

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie

Studijní program: Reprodukční a vývojová biologie



Bc. Kateřina Bajerová

Expres a lokalizace integrinů alfa V a alfa 3 v samčích germinálních buňkách u vybraných druhů savců

Expression and localization of alpha V and alpha 3 integrins in male germ cells of selected mammalian species

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Michaela Frolíková, Ph.D.

Praha 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a 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, 3.1.2022

.....

Kateřina Bajerová

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Michaele Frolíkové, Ph.D. za odborné vedení, čas a cenné rady poskytované po dobu mého působení v laboratoři. Dále děkuji Mgr. Veronice Páleníkové za přátelskou podporu, ochotu, čas a rady, které byly při práci na mém diplomovém projektu k nezaplacení. Děkuji také dalším členům Laboratoře reprodukční biologie, především Ondřeji Šanovci a Monice Vlčkové, za spolupráci a vytvoření přátelského pracovního kolektivu. Ráda bych také poděkovala své rodině za velkou podporu při studiu.

Abstrakt

Integriny jsou transmembránové glykoproteiny zprostředkující adhezi buněk a jejich komunikaci s extracelulární matrix. Přítomnost integrinových podjednotek byla popsána nejen na somatických buňkách, ale i na oocytech a spermiích. V plazmatické membráně vajíčka se integriny společně s dalšími proteiny z rodiny tetraspaninů podílejí na formování rozsáhlých molekulárních sítí. Obdobné struktury byly v posledních letech odhaleny i na spermii. Zatímco úloha integrinů na vajíčku byla v minulosti intenzivně studována, o přítomnosti a funkci těchto molekul na spermii se toho ví mnohem méně. V rámci této diplomové práce jsme se zaměřili na studium exprese a lokalizace integrinu alfa V a alfa 3 na akrozom-intaktních spermiích a porovnali vzájemné mezidruhové rozdíly u myši, kance a člověka. U integrinu alfa V jsme dále popsali změny v jeho lokalizaci po akrozomální reakci, která je důležitou součástí maturace spermií. Pomocí konfokální mikroskopie jsme integrin alfa V na akrozom-intaktních spermiích u všech námi studovaných druhů lokalizovali v oblasti akrozomu, a po akrozomální reakci jsme detekovali jeho přesun do postakrozomální oblasti a do ekvatoriálního segmentu. Použití imunodetekce ukázalo klesající expresi integrinu alfa V u kapacitovaných a akrozom-zreagovaných spermií. Integrin alfa 3 byl na akrozom-intaktních spermiích myši detekován v oblasti akrozomu, na rozdíl od lidských a kančích spermií, kde se nachází v postakrozomální oblasti a v ekvatoriálním segmentu. Lokalizace integrinových podjednotek alfa V a alfa 3 v klíčových oblastech spermie ukazuje na jejich možnou roli při interakci spermie s oocytem, a vybízí k dalšímu výzkumu těchto proteinů.

Klíčová slova: integrin alfa V, integrin alfa 3, spermie, germinální buňky, akrozomální reakce

Abstract

Integrins are transmembrane glycoproteins mediating cell-cell adhesion and ensuring communication between extracellular matrix and cell cytoskeleton. The presence of integrin subunits has already been described on somatic cells, as well as on oocytes and sperm cells. In oocyte plasma membrane, integrins together with tetraspanins are involved in the formation of vast molecular webs. Analogical structures have been recently discovered in sperm plasma membrane as well. While the role of integrins on oocyte has been researched quite extensively, there is much less known about its presence and function on sperm. This Master's thesis focuses on expression and localization of integrins alpha V and alpha 3 on acrosome-intact sperm and its comparison between mouse, pig and human sperm cells. Furthermore, this thesis also describes relocation of the alpha V integrin after the acrosome reaction, which is an essential step of sperm maturation. Using confocal microscopy, the alpha V integrin localization was detected in acrosomal cap area of acrosome-intact sperm of all selected species. After acrosome reaction, the alpha V integrin relocated and was depicted in postacrosomal region and equatorial segment of acrosome-reacted sperm. Immunodetection revealed a decreasing expression of the alpha V integrin in capacitated and acrosome-reacted sperm. The alpha 3 integrin localization was detected in acrosomal cap area of acrosome-intact mouse sperm. On the contrary, in human and pig sperm the alpha 3 integrin was detected in postacrosomal region and equatorial segment. Localization of the alpha V and alpha 3 integrins in key areas of sperm head refer to their potential role in sperm-egg membrane interaction and encourage future research of this topic.

Key words: integrin alpha V, integrin alpha 3, sperm, germ cells, acrosome reaction

Seznam použitých zkratk

ADAM	protein obsahující doménu disintegrin a metaloproteinázu
AR	akrozomální reakce
ATP	adenosintrifosfát
CD	diferenciační skupina
ECM	extracelulární matrix
EGF	epidermální růstový faktor
ES	ekvatoriální segment
FIMP	fertilization influencing membrane protein
IAM	vnitřní akrozomální membrána
IVF	<i>in vitro</i> fertilizace
kDa	kilodalton – jednotka molekulární hmotnosti
OAM	vnější akrozomální membrána
PAR	postakrozomální region
PLA	proximity ligation assay
PM	plazmatická membrána
PNA	lektin z podzemnice olejné (PNA = peanut agglutinin)
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsíranu sodného
SIM	mikroskopie se strukturovaným osvětlením
SOF1	sperm-oocyte fusion required 1 protein
SPACA6	sperm acrosome associated 6 protein
TMEM95	transmembrane protein 95
ZP	<i>zona pellucida</i>
ZP1-4	glykoprotein <i>zona pellucida</i> 1-4
ZPBP1	<i>zona pellucida</i> binding protein 1

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Literární přehled	11
2.1. Stavba spermie	11
2.1.1. Hlavička	11
Akrozom.....	13
2.1.2. Krček.....	13
2.1.3. Bičík.....	13
2.2. Příprava spermie na oplození.....	14
2.2.1. Epididymální maturace a ejakulace	14
2.2.2. Kapacitace.....	14
2.2.3. Akrozomální reakce	15
2.3. Adheze a fúze gamet.....	17
2.4. Integriny	18
2.4.1. Struktura integrinu	19
2.4.2. Integriny na gametách.....	20
2.4.3. Tetraspaninové sítě na gametách	20
2.4.4. Integrin alfa V.....	21
2.4.5. Integrin alfa 3.....	22
3. Cíle diplomového projektu	23
4. Materiál a metody	24
4.1. Materiál.....	24
4.1.1. Modelové organismy	24
4.1.2. Roztoky.....	24
4.1.3. Chemikálie	24
4.1.4. Protilátky.....	25
Primární protilátky	25
Sekundární protilátky	25
4.1.5. Materiál pro práci s proteiny.....	26
4.1.6. Přístroje.....	27
4.1.7. Další materiál.....	27
4.2. Metody	28
4.2.1. Izolace a příprava vzorků spermií.....	28

4.2.2.	Kapacitace <i>in vitro</i>	29
4.2.3.	Indukce akrozomální reakce	30
4.2.4.	Příprava suspenze testikulárních buněk	30
4.2.5.	Imunofluorescenční barvení	31
	Blokace	31
	Primární protilátka.....	31
	Sekundární protilátka	31
	Montování	32
	Mikroskopie.....	32
4.2.6.	Metody práce s proteiny	32
	Příprava lyzátů.....	32
	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)	33
	Western blot	34
	Imunodetekce proteinů	34
	Optimalizace protokolu pro alfa 3 integrin	35
4.2.7.	Statistická vyhodnocení	35
5.	Výsledky	36
5.1.	Integrin alfa V	36
5.2.	Integrin alfa 3	46
5.3.	Kontrola kapacitace lidských spermií	50
6.	Diskuze	51
6.1.	Alfa V integrin	53
6.2.	Alfa 3 integrin	57
7.	Závěr.....	60
8.	Seznam použité literatury	61

1. Úvod

Proces oplození u savců je navzdory rozsáhlému výzkumu stále ne zcela objasněným dějem. V současnosti jsou již známy některé z molekulárních mechanismů realizujících zrání gamet a jejich přípravu na oplození. Stále ale postrádáme detailní znalosti o molekulárních změnách při vzájemné interakci gamet, jejich adhezi a následné fúzi.

Integriny jsou transmembránové proteiny, které zprostředkovávají adhezi mezi buňkami a mezi buňkou a extracelulární matrix. Jsou to buněčné receptory, které umožňují vzájemnou signalizaci buňky a extracelulární matrix, a to oběma směry, tedy zevnitř buňky do extracelulárního prostředí a naopak (Schwartz et al., 1995; Hynes, 2002). Společně s tetraspaniny participují na tvorbě multimolekulárních komplexů, tzv. tetraspaninových sítí, které zajišťují kompartmentalizaci a reorganizaci membrán (Berditchevski et al., 1996; Rubinstein et al., 1996; Boucheix a Rubinstein, 2001). Tetraspaninové sítě se dále pravděpodobně významnou měrou podílí na trans interakcích mezi membránou oocyty a spermie (Chen a Sampson, 1999; Takahashi et al., 2001; Zhu a Evans, 2002). Integriny jsou nezbytnou součástí těchto sítí, jelikož umožňují vazbu tetraspaninů, jejich vzájemnou komunikaci a interakci s cytoskeletem (Serru et al., 1999; Berditchevski F., 2001). Integriny se pravděpodobně význačně podílí na interakci spermie a oocyty (Sueoka et al., 1997; Fénichel et al., 1999; Zhu and Evans, 2002; Barraud-Lange et al., 2007). Přítomnost a funkce těchto receptorů byly intenzivně studovány především na oocyty, kde byla pozorována tvorba klastrů integrinů, jejich interakce v rámci tetraspaninových sítí a zapojení při interakci gamet (Campbell et al., 1995; Evans et al., 1995a; Ziyat et al., 2005, 2006). Taktéž na spermii byla popsána přítomnost mnoha integrinů a tetraspaninů a jejich vzájemných interakcí (Barraud-Lange et al., 2007; Frolikova et al., 2018, 2019; Jankovicova et al., 2020). Existence obdobných struktur jako jsou tetraspaninové sítě oocyty se tedy předpokládá i na spermii, stejně jako jejich zapojení při adhezi gamet. V současnosti ale není funkce integrinů na spermii dostatečně popsána a je tedy potřeba dalšího výzkumu.

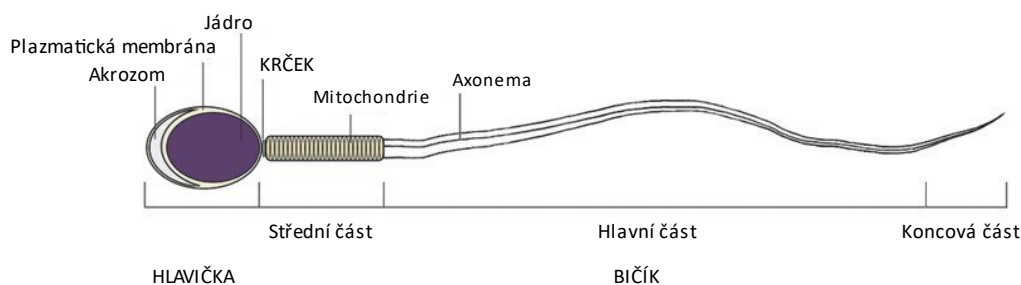
V samičím reprodukčním traktu prochází spermie zásadním maturačním procesem zvaným kapacitace, který následně vrcholí tzv. akrozomální reakcí (Yanagimachi, 1981). V průběhu kapacitace dochází k aktivaci mnohých signálních drah a ke změně složení membrán (Yanagimachi, 1994). Výsledkem kapacitace je hyperaktivace spermie, která zapříčiní výraznou progresivní motilitu spermie a tím jí umožní doputovat oviduktem k oocyty (Demott and Suarez, 1992). Následně je iniciována akrozomální reakce (AR), která

spermii umožní projít *zona pellucida* (ZP), glykoproteinovým obalem oocytu, a interagovat s plazmatickou membránou oocytu neboli oolemou (Barros et al., 1967; Lin et al., 1994). Akrozomální reakce je indukovaná exocytóza akrozomu, při které dochází k vylití akrozomálních enzymů do okolí a k membránové reorganizaci na hlavičce spermie. Dochází k přesunu klíčových proteinů na povrch do fúzogenní domény hlavičky spermie (Bedford et al., 1979; Cardullo a Florman, 1993; Spungin et al., 1995). Právě vystavení proteinů původně uzavřených v akrozomu extracelulárnímu prostředí a jejich přesun do fúzogenní domény hlavičky spermie po akrozomální reakci jsou klíčové děje, které těmto proteinům umožňují se později účastnit vzájemné interakce povrchových membrán spermie a oocytu a realizovat jejich adhezi a fúzi (Bedford et al., 1979; Satouh et al., 2012). Na otázku, jaké mechanismy se v tuto chvíli odehrávají a které molekuly se jich účastní, zatím neznáme přesnou odpověď, nicméně se ukazuje, že integriny ve spolupráci s tetraspaniny a dalšími receptory jsou součástí tohoto procesu. Detekce integrinů alfa V a alfa 3 na spermii, popis relokace integrinu alfa V po akrozomální reakci a jejich mezidruhové porovnání u myši, kance a člověka, by mohly pomoci objasnit, zda jsou tyto integriny vhodnými kandidátními molekulami pro účast na interakci membrán obou gamet a zda by nebylo vhodné je využít jako nový proteinový marker kvality spermií.

2. Literární přehled

2.1. Stavba spermie

Samčí zárodečná buňka neboli spermie je vysoce specializovaná haploidní buňka, která vzniká v semenotvorných kanálcích varlat v procesu zvaném spermatogeneze. Zralá spermie je složena z hlavičky, spojovacího oddílu neboli krčku a bičíku (Obr. 1) (Fawcett, 1975).



Obr. 1: Stavba spermie, upraveno (Rothmann a Bort, 2018)

2.1.1. Hlavička

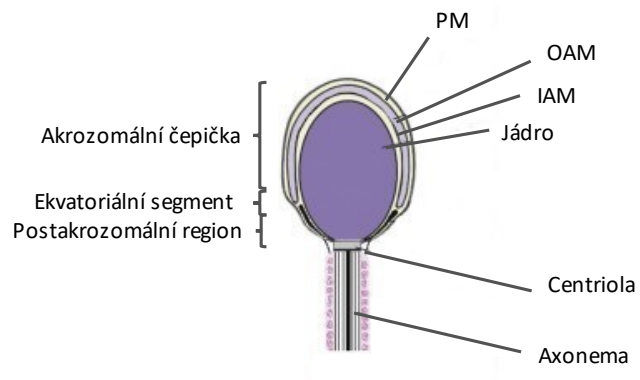
Hlavička spermie je atypická struktura, kterou nalezneme pouze u spermie. Její velikost a tvar, a stejně tak i velikost a tvar přítomných organel, jsou mezi jednotlivými druhy vysoce variabilní (Gage, 1998). U savců nacházíme spermie s hlavičkami kulatými (člověk), oválnými (kanec) a falciformními, tzn. ve tvaru srpku s typickým apikálním háčkem (Obr. 3), které jsou typické pro hlodavce (myš) (Yanagimachi, 1981; Eddy a O'Brien, 1994).

Na plazmatické membráně hlavičky spermie rozlišujeme 3 oblasti, a to akrozomální doménu, ekvatoriální segment (ES) a postakrozomální region (PAR) (Obr. 2, 3 a 4) (Fawcett, 1975). Tyto domény mají odlišné proteinové složení v závislosti na jejich funkci a liší se např. i poměrným zastoupením sterolů, fosfolipidů a glykoproteinů (Bearer a Friend, 1990). V průběhu maturace spermie navíc dochází k mnoha dalším změnám ve složení membrán u jednotlivých membránových domén. Plazmatická membrána (PM) akrozomální domény slouží především k udržení stability akrozomu, a tedy k zabránění předčasné AR (Benoff, 1997). Pro fúzi spermie a oocyty je zásadní výsledné složení membrány ekvatoriálního segmentu, což je fúzogenní doména hlavičky klíčová pro správný průběh fúze membrán obou gamet (Yanagimachi, 1994).

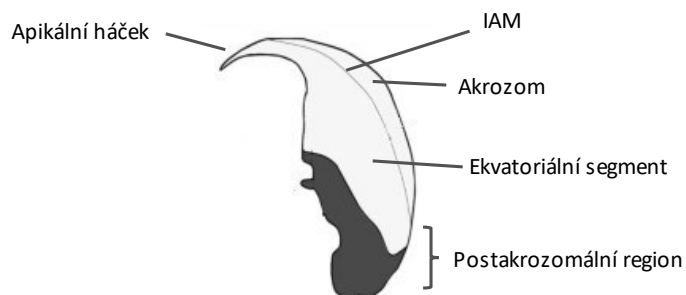
Po téměř celé délce hlavičky spermie se z posteriorní části rozpíná jádro, které je ohraničené jadernou membránou a obsahuje vysoce kondenzovaný chromatin (Poccia, 1986).

Spermie vzniká meiotickým dělením, obsahuje tedy pouze jednu sadu chromozomů.

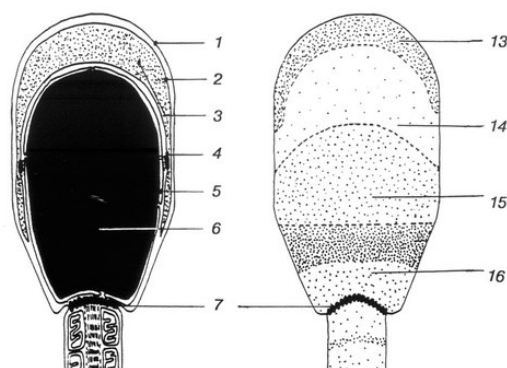
Druhou organelou hlavičky, nacházející se na anteriorní části, je akrozom.



Obr. 2: Hlavička lidské spermie, upraveno (Rothmann a Bort, 2018)



Obr. 3: Hlavička myší spermie, upraveno (Medarde et al., 2013)



Obr. 4: Hlavička kančí spermie. (1) PM, (2) OAM, (3) akrozomální matrix, (4) IAM, (5) jaderná membrána, (6) jádro, (7) krček, (13) apikální akrozom, (14) pre-ekvatoriální akrozom, (15) ekvatoriální segment, (16) PAR, převzato (Gadella et al., 2008)

Akrozom

Akrozom je velice unikátní organela, jejíž poškozením či chybným vývinem spermie ztrácí schopnost oplodnit oocyt (Dam et al., 2007). Rozlišujeme jej na anteriorní akrozomální čepičku, představující akrozomální doménu a na ES na posteriorní části (Yanagimachi, 1994). Je tvořený akrozomální membránou rozdělenou na dva kompartmenty – vnitřní (IAM) a vnější (OAM) akrozomální membránu (Obr. 2 a 4). Vnější akrozomální membrána leží pod plazmatickou membránou a vnitřní akrozomální membrána obklopuje jadernou membránu (Buffone et al., 2008). Vzájemně se liší jak svým složením, tak svou funkcí při oplození (Bearer a Friend, 1990). Akrozom je narušen při akrozomální reakci, kdy dochází k mnohonásobnému splynutí OAM a plazmatické membrány spermie. AR je z vnějšího prostředí indukovaná exocytóza akrozomu, při které se obsah akrozomu uvolní do okolního prostředí a umožní tak spermii průchod extracelulárními obaly oocytu (Barros et al., 1967; Cardullo a Florman, 1993; Spungin et al., 1995). Akrozom vzniká na anteriorní části hlavičky z váčků Golgiho aparátu a PM v průběhu spermiogeneze, což je proces dokončující vývoj spermatid ve spermie (Tang et al., 1982; Berruti a Paiardi, 2011). Je to organela podobající se lysozomu, obsahuje totiž mimo jiné hydrolytické enzymy typické právě pro lysozomy (Allison a Hartree, 1970). Byly zde ale identifikovány i enzymy specifické pouze pro akrozom, jako je serinová proteáza akrosin štěpící glykoproteiny ZP a spermatická hyaluronidáza, která štěpí kyselinu hyaluronovou v extracelulární matrix (Baba et al., 1989; Kim et al., 2005).

2.1.2. Krček

Postakrozomální oblast hlavičky spermie navazuje na krček, který propojuje hlavičku s bičíkem. Nachází se zde proximální centriola a basální destička kotvící axonemu bičíku, který vznikl v průběhu spermiogeneze z distální centrioly (Eddy a O'Brien, 1994).

2.1.3. Bičík

Bičík je nezbytnou strukturou pro pohyblivost spermie, tzv. motilitu. Krček přechází v část bičíku zvaný „mid-piece“, tedy střední část. To je rozšířená oblast bičíku, který je zde obklopen tzv. mitochondriální pochvou. Nalezneme zde veliké množství mitochondrií umožňující oxidativní fosforylaci produkující adenosintrifosfát (ATP), který spermie využívá k pohybu bičíku (Yanagimachi, 1994). Následuje dlouhá hlavní část bičíku a část koncová.

Bičík je tvořený mikrotubulární strukturou tzv. axonemou. Axonema je tvořena kruhovitým uspořádáním devíti párů mikrotubulů s centrálním párem uprostřed (Fawcett, 1975). Mikrotubuly využívají molekulární motory dyneiny, které generují pohyb bičíku.

