

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Veronika Foldynová

**Role integrinů během přípravy gamet
k oplození a jejich vzájemné interakce**

Role of integrins in gametes prior to fertilization
and during their interaction

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Kateřina Komrsková, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Michaela Frolíková, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů. Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle §60 odst. 1 autorského zákona.

V dne

Podpis autora

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí své bakalářské práce, RNDr. Kateřině Komrskové, Ph.D. a konzultantce RNDr. Michaelae Frolíkové, Ph.D, za jejich cenné rady, veškeré připomínky, vstřícný přístup a trpělivost, kterou mi během psaní věnovaly. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svému příteli a rodině za podporu během celého studia.

Abstrakt

Integriny jsou heterodimerní transmembránové glykoproteiny, které představují velkou skupinu receptorů buněčné adheze podílející se na interakcích buněk, buňky a extracelulární matrix a interakcích buňky s patogenem. V současné době je u savců známo 24 různých integrinových heterodimerů. Podílejí se na široké škále procesů jako je imunitní odpověď, řízená migrace lymfocytů, agregace krevních destiček, také při hojení ran, buněčné diferenciaci, migraci, proliferaci a samotném přežití buněk. Integriny byly detekovány i na germinálních buňkách a dnes je známé, že hrají důležitou roli i v reprodukčních procesech jako je oplození, implantace embrya a embryonální vývoj. Hlavní náplní této bakalářské práce je seznámení s integriny z pohledu reprodukce, fyziologie integrinů, výskytu a lokalizace jednotlivých podjednotek u samčích a samičích gamet savců. Významná část práce je věnována diskuzi role integrinů u gamet, a to jak během maturačních procesů (dozrávání vajíčka ve vaječniku, kapacitaci a akrozomální reakce spermie), tak i při migraci spermie, tvorbě ovidukálního rezervoáru i jejich přímé a nepřímé zapojení do vazby a fúze gamet při oplození.

Klíčová slova: integriny, spermie, vajíčko, fúze, oplození

Abstract

Integrins are heterodimeric transmembrane glycoproteins that represent a large group of cell adhesion receptors involved in cell-cell, cell-extracellular matrix and cell-pathogen interactions. Up to now, 24 different integrin heterodimers have been detected in mammals. They are involved in a wide range of processes such as immune response, lymphocyte homing, platelet aggregation, also in wound healing, cell differentiation, migration, proliferation and even in cell survival. Integrins have also been detected on germ cells and are now known to play an important role in reproductive processes such as fertilization, embryo implantation, and embryonic development. The main aim of this thesis is to introduce integrins from the perspective of reproduction, integrin physiology, occurrence and localization of individual subunits in male and female germ cells. A significant part of the work is devoted to a discussion of the role of integrins in gametes, both during maturation processes (egg maturation in the ovary, capacitation and the acrosomal reaction of sperm), in sperm migration, oviductal reservoir formation and their direct and indirect involvement in adhesion and fusion of the gametes during fertilization.

Keywords: integrins, sperm, egg, fusion, fertilization

Obsah

Seznam obrázků	2
Seznam tabulek	2
Úvod	3
1 Integriny	4
1.1 Struktura integrinů	5
1.2 Integriny v gametách	6
2 Role integrinů v reprodukci savců	11
2.1 Integriny jako součást ovidukálního rezervoáru spermií	12
2.2 Integriny v interakci ovidukální tekutiny a spermií	13
2.3 Role integrinů při reorganizaci a stabilitě membrán	15
2.4 Integriny při organizaci proteinových komplexů	17
3 Role integrinů při fúzi gamet	20
3.1 Integriny jako sekundární receptor IZUMO1	24
3.2 Integriny jako vazebný partner SPACA6 na spermii	25
Závěr	26
Seznam použité literatury	28
A Přílohy	39
A.1 Ligandy lidských integrinů	39

Seznam obrázků

1.1	Domény podjednotek α a β obsahujících I doménu.	5
1.2	Integrinové rodiny vyšších obratlovců	7
1.3	Rozložení integrinů na hlavičce spermie myši	7
2.1	Interakce membrán spermie a oviduktozomu.	14
2.2	Schématické znázornění interakce gamet.	16
2.3	Model aktivovaných stavů integrinových heterodimerů α/β	19
3.1	Hypotetický model adheze/fúze savčích gamet.	24

Seznam tabulek

1.1	Integrinové podjednotky detekované u gamet savců.	8
A.1	Ligandy lidských integrinů.	39

Úvod

Reprodukce savců představuje komplexní proces, který na molekulární úrovni zahrnuje řadu řízených a kontrolovaných dějů předcházejících úspěšnému splynutí spermie a vajíčka, vzniku diploidní zygoty a vytvoření nového jedince. Zatímco maturační procesy vajíčka probíhají před ovulací a jsou dokončeny až po oplození, maturace spermie probíhá průběžně v samčím a následně i samičím pohlavním traktu. Během cesty do místa oplození interaguje spermie se somatickými buňkami tvořící epitel samčího i samičího pohlavního traktu, složkami reprodukčních tekutin především prostřednictvím mikrovezikulů a exozómů, ale také s molekulami extracelulární matrix vajíčka, a nakonec i s plazmatickou membránou samotné samičí germinální buňky.

Do těchto dějů je zapojeno mnoho molekul, které tvoří u obou germinálních buněk proteinové sítě. Základ takovýchto rozsáhlých a komplexních sítí zajišťují především membránové glykoproteiny tetraspaniny a také membránové receptory buněčné adheze integriny, které jsou stěžejním zaměřením této bakalářské práce. Integriny, které jsou transmembránové proteiny, se nacházejí u téměř všech typů somatických buněk mnohých živočichů včetně savců (Humphries, 2000)*¹. Jedná se o heterodimery podjednotek α a β spojeny nekovalentní vazbou a jejich funkce je zcela esenciální pro mnoho buněčných procesů jako je buněčná diferenciace, migrace, proliferace, spojení buněk, hojení ran a také jsou klíčové i pro imunologické funkce (Takada a kol., 2007)*. Integriny detekujeme také na germinálních buňkách, kde hrají významnou roli během reprodukčních procesů živočichů a kroků nezbytných k úspěšné fúzi gamet.

