Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů

Thomas Deutsch

Molekulární mechanismy zapojené do fúze spermie a oocytu u savců a jejich poruchy

Molecular mechanisms involved in the fusion of sperm and oocyte in mammals and their disorders

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Marie Pleváková

Praha, 2025

Poděkování /Acknowledgement:

Velké poděkování patří vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Marii Plevákové za podporu a vstřícnost, za její čas, odborné konzultace, pozitivní přístup a trpělivost při zpracování mého tématu. Taktéž děkuji a velmi si vážím cenných rad a zpětné vazby při vypracování mé práce RNDr. Tereze Tlapákové, Ph.D.

Prohlášení/Declaration:

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

I declare that I wrote this thesis myself and have listed all the resources I used and a bibliography. Neither this thesis nor its important part was previously used to gain any academic degree.

V Praze, 2025

In Prague, 2025

Podpis / Signature

Abstrakt

Fúze oocytu a spermie je klíčovým krokem oplodnění a představuje vysoce regulovaný proces, během něhož dochází ke splynutí dvou gamet a vzniku totipotentní zygoty. Cílem této bakalářské práce je shrnout současné poznatky o molekulárních mechanismech, které tento proces u savců umožňují. Práce se zaměřuje na jednotlivé fáze fúze, včetně kapacitace, chemotaxe, vazby spermie na zonu pellucidu, akrozomální reakce, tvorby akrozomu, průniku spermie přes zona pellucida a finální fúze plazmatických membrán obou buněk.

Zvláštní pozornost je věnována interakcím mezi klíčovými proteiny lokalizovanými na povrchu spermie (např. IZUMO1, SPACA6, SPESP1, TMEM95) a jejich receptory v oolemně oocytu, zejména proteinu JUNO, CD9 a integrinům. Detailně je popsána i interakce IZUMO1–JUNO jako zásadní pár zajišťující rozpoznání a navázání spermie na oocyt. Závěrečná část práce stručně pojednává o poruchách fúze a jejich možném klinickém významu v souvislosti s některými formami lidské neplodnosti.

Klíčová slova: oocyt, spermie, fúze gamet, kapacitace, akrozomální reakce, kontakt gamet, oplození, zygota

Abstract

The fusion of the oocyte and sperm is a crucial step in fertilization and represents a highly regulated process resulting in the formation of a totipotent zygote. The aim of this bachelor thesis is to summarize current knowledge about the molecular mechanisms that enable this process in mammals. The thesis focuses on individual stages of fusion, including capacitation, chemotaxis, sperm binding to the zona pellucida, the acrosome reaction and acrosome formation, sperm penetration through the zona pellucida, and the final fusion of the gamete plasma membranes.

Special attention is paid to the interactions between key sperm surface proteins (such as IZUMO1, SPACA6, SPESP1, TMEM95) and their receptors on the oocyte oolemma, particularly JUNO, CD9, and integrins. The interaction between IZUMO1 and JUNO is described in detail as a fundamental recognition and binding pair. The final part of the thesis briefly addresses fusion defects and their potential clinical relevance in the context of human infertility.

Key words: oocyte, sperm, gamete fusion, capacitation, acrosomal reaction, gamete contact, fertilization, zygote

Seznam zkratek

4HB.....Čtyřšroubovicový prutový svazek *(Four-helix bundle)*

AR.....Akrozomální reakce *(Acrosomal reaction)*

ASA.....Antispermální protilátky *(Antisperm antibodies)*

cAMP.....Cyklický adenosinmonofosfát *(Cyclic adenosine monophosphate)*

ES.....Ekvatoriální segment *(Equatorial segment)*

FSH.....Folikuly stimulující hormon *(Follicle-stimulating hormone)*

GABA.....Kyselina gama-aminomáselná *(Gamma-aminobutyric acid)*

GnRH.....Gonadoliberin *(Gonadotropin-releasing hormone)*

GPI.....glykosylfosfatidylinositol (glycosylphosphatidylinositol)

Ig.....Imunoglobulinová doména *(Immunoglobulin domain)*

IHP.....Vnitřní hydrofobní oblast *(Internal hydrophobic part)*

LH.....Lutenizační hormon *(Luteinizing hormone)*

MMAF.....Vícečetné morfologické abnormality bičíku spermií *(Multiple morphological abnormalities of the sperm flagella)*

PKA.....Proteinová kináza A *(Protein kinase A)*

SACY.....Rozpustná adenylátcykláza *(Soluble adenylyl cyclase)*

sAR.....spontánní AR (spontaneous AR)

Tssk6.....Varleti specifická serin/threoninová proteinkináza 6 *(Testis-specific serine/threonine-protein kinase 6)*

ZP.....Zona pellucida *(Zona pellucida)*

Obsah

Seznam zkratek 5

1. Úvod 1

2. Pohlavní buňky a jejich maturace 2

2.1. Samičí oocyt 2

2.1.1. Maturace oocytu 2

2.1.2. Kumulární buňky a zona pellucida 2

2.2. Samčí spermie 4

2.2.1. Kapacitace 5

2.2.2. Chemotaxe 6

2.2.3. Akrozomální reakce 7

3. Proces oplození 9

3.1. Akrozomální reakce a vazba spermie na zona pellucida 9

3.2. Exocytóza akrozomu 10

3.3. Průnik spermie ZP 10

4. Klíčové proteiny zapojené do fúze spermie a oocytu 11

4.1. Proteiny spermie 12

4.1.1. IZUMO1 12

4.1.2. SPESP1 13

4.1.3. SPACA6 13

4.1.4. TMEP95 13

4.2. Proteiny oocytu 14

4.2.1. JUNO 14

4.2.2. CD9 14

4.2.3. Integriny 15
5. Poruchy fúze 16
5.1. Genetické příčiny poruch fúze 16
5.2. Strukturální a funkční poruchy spermií 17
5.3. Imunologické příčiny poruch fúze gamet 18
6. Závěr 19
Zdroje 20

1. Úvod

Oplození je zásadní biologický proces, který zajišťuje vznik nové diploidní buňky – zygoty – a tím i pokračování druhu. U savců je fúze spermie a oocytu vysoce specifickým a druhově omezeným procesem, jenž vyžaduje přítomnost konkrétních proteinů a signálních drah na obou stranách. Samčí spermie i samičí oocyt prochází dynamickým vývojem, aby dosáhly schopnosti fertilizace. Zatímco oocyt prochází meiotickou maturací, spermie prochází řadou funkčních změn, jako je epididymální maturace, kapacitace a akrozomální reakce (AR).

Poté nastává samotný proces oplození, který začíná vazbou spermie na zonu pellucidu (ZP) a exocytózou akrozomu a končí jejím průnikem do oocytu. Fúze gamet je zprostředkována specifickými proteiny na povrchu obou gamet. Klíčové proteiny na spermii jsou IZUMO1, SPESP1, SPACA6 a TMEM95, zatímco na oocytu jsou pro tuto interakci nezbytné proteiny jako JUNO, CD9 a integriny.

Pochopení těchto procesů je zásadní pro diagnostiku a léčbu neplodnosti, která představuje rostoucí globální problém. Poruchy fúze gamet mohou mít různé příčiny, od genetických mutací v klíčových genech, přes strukturální a funkční poruchy spermií, až po imunologické faktory.

Cílem této bakalářské práce je shrnout současné poznatky o molekulárních mechanismech, které umožňují úspěšnou fúzi oocytu a spermie u savců a popsat poruchy, které tento proces mohou ovlivnit.

2. Pohlavní buňky a jejich maturace

Charakteristickým rysem pohlavního rozmnožování savců je fúze gamet. Samci produkují spermie a samice oocyty. Během fertilizace proniká haploidní spermie do haploidního oocytu, čímž dochází ke vzniku diploidní zygoty. Tento proces je základem pro vývoj nového jedince.

2.1. Samičí oocyt

2.1.1. Maturace oocytu

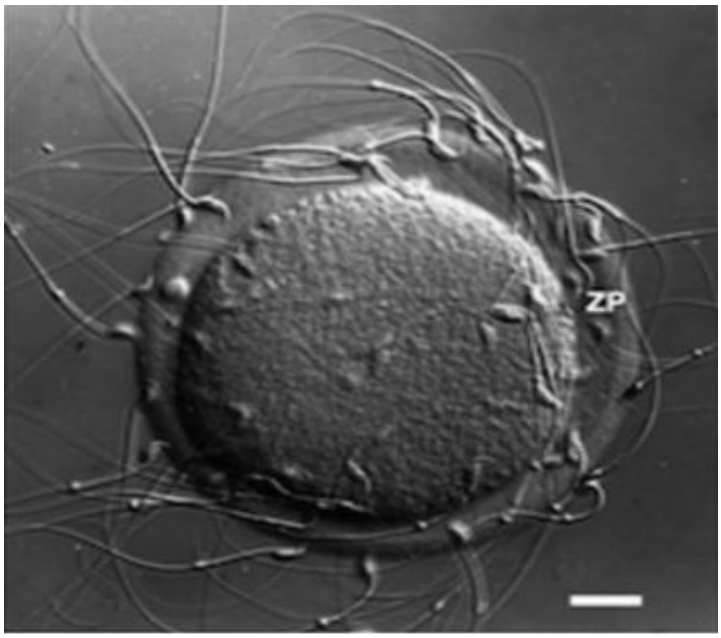
Oocyt je samičí pohlavní buňka, která je klíčová pro vznik nového jedince. Lidský maturovaný oocyt představuje jednu z největších buněk v lidském těle, s průměrem přibližně 0,11-0,12 mm (Cavilla et al. 2008).

Primordiální zárodečné buňky, prekurzory oocytů, během raného embryonálního vývoje migrují ze žloutkového váčku do vyvíjejících se gonád. Zde pod vlivem různých faktorů, jako jsou faktor kmenových buněk **(**SCF), GDF-9 (Hammadeh et al. 2004; Hayashi et al. 1999)a růstového faktoru beta1, diferencují na oogonie (Picton et al. 1998). Ty se zde mitoticky dělí a následně vstupují do meiózy I a dávají vznik primárním oocytům, které se zastaví v profázi I a zůstávají v tomto stavu až do puberty (Sánchez a Smitz 2012). V pubertě dochází k rozpadu zárodečných váčků po stimulaci gonadoliberinem (gnRH) (Kanter et al. 2004), folikuly stimulačním hormonem (FSH) (Zhao et al. 2020), luteinizačním hormonem (LH) (Park et al. 2004) a estrogenem (Guo et al. 2004) a oocyt dokončuje meiózu I a dělí se na haploidní sekundární oocyt a první polární tělísko. Během ovulace je rekrutováno několik primárních oocytů a obvykle je následně ovulován pouze jeden a zbytek zanikne v procesu zvaném atrézie (Shilo et al. 2022). Sekundární oocyt poté vstupuje do meiózy II a zastaví se v metafázi II, která je regulována pomocí maturaci podporujícího faktoru (MPF) (Wu et al. 1997) a ve které setrvává až do oplození. Pokud je oocyt oplozen, dokončí meiózu II a dojde k vydělení druhého pólového tělíska a vzniku zygoty. (Clift a Schuh 2013)

2.1.2. *Kumulární buňky* a *zona pellucida*

Zona pellucida je glykoproteinová vrstva, která se nachází na povrchu savčího oocytu. Má klíčovou roli v procesu oplození a raném embryonálním vývoji. ZP je složena z několika glykoproteinů – ZP1, ZP2, ZP3 a ZP4 –, jejichž zastoupení se liší v závislosti na živočišném druhu. Například u člověka jsou přítomny všechny čtyři typy glykoproteinů ZP1-ZP4, zatímco u myší se vyskytují pouze ZP1-ZP3**.** (Obr.1) (Wassarman a Litscher 2024).

