

Přírodovědecká fakulta
Univerzity Karlovy
Katedra zoologie

Role proteinu CD46 v procesu oplození

Bakalářská práce

Jan Suchan

Školitel: Doc. Mgr. Pavel Stopka, Ph.D.

Praha 2007

Obsah

	Abstrakt.....	2
	Seznam zkratk.....	3
1	Úvod.....	4
2	Struktura a lokalizace CD46.....	5
	2.1 Struktura.....	5
	2.2 Lokalizace CD46.....	7
	2.3 Mezidruhové rozdíly.....	8
3	Receptorová a regulační funkce.....	9
	3.1 Regulace komplementu.....	9
	3.2 Vazebná specifita extracelulárních domén.....	10
	3.3 Afinita k viru spalniček.....	10
	3.4 Afinita k bakteriím <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	12
	3.5 Buněčná signalizace.....	13
4	Oplození.....	15
	4.1 Proces oplození.....	15
	4.2 Oplození a CD46.....	17
	4.3 CD46 jako marker akrozomální reakce.....	18
	4.4 Genová modifikace CD46.....	19
	4.5 Rod <i>Apodemus</i>	21
5	Závěr.....	23
	Přehled literatury.....	25

Abstrakt

CD46 je imunologicky významný transmembránový protein, který se podílí na regulaci komplementárních fragmentů C3b, C4b a spouští aktivaci T lymfocytů. CD46 funguje jako receptor pro patogeny jako je například virus spalniček nebo bakterie *Neisseria gonorrhoeae*. U spermií se CD46 nachází pouze na vnitřní akrozomální membráně a pravděpodobně zastává roli v oplození. V této rešerši jsou shrnuty molekulární poznatky o proteinu CD46 a jeho možné role v oplození. Popsáno je i evoluční hledisko na protein CD46, především jaké příčiny způsobují modifikace tohoto proteinu u některých savců.

Abstract

CD46 is immunologic important transmembrane protein, which is included in regulation of complement fragments C3b, C4b and triggers activation of T lymphocytes. CD46 serves as receptor for pathogens such as measles virus and bacteria *Neisseria gonorrhoeae*. In sperm CD46 is located on the inner acrosomal membrane only and probably CD46 has a role in fertilization. This review includes molecular view about protein CD46 and its possible roles in fertilization. Evolutionary view on CD46 is described here, especially which reasons cause modifications of protein CD46 of some mammals.

Klíčová slova: CD46, komplement, oplození, spermie, spontánní akrozomální reakce

Seznam zkratk

AK	aminokyselina
CCP	complement control protein, extracel. doména
CRP	complement regulatory protein
CYT	cytoplazmatická doména
GalT.....	galaktosyl transferáza
GEF.....	GDP/GTP exchange factor
FITC.....	fluorescein isothiocyanát
IFN.....	interferon 1
MCP	membrane cofactor protein
SAR	spontaní akrozomální reakce
SCR	short complement like repeat, extracel. doména
STP	serine/threonine/proline bohatá doména
ZP	zona pellucida
ZP 1-3.....	proteiny zona pellucida
WHO.....	World health organisation

1 Úvod

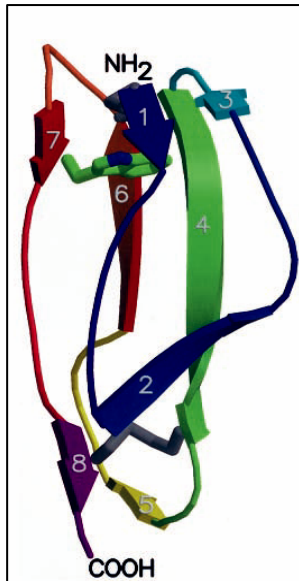
Tato práce se zabývá membránovým proteinem CD46 a především jeho rolí při oplození. Protein CD46 neboli CRP (Complement regulatory protein), MCP (membrane cofactor protein) byl poprvé popsán v roce 1985 (Cole et al. 1985). CD46 náleží do rodiny membránových proteinů regulátorů komplementu, kam patří například také protein CD55 (DAF) a komplement receptor 1 (CR1), CR2 (Lublin et al. 1988). Tyto proteiny se uplatňují při degradaci komplementu, který označuje buňky imunitnímu systému. CD46 působí v somatických buňkách jako kofaktor pro sérovou proteasu faktor I, štěpící C3b a C4b fragmenty komplementu a tím chrání vlastní buňky před napadením imunitním systémem (Seya a Atkinson 1989). Slouží také jako receptor pro několik patogenů jako je např. virus spalniček (Naniche et al. 1993), *Streptococcus pyogenes* (Okada et al. 1995), *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitides* (Kallstrom et al. 1997) či herpesvirus 6 (Santoro et al. 1999). Uplatňuje se při aktivaci T-lymfocytů (Astier et al. 2000). Na spermatických buňkách se vyskytuje pouze na vnitřní akrozomální membráně a jeho funkce zde je doposud nejasná. U hlodavců je exprese CD46 omezena pouze na varlata (Seya et al. 1998) a u myšic (*Apodemus*) se nevyskytuje vůbec (Johnson et al., dosud nepublikované výsledky). Zatím nejsou známy některé role CD46: 1) Buněčné hledisko; Jaká je funkce CD46 na vnitřní akrozomální membráně, 2) Evoluční hledisko; Proč se protein nevytváří u zástupců rodu *Apodemus*.

Práce je rozdělena do několika kapitol. Nejdříve je popsána struktura proteinu CD46, jeho lokalizace a rozdíly mezi myším, lidským a prasečím CD46. V další části se popisuje funkce CD46 jako regulátoru C3b, C4b komplementu, ale také receptoru pro patogeny. Vysvětlena je i role při aktivaci T-lymfocytů. Poslední kapitola se zaměřuje na oplození. Popsán je jednak obecně proces oplození, tak možné funkce CD46 v procesu oplození. Část poslední kapitoly se věnuje také rodu *Apodemus* a absenci CD46 u jejich zástupců.