Hlavním cílem této bakalářské práce je diskuze recentní literatury v oblasti fyziologie integrinů u samčích i samičích gamet. Tato práce na jednom místě čtenáři v ucelené formě předkládá doposud získané poznatky o roli integrinů v průběhu přípravy spermie a vajíčka k oplození a během jejich fúze. Součástí práce je i přehledné shrnutí informací o přítomnosti jednotlivých integrinových podjednotek a heterodimerů v gametách, mimo jiné ve formě originální tabulky s referencemi na původní práce. V práci je kladen důraz na interakce integrinů s cytoskeletem a s extracelulární matrix, které jsou diskutovány v kontextu nejnovějších poznatků.

¹Hvězdičkou jsou v této práci označena review.

1. Integriny

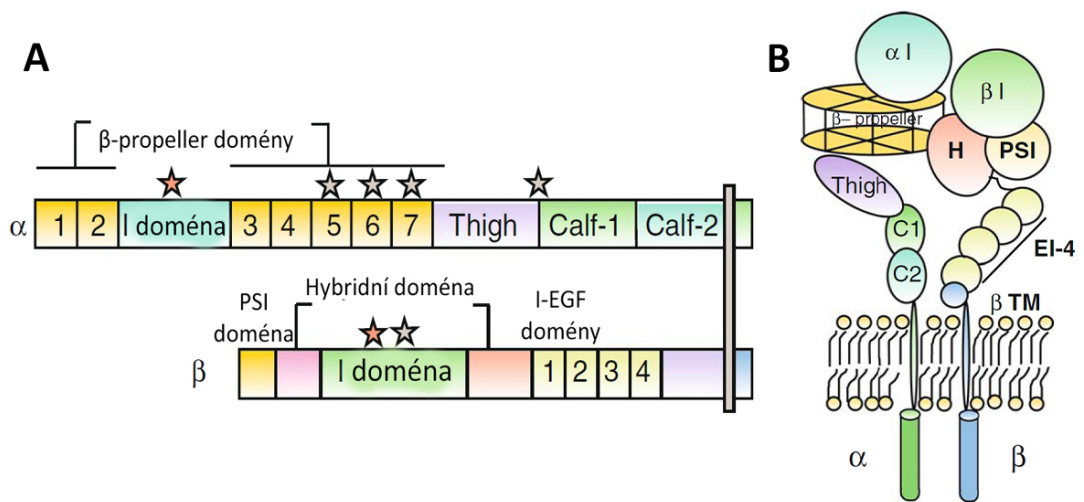
Integriny představují superrodinu molekul buněčné adheze, které zprostředkovávají interakce mezi buňkami, mezi buňkou a extracelulární matrix a také interakci buňky s patogenem. Jedná se o transmembránové molekuly přenášející obousměrně signály přes plazmatickou membránu. Tyto dva děje, intracelulární signalizace a buněčná adheze, mají klíčový podíl na úspěšném oplození vajíčka spermií. Integriny se váží na širokou škálu ligandů včetně molekul extracelulární matrix, nebo proteinů patřících do imunoglobulinové superrodiny (Takada a kol., 2007)* a účastní se mnoha základních buněčných procesů jako je buněčná diferenciaci, migrace, proliferace, spojení buněk či samotné buněčné přežití (Luo a Springer, 2006)*. Integriny regulují také mnoho biologických funkcí včetně hojení ran, jsou důležité pro imunologické funkce (Takada a kol., 2007)* a v neposlední řadě se jedná o jedny ze stěžejních proteinů v reprodukčních procesech živočichů jako je oplození, embryonální vývoj a implantace embrya.

Integriny jsou velké, transmembránové heterodimery nekovalentně asociovaných podjednotek α a β , které jsou zcela esenciální pro existenci živočichů. Integriny nalézáme téměř na všech typech buněk u mnohých kmenů od houbovců po strunatce (Humphries, 2000)*.

Různé integrinové receptory jsou schopny se vázat k různým ligandům (tabulka A.1), na základě jejich heterodimerické struktury a signálů zevnitř buněk (Takada a kol., 2007)*. Savčí integriny mohou být široce seskupeny do laminin-vázajících integrinů ($\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha7\beta1$ a $\alpha6\beta4$), integrinů kolagen-vázajících ($\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$, $\alpha10\beta1$ a $\alpha11\beta1$), integrinů leukocytů ($\alpha L\beta2$, $\alpha M\beta2$, $\alpha X\beta2$ a $\alpha D\beta2$) a dále integrinů rozpoznávajících RGD (tripeptid Arginin-Glycin-Aspartát; R = Arginin, G = Glycin, D = Aspartát) sekvence ($\alpha5\beta1$, $\alpha V\beta1$, $\alpha V\beta3$, $\alpha V\beta5$, $\alpha V\beta6$, $\alpha V\beta8$ a $\alpha IIb\beta3$), která se například vyskytuje ve struktuře fibronektinu a vitronektinu.

Expresí specifických integrinových podjednotek a jejich množstvím na povrchu buněk se mění jejich adhezivní a signalizační vlastnosti. Ke změnám ve funkci integrinů může docházet také dynamicky bez změny jejich exprese, a to na základě vnitrobuněčné signalizace (signalizace *inside-out*; Ginsberg a kol., 1992)*.