2.2. Příprava spermie na oplození

2.2.1. Epididymální maturace a ejakulace

Spermie, které dokončí spermatogenezi, putují z varlete do nadvarlete neboli *epididymis*. Takové spermie nejsou schopné interagovat s oocytem a nemají schopnost progresivní motility (Gatti et al., 2004). Epididymis dělíme na tři části – *caput*, *corpus* a *cauda*. Při průchodu nadvarletem spermie prochází epididymální maturací a v *cauda* jsou maturované spermie shromažďovány. V epididymis dochází k navázání dekapacitačních faktorů, které stabilizují PM a inhibují předčasnou akrozomální reakci. Kromě vazby dekapacitačních faktorů dochází i k dalším úpravám složení membrány (Saxena et al., 2002; Dacheux et al., 2003). Maturační prostředí nadvarlete je vytvořeno pomocí specializovaných membránových váčků, tzv. epididysomů (Sullivan et al., 2005; Caballero et al., 2011). Pomocí epididysomů jsou na spermii dopraveny enzymy a proteiny, které se různými způsoby naváží na PM spermie, i transmembránové proteiny, které jsou inkorporovány do PM (Kirchhoff et al., 1996; Martin-Deleon, 2015). Spermie se v průběhu epididymální maturace stávají motilními (Soler et al., 1994; van der Horst et al., 1999). Následně jsou spermie ejakulovány a prochází samičím rozmnožovacím ústrojím až do istmické části oviduktu. Při ejakulaci spermie váží ze semenné plazmy další dekapacitační faktory a proteiny, které interagují se sacharidy oviduktálního epitelu a tvoří tak oviduktální rezervoár spermií (Lefebvre et al., 1995; Suarez, 1998; Petrunkina et al., 2001). Rezervoár slouží k selekci spermií, prodloužení jejich setrvání v oviduktu a synchronizaci kapacity spermie s ovulací oocyty, tedy ke zvýšení šance úspěšného oplození (Hunter, 1996; Töpfer-Petersen et al., 2002).

2.2.2. Kapacitace

Z istmu vejcovodu jsou uvolňovány spermie, které jsou kapacitované a hyperaktivované (Demott a Suarez, 1992). Kapacitace je řada změn, jejichž výsledkem je progresivně motilní spermie, která je plně kompetentní podstoupit AR a oplodnit oocyt (Austin, 1951; Chang, 1951). Dochází ke změnám na membráně spermie, ve složení

cytoplazmy a k následné hyperaktivaci spermie (Yanagimachi, 1994). Hyperaktivované spermie mají výrazně zvýšenou schopnost progresivní motility a je pro ně typické intenzivní asymetrické kmitání bičíku (Demott a Suarez, 1992). Orientace pohybu kapacitované a hyperaktivované spermie je dána chemoatraktanty, ale také termotaxí, do proximální části oviduktu zvané *ampulla* (Eisenbach, 1999; Bahat a Eisenbach, 2006). Hyperaktivace je stav spermie nezbytný pro průnik obaly oocyty (Stauss et al., 1995).

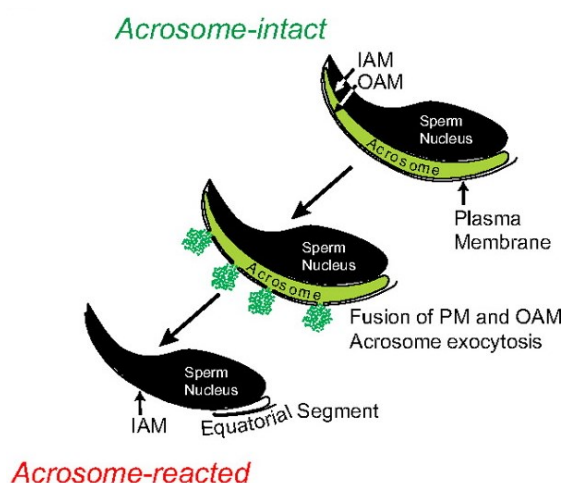
Membránové změny při kapacitaci zahrnují odloučení dekapacitačních faktorů a eflux cholesterolu vedoucí ke zvýšení fluidity PM. Iontové kanály nacházející se v PM jsou otevírány, což vede ke změně koncentrace intracelulárních iontů, především ke zvýšení koncentrace Ca^{2+} a HCO_3^- , a PM je hyperpolarizována (Okamura et al., 1988; Ruknudin a Silver, 1990; Harrison et al., 1996). Dochází k významné tyrosinové fosforylaci proteinů a aktivaci řady signálních kaskád (Visconti et al., 1995; Krapf et al., 2010). Je iniciována polymerace aktinu v kortikálním cytoskeletu, který upevní membránové proteiny a navíc fyzicky brání kontaktu PM a OAM a jejich fúzi (Brenner et al., 2003). Funkční receptory pro rozpoznání oocyty jsou v průběhu kapacitace agregovány v apikální části hlavičky (van Gestel et al., 2005). Všechny tyto změny vedou ke stavu spermie, kdy je připravena na AR (Fraser, 1998).

2.2.3. Akrozomální reakce

Kapacitované spermie s intaktním akrozomem musí při dosažení oocyty projít jeho extracelulárními obaly, k čemuž je nutné podstoupit AR. Akrozomální reakce je esenciální součástí oplození, bez kterého spermie nejsou fertilizace schopné. Je to proces indukované exocytózy akrozomu, při které dochází k mnohonásobnému splynutí OAM a PM spermie a sekreci obsahu akrozomu do okolí (Obr. 5) (Barros et al., 1967). Indukce AR je uskutečněna kontaktem se ZP, glykoproteinovým obalem oocyty (Cross et al., 1988; Chamberlin a Dean, 1990; Florman, 1994). U myši byla popsána AR indukovaná kontaktem s kumulárními buňkami obklopujícími oocyt (Jin et al., 2011). Kumulární buňky jsou součástí expandovaného kumulu, který chrání oocyt a reguluje spermie pronikající k oocyty. Spermie pomocí hyaluronidázové domény PH-20 na PM a akrozomální hyaluronidázy aktivované po AR štěpí hyaluronan kumulu a prostupují k ZP (Lin et al., 1994; Kim et al., 2005). *In vitro* pozorujeme v médiu bez induktoru i spontánní AR spermií, které jsou poté plně schopné fertilizace oocyty (Mortimer et al., 1989).

K iniciaci AR dochází primární vazbou spermie na oligosacharidy ZP3 glykoproteinu

u myši (Bleil a Wassarman, 1980), a ZP1, ZP3 či ZP4 glykoproteinů u člověka (Chiu et al., 2008; Ganguly et al., 2010). Vazba způsobí řadu paralelně probíhajících dějů, které v konečném důsledku uskuteční akrozomální reakci. Při indukci jsou aktivovány G-proteiny, nastává zvýšení intracelulárního pH, PM je depolarizována a je aktivováno otevření iontových kanálů PM, čímž naroste koncentrace Ca^{2+} . Dochází k fosforylaci proteinů a aktivaci signálních kaskád (Spungin a Breitbart, 1996; Arnoult et al., 1999). Influxem Ca^{2+} je způsobena aktivace „aktin-severing“ proteinu zvaného gelsolin, a následný rozpad kortikálního aktinového cytoskeletu spermie (Spungin et al., 1995; Brener et al., 2003), který iniciuje relokaci klíčových proteinů spermie participujících na adhezi a fúzi s membránou oocyty (Bedford et al., 1979). Tyto změny vedou k tvorbě fúzogenních lipidů a ke vzniku fúzogenních domén na membráně spermie, které umožní následnou mnohonásobnou fúzi PM a OAM. Na spermii je po fúzi PM a OAM odhalena IAM, na které jsou lokalizovány vazebné receptory (Cardullo a Florman, 1993; Spungin et al., 1995). Obsah akrozomu je sekretován do okolí a probíhá sekundární vazba spermie na ZP. Mezi zúčastněné proteiny patří např. ZPBP1 (*zona pellucida* binding protein 1) (Mori et al., 1993), zonadhesin (Hardy a Garbers, 1995), či zmíněný akrosin (Baba et al., 1989). Akrosin zprostředkovává tuto sekundární vazbu s glykoproteinem ZP2, a svou proteolytickou aktivitou spolu s dalšími hydrolytickými enzymy štěpí glykoproteiny ZP, a umožňuje tak průnik tímto glykoproteinovým obalem do perivitellinního prostoru k membráně oocyty (Lin et al., 1994; Kim et al., 2005; Howes et al., 2008).



Obr. 5: Schéma akrozomální reakce, převzato (Avella a Dean, 2011)

2.3. Adheze a fúze gamet

U akrozom-zreagované spermie, která pronikne do perivitellinního prostoru oocyty, může být iniciována fúze membrán obou gamet. Jedná se o komplexní proces, kterého se účastní mnoho vzájemně interagujících proteinů. Fúze je realizována proteiny fúzogenní domény hlavičky spermie – ekvatoriálního segmentu, která vznikla relokací klíčových proteinů po AR (Bedford et al., 1979; Takano et al., 1993; Sosnik et al., 2009). Právě ekvatoriální segment je oblastí prvního kontaktu gamet (Yanagimachi, 1994). Na oocyty je fúzogenní doménou oolemy oblast bohatá na microvilli (Ebensperger a Barros, 1984).

Primárním fúzním proteinem spermie je protein Izumo1 z imunoglobulinové rodiny typu 1 (Inoue et al., 2005). Izumo1 je po AR přemístěn z akrozomálních membrán do ekvatoriálního segmentu, kde zajišťuje prvotní nescifickou adhezi gamet (Sosnik et al., 2009). Jedná se o esenciální receptor spermie – Izumo1 deficientní myši jsou neplodné (Inoue et al., 2005). Receptorem tohoto proteinu na oocyty je Juno (Bianchi et al., 2014), který je záhy vyvázan z membrány oocyty (Bianchi a Wright, 2014).

Adheze spermie se u myši účastní proteiny z ADAM rodiny. Fertilin β (ADAM2) obsahuje disintegrinovou doménu, kterou může vázat integriny (Evans et al., 1995b). Původní hypotéza, že fertilin β váže integrin $\alpha 6\beta 1$ oocyty (Chen a Sampson, 1999), má v různých studiích s rozdílnou metodikou rozporuplné výsledky (Almeida et al., 1995; Evans et al., 1997). Knock-out tohoto proteinu u samců myši ale způsobuje neplodnost a je tedy pravděpodobně dalším proteinem nezbytným pro oplození (Cho et al., 1998). Avšak je možné, že je na oocyty přítomný jiný integrinový heterodimer, který s fertilinem β asociuje, např. $\alpha 5\beta 1$ (Tarone et al., 1993), nebo takový, který nebyl zatím popsán. Integrin $\alpha 6\beta 1$ na oocyty interaguje s tetraspaninem CD9 a je redistribuován a akumulován v místě vazby spermie (Ziyyat et al., 2006). Samotný protein CD9 je významným receptorem oocyty účastnícím se vazby spermie, a asociací s dalšími tetraspaniny a přítomnými proteiny zprostředkovává fúzi (Miyado et al., 2000; Runge et al., 2007; Chalbi et al., 2014).

Nedávný výzkum odhalil u myši další 4 fúzní proteiny, jejichž narušená exprese způsobuje neplodnost. Jsou to proteiny SOF1 (Noda et al., 2020), SPACA6 (Barboux et al., 2020; Noda et al., 2020), FIMP (Fujihara et al., 2020) a TMEM95 (Lamas-Toranzo et al., 2020; Noda et al., 2020). Hypotéza, že se jedná o fúzní proteiny, a že při oplození nemají jinou funkci, byla potvrzena, jelikož jejich knock-out spermie byly pozorovány pod ZP, neschopné fúze s membránou oocyty (Fujihara et al., 2020). Další proteiny, které se účastní

adheze a fúze membrán, ani způsoby, jakými spolu interagují, prozatím nejsou popsány. Mezi významné kandidátní proteiny patří právě integriny.

2.4. Integriny

Integriny jsou buněčné adhezní receptory, které zprostředkovávají adhezi mezi dvěma buňkami, a které zajišťují vzájemnou komunikaci mezi buňkou a extracelulární matrix (ECM) (Hynes, 1987). Buněčná adheze je nezbytným dějem pro diferenciaci buněk, imunitní systém či hojení poranění, může být ale také patogenní např. při vzniku a expanzi nádorů. (Hynes, 1987; Abram a Lowell, 2009; Rybinski et al., 2014). Integriny jsou přítomny u téměř všech buněčných typů a pro každý je typická exprese specifických integrinových podjednotek a jejich kombinace (Teitelbaum, 2000; Burns et al., 2002; Humphries et al., 2006).

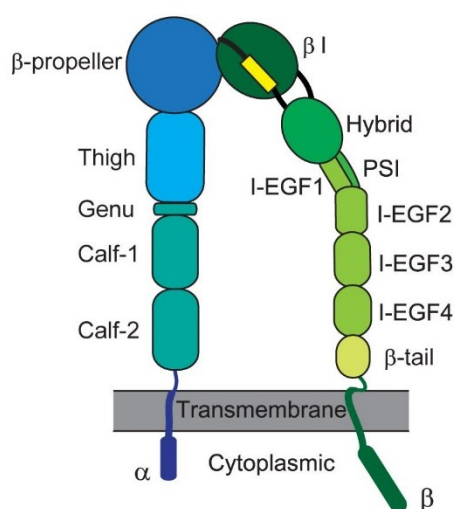
Integriny umožňují spojení extracelulární matrix s buněčným cytoskeletem, především s aktinovými filamenti. Mají schopnost aktivace intracelulárních signálních drah v reakci na podnět ECM z vnějšího prostředí, a jsou navíc schopné přenášet signál oběma směry. Intracelulární signál tak může ovlivnit schopnost integrinu vázat extracelulární ligand (Schwartz et al., 1995). Na základně aktivace těchto signálních drah pak může být uskutečněna adheze buněk, jejich migrace, růst, apoptóza apod (Frisch a Francis, 1994; Meredith a Schwartz, 1997; Vicente-Manzanares et al., 2009). Integriny samotné ale nemají katalytickou aktivitu a nejsou tedy schopné signál přenášet. Pro jejich funkci je proto nutná aktivita adaptorových proteinů, které vazbu na cytoskelet zprostředkují, a zároveň i regulují. Mezi ně patří např. talin, kindlin, α -actinin a další (Tadokoro et al., 2003; Calderwood, 2004; Kadry a Calderwood, 2020). Vazbou ligandů či adaptorových proteinů je indukována konformační změna integrinu, která zvýší jeho afinitu k ligandu a může také vyvolat klastrování integrinů (Morse et al., 2014). Klastrování je umožněno interakcí transmembránových domén stejného typu podjednotek, tzv. homotypickou oligomerizací transmembránových domén. Tyto klastry integrinů umožňují vznik hemidesmosomů a fokálních adhezí (Li et al., 2003).

Integriny jsou složeny ze dvou glykoproteinových podjednotek, alfa a beta. Podjednotky jsou nekovalentně spojeny a tvoří heterodimery. V současné době je u savců známo 24 kombinací alfa a beta podjednotek a specifita těchto receptorů závisí právě na kombinaci podjednotek tvořících heterodimer (Hynes, 2002). Integriny dělíme na kolagenní, lamininové, RGD – specifické receptory a receptory leukocytů. Mezi proteiny ECM

obsahující RGD sekvenci, tedy triplet arginin, glycin a kyselina asparagová, patří např. fibronektin či vitronektin (Humphries et al., 2006).

2.4.1. Struktura integrinu

Integriny jsou proteiny s konzervovanou strukturou napříč živočišnými druhy. Integrinové podjednotky (Obr. 6) jsou složeny z mohutné extracelulární části, transmembránové helixové domény a z cytoplazmatické C-terminální domény interagující s adaptorovými proteiny regulujícími aktivitu integrinu. Ta je u alfa podjednotky výrazně kratší, větší množství vazebných proteinů je tak vázáno na cytoplazmatickou doménu beta podjednotky (Gupta et al., 2008). Extracelulární část alfa podjednotky obsahuje hlavovou ligand vazebnou β -propeller doménu, a „leg“ region složený z thigh, calf1 a calf2 domén. Na extracelulární β -propeller doméně se může nacházet ještě α I doména, která obsahuje místo pro vazbu kovových iontů MIDAS (metal-ion dependent adhesion site). Extracelulární část podjednotky beta je složena z hlavové PSI domény, hybridní domény a z ligand vazebné domény β I. Doména β I spolu s β -propeller doménou alfa podjednotky zprostředkovává vazbu ligandu (Plow et al., 2000; Kadry a Calderwood, 2020). Tato doména obsahuje místa pro vazbu kationtů Mg^{2+} a Ca^{2+} , která slouží ke koordinaci vazby ligandu – MIDAS a vazebné místo jemu přilehlé ADMIDAS. Noha beta podjednotky je tvořena čtyřmi repeticemi epidermálního růstového faktoru (EGF) bohatými na cystein a β tail doménou (Amin Arnaout et al.; Campbell a Humphries, 2011).



Obr. 6: Struktura integrinových podjednotek, převzato (Park et al., 2020)

2.4.2. Integriny na gametách

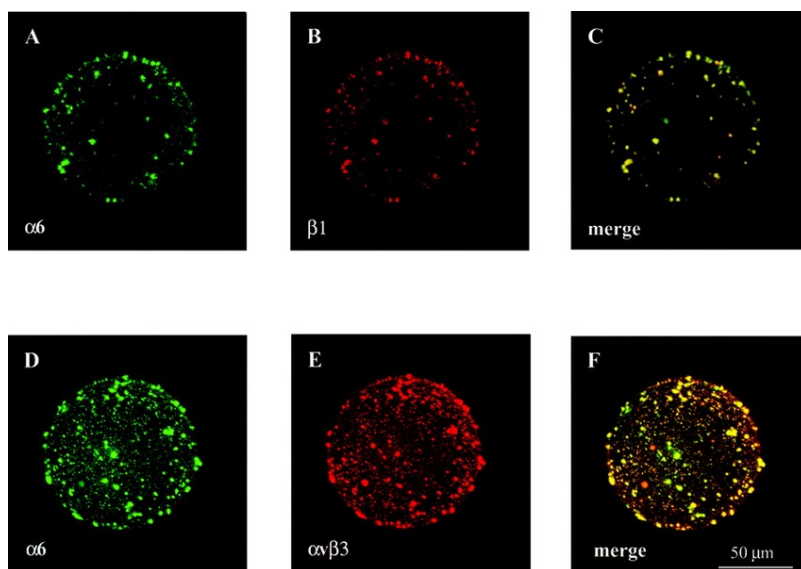
Předmětem výzkumu lokalizace integrinů na savčích gametách byly zpočátku především oocyty. Zde bylo identifikováno hned několik alfa a beta podjednotek i jejich heterodimerů, napříč různými druhy živočichů a bylo prokázáno, že se podílí na oplození (Tarone et al., 1993; Evans et al., 1995a; Linfor a Berger, 2000; Ziyat et al., 2005). Poté se pozornost zaměřila i na identifikaci integrinů na spermiích, kde bylo popsáno 5 alfa podjednotek a 3 beta podjednotky. Jedná se o podjednotky alfa 3 (Klentzeris et al., 1995; Glander et al., 1998; Frolikova et al., 2016, 2019; Jankovicova et al., 2020), alfa 4 (Klentzeris et al., 1995; Glander et al., 1998), alfa 5 (Klentzeris et al., 1995; Fusi et al., 1996; Glander et al., 1998), alfa 6 (Klentzeris et al., 1995; Glander et al., 1998; Frolikova et al., 2019), alfa V (Fusi et al., 1996; Glander et al., 1998; Palenikova et al., 2021), beta 1 (Fusi et al., 1996; Frolikova et al., 2016, 2019), beta 3 (Fusi et al., 1996; Glander et al., 1998) a beta 4 (Glander et al., 1998; Frolikova et al., 2019), jejichž lokalizace v jednotlivých kompartmentech hlavičky spermie byla graficky znázorněna a popsána v souhrnném článku Merc a kol. (2021).

Integriny asociují s dalšími transmembránovými proteiny – tetraspaniny, a jsou součástí multimolekulárních komplexů tetraspaninů a dalších receptorů (Berditchevski F., 2001).

2.4.3. Tetraspaninové síť na gametách

Tetraspaniny jsou transmembránové proteiny, které mohou asociovat s jinými proteiny a také s dalšími tetraspaniny, a tvořit na membránách multimolekulární komplexy zvané tetraspaninové síť. Tetraspaniny se tímto způsobem podílí na kompartmentalizaci membrán a jejich reorganizaci, relokaci proteinů, které jsou součástí sítě a jejich akumulaci v požadované oblasti (Odintsova et al., 2003; Termini a Gillette, 2017). Tak je tomu i na oocytu, kde byl lokalizován uvedený tetraspanin CD9 (Miyado et al., 2000), tetraspanin CD81, který je rovněž proteinem účastnícím se fúze membrán (Takahashi et al., 2001), a CD151 (Ziyat et al., 2006). Tetraspaninové síť zde zajišťují nejen redistribuci a klastrování zmíněného integrinu $\alpha 6\beta 1$, ale pravděpodobně také klastrování integrinu $\alpha V\beta 3$ (Obr. 7) (Ziyat et al., 2005), proteinu Juno (Chalbi et al., 2014) a dalších receptorů oocytu v místě fúze. Tyto tetraspaniny byly identifikovány i na spermii a předpokládá se, že i zde tvoří obdobné multimolekulární síť a zprostředkovávají oplození (Ito et al., 2010; Jankovicova et

al., 2016, 2020). Nabízí se tedy otázka, zda i na spermii tetraspaniny tvoří tetraspaninové sítě, popř. jaké proteiny jsou v nich zapojeny, jak spolu interagují a jakou mají roli.