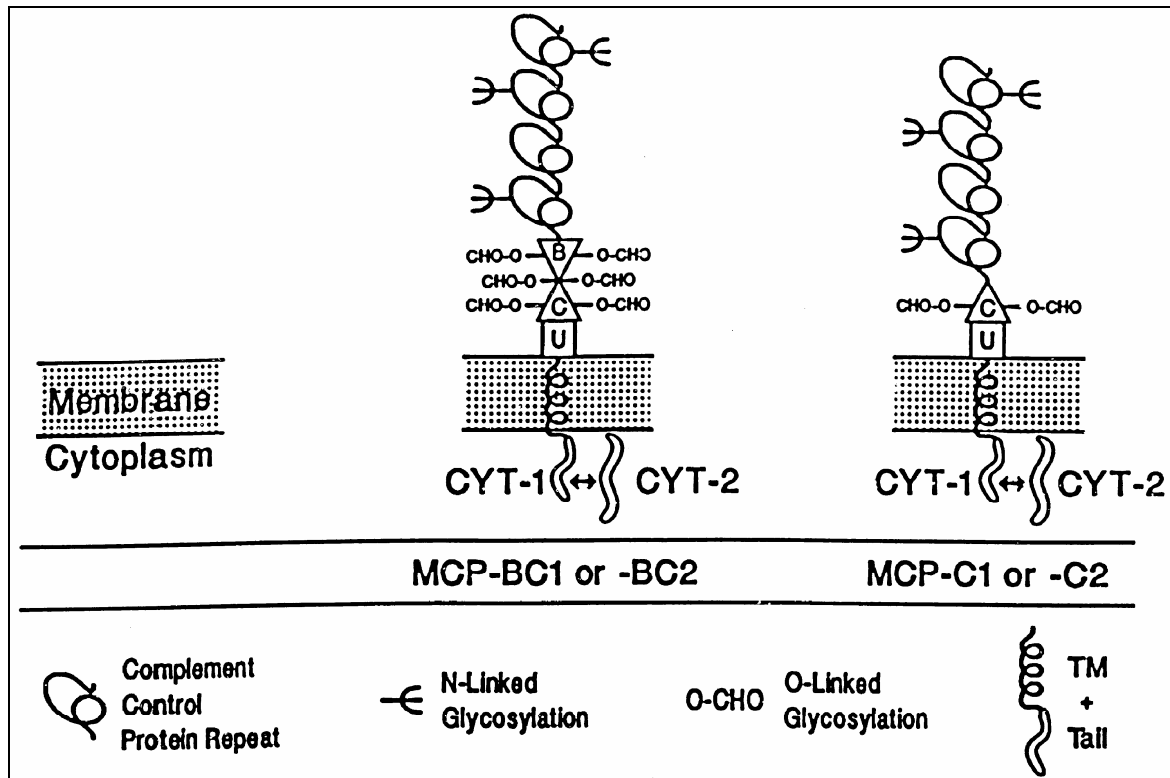
2 Struktura a lokalizace CD46

2.1 Struktura

CD46 je transmembránový glykoprotein. Aminokyselinová délka proteinu CD46 je u myši (*Mus musculus*) 365 aminokyselinových zbytků. Skládá se z několika podjednotek: transmembránové, cytoplazmatické a extracelulární. U cytoplazmatické podjednotky byla zjištěna signalizační funkce (Wang et al. 2000) a u extracelulární podjednotky receptorová a regulační funkce (Kojima et al. 1993). Protein má 4 extracelulární CCP (Complement control protein) domény (Lublin et al. 1988), jejichž spoje jsou vysoce hydrofobní. Domény CCP jsou také označovány jako SUSHI repetice neboli SCR (Short complement-like repeat). CCP obsahuje přibližně 60 aminokyselinových zbytků. SUSHI repetice byla identifikována u více proteinů komplementárního systému. CCP 2-4 tvoří vazebné místo pro své ligandy. CD46 dále obsahuje extracelulární doménu bohatou na serin, threonin a prolin (STP), která u lidských somatických buněk může existovat ve 4 isoformách: BC1, BC2, C1, C2 (Post et al. 1991). U lidí 65 % populace přednostně vytváří BC formu, 29 % obě formy a 6 % C formu (Kemper et al. 2001). Za ní se nachází segment 12 aminokyselin neznámé funkce, transmembránová doména (TM) a cytoplazmatický konec (CYT) ve 2 alternativních formách Cyt-1 (16 AK) nebo Cyt-2 (22 AK) (Liszewski et al. 1994). CCP domény jsou N-glykosylovány (CCP 1,2,4) a STP region je O-glykosilován (Liszewski et al. 1991). Glykosylace je velmi důležitá pro receptorovou funkci proteinu. Například úroveň O-glykosylace na STP doméně ovlivňuje schopnost regulace komplementu, kdy isoformy s vyšší hodnotou O-glykosylace chrání buňku před komplementem lépe. N-glykosylace CCP 2, 3, 4 je nezbytně důležitá pro regulaci komplementu a tím pádem i ochranu buňky. Důležitost N-glykosylace CD46 je umocněna evoluční fixací mezi druhy (Liszewski et al. 1998). Naopak N-glykosylace CCP 1, 2 usnadňuje navázání patogenů např. viru spalniček (Maisner et al. 1996).



Obr.1: CCP doména: Extracelulární CCP doména je charakterizována sekvencí 60 aminokyselinových zbytků. Ty obsahují 4 cysteinové zbytky, tvořící 2 disulfidové můstky (1+3 a 2+4), vysoce konzervovaný tryptofan, konzervovaný glycin, prolin a hydrofobní zbytky. CCP domény jsou složeny do malých a kompaktních hydrofobních jader, obklopených 6 až 8 β -listů a stabilizovány 2 disulfidickými můstky. Relativní strukturální orientace β -2 a β -4 listů jsou pro všechny SUSHI struktury společná, zatímco topologie ostatních listů je variabilní. CCP domény jsou zapojené do mnoha rozpoznávacích procesů, včetně vázání komplementových faktorů na fragmenty komplementu C3b a C4b. Jsou také součástí adhezivních proteinů. Zdroj: Liszewski et al. 2000.

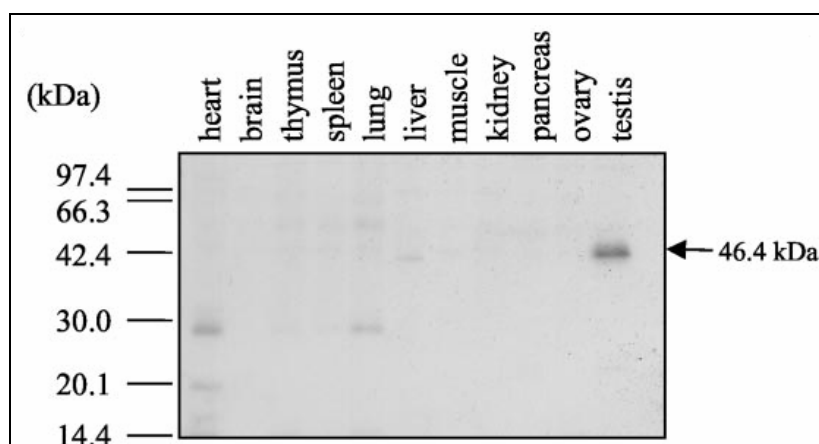


Obr.2: Schématické zobrazení struktury proteinu CD46 a jeho izoforem. Každá izoforma obsahuje 4 extracelulární CCP domény. CCP 2-4 jsou N glykosylované. Po CCP doménách následuje STP extracelulární doména bohatá na prolin/ serin/ threonin a je O glykosylována. STP doména je rozdělena na C a B formu, kdy C je tvořena ve všech izoformách. Na STP navazuje 12 AK (U) segment neznámé funkce. Následuje transmembránová doména (TM) a cytoplazmatická doména (CYT). CYT doména může být sestřižena do 2 izoforem Cyt 1 a Cyt 2. Zdroj: Kemper et al. 2001.

2.2 Lokalizace CD46

Gen pro CD46 se u myši stejně jako u člověka nachází na 1. chromozomu; 1 H6; 106,6 cM. U laboratorního potkana (*Rattus norvegicus*) je na 13. chromozomu a prasete domácího (*Sus scrofa*) na 9. chromozomu. CD46 se u člověka vyskytuje na povrchu většiny buněk (především leukocyty, ledviny, plíce, kosterní svaly, srdce, varlata, placentální trofoblast, buňky CNS...) ve 4 izoformách vytvořených alternativním sestřihem (Post et al. 1991). Homology lidského CD46 byly zjištěny u primátů (Murakami et al. 1996) a prasete (Toyomura et al. 1997). Analýza mRNA dokázala, že myš (*Mus musculus*) a ostatní hlodavci (krysy, morčata...) vytvářejí mRNA CD46 pouze ve varlatech a samotný protein se nachází jen na vnitřní akrozomální membráně (Seya et al. 1998). Exprese mRNA CD46 myši probíhá paralelně s vývojem spermatid při pohlavním vývoji (Tsujimura et al. 1998). K expresi mRNA CD46 nedocházelo do 29. dne vývoje pohlavních buněk. Spermatidy převažují v 16-24 dni vývoje. Simpson a Holmes (1994) zjistili, že exprese mRNA byla výrazně potlačena u mutantních myši s nefunkční spermatogenezí (Simpson a Holmes 1994). U lidí, primátů a prasat dochází také k silné expresi CD46 na vnitřní akrozomální membráně, ale CD46 je zde tvořena jinou izoformou než na ostatních buňkách (Seya et al. 1993).

Pro lokalizaci proteinu CD46 většiny somatických buněk na SDS-PAGE je charakteristický široký vzor s dvěma pruhy. Horní pruh má relativní molekulovou hmotnost 59 kDa - 68 kDa (BC1 a BC2 isoforma) a M_r dolního bandu je 51 kDa – 58 kDa (C1 a C2 isoforma) (Post et al. 1991). CD46 obsažený na vnitřní akrozomální membráně lidské spermie se liší a má velikost 43 – 50 kDa (Cervoni et al. 1992).



Obr.3: Immunoblotting analýza několika myších tkání. Protilátka proti CD46 zvýraznila pouze 46.4 kDa band charakteristický pro CD46 ve varlatech (Inoue et al. 2003).

2.3 Mezidruhové rozdíly

Myši (*Mus musculus*) a lidské CD46

Jak již bylo řečeno, receptor CD46 se u hlodavců vyskytuje jen na vnitřní akrozomální membráně spermatické buňky (Seya et al. 1998). U člověka se vyskytuje CD46 na většině jaderných buňek a na vnitřní akrozomální membráně spermie. U hlodavců CD46 zřejmě asociuje svou funkci pouze s oplozením. Obecně je u hlodavců exprese proteinů regulujících komplement (CD55, CD59b, C4b-binding protein) preferována v reprodukčních orgánech. U myších buněk funkci regulace komplementu na povrchu somatických buněk vykonává homolog CD46 proteinu Crry protein, jenž vykonává také funkci příslušící CD55 (Li et al. 1993). Další odlišností je absence některých sekvencí v cytoplazmatické doméně. Jedná se o sekvence YXXL (Yant et al. 1997), RRKKK (Seya et al. 1997), FTSL (Liszewski et al. 1994). Tyto sekvence se uplatňují při infekci virem spalniček a u myšího CD46 se nevyskytují. Výsledná aminokyselinová podobnost myšího a lidského CD46 je 45 % a nukleotidová 62 % (Tsujimura et al. 1998).

Lidské a prasečí (*Sus scrofa*) CD46

Prasečí CD46 má stejnou strukturální organizaci jako lidské: čtyři CCP domény, STP doména, transmembránová doména a cytoplazmatický konec. Výsledná aminokyselinová shoda je 42 %, což je vůbec jedna z největších podobností mezi známými lidskými a prasečími proteiny (Toyomura et al. 1997). Při použití protilátek na prasečí CD46 Toyomura et al. zjistil, že na rozdíl od člověka se CD46 vytváří i na povrchu červených krvinek prasete. Funkci regulátoru komplementu si též zachovává. Za zmínku stojí především problematika xenotransplantací. Hlavní překážkou odmítnutí prasečích orgánů lidským tělem je vysoká citlivost prasečích buněk na lidský komplement. To může být zapříčiněno menší aktivitou prasečího CD46. Vysoká citlivost vede k hyperakutnímu odmítnutí tkáně dárce (Dalmaso et al. 1992). To je způsobeno přítomností α 1-3 galactosyl galaktosy na povrchu prasečích buněk, proti kterým má lidské tělo protilátky (Galili et al. 1987). Ke snížení poškození zprostředkovaného komplementem by se dala využít právě vlastnost CD46 regulovat komplement a vytvářela by se transgenní prasata s lidským CD46 (Adam set al. 2001). Dosaženo bylo zatím jen částečných úspěchů s použitím silných imunopresiv (McGregor et al. 2005).