Prostřednictvím integrinové aktivace dochází k reverzibilním změnám extracelulárních domén heterodimerů (natažením do prostoru), což výrazně ovlivňuje afinitu k jejich ligandům (Calderwood, 2004)*. Ke změnám ve vazebných schopnostech buňky k extracelulární matrix může docházet také prostřednictvím změn v rozložení integrinů na povrchu, shlukováním či laterální difúzí a reorganizací cytoskeletu (Hogg a kol., 2002)*. Tyto mechanismy



Obrázek 1.1: A: Znárodnění domén podjednotek α a β obsahujících I doménu. Hvězdičky označují místa vazby kationtů. B: Znárodnění uspořádní domén v integrinech obsahujících α I doménu. Převzato a přeloženo z Barczyk a kol. (2010)*.

mohou fungovat i současně, např. aktivace integrinů prostřednictvím vazby ligandu může také indukovat shlukování heterodimerů (Isenberg a kol., 1987), což může hrát roli například během vazby a fúze gamet.

1.1 Struktura integrinů

Jak už bylo zmíněno, integriny jsou heterodimery nekovalentně asociovaných podjednotek α a β (Hynes, 2002)*. K heterodimerizaci integrinu dochází intracelulárně ještě před transportem na buněčný povrch (Campbell a Humphries, 2011)*. Volné α a β podjednotky tedy na buněčném povrchu neexistují, vždy se zde nacházejí ve formě heterodimeru.

Podjednotky α a β jsou složeny z několika flexibilně propojených domén (obrázek 1.1A). Většina samotného proteinu se nachází mimo buňku (extracelulární část), ale obě podjednotky procházejí plazmatickou membránou v podobě jednoduché, membránou prostupující šroubovice, a končí obvykle krátkými nestrukturovanými cytoplazmatickými konci. Velikost jednotlivých podjednotek se liší, ale obvykle α i β podjednotka obsahují okolo 750 až 1000 aminokyselin (Campbell a Humphries, 2011)*.

Ektodomény integrinových podjednotek hrají důležitou roli při vazbě ke komponentům extracelulární matrix i k dalším receptorům na povrchu stejné nebo jiné buňky, v přenosu signálů a jsou taky zodpovědné za heterodimerizaci integrinů (Luo a Springer, 2006)*. U α podjednotky se její extracelulární část skládá ze čtyř nebo pěti domén, v případě podjednotky β ze sedmi domén, které dohromady vytváří strukturu „nohy“ podepírající

„hlavu“ (Barczyk a kol., 2010, obrázek 1.1B)*.

Do vnitřního prostoru buňky jsou natažené cytoplazmatické konce integrinových podjednotek, které navazují na membránou procházející helixy. Cytoplazmatické konce obvykle bývají kratší než 75 aminokyselin. Výjimkou je cytoplazmatický konec podjednotky $\beta 4$, který je dlouhý okolo 1000 aminokyselin, což má význam i pro reprodukci (Dickinson a kol., 1994).

Tyto části podjednotek jsou schopné aktivně vytvářet vazby (Shoemaker a kol., 2000), a také iniciují sestavení velkých signalizačních komplexů, které hrají při oplození důležitou roli (Campbell a Humphries, 2011)*. Využívají k tomu několik proteinů jako např. talin, který se váže na aktinová filamenta, a tak tvoří spojení s cytoskeletem, které je klíčové pro většinu, ne-li pro všechny integriny zprostředkované funkce (Wegener a kol., 2007). Na druhou stranu, odlišná struktura $\beta 4$ podjednotky umožňuje vazbu kromě aktinu či tubulinu, také na intermediální filamenta (obrázek 1.3B), důležitou např. pro stabilitu membrán spermie během akrozomální reakce (kapitola 2.3).

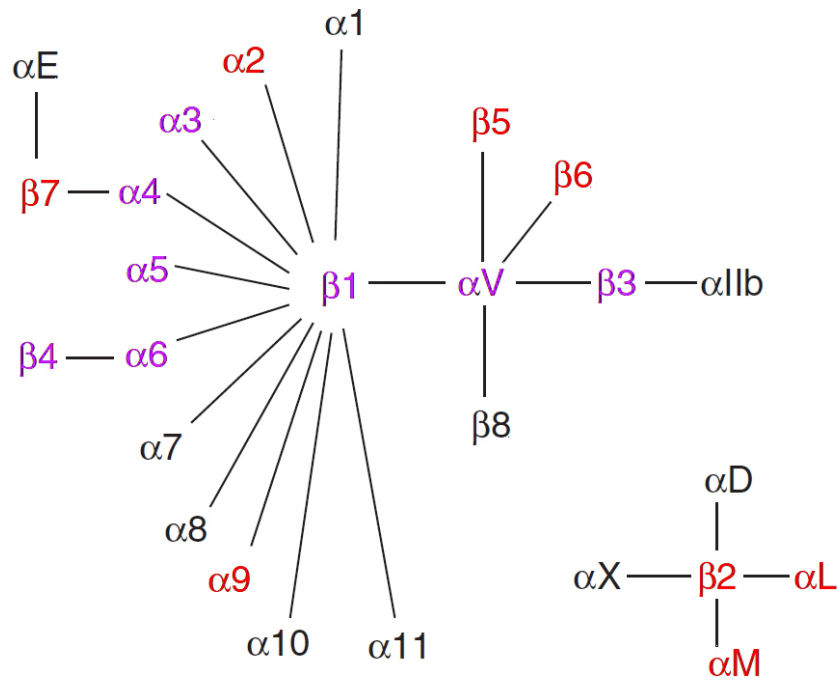
1.2 Integriny v gametách

U obratlovců bylo doposud objeveno 18 α a 8 β podjednotek, které se mohou sestavit do 24 různých receptorů (obrázek 1.2) s různými vazebnými vlastnostmi (Hynes, 2002; Barczyk a kol., 2010)*. Některé integriny jsou široce rozšířené na různých typech buněk, jiné jsou zase omezeny na konkrétní typ buněčné tkáně.