Obr. 7: Lokalizace integrinů na oocyty, převzato (Ziyyat et al., 2005)

2.4.4. Integrin alfa V

Integrin alfa V neboli CD51, kódovaný genem *ITGAV*, tvoří heterodimery s podjednotkami beta 1, beta 3, beta 5, beta 6 a beta 8. Řadí se mezi RGD-vazebné receptory a jeho ligandy jsou tedy proteiny obsahující sekvenci arginin, glycin a kyselina asparagová – fibronektin, vitronektin, fibrinogen či osteopontin (Hynes, 2002). Integriny složené z alfa V podjednotky byly popsány v mnoha tkáních a buněčných typech - např. na osteoklastech, makrofázích, na buňkách endotelu a fibroblastech (Gailit a Clark, 1996; Teitelbaum, 2000; Antonov et al., 2004). Podílí se na fyziologických dějích jako je resorpce kostí, neovaskularizace, hojení poranění, ale také na patologických dějích jako je proliferace nádorových tkání (Brooks et al., 1994; Breuss et al., 1995; Teitelbaum, 2000). Také v samčím reprodukčním ústrojí reguluje patologické procesy jako je progres rakoviny prostaty (Cooper et al., 2002). Tento integrin byl popsán i na oocyty, kde asociuje s podjednotkou beta 3 a interaguje s integrinem $\alpha 6\beta 1$ (Obr. 7) a tetraspaniny (Ziyyat et al., 2005). Na spermii byl integrin alfa V popsán u člověka (Fusi et al., 1996; Glander et al., 1998), myši (Boissonnas et al., 2010) a v recentní studii naší laboratoře byl lokalizován na spermii myši, člověka i kance (Palenikova et al., 2021).

2.4.5. Integrin alfa 3

Integrin alfa 3 neboli CD49c je produktem genu *ITGA3*. Tvoří heterodimer pouze s podjednotkou beta 1 a společně představují receptor rozeznávající primárně laminin (Humphries et al., 2006). Integrin $\alpha3\beta1$ je exprimován především na epiteliálních buňkách a je bohatě rozšířený v mnoha tkáních např. pak v plicích, v ledvinách či na keratinocytech v epidermis (Carter et al., 1990; Bartolazzi et al., 1993; Goldfinger et al., 1999). Tento protein je u člověka přítomný ve dvou izoformách, přičemž první izoforma je univerzálně rozšířená v celém organismu a druhá izoforma je specifická pro endoteliální buňky cév (de Melker et al., 1997). Integrin alfa 3 je bohatě glykosilován – obsahuje 15 glykosilačních míst. Tento integrin byl popsán jak na myším oocytu (Tarone et al., 1993), tak na spermii (Klentzeris et al., 1995; Glander et al., 1998), a to na PM a OAM v oblasti akrozomu (Frolikova et al., 2016, 2019; Jankovicova et al., 2020). U kance zatím nebyl alfa 3 integrin identifikován, jeho lokalizace byla tedy poprvé popsána v této práci.

3. Cíle diplomového projektu

Cílem této diplomové práce je detekce vybraných integrinových podjednotek, jejich lokalizace na samčích germinálních buňkách myši, kance a člověka a jejich mezidruhové porovnání.

- I. Detekce exprese a lokalizace integrinu alfa V a alfa 3 na akrozom-intaktní spermii vybraných druhů savců včetně člověka a porovnání případných vzájemných mezidruhových rozdílů.
- II. Popis relokace integrinu alfa V na spermii po indukované akrozomální reakci.

4. Materiál a metody

4.1. Materiál

4.1.1. Modelové organismy

Laboratorní myš (inbrední kmen C57BL/6, chov Ústavu molekulární genetiky AV ČR, BIOCEV)

Prase domácí (Inseminační stanice Skršín)

Spermie dárců (z center asistované reprodukce v Praze, s informovaným souhlasem)

4.1.2. Roztoky

PBS – fosfátový pufr pH 7,4

PBS + 0,05% Tween 20 (Bio-Rad)

Fyziologický roztok- 0,9% vodný roztok chloridu sodného (Sigma-Aldrich)

PFA – 3,2% a 4% paraformaldehyd, ředěn v PBS (Sigma-Aldrich)

4.1.3. Chemikálie

dH₂O

M2 medium (M7167, Sigma-Aldrich)

Sperm Preparation Medium (Origio)

Origio Sperm Wash (Origio)

Origio Gradient 40/80 (Origio)

Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer 10X (BioLegend)

TALP medium (Tyrode's albumin lactate pyruvate) (Sigma)

Sodium pyruvát (Sigma-Aldrich)

CaI – Calcium ionofor (A23187, Sigma-Aldrich)

Parafinový olej (P-LAB)

BSA – Bovinní sérum albumin (Sigma-Aldrich)

SuperBlock Blocking Buffer v PBS (37515, Thermo Fisher Scientific)

PFA – Paraformaldehyd 3,2% (Sigma-Aldrich)

PNA lectin Alexa Fluor 568 (Invitrogen)

Vectashield Antifade Mounting Medium with DAPI (H1200, Vector Laboratories)

Kolagenáza (C7657, Sigma-Aldrich)

DNáza I (Roche)

RPMI 1640 Medium (Thermo Fisher Scientific)

4.1.4. Protilátky

Primární protilátky

Anti- α -Tubulin antibody, mouse monoclonal, DM1A clone (T6199, Sigma-Aldrich)

Anti-alpha V integrin antibody, rabbit monoclonal (ab1930, Sigma-Aldrich)

Anti-alpha V integrin antibody, rabbit monoclonal (ab179475, Abcam)

Anti-alpha 3 integrin antibody, rabbit polyclonal (PA5-99407, Invitrogen)

Anti.alpha6 integrin antibody, mouse monoclonal IgM (Sc-374057, Santa Cruz Biotechnology)

Anti-phosphotyrosine antibody 4G10, mouse monoclonal (05-321, Sigma-Aldrich)

Sekundární protilátky

Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (A11029, Invitrogen)

Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) (A11008, Invitrogen)

Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgM (A21042, Invitrogen)

Goat anti-rabbit IgG (H+L) -HRP (170-6515, Bio-rad)

Goat ani-mouse IgG (H+L) - HRP (170-6516, Bio-rad)

Goat anti-mouse IgM – HRP (ab97230, Abcam)

4.1.5. Materiál pro práci s proteiny

10% APS – Amonium persulfát (Sigma-Aldrich)

Resolving Gel Buffer, 1.5 M Tris-HCl pufr pH 8.8 (Bio-Rad)

Stacking Gel Buffer, 0.5 M Tris-HCl pufr pH 6.8 (Bio-Rad)

SDS – dodecylsírán sodný (Sigma-Aldrich)

Methanol G.R. (Lach-Ner)

Glycin (Serva)

Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan (Serva)

30% Acrylamide/Bis Solution 37,5:1 (Bio-Rad)

TEMED – Tetramethylethylendiamin (Sigma-Aldrich)

2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)

Qubit Protein Assay Kit (Q33211, Invitrogen)

Precision Plus Protein Dual Color Standard (Bio-Rad)

0,05% bromfenolová modř

PVDF Immobilon-P membrána (Immobilon)

Nitrocelulozová membrána (Immobilon)

Whatman 3MM CHR (Cytiva)

Ponceau S (Sigma-Aldrich)

PBS + 0,05% Tween 20 (Bio-Rad)

Odtučněné blotovací sušené mléko (Santa Cruz Biotechnology), 5% roztok v PBS

SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific)

Super Signal West Pico Chemiluminiscent Substrate (Thermo Fisher Scientific)

4.1.6. Přístroje

Centrifuga Mini spin plus (Eppendorf)

Centrifuga 5804 R (Eppendorf)

Combi-spin FVL-2400N (Biosan)

Inkubátor CO2 New Brunswick Galaxy 14s (Eppendorf)

Azure c600 (Azure Biosystems)

ThermoCell MixingBlock (Bioer)

Mini Protean 3 Cell (Bio-Rad)

Power Pac HC Power Suply (Bio-Rad)

Qubit fluorometr (Invitrogen)

Vortex mixer (P-Lab)

Orbital Shaker PSU-10i (Biosan)

Laminární box (Faster)

Vodní lázeň (GRANT)

Konfokální mikroskop (Carl Zeiss LSM 880 NLO)

Fluorescenční mikroskop (Olympus IX81)

4.1.7. Další materiál

Cell Strainer 70 µm nylon (352350, Falcon)

4.2. Metody

4.2.1. Izolace a příprava vzorků spermií

Myší spermie

Myší spermie byly získány usmrcením dospělých samců a následným odebráním 5. regionu *cauda epididymis*. Tkáň byla následně vložena do 200 μ l kapky M2 media připravené na petriho misce, zalité parafinovým olejem a temperované na 37 °C. Následně byla miska vložena na 10 minut do inkubátoru, kde se při 37 °C a v přítomnosti 5% CO₂ uvolnily z tkáně spermie. Spermie určené ke kapacitaci byly zpracovány dle protokolu viz níže (4.2.2.). Suspenze byla odsáta do mikrozkušavky a stočena po dobu 5 minut při 400 g. Spermie byly poté 2x promyty ve 100 μ l PBS.

Kančí spermie

Spermie kance byly získány z ejakulátu. Ejakulát byl pipetován do 15ml Falcon zkumavek po 5 ml a stočen při 300 g a 17 °C po dobu 10 minut. Následně byl 2x promýván ve 5 ml PBS a zbaven ředících látek. Spermie určené ke kapacitaci *in vitro* byly dále zpracovány dle protokolu (viz níže 4.2.2.). Ostatní spermie byly resuspendovány v 5 ml PBS a tato suspenze byla dále pipetována po 1 ml do mikrozkušavek.

Lidské spermie

Lidské spermie byly získány z ejakulátu. V případě kryokonzervovaných vzorků byly nejprve rozmrazeny ve vodní lázni při 37 °C po dobu 10 minut. Pro zpracování ejakulátu byl připraven hustotní gradient 40/80. Do 15ml Falcon zkumavky byl nanesen 1 ml 80% media temperovaného na pokojovou teplotu a na to byl pomalu a opatrně pipetován 1 ml 40% media taktéž pokojové teploty tak, aby byla viditelná hranice mezi medii. Na gradient byl nanesen 1 ml ejakulátu tak, aby vytvořil vrstvu nad medii gradientu. Zkušavka s gradientem byla stočena na 25 minut při 23 °C a 300 g. Byl odebrán supernatant a k peletě, kde se nacházejí kvalitní spermie, bylo velice pomalu pipetováno 500 μ l Sperm Wash, který byl temperován na 37 °C. Spermie byly přepipetovány do 1,5ml mikrozkušavek a byly stočeny na 10 minut při 300 g a takto ve Sperm Wash 2x promyty. Poté bylo po odebrání supernatantu přidáno 100 μ l Sperm Wash, suspenze byla resuspendována a všechny vzorky byly vzájemně promíchány či spojeny a následně příslušně rozpipetovány zpět do zkumavek, a opět stočeny.

Spermie určené ke kapacitaci (tedy 2/3 vzorků) byly dále zpracovány dle následujícího odstavce (viz níže 4.2.2.). Ostatní spermie byly stočeny ve 200 μ l fyziologického roztoku při 300 g po dobu 5 minut a takto 2x promyty.

4.2.2. Kapacitace *in vitro*

Myší spermie

Pro přípravu kapacitovaných spermií byly připraveny kapacitační misky – do petriho misky byly nanесeny 100 μ l kapky M2 media, které byly překryty parafinovým olejem. Misky byly temperovány na 37 °C při 5% CO₂. Z kapky M2 media s uvolněnými spermii bylo poté odebráno 5 μ l suspenze do každé kapky media v kapacitačních miskách. Kapacitační misky byly vloženy do inkubátoru, kde se spermie inkubovaly 1 hodinu při 37 °C a 5% CO₂. Spermie určené k akrozomální reakci (tedy polovina vzorků) byly dále zpracovány dle protokolu (viz níže 4.2.3.). Ostatní kapacitované spermie v kapkách media byly odsáty do mikrozkušavek, stočeny na 5 minut při 400 g a poté byly promyty ve 100 μ l PBS.

Kančí spermie

Po promytí spermií v PBS byl supernatant odebrán a do Falcon zkumavek s peletou bylo přidáno po 10 ml kapacitačního media. Kapacitační medium bylo připraveno modifikací TALP media přidáním 3 mg/ml BSA a 0,12 mg/ml sodium pyruvátu, výsledné pH bylo upraveno na 7,4. Spermie byly inkubovány 2 hodiny při 37 °C a 5% CO₂. Po inkubaci v kapacitačním mediu byly spermie opět stočeny a promyty v 5 ml PBS.

Lidské spermie

Ze zkumavky s lidskými spermii promytými ve Sperm Wash byl odebrán supernatant a bylo přidáno 300 μ l Sperm Preparation media temperovaného na 37 °C. Vzorky byly vloženy do inkubátoru, kde se inkubovaly 2 hodiny při 37 °C a 5% CO₂ a kde proběhla kapacitace. Spermie určené k akrozomální reakci (tedy polovina vzorků) byly dále zpracovány dle následujícího odstavce (viz níže 4.2.3.). Ostatní kapacitované spermie byly stočeny při 300 g na 10 minut. Supernatant byl odebrán a bylo přidáno 200 μ l Sperm Wash a spermie byly znovu stočeny. Následně byly 2x po 5 minutách promyty ve 300 μ l fyziologického roztoku.

4.2.3. Indukce akrozomální reakce

Myší spermie

Pro indukci akrozomální reakce byl do kapek M2 media se spermii v kapacitačních miskách přidán CaI v poměru 1:100. Misky byly poté vloženy zpět do inkubátoru, opět na 1 hodinu inkubace při 37 °C a 5% CO₂. Spermie byly poté stočeny na 5 minut při 400 g a promyty ve 100 µl PBS.

Kančí spermie

Indukce akrozomální reakce u kančích spermií byla připravena přidáním 5 µM CaI. Vzorky se poté inkubovali 1 hodinu při 37 °C a 5% CO₂. Následně byly spermie stočeny při 300 g na 10 minut. Supernatant byl odebrán a spermie byly 2x po 5 minutách promyty v 5 ml PBS.

Lidské spermie

Pro přípravu akrozom zreagovaných spermií byl po inkubaci ke vzorkům přidán CaI v poměru 1:100, tedy 3 µl. Vzorky byly vloženy zpět do inkubátoru na 1 hodinu. Následně byly spermie promyty stejným způsobem jako po kapacitaci. Byly stočeny při 300 g na 10 minut. Supernatant byl odebrán, bylo přidáno 200 µl Sperm Wash a vzorky byly znovu stočeny. Následně byly 2x po 5 minutách promyty ve 300 µl fyziologického roztoku.

4.2.4. Příprava suspenze testikulárních buněk

Myší varlata byla získána usmrcením dospělých samců a následným odebráním tkáně. Tkáň byla vložena do petriho misky s PBS, kde byla odstraněna *tunica albuginea*. Varlata byla poté vložena do 5 ml RPMI media, vytemperovaného na 37°C, s 25 µl kolagenázy a 25 µl DNázy I. Následně byla tkáň inkubována na třepačce 20 minut při 37°C a 50 rpm. Po inkubaci byla suspenze opatrně pipetována, aby byly rozrušeny větší shluky tkáně. Suspenze byla filtrována přes 70 µm buněčný filtr. Po filtraci v sítku zůstaly pouze buňky testikulárních kanálků bez intersticiálních buněk. Sítko s filtrem bylo ze spodní části obaleno parafilmem a bylo přidáno 1,5 ml M2 media, ve kterém byl obsah sítko resuspendován. Suspenze byla stočena při 500 g na 10 minut. Supernatant byl odebrán a k peletě bylo přidáno 1,5 ml PBS, ve kterém byla suspenze stočena 5 minut na 400 g. K promyté suspenzi by přidán

4% paraformaldehyd a byla fixována po dobu 10 minut. Následně byla suspenze opět stočena, promyta v PBS a naředěna na zhruba dvojnásobek objemu. Požadovaná hustota suspenze byla zkontrolována v kapce. Byl proveden roztěr suspenze a dále se postupovalo dle standardního protokolu pro imunofluorescenční barvení.

4.2.5. Imunofluorescenční barvení

Koncentrace spermií byla zkontrolována pod světelným mikroskopem, v případě potřeby byla suspenze naředěna. Následně byl proveden roztěr 5 μ l suspenze buněk, v případě lidských a kančích spermií bylo nanášeno 10 μ l suspenze do kroužku nakresleného voděvzdorným fixem.

Fixace a permeabilizace

Vzorky byly fixovány 3,2% paraformaldehydem po dobu 10 min. Poté byla sklíčka promyta ve fyziologickém roztoku. Následně byl pro permeabilizaci buněk na preparáty nanášen Permeabilization Wash Buffer, který byl naředěn v poměru 1:10 v dH₂O. Po 15 minutách byly vzorky znovu promyty fyziologickým roztokem.

Blokace

Na vzorky bylo nanášeno blokační medium, 5% BSA nebo SuperBlock dle příslušné protilátky, a byly blokovány po dobu 45 minut ve vlhké komůrce při pokojové teplotě. Preparáty byly poté opět promyty.

Primární protilátka

Pro označení antigenů na spermii byla nanášena primární protilátka naředěna ve fyziologickém roztoku (anti-alfa V integrin ab1930 1:50, anti-alfa 3 integrin 1:10, anti-fosfotyrosin 4G10 1:100). Sklíčko bylo překryto krycím sklíčkem nebo parafilmem. Inkubace v primární protilátce probíhala přes noc ve vlhké komůrce v lednici. Poté byly preparáty promyty ve fyziologickém roztoku.

Sekundární protilátka

Následovalo nanášení sekundární protilátky pro vizualizaci vazby příslušné primární protilátky na antigen. Sekundární protilátky Alexa Fluor 488 byly ředěny v poměru 1:300 ve

fyziologickém roztoku. Preparáty se inkubovaly 45 min ve vlhké komůrce při pokojové teplotě. Vzorky byly opět promyty.

Následně byl nanesen PNA lektin pro vizualizaci akrozomu. PNA lektin byl ředěný 1:500 ve fyziologickém roztoku a byl na vzorkách inkubován 30 minut ve vlhké komůrce při pokojové teplotě. Sklíčka byla poté promyta ve fyziologickém roztoku a v dH₂O.

Montování

Po oschnutí byly vzorky montovány Vectashield Antifade Mounting mediem s DAPI, pomocí kterého vizualizujeme jádra spermií. Preparáty byly překryty krycím sklíčkem a utěsněna průhledným lakem na nehty.

Mikroskopie

Vzorky byly pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem Olympus IX81 a pod invertovaným konfokálním mikroskopem Carl Zeiss LSM 880 NLO.

4.2.6. Metody práce s proteiny

Příprava lyzátů

Ke vzorkům spermií bylo přidáno 100 μ l PBS (dle velikosti pelety) a byly stočeny na 5 minut při 300 g. Supernatant byl odebrán a k peletě spermií bylo přidáno 70-120 μ l SDS neredukujícího vzorkového pufru, dle velikosti pelety. Vzorky byly dány na led a po dobu 30 minut byly průběžně vortexovány pro dobré uvolnění a denuraci proteinů. Zlyzované vzorky byly poté stočeny na 2 minuty při 10 000 g. Supernatant, kde se nachází uvolněné proteiny, byl pipetován do nové mikrozkušavky a povařen a mixován v termobloku při 95°C a rychlosti 500 po dobu 5 minut.

Pro změření koncentrace proteinů v lyzátu byl připraven Qubit protein kvantifikační roztok dle protokolu. Ke 198 μ l Qubit roztoku bylo přidáno 2 μ l lyzátu a 15 minut byl roztok inkubován ve tmě. Poté byla ve Qubit fluorometru změřena koncentrace proteinů ve lyzátu a byl vypočítán nanášecí objem jednotlivých vzorků.

Ke vzorkům přidáme 2 μ l bromfenolové modři pro vizualizaci postupu vzorků při elektroforéze. Takto upravené vzorky jsou připraveny k nanesení na gel.

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

Nejprve byla sestavena aparatura pro přípravu gelu. Byla použita 1 mm skla. Poté byl připraven separační 10% gel (viz Tab. 1), byl nalit mezi skla do připravené aparatury a převrstven dH₂O. Po zhruba 30 minutách, kdy je gel zpolymerovaný, byla voda odlita a separační gel byl převrstven gelem zaostřovacím, který byl mezitím připraven (viz Tab. 2). Mezi skla byl vložen hřebínek dané velikosti s požadovaným počtem jamek. Zhruba po dalších 30 minutách byl gel ztuhlý.

Tab. 1: Příprava 10% separačního gelu

10% separační gel:	(μ l)
1,5 M Tris-HCl pufr, pH8.8	2 500
Roztok akrylamidu	3 330
dH ₂ O	4 160
10% SDS	100
TEMED	4,5
10% APS	70

Tab. 2: Příprava 4% zaostřovacího gelu

4% zaostřovací gel:	(μ l)
0,5 M Tris-HCl pufr, pH6.8	1520
Roztok akrylamidu	625
dH ₂ O	325
10% SDS	25
TEMED	3,8
10% APS	35

Do sestavené aparatury na elektroforézu byly vloženy připravené gely. Hřebínky byly z gelu vyjmuty a stojánek s gely ve vaničce byl zalit elektrodovým pufrům (viz Tab. 3). Následně byly nanесeny připravené vzorky. Jako marker molekulové hmotnosti byl použit Precision Plus Protein Dual Color standard (3 μ l na jamku). Aparatura s víkem byla napojena na zdroj a zapnuta na 30 min při konstantním napětí 80 V, dokud vzorky nedosáhly k separačnímu gelu. Následně byly proteiny separovány dalších zhruba 70 minut při konstantním napětí 140 V, dokud vzorky nedosáhly spodního konce gelu.

Tab. 3: Složení elektrodového pufru

Elektrodový pufr 10x:

25 mM Tris	60.6 g
192 mM glycin	288 g
0,1% SDS	20 g
dH ₂ O	do 2000 ml

Elektrodový pufr 1x: 200 ml elektrodový pufr 10x, dH₂O dolita do 2000 ml

Western blot

Izolační houbičky, membrány a whatmany byly ponořeny do blotovacího pufru (viz Tab. 4). PVDF membrána byla nejprve namočená v methanolu po dobu 5 minut, až poté v blotovacím pufru. Poté byla sestavena blotovací aparatura pro přenos proteinů z gelu na membránu. Pro přenos proteinů a následnou imunodetekci alfa V integrinu byla použita PVDF membrána. Gel byl vložen do sandwiche, který byl následně uzavřen a vložen do aparatury. Aparatura byla zalita blotovacím pufrem, uzavřena víkem a vložena do nádoby s ledem. Poté byla napojena na zdroj a zapnuta při konstantním elektrickém proudu 500 mA na 90 minut.