ZP se podílí na indukci AR, prevenci polyspermie a ochraně časného embrya. Také je zapojena do komunikace mezi oocytem a okolními granulózními buňkami ve vyvíjejícím se folikulu (Joonè et al. 2017).



Obr. 1:Myší oocyt inkubovaný v přítomnosti volně plovoucích spermií. Na obrázku jsou spermie navázané na zonu pellucidu.(Převzato z Wassarman et al.,2024)

Každý z glykoproteinů ZP hraje důležitou roli v procesu fertilizace. ZP1 zajišťuje crosslinking (zesíťování) ZP2 a ZP3. ZP3 se podílí na vazbě spermie na oocyt se uplatňuje ZP3 a ZP2 pomáhá následné AR (Mao a Yang 2013).

Výsledky experimentů s knockout ($^{-}/^{-}$) myšmi, že proteiny ZP2 a ZP3 je nezbytné pro správnou tvorbu ZP během oogeneze. Absence kteréhokoli z těchto proteinů vede u samic k neplodnosti (Wassarman a Litscher 2024). Zatímco myší i lidské proteiny ZP2, ZP3 a ZP jsou monomery, protein ZP1 tvoří dimer spojený disulfidickým můstkem (Greve a Wassarman 1985; K. Nishimura et al. 2019). Na jejich N-konci se nachází signální sekvence o délce přibližně 20–30 aminokyselin, která směřuje do sekreční dráhy. Klíčovou strukturou je úsek tvořený přibližně 270 aminokyselinami, které se nazývají ZP doména (ZPD), označovaná také jako ZP modul. Tato doména se skládá ze dvou poddomén ZP-N a ZP-C, které jsou spojeny ohebnou oblastí o délce přibližně 25 aminokyselin. Součástí ZPD proteinu je také vnitřní hydrofobní oblast (IHP), která hraje roli v regulaci polymerizace ZP proteinů. Na C-konci se nachází propeptidové oblast, která zajištuje správnou sekreci proteinu (Wassarman a Litscher 2024).

Kumulární buňky jsou definovány jako skupina úzce spojených granulózních buněk, které obklopují oocyt. Plní specializované role, přenášejí signály ve vaječníku a podporují růst a zrání oocytů během pozdějších fází vývoje folikulů. Jejich funkce je závislá na mezerových spojích, které se mezi nimi tvoří. (Z. Huang a Wells 2010).

Kumulární buňky, které jsou v přímém kontaktu s oocytem, tvoří kumulární komplex. Ten ovlivňuje genovou expresi a proteosyntézu v oocytu. Důležitou roli mají (kumulární buňky) v regulaci hladiny vápníku uvnitř oocytu, jelikož zvýšením koncentrace Ca^{2+} v oocytu podporují jeho maturaci (Turathum et al. 2021). Tyto buňky navíc chrání oocyt před oxidativním stresem prostřednictvím produkce antioxidantů, jaké je například glutathion. Tím přispívají k ochraně oocytu a snižují riziko apoptózy (Tatemoto et al. 2000).

Kumulární buňky dále zvyšují fertilizační kapacitu a mobilitu spermií prostřednictvím produkce prostaglandinů E1 (PGE1) a E2 (PGE2) a proteinu pentraxin 3 (PTX3). V neposlední řadě také produkují progesteron, který je klíčovým induktorem AR. Progesteron se následně váže na receptor NYD-SP8, který se nachází na kumulárních buňkách a spouští mobilizaci Ca^{2+} což vede k zahájení AR. Progesteron také indukuje hyperaktivaci spermií, která je klíčová pro jejich schopnost oplodnit oocyt (Turathum et al. 2021).

2.2. Samčí spermie

Samčí pohlavní buňky, spermie, vznikají procesem spermatogeneze ze spermatogonií v semenotvorných kanálcích varlat (Neto et al. 2016). Hlavička spermie obsahuje deoxyribonukleovou kyselinu (DNA) ve formě chromozomů, jejichž počet je haploidní. Na horní části hlavičky spermie se nachází akrozom, který obsahuje proteolytické enzymy Akrozin, serinová proteáza 21 (PRSS21) (Foster a Gerton 2016) a Hyaluronidázu (Kim et al. 2005). K jejich uvolnění dochází během AR, která umožňuje spermiím proniknout do oocytu.

Mitochondrie ve střední části spermie poskytují energii nezbytnou pro její pohyb, který je zajišťován bičíkem (Roldan 2019). Podél horní části varlat je umístěno nadvarle, provazcovitá struktura, ve které spermie dozrávají, získávají pohyblivost a následně jsou zde uloženy (H. Nishimura a L'Hernault 2017).

Epitel a lumen nadvarlete zajišťuje ideální prostředí pro maturaci spermií. Dochází u nich k povrchovým změnám, jako je ztráta některých fosfolipidů a zároveň nabytí jiných fosfolipidů a sterolů v plazmatické membráně. Například vyvázání množství cholesterolu a zvýšení množství fosfatidylcholinu u kance v plazmatické membráně zvyšuje její fluiditu (Gervasi a Visconti 2017).

Během maturace dochází ke zpevnění jednotlivých struktur spermie, jako je jádro a bičík. Tyto změny zajišťuje tvorba disulfidické S-S vazby, která je také zásadní pro získání motility v nadvarleti. Pro získání plné schopnosti fertilizace oocytu musí spermie projít dalšími maturačními změnami v samičím pohlavním traktu (Weigel Muñoz et al. 2024).

2.2.1. Kapacitace

Kapacitace je maturační proces, během kterého spermie získává schopnost oplodnit oocyt. Kapacitace probíhá v samičím pohlavním traktu a dá se rozdělit na rychlé a pomalé děje. Tyto procesy jsou regulovány bikarbonátem (HCO^{3-}), rozpustnou adenylátcyklázou (SACY) a cyklickým adenosinmonofosfátem (cAMP) (Salicioni et al. 2007) a centrálně jsou regulovány protein kinázou A (Protein kinase A, PKA) (Morgan et al. 2008).

Prvním krokem kapacitace spermií je vyvázání cholesterolu z plazmatické membrány, které je zprostředkováno albuminem přítomným v samičím reprodukčním traktu. Tím dochází ke zvýšení její fluidity a permeability membrány spermie. Následně dochází k přílivu iontů Ca^{2+}, které jsou nezbytné pro celý proces kapacitace (Langlais a Roberts 1985).

Mezi rychlé děje patří aktivace progresivní motility spermií. K tomu dochází, jakmile se spermie dostane do samičího pohlavního traktu. U člověka se tak děje v přední části vagíny poblíž děložního hrdla (Suarez a Pacey 2006), kde je přítomný bikarbonát a Ca^{2+}. Tyto ionty stimulují SACY, což vede ke zvýšení hladiny cAMP a následně k aktivaci PKA.

Pomalé děje zahrnují změny ve vzorci pohybu spermií, známé jako hyperaktivace, a získání schopnosti podstoupit AR. Ke spuštění AR dochází prostřednictvím stimulace fyziologických agonistů jako je ZP (Salicioni et al. 2007).

Dalším důležitým pomalým dějem je fosforylace tyrosinu, která je regulována cAMP-dependentní protein kinázou (Visconti et al. 1995). Probíhá jedním ze tří mechanismů.

Proteinkináza tyrosinu je stimulována přímou fosforylací pomocí PKA nebo enzymatickou kaskádou, která zahrnuje fosforylaci pomocí PKA. Alternativním mechanismem je inhibice Tyrosinfosfatázy přímou fosforylací pomocí PKA či enzymatickou kaskádou, která zahrnuje fosforylaci pomocí PKA. Poslední možností je, že se cílové proteiny stávají substráty pro aktivitu proteinkinázy tyrosinu po fosforylaci na serinových nebo threoninových zbytcích pomocí PKA (Visconti et al. 2002). Transmembránový přítok HCO^{3-} je rovněž spojen se zvýšením intracelulárního pH (Zeng et al. 1996), což aktivuje aktivuje kanál CatSper. Ten zajišťuje tok Ca^{2+} iontů do bičíku a tím přispívá k aktivaci kapacitace (Lishko a Kirichok 2010).

Hyperaktivace představuje typ motility spermií, kterou spermie získá ve vejcovodech. Je charakterizována asymetrickými kmity bičíku s vysokou amplitudou, které spermiím umožňují proniknout spermií do zóny pellucidy (Suarez a Pacey 2006).

Proces kapacitace spermií je ovlivněn různými molekulami a proteiny. Klíčovou roli hrají například steroidní hormony, jako je progesteron a estrogen, které se nacházejí ve vejcovodné a folikulární tekutině (Luconi et al. 2004; Ded et al. 2013). Kapacitaci podporují také reaktivní formy kyslíku, což naznačuje, že je kapacitace oxidační proces (de Lamirande a Gagnon 1993).

Zajímavé je, že některé molekuly fungují druhově závislým způsobem. Příkladem je kyselina c-aminomáselná (GABA), která u člověka (Calogero et al. 1996), beranů (de las Heras et al. 1997) a potkanů (Jin et al. 2009) působí jako induktor AR a hyperaktivace spermií, zatímco u křečků působí jako supresor (Kon et al. 2014).

2.2.2. Chemotaxe

Po dokončení kapacitace se spermie, které se nachází ve vejcovodech, musí orientovat a pohybovat se směrem k oocytu. Tento pohyb se nazývá chemotaxe (Perez-Cerezales et al. 2015). Během chemotaxe se spermie řídí koncentračním gradientem molekul, tzv. chemoatraktantů, které se nachází ve vejcovodné a folikulární tekutině a jsou produkovány kumulárními buňkami a maturovaným oocytem (Oliveira et al. 1999; Sun et al. 2005). Mezi nejdůležitější chemoatraktanty u člověka patří progesteron (Villanueva-Díaz et al. 1995), kyselina hyaluronová (Sliwa 1999).

Progesteron hraje klíčovou roli ve spuštění chemotaxe spermie, a to aktivací vápníkového kanálu Catsper. Ten se nachází v bičíku spermie a je aktivován progesteronem (Ren et al. 2001; Lishko et al. 2011). Tato aktivace má za následek vtok vápníkových iontů do spermie, což vede ke spuštění chemotaxe (Strünker et al. 2011).

V otázce role progesteronu v chemotaxi spermií se vědecké názory různí. Studie z roku 1999 naznačuje, že se progesteron nepodílí na chemotaxi spermií (Jaiswal et al. 1999). Tomu však odporuje novější studie, ve které byl progesteron identifikován jako jeden z hlavních chemoatraktantů spermií (Oren-Benaroya et al. 2008).

Bylo popsáno, že progesteronem indukovaná chemotaxe lidských spermií je zprostředkovaná proteinkinázovými drahami závislými na cAMP a cyklický guanosinmonofosfát cGMP (Teves et al. 2009). Chemotaxe je možná pouze u spermií s intaktním akrozomem. Z toho vyplývá, že jsou

spermie schopné chemotaxe pouze pokud u nich ještě neproběhla AR. Také bylo popsáno, že jsou schopny reagovat i na velmi nízké koncentrace progesteronu (Guidobaldi et al. 2017).

Je zajímavé že savčí spermie obsahují mnoho pachových receptorů (Vanderhaeghen et al. 1993). U lidí se na chemotaxi podílí například lidský čichový receptor 17-4 (hOR17-4), jež je receptorem pro Bourgeonal, aromatický aldehyd používaný v parfumerii, (Spehr et al. 2003).

Aktivace receptoru hOR17-4, spouští signální kaskádu, která aktivuje membránově asociované adenylylcyklázy (mAC) (Spehr et al. 2003). To vede ke zvýšení koncentrace Ca^{2+} a cAMP v hlavičce spermie, což je nezbyté pro spuštění chemotaktického pohybu.