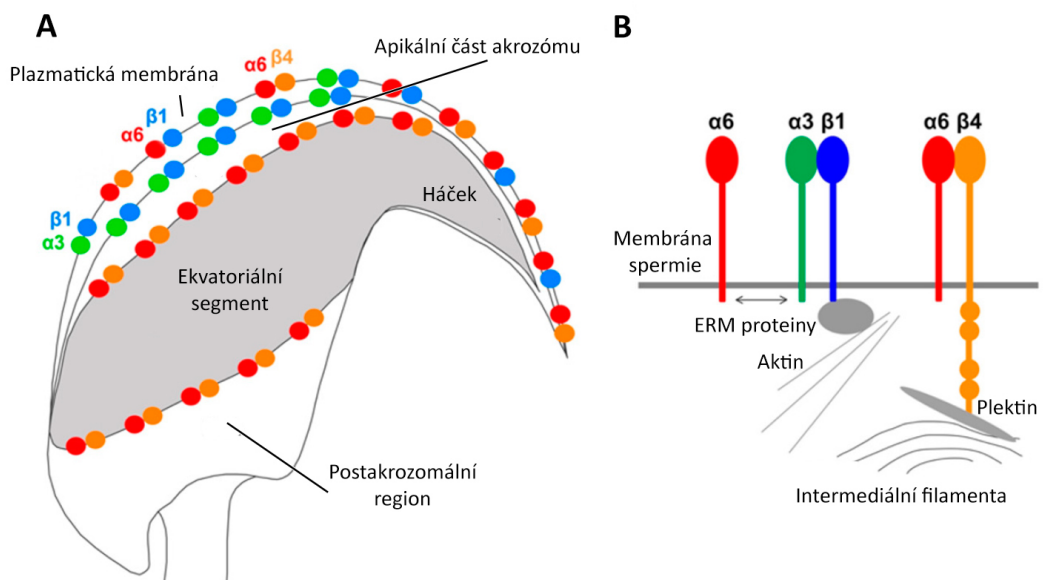
Integriny jsou přítomné rovněž v germinálních buňkách (vyznačené barevně na obrázku 1.2). Do současnosti bylo na vajíčku u savců identifikováno 9 α a 7 β podjednotek. U spermii bylo dosud nalezeno integrinových podjednotek výrazně méně (tabulka 1.1 a obrázek 1.2). Ne všechny integriny jsou lokalizovány v gametách ve stejných místech (Frolíková a kol., 2019), obrázek 1.3A například ukazuje rozložení některých integrinových heterodimerů v různých kompartmentech hlavičky spermie.

Na vajíčku jsou integriny součástí tzv. tetraspaninové sítě, kde interagují s dalšími proteiny a vytvářejí mezi nimi vazby (Jahn a kol., 2003; Satouh a kol., 2012), interagují s aktinovým cytoskeletem uvnitř vajíčka (např. Frolíková a kol., 2012) a v neposlední řadě jsou schopné vázat se k proteinům na povrchu spermie (Klínovska a kol., 2014)*.

Výzkumy z posledních let prokázaly přítomnost některých proteinů známých z tetraspaninových sítí vajíčka taktéž na spermii, proto můžeme předpokládat, že síť obdobná tetraspaninové síti na vajíčku se nachází i na spermii. Integriny se na spermii zapojují do procesu obousměrné signalizace během zrání spermii, akrozomální reakce, a dále se



Obrázek 1.2: Znázornění integrinové rodiny. Převzato z Takada a kol. (2007)*. U vyšších obratlovců (tedy včetně lidí) zahrnuje typicky 24 heterodimerů, vytvořených spojením podjednotek α a β . Fialovou barvou jsou označeny integrinové podjednotky, které byly potvrzeny na obou gametách. Červeně jsou označeny podjednotky doposud nalezené pouze na vajíčce, nikoliv na spermii. Pro reference viz tabulka 1.1.



Obrázek 1.3: A: Rozložení integrinových heterodimerů v různých částech hlavičky spermie myši. B: Schématické znázornění podjednotek v plazmatické membráně spermie a jejich interakce s proteiny a cytoskeletem buňky. Převzato a přeloženo z Frolíková a kol. (2019).

Tabulka 1.1: Integrinové podjednotky detekované u gamet savců s příklady referencí.

Vajíčko		Spermie	
Podjednotka	Reference	Podjednotka	Reference
$\alpha 2$	Campbell a kol. (1995)	$\alpha 3$	Glander a Schaller (1993)
$\alpha 3$	Tarone a kol. (1993)	$\alpha 4$	Glander a Schaller (1993)
$\alpha 4$	Campbell a kol. (1995)	$\alpha 5$	Fusi a kol. (1996)
$\alpha 5$	Fusi a kol. (1992)	$\alpha 6$	Glander a Schaller (1993)
$\alpha 6$	Fusi a kol. (1993)	αV	Fusi a kol. (1996)
$\alpha 9$	Stanton a Green (2001)	$\beta 1$	Glander a Schaller (1993)
αV	Fusi a kol. (1993)	$\beta 3$	Boissonnas a kol. (2010)
αM	Anderson a kol. (1993)	$\beta 4$	Glander a kol. (1998)
αL	Campbell a kol. (1995)		
$\beta 1$	Evans a kol. (1997)		
$\beta 2$	Anderson a kol. (1993)		
$\beta 3$	Almeida a kol. (1995)		
$\beta 4$	Campbell a kol. (1995)		
$\beta 5$	Almeida a kol. (1995)		
$\beta 6$	Sengoku a kol. (2004)		
$\beta 7$	Campbell a kol. (1995)		

účastní interakce spermie s epitelem a s vajíčkem (Frolíková a kol., 2019). Role integrinů v gametách savců je stěžejním předmětem zájmu této práce, vzhledem k tomu, že právě savcům se věnuje velká část výzkumů. Podrobně ji diskutujeme v kapitolách 2 a 3.