Tab. 4: Složení blotovacího pufru

Blotovací pufr:

25 mM Tris	6 g
192 mM glycin	28,8 g
20% methanol	400 ml
dH ₂ O	do 2000 ml

Imunodetekce proteinů

Po skončení western blotu byly membrány vyjmuty a promyty v dH₂O. Pro kontrolu přenosu proteinů byly membrány promyty v 0,1% Ponceau S barvivu. Následně byly membrány promývány v dH₂O a PBS s 0,05% Tweenem, a 1 hodinu blokovány v 5% roztoku odtučněného mléka v PBS. Membrány byly poté opět promyty v roztoku PBS

s 0,05% Tweenem a inkubovány v primární protilátce přes noc ve 4 °C. Primární protilátky byly ředěny v PBS následovně: anti-alfa V integrin (ab179475) 1:250 pro myši a kančí lyzáty a 1:500 pro lidské, anti- α -Tubulin 1:3000, anti-alfa 3 viz níže. Druhý den byly membrány 6x promývány v PBS s 0,05% Tweenem, vždy po dobu 5 minut, a následně byly 1 hodinu inkubovány v sekundární protilátce ředěné v PBS v poměru 1:3000. Membrány byly po inkubaci opět 6x promyty v PBS s 0,05% Tweenem, vždy po dobu 5 minut. Proteiny na membráně byly detekovány pomocí vyvolávacího roztoku v přístroji Azure c600.

Optimalizace protokolu pro alfa 3 integrin

Protokol pro protilátku proti alfa 3 integrinu, tedy pro identifikaci integrinové podjednotky alfa 3, byl modifikován pro výraznější detekci. Optimalizován byl protokol pro přípravu lyzátů a pro inkubaci v primární protilátce a to následovně. Peleta spermií byla po promytí spermií v PBS resuspendována ve 100 μ l SDS neredukujícího vzorkového pufru a povařena v termobloku při 97 °C po dobu 3 minut. Lyzáty byly poté stočeny na 2 minuty při 10 000 g a byl odebrán supernatant. Pro přenos proteinů a pro následnou imunodetekci byla v případě alfa 3 integrinu použita nitrocelulósová membrána. Primární protilátka (anti-alfa 3 integrin) byla ředěna 1:20 v PBS a membrány se inkubovaly 90 minut.

4.2.7. Statistická vyhodnocení

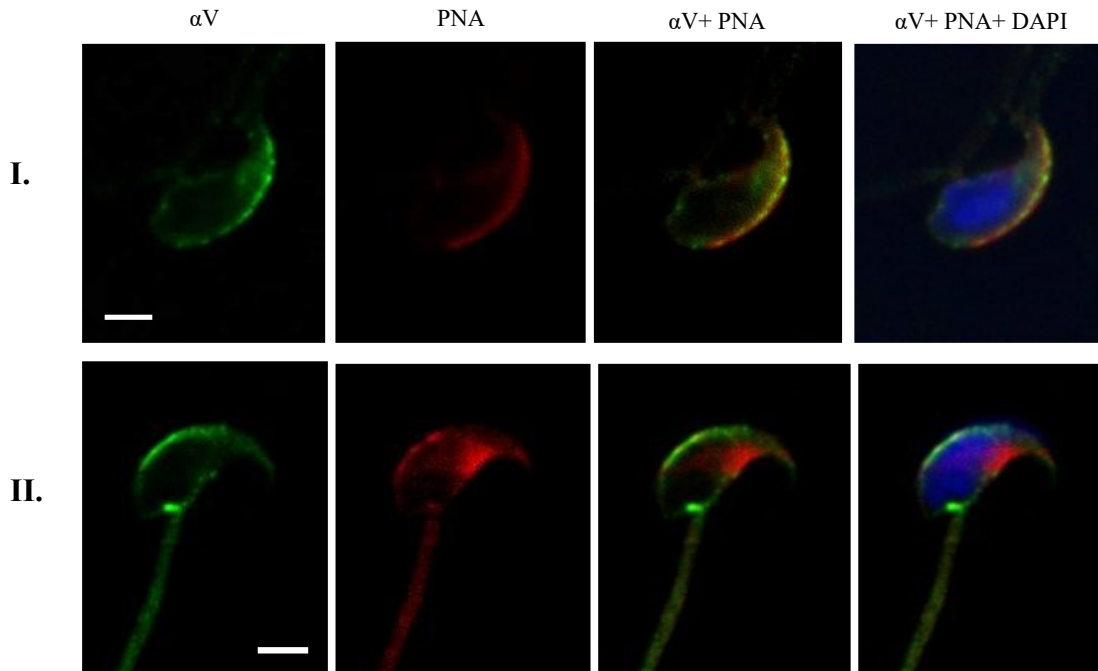
Pro vyhodnocení, denzitometrickou analýzu a další úpravu byl využit open-source software ImageJ. Statistická signifikance určená „p“ hodnotou byla získána s využitím student t-testu.

5. Výsledky

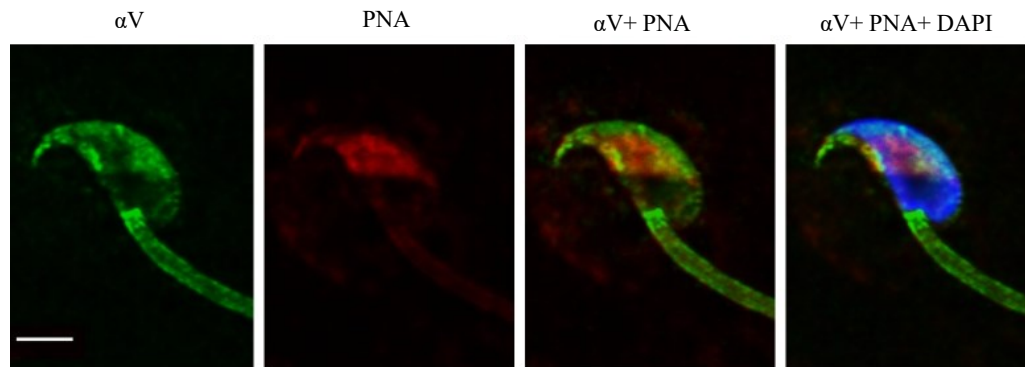
Diplomová práce se zabývá detekcí integrinů alfa V a alfa 3 a jejich lokalizací na akrozom-intaktních spermiích myši, kance a člověka. Dále je popsána také relokace integrinu alfa V po indukované AR. Pro detekci integrinů byla využita metoda western blot imunodetekce a pro vizualizaci lokalizace studovaných integrinů byla použita metoda nepřímé imunofluorescence. Pro hodnocení stavu akrozomu bylo ve všech vzorcích využito značení pomocí PNA a jádro bylo vizualizováno pomocí DAPI.

5.1. Integrin alfa V

Lokalizace integrinu alfa V byla pomocí nepřímé imunofluorescence popsána na epididymálních, kapacitovaných a akrozom-zreagovaných spermiích myši. Integrin alfa V byl lokalizován na akrozom-intaktních spermiích zejména v oblasti akrozomu, v apikálním háčku a dále v oblasti krčku (Obr. 8). Slabší signál byl viditelný také v PAR. Po akrozomální reakci byla na hlavičce spermie pozorována změna paternu signálu pro integrin alfa V, ten byl detekovatelný zejména v ekvatoriálním segmentu, fúzogenní doméně spermie (Obr. 9). Nicméně přítomnost integrinu alfa V byla stále detekovatelná i v oblasti apikálního háčku. Exprese byla výrazná také na krčku a bičíku spermie. Slabý signál byl přítomen v PAR.

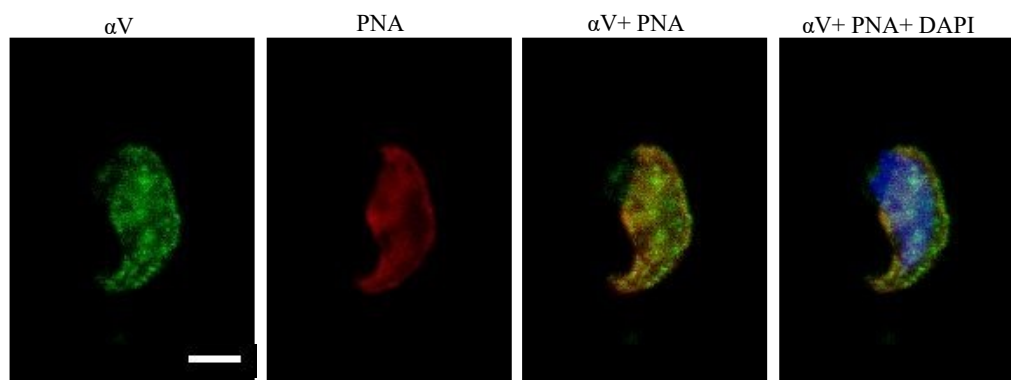


Obr. 8: Lokalizace alfa V na myších akrozom-intaktních spermích. Integrin alfa V (zeleně) byl na akrozom-intaktních epididymálních (I.) a kapacitovaných (II.) spermích lokalizován v oblasti akrozomu. Vysoká míra exprese byla pozorována především v apikální oblasti akrozomu a v apikálním háčku. Slabší signál byl viditelný v postakrozomální oblasti a na krčku spermie. Akrozomální statut byl hodnocen na základě značení PNA (červeně), jádro je značeno pomocí DAPI (modře). Měřítka reprezentuje 3 μm .



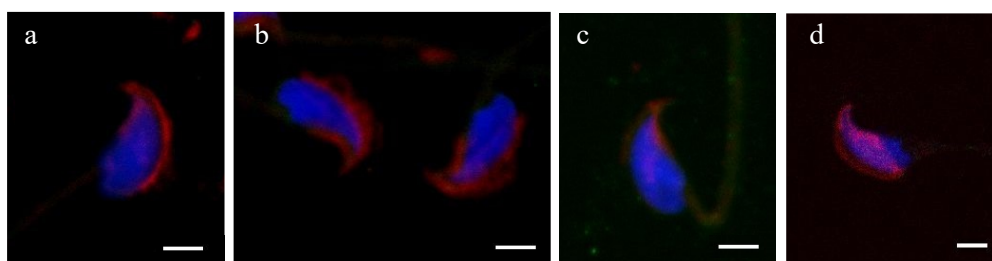
Obr. 9: Lokalizace alfa V na myších akrozom-zreagovaných spermích. Na myších spermích po akrozomální reakci byla lokalizace integrinu alfa V (zeleně) vizualizována v ekvatoriálního segmentu a v apikálním háčku na hlavičce spermie. Nápadný signál lze pozorovat také na krčku a bičíku spermie. Akrozomální statut byl hodnocen na základě značení PNA (červeně), jádro je značeno pomocí DAPI (modře). Měřítka reprezentuje 3 μm .

Integrin alfa V byl detekován také na spermiích získaných z myších varlat. Zde byl lokalizován v celé oblasti hlavičky spermie, s méně výrazným signálem v PAR (Obr. 10).



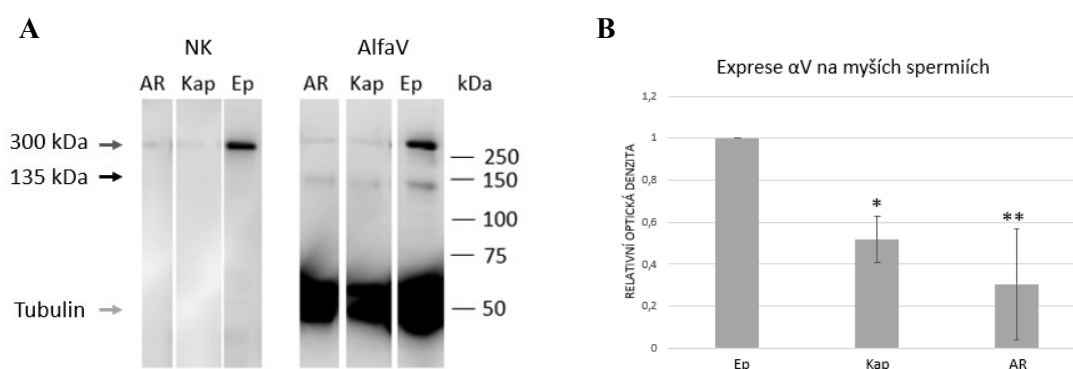
Obr. 10: Lokalizace alfa V na myších spermiích z testes. Integrin alfa V (zeleně) byl na spermiích z testikulární tkáně lokalizován na celé hlavičce spermie. Akrozomální statut byl hodnocen na základě značení PNA (červeně), jádro je značeno pomocí DAPI (modře). Měřítka reprezentuje 3 μm .

Pro vyloučení detekce nespecifického signálu, vzniklého přímou vazbou sekundárních protilátek na buňky ve vzorku, byly pro imunofluorescenční barvení připraveny negativní kontroly. Negativní kontroly byly zhotoveny vynecháním použití primárních protilátek. Ve vzorcích negativních kontrol jsme nepozorovali žádný signál a vyloučili jsme tak možnost, že námi detekovaný patern lokalizace integrinu alfa V není správný a jedná se pouze o nespecifickou interakci sekundární protilátky a vzorku (Obr. 11).



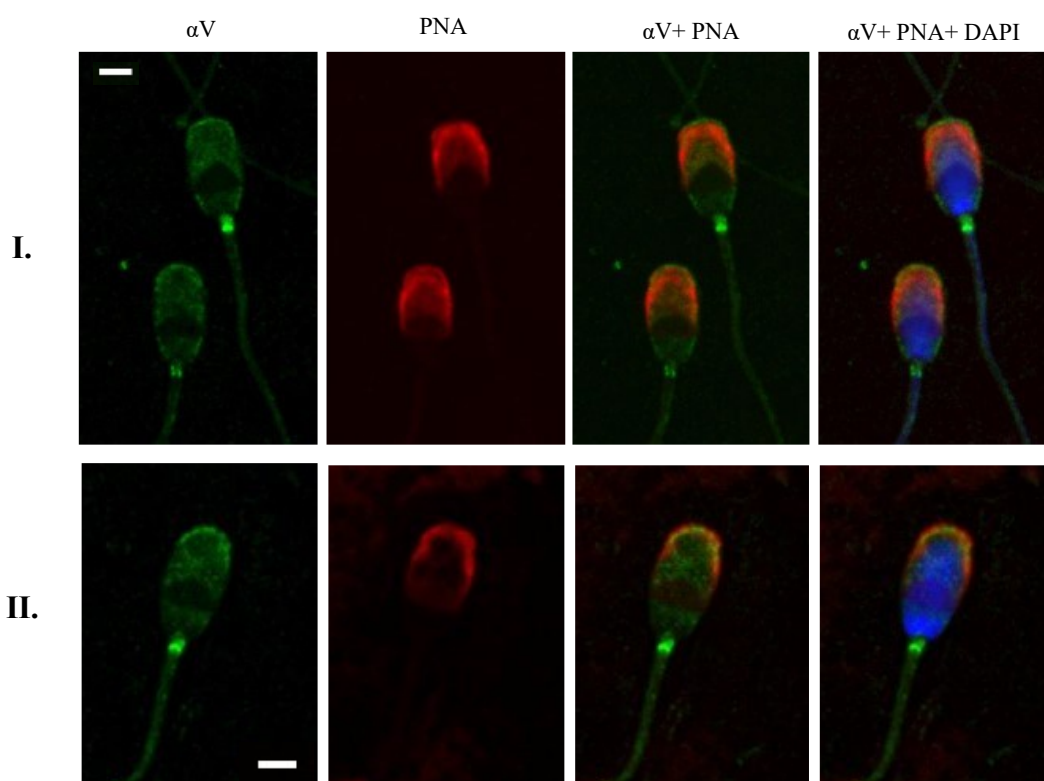
Obr. 11: Negativní kontrola imunofluorescenčního barvení myších spermií protilátkou proti alfa V integrinu. (a) Epididymální spermie, (b) kapacitované spermie, (c) akrozom-zreagované spermie, (d) spermie z testikulární tkáně. Při vynechání primární protilátky nebyl detekován žádný signál (zeleně). Akrozomální statut byl hodnocen na základě značení PNA (červeně), jádro je značeno pomocí DAPI (modře). Měřítka reprezentuje 3 μm .

Integrin alfa V byl s využitím western blot imunodetekce identifikován v lyzátech myších spermii. Pro detekci případných nespecifických reakcí protilátky byly provedeny negativní kontroly. V lyzátu epididymálních, kapacitovaných a akrozom-zregovaných myších spermii byl protilátkou proti alfa V integrinu detekován protein o velikosti 135 kDa (Obr. 12 A). Dále byl u myši detekován signál v oblasti 300 kDa. Vzhledem k tomu, že stejný signál byl pozorován i v negativní kontrole, vyhodnotili jsme jeho přítomnost jako důsledek nespecifické interakce sekundární protilátky. Následně byla exprese alfa V integrinu hodnocena pomocí denzitometrické analýzy, do které byla zahrnuta tři měření. Exprese byla normalizována k množství tubulinu, který sloužil jako kontrola nanášky. Na základě denzitometrické analýzy jsme prokázali statisticky významné snížení míry exprese ($p < 0,05$) alfa V integrinu u kapacitovaných a akrozom-zregovaných spermii v porovnání se spermii epididymálními (Obr. 12 B). Chybové úsečky představují standartní odchylku při třech opakování.

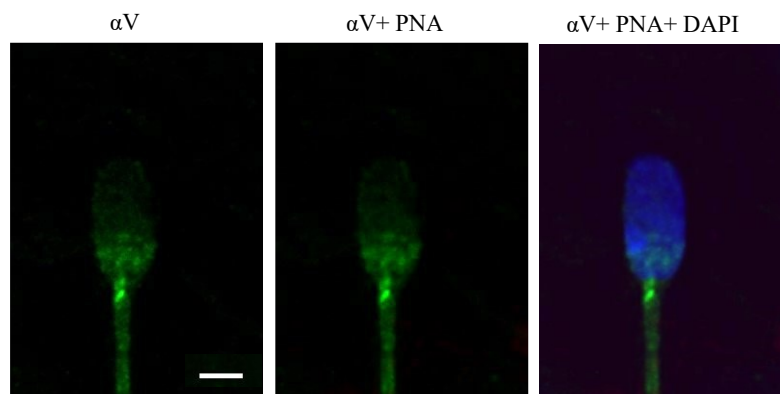


Obr. 12: Western blot imunodetekce alfa V integrinu v lyzátu myších spermii. (A) V lyzátu epididymálních (Ep), kapacitovaných (Kap) a akrozom zregovaných (AR) spermii byl protilátkou proti alfa V integrinu detekován protein o velikosti 135 kDa (černá šipka). Dále byl detekován nespecifický signál (šedá šipka) v oblasti zhruba 300 kDa, který byl detekován i v negativní kontrole (NK). Protilátkou proti α tubulinu byl detekován protein o velikosti 50 kDa. **(B)** Denzitometrická analýza prokázala statisticky významné snížení míry exprese ($p < 0,05$) alfa V integrinu u kapacitovaných (Kap) a akrozom-zregovaných (AR) spermii v porovnání se spermii epididymálními. Expresse alfa V integrinu byla pro účely analýzy normalizována k množství tubulinu alfa. Chybové úsečky představují standartní odchylku při 3 opakování.

S využitím imunofluorescenčního barvení a konfokální mikroskopie byla přítomnost integrinu alfa V detekována na ejakulovaných, kapacitovaných a akrozom-zreagovaných spermích kance. Integrin alfa V byl na akrozom-intaktních ejakulovaných a kapacitovaných spermích lokalizován v akrozomu, a to zejména v jeho apikální oblasti, dále byl lokalizován v PAR a na krčku spermie (Obr. 13). Po AR došlo ke změnám v jeho lokalizaci a integrin alfa V byl přítomen v ES a PAR (Obr. 14). Nepřítomnost signálu PNA značí úspěšnou exocytózu akrozomu.

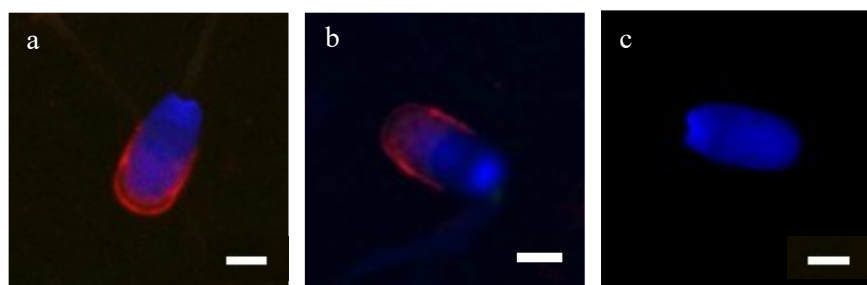


Obr. 13: Lokalizace alfa V na kančích akrozom-intaktních spermích. Lokalizace integrinu alfa V (zeleně) byla na akrozom-intaktních ejakulovaných (I.) a kapacitovaných (II.) spermích vizualizována v oblasti akrozomu, postakrozomální oblasti a také na krčku spermie. Akrozomální statut byl hodnocen na základě značení PNA (červeně), jádro je značeno pomocí DAPI (modře). Měřítka reprezentuje 3 μm .



Obr. 14: Lokalizace alfa V na kančích spermích po akrozomální reakci. Na akrozom zreagovaných kančích spermích byl integrin V (zeleně) lokalizován především v PM postakrozomální oblasti, ES a na krčku. Akrozomální statut byl hodnocen na základě značení PNA (červeně), jádro je značeno pomocí DAPI (modře). Měřítka reprezentuje 3 μm .