3 Receptorová a regulační funkce proteinu CD46

3.1 Regulace komplementu

CD46 působí na povrchu buněk jako kofaktor pro sérovou proteázu faktor I zprostředkávající degradaci C3b a C4b fragmentů a tím chrání vlastní buňky před autoimunitním poškozením (Seya a Atkinson 1989). Stejnou regulační funkci mají také proteiny CR1, faktor H a C4b vazebný protein. Cílem komplementární kaskády je vystavení a aktivace C3b a C4b komplementárních částic na povrch buňky. Regulační proteiny jako CD46 mají za úkol především navázat C3b, C4b fragmenty. Působí tedy jako kofaktor sérové proteázy faktor I, která navázané komplementární částice štěpí. Štěpení C4b uvolňuje molekulu C4c a C4d, kdy C4d zůstává kovalentně svázána s povrchem buňky. Degradací C3b vzniká iC3b. Tyto iC3b částice a C3b, C4b fragmenty jsou ligandy pro komplementární receptory typu CR2 (Morgan 1999). Tyto interakce podporují fagocytózu, signalizaci B lymfocytů a lokalizaci protilátek (Nielsen et al. 2000). Vazbou C3b a C5 konvertázy se začne tvořit attack membrane complex. Štěpením C3 a C5 se navíc uvolňují anaphylatoxiny způsobující lokální zánět a aktivující kompetentní buňky imunitního systému. Komplement aktivující dráhy jsou regulovány tak, aby docházelo k aktivaci odpovídajícího cíle a omezila se vazba C3b, C4b na vlastní buňky (Liszewski a Atkinson 1996). Zajímavé výsledky přinesla studie, při níž byla použita ovaria čínského křečka s implantovaným lidským CD46 proteinem. Na procesu štěpení komplementu se při velkém množství C3b podílí jako kofaktor spíše faktor H plazmový protein, zatímco CD46 protein se prosazuje při nižších dávkách C3b (Barilla-LaBarca et al. 2002). Stejný systém regulace komplementu využívají například Pox viry, které si vytvářejí komplement inhibující proteiny, funkčně a někdy i strukturně podobné CD46, či jiným regulátorům komplementu (Howard et al. 1998).

3.2 Vazebná specifita CCP domén

Vysokou afinitu jednotlivých CCP domén má CD46 protein ke svému přirozenému ligandu C3b a C4b složce komplementu a některým patogenním ligandům (Liszewski a Atkinson 1996). Mezi regiony účastnících se regulace komplementu patří oblasti bohaté na prolin a to pouze v CCP 3 a CCP 4. Důležitou roli hrají i cysteinové zbytky. Zatímco jejich substituce na těchto regionech v CCP 1 a 2 ovlivnily interakce s C4b, tak v CCP 3 a 4 změnila interakce i s C3b. Z toho vyplývá, že vazebné místo pro C4b se nachází na všech 4 CCP doménách, zatímco pro C3b pouze na CCP 3 a 4. Aminokyseliny důležité pro interakci C3b a C4b se tedy nacházejí na CCP 2 a 3. Při pokusu s cílenými substitucemi nejvíce změnila vazebnou a regulační funkci CCP domén pro C3b, C4b substituce na hydrofobních spojích mezi doménami 2/3 a 3/4 a substituce Cys zbytků (Liszewski et al. 2000).

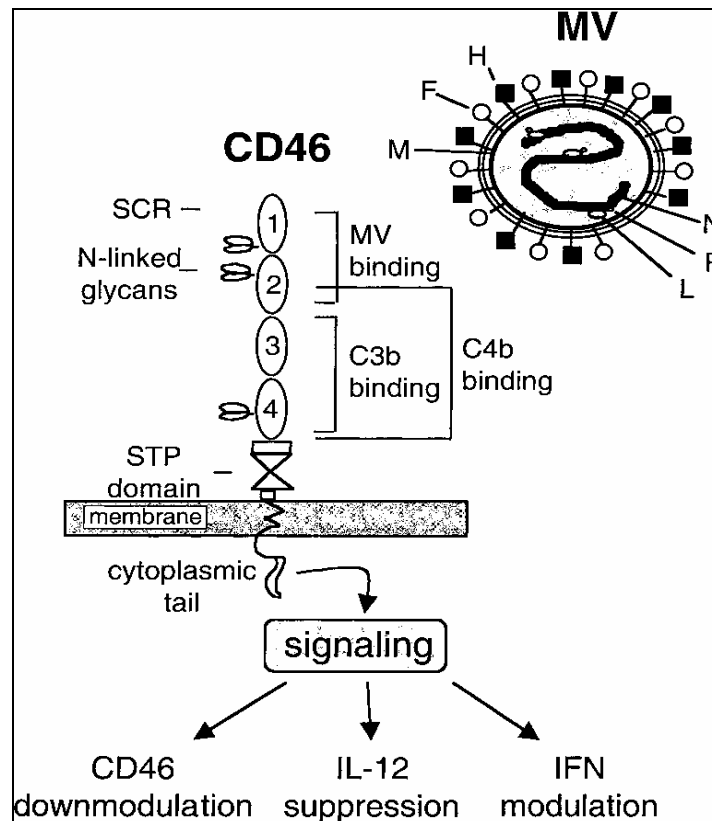
Regulační oblasti pro C4b na CCP 1 a 2 jsou zahrnuty ve vazbě s virem spalniček. K přímému kontaktu s virem dochází na 94-97 AK reziduu CCP-2 domény (Casasnovas et al. 1999) a v místě 37-59 AK rezidua CCP 1 (Manchester et al. 1995). Zajímavostí je, že Jihoameričtí primáti úplně „odstranili“ CCP 1 doménu na většině buněk pomocí alternativního sestřihu, na vnitřní akrozomální membráně spermie však CCP 1 zůstává. V mRNA CD46 somatických buněk úplně chybí 2. exon. Tímto opatřením se zabránilo vazbě viru spalniček, aniž by byla ohrožena funkce regulace komplementu. C3b aktivita je skoro nezměněna a C4b aktivita se uchovala na ostatních doménách, i když je méně efektivní (Hsu et al. 1997).

3.3 Afinita k viru spalniček

Virus spalniček patří do rodiny paramyxovirů. Onemocnění virem spalniček stále patří k jedné z hlavních příčin dětských úmrtí na světě, přestože se Světová zdravotnická organizace (WHO) snaží poskytnout vakcínu i do nejvíce postižených rozvojových oblastí (Subsaharská Afrika, Jižní a Jihovýchodní Asie). V roce 2005 zemřelo na toto onemocnění 345 000 lidí. Spalničky způsobují nejen akutní dýchací potíže, ale jsou spojovány také s dočasnou imunosupresí. To vede k pneumonii a dalším sekundárním infekcím. V nejhorších případech dochází až k zánětům nervového systému. Přes všechnu

snahu vymístit spalničky, se tento virus znovu objevuje i ve vyspělých zemích (Japonsko 1997-1998, Nizozemí 1999-2000). Příčinou je vysoká nakažlivost a rezistence malých dětí na vakcínu, způsobená přítomností matčiných protilátek (<http://www.who.int/topics/measles/en/>).

Transmembránový protein CD46 je receptorem pro virus spalniček. Pro interakci s CD46 používá virus glykoprotein hemagglutinin, který se váže na CCP 1 a 2 domény (Manchester et al. 1997). To bylo dokázáno použitím monoklonálních protilátek proti CCP -1 a -2, které inhibovaly infekci virem spalniček. Naopak protilátky proti CCP -3 a -4 vazbě viru nebránily. Důležitost CCP 1 pro vazbu viru byla ověřena vytvořením CD46 s delecemi v CCP 1, což také způsobilo inhibici infekce, ale neporušilo funkci regulace komplementu. Použitím monoklonální protilátky E4.3 proti CCP se inhibovala vazba virového hemagglutininu na CD46 v místě 37-59 AK rezidua (Manchester et al. 1995). Tento region se tedy podílí na vazbě hemagglutininu (Hsu et al. 1997). Jako kriticky důležité místo pro vazbu se jeví především Pro 39 na CCP 1 (Liszewski et al. 2000). Dalším nepostradatelným prvkem pro stabilizaci vazby jsou N-glykosilované úseky CCP 2 (Maisner et al. 1996). Napadení buňky se účastní ještě další virový obalový glykoprotein, membránový fúzní protein (Malvoisin a Wild 1993). Svou roli v patogenitě viru hraje i cytoplazmatická doména CD46. Konkrétně se jedná o isoformu Cyt 2 s delším AK řetězcem (22 AK). CYT doména dokáže regulovat imunitní odpověď. Interakce CD46 a viru spalniček může modulovat indukci antivirové imunitní odpovědi skrze signální dráhu. K tomu dochází inhibicí exprese cytokinu IL-12, iniciátoru buněčné imunitní odpovědi (Fugier-Vivier et al. 1997). Dále moduluje imunitní odpověď regulací produkce interferonu 1 (IFN), hrajícím důležitou roli v aktivaci časné antivirové imunitní odpovědi. Vazbou viru CYT doména indukuje intracelulární signál, jenž aktivuje produkci IFN. Virus spalniček umí tento děj regulovat také, pomocí snížení afinity k CD46 totiž úspěšně potlačuje IFN produkci (Manchester et al. 2000). Některé kmeny spalniček regulují CD46, aby ještě více podporoval lyzi C3b komplementu (Schnorr et al. 1995). Tato pozorování tak podtrhují důležitost cytoplazmatické domény typu 2.



Obr.5: Interakce viru spalniček a buněčného receptoru CD46. Receptorovou funkci zastávají 4 CCP (SCR) domény. Virus spalniček se váže na CCP 1 a 2. C3b, C4b fragmenty komplementu na CCP 2 – 4. Na povrchu viru jsou 2 glykoproteiny H (hemagglutinin) a F (membránový fúzní protein), účastníci se vazby s hostitelskou buňkou. Vazba viru na CD46 aktivuje cytoplazmatickou doménu a spouští signální dráhu regulující imunitní odpověď. Zdroj: Manchester et al. 2000.