2.2.3. Akrozomální reakce

Aby mohlo dojít k fertilizaci, musí spermie projít přes ZP oocytu. Klíčovým mechanismem pro tento proces je AR, exocytotický proces, který je zahájen po dokončení kapacitace (Florman a First 1988).

Během AR dochází uvolnění hydrolytických enzymů z akrozomu spermie nezbytných pro proniknutí přes ZP oocytu. Zároveň dochází k vystavení vazebných proteinů na povrchu hlavičky spermie, které následně umožní její vazbu na oocyt. AR probíhá v akrozomu, specializovaném váčku v přední části hlavičky spermie (Florman et al. 2008). Je rozdělen na dvě části: ekvatoriální (Equatorial segment, ES) a anteriorní segment (Saeki et al. 2005). AR je u člověka a myši spouštěna dvěma fyziologickými spouštěči (Simons a Fauci 2018): proteinem ZP3 a progesteronem (Harper et al. 2006). Vazba těchto molekul na příslušné receptory vede k fúzi akrozomální membrány s plazmatickou membránou hlavičky spermie, což způsobí vylití enzymatického obsahu akrozomu, jež pomáhá spermiím proniknout přes ZP a umožňuje tak průnik spermie přes ZP (Saeki et al. 2005).

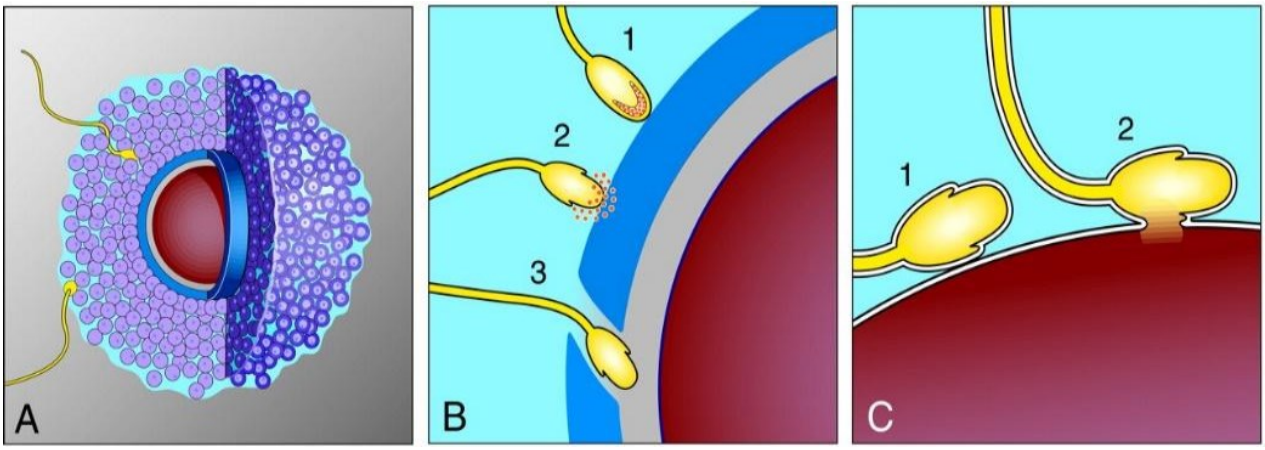
Průběh AR je závislý na vápníkových iontech. Klíčovým krokem je vazba proteinu ZP3 a progesteronu na receptory spřažené s G proteiny (GPCR) a R, což vede ke stimulaci Ca^{2+} kanálu a následnému vtoku Ca^{2+} do hlavičky spermie (Simons a Fauci 2018).

Ke zvýšení hladiny Ca^{2+} v hlavičce spermie dochází několika způsoby. Jednou možností je zvýšení pH prostřednictvím aktivace GPCR, které vede k otevření Ca^{2+} kanálů (Arnoult et al. 1996). Další možnost je aktivací fosfolipázy C, která hydrolyzuje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP2) na inositol 1,4,5-trifosfát (IP_3) a diacylglycerol (DAG) (Walensky a Snyder 1995) , což vede k uvolnění Ca^{2+} z intracelulárních zásob a aktivaci proteinkinázy C (Breitbart et al. 1992; Spungin a Breitbart 1996).

Po zvýšení koncentrace Ca^{2+} uvnitř spermie se aktivuje enzym adenylátcykláza katalyzující přeměnu adenosintrifosfátu (ATP) na cAMP. Následně dochází k aktivaci PKA, která fosforyluje řadu intracelulárních proteinů (Lefièvre et al. 2002).

Aby se spermie dostala k ovulovanému oocytu, musí nejprve projít přes kumulární buňky, které oocyt obklopují (Obr. 2) (Primakoff a Myles 2002). Pro tento průchod spermie využívá hyaluronidázu 5, která se nachází na plazmatické i akrozomální membráně spermie (Seol et al. 2022). Hlavním enzymem, nacházejícím se v akrozomu je Akrozin – serinová proteáza, přítomná v akrozomu v neaktivní formě zvané proakrozin. Dále se v akrozomu nachází i varleti specifická serinová proteáza 5 (TESP5), která má stejnou funkci jako Akrozin (Kawano et al. 2010).

Po úspěšném průniku spermie přes ZP dochází k fúzi membrán spermie a oocytu. Tento proces je zprostředkován interakcí proteinu IZUMO1 spermie a jeho receptoru JUNO na plazmatické membráně oocytu. Během AR dochází k relokalizaci IZUMO1 z akrozomu do ES hlavičky spermie (Satouh et al. 2012). Vazba IZUMO1 a JUNO spustí fúzi membrán spermie a oocytu a je nezbytnou fází celého procesu fertilizace (Bianchi et al. 2014).



Obr. 2: Fáze průniku spermie a oplození oocytu

A – Průnik spermie přes kumulární buňky

B – 1) Vazba na ZP

2) Akrozomální reakce

3)Průnik přes zona pellucida

C – 1) Vazba na oolemu

2)Fúze oocytu a spermie

(Převzato a upraveno z Primakoff a Myles, 2025)

3. Proces oplození

Oplození je proces, který je velmi úzce časově ohraničen, jelikož oocyt má fertilizační kapacitu pouze 24 hodin. Aby mohlo dojít k oplození oocytu, musí spermie projít kapacitací, následně AR, projít přes ZP a navázat se na oolemu oocytu. Každý z těchto kroků, od kapacitace po navázání na oolemu, je pro úspěšné oplození zásadní. Tyto procesy představují komplexní kaskádu molekulárních a biochemických událostí, jejichž přesná regulace je klíčová pro zajištění fúze gamet a následného vzniku zygoty.

3.1. Akrozomální reakce a vazba spermie na zona pellucida

AR může být indukovaná, ke které dochází po navázaní spermie na oocyt, nebo spontánní, ke které dojde předčasně, tedy ještě před navázáním spermie na ZP. Výzkumy ukázaly, že pokud je přítomno větší množství spermií, u kterých proběhla spontánní AR, snižuje se jejich celková fertilizační kapacita (Wiser et al. 2014). Bylo také zjištěno, že polymerizace aktinu, která je řízena dvěma odlišnými cestami: jednou závislou na Ca^{2+}/kalmodulin-dependentní protein kináze II

(CaMKII) a druhou závislou na fosfolipáze D (PLD), snižuje pravděpodobnost spontánní AR (spontaneous AR, sAR). Děje se to během kapacitace spermií, kdy je aktin ve filamentózní formě, známé jako F-aktin, a při polymerizaci začne tvořit síť v hlavičce spermie. Tato síť funguje jako fyzikálně-mechanická bariéra, která brání předčasné interakci mezi vnější akrozomální a překrývající plazmatickou membránou, a tím inhibuje sAR. Aktin se po navázání na ZP znovu depolymerizuje, aby mohlo dojít k AR (Shabtay a Breitbart 2016).

Proteiny a oligosacharidy na povrchu spermie, které se vážou na ZP3 glykoprotein ZP oocytu, se u různých druhů liší. Například u myší se na této vazbě podílí enzym β1,4-galaktosyltransferáza (Macek et al. 1991). U prasat hrají klíčovou roli proteiny spermadhesin AQN-3 (AQN-3), akrozomální protein P47 (P47) a fertilin beta (van Gestel et al. 2007). U člověka se na této vazbě podílí mnoho dosud málo prozkoumaných proteinů mezi které patří například β1,4-galaktosyltransferáza (Thall et al. 1995) a Zonadhesin (Hickox et al. 2001).

3.2. Exocytóza akrozomu

Poté co dojde k navázání spermie na ZP3 oocytu, plazmatická membrána spermie fúzuje s akrozomální membránou, což má za následek exocytózu akrozomálního váčku. Tento proces je závislý na vysokých hladinách Ca^{2+} (De La Vega-Beltran et al. 2012). Na fúzi membrán se také podílí SNARE proteiny jako syntaxin a synaptobrevin (Ramalho-Santos et al. 2000). Ty jsou pod kontrolou malé GTPázy Rab3A (Michaut et al. 2000). Po fúzi je na povrchu spermie vystavena vnitřní akrozomální membrána, která, prostřednictvím enzymů na svém povrchu, zajištuje druhé navázání na ZP2 (T. T. Huang a Yanagimachi 1985).

3.3. Průnik spermie ZP

Vazba spermie na ZP3 indukuje AR. Během AR dochází ke splynutí plasmatické membrány spermie s vnější akrozomální membránou, vezikulaci a následné fyzické ztrátě obou těchto membrán. V důsledku tohoto odstranění membrán jsou pak ztracena i ZP3 vazebná místa, která se nacházela na plasmatické membráně překrývající akrozomální čepičku. To umožní sekundární vazbu spermie na protein ZP2 , zprostředkovanou receptory lokalizovanými na její vnitřní akrozomální membráně (Kerr et al. 2002). Klíčovým enzymem podílejícími se na této sekundární vazbě u myší a u člověka je Akrozin (Morton 1975; Howes et al. 2001; Furlong et al. 2005).

Na sekundární vazbě na ZP2 se u myší podílí další proteiny vnitřní akrosomální membrány jako je například IAM38 (Y. Yu et al. 2006). Dále je to protein MC41, který se nachází

v kortikálním regionu akrozomu u myší a tvoří vazbu s akrosomální 75kDa serinovou proteázou a podílí se na sekundární vazbě spermie na ZP2 (Tanii et al. 2001).

Po sekundární vazbě na ZP2 se spermie pomocí enzymů začne připravovat na průnik ZP (Kim et al. 2008). U myší se na enzymatickém štěpení a průniku spermie přes ZP podílí hyaluronidáza SPAM1 (Kimura et al. 2009) a Akrozin (Hua et al. 2023). U akrozin-deficientních spermií u myší bylo zjištěno, že penetraci ZP zajišťují i jiné serinové proteázy, jako je TESP5 (Honda et al. 2002).

Štěpení ZP umožní mechanický průnik spermie přes ZP. Ačkoliv je pohyb bičíku při průniku přes ZP důležitý, není dostačující pro penetraci (Green 1987). K úspěšné penetraci je proto nezbytná i enzymatická degradace glykoproteinů ZP, kterou zajišťují proteázy spermie (Saldívar-Hernández et al. 2015). Po průniku ZP se spermie dostane do kontaktu s plazmatickou membránou oocytu, oolemou. Tento kontakt je zprostředkován interakcí mezi specifickými proteiny na povrchu spermie a receptory na oolemě (Kaji a Kudo 2004). Samotná fúze je iniciována v ES spermie, který obsahuje fúzní proteiny (Wolkowicz et al. 2008). Celý proces probíhá v perivitelinním prostoru, což je oblast mezi ZP a oolemou (Hassa et al. 2014).