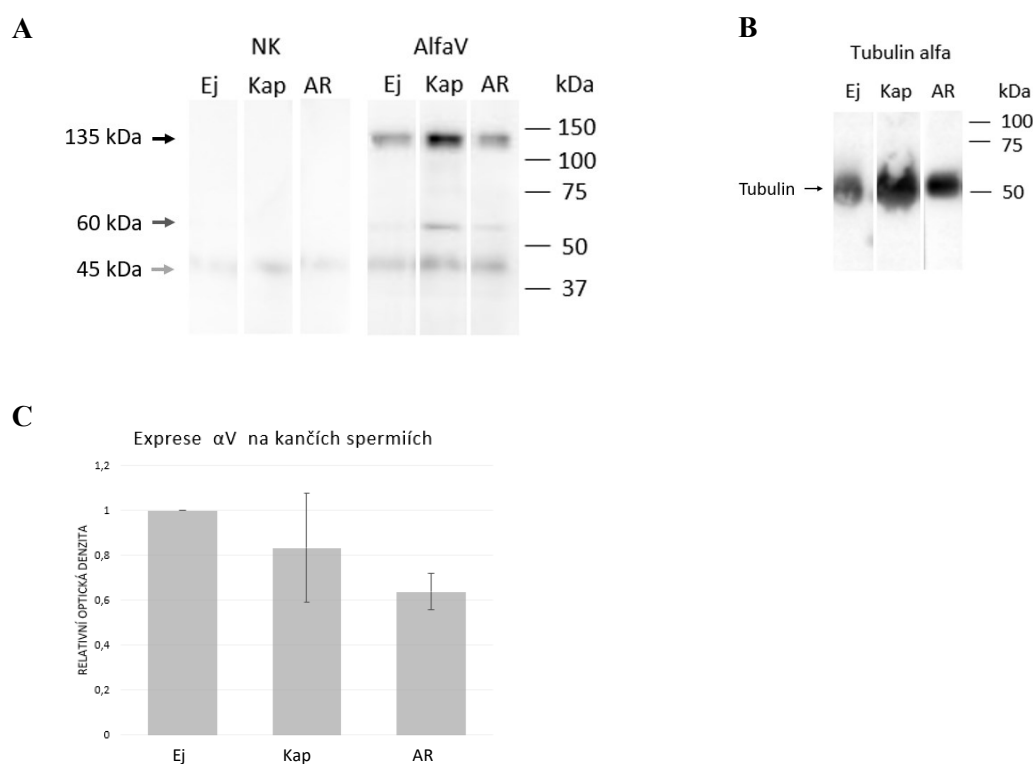
Pro vyloučení detekce nespecifického signálu byly pro imunofluorescenční barvení kančích spermií připraveny negativní kontroly. Při vynechání primární protilátky jsme nepozorovali žádný signál a vyloučili jsme tak možnost, že námi pozorovaná lokalizace integrinu alfa V představuje pouze nespecifickou interakci sekundární protilátky a vzorku (Obr. 15).



Obr. 15: Negativní kontrola imunofluorescenčního barvení kančích spermií protilátkou proti integrinu alfa V. (a) Ejakulované spermie, (b) kapacitované spermie, (c) akrozom-zreagované spermie. Při vynechání primární protilátky nebyl detekován žádný signál (zeleně). Akrozomální statut byl hodnocen na základě značení PNA (červeně), jádro je značeno pomocí DAPI (modře). Měřítka reprezentuje 3 μm .

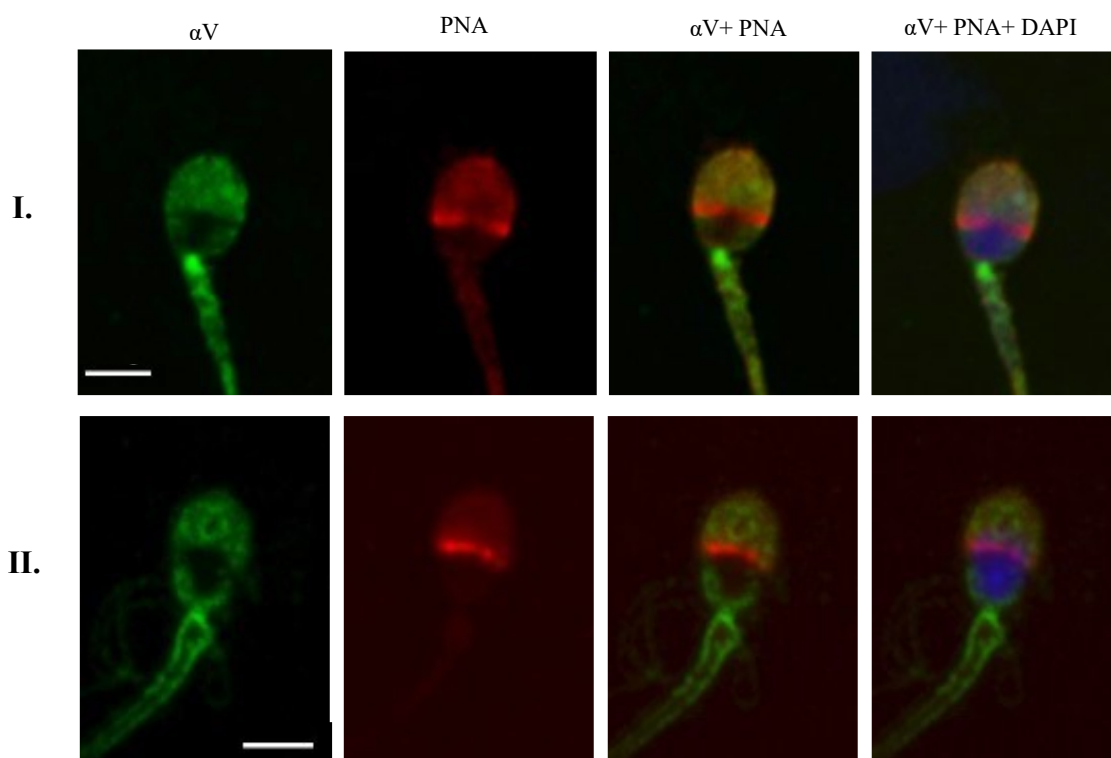
Přítomnost integrinu alfa V jsme detekovali také v lyzátu ejakulovaných, kapacitovaných a akrozom-zreagovaných spermií kanců (Obr. 16 A). Protilátkou proti alfa V integrinu byl detekován protein o velikosti 135 kDa. Pro detekci případných nespecifických reakcí protilátky byly zhotoveny negativní kontroly. Na membráně byl dále detekován

signál oblasti 45 kDa. Tento signál byl pozorován taktéž v negativní kontrole, tudíž jsme jeho přítomnost vyhodnotili jako důsledek nespecifické interakce sekundární protilátky. Byl zde detekován také signál v oblasti 60 kDa, který je ve specifikacích protilátky výrobcem označen jako nespecifický. Jako kontrola nanášky byl využit tubulin alfa, který byl detekován v oblasti 50 kDa (Obr. 16 B). Exprese alfa V integrinu byla pro účely analýzy normalizována k množství tubulinu. Denzitometrická analýza prokázala stejně jako u myši pokles exprese ($p > 0,05$) alfa V integrinu u kapacitovaných a akrozom-zreagovaných spermii v porovnání se spermii ejakulovanými (Obr. 16 C). Chybové úsečky představují standartní odchylku při čtyřech opakování.

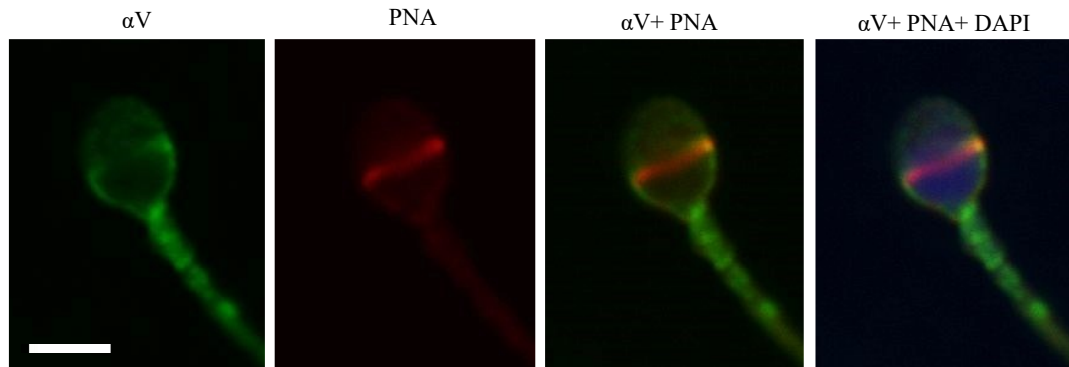


Obr. 16: Western blot imunodetekce alfa V integrinu v lyzátu kančích spermii. (A) V lyzátu ejakulovaných (Ej), kapacitovaných (Kap) a akrozom zreagovaných (AR) spermii byl protilátkou proti alfa V integrinu detekován protein o velikosti 135 kDa (černá šipka). Dále byl detekován nespecifický signál o velikosti 60 kDa (šedá šipka), který byl výrobcem označen ve specifikacích protilátky, a další nespecifický signál (světlá šipka) v oblasti 45 kDa, který byl pozorován i v negativní kontrole (NK). (B) Tubulin sloužící jako kontrola nanášky byl detekován v oblasti 50 kDa. (C) Denzitometrická analýza prokázala pokles exprese ($p > 0.05$) alfa V integrinu u kapacitovaných (Kap) a akrozom zreagovaných (AR) spermii v porovnání se spermii ejakulovanými (Ej). Expese alfa V integrinu byla pro účely analýzy normalizována k množství tubulinu alfa. Chybové úsečky představují standartní odchylku při 4 opakování.

Lokalizace integrinu alfa V byla popsána taktéž na ejakulovaných, kapacitovaných a akrozom-zreagovaných spermích člověka. Pomocí nepřímé imunofluorescence byl integrin alfa V vizualizován v akrozomální čepičce a v ES hlavičky, a dále také na krčku a bičíku akrozom-intaktních spermí (Obr. 17). Na kapacitovaných spermích byla pozorovatelná počínající relokace integrinu alfa V do PAR. Na akrozom-zreagovaných spermích byl integrin alfa V přítomen v ES a PAR. Přítomnost integrinu alfa V v oblasti krčku a bičíku byla zachována i u akrozom-zreagovaných spermí (Obr. 18).

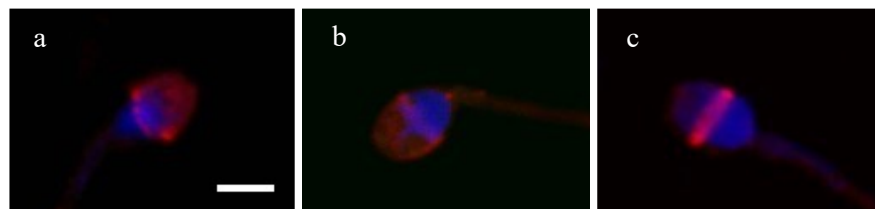


Obr. 17: Lokalizace alfa V na lidských akrozom-intaktních spermích. Integrin alfa V (zeleně) byl na ejakulovaných (I.) a kapacitovaných (II.) lidských spermích lokalizován v oblasti akrozomu, v ekvatoriálním segmentu, na krčku a bičíku. Na kapacitovaných spermích pozorujeme počínající relokaci integrinu alfa V do postakrozomální oblasti. Akrozomální statut byl hodnocen na základě značení PNA (červeně), jádro je značeno pomocí DAPI (modře). Měřítka reprezentuje 3 μ m.



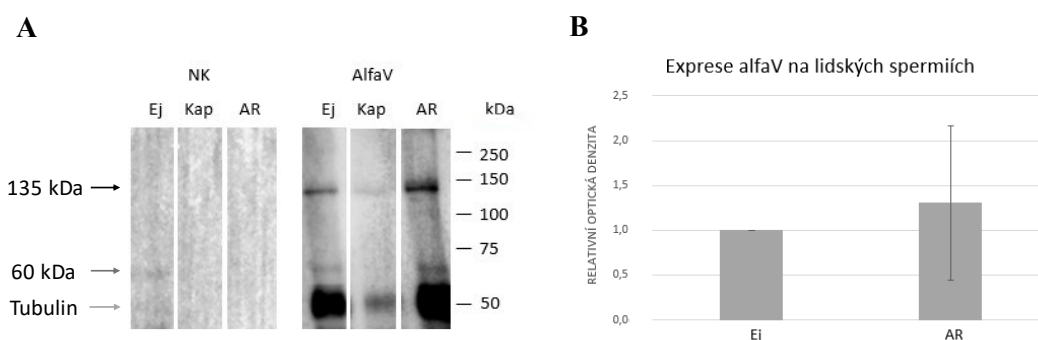
Obr. 18: Lokalizace alfa V na lidských spermích po akrozomální reakci. Lokalizace integrinu alfa V (zeleně) na lidských akrozom-zreagovaných spermích byla vizualizována v ekvatoriálním segmentu, v postakrozomální oblasti, krčku a bičíku. Akrozomální statut byl hodnocen na základě značení PNA (červeně), jádro je značeno pomocí DAPI (modře). Měřítka reprezentuje 3 μm .

Pro vyloučení detekce nespecifického signálu byly připraveny negativní kontroly. Ve vzorcích negativních kontrol lidských spermíi jsme nepozorovali žádný signál a vyloučili jsme tak možnost, že námi detekovaný patern lokalizace integrinu alfa V není správný a jedná se pouze o nespecifickou interakci sekundární protilátky a vzorku (Obr. 19).



Obr. 19: Negativní kontrola imunofluorescenčního barvení lidských spermíi protilátkou proti integrinu alfa V. (a) Ejakulované spermie, (b) kapacitované spermie, (c) akrozom zreagované spermie. Při vynechání primární protilátky nebyl detekován žádný signál (zeleně). Akrozomální statut byl hodnocen na základě značení PNA (červeně), jádro je značeno pomocí DAPI (modře). Měřítka reprezentuje 3 μm .

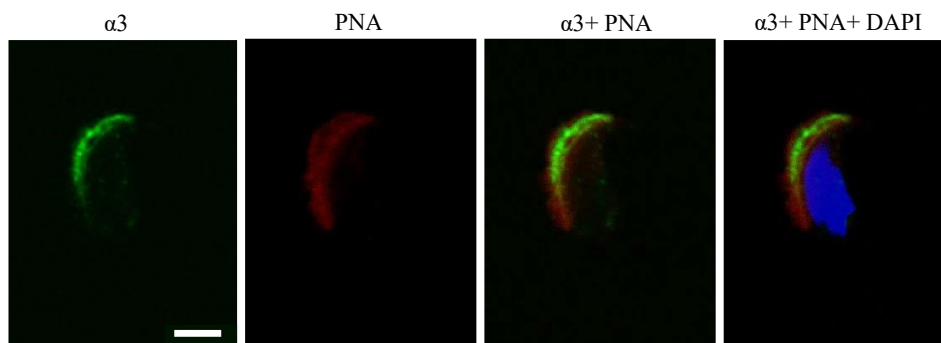
Integrin alfa V byl s využitím western blot metody identifikován taktéž v lyzátech lidských spermií. Pro detekci případných nespecifických reakcí protilátky byly provedeny negativní kontroly. V lyzátech ejakulovaných, kapacitovaných a akrozom-zregovaných spermií byl protilátkou proti alfa V integrinu detekován protein o velikosti 135 kDa (Obr. 20 A). Dále byl detekován nespecifický signál v oblasti 60 kDa, který je výrobcem označen ve specifikacích protilátky. Jako kontrola nanášky sloužil tubulin alfa, který byl detekován v oblasti 50 kDa. Expresse alfa V byla normalizována k množství tubulinu. Následně byla exprese alfa V integrinu hodnocena pomocí denzitometrické analýzy, do které byla zahrnuta tři měření. Na základě denzitometrické analýzy jsme prokázali statisticky nesignifikantní zvýšení míry exprese ($p > 0,05$) alfa V integrinu u akrozom-zreagovaných spermií v porovnání se spermiemi ejakulovanými (Obr. 20 B). Chybové úsečky představují standartní odchylku při 3 opakování.



Obr. 20: Western blot imunodetekce alfa V integrinu v lyzátu lidských spermií. (A) V lyzátu ejakulovaných (Ej), kapacitovaných (Kap) a akrozom zreagovaných (AR) spermií byl protilátkou proti alfa V integrinu detekován protein o velikosti 135 kDa (černá šipka). Byl detekován také nespecifický signál v oblasti 60 kDa (šedá šipka), který byl výrobcem označen ve specifikacích protilátky. Tubulin, který byl využit jako kontrola nanášky byl detekován v oblasti 50 kDa (světlá šipka). **(B)** Denzitometrická analýza prokázala zvýšení míry exprese ($p > 0,05$) alfa V integrinu u akrozom-zreagovaných (AR) spermií v porovnání se spermiemi ejakulovanými (Ej). Expresse alfa V integrinu byla pro účely analýzy normalizována k množství tubulinu alfa. Chybové úsečky představují standartní odchylku při 3 opakování.

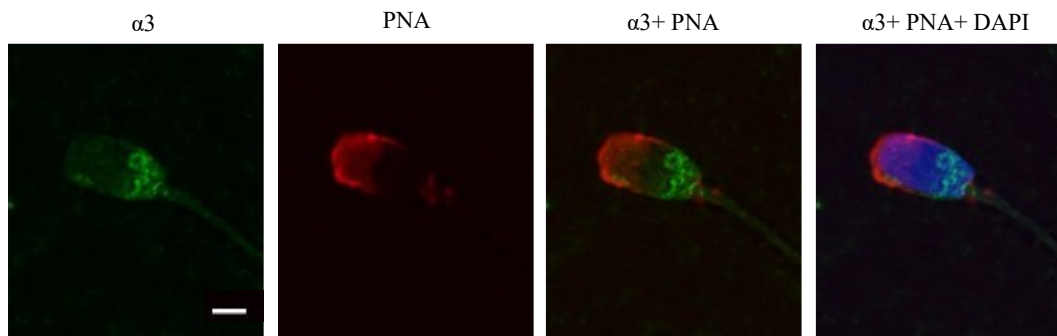
5.2. Integrin alfa 3

Integrin alfa 3 byl využitím imunofluorescenčního barvení a konfokální mikroskopie lokalizován na myších, kančích a lidských akrozom-intaktních spermiích. Na akrozom-intaktních myších spermiích byl vizualizován zejména v oblasti akrozomu a v apikálním háčku (Obr. 21).

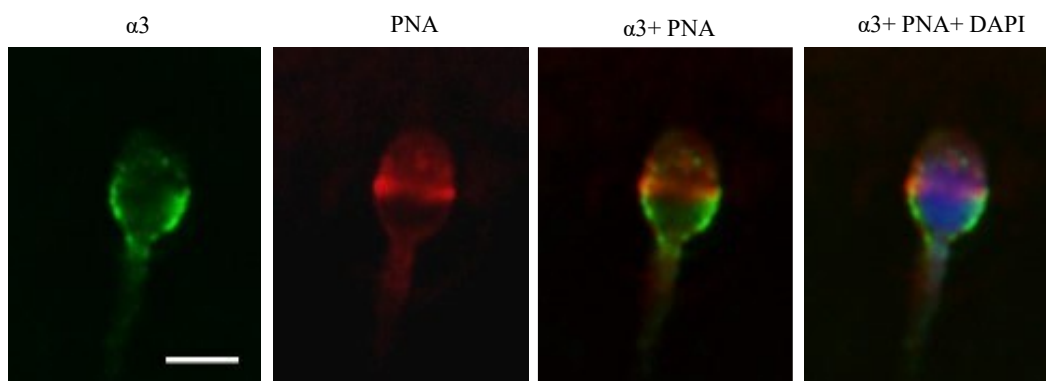


Obr. 21: Lokalizace alfa 3 na myších epididymálních spermiích. Integrin alfa 3 (zeleně) byl na epididymálních spermiích lokalizován v oblasti akrozomu a v apikálním háčku. Akrozomální statut byl hodnocen na základě značení PNA (červeně), jádro je značeno pomocí DAPI (modře). Měřítko reprezentuje 3 μm .

Rozdílnou lokalizaci integrinu alfa 3 než na myších spermiích jsme pozorovali u lidských a kančích spermií. Na kančích akrozom-intaktních spermiích byla exprese alfa 3 vizualizována v PAR a také v ES (Obr. 22). V oblasti akrozomu byl viditelný pouze slabý signál. Obdobně na ejakulovaných spermiích člověka je integrin alfa 3 lokalizován v PAR a ES (Obr. 23). I zde pozorujeme slabou expresi v akrozomální čepičce.

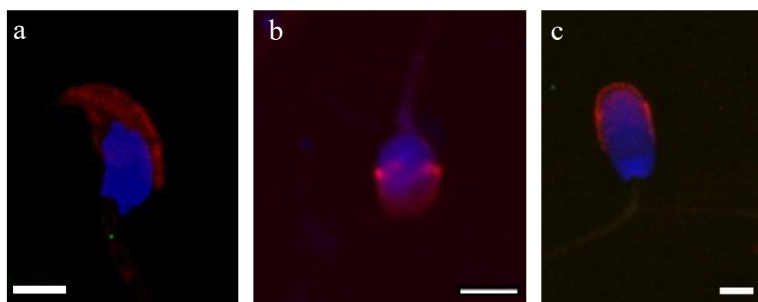


Obr. 22: Lokalizace alfa 3 na kančích ejakulovaných spermích. Lokalizace integrinu alfa 3 (zeleně) na kančích ejakulovaných spermích byla vizualizována v postakrozomální oblasti, slabší expresi lze pozorovat i v ES a v oblasti akrozomu. Akrozomální statut byl hodnocen na základě značení PNA (červeně), jádro je značeno pomocí DAPI (modře). Měřítka reprezentuje 3 μm .