Kromě různých druhů savců integriny detekujeme i u dalších živočichů, např. u houby obrovské (*Geodia cydonium*) se vyskytuje 1 α a 1 β integrinová podjednotka (Pancer a kol., 1997), u *C. elegans* byly detekovány 2 α a 1 β podjednotka (Baum a Garriga, 1997), u octomilek dokonce 5 α a 2 β podjednotky integrinů (Adams a kol., 2000). V některých případech byly pozorované i integriny v gametách, a byla tedy zkoumána jejich role v reprodukci.

Velká pozornost je věnována ježovkám, zejména ježovce purpurové (*Strongylocentrotus purpuratus*), ale i ježovce proměnlivé (*Lyttechinus variegatus*). U obou druhů byly α i β podjednotky integrinů detekovány na vajíčkách, i v některých dalších vývojových stádiích (Marsden a Burke, 1997; Hertzler a McClay, 1999). Některé z detekovaných podjednotek jsou homologní s podjednotkami známými u savců, např. βG je podobná podjednotce $\beta 1$ (Marsden a Burke, 1997). U ježovky proměnlivé hraje zásadní strukturní roli při formování

kortikálního aktinového cytoskeletu oocyty integrin $\alpha\beta\gamma$ (Murray a kol., 2000; Burke a kol., 2004). Po oplození se tento integrin z povrchu vajíček během kortikální reakce odstraňuje. Množství integrinů exprimovaných na povrchu buněk následně znovu u obou zmiňovaných druhů narůstá během gastrulace, což naznačuje jejich roli v embryogenezi (Marsden a Burke, 1997; Hertzler a McClay, 1999; Susan a kol., 2000).

Mezi hojně studované živočichy patří i žáby, většina výzkumů se zaměřuje na drápatku vodní (*Xenopus laevis*), případně na ropuchu argentinskou (*Bufo arenarum*). Na plazmatické membráně vajíčka byly integriny u žab detekovány už během oogeneze (Gawantka a kol., 1992; Joos a kol., 1995; Müller a kol., 1993; Whittaker a DeSimone, 1993), u některých podjednotek následně dochází k internalizaci (např. $\beta 1$; Müller a kol., 1993), a tyto podjednotky se na povrch dostávají znovu během embryogeneze (DeSimone a Hynes, 1988; Müller a kol., 1993), podobně jako je tomu u ježovek. V případě ropuchy argentinské byly integriny (konkrétně podjednotka αV) detekovány i na spermii. Integriny na vajíčku u zmíněných druhů žab mají pravděpodobně roli při adhezi a fúzi spermie a vajíčka. Při inkubování vajíček s peptidy, které jsou schopny se na integriny vázat, zejména RGD peptidy, byla u drápatek pozorována snížena schopnost oplození (Mouguelar a kol., 2011). Role integrinů v procesu oplození u ropuch byla obdobně potvrzena v práci Coux a Cabada (2006). Nepřímý důkaz o zapojení integrinů do tohoto procesu vyplývá i z objevu vazebných partnerů integrinů, proteinů z rodiny ADAM (ang. *a disintegrin and metalloproteinase domain*) u drápatky vodní (Shilling a kol., 1997). ADAM proteiny jsou pravděpodobnými vazebnými partnery integrinů i u savců (viz kapitola 3). U drápatek byla také potvrzena zásadní role integrinů při gastrulaci (Whittaker a DeSimone, 1993). Obdobnou roli hrají integriny pravděpodobně i u jiných obojživelníků, např. u žebrovníků (Darribère a kol., 1990; Gawantka a kol., 1992).

Při oplození jsou integriny důležité i u korálnatců. U větevníků druhu *Acropora millepora* bylo pozorováno výrazné snížení schopnosti spermie vázat se na vajíčko v přítomnosti antiséra proti $\beta cn1$ podjednotce (Iguchi a kol., 2007). Obdobné integrinové podjednotky byly detekovány v gonádách i u *Nematostella vectensis* z řádu sasanek. I zde hrají pravděpodobně roli ve vazbě spermie a vajíčka (Gong a kol., 2014). U tohoto druhu byly navíc detekovány i homology ADAM proteinů (Nicholson a kol., 2005).

Důležitou roli v reprodukci a embryogenezi hrají integriny pravděpodobně i u hmyzu. U octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*) jsou tyto proteiny důležité během oogeneze (Negreiros a kol., 2010; Fernández-Miñán a kol., 2007; Meehan a kol., 2015; Cha a kol., 2017; Lovegrove a kol., 2019), např. $\beta 1$ integriny zabezpečují vazbu mezi folikulárními buňkami a komponenty extracelulární matrix (Meehan a kol., 2015; Lovegrove a kol.,

2019) nebo také správné zarovnání mitotického vřeténka (Fernández-Miñán a kol., 2007). Interagují také s jinými proteiny, např. s tenzinem (Cha a kol., 2017). Zásadní roli mají integriny také během embryonálního vývoje (Brown, 1993; Negreiros a kol., 2010). $\beta 1$ typ integrinů byl detekován také ve všech vývojových stádiích od vajíčka po tkáň dospělého jedince černopásky druhu *Helicoverpa assulta*, u které byl zatím potvrzen jejich vliv na embryonální vývoj (Park a kol., 2014). Obdobné integriny byly pozorovány u blýskavek druhů *Spodoptera litura* a *Spodoptera exigua* (Park a kol., 2014).