Spermie následně vstupuje do cytoplazmy oocytu. Klíčovou roli při vstupu spermie do cytoplasmy oocytu hraje interakce mezi akrosomálním proteinem IZUMO1 a jeho receptorem JUNO na oolemě. Před navázáním na JUNO je IZUMO1 v monomerním stavu. Po navázání dojde ke zvýšení pravděpodobnosti dimerizace, tedy spojení dvou monomerních jednotek IZUMO. Tento proces je spouštěn proteinovou disulfidickou izomerázou (Inoue et al. 2015). Bylo též zjištěno, že fragment IZUMO1PPF je důležité funkční místo a jeho blokace monoklonálními protilátkami výrazně inhibuje fúzi (Inoue et al. 2013). Pro finální fúzi je nutná tvorba fúzního póru. K tomu může dojít jedním ze dvou mechanismů. Přímou fúzí, kdy jsou k sobě obě fúzující membrány přiblíženy za pomoci fúzních proteinů a vzájemnou vazbou těchto proteinů a tvorbou proteinových komplexů dojde ke sloučení membrán, nebo hemifúzí, kdy dochází k postupnému spojování jednotlivých vrstev membrány (Chernomordik a Kozlov 2005) v procesu fúze.

4. Klíčové proteiny zapojené do fúze spermie a oocytu

Fúze spermie a oocytu představuje klíčový proces pohlavního rozmnožování savců, který je nezbytný pro vznik zygoty. Je umožněn díky specifickým molekulárním interakcím mezi proteiny na povrchu obou pohlavních buněk.

Na povrchu spermie se nacházejí tyto proteiny: IZUMO1 (Inoue et al. 2005), SPACA6 (Barbaux et al. 2020), TMEM95 (Lamas-Toranzo et al. 2020a), FIMP (Fujihara et al. 2020) a SOF1

(Noda et al. 2020) a DCST1 a DCST2, které se podílejí na fúzi spermie a oocytu tím, že regulují stabilitu SPACA6 (Inoue et al. 2021). Mezi hlavní proteiny nacházející se na membráně oocytu patří CD 9 (Miyado et al. 2000), receptor JUNO (Bianchi et al. 2014), protein CD81 (Rubinstein et al. 2006).

4.1. Proteiny spermie

4.1.1. IZUMO1

IZUMO1 je transmembránový protein z rodiny imunoglobulinů (IgSF), který se na povrchu spermie objevuje až po dokončení AR. Jeho struktura obsahuje extracelulární doménu s jednou imunoglobulinovou (Ig) doménu v N-terminální oblastí (Ellerman et al. 2009). Detailnější analýza ukázala že se protein skládá ze čtyřšroubovicového prutovitého svazku (4HB) na N-konci a Ig-like domény, přičemž dva antiparalelní β-prameny (β1 a β2) fungují jako kloub mezi těmito doménami Spermie po AR lze na základě vzoru distribuce proteinu IZUMO1 rozdělit do tří kategorií: s výskytem v oblasti akrozomální čepičky, v ES, nebo po celé. Během AR dochází k relokaci proteinu IZUMO1 z přední části hlavičky spermie do ES a postakrozomální oblasti. Spermie po AR lze na základě vzoru výskytu IZUMO1 rozdělit do tří hlavních typů: s výskytem v oblasti akrozomální čepičky, v ES nebo po celé hlavičce. Tato relokace je klíčová, protože fúze spermie s oocytem začíná právě v oblasti ES (Inoue et al. 2011).

Lokalizace proteinu IZUMO1 se může lišit v závislosti na druhu. Například u myších spermií je IZUMO1 původně lokalizován na vnitřní i vnější akrozomální membráně (Satouh et al. 2012), zatímco u skotu se nachází na rozhraní mezi hlavní částí a ES akrozomální oblasti (Fukuda et al. 2016). Relokalizace IZUMO1 je podmíněna aktinovým cytoskeletem a aktivitou serinové kinázy (Tssk6) (Sosnik et al. 2009). Pro optimální průběh oplození je nezbytný i protein GLIPR1L1, jehož absence narušuje průběh akrozomální exocytózy a brání relokaci proteinu IZUMO1 (Gaikwad et al. 2019). Po přesunu do ES se IZUMO1 váže na svůj receptor JUNO, glykosylfosfatidylinositol (GPI) vazebný protein na membráně oocytu, v perivitelinním prostoru (Pacak et al. 2023). Experimentální data potvrdila zásadní význam IZUMO1 pro fúzi. Bylo zjištěno, že spermie, které neobsahují protein IZUMO1, sice dokážou projít ZP, ale hromadí se v perevitelinním prostoru, protože bez tohoto proteinu nejsou schopny fúzovat s oolemou oocytu (Inoue et al. 2005).

4.1.2. SPESP1

Protein SPESP1 se nachází v ES hlavičky spermie (Wolkowicz et al. 2008). U spermií, které protein SPESP1 postrádají dochází k významnému narušení struktury ES. Tento defekt má za následek nesprávné rozložení fúzních proteinů, jako jsou členové rodiny ADAM a antigen MN9. Ztráta SPESP1 tak ovlivňuje nejen množství, ale i lokalizaci těchto klíčových proteinů, čímž znemožňuje fúzi spermie s oocytem. Z tohoto důvodu je přítomnost SPESP1 nezbytná pro vznik plně funkční a fúze schopné spermie (Fujihara et al. 2010).

4.1.3. SPACA6

SPACA6 je protein, který se strukturně podobá lidskému proteinu IZUMO1, s ektodoménou složenou ze čtyřšroubovicového svazku a imunoglobulinové domény, spojených flexibilní oblastí (Vance et al. 2022). Tento protein je exprimován v lidských spermiích a po AR zůstává lokalizován v ES. U myší, kterým chybí gen pro Spaca6 byla zjištěna neplodnost. Jejich spermie se sice dostanou do perivitelinního prostoru, ale k fúzi s oocytem nedochází. Byla provedena studie, která zkoumala vliv proteinu SPACA6 na relokalizaci proteinu IZUMO1 během AR. Ačkoli je dynamický pohyb IZUMO1 u myší považován za klíčový pro fúzi gamet, ukázalo se, že absence SPACA6 neovlivňuje jeho lokalizaci ani následnou relokalizaci. Přesná role SPACA6 tak zůstává nejasná (Barbaux et al. 2020).

4.1.4. TMEP95

TMEM95 je transmembránový protein, který se po AR přesouvá do ES spermie (Hernández-Falcó et al. 2022). Nachází se u několika savčích druhů, včetně hlodavců, prasat, skotu a primátů, i člověka (Noda et al. 2020). Dlouhou dobu nebylo jasné, jakou roli hraje TMEM95 při fúzi membrán. Nedávné studie ale naznačují, že by se na oocytu mohl nacházet jeho dosud neidentifikovaný receptor. Je pravděpodobné, že se vazba tohoto receptoru na TMEM95 přímo podílí na fúzi spermie a oocytu (Tang et al. 2022). Spermie, kterým TMEM95 chybí se morfologicky nijak neliší a vykazují normální motilitu. Dokonce jsou schopné projít ZP a navázat se na oolemu. Jakmile však dojde k navázání, nedochází k fúzi s membránou oocytu ani k průniku do ooplazmy oocytu (Lamas-Toranzo et al. 2020; Tang et al. 2022).

4.2. Proteiny oocytu

4.2.1. JUNO

Protein JUNO je klíčový receptor na povrchu oocytu, který hraje nezastupitelnou roli v procesu fúze se spermií. Patří mezi GPI vazebné proteiny, které, jak bylo zjištěno, fungují jako receptory pro vazbu spermie (Alfieri et al. 2003). JUNO se váže na protein IZUMO1 na povrchu spermie, což je zásadní pro úspěšné oplodnění. JUNO deficientní oocyty nejsou schopné fúze se spermiemi. Po úspěšné fertilizaci je navíc JUNO vyloučen z oolemy do extracelulárních váčků čímž se účinně předchází vzniku polyspermie (Bianchi et al. 2014). Interakce mezi JUNO a IZUMO1 je velmi komplexní. Hlavní vazebnou oblastí na proteinu IZUMO1 je centrální beta-hairpin oblast (beta1-beta2). JUNO interaguje s IZUMO1 zejména oblastí loop 1 (L1), kde je kritickým prvkem motiv Gly80-Leu81. Celý komplex je navíc stabilizován interakcemi dvou tryptofanů, konkrétně Trp148 z IZUMO1 a Trp62 z JUNO (Ohto et al. 2016).

4.2.2. CD9

Protein CD9 je membránový protein oocytu, který má klíčovou roli ve fúzi spermie a oocytu. Jeho význam byl objeven u myší, u kterých jeho absence vedla k neschopnosti fúze, ačkoliv nebyla narušena vazba spermie na oocyt (Miyado et al. 2000). CD9 se nachází v mikrovili bohatém regionu oolemy (Frolikova et al. 2023). Tato specializovaná oblast usnadňuje nejen vazbu spermie, ale i následnou fúzi. Lokální koncentrace proteinů CD9 zde posiluje interakci mezi proteiny IZUMO a JUNO (Chalbi et al. 2014).To naznačuje, že k vazbě spermie a oocytu nedochází náhodně, ale je omezena pouze na určité části oolemy (Ravaux et al. 2018; Frolikova et al. 2023). Při kontaktu se spermií oocyt reaguje aktivací tetraspaninu CD9, což vede k vytvoření prodloužených mikrovilli s obsahem aktinu, které zvětšují celkovou plochu kontaktu se spermií (Jégou et al. 2011). CD9 je zodpovědný za tvorbu mikrovilli na povrchu oocytu (Runge et al. 2007). Následné děje řízené aktinem přetvářejí kortikální aktinovou vrstvu oocytu a umožňují fyzické začlenění hlavičky spermie do membrány oocytu (Satouh et al. 2012). Nové studie navíc ukázala, že CD9 hraje klíčovou roli v aktivaci proteinu PTK2B. Ten se shromažďuje v místě kontaktu se spermií, kde pomáhá v přestavbě aktinového cytoskeletu a usnadňuje tak fúzi (Wang et al. 2017).

4.2.3. Integriny

Integriny tvoří rozsáhlou skupinu receptorů složených z alfa a beta podjednotek, které zprostředkovávají mezibuněčné interakce (Campbell a Humphries 2011). Na oocytech bylo detekováno 9 α- a 7 β-podjednotek integrinů, zatímco na spermiích bylo zjištěno 5 α- a 3 β-podjednotky. Na povrchu oolemy jsou integriny lokalizovány společně s tetraspaniny, jako jsou CD9, CD81 a CD151, se kterými interagují. Na spermiích tvoří integrinové podjednotky heterodimery, které se vyskytují v různých částech hlavičky spermie a mají funkci v několika fázích života spermie, od jejího zrání, aktivaci, přes interakci s epitelem samičího reprodukčního traktu, až po kontakt s oocytem. Významnou roli integrinů při fúzi naznačuje jejich relokalizace do ES během AR, podobně jako u proteinů nezbytných pro fúzi, jako je IZUMO1. Merc et al. V přehledovém článku z roku 2021 spekulují, že integriny nefungují jako primární fúzní receptory, ale spíše hrají nepřímou roli. Mohou sloužit jako sekundární receptory pro IZUMO1, potenciální vazební partneři proteinu SPACA6 na spermii nebo se podíle na fúzi prostřednictvím interakcí s tetraspaniny. Tato hypotéza však zatím není zcela objasněna (Merc et al. 2021).

Přestože se ví, že se CD9 podílí na fúzi, a bylo zkoumáno, zda s ním spolupracuje i integrin α6β1 na oocytu. Výzkum ukázal, že je oocyt i bez tohoto integrinu stále schopen fúze a že s CD9 nespolupracuje (Miller et al. 2000). Naopak, integrin α6β1na membráně spermií se u myší prokazatelně podílí na fúzi s oocytem (Barraud-Lange et al. 2007).