3.4 Afinita k bakteriím *Neisseria gonorrhoeae*

CD46 protein nehraje roli pouze jako receptor virů, ale také jako receptor pro některé bakterie. Dobře prozkoumaná interakce s proteinem CD46 je především u bakterie *Neisseria gonorrhoeae* (gram negativní diplokok) (Kallstrom et al. 1997). Tato bakterie způsobuje kapavku, pohlavně přenosný zánět dělohy, vejcovodů, pánevní pobřišnice a močových cest, ale i zánět spojivek, a u novorozenců může zapříčinit i slepotu.

Pro úspěšnou infekci je důležitá adheze k apikální straně epiteliální buňky pomocí bakteriálních fimbrií (Swanson 1973). Samotné adheze s extracelulární doménou proteinu CD46 se účastní fimbrie typu 4. Ten se váže na CCP 3 a STP doménu (Kallstrom et al. 2001). Důsledkem adheze bakteriální fimbrie je následné vyplavování Ca^{2+} z intracelulárních zásob. Vysoká hladina intracelulárního vápníku a následná aktivace

transdukce signální dráhy ovlivňující tvorbu adhezních plaků, se jeví jako důležitá pro udržení stabilní vazby bakteriální fimbrie – hostitelská buňka (Kallstrom et al. 1998).

Velmi důležitou roli hraje cytoplazmatická doména proteinu CD46, a to konkrétně delší Cyt 2 isoforma, která má signální funkci. Na tento fakt poukazují pokusy s izoformou Cyt 1 s kratším řetězcem, která nepodporovala adhezi bakterie (Kallstrom et al. 2001). Po infekci epitelálních buněk bakterií dochází k zapnutí tyrosinové fosforylace Cyt 2 domény Src kinázou. Kritickou roli zde hraje především c-Yes kináza a její cílová AK na Cyt 2 Tyr 354 (Wang et al. 2000; Lee et al. 2002). Tato kináza se začne při infekci shlukovat kolem Cyt 2. Důsledkem je tedy spuštění signální kaskády důležité pro patogenitu *Neisserie*. Spojení mezi tyrosin kinázami a adhezí bakterie k receptoru se prokázala použitím inhibitoru těchto kináz, což vedlo ke snížení adheze *Neisserie*. Existuje několik hypotéz jakým způsobem fosforylace CD46 ovlivňuje nakažlivost bakterie. Naskýtá se možnost aktivace kortikálních plaků podporujících adhezi *Neisserie* (Merz et al. 1999). Tyto plaky obsahují cytoskeletální komponenty, tyrosin fosforylované proteiny, signální molekuly a Opa receptory. Další podobný proces zahrnuje formaci adhezního komplexu (Yamada a Geiger 1997). Tento komplex (cytoskeletální komponenty, tyrosin fosforylované proteiny a signální molekuly) je aktivován signální kaskádou a shlukuje se v kortexu na místě adheze. Z toho vyplývá, že bakterie je schopná využít způsoby, které jsou používány k adhezí mezi buňkami nebo buňkami a substrátem.

3.5 Buněčná signalizace

Různé patogeny zneužívají komplementární receptory typu CD46 k šíření v organismu a jako ochranu před hostitelským imunitním systémem. Zneužívají k tomu Cyt 2 doménu CD46, schopnou spustit příslušnou buněčnou signalizaci, aktivující pro patogen výhodné kroky. Cyt 2 doména CD46 interaguje s mnoha kinázami, např. je fosforylována tyrosin kinázami v makrofázích (Wong et al. 1997). Na druhou stranu hostitelská buňka využívá signální funkci CD46 stejně dobře ve svůj prospěch. Dokáže totiž fungovat jako kostimulátor aktivace T lymfocytů. Stimulace extracelulární domény lidského CD46 zapříčiní tyrosin fosforylaci intracelulárních proteinů. Patří mezi ně CBL a LAT adaptorové proteiny (Astier et al. 2000). Ty se uplatňují v negativní/pozitivní regulaci TCR (T-cell receptor) signalizace aktivující T lymfocyty.

LAT proteiny umožní fosforylaci GEF proteinu Vav, který se podílí na reorganizaci aktinového cytoskeletu důležitého pro aktivaci T lymfocytů (Serrador et al. 1999). Protein Vav zároveň aktivuje Rac GTPázy. Výsledkem je rozšíření T lymfocytů a zvýšená afinita integrinů ke svým ligandům v místě zánětu (D'Souza-Schorey et al. 1998). Ukázalo se, že CD46 společně s CD3 působí velké morfologické změny a reorganizaci aktinu (Zaffran et al. 2001). Následná aktivace T-lymfocytů je zásadní pro jejich migraci skrz cévy, lymfatické orgány nebo adhezi k cílovým buňkám (Penninger a Crabtree 1999). Proteiny CD3/CD46 také aktivuje Tr-1 specifický cytokinový fenotyp u CD4+ T-lymfocytů, což má za následek proliferaci interleukinu 10 a supresi T-helper buněk (Kemper et al. 2003).

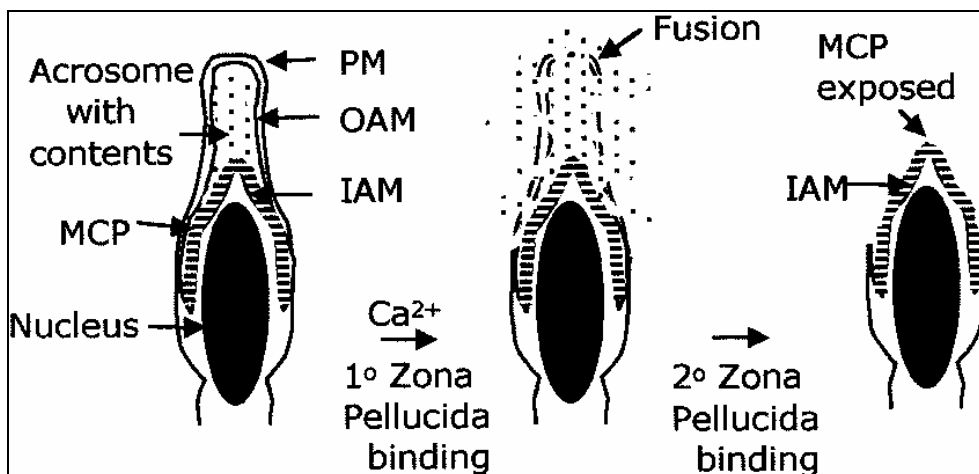
4 Oplození

4.1 Proces oplození

Oplození by se dalo z pohledu buněčných interakcí obecně charakterizovat jako soubor pochodů a interakcí, založených na funkci proteinů obsažených na povrchu vajíčka či spermie (Romanovský 1982). Proteiny na spermiu se účastní jak rozpoznání vajíčka spermií, fúze gamet, tak i morfologických změn v průběhu kapacitace spermie, ale i ochrany spermie v cizím prostředí samičího rozmnožovacího traktu. Přesně takový účel by mohl mít i CD46 na vnitřní akrozomální membráně, ale i další regulátory komplementu (Harris et al. 2006). Je proto nutné pochopit interakci mezi spermií a vajíčkem.

Nejdříve musí spermie projít skrz vnější vrstvu oocyty tvořenou buňkami kumulu, obklopujícími ovulující vajíčko většiny savců. V tomto procesu spermie uplatňují GPI ukotvené hyaluronidasy (Lin et al. 1994), ale také výrazně zvýšené pohyblivosti spermií (Yanagimachi 1994). Cílem je pouze najít správnou cestu kumulem k další vrstvě vajíčka zona pellucida (ZP). Zona pellucida je specifická extracelulární matrix skládající se z glykoproteinů ZP1, ZP2 a ZP3. Dnes se nejvíce preferuje model, kdy se spermie váže na O-vázané oligosacharidy ZP3. Pro potvrzení tohoto modelu byl proveden knock-out pro ZP3. Výsledek však ukázal, že zona pellucida se bez ZP3 vůbec nevytváří (Rankin et al. 1996). Proto implantovali myši lidské ZP3, aby se ZP vytvořila, ale nemohli se na ni vázat myší spermie. Tyto oocyty na svém povrchu začaly přesto vytvářet „myší“ oligosacharidy, na které se spermie vázaly (Rankin et al. 1998). Při absenci exprese ZP1 dochází k neorganizovanému růstu ZP kolem oocyty a samice mají sníženou plodnost (Wassarman et al. 2004). U vazebných proteinů na povrchu spermatické buňky je situace složitější. Našlo se mnoho povrchových proteinů, které byly testovány pomocí knock-outu jejich genu. Tato studie nakonec nepřinesla žádný uspokojivý výsledek (Wassarman et al. 2001). Například knock-out Galaktosyl transferázy (GalT) nijak nesnížil schopnost oplození, přestože nedocházelo ke klasické akrozomální reakci zprostředkované ZP3 (Lu a Shur 1997). Naopak výsledek knock-outu dalších zkoušených proteinů jako Fertilin- β a Cyritestin měl jiný dopad. Samci byli neplodní a nedošlo k vazbě spermie na ZP (Nishimura et al. 2001). Spermie také současně s Fertilinem- β a cyritestinem ztratila další