Integriny byly pozorovány i u dalších druhů. Jedna β a čtyři α podjednotky byly pozorovány u krevničky střešní (*Schistosoma mansoni*), β podjednotka byla detekována i v reprodukčních orgánech a má zde roli během oogeneze (v mitóze/meióze) i v reorganizaci cytoskeletu oocytu (Beckmann a kol., 2012). U *C. elegans* byla potvrzena role integrinů v embryonálním vývoji (Meighan a Schwarzbauer, 2014) a jsou také důležité pro správné ukotvení aktinového cytoskeletu ve spermatéce (Gettner a kol., 1995). Ve vajíčku i dalších stádiích nezmarovky masité (*Podocoryne carnea*) byla detekována jedna α a jedna β podjednotka, jejich funkce při reprodukci zatím není známa (Reber-Müller a kol., 2001).

Skutečnost, že integriny pozorujeme již v gametách jednoduchých kmenů živočichů např. u žahavců, ale i u komplexnějších organismů jako jsou strunatci (např. obojživelníci, nebo savci) naznačuje, že jejich role v reprodukci je evolučně vysoce konzervována. Zároveň je velmi pravděpodobné, že již v nejstarších organismech mají integriny obdobné vazebné partnery jako pozorujeme u savců, např. proteiny z rodiny ADAM.

2. Role integrinů v reprodukci savců

Savčí reprodukce je velice komplexní molekulární proces, zahrnující kaskádu kroků, během kterých prochází zúčastněné samčí i samičí gamety nevratnými změnami, bez kterých by k úspěšnému oplození nemohlo dojít.

Mnoho důležitých částí procesu maturace gamet, jako například kapacitace, akrozomální reakce či reorganizace membrán, ale i oplození, nevyjímajíc vzájemné rozpoznání spermie a vajíčka, jejich adhezi a následnou fúzi, jsou zprostředkované řadou vzájemných interakcí proteinů nacházejících se jak na vajíčku, tak na spermiích. Esenciální částí těchto sítí jsou integriny (Frolíková a kol., 2019).

Maturační procesy vajíčka jako oogeneze a folikulogeneze probíhají ve vaječníku a jsou ovlivněné okolním prostředím. Roli hrají komponenty extracelulární matrix (např. laminin, fibronectin, kolageny, různé glykoproteiny a proteoglykany), které jsou přítomné v membráně folikulu, granulózních buňkách i folikulární tekutině. Je velice pravděpodobné, že komunikaci dozrávajícího oocytu s komponenty extracelulární matrix zabezpečují integriny, které jsou na povrch vajíčka exprimovány již od stádia primárního oocytu (např. Zuccotti a kol., 1998).

Schopnost fúze se spermií vajíčka získávají již před uvolněním z folikulu (Zuccotti a kol., 1995). Po ovulaci je vajíčko uvolněno z vaječníku a zachyceno ústím vejcovodu. Z něho je pak vajíčko unášeno proudem ovidukální tekutiny, který je indukován pohybem řasinek epiteliálních buněk vejcovodu a kontrakcí hladké svaloviny (např. Gaddum-Rosse a Blandau, 1976; Miki a Clapham, 2013) do místa setkání se spermií - střední části vejcovodu zvané ampula (Suarez, 2015)*. Vajíčko je v této době zastaveno v metafázi II. až do doby oplození.

Na druhou stranu, už téměř 70 let je známo, že čerstvě ejakulovaná spermie není schopná proniknout do vajíčka (Chang, 1951; Austin, 1952). Aby byla savčí spermie schopná oplození, musí v samičím reprodukčním traktu projít důležitými kroky - fyziologickými změnami při procesu zvaném kapacitace a následnými morfologickými změnami při tzv. akrozomální reakci (Okabe, 2013)*. Integriny hrají v těchto procesech zásadní roli.

Při kapacitaci dochází ke změnám ve struktuře membrány spermie, zejména k efluxu cholesterolu, zvýšení její fluidity a propustnosti pro ionty, ke změnám v membránovém potenciálu (hyperpolarizaci) i zvýšení tyrozinové fosforylace proteinů (např. Cross, 2003; Suarez, 2016)*. Důležitým krokem je zde polymerizace aktinových vláken v kortikálním cytoskeletu, nacházejícím se mezi plazmatickou a vnější akrozomální membránou, čímž se brání jejich vzájemnému kontaktu do doby zahájení akrozomální reakce. Zároveň na svých místech udržuje řadu membránou procházejících proteinů (Brenner a kol., 2003). Pro správný průběh

kapacitace je nezbytné navázání spermií v oviduktálním rezervoáru a interakce s oviduktální tekutinou. Oba procesy jsou pravděpodobně zprostředkovány integriny.

Současně s kapacitací dochází ke změnám v pohybu spermie (hyperaktivaci), která zvyšuje její pohyblivost a napomáhá pohybu ve vejcovodu. Hyperaktivace je také důležitá pro průnik spermií přes vnější obaly vajíčka, kumulární buňky a tzv. *zona pellucida* (obrázek 2.2), glykoproteinový obal vajíčka (např. Lindemann a Kanous, 1989).

Vyvrcholením kapacitace je akrozomální reakce, která je započatá masivním vtokem vápenatých iontů přes plazmatickou membránu a zvýšením intracelulárního pH. Dochází také k aktivaci fosfatáz, které slouží k defosforylaci četných proteinů. V neposlední řadě dochází také k výrazné reorganizaci membrán.

2.1 Integriny jako součást oviduktálního rezervoáru spermií

Spermie se při sexuálním styku savců, pro které je typické vnitřní oplození, dostávají přímo do samičího reprodukčního traktu (vagíny, nebo dělohy v závislosti od druhu; Harper, 1982; Suarez, 2015)*. Pro setkání s vajíčkem musí spermie migrovat do místa oplození. Pouze zlomek ejakulovaných spermií (morfologicky nezávadných) se dostane až do vejcovodu (Suarez, 2015; Puga Molina a kol., 2018)*.