Bylo zjištěno, že podjednotka β1 se během AR přesouvá z apikální části ES, kde se pak rozšíří na celý ES a následně pokrývá celou hlavičku spermie (Frolikova et al. 2016). Aby se ověřila nezbytnost integrinu β1 pro fertilizaci, byly provedeny experimenty, s myšmi, u kterých byl gen Itgb1 cíleně inaktivován jak v oocytech, tak ve spermiích. Inaktivace genu Itgb1 u oocytů byla kompletní, zatímco u spermií došlo pouze k částečnému potlačení exprese β1 integrinu, kde bylo zachováno přibližně 15 % jeho původní hladiny. I přes tuto neúplnou deleci u spermií, výsledek pokusu s inaktivací genu Itgb1 u obou gamet byl v podstatě stejný jako jeho částečná inaktivace pouze ve spermiích. To vedlo k závěru, že integrinová podjednotka β1 na povrchu oocytu není pro fertilizaci u myší nezbytná, zatímco integrin β1 na spermii hraje klíčovou roli pro úspěšnou adhezi a fúzi gamet. Data naznačují, že spermie s částečně potlačenou expresí β1 integrinu byly vážně omezeny v jejich schopnosti oplodnit oocyty in vitro, přičemž mnoho spermií zůstalo nahromaděno v perivitelinním prostoru, což indikuje neschopnost normálně fúzovat s oolemmou (Barraud-Lange et al. 2020).

5. Poruchy fúze

Proces fúze gamet je kritickým krokem v reprodukci, a jeho narušení může vést k poruchám plodnosti. Navzdory pokroku v technikách asistované reprodukce zůstává neplodnost způsobená poruchami fúze gamet významným klinickým problémem. Tyto poruchy mohou vyplývat z několika příčin. Jednou z nich jsou mutace v genech kódujících klíčové fúzní proteiny nebo strukturní abnormality gamet. Dále se na vzniku těchto poruch mohou podílet imunologické faktory, jako je například přítomnost antispermálních protilátek. Tyto protilátky narušují normální interakce mezi spermií a oocytem, čímž zásadně ovlivňují proces oplození.

5.1. Genetické příčiny poruch fúze

Proteiny IZUMO1 a JUNO hrají v procesu fúze nezastupitelnou roli, a proto jejich absence či mutace v genech, které je kódují, mohou být příčinou reprodukčních obtíží. IZUMO1, transmembránový protein přítomný na povrchu akrozomálně zreagované spermie, je nezbytný pro vazbu spermie na oocyt. Bylo popsáno, že ačkoli absence IZUMO1 u myší neovlivňuje morfologii ani motilitu spermií, nedochází k následné fúzi. Toto zjištění ukazuje, že narušení funkce IZUMO1 může vést ke vzniku neplodnosti u samců způsobené selháním fúze gamet (Inoue et al. 2005).

JUNO, receptor na povrchu oocytu, který interaguje s IZUMO1 spermie, je klíčový pro fúzi gamet. Jeho zásadní role byla potvrzena na knock-out myších modelech, u kterých absence JUNO vedla k úplné sterilitě samic, jelikož oocyty nebyly schopny fúze se spermiemi (Bianchi et al. 2014). To naznačuje, že defekty ve funkci JUNO mohou být příčinou neplodnosti u samic způsobené poruchou fúze gamet.

Také výzkum u lidí potvrzuje význam IZUMO1 a JUNO v etiologii poruch plodnosti. Mutace v genu IZUMO1R byla spojena s opakovaným selháním fertilizace během cyklů in vitro fertilizace IVF. To potvrzuje studie (Yu et al. 2018), která identifikovala čtyři vzácné polymorfismy, včetně dvou missense mutací (rs76779571 a rs61742524) u pacientek s opakovaným fertilizačním selháním. U fertilních kontrol tyto mutace nebyly detekovány. Tyto mutace by mohly ovlivnit vazebnou schopnost JUNO nebo jejího zakotvení v membráně, což může bránit správné interakci s IZUMO1. Dále byla identifikována mutace c.510T>G (p.His170Gln) v IZUMO1R, která narušuje konformaci GPI kotvy JUNO, čímž pravděpodobně znemožňuje správné navázání IZUMO1. Tato zjištění ukazují, že i izolované bodové mutace mohou zabránit oplození, což zdůrazňuje důležitost genetického screeningu u pacientek s idiopatickou neplodností.

Kromě proteinů IZUMO1 a JUNO hrají v procesu fúze gamet klíčovou roli i další molekuly, jejichž dysfunkce může vést k poruchám plodnosti. CD9 je člen tetraspaninové rodiny a je hojně exprimován na microvilli oolemy. Je považován za klíčový faktor fúze, protože umožňuje reorganizaci membrány oocytu a usnadňuje kontakt a následnou fúzi se spermií. Funkční význam CD9 byl jednoznačně prokázán na myších modelech, u kterých knock-out CD9 vedl k úplné neplodnosti samic. Tyto oocyty byly morfologicky normální a spermie se na ně vázaly, ale nedocházelo k fúzi (Miyado et al. 2000). Pomocí elektronové mikroskopie u *CD9*$^{-/-}$ oocytů byla pozorována narušená tvorba membránových microvilli, která pravděpodobně znesnadňuje fyzický kontakt se spermií nezbytný pro fúzi (Miyado et al. 2000).

U člověka dosud nebyly identifikovány patogenní mutace v genu pro CD9, které by byly přímo spojeny s poruchami fúze gamet. Nicméně, některé studie naznačují, že hladina exprese CD9 v oocytech může kolísat s věkem ženy nebo kvalitou oocytů, což může ovlivňovat jejich fertilizační potenciál (Runge et al. 2007).

Kromě defektů fúzních proteinů mohou reprodukční problémy vyplývat i z narušené struktury ZP. Mutace v genech kódujících proteiny ZP, konkrétně ZP1, ZP2 a ZP3, mohou zásadním způsobem narušit strukturu této extracelulární matrix obklopující oocyt a znemožnit tím správnou vazbu spermie a následnou fúzi. Studie identifikovala nové patogenní varianty v těchto genech u sedmi pacientek ze šesti rodin s idiopatickou neplodností (Zhou et al. 2019). U postižených žen byly pozorovány fenotypy jako syndrom prázdného folikulu (empty follicle syndrome), oocytární degenerace a opakované selhání oplodnění při IVF. Funkční studie provedená na buněčných modelech také ukázala, že tyto mutace výrazně snižují expresi, sekreci a interakci ZP proteinů, což vede k defektní tvorbě nebo oslabení ZP (Yang et al. 2021). Tyto poznatky podtrhují význam genů ZP1–ZP3 pro správné oplození a ukazují, že i poruchy extracelulární složky oocytu mohou mít za následek sterilitu.

5.2. Strukturální a funkční poruchy spermií

Strukturální a funkční defekty spermií představují významný etiologický faktor mužské neplodnosti, zejména prostřednictvím mechanismů narušujících fúzi gamet. Bylo identifikováno několik klíčových genetických příčin spojených s teratozoospermií. Makrozoospermie, charakterizovaná přítomností abnormálně velkých spermií, je spojena s homozygotními mutacemi v genu AURKC. Tato asociace může mít evoluční význam díky potenciální selekční výhodě heterozygotů. Globozoospermie, vyznačující se kulatými spermiemi bez akrozomu, je spojena

s mutacemi nebo delecemi v genech DPY19L2 a SPATA16, které jsou kritické pro správnou tvorbu akrozomu (Coutton et al. 2015).

Jedním z nejlépe popsaných genetických syndromů spojených s defektem bičíku je primární ciliární dyskineze, u níž mutace v genech kódujících proteiny vnitřního nebo vnějšího dyneinového raménka způsobují nepohyblivost bičíku. U pacientů s těmito mutacemi je často pozorována kompletní imobilita nebo výrazně snížená progresivní motilita spermií, což prakticky znemožňuje transport spermií k oocytu (Ben Khelifa et al. 2014). Příkladem je mutace v genu DNAH1, kódujícím vnitřní dyneinové raménko, která byla identifikována u pacientů s vícečetnými morfologickými abnormalitami bičíku spermií (MMAF). MMAF je forma těžké teratozoospermie charakterizovaná krátkými, zkroucenými nebo chybějícími bičíky (Jiang et al. 2021). Tyto strukturální defekty nejen že znemožňují spermii dosažení oocytu, ale mohou také narušit proces kapacitace a AR, které jsou nezbytné pro úspěšnou fertilizaci.

5.3. Imunologické příčiny poruch fúze gamet

Imunitní reakce představují další možný mechanismus narušení fúze gamet, kdy dochází k tvorbě protilátek proti vlastním nebo cizím gametám. Tyto protilátky mohou interferovat s různými fázemi fertilizačního procesu, včetně fúze membrán oocytu a spermie.

U mužů představuje tvorba antispermálních protilátek (antisperm antibodies, ASA) autoimunitní reakci, která vzniká v důsledku narušení imunologické tolerance ve varlatech. K této poruše může dojít v důsledku traumatu, infekce nebo také při poškození hemato-testikulární bariéry. ASA se pak mohou nacházet v semenné plazmě nebo být přímo navázané na povrchu spermií.

U žen představuje produkce ASA aloimunitní reakci, při níž imunitní systém rozpoznává spermie jako cizorodé antigeny. K tvorbě těchto protilátek dochází v důsledku expozice spermiovým antigenům, jež se dostávají do kontaktu s imunitním systémem ženy. ASA jsou produkovány v rámci ženského reprodukčního traktu a nacházejí se například v krevní plazmě, cervikálním hlenu, folikulární tekutině či vaginálním sekretu. Možnosti léčby zahrnují imunosupresivní terapii kortikosteroidy a intrauterinní inseminaci (Restrepo a Cardona-Maya 2013).

Experimentální studie prokázaly, že některé ASA mohou přímo interferovat s funkcí fúzních proteinů a tím narušovat proces oplození. U myší byla detekována protilátka OBF13, která se váže na protein IZUMO1 na povrchu spermie a allostericky blokuje jeho interakci s receptorem JUNO

na oocytu, čímž zcela znemožňuje fertilizaci (Lu et al. 2025). Podobný mechanismus byl pozorován i u člověka, kde monoklonální protilátka proti JUNO v *in vitro* podmínkách blokuje fúzi gamet, aniž by ovlivnila předchozí fáze vazby spermie na oocyt (Bianchi et al. 2014). Tyto poznatky zdůrazňují význam imunologických faktorů v etiologii poruch fúze gamet a související neplodnosti.

6. Závěr

Proces fúze oocytu a spermie je klíčovým momentem oplodnění, který navazuje na komplexní sekvenci molekulárních a buněčných událostí. Mezi tyto události patří maturace gamet, kapacitace spermie, chemotaxe, interakce se zonou pellucidou a akrozomální reakce.

Fúze plazmatických membrán gamet je zprostředkována specifickými proteinovými interakcemi. Na povrchu spermie hrají zásadní roli proteiny jako IZUMO1, SPACA6, SPESP1 a TMEM95, zatímco na povrchu oocytu jsou klíčové JUNO, CD9 a integriny. Vzájemné rozpoznání a vazba těchto proteinů představuje základní krok pro spojení obou gamet.

Poruchy v procesu fúze mohou být významným, avšak stále podceňovaným, faktorem mužské i ženské neplodnosti. Přes pokroky ve výzkumu zůstávají některé aspekty ne zcela objasněné. Mezi ně patří zejména přesné mechanismy interakcí proteinů během fúze a vazba spermie na zonu pellucidu. Ačkoli byly identifikovány kandidátní molekuly, jako jsou β1,4-galaktosyltransferáza a Zonadhesin, jednoznačný receptorový systém pro vazbu na proteiny ZP2 a ZP3 u člověka dosud nebyl spolehlivě potvrzen.