membránové proteiny. Další adhezivní proteiny jsou umístěny v akrozomálním váčku a na akrozomální membráně. Jedná se např. o proteiny sp56 (Foster et al. 1997) a zonadhesin (Hickox et al. 2001). Ty se s velkou pravděpodobností účastní adheze spermie a ZP při akrozomální reakci, než dojde k penetraci ZP. Po úspěšném navázání spermie a ZP dochází k akrozomální reakci. Kritická pro úspěšnou akrozomální reakci je také kapacitace spermatické buňky, zakončená odhozením glykoproteinového obalu na povrchu spermatické hlavičky. Během akrozomální reakce plazmatická membrána rostrální části spermie fúzuje s vnější akrozomální membránou, což vede k uvolnění akrozomálního obsahu a zániku těchto membrán. Z molekulárního hlediska nejdříve dochází k vazbě ZP3 a spermatických receptorů (GalT,...), to aktivuje heterotrimerní GTP vazebné proteiny a fosfolipázu C. Ty následně způsobí zvýšení koncentrace cytoplazmatického vápníku. Tato vazba také spouští jinou signální kaskádu stimulující vstup extracelulárního vápníku pomocí T a Trp rodiny kanálů (Jungnickel et al. 2001, 2006). Následný vzrůst koncentrace cytoplazmatického vápníku spouští vylití akrozomu (O'Toole et al. 2000). Proteasy a glykosidázy poté začnou vytvářet úzký otvor do ZP velikosti spermatické hlavičky. Stále není úplně jasné zda jsou v tomto procesu důležitější proteázy akrozomálního obsahu či membránové proteázy. Nejistá je také pozice známého proteinu akrozinu, který se měl podílet na vazbě spermie-oocyt a penetrovat ZP. Později se však zjistilo, že tyto schopnosti nemá a nejspíše celý proces pouze urychluje (Honda et al. 2002). Bylo provedeno několik studií, které si kladly za úkol prokázat vliv hormonu progesteronu na spuštění akrozomální reakce kapacitované spermatické buňky (Bronson et al. 1999). V další fázi oplození fúzuje vnější akrozomální membrána spermie s plazmatickou membránou vajíčka. V této činnosti se velká pozornost obrací na povrchové proteiny z ADAM rodiny. Tyto proteiny mají disintegrin doménu, která má svého vazebného partnera v integrinu plazmatické membrány vajíčka (Primakoff a Myles 2000). Další možností je protein CD9, při jehož knock-outu u samice myši je fúze gamet defektní (Le Naour et al. 2000). Chtěl bych ale připomenout, že důsledek knock-outu nemusí být vždy objektivní. Genová modifikace jednoho proteinu nutně nevyřadí určitou jeho funkci, protože ho může nahradit jiný protein (viz. Rozdělení funkce regulace C3b komplementu mezi CD46 a H faktor). Na druhou stranu knock-out jednoho genu většinou negativně ovlivní funkce ve větším rozsahu, než v rámci projevu jednoho genu.



Obr.5: Schéma akrozomální reakce lidské spermie. V kapacitované spermii se zvýší koncentrace cytoplazmatického vápníku. Následně vnější akrozomální membrána (OAM) fúzuje s plazmatickou membránou (PM) vajíčka a dochází k vylití akrozomálního obsahu. Poté je odhalena vnitřní akrozomální membrána (IAM), kde se nachází CD46. Zdroj: Riley et al. 2002.

4.2 Oplození a CD46

Některé studie navrhují konkrétně protein CD46 na vnitřní akrozomální membráně jako jeden z proteinů zodpovědných za spojení spermie a oocyty při akrozomální reakci. Byla použita specifická monoklonální protilátka (MH61) proti lidskému CD46 při akrozomální reakci lidské spermie. Navázání protilátky MH61 blokovalo u většiny vzorků fúzi lidské spermie a křeččího oocyty (Okabe et al. 1990). Další práce (Anderson et al. 1993) demonstrovala specifickou vazbu C3b dimeru komplementu s CD46. Při akrozomální reakci vypuštěné proteázy rozštěpily C3b komplement na produkt C3bi a tím podpořily jeho vazbu k CD46. Oocyt vytváří na povrchu CR1 a CR3 komplementové receptory, vázající C3bi na CD46. Tím by vznikl model interakce spermie-oocyt, který by byl založen na propojení CD46 spermie/ C3b/ CR1,3 (Anderson et al. 1993). Novější práce tento model spíše zpochybňuje. Byla totiž vytvořena monoklonální protilátka proti CD46 laboratorního potkana, blokující C3b vazebné místo na CCP doménách. Interakci spermie s oocytem to ale nebránilo (Taylor et al. 1994). Nabízí se tak možnost působení jiného vazebného místa CD46 proteinu na spojení s oocytem. Než spermatická buňka projde semenotvorným tubulem, jsou N-cukry na CCP doménách deglykosylovány. To je poměrně běžný jev na membránách spermie a mohl by být nezbytný pro interakci mezi spermii a oocytem (Riley et al. 2002). Důležitosti proteinu CD46 při interakci s oocytem a

možnosti jeho evoluční fixace nasvědčuje i příklad jihoamerických primátů. U nich nedochází k deleci CCP 1 domény CD46 na vnitřní akrozomální membráně spermií jako u ostatních buněk (Riley et al. 2002).

4.3 CD46 jako marker akrozomální reakce

Semenotvorný tubulus varlat hraje klíčovou roli v produkci a maturaci samčích pohlavních buněk. Jeho analýza tak přispívá k pochopení spermatogeneze a tím pádem i roli spermatických proteinů jako je CD46 v oplození. Semenotvorný tubulus má několik úrovní struktury, u lidí 6 a u blíže zkoumané krysy dokonce 14 úrovní. Každá úroveň se od sebe liší mikroskopickými znaky jako frekvencí meiotického a mitotického dělení, povrchem spermatidy, povrchem akrozomu, uspořádání mitochondrií nebo přítomnost shluků rostoucích spermatid (Hess 1990). Pro úspěšnou identifikaci každého stupně vývoje nestačí pouze samotný z těchto faktorů (Mizuno et al. 2005). Pro studium by tak byl nejvhodnější antigenní faktor nacházející se na spermatické buňce pouze v rámci jedné oblasti. Navíc by sám o sobě stačil k určení jednotlivých úrovní vývoje spermatické buňky. Úspěšným kandidátem se proto stal právě receptor CD46, který se již osvědčil jako vhodný akrozomální marker u člověka (Seya et al. 1993). Jeho přednost tkví především v lokalizaci pouze na akrozomu vyvíjející se spermatické buňky (Mizuno et al. 2004). Pro jeho barvení se použila specifická monoklonální protilátka MM.1 proti CD46 laboratorního potkana. K posouzení různých fází vývoje se využívá i DAPI barvení a odlišení na základě morfologických změn. Jednotlivé vývojové stupně spermatid laboratorního potkana se dají rozdělit do různých částí semenotvorného tubulu na úroveň 1-19. V ranných stádiích vývoje spermatogonií a spermatocytů nedochází k expresi CD46. Protein se nenachází ani v Golgiho aparátu ani ve vznikajícím akrozomu. Exprese CD46 je poprvé detekována na úrovni 7. V této chvíli se nachází jak v Golgiho aparátu, tak ve vznikajícím akrozomu. Ve fázi 8-14 exprese sílí. Po 14. stupni vývoje se CD46 koncentruje v místě zralého akrozomu a již se nenachází v Golgiho aparátu. To naznačuje, že CD46 je transportováno z Golgiho aparátu do akrozomu v prvních fázích jeho formování. CD46 by tak mohl mít určitou roli při maturaci akrozomu při spermatogenezi (Mizuno et al. 2005).

Receptor CD46 se osvědčuje také jako dobrá sonda akrozomální reakce u člověka (Jaiswal et al. 1999); konkrétně úplné akrozomální reakce kdy se vylíje všechen obsah akrozomálního váčku a obnaží se vnitřní akrozomální membrána. Využívá se pozitivního barvení pomocí FITC-CD46 monoklonální protilátky (FITC = fluorescein isothiocyanát). To přineslo svůj užitek při studiích zabývajících se různými stupni akrozomální reakce a indukci SAR nebo při výzkumu vlivu progesteronu na spuštění akrozomální reakce spermie (Bronson et al. 1999).

4.4 Genová modifikace CD46

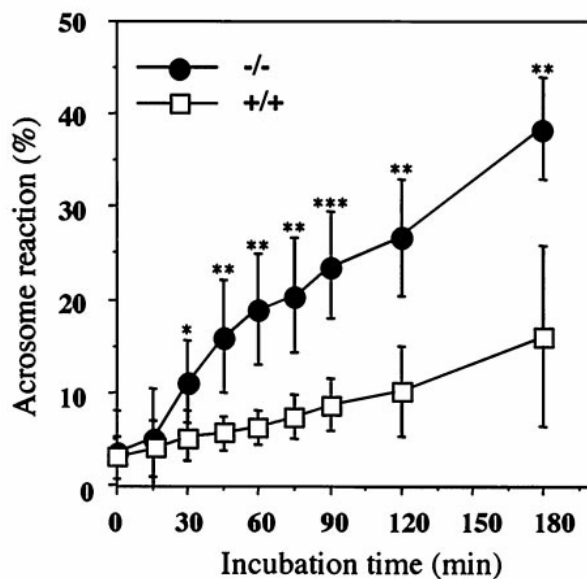
Spermatická buňka putující reprodukčním traktem samice k oocytu je ohrožena komplementem, který vyživá samice především v děloze a oviduktu k odstraňování cizích těles. Například estrogen stimuluje tvorbu C3 komplementu v děloze laboratorního potkana (Sundstrom et al. 1989). Jak již bylo poznamenáno výše, u spermie se CD46 nachází jen na vnitřní akrozomální membráně a proto nemůže využít svou schopnost regulace komplementu na povrchu buňky (Taylor a Johnson 1996). Tuto funkci na plazmatické membráně spermie přebírají příbuzné proteiny, regulátor komplementu CD55 a CD59 (Simpson a Holmes 1994). Avšak v bodu blízko ZP potřebuje v procesu kapacitace spermie odhodit část své plazmatické membrány z hlavové akrozomální části. Následuje vylití obsahu z akrozomálního váčku (akrozomální reakce) a zahájení oplodnění vajíčka (Yanagimachi 1994). Tímto ztrácí i svou ochranu před komplementem použitím komplementárních receptorů v plazmatické membráně. Protože vnitřní akrozomální membrána je místem výskytu receptoru CD46, nabízí se možnost, že CD46 hraje roli v ochraně spermie před komplementem v samičím reprodukčním traktu při akrozomální reakci (Seya et al. 1993).