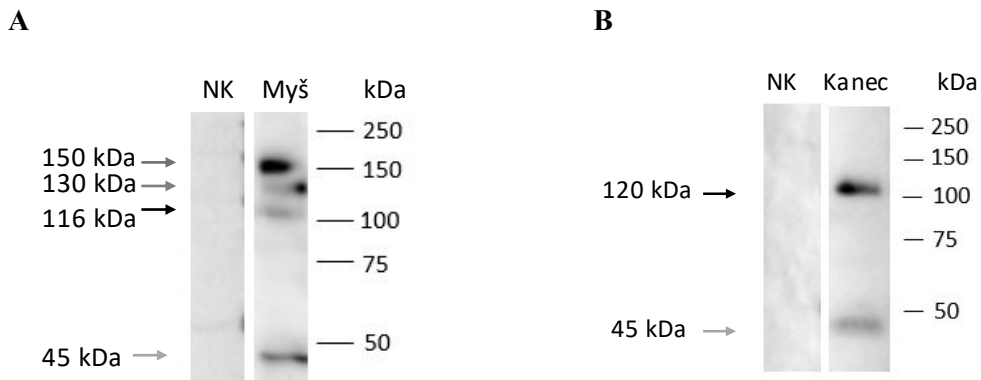
Obr. 23: Lokalizace alfa 3 na lidských ejakulovaných spermích. Integrin alfa 3 (zeleně) byl na ejakulovaných spermích lokalizován v postakrozomální oblasti a v ekvatoriálním segmentu. Expresi lze pozorovat i v oblasti apikálního akrozomu. Akrozomální statut byl hodnocen na základě značení PNA (červeně), jádro je značeno pomocí DAPI (modře). Měřítka reprezentuje 3 μm .

Pro vyloučení detekce nespecifického signálu byly také při imunofluorescenčním značení myších, lidský a kančích spermii protilátkou proti alfa 3 integrinu zhotoveny negativní kontroly. Negativní kontroly byly zhotoveny vynecháním použití primárních protilátek. Při vynechání primární protilátky nebyl detekován žádný signál, a tudíž jsme vyloučili možnost, že námi detekovaný signál představuje pouze nespecifickou interakci sekundární protilátky a vzorku (Obr. 24).

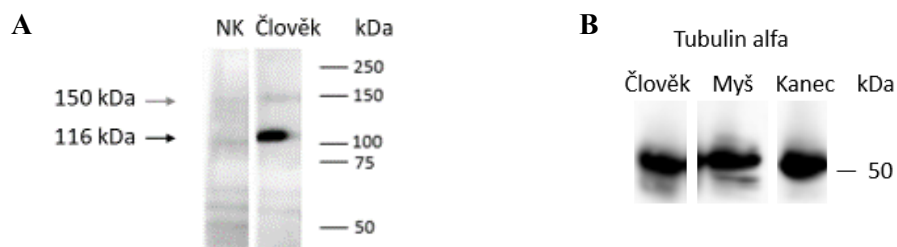


Obr. 24: Negativní kontrola imunofluorescenčního barvení myších, lidských a kančích spermií protilátkou proti integrinu alfa 3. (a) myší epididymální spermie, (b) lidské ejakulované spermie, (c) kančí ejakulované spermie. Při vynechání primární protilátky nebyl detekován žádný signál (zeleně). Akrozomální statut byl hodnocen na základě značení PNA (červeně), jádro je značeno pomocí DAPI (modře). Měřítka reprezentuje 3 μm .

Integrin alfa 3 jsme s využitím metody western blot detekovali v lyzátech akrozom-intaktních myších, kančích a lidských spermií. Pro detekci případných nespecifických reakcí protilátky byly provedeny negativní kontroly. V lyzátech spermií byl protilátkou proti alfa 3 integrinu detekován protein velikosti 116 kDa u myši a člověka, a o velikosti 120 kDa u kance (Obr. 25 a 26). U myši a člověka byl detekován také signál v oblasti 150 kDa, který dle informace od výrobce uvedené ve specifikacích protilátky reprezentuje plně glykosilovanou formu alfa 3 podjednotky. V lyzátu myších spermií byl dále detekován protein o velikosti 130 kDa. U myši a kance jsme detekovali také signál v oblasti 45 kDa. Tubulin alfa byl použit jako kontrola nanášky a protilátkou byl vizualizován v oblasti 50 kDa (Obr. 26 B).



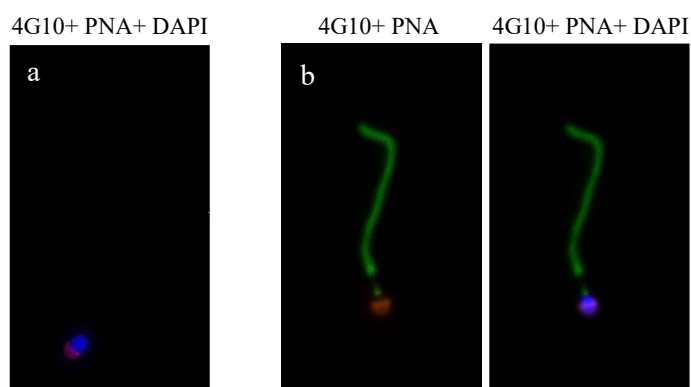
Obr. 25: Western blot imunodetekce alfa 3 integrinu. (A) V lyzátu epididymálních myších spermii byl protilátkou proti alfa 3 integrinu detekován protein o velikosti 116 kDa (černá šipka). Dále byl detekován protein o velikosti 150 kDa, který je označen výrobcem ve specifikacích protilátky, a 130 kDa (šedé šipky). Lze pozorovat také signál v oblasti 45 kDa (světlá šipka). **(B)** V lyzátu ejakulovaných kančích spermii byl detekován protein o velikosti 120 kDa představující alfa3 integrin (černá šipka). Byl detekován také signál (světlá šipka) v oblasti zhruba 45 kDa.



Obr. 26: Western blot imunodetekce alfa 3 integrinu. (A) V lyzátu ejakulovaných lidských spermii byl protilátkou proti alfa 3 integrinu detekován protein o velikosti 150 kDa (šedá šipka), který je označen výrobcem ve specifikacích protilátky, a protein o velikosti 116 kDa (černá šipka). **(B)** V lyzátu epididymálních myších a ejakulovaných kančích a lidských spermii byl protilátkou proti tubulinu alfa detekován signál v oblasti 50 kDa vizualizující tubulin, který byl použit jako kontrola nanášky.

5.3. Kontrola kapacity lidských spermií

Abychom si ověřili, že u lidských spermií použitých v našich experimentech dochází ke kapacitaci, využili jsme metod nepřímé imunofluorescence a fluorescenční mikroskopie, pomocí nichž jsme detekovali přítomnost fosfotyrosinu. Protilátka proti fosfotyrosinu značí fosforylovaný tyrosin, který je po kapacitaci přítomný v bičíku spermie. V průběhu kapacity dochází k fosforylaci na tyrosinových zbytcích a detekce míry tyrosinové fosforylace je tak běžným markerem průběhu kapacity (Bravo et al., 2005). Na ejakulované spermii jsme nepozorovali žádný signál této protilátky, čímž jsme si ověřili použitelnost námi zvoleného markeru (Obr. 27 a). Naopak na spermii inkubované v kapacitačním médiu je viditelný výrazný signál v oblasti bičíku, což potvrzuje, že spermie v našem experimentu prošly kapacitací (Obr. 27 b).



Obr. 27: Kontrola kapacity lidských spermií protilátkou proti fosfotyrosinu (zeleně). (a) Ejakulované spermie nevykazují žádný signál protilátky na bičíku. (b) Kapacitované spermie mají protilátkou výrazně značený bičík, který je znakem kapacity. Akrozomální statut byl hodnocen na základě značení PNA (červeně), jádro je značeno pomocí DAPI (modře).

6. Diskuze

Zrání gamet, jejich příprava na oplození i oplození samotné, to vše jsou velice komplexní děje, kterých se účastní nespočet signálních drah a interakcí přítomných molekul. U některých z nich byly již molekulární mechanismy, které zodpovídají za jejich průběh, popsány, u dalších z nich ale tyto mechanismy stále nejsou známy. V posledních letech výzkum v oblasti reprodukční biologie velice pokročil a nyní byly identifikovány další proteiny, které jsou do těchto procesů zapojeny. Příkladem takového pokroku je identifikace hned několika klíčových fúzních proteinů spermie v uplynulém roce (Barboux et al., 2020; Fujihara et al. 2020; Lamas-Toranzo et al., 2020; Noda et al., 2020).

Porozumění molekulárním mechanismům a identifikace klíčových molekul, které se účastní oplození, je velmi potřebné. V současnosti je neplodných téměř 15 % párů pokoušejících se o početí, a 30 % z těchto párů je diagnostikována idiopatická neplodnost (Gelbaya et al., 2014). Identifikace klíčových molekul, které by mohli sloužit jako markery kvality spermií, by mohla výrazným způsobem pomoci při diagnostice a následné léčbě těchto párů.

Integriny patří mezi intenzivně studované proteiny výzkumu interakce gamet. Zatím však nebylo jednoznačně potvrzeno, zda lze integriny řadit mezi molekuly, které jsou esenciální pro úspěšnou fúzi, či nikoliv. Sengoku a kol. (2004) ve své práci inkubovali oocyty zbavené ZP s protilátkami proti řadě integrinů a následně takto ošetřené gamety použili pro *in vitro* fertilizaci (IVF). V rámci tohoto experimentu ukázali, že vazba a fúze gamet byla inhibována jen zhruba z poloviny, z čehož lze vyvodit, že integriny oocyty se na interakci gamet podílí, ale nemají zde esenciální roli. Naopak Glander a Schaller (1993) popsali významně sníženou expresi integrinů u teratozoospermii, tedy spermií s abnormální morfologií, které mají sníženou schopnost fertilizace. Integriny spermie se tedy pravděpodobně účastní spermiogeneze a následně jsou zapojeny také při oplození. Klentzeris a kol. (1995) pozorovali pozitivní korelaci mezi přítomností beta 1 integrinů na spermii a její schopností oplodnit oocyt, což naznačuje, že integriny se podílí na rekognici oocyty a na interakci těchto gamet. Tyto výzkumy jsou v souladu s výsledky studie Reddy a kol. (2003), který popsal sníženou expresi integrinu $\alpha 6\beta 1$ u spermií mužů, kteří měli problémy s plodností. Inkubací spermií s RGD peptidy, které jsou vázány integriny, navíc došlo k úplné inhibici vazby spermií k oocyty. I v této studii tedy bylo potvrzeno zapojení integrinů spermie, především pak integrinu $\alpha 6\beta 1$, při adhezi a fúzi gamet. Integrin $\alpha 6\beta 1$ byl na základě tohoto výzkumu navržen jako vhodný proteinový marker kvality spermií. Role beta 1 integrinů jako

fúzních proteinů byla potvrzena v experimentu s myší linií s podmíněným knock-down beta 1 integrinu spermií ve studii Barraud-Lange a kol. (2020), kdy v IVF experimentu došlo k hromadění spermií v perivitellinním prostoru. Výsledky těchto studií naznačují, že přítomnost integrinů na gametách, zejména pak na spermiích, je zásadní pro úspěšné oplození. Zatímco integriny vajíčka se nezdaří být pro fertilizaci nezbytné, integriny na spermiích mají pravděpodobně při interakci gamet významnou roli. Další výzkum integrinů na spermiích může významnou měrou přispět k objasnění tohoto procesu.

Přestože role integrinů stále není přesně popsána, recentní publikace navrhuje přesvědčivé hypotézy o jejich možném zapojení, a to nejen při adhezi a fúzi spermie a oocyty. Pro bližší porozumění a definování jejich role je klíčové tyto proteiny na spermiích identifikovat, popsat jejich lokalizaci a jejich relokaci v průběhu přípravy spermie na fúzi s oocytem, především pak po dokončení AR.

V rámci diplomové práce byly lokalizovány integriny alfa V a alfa 3 na myších, kančích a lidských spermiích. Myš je hojně využívaným modelovým organismem, a to nejen v oblasti reprodukční biologie. Pro studium gamet je myš využívána především pro svůj nenáročný chov, krátký životní cyklus, a také proto, že její genom lze geneticky modifikovat, což umožňuje studium gamet s knock-out požadovaného genu. Gamety myši jsou nejlépe prozkoumanými germinálními buňkami a byly proto zahrnuty do diplomového projektu. Avšak vzhledem k rozdílné morfologii myší a lidské spermie myš nepředstavuje nejvhodnější modelový organismus. Také reprodukční strategie myší a dalších hlodavců se značně liší od ostatních savců. U myší byly popsány specifické reprodukční odchylky jako je například předčasná indukce akrozomální reakce spermie (La Spina et al., 2016) či formování tzv. spermatických vláček u myšic (Moore et al., 2002). Proto byl pro účely této práce vybrán další modelový organismus, konkrétně kanec. Kančí spermie jsou znatelně větší a delší než spermie člověka. Hlavička je ovální, dlouhá 6 až 8 μm (Cummins a Woodall, 1985). Je tedy morfologicky podobnější kulaté hlavičce lidské spermie, dlouhé zhruba 5 μm , než hlavička myší spermie, která má srpkovitý tvar, a existuje zde předpoklad, že poznatky o molekulárních mechanismech chování spermie kance tak mohou být lépe translatovatelné na spermií lidskou. Kančí spermie jsou vhodným materiálem i vzhledem k tomu, že stejně jako spermie lidské jsou z etických důvodů získány v ejakulovaném stavu. Procházejí tedy, narozdíl od epididymálních spermií, dalšími změnami a váží proteiny a enzymy semenné plazmy. Spermie kance ale nejsou studovány v takové míře jako spermie myší a mnoho

proteinů, které již byly identifikovány u myši, na spermiích kanců doposud nebylo popsáno. Výsledky získané ze studia modelových organismů jsme v naší práci následně porovnali s výsledky získanými na spermiích člověka.

V rámci této práce jsou prezentovány mezidruhové rozdíly zejména v lokalizaci alfa 3 integrinu. Ten byl na akrozom-intaktní spermii myši lokalizován v oblasti apikálního akrozomu, u člověka a kance však byl detekován v ES a PAR. To naznačuje odlišnou funkci této podjednotky u jednotlivých druhů popsanou níže v této kapitole. Naopak v lokalizaci alfa V integrinu jsme nepozorovali výrazné mezidruhové rozdíly. Porozumění mezidruhovým rozdílům v morfologii a expresi proteinů může přispět ke komplexnímu pochopení procesu oplození.

6.1. Alfa V integrin

V této práci byla s využitím metody nepřímé imunofluorescence popsána lokalizace integrinu alfa V na akrozom-intaktních epididymálních myších a ejakulovaných kančích a lidských spermiích, a na akrozom-zreagovaných spermiích těchto druhů savců. Na myších spermiích byla pozorována jeho exprese v oblasti akrozomu a relokace do ES a PAR, na lidských spermiích taktéž, analogicky se studií naší laboratoře (Palenikova et al., 2021). Na kapacitované lidské spermii lze v důsledků zvýšené fluidity membrány pozorovat laterální pohyb alfa V integrinu a jeho počínající relokaci do PAR, tedy počínající AR. To lze vysvětlit způsobem uchování spermií. Získaný ejakulát byl zamražen a uchován v tekutém dusíku, následně byl rozmražen a spermie byly využity pro účely diplomového projektu. Je možné, že vlivem mražení došlo k nepatrnému poškození spermií, kdy mezi kapacitovanými spermii docházelo v kapacitačním mediu ke spontánní AR. Vhodnější by proto bylo využití spermií nemražených, čerstvě ejakulovaných. To je ale problematické především z logistických důvodů. Heterogenitu spermií ve vzorcích rozdělených na ejakulované, kapacitované a akrozom-zreagované pozorujeme také při imunodetekci exprese alfa V. Densitometrická analýza ukázala zvýšenou expresi alfa V integrinu u akrozom-zreagovaných lidských spermií v porovnání se spermii ejakulovanými. Výsledky analýzy byly ale vyhodnoceny jako nesignifikantní. Vzorky spermií, které byly využity na přípravu lyzátů, tak pravděpodobně neobsahovaly homogenní skupiny spermií. Pro další výzkum by tedy bylo vhodné lidské spermie selektovat a rozdělit do homogenních skupin, především pak oddělit akrozom-intaktní a akrozom-zreagované spermie na základě vhodně zvoleného markeru akrozomálního statutu.

Na kančích spermii byl integrin alfa V lokalizován v oblasti apikálního akrozomu a exprese byla viditelná také v PAR. V průběhu AR došlo k relokaci alfa V do ES a PAR, kde byla pozorována výrazná exprese, shodně s výsledky výzkumu naší laboratoře (Palenikova et al., 2021).

Při vyhodnocování snímků z konfokálního mikroskopu je třeba vzít v potaz omezenou rozlišovací schopnost konfokální mikroskopie. Pro přesnější lokalizaci podjednotek, především pro určení příslušného membránového kompartmentu v oblasti akrozomu, je vhodné využití super-rezoluční mikroskopie. S využitím mikroskopie se strukturovaným osvětlením (SIM) byl alfa V integrin lokalizován v PM, OAM i v IAM akrozomu (Palenikova et al., 2021).

Alfa V integrin byl na lidské spermii lokalizován již na konci 20. století (Fusi et al., 1996; Glander et al., 1998). Glander a kol. (1998) detekovali alfa V integrin v PAR a nepozorovali žádnou změnu v lokalizaci alfa V integrinu po indukci AR. Výsledky této studie se tedy značně liší od výsledků v této práci. Je možné, že v tomto výzkumu docházelo ke spontánní AR před její indukcí, podobně jako bylo popsáno v této práci, a že byly pozorovány již akrozom-zreagované spermie. Ve studii Fusi a kol. (1996) byl integrin alfa V popsán v IAM akrozomu a následně byla pozorována jeho relokace z akrozomu do ES a PAR. Výsledky jsou tedy analogické s výsledky této práce, ačkoliv v této práci nepozorujeme zmíněnou detailnější lokalizaci v IAM. Je ale nutné vzít v úvahu rok provedení uvedených prací a tehdejší technické možnosti. Relevantnější výsledek pravděpodobně prezentuje uvedený recentní výzkum využívající SIM.

Na myší spermii byl integrin alfa V popsán poprvé ve studii Boissonnas a kol. (2010). Výsledky v tomto článku jsou ale v rozporu s výsledky této práce. Integrin alfa V zde na epididymálních spermii při využití imunofluorescenčního barvení nevykazoval žádnou expresi a byl lokalizován až na kapacitované spermii, a to v oblasti apikálního akrozomu. I po AR zde byla viditelná výrazná exprese integrinu alfa V v IAM akrozomu. My jsme tuto podjednotku lokalizovali již před AR a poté došlo k její relokaci do ES a PAR. Tyto studie popisující lokalizaci alfa V integrinu tedy prezentovaly rozporuplné výsledky a ukázalo se, že je vhodné provést nové studie využívající pokročilých technologií.

Western blot imunodetekce alfa V integrinu v lyzátech myších i kančích spermii a následná denzitometrická analýza ukázala klesající tendenci exprese integrinu alfa V u kapacitovaných a akrozom-zreagovaných spermii v porovnání se spermii epididymálními a ejakulovanými. To odpovídá její lokalizaci v oblasti akrozomu vizualizované pomocí

nepřímé imunofluorescence. Při AR dochází k mnohonásobnému splynutí PM a OAM, které společně vytváří tzv. hybridní váčky, a následně dochází k odloučení těchto membránových váček pryč z povrchu spermie (Barros et al., 1967). To je pravděpodobně příčinou námi pozorované snížené exprese integrinu po AR, neboť je odloučen jako součást hybridních váček. Současně dochází k reorganizaci membrán a k relokaci klíčových proteinů do IAM ES. Kromě této relokace integrinu alfa V v rámci povrchových membrán spermie, se může alfa V do ES dostávat i jinou alternativní cestou. Bylo popsáno, že po uvolnění z povrchu spermie se mohou některé z hybridních váček zpětně navazovat na povrch spermie a v oblasti ES fúzovat s PM spermie (Zanetti a Mayorga, 2009).

Výrazná exprese a lokalizace alfa V integrinu na ejakulovaných spermiiích naznačuje jeho možnou roli ještě před samotným kontaktem spermie s oocytem. Integriny na gametách savců se totiž pravděpodobně účastní jak oplození, tak dějů, které mu předcházejí. Jednou z diskutovaných funkcí RGD-vazebných integrinů, jako je alfa V, je spoluúčast na tvorbě ovidukálního rezervoáru spermii (Osycka-Salut et al., 2017; Merc et al., 2021). Spermie jsou zde vázány přes lektinové receptory k sacharidovým zbytkům na membránách epiteliálních buněk oviduktu (Lefebvre et al., 1995; Suarez, 1998). Epiteliální buňky oviduktu exprimují též integriny a mohly by navázat integriny spermie vzájemnou vazbou fibronektinu přítomného na epitelu a v ovidukální tekutině (Osycka-Salut et al., 2017). Na epiteliálních buňkách byly identifikovány integriny alfa V, beta 1 a beta 3 (Gabler et al., 2003). Přítomnost alfa V integrinu, jakožto ligandu fibronektinu, na ejakulovaných spermiiích nasvědčuje možné existenci těchto interakcí. Avšak výsledky některých studií ukazují, že fibronektin svou vazbou na integriny iniciuje kapacitaci. Tato vazba je nejspíš pouze doplňkovou, jelikož při zvýšení koncentrace fibronektinu v oviduktu dochází k uvolnění spermii (Osycka-Salut et al., 2020).