Ukazuje se, že úlohu při této selekci mohou sehrávat i různé proteiny jinak morofologicky nezávadných a normálně pohyblivých spermií (Suarez, 2016)*. Je možné, že roli zde hrají i integriny. Ty jsou totiž hlavními vazebnými partnery proteinů z rodiny ADAM (Ikawa a kol., 2010)* a experimenty na myších s chybějícími geny pro ADAM proteiny, především ADAM3 (Cho a kol., 1998; Yamaguchi a kol., 2012) poukazují na neschopnost takových spermií překonat uterotubulární spojení. I když konkrétní mechanismus není ještě znám, můžeme hypotetizovat, že se tak děje právě v důsledku neschopnosti vázat se na integriny oviduktu, které zde byly detekovány (Gabler a kol., 2003). Jelikož takové spermie mají i sníženou schopnost vazby na *zona pellucida* vajíčka (kapitola 2.3), je možné, že se v obou případech uplatňuje obdobný mechanismus (Ikawa a kol., 2010)*. Na druhou stranu, neschopnost překonat uterotubulární spojení vykazují i spermie s chybějícími geny pro další proteiny, např. kalmegin (Nakanishi a kol., 2004).

Když se spermie dostanou přes uterotubulární spojení, dochází k vazbě jejich hlavičky na epiteliální buňky v zúženém úseku vejcovodu (*isthmus*), vytváří se tzv. oviduktální rezervoár spermií (Suarez, 2016)*.

Molekulární podstata vazby spermií k epiteliálním buňkám oviduktu není doposud zcela jasná. Ukazuje se, že u jednotlivých druhů se může lišit, a zároveň i u konkrétního druhu

může být zprostředkována komplexem proteinových interakcí různých molekul (např. Lyons a kol., 2018). Mnohé studie naznačily, že vazba je zprostředkována glykany (např. Wagner a kol., 2002; Cortés a kol., 2004) a v některých případech monosacharidem fukózou (Lefebvre a kol., 1997). Nicméně se ukazuje, že by se na vazbě spermií k epiteliálním buňkám mohly podílet integriny.

Jedním z možných mechanismů je vazba fibronektinu, který je lokalizován na apikální části řasinkových buněk lidského oviduktu, a integrinu $\alpha 5\beta 1$, jehož přítomnost na povrchu spermií byla prokázána (Osycka-Salut a kol., 2017). Fibronektin se k integrinům váže prostřednictvím své RGD domény.

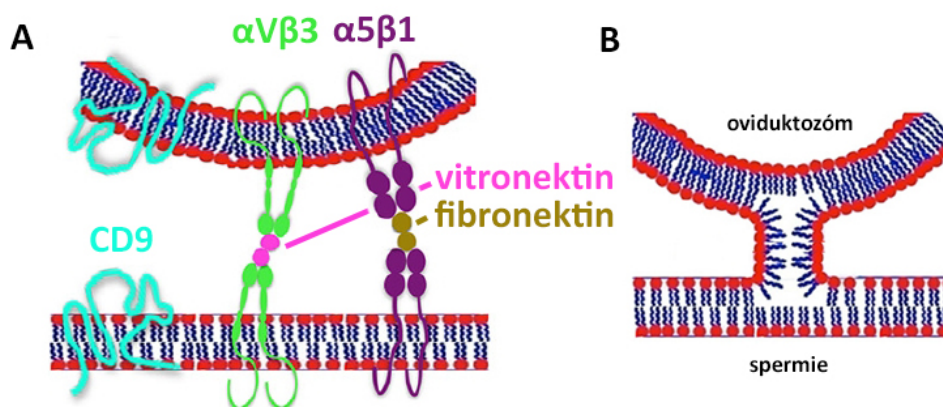
Je nutné dodat, že integriny byly detekovány také na povrchu řasinkových buněk oviduktu (např. αV , $\beta 3$ a $\beta 1$; Gabler a kol., 2003), a proto mohou být také do této interakce zapojeny. Tyto oviduktální integriny by se potencionálně mohly vázat na fibronektin lokalizovaný na spermiích (Lyons a kol., 2018).

Vedle integrinových interakcí byly na spermiích detekovány další molekuly, které se pravděpodobně do tohoto procesu také zapojují. Jedná se například o β -defenzin (Lyons a kol., 2018) anebo lektinu podobné molekuly jako je BSP (ang. *Binder of Sperm*; Igotz a kol., 2007). Zatímco pro β -defenzin je vazebný partner na epiteliálních buňkách neznámý, pro BSP jsou to anexiny. Mezi navrženými oviduktálními proteiny jsou také chaperony, ovšem jejich přesná funkce není doposud jasná (Boilard a kol., 2004).

Vazba spermie na epiteliální buňky vejcovodu prodlužuje jejich životnost regulací průběhu kapacity a ovlivněním motility spermie, a zabezpečuje synchronizaci maturace spermií a ovulace (Rodríguez-Martínez a kol., 2005). Tato vazba také umožňuje selekci spermií s nejlepší morfologií, a dále postupné uvolňování oplození schopných spermií, čímž se zvyšuje šance oplození, a zároveň snižuje pravděpodobnost polyspermie (Hunter a Leglise, 1971; Teijeiro a Marini, 2012). Intenzita uvolňování spermií narůstá v době ovulace. V důsledku interakce spermií se složkami oviduktální tekutiny (kapitola 2.2) dochází k iniciaci kapacity a k postupné ztrátě schopnosti vázat se na epiteliální buňky vejcovodu.