K objasnění funkce receptoru CD46 a potvrzení či vyvrácení předešlých hypotéz byly vytvořeny myši s knock-outem pro gen kódující CD46 použitím homologní rekombinace (Inoue et al. 2003). CD46 knock-out myši byly přesto zdravé a plodné. K žádnému viditelnému poškození spermie komplementem nedošlo a proto se může konstatovat, že rolí proteinu CD46 na vnitřní akrozomální membráně není přednostně regulace komplementu. V kapitole o oplození byl popsán model interakce spermie-oocyt u člověka založený na vytvoření jakéhosi mostu CD46 spermie/ C3b/ CR1, 3 oocytu, kde CD46

hraje roli vazebného proteinu. Tato hypotéza se stává spíše nepravděpodobnou, vzhledem k převládající schopnosti oplození u CD46 $-/-$ myši. Úplně vyloučeno to však také nemůže být, protože studie knock-outu byla provedena zatím pouze u myši. U jednotlivých samců se však prokázaly velké rozdíly ve schopnosti oplození, kdy CD46 $-/-$ samci produkovali vyšší počet potomků než samci s neporušenou tvorbou CD46. Také se ukázalo, že incidence spontánní akrozomální reakce spermií CD46 $-/-$ samců je až dvojnásobná než u normálních samců. Jedna z možností způsobujících spontánní akrozomální reakci u spermií s narušeným CD46 může být změna chování iontových kanálů, což vede ke zvýšení koncentrace cytoplazmatického vápníku a následného spuštění spontánní akrozomální reakce.

Objevila se i tvrzení, že spontánní akrozomální reakce je čistě následek poškození spermie. Podle jedné z teorií však SAR může být následkem přirozené kapacitace (Kim et al. 2001). Z tohoto modelu by vyplývalo, že ZP neinicuje akrozomální reakci, ale pouze zvyšuje rychlost akrozomální exocytosy již aktivované spermie. Mezi další faktory spouštějící spontánní akrozomální reakci patří i progesteron (Bronson et al. 1999) nebo folikulární tekutina (De Jonge et al. 1993). SAR se dá spolehlivě spustit také pomocí různých látek; např. Ca^{2+} ionofory, analogy cAMP, stimulatory protein kinázy C, pentoxifylline, krevní destičky aktivující faktor (Jaiswal et al. 1999).

Ztráta CD46 samozřejmě může ovlivnit také distribuci membránových proteinů vázajících se na něj. K těmto membránovým proteinům patří beta 1 integriny a tetraspany (Lozahic et al. 2000). CD46 $-/-$ spermie mají mnohem větší incidenci SAR než normální spermie, proto by jedna z funkcí CD46 mohla souviset se stabilizací akrozomální membrány.



Obr.6: Graf znázorňující incidenci spontánní akrozomální reakce u myši s neporušeným CD46 (+/+) a myši s knock-outem genu pro CD46 (-/-). Zdroj: Inoue et al. 2003.

4.5 Rod *Apodemus*

Hlodavci vytvářejí CD46 pouze na vnitřní akrozomální membráně a jeho funkci regulace komplementu na ostatních buňkách zajišťuje homologní protein Crry (Li et al. 1993). Existují však hlodavci rodu *Apodemus* (myšice), kde zkoumané druhy CD46 nevytvářejí ani na vnitřní akrozomální membráně spermií. Neschopnost exprese proteinu je způsobena alternativním sestřihem transkriptu. Dochází při tom k delecím exonů 5-7 nebo 6-7, kdy zkoumané druhy myšic měly delece v jiných exonech. Také se objevuje prodloužení 3' konce a zkrácení 5' nepřekládaného konce řetězce mRNA. Transkript se tedy tvoří ale protein CD46 již ne (Johnson et al., dosud nepublikované výsledky). Jak již bylo popsáno výše, knock-out CD46 způsobuje nestabilitu akrozomu a následnou spontánní akrozomální reakci (Inoue et al. 2003). Ukázalo se, že i v případě přirozeného narušení tvorby proteinu se neobjevují viditelné negativní vlivy na fertilizaci, podobně jako knock-out CD46 u myši. V případě přirozené nepřítomnosti CD46 u myšic také dochází k předčasné akrozomální reakci. Spermie zároveň vytvářejí tzv. vláčky shloučených spermií, které jsou k sobě přichycené. Zvyšují si tak motilitu, tedy zvýšenou úspěšnost dosáhnout oocyty (Moore et al. 2002). V tomto případě se může jednat o kompetici mezi spermii různých jedinců o to, která spermie dosáhne vajíčka a oplodní

ho. Podle nových studií je kompetice na úrovni oplození poměrně běžná, obzvláště u promiskuitních druhů jako například Myšice křovinná (Moore et al. 2002). Tyto spermie pod tlakem kompetice často prodělávají morfologické a biochemické změny důležité pro úspěšnou fertilizaci, tzn. že větší část populace spermií je kapacitována (Gomendio et al. 2006).

5 Závěr

Z dosavadních výzkumů se protein CD46 jeví jako velice komplexní. Jeho funkce jako regulátoru komplementu na somatických buňkách je poměrně dobře prozkoumána. Úplně opačná situace však nastává u jeho role na vnitřní akrozomální membráně spermie při oplození. Jeho neměnná forma na vnitřní akrozomální membráně u většiny savců vytvářejících CD46, nasvědčuje na jeho evoluční zafixování na této pozici. Na to poukazuje příklad hlodavců majících CD46 pouze na vnitřní akrozomální membráně a Jihoamerických primátů, u jejichž CD46 na ostatních buňkách nedochází k expresi CCP 1 domény. Z pozice CD46 na spermatické buňce se od nich proto očekávala především vazba k ZP nebo regulace aktivace komplementu C3b, C4b samice. Výsledky se ukázaly překvapivé. Monoklonální protilátky blokující vazebná místa na CD46 nijak nebránily vazbě spermie s oocytom. Knock-out CD46 neovlivnil schopnost spermie oplodnit oocyt, ale docházelo k spontánní akrozomální reakci. Naskýtá se další možná a neprozkoumaná role, a to stabilizace vnitřní akrozomální membrány. Vycházíme z modelu T lymfocytů, u kterých Cyt 2 doména CD46 aktivuje signální kaskádu spouštějící změny aktinového cytoskeletu. Stejně tak CD46 interagující s patogenní bakterií *Neisseria* zapříčiňuje shlukování cytoskeletálních komponentů v hostitelské buňce. Podobným způsobem by CD46 na vnitřní akrozomální membráně spermie mohlo reorganizovat aktinová vlákna spermatické buňky. Důležitosti role cytoplazmatické domény také nasvědčuje regulace imunitní odpovědi při napadení virem spalniček.

Prozatímní výzkum CD46 se zaměřuje přednostně k imunologickému hledisku funkce CD46. Perspektivní se jeví i možná evoluční role proteinu CD46. Zajímavý je konkrétně rod *Apodemus*, jejichž zástupci přirozeně netvoří protein CD46. Může existovat několik variant působení selekčních tlaků na deaktivaci proteinu CD46. Jednak negativní vliv afinity CD46 k některým patogenům. Bez CD46 se tak snižuje možnost přenosu patogenu a následné infekce. Právě promiskuitní druhy myšic, které jsou nejvíce ohroženy pohlavně přenosnými patogeny se receptoru CD46 „zbavily“. Dalším tlakem může být zvýšení reprodukční úspěšnosti jedinců bez CD46 a s tím spojená kompetice spermií. Příkladem jsou knock-outy myši, jejichž jedinci mají větší vrhy než normální jedinci. Možností je i reprodukčně izolační mechanismus. Jak již bylo popsáno myšice tvoří transkript CD46, ale již netvoří protein. U každého prozkoumaného druhu je transkript odlišný. Na úrovni DNA dochází u každého druhu myšic k jiným nesynonymním

záměněm, tedy druhově specifickým sekvencím. To naznačuje, že funkce CD46 může souviset se speciálními událostmi.

Přehled literatury

Adams DH, Kadner A, Chen RH, Farivar RS. 2001: Human membrane cofactor protein (MCP, CD 46) protects transgenic pig hearts from hyperacute rejection in primates. *Xenotransplantation.*; 8(1):36-40.

Anderson DJ, Abbott AF, Jack RM. 1993: The role of complement component C3b and its receptors in sperm-oocyte interaction. *Proc Natl Acad Sci.*;90(21):10051-5.

Astier A, Trescol-Biemont MC, Azocar O, Lamouille B, Rabourdin-Combe C. 2000: Cutting edge: CD46, a new costimulatory molecule for T cells, that induces p120CBL and LAT phosphorylation. *J Immunol.*;164(12):6091-5.