V oviduktu spermie interagují s extracelulárními váčky zvanými oviduktosomy (Al-Dossary et al., 2013). Oviduktosomy obsahují řadu proteinů a fúzí dochází k přenosu těchto proteinů na membrány spermie. Jedná se o nezbytný proces pro další přípravu spermie na oplození, tedy pro úspěšný průběh kapacitace a akrozomální reakce (Ferraz et al., 2019). Na těchto váčkách byl u myši lokalizován integrin $\alpha V\beta 3$ a tetraspanin CD9, a bylo prokázáno, že integriny zprostředkovávají fúzi váček se spermii (Al-Dossary et al., 2015). Přítomný tetraspanin CD9 dle Al-Dossary a kol. (2015) pravděpodobně organizuje integriny v místě fúze. Integriny váček a spermie by zde mohly interagovat, podobně jako v případně epiteliálních buněk oviduktu, přes přítomný fibronektin či vitronektin. Lokalizace integrinu

alfa V na myších, kančích a lidských akrozom-intaktních spermích podporuje tuto hypotézu. Podobné interakce, jako zde byly popsány, by se zřejmě mohly účastnit i fúze epididysomů se spermii v rámci epididymální maturace a dalších stádií zrání spermií, jelikož dle výsledků této práce je alfa V exprimována již na spermii v *testes*. Alfa V integrin byl lokalizován na testikulárních spermích v oblasti celé hlavičky. Podobně je ve studii Palenikova a kol. (2021) popsána exprese alfa V integrinu na jednotlivých vývojových stádiích spermatogenních buněk. Integriny přítomné v těchto váčcích fúzujících se spermii by navíc mohly ovlivnit výsledky studií využívajících gamety podmíněných knock-out myší s delecí genů pro integriny ve specifických tkáních (Miller et al., 2000; He et al., 2003). Takové spermiie by mohly tyto integriny zpětně získat právě fúzí s oviduktosomy či epididysomy, což je nutné ve studiích používajících tento model uvážit. Barraud-Lange a kol. (2007) navíc popsali výměnu váčků také mezi oocytem a spermii.

Jelikož integrinové podjednotky tvoří heterodimery, podjednotka alfa V musí být na spermii přítomna ve vazbě s beta podjednotkou. Dimerizace alfa V s některou z beta podjednotek zatím na myši, kančí ani lidské spermii potvrzena nebyla. Ve studii Boissonnas a kol. (2010) byl na myši spermii na základě kolokalizace identifikován heterodimer $\alpha V\beta 3$. Lokalizace těchto podjednotek ve stejné oblasti ale není dostačující, jelikož podjednotka beta 3 může dále dimerizovat také s podjednotkou alfa IIb a podjednotka alfa V může tvořit heterodimery s podjednotkami beta 1, beta 3, beta 5, beta 6 a beta 8 (Hynes, 2002). Pro potvrzení je potřeba provést další výzkum zahrnující metody vyhodnocující interakci podjednotek jako PLA (proximity ligation assay) či ko-imunoprecipitace. Navíc, jak již bylo v této kapitole uvedeno, pozorovaná lokalizace alfa V ve studii Boissonnas a kol. (2010) se liší od lokalizace alfa V v této práci i v recentní publikaci naší laboratoře (Palenikova et al., 2021). Ve stejných oblastech jako integrin alfa V byla lokalizována podjednotka beta 1 (Frolikova et al., 2016), která může s alfa V podjednotkou též tvořit heterodimery. Studie zaměřená na identifikaci heterodimerů alfa V podjednotky tvořených s beta podjednotkami by mohla dále přiblížit její roli na spermii.

Jak bylo popsáno, relokace alfa V podjednotky do fúzogenní domény ES napovídá, že se podílí na fúzi gamet (Palenikova et al., 2021). Stejně tak můžeme v ES po AR pozorovat i další integriny a jiné proteiny jako je Izumo1, CD9, CD81, CD151 či CD46 (Sosnik et al., 2009; Frolikova et al., 2016, 2018; Jankovicova et al., 2020). Zejména popis alfa V integrinu na lidské spermii vybízí k dalšímu výzkumu a zvážení tohoto integrinu při vyhodnocování proteinových markerů kvality spermii, obdobně jako u integrinu $\alpha 6\beta 1$ (Reddy et al., 2003).

Bylo navrženo několik hypotéz popisujících interakce integrinů přítomných ve fúzogenní doméně spermie při fúzi membrán gamet. Vzájemná interakce RGD-vazebných integrinů exprimovaných na gametách by mohla být zprostředkována přes fibronektin či vitronektin přítomný v okolí spermie (Boissonnas et al., 2010). Integriny spermie by mohly interagovat také s tetraspaniny oocyty (Miyado et al., 2000; Takahashi et al., 2001; Ziyat et al., 2006). Byla popsána vazba extracelulární domény EC2 tetraspaninů CD9, CD81 a CD151, které byly identifikovány na oocyty, k ligand vazebné doméně $\alpha V\beta 3$ integrinu (Yu et al., 2017). Navržen byl také model preferované *trans*-interakce, tedy interakce proteinů přítomných v rozdílných membránách, podjednotky alfa 3 s podjednotkou beta 4 (Frolikova et al., 2019).

6.2. Alfa 3 integrin

Dále byla v této práci byla popsána lokalizace integrinu alfa 3 na akrozom-intaktních myších, lidských a kančích spermích. Integrin alfa 3 jsme u myši pozorovali v oblasti apikálního akrozomu, shodně s výsledky studií Frolikova a kol. (2016) a Jankovicova a kol. (2020). Jeho lokalizace byla v těchto pracích přesněji určena pomocí SIM do PM a OAM apikálního akrozomu, kde byl v této oblasti pomocí metody PLA dokonce identifikován heterodimer $\alpha 3\beta 1$ (Frolikova et al., 2019). Na lidských spermích jsme integrin alfa 3 lokalizovali v ES a PAR. Oproti tomu ve studii Glander a kol. (1998) byl integrin alfa 3 lokalizován v akrozomu. Naopak Klentzeris a kol. (1995) lokalizovali integrin alfa 3 v ES, analogicky s výsledky této práce. Opět je ale nutné vzít v úvahu rok provedení uvedených prací a tehdejší technické možnosti. Na rozdíl od myších a lidských spermíí, na spermích kance doposud nebyl integrin alfa 3 popsán. My jsme na kančích spermích pozorovali výraznou expresi alfa 3 v ES a PAR, obdobně jako na spermích člověka.

Přítomnost alfa 3 integrinu byla potvrzena pomocí western blot imunodetekce. V lyzátech akrozom-intaktních spermíí byl protilátkou proti alfa 3 integrinu detekován protein o velikosti 116 kDa a 120 kDa u příslušných druhů. U člověka byl detekován také protein o velikosti 150 kDa, který dle informace výrobce uvedené ve specifikacích protilátky reprezentuje plně glykosilovanou formu alfa 3 integrinu. Obdobně i u myši byl detekován plně glykosilovaný alfa 3 integrin a dále zde byl detekován signál v oblasti 130 kDa, který představuje pravděpodobně částečně glykosilovanou formu alfa 3 integrinu. U myši a kance byl pozorován signál v oblasti 45 kDa, který nebyl detekován v negativní kontrole. Tato nespecifická interakce nebyla výrobcem uvedena ve specifikacích protilátky. Je možné, že

došlo ke štěpení proteinu v disulfidickém můstku, přestože lyzáty spermií byly připraveny v neredukujících podmínkách, kdy by disulfidické můstky měly být zachovány.

Lokalizace integrinu alfa 3 v oblasti apikálního akrozomu na myších epididymálních spermiích naznačuje možnou asociaci s dalšími přítomnými proteiny. Heterodimer $\alpha 3\beta 1$, který byl na spermii identifikován v PM a OAM (Frolikova et al., 2019), v somatických buňkách asociuje s tetraspaniny CD9 a CD81 (Berditchevski et al., 1996). Přítomnost těchto tetraspaninů byla popsána také na spermii, a to ve stejné oblasti (Frolikova et al., 2018), což podporuje hypotézu o vzájemné interakci tetraspaninů a integrinů a o tvorbě tetraspaninových sítí. Je tedy možné, že zde dochází k interakci integrinu $\alpha 3\beta 1$ a tetraspaninů.

Taktéž CD151 interaguje s podjednotkou alfa 3 a zprostředkovává interakci $\alpha 3\beta 1$ s CD9 (Serru et al., 1999). Na spermii člověka byl v této práci alfa 3 integrin lokalizován v ES a PAR, stejně jako tetraspanin CD 151 (Jankovičová et al., 2020), což naznačuje jejich možnou interakci v této oblasti. Tetraspanin CD151 posiluje v hemidesmosomech adhezi $\alpha 3\beta 1$ s $\alpha 6\beta 4$ a s navázaným plektinem, který je přítomen kolem jádra (te Molder et al., 2019). Bylo navrženo, že u myší spermií interakcí s $\alpha 6\beta 4$ zprostředkovává stabilitu ES před AR (Jankovičová et al., 2020). Také u lidské spermií by tedy obdobně, interakcí s $\alpha 3\beta 1$, mohl CD151 zprostředkovávat stabilitu ES před AR. Další výzkum by mohl vyhodnotit vzájemnou interakci CD9, CD81 a CD151 a alfa 3 integrinu na myších, lidských a kančích spermiích.

V rámci tetraspaninových sítí by mohly tetraspaniny vzájemnou asociací s integriny zprostředkovat regulaci integrinů, jejich organizaci do kompartmentů membrány, a po AR by v průběhu reorganizace membrány mohly realizovat jejich případnou relokační do ES. Prozatím ale není přesně popsáno, které vzájemné interakce tetraspaninů a integrinů jsou na spermii přítomné, které další proteiny jsou součástí těchto sítí, ani kterých dějů se účastní.

Integrinový heterodimer $\alpha 3\beta 1$ identifikovaný na myší spermii (Frolikova et al., 2019), jakožto protein interagující s aktinovým cytoskeletem, by se zde mohl podílet na udržení stability akrozomu. Akrozomální reakce je pro spermii putující k oocyту zásadním okamžikem. Dochází k fúzi PM a OAM akrozomu, reorganizaci zbývajících membrán a k relokační proteinů klíčových pro fúzi gamet do ES (Bedford et al., 1979). Pro tyto děje je nezbytná depolymerizace aktinového cytoskeletu mezi PM a OAM a jeho přeskupení (Brener et al., 2003). Významným proteinem spermií je CD46, který váže aktinový cytoskelet a podílí se na udržení stability akrozomu (Inoue et al., 2003). Na myší spermii byl lokalizován na akrozomálních membránách v apikálním akrozomu (Frolikova et al., 2016). V OAM byl

identifikován také heterodimer $\alpha 3\beta 1$ (Frolikova et al., 2019). CD46 v somatických buňkách asociuje právě s beta 1 integrinovou podjednotkou (Lozahic et al., 2000) a jejich vazba byla potvrzena pomocí PLA metody i na myších spermiích (Frolikova et al., 2016). Je tedy možné, že CD46 na spermii asociuje s integrinem $\alpha 3\beta 1$ a společně se podílejí na udržení stability akrozomu a na regulaci zmíněných dějů (Merc et al., 2021).

Pro objasnění role integrinu alfa 3 na spermii by bylo vhodné popsat jeho lokalizaci také na akrozom-zreagovaných spermiích, na což v této práci již z časových důvodů nebyl prostor. Případná relokace této podjednotky po AR do fúzogenní domény spermie by mohla přiblížit funkci tohoto integrinu při adhezi a fúzi gamet.

7. Závěr

V diplomové práci byly na spermiích popsány vybrané integriny, a sice alfa V a alfa 3. Tyto podjednotky byly detekovány s využitím imunoblotovací metody a lokalizovány pomocí nepřímé imunofluorescence. Jejich lokalizace byla mezidruhově porovnána, a to na myších, kančích a lidských spermiích. Integrin alfa V byl na akrozom-intaktních myších, kančích i lidských spermiích lokalizován zejména v oblasti akrozomu. Oproti tomu v lokalizaci integrinu alfa 3 jsme pozorovali mezidruhové rozdíly. V porovnání s lidskými a kančími spermiemi se lokalizace tohoto integrinu u myších spermií lišila. Na myších spermiích byl alfa 3 integrin vizualizován v akrozomu, na kančích a lidských spermiích byl lokalizován především v PAR a ES. Na kančích spermiích tento integrin navíc doposud nebyl popsán. Lokalizace těchto podjednotek naznačuje jejich možné zapojení při průchodu spermie samčím a následně také samičím reprodukčním ústrojím, ještě před samotným kontaktem s oocytem.

Dále byla popsána relokace alfa V integrinu v průběhu akrozomální reakce, a to do ekvatoriálního segmentu – fúzogenní domény spermie. Relokace této podjednotky do ES vybízí ke zvážení její možné role při interakci spermie s oocytem, tedy při adhezi a následné fúzi těchto gamet.

Diplomový projekt prezentuje data vhodná pro další výzkum integrinů alfa V a alfa 3 a jejich interakcí s dalšími proteiny. Především u integrinu alfa 3 je potřeba další výzkum popisující jeho lokalizaci po AR. Další studium těchto podjednotek by mohlo objasnit roli těchto integrinů v procesu oplození, identifikovat jejich heterodimery a také vyhodnotit možné využití alfa V integrinu jako proteinového markeru plodnosti při vyhodnocování kvality spermií.

8. Seznam použité literatury

- Abram CL, Lowell CA. 2009. The Ins and Outs of Leukocyte Integrin Signaling. *Annual review of immunology* 27:339.
- Al-Dossary AA, Bathala P, Caplan JL, Martin-DeLeon PA. 2015. Oviductosome-sperm membrane interaction in cargo delivery: Detection of fusion and underlying molecular players using three-dimensional super-resolution structured illumination microscopy (SR-SIM). *Journal of Biological Chemistry* 290:17710–17723.
- Al-Dossary AA, Strehler EE, Martin-DeLeon PA. 2013. Expression and Secretion of Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase 4a (PMCA4a) during Murine Estrus: Association with Oviductal Exosomes and Uptake in Sperm. *PLoS ONE* 8:80181.
- Allison AC, Hartree EF. 1970. Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. *Journal of reproduction and fertility* 21:501–515.
- Almeida EAC, Huovila APJ, Sutherland AE, Stephens LE, Calarco PG, Shaw LM, Mercurio AM, Sonnenberg A, Primakoff P, Myles DG, White JM. 1995. Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. *Cell* 81:1095–1104.
- Amin Arnaout M, Goodman S, Xiong J-P. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion.
- Antonov AS, Kolodgie FD, Munn DH, Gerrity RG. 2004. Regulation of macrophage foam cell formation by alphaVbeta3 integrin: potential role in human atherosclerosis. *The American journal of pathology* 165:247–258.
- Arnoult C, Kazam IG, Visconti PE, Kopf GS, Villaz M, Florman HM. 1999. Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:6757.
- Austin CR. 1951. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Australian journal of scientific research Ser B: Biological sciences* 4:581–596.
- Avella MA, Dean J. 2011. Fertilization with acrosome-reacted mouse sperm: Implications for the site of exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:19843–19844.
- Baba T, Michikawa Y, Kawakura K, Arai Y. 1989. Activation of boar proacrosin is effected by processing at both N-and C-terminal portions of the zymogen molecule. *FEBS Letters* 244:132–136.
- Bahat A, Eisenbach M. 2006. Sperm thermotaxis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 252:115–119.
- Barboux S, Ialy-Radio C, Chalbi M, Dybal E, Homps-Legrand M, do Cruzeiro M, Vaiman D, Wolf JP, Ziyat A. 2020. Sperm SPACA6 protein is required for mammalian Sperm-Egg Adhesion/Fusion. *Scientific Reports* 10.
- Barraud-Lange V, Ialy-Radio C, Chalas C, Holtzmann I, Wolf JP, Barboux S, Ziyat A. 2020. Partial Sperm beta1 Integrin Subunit Deletion Proves Its Involvement in Mouse Gamete Adhesion/Fusion. *International Journal of Molecular Sciences* 21:1–13.
- Barraud-Lange V, Naud-Barriant N, Bomsel M, Wolf J, Ziyat A. 2007. Transfer of oocyte membrane fragments to fertilizing spermatozoa. *The FASEB Journal* 21:3446–3449.
- 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 Developmental Biology* 7.
- Barros C, Bedford JM, Franklin LE, Austin CR. 1967. Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. *The Journal of Cell Biology* 34:C1
- Bartolazzi A, Cerboni C, Full C, Valentini C, Giorgio Natali P, Ventura I, Bigotti A. 1993. VLA-3 Distribution in Normal and Neoplastic Non-lymphoid Human Tissues. *Pathology - Research and Practice* 189:387–393.
- Bearer EL, Friend DS. 1990. Morphology of mammalian sperm membranes during differentiation, maturation, and capacitation. *Journal of electron microscopy technique* 16:281–297.
- Bedford JM, Moore HDM, Franklin LE. 1979. Significance of the equatorial segment of the acrosome of the spermatozoon in eutherian mammals. *Experimental cell research* 119:119–126
- Benoff S. 1997. Carbohydrates and fertilization: an overview. *Molecular human reproduction* 3:599–637.
- Berditchevski F. 2001. Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye - PubMed. *Journal of cell science* 114:4143–4151.
- Berditchevski F, Zutter MM, Hemler ME. 1996. Characterization of novel complexes on the cell surface between integrins and proteins with 4 transmembrane domains (TM4 proteins). *Molecular biology of the cell* 7:193–207.
- Berruti G, Paiardi C. 2011. Acrosome biogenesis: Revisiting old questions to yield new insights. *Spermatogenesis* 1:95–98.

- Bianchi E, Doe B, Goulding D, Wright GJ. 2014. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilisation. *Nature* 508:483.
- Bianchi E, Wright GJ. 2014. Izumo meets Juno: Preventing polyspermy in fertilization. *Cell Cycle* 13:2019.
- Bleil JD, Wassarman PM. 1980. Mammalian sperm-egg interaction: Identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* 20:873–882
- Boissonnas CC, Montjean D, Lesaffre C, Auer J, Vaiman D, Wolf JP, Ziyat A. 2010. Role of sperm $\alpha v \beta 3$ integrin in mouse fertilization. *Developmental Dynamics* 239:773–783.
- Boucheix C, Rubinstein E. 2001. Tetraspanins. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 2001 58:9 58:1189–1205.
- Bravo MM, Aparicio IM, Garcia-Herreros M, Gil MC, Peña FJ, Garcia-Marin LJ. 2005. Changes in tyrosine phosphorylation associated with true capacitation and capacitation-like state in boar spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 71:88–96.
- Brener E, Rubinstein S, Cohen G, Shternall K, Rivlin J, Breitbart H. 2003. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of reproduction* 68:837–845.
- Breuss JM, Gallo J, DeLisser HM, Klimanskaya I v., Folkessons HG, Pittet JF, Nishimura SL, Aldape K, Landers D v., Carpenter W, Gillett N, Sheppard D, Matthey MA, Albelda SM, Kramer RH, Pytela R. 1995. Expression of the $\beta 6$ integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling. *Journal of Cell Science* 108:2241–2251.
- Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA. 1994. Requirement of vascular integrin $\alpha v \beta 3$ for angiogenesis. *Science (New York, NY)* 264.
- Buffone MG, Foster JA, Gerton GL. 2008. The role of the acrosomal matrix in fertilization. *The International journal of developmental biology* 52:511–522.
- Burns KH, Owens GE, Fernandez JM, Nilson JH, Matzuk MM. 2002. Characterization of integrin expression in the mouse ovary. *Biology of Reproduction* 67:743–751.
- Caballero J, Frenette G, Sullivan R. 2011. Post testicular sperm maturational changes in the bull: Important role of the epididymosomes and prostasomes. *Veterinary Medicine International* 2011.
- Calderwood DA. 2004. Talin controls integrin activation. In: *Biochemical Society Transactions*. Vol. 32.
- Campbell ID, Humphries MJ. 2011. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3:1–14.
- Campbell S, Swann HR, Seif MW, Kimber SJ, Aplin JD. 1995. Cell adhesion molecules on the oocyte and preimplantation human embryo. *Human reproduction (Oxford, England)* 10:1571–1578.
- Cardullo RA, Florman HM. 1993. Strategies and methods for evaluating acrosome reaction. *Methods in enzymology* 225:136–153.
- Carter WG, Wayner EA, Bouchard TS, Kaur P. 1990. The role of integrins $\alpha 2 \beta 1$ and $\alpha 3 \beta 1$ in cell-cell and cell-substrate adhesion of human epidermal cells. *Journal of Cell Biology* 110:1387–1404.
- Chalbi M, Barraud-Lange V, Ravaux B, Howan K, Rodriguez N, Soule P, Ndzoudi A, Boucheix C, Rubinstein E, Wolf JP, 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 (Cambridge, England)* 141:3732–9.
- Chamberlin ME, Dean J. 1990. Human homolog of the mouse sperm receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87.
- Chang MC. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168:697–698.
- Chen H, Sampson NS. 1999. Mediation of sperm-egg fusion: evidence that mouse egg $\alpha 6 \beta 1$ integrin is the receptor for sperm fertilin β . *Chemistry & biology* 6:1–10.
- Chiu PCN, Wong BST, Chung MK, Lam KKW, Pang RTK, Lee KF, Sumitro SB, Gupta SK, Yeung WSB. 2008. Effects of Native Human Zona Pellucida Glycoproteins 3 and 4 on Acrosome Reaction and Zona Pellucida Binding of Human Spermatozoa. *Biology of Reproduction* 79:869–877.
- Cho C, Bunch DOD, Faure JE, Goulding EH, Eddy EM, Primakoff P, Myles DC. 1998. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin β . *Science* 281.
- Cooper CR, Chay CH, Pienta KJ. 2002. The role of $\alpha(v)\beta(3)$ in prostate cancer progression. *Neoplasia (New York, NY)* 4:191–4.
- Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW. 1988. Induction of acrosome reactions by the human zona pellucida. *Biology of Reproduction* 38.
- Cummins JM, Woodall PF. 1985. On mammalian sperm dimensions. *Journal of reproduction and fertility* 75:153–175.
- Dacheux JL, Luc Gatti J, Dacheux F. 2003. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microscopy research and technique* 61:7–17.
- Dam AHDM, Feenstra I, Westphal JR, Ramos L, van Golde RJT, Kremer JAM. 2007. Globozoospermia revisited. *Human reproduction update* 13:63–75.