Zdroje

Alfieri, Jennifer A., Arlan D. Martin, Junji Takeda, Gen Kondoh, Diana G. Myles, a Paul Primakoff. 2003. „Infertility in Female Mice with an Oocyte-Specific Knockout of GPI-Anchored Proteins". Journal of Cell Science 116 (Pt 11): 2149–55.

Arnoult, C., Y. Zeng, a H. M. Florman. 1996. „ZP3-Dependent Activation of Sperm Cation Channels Regulates Acrosomal Secretion during Mammalian Fertilization". The Journal of Cell Biology 134 (3): 637–45.

Barbaux, Sandrine, Côme Ialy-Radio, Myriam Chalbi, et al. 2020. „Sperm SPACA6 Protein Is Required for Mammalian Sperm-Egg Adhesion/Fusion". Scientific Reports 10 (1): 5335.

Barraud-Lange, Virginie, Côme Ialy-Radio, Céline Chalas, et al. 2020. „Partial Sperm Beta1 Integrin Subunit Deletion Proves Its Involvement in Mouse Gamete Adhesion/Fusion". International Journal of Molecular Sciences 21 (22): 8494.

Barraud-Lange, Virginie, Nathalie Naud-Barriant, Line Saffar, et al. 2007. „Alpha6beta1 Integrin Expressed by Sperm Is Determinant in Mouse Fertilization". BMC Developmental Biology 7 (září): 102.

Ben Khelifa, Mariem, Charles Coutton, Raoudha Zouari, et al. 2014. „Mutations in DNAH1, Which Encodes an Inner Arm Heavy Chain Dynein, Lead to Male Infertility from Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella". American Journal of Human Genetics 94 (1): 95–104.

Bianchi, Enrica, Brendan Doe, David Goulding, a Gavin J. Wright. 2014. „Juno Is the Egg Izumo Receptor and Is Essential for Mammalian Fertilization". Nature 508 (7497): 483–87.

Breitbart, H, J Lax, R Rotem, a Z Naor. 1992. „Role of protein kinase C in the acrosome reaction of mammalian spermatozoa". Biochemical Journal 281 (2): 473–76.

Calogero, A. E., J. Hall, S. Fishel, S. Green, A. Hunter, a R. D'Agata. 1996. „Effects of Gamma-Aminobutyric Acid on Human Sperm Motility and Hyperactivation". Molecular Human Reproduction 2 (10): 733–38.

*Campbell, Iain D., a Martin J. Humphries. 2011. „Integrin Structure, Activation, and Interactions". Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 3 (3): a004994..

Cavilla, J. L., C. R. Kennedy, A. G. Byskov, a G. M. Hartshorne. 2008. „Human Immature Oocytes Grow during Culture for IVM". *Human Reproduction (Oxford, England)* 23 (1): 37–45.

*Clift, Dean, a Melina Schuh. 2013. „Restarting Life: Fertilization and the Transition from Meiosis to Mitosis". *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 14 (9): 549–62.

*Coutton, Charles, Jessica Escoffier, Guillaume Martinez, Christophe Arnoult, a Pierre F. Ray. 2015. „Teratozoospermia: Spotlight on the Main Genetic Actors in the Human". Human Reproduction Update 21 (4): 455–85.

De La Vega-Beltran, Jose Luis, Claudia Sánchez-Cárdenas, Darío Krapf, et al. 2012. „Mouse Sperm Membrane Potential Hyperpolarization Is Necessary and Sufficient to Prepare Sperm for the Acrosome Reaction". The Journal of Biological Chemistry 287 (53): 44384–93.

Ded, Lukas, Natasa Sebkova, Martina Cerna, et al. 2013. „In Vivo Exposure to 17β-Estradiol Triggers Premature Sperm Capacitation in Cauda Epididymis". Reproduction (Cambridge, England) 145 (3): 255–63.

Ellerman, Diego A., Jimin Pei, Surabhi Gupta, William J. Snell, Diana Myles, a Paul Primakoff. 2009. „Izumo Is Part of a Multiprotein Family Whose Members Form Large Complexes on Mammalian Sperm". Molecular Reproduction and Development 76 (12): 1188–99.

Florman, H. M., a N. L. First. 1988. „The Regulation of Acrosomal Exocytosis. I. Sperm Capacitation Is Required for the Induction of Acrosome Reactions by the Bovine Zona Pellucida in Vitro". *Developmental Biology* 128 (2): 453–63.

*Florman, Harvey M., Melissa K. Jungnickel, a Keith A. Sutton. 2008. „Regulating the Acrosome Reaction". The International Journal of Developmental Biology 52 (5–6): 503–10.

*Foster, James A., a George L. Gerton. 2016. „The Acrosomal Matrix". Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology 220: 15–33.

Frolikova, Michaela, Natasa Sebkova, Lukas Ded, a Katerina Dvorakova-Hortova. 2016. „Characterization of CD46 and B1 Integrin Dynamics during Sperm Acrosome Reaction". Scientific Reports 6 (září): 33714.

Frolikova, Michaela, Vishma Pratap Sur, Ivan Novotny, et al. 2023. „Juno and CD9 Protein Network Organization in Oolemma of Mouse Oocyte". Frontiers in Cell and Developmental Biology 11: 1110681.

Fujihara, Yoshitaka, Yonggang Lu, Taichi Noda, et al. 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 (17): 9393–400.

Fujihara, Yoshitaka, Masao Murakami, Naokazu Inoue, et al. 2010. „Sperm Equatorial Segment Protein 1, SPESP1, Is Required for Fully Fertile Sperm in Mouse". Journal of Cell Science 123 (Pt 9): 1531–36.

Fukuda, Masaki, Mitsuhiro Sakase, Moriyuki Fukushima, a Hiroshi Harayama. 2016. „Changes of IZUMO1 in Bull Spermatozoa during the Maturation, Acrosome Reaction, and Cryopreservation". Theriogenology 86 (9): 2179-2188.e3.

Furlong, Laura I., Jeffrey D. Harris, a Mónica H. Vazquez-Levin. 2005. „Binding of Recombinant Human Proacrosin/Acrosin to Zona Pellucida (ZP) Glycoproteins. I. Studies with Recombinant Human ZPA, ZPB, and ZPC". Fertility and Sterility 83 (6): 1780–90.

Gaikwad, Avinash S., Amanda L. Anderson, D. Jo Merriner, et al. 2019. „GLIPR1L1 Is an IZUMO-Binding Protein Required for Optimal Fertilization in the Mouse". BMC Biology 17 (1): 86.

*Gervasi, M. G., a P. E. Visconti. 2017. „Molecular Changes and Signaling Events Occurring in Spermatozoa during Epididymal Maturation". Andrology 5 (2): 204–18.

Gestel, Renske A. van, Ian A. Brewis, Peter R. Ashton, Jos F. Brouwers, a Barend M. Gadella. 2007. „Multiple Proteins Present in Purified Porcine Sperm Apical Plasma Membranes Interact with the Zona Pellucida of the Oocyte". Molecular Human Reproduction 13 (7): 445–54.

Green, D. P. 1987. „Mammalian Sperm Cannot Penetrate the Zona Pellucida Solely by Force". Experimental Cell Research 169 (1): 31–38.

Greve, J. M., a P. M. Wassarman. 1985. „Mouse Egg Extracellular Coat Is a Matrix of Interconnected Filaments Possessing a Structural Repeat". Journal of Molecular Biology 181 (2): 253–64.

Guidobaldi, Hector A., Noritaka Hirohashi, Marisa Cubilla, Mariano G. Buffone, a Laura C. Giojalas. 2017. „An Intact Acrosome Is Required for the Chemotactic Response to Progesterone in Mouse Spermatozoa". Molecular Reproduction and Development 84 (4): 310–15.

Guo, Yi, Ke-Jun Guo, Li Huang, Xiao-Guang Tong, a Xia Li. 2004. „Effect of Estrogen Deprivation on Follicle/Oocyte Maturation and Embryo Development in Mice". Chinese Medical Journal 117 (4): 498–502.

Hammadeh, Mohamad Eid, Constanze Fischer-Hammadeh, Heidrun Hoffmeister, Wolfgang Herrmann, Peter Rosenbaum, a Werner Schmidt. 2004. „Relationship between Cytokine Concentrations (FGF, sICAM-1 and SCF) in Serum, Follicular Fluid and ICSI Outcome". *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)* 51 (1): 81–85.

Harper, Claire V., Christopher L. R. Barratt, Stephen J. Publicover, a Jackson C. Kirkman-Brown. 2006. „Kinetics of the Progesterone-Induced Acrosome Reaction and Its Relation to Intracellular Calcium Responses in Individual Human Spermatozoa". Biology of Reproduction 75 (6): 933–39.

Hassa, Hikmet, Yunus Aydın, a Fulya Taplamacıoğlu. 2014. „The Role of Perivitelline Space Abnormalities of Oocytes in the Developmental Potential of Embryos". Journal of the Turkish German Gynecological Association 15 (3): 161–63.

Hayashi, M., E. A. McGee, G. Min, et al. 1999. „Recombinant Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) Enhances Growth and Differentiation of Cultured Early Ovarian Follicles". *Endocrinology* 140 (3): 1236–44.

Heras, M. A. de las, A. Valcarcel, a L. J. Perez. 1997. „In Vitro Capacitating Effect of Gamma-Aminobutyric Acid in Ram Spermatozoa". Biology of Reproduction 56 (4): 964–68.

Hernández-Falcó, Miranda, Paula Sáez-Espinosa, Andrea López-Botella, Jon Aizpurua, a María José Gómez-Torres. 2022. „The Role of Sperm Proteins IZUMO1 and TMEM95 in Mammalian Fertilization: A Systematic Review". International Journal of Molecular Sciences 23 (7): 3929.

Honda, Arata, Kazuo Yamagata, Shin Sugiura, Katsuto Watanabe, a Tadashi Baba. 2002. „A Mouse Serine Protease TESP5 Is Selectively Included into Lipid Rafts of Sperm Membrane Presumably as a Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Protein". *The Journal of Biological Chemistry* 277 (19): 16976–84.

Howes, E., J. C. Pascall, W. Engel, a R. Jones. 2001. „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 (Pt 22): 4127–36.

Hua, Rong, Rufeng Xue, Yiyuan Liu, et al. 2023. „ACROSIN Deficiency Causes Total Fertilization Failure in Humans by Preventing the Sperm from Penetrating the Zona Pellucida". Human Reproduction (Oxford, England) 38 (6): 1213–23.

Hickox, J. R., M. Bi, a D. M. Hardy. 2001. „Heterogeneous Processing and Zona Pellucida Binding Activity of Pig Zonadhesin". The Journal of Biological Chemistry 276 (44): 41502–9.

*Huang, Zhongwei, a Dagan Wells. 2010. „The Human Oocyte and Cumulus Cells Relationship: New Insights from the Cumulus Cell Transcriptome". Molecular Human Reproduction 16 (10): 715–25.

Huang, T. T., a R. Yanagimachi. 1985. „Inner Acrosomal Membrane of Mammalian Spermatozoa: Its Properties and Possible Functions in Fertilization". The American Journal of Anatomy 174 (3): 249–68.

Chalbi, Myriam, Virginie Barraud-Lange, Benjamin Ravaux, et al. 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 (19): 3732–39.

*Chernomordik, Leonid V., a Michael M. Kozlov. 2005. „Membrane Hemifusion: Crossing a Chasm in Two Leaps". Cell 123 (3): 375–82.