Barilla-LaBarca ML, Liszewski MK, Lambris JD, Hourcade D, Atkinson JP. 2002: Role of membrane cofactor protein (CD46) in regulation of C4b and C3b deposited on cells. *J Immunol.*; 168(12):6298-304.

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

Casasnovas JM, Larvie M, Stehle T. 1999: Crystal structure of two CD46 domains reveals an extended measles virus-binding surface. *EMBO J.*; 18(11):2911-22.

Cervoni F, Oglesby TJ, Adams EM, Milesifluet C, Nickells M, Fenichel P, Atkinson JP, Hsi BL. 1992: Identification and characterization of membrane cofactor protein of human spermatozoa. *J Immunol.*; 148(5):1431-7.

Cole JL, Housley GA Jr, Dykman TR, MacDermott RP, Atkinson JP. 1985: Identification of an additional class of C3-binding membrane proteins of human peripheral blood leukocytes and cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 82(3):859-63.

Dalmaso AP, Vercellotti GM, Fischel RJ, Bolman RM, Bach FH, Platt JL. 1992: Mechanism of complement activation in the hyperacute rejection of porcine organs transplanted into primate recipients. *Am J Pathol.*; 140(5):1157-66.

De Jonge CJ, Barratt CL, Radwanska E, Cooke ID. 1993: The acrosome reaction-inducing effect of human follicular and oviductal fluid. *J Androl.*;14(5):359-65.

D'Souza-Schorey C, Boettner B, Van Aelst L. 1998: Rac regulates integrin-mediated spreading and increased adhesion of T lymphocytes. *Mol Cell Biol.*;18(7):3936-46.

Foster JA, Friday BB, Maulit MT, Blobel C, Winfrey VP, Olson GE, Kim KS, Gerton GL. 1997: AM67, a secretory component of the guinea pig sperm acrosomal matrix, is related to mouse sperm protein sp56 and the complement component 4-binding proteins. *J Biol Chem.*;272(19):12714-22.

- Fugier-Vivier I, Servet-Delprat C, Rivaille P, Rissoan MC, Liu YJ, Roubourdin-Combe C. 1997: Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. *J Exp Med.*; 186(6):813-23.
- Galili U, Buehler J, Shohet SB, Macher BA. 1987: The human natural anti-Gal IgG. III. The subtlety of immune tolerance in man as demonstrated by crossreactivity between natural anti-Gal and anti-B antibodies. *J Exp Med.*; 165(3):693-704.
- Gomendio M, Martin-Coello J, Crespo C, Magana C, Roldan ER. 2006: Sperm competition enhances functional capacity of mammalian spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;103(41):15113-7.
- Harris CL, Mizuno M, Morgan BP. 2006: Complement and complement regulators in the male reproductive system. *Mol Immunol.*;43(1-2):57-67.
- Hess RA. 1990: Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes. *Biol Reprod.*;43(3):525-42.
- Hickox JR, Bi M, Hardy DM. 2001: Heterogeneous processing and zona pellucida binding activity of pig zonadhesin. *J Biol Chem.* 2001 Nov 2;276(44):41502-9.
- Honda A, Siruntawineti J, Baba T. 2002: Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions. *Hum Reprod Update.*;8(5):405-12.
- Howard J, Justus DE, Totmenin AV, Shchelkunov S, Kotwal GJ. 1998: Molecular mimicry of the inflammation modulatory proteins (IMPs) of poxviruses: evasion of the inflammatory response to preserve viral habitat. *J Leukoc Biol.*; 64(1):68-71.
- Hsu EC, Dorig RE, Sarangi F, Marcil A, Iorio C, Richardson CD. 1997: Artificial mutations and natural variations in the CD46 molecules from human and monkey cells define regions important for measles virus binding. *J Virol.*; 71(8):6144-54.
- Inoue N, Ikawa M, Nakanishi T, Matsumoto M, Nomura M, Seya T, Okabe M. 2003: Disruption of mouse CD46 causes an accelerated spontaneous acrosome reaction in sperm. *Mol Cell Biol.*;23(7):2614-22.
- Jaiswal BS, Eisenbach M, Tur-Kaspa I. 1999: Detection of partial and complete acrosome reaction in human spermatozoa: which inducers and probes to use? *Mol Hum Reprod.*;5(3):214-9.
- Jungnickel MK, Marrero H, Birnbaumer L, Lemos JR, Florman HM. 2001: Trp2 regulates entry of Ca²⁺ into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat Cell Biol.*;3(5):499-502.
- Kallstrom H, Blackmer Gill D, Albiger B, Liszewski MK, Atkinson JP, Jonsson AB. 2001: Attachment of *Neisseria gonorrhoeae* to the cellular pilus receptor CD46: identification of domains important for bacterial adherence. *Cell Microbiol.*;3(3):133-43.
- Kallstrom H, Islam MS, Berggren PO, Jonsson AB. 1998: Cell signaling by the type IV pili of pathogenic *Neisseria*. *J Biol Chem.*;273(34):21777-82.

- Kallstrom H, Liszewski MK, Atkinson JP, Jonsson AB. 1997: Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol.*;25(4):639-47.
- Kemper C, Chan AC, Green JM, Brett KA, Murphy KM, Atkinson JP. 2003: Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature.*;421(6921):388-92.
- Kemper C, Leung M, Stephensen CB, Pinkert CA, Liszewski MK, Cattaneo R, Atkinson JP. 2001: Membrane cofactor protein (MCP; CD46) expression in transgenic mice. *Clin Exp Immunol.*; 124(2):180-9.
- Kim KS, Foster JA, Gerton GL. 2001: Differential release of guinea pig sperm acrosomal components during exocytosis. *Biol Reprod.*;64(1):148-56.
- Kojima A, Iwata K, Seya T, Matsumoto M, Ariga H, Atkinson JP, Nagasawa S. 1993: Membrane cofactor protein (CD46) protects cells predominantly from alternative complement pathway-mediated C3-fragment deposition and cytolysis. *J Immunol.*; 151(3):1519-27.
- Le Naour F, Rubinstein E, Jasmin C, Prenant M, Boucheix C. 2000: Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science.*;287(5451):319-21.
- Lee SW, Bonnah RA, Higashi DL, Atkinson JP, Milgram SL, So M. 2002: CD46 is phosphorylated at tyrosine 354 upon infection of epithelial cells by *Neisseria gonorrhoeae*. *J Cell Biol.*;156(6):951-7.
- Li B, Sallee C, Dehoff M, Foley S, Molina H, Holers VM. 1993: Mouse Crry/p65. Characterization of monoclonal antibodies and the tissue distribution of a functional homologue of human MCP and DAF. *J Immunol.*; 151(8):4295-305.
- Lin Y, Mahan K, Lathrop WF, Myles DG, Primakoff P. 1994: A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J Cell Biol.*;125(5):1157-63.
- Liszewski MK, Atkinson JP. 1996: Membrane cofactor protein (MCP; CD46). Isoforms differ in protection against the classical pathway of complement. *J Immunol.*; 156(11):4415-21.
- Liszewski MK, Leung M, Cui W, Subramanian VB, Parkinson J, Barlow PN, Manchester M, Atkinson JP. 2000: Dissecting sites important for complement regulatory activity in membrane cofactor protein (MCP; CD46). *J Biol Chem.*; 275(48):37692-701.
- Liszewski MK, Leung MK, Atkinson JP. 1998: Membrane cofactor protein: importance of N- and O-glycosylation for complement regulatory function. *J Immunol.*; 161(7):3711-8.
- Liszewski MK, Post TW, Atkinson JP. 1991: Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol.*; 9:431-55.

Liszewski MK, Tedja I, Atkinson JP. 1994: Membrane cofactor protein (CD46) of complement. Processing differences related to alternatively spliced cytoplasmic domains. *J Biol Chem.*; 269(14):10776-9.

Lozahic S, Christiansen D, Manie S, Gerlier D, Billard M, Boucheix C, Rubinstein E. 2000: CD46 (membrane cofactor protein) associates with multiple beta1 integrins and tetraspans. *Eur J Immunol.*;30(3):900-7.

Lu Q, Shur BD. 1997: Sperm from beta 1,4-galactosyltransferase-null mice are refractory to ZP3-induced acrosome reactions and penetrate the zona pellucida poorly. *Development.*;124(20):4121-31.

Lublin DM, Liszewski MK, Post TW, Arce MA, Le Beau MM, Rebentisch MB, Lemons LS, Seya T, Atkinson JP. 1988: Molecular cloning and chromosomal localization of human membrane cofactor protein (MCP). Evidence for inclusion in the multigene family of complement-regulatory proteins. *J Exp Med.*; 168(1):181-94.

Maisner A, Alvarez J, Liszewski MK, Atkinson DJ, Atkinson JP, Herrler G. 1996: The N-glycan of the SCR 2 region is essential for membrane cofactor protein (CD46) to function as a measles virus receptor. *J Virol.*; 70(8):4973-7.

Malvoisin E, Wild TF. 1993: Measles virus glycoproteins: studies on the structure and interaction of the haemagglutinin and fusion proteins. *J Gen Virol.*; 74 (Pt 11):2365-72.

Manchester M, Eto DS, Valsamakis A, Liton PB, Fernandez-Munoz R, Rota PA, Bellini WJ, Forthal DN, Oldstone MB. 2000: Clinical isolates of measles virus use CD46 as a cellular receptor. *J Virol.*; 74(9):3967-74.