- Demott RP, Suarez SS. 1992. Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biology of Reproduction* 46:779–785.
- Ebensperger C, Barros C. 1984. Changes at the hamster oocyte surface from the germinal vesicle stage to ovulation. *undefined* 9:387–397.
- Eddy E, O'Brien D. 1994. The spermatozoon. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The Physiology of Reproduction*. NY: Raven Press. p 29–77.
- Eisenbach M. 1999. Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation - PubMed. *Developmental genetics* 25:87–94.
- Evans JP, Kopf GS, Schultz RM. 1997. Characterization of the binding of recombinant mouse sperm fertilin beta subunit to mouse eggs: evidence for adhesive activity via an egg beta1 integrin-mediated interaction. *Developmental biology* 187:79–93.
- Evans JP, Schultz RM, Kopf GS. 1995a. Identification and localization of integrin subunits in oocytes and eggs of the mouse. *Molecular Reproduction and Development* 40:211–220.
- Evans JP, Schultz RM, Kopf GS. 1995b. Mouse sperm-egg plasma membrane interactions: analysis of roles of egg integrins and the mouse sperm homologue of PH-30 (fertilin) beta - PubMed. *Journal of cell science* 108:3267–78.
- Fawcett DW. 1975. The mammalian spermatozoon. *Developmental Biology* 44:394–436.
- Fénichel P, Gobert B, Carré Y, Barbarino-Monnier P, Hiéronimus S. 1999. Polycystic ovary syndrome in autoimmune disease. *Lancet* 353:2210.
- Ferraz M de AMM, Carothers A, Dahal R, Noonan MJ, Songsasen N. 2019. Oviductal extracellular vesicles interact with the spermatozoon's head and mid-piece and improves its motility and fertilizing ability in the domestic cat. *Scientific Reports* 2019 9:1 9:1–12.
- Florman HM. 1994. Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca²⁺ are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis. *Developmental biology* 165:152–164.
- Fraser LR. 1998. Sperm capacitation and the acrosome reaction. *Human reproduction (Oxford, England)* 13 Suppl 1:9–19.
- Frisch SM, Francis H. 1994. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *Journal of Cell Biology* 124.
- Frolikova 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.
- Frolikova M, Sebkova N, Ded L, Dvorakova-Hortova K. 2016. Characterization of CD46 and β 1 integrin dynamics during sperm acrosome reaction. *Scientific Reports* 6.
- Frolikova M, Valaskova E, Cerny J, Lumeau A, Sebkova N, Palenikova V, Sanchez-Hernandez N, Pohlova A, Manaskova-Postlerova P, Dvorakova-Hortova K. 2019. Addressing the compartmentalization of specific integrin heterodimers in Mouse sperm. *International Journal of Molecular Sciences* 20.
- Fujihara Y, Lu Y, Noda T, Oji A, Larasati T, Kojima-Kita K, Yu Z, Matzuk RM, Matzuk MM, Ikawa M. 2020. Spermatozoa lacking Fertilization Influencing Membrane Protein (FIMP) fail to fuse with oocytes in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117.
- Fusi FM, Tamburini C, Mangili F, Montesano M, Ferrari A, Bronson RA. 1996. The expression of alpha V, alpha 5, beta 1 and beta 3 integrin chains on ejaculated human spermatozoa varies with their functional state. *Molecular Human Reproduction* 2:169–175.
- Gabler C, Chapman DA, Killian GJ. 2003. Expression and presence of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the oestrous cycle. *Reproduction* 126.
- Gadella BM, Tsai PS, Boerke A, Brewis IA. 2008. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *International Journal of Developmental Biology* 52:473–480.
- Gage MJG. 1998. Mammalian Sperm Morphometry . *Biological Sciences* 265:97–103.
- Gailit J, Clark RAF. 1996. Studies in vitro on the role of alpha v and beta 1 integrins in the adhesion of human dermal fibroblasts to provisional matrix proteins fibronectin, vitronectin, and fibrinogen. *The Journal of investigative dermatology* 106:102–108.
- Ganguly A, Bukovsky A, Sharma RK, Bansal P, Bhandari B, Gupta SK. 2010. In humans, zona pellucida glycoprotein-1 binds to spermatozoa and induces acrosomal exocytosis. *Human Reproduction* 25:1643–1656.
- Gatti JL, Castella S, Dacheux F, Ecroyd H, Métayer S, Thimon V, Dacheux JL. 2004. Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal reproduction science* 82–83:321–339
- Gelbaya TA, Potdar N, Jevé YB, Nardo LG. 2014. Definition and epidemiology of unexplained infertility. *Obstetrical & gynecological survey* 69:109–115.
- van Gestel RA, Brewis IA, Ashton PR, Helms JB, Brouwers JF, Gadella BM. 2005. Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Molecular Human Reproduction* 11.

- Glander H-J, Schaller J. 1993. Beta 1-integrins of spermatozoa: a flow cytophotometric analysis. *International Journal of andrology* 16:105–106.
- Glander HJ, Schaller J, Rohwedder A, Henkel R. 1998. Adhesion molecules and matrix proteins on human spermatozoa. In: *Andrologia*. Vol. 30.
- Goldfinger LE, Hopkinson SB, deHart GW, Collawn S, Couchman JR, Jones JC. 1999. The alpha3 laminin subunit, alpha6beta4 and alpha3beta1 integrin coordinately regulate wound healing in cultured epithelial cells and in the skin. *Journal of Cell Science* 112.
- Gupta V, Alonso JL, Sugimori T, Issafi M, Xiong J-P, Arnaout MA. 2008. Role of the β -subunit arginine/lysine finger in integrin heterodimer formation and function. *The Journal of Immunology* 180.
- Hardy DM, Garbers DL. 1995. A Sperm Membrane Protein That Binds in a Species-specific Manner to the Egg Extracellular Matrix Is Homologous to von Willebrand Factor. *Journal of Biological Chemistry* 270:26025–26028.
- Harrison RA, Ashworth PJ, Miller NG. 1996. Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Molecular reproduction and development* 45:378–91.
- He ZY, Brakebusch C, Fässler R, Kreidberg JA, Primakoff P, Myles DG. 2003. None of the integrins known to be present on the mouse egg or to be ADAM receptors are essential for sperm-egg binding and fusion. *Developmental biology* 254:226–237.
- van der Horst G, Seier J v., Spinks AC, Hendricks S. 1999. The maturation of sperm motility in the epididymis and vas deferens of the vervet monkey, *Cercopithecus aethiops*. *International Journal of Andrology* 22:197–207.
- Howes E, Pascall JC, Engel W, Jones R. 2008. Interactions between mouse ZP2 glycoprotein and proacrosin; a mechanism for secondary binding of sperm to the zona pellucida during fertilization. *Journal of Cell Science* 114:4127–4136.
- Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. 2006. Integrin ligands at a glance. *Journal of Cell Science* 119:3901–3903.
- Hunter RHF. 1996. Ovarian Control of Very Low Sperm/egg Ratios at the Commencement of Mammalian Fertilisation to Avoid Polyspermy. *Molecular reproduction and development*.44:417–422.
- Hynes RO. 1987. Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell* 48.
- Hynes RO. 2002. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* 110:673–687
- 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. *Molecular and Cellular Biology* 23:2614.
- 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.
- Jankovicova J, Frolikova M, Palenikova V, Valaskova E, Cerny J, Secova P, Bartokova M, Horovska L, Manaskova-Postlerova P, Antalikova J, Komrskova K. 2020. Expression and distribution of CD151 as a partner of alpha6 integrin in male germ cells. *Scientific Reports* 10.
- Jankovicova J, Frolikova M, Sebkova N, Simon M, Cupperova P, Lipcseyova D, Michalkova K, Horovska L, Sedlacek R, Stopka P, Antalikova J, Dvorakov-Hortova K. 2016. Characterization of tetraspanin protein CD81 in mouse spermatozoa and bovine gametes. *Reproduction* 152:785–793.
- Jankovičová J, Sečová P, Michalková K, Antalíková J. 2020. Tetraspanins, More than Markers of Extracellular Vesicles in Reproduction. *International Journal of Molecular Sciences* 21:1–30.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:4892–4896.
- Kadry YA, Calderwood DA. 2020. Chapter 22: Structural and signaling functions of integrins. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1862.
- Kim E, Baba D, Kimura M, Yamashita M, Kashiwabara SI, Baba T. 2005. Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:18028–18033.
- Kirchhoff C, Hale G, William S. 1996. Cell-to-cell transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins during sperm maturation.
- Klentzeris LD, Fishel S, Mcdermott H, Dowell K, Hall J, Green S. 1995. A positive correlation between expression of beta 1-integrin cell adhesion molecules and fertilizing ability of human spermatozoa in vitro. *Human reproduction (Oxford, England)* 10:728–733.

- Krapf D, Arcelay E, Wertheimer E v., Sanjay A, Pilder SH, Salicioni AM, Visconti PE. 2010. Inhibition of Ser/Thr phosphatases induces capacitation-associated signaling in the presence of Src kinase inhibitors. *The Journal of biological chemistry* 285:7977–7985.
- Lamas-Toranzo I, Hamze JG, Bianchi E, Fernández-Fuertes B, Pérez-Cerezales S, Laguna-Barraza R, Fernández-González R, Lonergan P, Gutiérrez-Adán A, Wright GJ, Jiménez-Movilla M, Bermejo-álvarez P. 2020. TMEM95 is a sperm membrane protein essential for mammalian fertilization. *eLife* 9:1–18.
- Lefebvre R, Chenoweth PJ, Drost M, LeClear CT, MacCubbin M, Dutton JT, Suarez SS. 1995. Characterization of the oviductal sperm reservoir in cattle. *Biology of reproduction* 53:1066–1074.
- Li R, Mitra N, Gratkowski H, Vilaire G, Litvinov R, Nagasami C, Weisel JW, Lear JD, DeGrado WF, Bennett JS. 2003. Activation of integrin alphaIIb beta3 by modulation of transmembrane helix associations. *Science* 300.
- Lin Y, Mahan K, Lathrop WE, Myles DG, Primakoff P. 1994. A Hyaluronidase Activity of the Sperm Plasma Membrane Protein PH-20 Enables Sperm to Penetrate the Cumulus Cell Layer Surrounding the Egg. *Journal of Cell Biology* 125:1157–1163.
- Linfor J, Berger T. 2000. Potential role of alpha v and beta 1 integrins as oocyte adhesion molecules during fertilization in pigs. *Reproduction* 120:65–72.
- Lozahic S, Christiansen D, Manié S, Gerlier D, Billard M, Boucheix C, Rubinstein E. 2000. CD46 (membrane cofactor protein) associates with multiple $\beta 1$ integrins and tetraspans. *European Journal of Immunology* 30:900–907.
- Martin-Deleon PA. 2015. Epididymosomes: transfer of fertility-modulating proteins to the sperm surface. *Asian Journal of Andrology* 17:720.
- Medarde N, Muñoz-Muñoz F, López-Fuster MJ, Ventura J. 2013. Variational modularity at the cell level: Insights from the sperm head of the house mouse. *BMC Evolutionary Biology* 13:1–7.
- de Melker AA, Sterk LM, Delwel GO, Fles DL, Daams H, Weening JJ, Sonnenberg A. 1997. The A and B variants of the alpha 3 integrin subunit: tissue distribution and functional characterization. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 76:547–63.
- Merc V, Frolikova M, Komrskova K. 2021. Role of integrins in sperm activation and fertilization. *International Journal of Molecular Sciences* 22.
- Meredith JE, Schwartz MA. 1997. Integrins, adhesion and apoptosis. *Trends in Cell Biology* 7.
- Miller BJ, Georges-Labouesse E, Primakoff P, Myles DG. 2000. Normal Fertilization Occurs with Eggs Lacking the Integrin $\alpha 6 \beta 1$ and Is Cd9-Dependent. *The Journal of Cell Biology* 149:1289.
- Miyado K, Yamada G, Yamada S, Hasuwa H, Nakamura Y, Ryu F, Suzuki K, Kosai K, Inoue K, Ogura A, Okabe M, Mekada E. 2000. Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science (New York, NY)* 287:321–324.
- te Molder L, Juksar J, Harkes R, Wang W, Kreft M, Sonnenberg A. 2019. Tetraspanin CD151 and integrin $\alpha 3 \beta 1$ contribute to the stabilization of integrin $\alpha 6 \beta 4$ -containing cell-matrix adhesions. *Journal of cell science* 132.
- Moore H, Dvořáková K, Jenkins N, Breed W. 2002. Exceptional sperm cooperation in the wood mouse. *Nature* 418.
- Mori E, Baba T, Iwamatsu A, Mori T. 1993. Purification and characterization of a 38-kDa protein, sp38, with zona pellucida-binding property from porcine epididymal sperm. *Biochemical and biophysical research communications* 196:196–202.
- Morse EM, Brahme NN, Calderwood DA. 2014. Integrin cytoplasmic tail interactions. *Biochemistry* 53.
- Mortimer D, Curtis EF, Camenzind AR, Tanaka S. 1989. The spontaneous acrosome reaction of human spermatozoa incubated in vitro. *Human reproduction (Oxford, England)* 4:57–62.
- Noda T, Lu Y, Fujihara Y, Oura S, Koyano T, Kobayashi S, Matzuk MM, Ikawa M. 2020. Sperm proteins SOF1, TMEM95, and SPACA6 are required for sperm-oocyte fusion in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117.
- Odintsova E, Voortman J, Gilbert E, Berditchevski F. 2003. Tetraspanin CD82 regulates compartmentalisation and ligand-induced dimerization of EGFR. *Journal of Cell Science* 116.
- Okamura N, Tajima Y, Sugita Y. 1988. Decrease in bicarbonate transport activities during epididymal maturation of porcine sperm. *Biochemical and biophysical research communications* 157:1280–1287.
- Osycka-Salut CE, Castellano L, Fornes D, Beltrame JS, Alonso CAI, Jawerbaum A, Franchi A, Díaz ES, Perez Martinez S. 2017. Fibronectin From Oviductal Cells Fluctuates During the Estrous Cycle and Contributes to Sperm–Oviduct Interaction in Cattle. *Journal of Cellular Biochemistry* 118:4095–4108.
- Osycka-Salut CE, Martínez-León E, Gervasi MG, Castellano L, Davio C, Chiarante N, Franchi AM, Ribeiro ML, Díaz ES, Perez-Martinez S. 2020. Fibronectin induces capacitation-associated events through the endocannabinoid system in bull sperm. *Theriogenology* 153:91–101.

- Palenikova V, Frolikova M, Valaskova E, Postlerova P, Komrskova K. 2021. α V Integrin Expression and Localization in Male Germ Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 22.
- Park EJ, Myint PK, Ito A, Appiah MG, Darkwah S, Kawamoto E, Shimaoka M. 2020. Integrin-Ligand Interactions in Inflammation, Cancer, and Metabolic Disease: Insights Into the Multifaceted Roles of an Emerging Ligand Irisin. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8.
- Petrunkina AM, Gehlhaar R, Drommer W, Waberski D, Töpfer-Petersen E. 2001. Selective sperm binding to pig oviductal epithelium in vitro. *Reproduction (Cambridge, England)* 121:889–896.
- Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. 2000. Ligand binding to integrins. *Journal of Biological Chemistry* 275.
- Poccia D. 1986. Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization, and early development. *International review of cytology* 105:1–65.
- Reddy VRK, Rajeev SK, Gupta V. 2003. A6B1 Integrin Is a Potential Clinical Marker for Evaluating Sperm Quality in Men. *Fertility and Sterility* 79:1590–1596.
- Rothmann SA, Bort A-M. 2018. Encyclopedia of reproduction. Volume 5: Assisted Reproduction. In: Michael K. Skinner, editor. Academic Press.
- Rubinstein E, Naour F le, Lagaudrière-Gesbert C, Billard M, Conjeaud H, Boucheix C. 1996. CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. *European journal of immunology* 26:2657–2665.
- Ruknudin A, Silver IA. 1990. Ca²⁺ uptake during capacitation of mouse spermatozoa and the effect of an anion transport inhibitor on Ca²⁺ uptake. *Molecular Reproduction and Development* 26:63–68.
- 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. *Developmental biology* 304:317–325.
- Rybinski B, Franco-Barraza J, Cukierman E. 2014. The wound healing, chronic fibrosis, and cancer progression triad. *Physiological Genomics* 46:223.
- 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* 125:4985–4990.
- Saxena DK, Oh-oka T, Kadomatsu K, Muramatsu T, Toshimori K. 2002. Behaviour of a sperm surface transmembrane glycoprotein basigin during epididymal maturation and its role in fertilization in mice. *Reproduction* 123:435–444.
- Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH. 1995. Integrins: Emerging paradigms of signal transduction. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 11.
- Sengoku K, Takuma N, Miyamoto T, Horikawa M, Isikawa M. 2004. Integrins are not involved in the process of human sperm-ooletal fusion. *Human Reproduction* 19:639–644.
- Serru V, le Naour F, Billard M, Azorsa DO, Lanza F, Boucheix C, Rubinstein E. 1999. Selective tetraspan-integrin complexes (CD81/ α 4 β 1, CD151/ α 3 β 1, CD151/ α 6 β 1) under conditions disrupting tetraspan interactions. *Biochemical Journal* 340:103.
- Soler C, Yeung CH, Cooper TG. 1994. Development of sperm motility patterns in the murine epididymis. *International Journal of Andrology* 17.
- Sosnik J, Miranda P v., Spiridonov NA, Yoon SY, Fissore RA, Johnson GR, Visconti PE. 2009. Tssk6 is required for Izumo relocalization and gamete fusion in the mouse. *Journal of Cell Science* 122:2741.
- la Spina FA, Puga Molina LC, Romarowski A, Vitale AM, Falzone TL, Krapf D, Hirohashi N, Buffone MG. 2016. Mouse sperm begin to undergo acrosomal exocytosis in the upper isthmus of the oviduct. *Developmental Biology* 411.
- Spungin B, Breitbart H. 1996. Calcium mobilization and influx during sperm exocytosis. *Journal of cell science*:1947–55.
- 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* 108:2525–2535.
- Stauss CR, Votta TJ, Suarez SS. 1995. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biology of reproduction* 53:1280–1285.
- Suarez SS. 1998. The oviductal sperm reservoir in mammals: Mechanisms of formation. In: *Biology of Reproduction*. Vol. 58.
- Sueoka K, Kuji N, Shiokawa S, Tanaka M, Miyazaki T, Yoshimura Y. 1997. Integrins and reproductive physiology: expression and modulation in fertilization, embryogenesis, and implantation. *Fertility and sterility* 67:799–811.
- Sullivan R, Saez F, Girouard J, Frenette G. 2005. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood cells, molecules & diseases* 35:1–10.
- Tadokoro S, Shattil SJ, Eto K, Tai V, Liddington RC, de Pereda JM, Ginsberg MH, Calderwood DA. 2003. Talin binding to integrin β tails: A final common step in integrin activation. *Science* 302.

- 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 1 Integrin-associated Proteins CD9, CD81, and CD98.
- Takano H, Yanagimachi R, Urch UA. 1993. Evidence that acrosin activity is important for the development of fusibility of mammalian spermatozoa with the oolemma: inhibitor studies using the golden hamster. *Zygote* (Cambridge, England) 1:79–91.
- Tang XM, Lalli MF, Clermont Y. 1982. A cytochemical study of the Golgi apparatus of the spermatid during spermiogenesis in the rat. *The American journal of anatomy* 163:283–294.
- Tarone G, Russo MA, Hirsch E, Odorisio T, Altruda F, Silengo L, Siracusa G. 1993. Expression of $\beta 1$ integrin complexes on the surface of unfertilized mouse oocyte. *Development* 117:1369–1375.
- Teitelbaum SL. 2000. Osteoclasts, integrins, and osteoporosis. In: *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. Vol. 18.
- Termini CM, Gillette JM. 2017. Tetraspanins function as regulators of cellular signaling. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 5:34.
- Töpfer-Petersen E, Wagner A, Friedrich J, Petrunkina A, Ekhlasi-Hundrieser M, Waberski D, Drommer W. 2002. Function of the mammalian oviductal sperm reservoir. *Journal of Experimental Zoology* 292:210–215.
- Vicente-Manzanares M, Choi CK, Horwitz AR. 2009. Integrins in cell migration - The actin connection. *Journal of Cell Science* 122.
- Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. 1. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121:1129–1137.
- Yanagimachi R. 1981. Mechanisms of Fertilization in Mammals. In: Mastroianni L, Biggers JD, editors. *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*. 1st ed. Boston, MA: Springer. p 81–182.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press. p 189–317.
- Yu J, Lee CY, Changou CA, Cedano-Prieto DM, Takada YK, Takada Y. 2017. The CD9, CD81, and CD151 EC2 domains bind to the classical RGD-binding site of integrin $\alpha v \beta 3$. *Biochemical Journal* 474:589–596.
- Zanetti N, Mayorga LS. 2009. Acrosomal Swelling and Membrane Docking Are Required for Hybrid Vesicle Formation During the Human Sperm Acrosome Reaction. *Biology of Reproduction* 81:396–405.
- Zhu X, Evans JP. 2002. Analysis of the roles of RGD-binding integrins, $\alpha 4 / \alpha 9$ integrins, $\alpha 6$ integrins, and CD9 in the interaction of the fertilin β (ADAM2) disintegrin domain with the mouse egg membrane. *Biology of Reproduction* 66:1193–1202.
- Ziyyat A, Naud-Barriant N, Barraud-Lange V, Chevalier F, Kulski O, Lemkecher T, Bomsel M, Wolf JP. 2005. Cyclic FEE peptide increases human gamete fusion and potentiates its RGD-induced inhibition. *Human Reproduction* 20:3452–3458.
- 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 intergrin $\alpha 6 \beta 1$, which are involved in human and mouse gamete fusion. *Journal of Cell Science* 119:416–424.