Inoue, Naokazu, Yoshihisa Hagihara, a Ikuo Wada. 2021. „Evolutionarily Conserved Sperm Factors, DCST1 and DCST2, Are Required for Gamete Fusion". eLife 10 (duben): e66313.

Inoue, Naokazu, Yoshihisa Hagihara, Danelle Wright, Takahisa Suzuki, a Ikuo Wada. 2015. „Oocyte-Triggered Dimerization of Sperm IZUMO1 Promotes Sperm-Egg Fusion in Mice". Nature Communications 6 (listopad): 8858.

Inoue, Naokazu, Daizo Hamada, Hironari Kamikubo, et al. 2013. „Molecular Dissection of IZUMO1, a Sperm Protein Essential for Sperm-Egg Fusion". Development (Cambridge, England) 140 (15): 3221–29.

Inoue, Naokazu, Masahito Ikawa, Ayako Isotani, a Masaru Okabe. 2005. „The Immunoglobulin Superfamily Protein Izumo Is Required for Sperm to Fuse with Eggs". Nature 434 (7030): 234–38.

*Inoue, Naokazu, Masahito Ikawa, a Masaru Okabe. 2011. „The Mechanism of Sperm-Egg Interaction and the Involvement of IZUMO1 in Fusion". Asian Journal of Andrology 13 (1): 81–87.

Jaiswal, B. S., I. Tur-Kaspa, J. Dor, S. Mashiach, a M. Eisenbach. 1999. „Human Sperm Chemotaxis: Is Progesterone a Chemoattractant?" Biology of Reproduction 60 (6): 1314–19.

Jégou, Antoine, Ahmed Ziyyat, Virginie Barraud-Lange, et al. 2011. „CD9 Tetraspanin Generates Fusion Competent Sites on the Egg Membrane for Mammalian Fertilization". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108 (27): 10946–51.

Jiang, Chuan, Xueguang Zhang, Heng Zhang, et al. 2021. „Novel Bi-Allelic Mutations in DNAH1 Cause Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella Resulting in Male Infertility". Translational Andrology and Urology 10 (4): 1656–64.

Jin, Jian-Yuan, Wen-Ying Chen, Cheng Xi Zhou, et al. 2009. „Activation of GABAA Receptor/Cl-Channel and Capacitation in Rat Spermatozoa: HCO3- and Cl- Are Essential". Systems Biology in Reproductive Medicine 55 (2): 97–108.

*Joonè, Carolynne J., Martin L. Schulman, a Henk J. Bertschinger. 2017. „Ovarian Dysfunction Associated with Zona Pellucida-Based Immunocontraceptive Vaccines". Theriogenology 89 (únor): 329–37.

*Kaji, Keisuke, a Akira Kudo. 2004. „The Mechanism of Sperm-Oocyte Fusion in Mammals". Reproduction (Cambridge, England) 127 (4): 423–29.

Kanter, Mehmet, Cengiz Yildiz, Ismail Meral, Ahmet Koc, a Ibrahim Tasal. 2004. „Effects of a GnRH Agonist on Oocyte Number and Maturation in Mice Superovulated with eCG and hCG". Theriogenology 61 (2–3): 393–98.

Kawano, Natsuko, Woojin Kang, Misuzu Yamashita, et al. 2010. „Mice Lacking Two Sperm Serine Proteases, ACR and PRSS21, Are Subfertile, but the Mutant Sperm Are Infertile in Vitro". Biology of Reproduction 83 (3): 359–69.

Kerr, Candace L., William F. Hanna, Joel H. Shaper, a William W. Wright. 2002. „Characterization of Zona Pellucida Glycoprotein 3 (ZP3) and ZP2 Binding Sites on Acrosome-Intact Mouse Sperm". Biology of Reproduction 66 (6): 1585–95.

Kim, Ekyune, Daichi Baba, Masanori Kimura, Misuzu Yamashita, Shin-ichi Kashiwabara, a Tadashi Baba. 2005. „Identification of a Hyaluronidase, Hyal5, Involved in Penetration of Mouse Sperm through Cumulus Mass". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102 (50): 18028–33.

*Kim, Ekyune, Misuzu Yamashita, Masanori Kimura, Arata Honda, Shin-Ichi Kashiwabara, a Tadashi Baba. 2008. „Sperm Penetration through Cumulus Mass and Zona Pellucida". The International Journal of Developmental Biology 52 (5–6): 677–82.

Kimura, Masanori, Ekyune Kim, Woojin Kang, et al. 2009. „Functional Roles of Mouse Sperm Hyaluronidases, HYAL5 and SPAM1, in Fertilization". Biology of Reproduction 81 (5): 939–47.

Kon, Hiroe, Gen L. Takei, Masakatsu Fujinoki, a Motoo Shinoda. 2014. „Suppression of Progesterone-Enhanced Hyperactivation in Hamster Spermatozoa by γ-Aminobutyric Acid". The Journal of Reproduction and Development 60 (3): 202–9.

Lamas-Toranzo, Ismael, Julieta G. Hamze, Enrica Bianchi, et al. 2020. „TMEM95 Is a Sperm Membrane Protein Essential for Mammalian Fertilization". eLife 9 (červen): e53913.

Lamirande, E. de, a C. Gagnon. 1993. „Human Sperm Hyperactivation and Capacitation as Parts of an Oxidative Process". Free Radical Biology & Medicine 14 (2): 157–66.

*Langlais, Jean, a Kenneth D. Roberts. 1985. „A Molecular Membrane Model of Sperm Capacitation and the Acrosome Reaction of Mammalian Spermatozoa". Gamete Research 12 (2): 183–224.

Lefièvre, Linda, Kula N. Jha, Eve de Lamirande, Pablo E. Visconti, a Claude Gagnon. 2002. „Activation of Protein Kinase A during Human Sperm Capacitation and Acrosome Reaction". Journal of Andrology 23 (5): 709–16.

Lishko, Polina V., Inna L. Botchkina, a Yuriy Kirichok. 2011. „Progesterone Activates the Principal Ca2+ Channel of Human Sperm". Nature 471 (7338): 387–91.

Lishko, Polina V., a Yuriy Kirichok. 2010. „The Role of Hv1 and CatSper Channels in Sperm Activation". The Journal of Physiology 588 (Pt 23): 4667–72.

Lu, Yonggang, Masahito Ikawa, a Shaogeng Tang. 2025. „Allosteric Inhibition of the IZUMO1-JUNO Fertilization Complex by the Naturally Occurring Antisperm Antibody OBF13". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 122 (10): e2425952122.

*Luconi, M., F. Francavilla, I. Porazzi, B. Macerola, G. Forti, a E. Baldi. 2004. „Human Spermatozoa as a Model for Studying Membrane Receptors Mediating Rapid Nongenomic Effects of Progesterone and Estrogens". Steroids 69 (8–9): 553–59.

Macek, M. B., L. C. Lopez, a B. D. Shur. 1991. „Aggregation of Beta-1,4-Galactosyltransferase on Mouse Sperm Induces the Acrosome Reaction". Developmental Biology 147 (2): 440–44.

*Mao, Hai-Tao, a Wan-Xi Yang. 2013. „Modes of Acrosin Functioning during Fertilization". Gene 526 (2): 75–79.

*McGinnis, Lynda K., S. Darlene Limback, a David F. Albertini. 2013. „Signaling Modalities during Oogenesis in Mammals". Current Topics in Developmental Biology 102: 227–42.

Merc, Veronika, Michaela Frolikova, a Katerina Komrskova. 2021. „Role of Integrins in Sperm Activation and Fertilization". International Journal of Molecular Sciences 22 (21): 11809. https://doi.org/10.3390/ijms222111809.

Michaut, M., C. N. Tomes, G. De Blas, R. Yunes, a L. S. Mayorga. 2000. „Calcium-Triggered Acrosomal Exocytosis in Human Spermatozoa Requires the Coordinated Activation of Rab3A and N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97 (18): 9996–10001.

Miller, B. J., E. Georges-Labouesse, P. Primakoff, a D. G. Myles. 2000. „Normal Fertilization Occurs with Eggs Lacking the Integrin Alpha6beta1 and Is CD9-Dependent". The Journal of Cell Biology 149 (6): 1289–96.

Miyado, K., G. Yamada, S. Yamada, et al. 2000. „Requirement of CD9 on the Egg Plasma Membrane for Fertilization". Science (New York, N.Y.) 287 (5451): 321–24.

*Morisawa, Masaaki, a Manabu Yoshida. 2005. „Activation of Motility and Chemotaxis in the Spermatozoa: From Invertebrates to Humans". Reproductive Medicine and Biology 4 (2): 101–14.

Morgan, Daniel J., Michael Weisenhaus, Sara Shum, et al. 2008. „Tissue-Specific PKA Inhibition Using a Chemical Genetic Approach and Its Application to Studies on Sperm Capacitation". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (52): 20740–45.

Morton, D. B. 1975. „Acrosomal Enzymes: Immunochemical Localization of Acrosin and Hyaluronidase in Ram Spermatozoa". Journal of Reproduction and Fertility 45 (2): 375–78.

*Neto, Filipe Tenorio Lira, Phil Vu Bach, Bobby B. Najari, Philip S. Li, a Marc Goldstein. 2016. „Spermatogenesis in Humans and Its Affecting Factors". Seminars in Cell & Developmental Biology 59 (listopad): 10–26.

Nishimura, Hitoshi, a Steven W. L'Hernault. 2017. „Spermatogenesis". Current Biology: CB 27 (18): R988–94.

Nishimura, Kaoru, Elisa Dioguardi, Shunsuke Nishio, et al. 2019. „Molecular Basis of Egg Coat Cross-Linking Sheds Light on ZP1-Associated Female Infertility". Nature Communications 10 (1): 3086.

Noda, Taichi, Yonggang Lu, Yoshitaka Fujihara, et al. 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 (21): 11493–502.

Ohto, Umeharu, Hanako Ishida, Elena Krayukhina, Susumu Uchiyama, Naokazu Inoue, a Toshiyuki Shimizu. 2016. „Structure of IZUMO1-JUNO Reveals Sperm-Oocyte Recognition during Mammalian Fertilization". Nature 534 (7608): 566–69.

Oliveira, R. G., L. Tomasi, R. A. Rovasio, a L. C. Giojalas. 1999. „Increased Velocity and Induction of Chemotactic Response in Mouse Spermatozoa by Follicular and Oviductal Fluids". Journal of Reproduction and Fertility 115 (1): 23–27.

Oren-Benaroya, R., R. Orvieto, A. Gakamsky, M. Pinchasov, a M. Eisenbach. 2008. „The Sperm Chemoattractant Secreted from Human Cumulus Cells Is Progesterone". Human Reproduction (Oxford, England) 23 (10): 2339–45.

Pacak, Paulina, Carleen Kluger, a Viola Vogel. 2023. „Molecular Dynamics of JUNO-IZUMO1 Complexation Suggests Biologically Relevant Mechanisms in Fertilization". Scientific Reports 13 (1): 20342.

Park, Jy-Young, You-Qiang Su, Miyako Ariga, Evelyn Law, S.-L. Catherine Jin, a Marco Conti. 2004. „EGF-like Growth Factors as Mediators of LH Action in the Ovulatory Follicle". Science (New York, N.Y.) 303 (5658): 682–84.

*Perez-Cerezales, Serafin, Sergii Boryshpolets, a Michael Eisenbach. 2015. „Behavioral Mechanisms of Mammalian Sperm Guidance". Asian Journal of Andrology 17 (4): 628–32.

*Picton, H., D. Briggs, a R. Gosden. 1998. „The Molecular Basis of Oocyte Growth and Development". Molecular and Cellular Endocrinology 145 (1–2): 27–37.