Manchester M, Gairin JE, Patterson JB, Alvarez J, Liszewski MK, Eto DS, Atkinson JP, Oldstone MB. 1997: Measles virus recognizes its receptor, CD46, via two distinct binding domains within SCR1-2. *Virology.*; 233(1):174-84.

Manchester M, Valsamakis A, Kaufman R, Liszewski MK, Alvarez J, Atkinson JP, Lublin DM, Oldstone MB. 1995: Measles virus and C3 binding sites are distinct on membrane cofactor protein (CD46). *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 92(6):2303-7.

McGregor CG, Davies WR, Oi K, Teotia SS, Schirmer JM, Risdahl JM, Tazelaar HD, Kremers WK, Walker RC, Byrne GW, Logan JS. 2005: Cardiac xenotransplantation: recent preclinical progress with 3-month median survival. *J Thorac Cardiovasc Surg.*; 130(3):844-51.

Merz AJ, Enns CA, So M. 1999: Type IV pili of pathogenic *Neisseriae* elicit cortical plaque formation in epithelial cells. *Mol Microbiol.*;32(6):1316-32.

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

Mizuno M, Harris CL, Suzuki N, Matsuo S, Morgan BP. 2005: Expression of CD46 in developing rat spermatozoa: ultrastructural localization and utility as a marker of the various stages of the seminiferous tubuli. *Biol Reprod.*;72(4):908-15.

- Moore H, Dvorakova K, Jenkins N, Breed W. 2002: Exceptional sperm cooperation in the wood mouse. *Nature*.;418(6894):174-7.
- Morgan BP. 1999: Regulation of the complement membrane attack pathway. *Crit Rev Immunol.*; 19(3):173-98.
- Murakami Y, Seya T, Kurita M, Nagasawa S. 1996: Molecular cloning of a complementary DNA for a membrane cofactor protein (MCP, CD46)/measles virus receptor on Vero cells and its functional characterization. *Biol Pharm Bull.*; 19(12):1541-5.
- Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, Roubourdin-Combe C, Gerlier D. 1993: Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol.*; 67(10):6025-32.
- Nielsen CH, Fischer EM, Leslie RG. 2000: The role of complement in the acquired immune response. *Immunology.*; 100(1):4-12.
- Nishimura H, Cho C, Branciforte DR, Myles DG, Primakoff P. 2001: Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin beta. *Dev Biol.*;233(1):204-13.
- Okabe M, Nagira M, Kawai Y, Matzno S, Mimura T, Mayumi T. 1990: A human sperm antigen possibly involved in binding and/or fusion with zona-free hamster eggs. *Fertil Steril.*;54(6):1121-6.
- Okada N, Liszewski MK, Atkinson JP, Caparon M. 1995: Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A streptococcus. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 92(7):2489-93.
- O'Toole CM, Arnoult C, Darszon A, Steinhardt RA, Florman HM. 2000: Ca(2+) entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell.*;11(5):1571-84.
- Penninger JM, Crabtree GR. 1999: The actin cytoskeleton and lymphocyte activation. *Cell.*;96(1):9-12.
- Post TW, Liszewski MK, Adams EM, Tedja I, Miller EA, Atkinson JP. 1991: Membrane cofactor protein of the complement system: alternative splicing of serine/threonine/proline-rich exons and cytoplasmic tails produces multiple isoforms that correlate with protein phenotype. *J Exp Med.*; 174(1):93-102.
- Primakoff P, Myles DG. 2000: The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet.*;16(2):83-7.
- Rankin T, Familiar M, Lee E, Ginsberg A, Dwyer N, Blanchette-Mackie J, Drago J, Westphal H, Dean J. 1996: Mice homozygous for an insertional mutation in the Zp3 gene lack a zona pellucida and are infertile. *Development.*;122(9):2903-10.

- Rankin TL, Tong ZB, Castle PE, Lee E, Gore-Langton R, Nelson LM, Dean J. 1998: Human ZP3 restores fertility in Zp3 null mice without affecting order-specific sperm binding. *Development.*;125(13):2415-24.
- Riley RC, Kemper C, Leung M, Atkinson JP. 2002: Characterization of human membrane cofactor protein (MCP; CD46) on spermatozoa. *Mol Reprod Dev.*;62(4):534-46.
- Riley RC, Tannenbaum PL, Abbott DH, Atkinson JP. 2002: Cutting edge: inhibiting measles virus infection but promoting reproduction: an explanation for splicing and tissue-specific expression of CD46. *J Immunol.*;169(10):5405-9.
- Romanovský A. 1982: Rozmnožování, ontogeneze a biologie vývoje živočichů. SPN Praha
- Santoro F, Kennedy PE, Locatelli G, Malnati MS, Berger EA, Lusso P. 1999: CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell.*; 99(7):817-27.
- Serrador JM, Nieto M, Sanchez-Madrid F. 1999: Cytoskeletal rearrangement during migration and activation of T lymphocytes. *Trends Cell Biol.*;9(6):228-33.
- Seya T, Atkinson JP. 1989: Functional properties of membrane cofactor protein of complement. *Biochem J.*; 264(2):581-8.
- Seya T, Hara T, Matsumoto M, Kiyohara H, Nakanishi I, Kinouchi T, Okabe M, Shimizu A, Akedo H. 1993: Membrane cofactor protein (MCP, CD46) in seminal plasma and on spermatozoa in normal and "sterile" subjects. *Eur J Immunol.*;23(6):1322-7.
- Seya T, Kurita M, Iwata K, Yanagi Y, Tanaka K, Shida K, Hatanaka M, Matsumoto M, Jun S, Hirano A, Ueda S, Nagasawa S. 1997: The CD46 transmembrane domain is required for efficient formation of measles-virus-mediated syncytium. *Biochem J.*; 322 (Pt 1):135-44.
- Seya T, Nomura M, Murakami Y, Begum NA, Matsumoto M, Nagasawa S. 1998: CD46 (membrane cofactor protein of complement, measles virus receptor): structural and functional divergence among species (review). *Int J Mol Med.*; 1(5):809-16.
- Seya T, Turner JR, Atkinson JP. 1996: Purification and characterization of a membrane protein (gp45-70) that is a cofactor for cleavage of C3b and C4b. *J Exp Med.*; 163(4):837-55.
- Schnorr JJ, Dunster LM, Nanan R, Schneider-Schaulies J, Schneider-Schaulies S, ter Meulen V. 1995: Measles virus-induced down-regulation of CD46 is associated with enhanced sensitivity to complement-mediated lysis of infected cells. *Eur J Immunol.*; 25(4):976-84.
- Simpson KL, Holmes CH. 1994: Differential expression of complement regulatory proteins decay-accelerating factor (CD55), membrane cofactor protein (CD46) and CD59 during human spermatogenesis. *Immunology.*; 81(3):452-61.
- Sundstrom SA, Komm BS, Ponce-de-Leon H, Yi Z, Teuscher C, Lyttle CR. 1989: Estrogen regulation of tissue-specific expression of complement C3. *J Biol Chem.*; 264(28):16941-7.

- Swanson J. 1973: Studies on gonococcus infection. IV. Pili: their role in attachment of gonococci to tissue culture cells. *J Exp Med.*;137(3):571-89.
- Taylor CT, Biljan MM, Kingsland CR, Johnson PM. 1994: Inhibition of human spermatozoon-oocyte interaction in vitro by monoclonal antibodies to CD46 (membrane cofactor protein). *Hum Reprod.*;9(5):907-11.
- Taylor CT, Johnson PM. 1996 Complement-binding proteins are strongly expressed by human preimplantation blastocysts and cumulus cells as well as gametes. *Mol Hum Reprod.*;2(1):52-9.
- Toyomura K, Fujimura T, Murakami H, Natsume T, Shigehisa T, Inoue N, Takeda J, Kinoshita T. 1997: Molecular cloning of a pig homologue of membrane cofactor protein (CD46). *Int Immunol.*; 9(6):869-76.
- Tsujimura A, Shida K, Kitamura M, Nomura M, Takeda J, Tanaka H, Matsumoto M, Matsumiya K, Okuyama A, Nishimune Y, Okabe M, Seya T. 1998: Molecular cloning of a murine homologue of membrane cofactor protein (CD46): preferential expression in testicular germ cells. *Biochem J.*; 330 (Pt 1):163-8.
- Wang G, Liszewski MK, Chan AC, Atkinson JP. 2000: Membrane cofactor protein (MCP; CD46): isoform-specific tyroxine phosphorylation. *J. Immunol.*; 164(4):1839-46.
- Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. 2001: A profile of fertilization in mammals. *Nat Cell Biol.*;3(2):E59-64.
- Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. 2004: Mouse zona pellucida genes and glycoproteins. *Cytogenet Genome Res.*;105(2-4):228-34.
- Wong TC, Yant S, Harder BJ, Korte-Sarfaty J, Hirano A. 1997: The cytoplasmic domains of complement regulatory protein CD46 interact with multiple kinases in macrophages. *J Leukoc Biol.*;62(6):892-900.
- Yamada KM, Geiger B. 1997: Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol.*;9(1):76-85.
- Yanagimachi R. 1994: Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote.*;2(4):371-2.
- Yant S, Hirano A, Wong TC. 1997: Identification of a cytoplasmic Tyr-X-X-Leu motif essential for down regulation of the human cell receptor CD46 in persistent measles virus infection. *J Virol.*; 71(1):766-70.
- Zaffran Y, Destaing O, Roux A, Ory S, Nheu T, Jurdic P, Roubardin-Combe C, Astier AL. 2001: CD46/CD3 costimulation induces morphological changes of human T cells and activation of Vav, Rac, and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase. *J Immunol.*;167(12):6780-5.