*Primakoff, Paul, a Diana G. Myles. 2002. „Penetration, Adhesion, and Fusion in Mammalian Sperm-Egg Interaction". Science (New York, N.Y.) 296 (5576): 2183–85.

Ramalho-Santos, J., R. D. Moreno, P. Sutovsky, et al. 2000. „SNAREs in Mammalian Sperm: Possible Implications for Fertilization". Developmental Biology 223 (1): 54–69.

Ravaux, Benjamin, Sophie Favier, Eric Perez, a Christine Gourier. 2018. „Egg CD9 Protein Tides Correlated with Sperm Oscillations Tune the Gamete Fusion Ability in Mammal". Journal of Molecular Cell Biology 10 (6): 494–502.

Ren, D., B. Navarro, G. Perez, et al. 2001. „A Sperm Ion Channel Required for Sperm Motility and Male Fertility". Nature 413 (6856): 603–9.

*Restrepo, B., a W. Cardona-Maya. 2013. „Antisperm Antibodies and Fertility Association". Actas Urologicas Espanolas 37 (9): 571–78.

Roldan, Eduardo R. S. 2019. „Sperm Competition and the Evolution of Sperm Form and Function in Mammals". Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene 54 Suppl 4 (říjen): 14–21.

Rubinstein, Eric, Ahmed Ziyyat, Michel Prenant, et al. 2006. „Reduced Fertility of Female Mice Lacking CD81". Developmental Biology 290 (2): 351–58.

Runge, Kathryn E., James E. Evans, Zhi-Yong He, et al. 2007. „Oocyte CD9 Is Enriched on the Microvillar Membrane and Required for Normal Microvillar Shape and Distribution". Developmental Biology 304 (1): 317–25.

Saeki, Kazuhiro, Norio Sumitomo, Yuki Nagata, et al. 2005. „Fine Surface Structure of Bovine Acrosome-Intact and Reacted Spermatozoa Observed by Atomic Force Microscopy". The Journal of Reproduction and Development 51 (2): 293–98.

Saldívar-Hernández, Analilia, María E. González-González, Ana Sánchez-Tusié, et al. 2015. „Human Sperm Degradation of Zona Pellucida Proteins Contributes to Fertilization". Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E 13 (září): 99.

*Salicioni, Ana M., Mark D. Platt, Eva V. Wertheimer, et al. 2007. „Signalling Pathways Involved in Sperm Capacitation". Society of Reproduction and Fertility Supplement 65: 245–59.

*Sánchez, Flor, a Johan Smitz. 2012. „Molecular Control of Oogenesis". Biochimica Et Biophysica Acta 1822 (12): 1896–912.

Satouh, Yuhkoh, Naokazu Inoue, Masahito Ikawa, a Masaru Okabe. 2012. „Visualization of the Moment of Mouse Sperm-Egg Fusion and Dynamic Localization of IZUMO1". Journal of Cell Science 125 (Pt 21): 4985–90.

Seol, Dong-Won, Sang Hoon Joo, Young-Hyun Kim, et al. 2022. „Sperm Hyaluronidase Is Critical to Mammals' Fertilization for Its Ability to Disperse Cumulus-Oocyte Complex Layer". Asian Journal of Andrology 24 (4): 411–15.

Shabtay, Ortal, a Haim Breitbart. 2016. „CaMKII Prevents Spontaneous Acrosomal Exocytosis in Sperm through Induction of Actin Polymerization". Developmental Biology 415 (1): 64–74.

Shilo, Michal, Avi Mayo, a Uri Alon. 2022. „A Mechanism for Ovulation Number Control". Frontiers in Endocrinology 13: 816967.

Simons, Julie, a Lisa Fauci. 2018. „A Model for the Acrosome Reaction in Mammalian Sperm". Bulletin of Mathematical Biology 80 (9): 2481–501.

Sliwa, L. 1999. „Hyaluronic Acid and Chemoattractant Substance from Follicular Fluid: In Vitro Effect of Human Sperm Migration". Archives of Andrology 43 (1): 73–76.

Sosnik, Julian, Patricia V. Miranda, Nikolay A. Spiridonov, et al. 2009. „Tssk6 Is Required for Izumo Relocalization and Gamete Fusion in the Mouse". Journal of Cell Science 122 (Pt 15): 2741–49.

Spehr, Marc, Gunter Gisselmann, Alexandra Poplawski, et al. 2003. „Identification of a Testicular Odorant Receptor Mediating Human Sperm Chemotaxis". Science (New York, N.Y.) 299 (5615): 2054–58.

Spungin, Ben, a Haim Breitbart. 1996. „Calcium mobilization and influx during sperm exocytosis". Journal of Cell Science 109 (7): 1947–55.

*Suarez, S. S., a A. A. Pacey. 2006. „Sperm Transport in the Female Reproductive Tract". Human Reproduction Update 12 (1): 23–37.

Strünker, Timo, Normann Goodwin, Christoph Brenker, et al. 2011. „The CatSper Channel Mediates Progesterone-Induced Ca2+ Influx in Human Sperm". *Nature* 471 (7338): 382–86.

Sun, Fei, Anat Bahat, Anna Gakamsky, et al. 2005. „Human Sperm Chemotaxis: Both the Oocyte and Its Surrounding Cumulus Cells Secrete Sperm Chemoattractants". Human Reproduction (Oxford, England) 20 (3): 761–67.

Tang, Shaogeng, Yonggang Lu, Will M. Skinner, et al. 2022. „Human Sperm TMEM95 Binds Eggs and Facilitates Membrane Fusion". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 119 (40): e2207805119.

Tanii, I., T. Oh-oka, K. Yoshinaga, a K. Toshimori. 2001. „A Mouse Acrosomal Cortical Matrix Protein, MC41, Has ZP2-Binding Activity and Forms a Complex with a 75-kDa Serine Protease". Developmental Biology 238 (2): 332–41.

Tatemoto, H., N. Sakurai, a N. Muto. 2000. „Protection of Porcine Oocytes against Apoptotic Cell Death Caused by Oxidative Stress during In Vitro Maturation: Role of Cumulus Cells". Biology of Reproduction 63 (3): 805–10.

Teves, Maria E., Hector A. Guidobaldi, Diego R. Uñates, et al. 2009. „Molecular Mechanism for Human Sperm Chemotaxis Mediated by Progesterone". PloS One 4 (12): e8211.

Thall, A. D., P. Malý, a J. B. Lowe. 1995. „Oocyte Gal Alpha 1,3Gal Epitopes Implicated in Sperm Adhesion to the Zona Pellucida Glycoprotein ZP3 Are Not Required for Fertilization in the Mouse". The Journal of Biological Chemistry 270 (37): 21437–40.

*Turathum, Bongkoch, Er-Meng Gao, a Ri-Cheng Chian. 2021. „The Function of Cumulus Cells in Oocyte Growth and Maturation and in Subsequent Ovulation and Fertilization". Cells 10 (9): 2292.

Vance, Tyler D. R., Patrick Yip, Elisabet Jiménez, et al. 2022. „SPACA6 Ectodomain Structure Reveals a Conserved Superfamily of Gamete Fusion-Associated Proteins". Communications Biology 5 (1): 984.

Vanderhaeghen, P., S. Schurmans, G. Vassart, a M. Parmentier. 1993. „Olfactory Receptors Are Displayed on Dog Mature Sperm Cells". The Journal of Cell Biology 123 (6 Pt 1): 1441–52.

Villanueva-Díaz, C., J. Arias-Martínez, L. Bermejo-Martínez, a F. Vadillo-Ortega. 1995. „Progesterone Induces Human Sperm Chemotaxis". Fertility and Sterility 64 (6): 1183–88.

Visconti, P. E., G. D. Moore, J. L. Bailey, et al. 1995. „Capacitation of Mouse Spermatozoa. II. Protein Tyrosine Phosphorylation and Capacitation Are Regulated by a cAMP-Dependent Pathway". Development (Cambridge, England) 121 (4): 1139–50.

*Visconti, P. E., V. A. Westbrook, O. Chertihin, I. Demarco, S. Sleight, a A. B. Diekman. 2002. „Novel Signaling Pathways Involved in Sperm Acquisition of Fertilizing Capacity". Journal of Reproductive Immunology 53 (1–2): 133–50.

Walensky, L. D., a S. H. Snyder. 1995. „Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors Selectively Localized to the Acrosomes of Mammalian Sperm". The Journal of Cell Biology 130 (4): 857–69.

Wang, Huizhen, Jinping Luo, Carol Carlton, Lynda K. McGinnis, a William H. Kinsey. 2017. „Sperm-Oocyte Contact Induces Outside-in Signaling via PYK2 Activation". Developmental Biology 428 (1): 52–62.

*Wassarman, Paul M., a Eveline S. Litscher. 2024. „Female Fertility and the Mammalian Egg's Zona Pellucida". Histology and Histopathology 39 (10): 1273–84.

*Weigel Muñoz, Mariana, Débora J. Cohen, Vanina G. Da Ros, et al. 2024. „Physiological and Pathological Aspects of Epididymal Sperm Maturation". Molecular Aspects of Medicine 100 (prosinec): 101321.

Wiser, A., S. Sachar, Y. Ghetler, A. Shulman, a H. Breitbart. 2014. „Assessment of Sperm Hyperactivated Motility and Acrosome Reaction Can Discriminate the Use of Spermatozoa for Conventional in Vitro Fertilisation or Intracytoplasmic Sperm Injection: Preliminary Results". Andrologia 46 (3): 313–15.

Wolkowicz, M. J., L. Digilio, K. Klotz, J. Shetty, C. J. Flickinger, a J. C. Herr. 2008. „Equatorial Segment Protein (ESP) Is a Human Alloantigen Involved in Sperm-Egg Binding and Fusion". Journal of Andrology 29 (3): 272–82.

Wu, B., G. Ignotz, W. B. Currie, a X. Yang. 1997. „Dynamics of Maturation-Promoting Factor and Its Constituent Proteins during in Vitro Maturation of Bovine Oocytes". Biology of Reproduction 56 (1): 253–59.

Yang, Ping, Tailai Chen, Yuqing Liu, et al. 2021. „The Critical Role of ZP Genes in Female Infertility Characterized by Empty Follicle Syndrome and Oocyte Degeneration". Fertility and Sterility 115 (5): 1259–69.

Yu, Mengru, Han Zhao, Tailai Chen, et al. 2018. „Mutational Analysis of IZUMO1R in Women with Fertilization Failure and Polyspermy after in Vitro Fertilization". Journal of Assisted Reproduction and Genetics 35 (3): 539–44.

Yu, Yang, Wei Xu, Young-Joo Yi, Peter Sutovsky, a Richard Oko. 2006. „The Extracellular Protein Coat of the Inner Acrosomal Membrane Is Involved in Zona Pellucida Binding and Penetration during Fertilization: Characterization of Its Most Prominent Polypeptide (IAM38)". Developmental Biology 290 (1): 32–43.

Zeng, Y., J. A. Oberdorf, a H. M. Florman. 1996. „pH Regulation in Mouse Sperm: Identification of Na(+)-, Cl(-)-, and HCO3(-)-Dependent and Arylaminobenzoate-Dependent Regulatory Mechanisms and Characterization of Their Roles in Sperm Capacitation". Developmental Biology 173 (2): 510–20.

Zhao, Hui, Junbang Ge, Juncai Wei, et al. 2020. „Effect of FSH on E2/GPR30-Mediated Mouse Oocyte Maturation in Vitro". Cellular Signalling 66 (únor): 109464.

Zhou, Zhou, Caixia Ni, Ling Wu, et al. 2019. „Novel Mutations in ZP1, ZP2, and ZP3 Cause Female Infertility Due to Abnormal Zona Pellucida Formation". Human Genetics 138 (4): 327–37.