2.2 Integriny v interakci oviduktální tekutiny a spermií

Dalším důležitým procesem, kde zejména integriny společně s tetraspaniny (např. CD9 a CD81) hrají klíčovou roli, je interakce spermií se složkami oviduktální tekutiny. Je známo, že reprodukční tekutiny v samčím i samičím pohlavním traktu obsahují extracelulární váčky – mikrovezikly a exozómy. Jedná se o membránou obalené váčky sloužící pro přenos důležitých proteinů na povrch spermií během maturace v nadvarletech a následně v samičím pohlavním



Obrázek 2.1: A: Interakce membrán spermie a oviduktozómu prostřednictvím integrinových heterodimerů. B: Vytvoření hydrofilního póru a můstku. Bližší popis tohoto procesu uvádíme v textu. Převzato a upraveno podle Al-Dossary a kol. (2015).

traktu (např. Caballero a kol., 2011). Při navázání v oviduktním rezervoáru se spermie dostávají do kontaktu s váčky z oviduktní tekutiny, tzv. oviduktozomy (Al-Dossary a kol., 2013), obsahujícími velké množství proteinů (Ferraz a kol., 2019).

Na rozdíl od somatických buněk, kde k přenosu proteinů, peptidů, lipidů, DNA fragmentů a molekul RNA mezi extracelulárními váčky a recipientní buňkou dochází pomocí endocytózy anebo fúze membrán (Raposo a Stoorvogel, 2013)*, u spermií nedochází k endocytóze. Proto je primárním mechanismem pro přenos proteinů z oviduktozómů fúze (Schwarz a kol., 2013).

Zásadní roli integrinů při tomto fúzním procesu potvrdil výzkum Al-Dossary a kol. (2015), který studoval přítomnost, lokalizaci a roli molekuly CD9 a αV podjednotky integrinu $\alpha V\beta 3$ na myším modelu. Obě molekuly byly detekovány jednak na oviduktozómeh a také v regionech spermie, kde dochází ke kontaktu při fúzi (primárně hlavička a krček).

Studie zároveň ukázala, že fúze oviduktozómu s membránou spermie může být zablokována v přítomnosti ligandů (fibronektinu a vitronektinu) vázajících integriny $\alpha 5\beta 1$ a $\alpha V\beta 3$, přidáním peptidového řetězce Arg-Gly-Asp (RGD motiv) či protilátek proti αV podjednotce. To potvrzuje, že integriny hrají v tomto procesu zásadní roli.

Podle modelu Al-Dossary a kol. (2015) protein CD9 vytváří fúzní místo na membránách oviduktozómů i spermie (obrázek 2.1 A). V těchto místech se nacházejí také adhezivní proteiny - integriny $\alpha 5\beta 1$ a $\alpha V\beta 3$. Příslušné ligandy pro tyto integriny, fibronektin a vitronektin se váží ke svému aktivovanému receptoru, což zabezpečí přiblížení membrány spermie a oviduktozómu do takové vzdálenosti (menší než 0,5 nm; Kozlov a kol., 1989), že dojde

k elektrostatickému odpuzování polárních hlaviček lipidů v membránách. Toto odpuzování způsobí otevření vnější vrstvy membrán, a to vede k vytvoření hydrofilního fúzního póru mezi spermii a oviduktozómem pro dokončení fúze (obrázek 2.1 B).

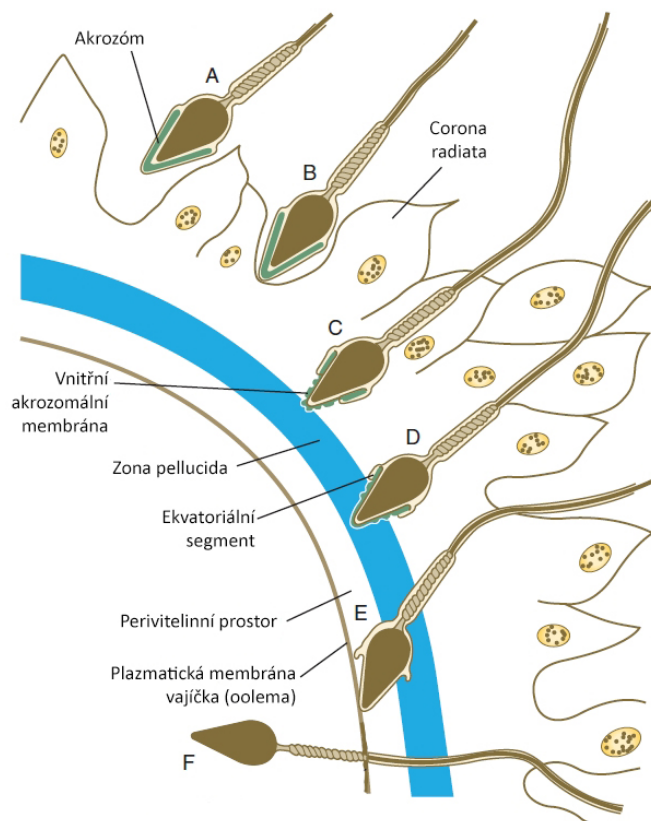
Taková interakce je důležitá například pro transport membránového proteinu Ca^{2+} ATPázy (PMCA4), sloužící pro přenos vápenatého iontu skrz plazmatickou membránu spermie (Wennemuth a kol., 2003). Dostatek PMCA4 je důležitý pro udržení životaschopnosti spermii během kapacitace, při jejich hyperaktivaci a akrozomální reakci. Všechny tyto procesy vyžadují zvýšenou hladinu Ca^{2+} (např. Gadella a Luna, 2014)*. Prostřednictvím oviduktozómů se mohou na povrch spermie přenášet během těchto závěrečných maturačních procesů i další transmembránové a membránové proteiny (Al-Dossary a kol., 2015). Ferraz a kol. (2019) například pozorovali vyšší úspěšnost oplození v in vitro experimentech u kočičího modelu v případě inkubace spermii s oviduktozómami v porovnání se vzorky, kde oviduktozómami přítomné nebyly. Zároveň je poměrně pravděpodobné, že stejný nebo obdobný mechanismus, založený na integrinech a tetraspaninech, se uplatňuje i při interakci spermie s extracelulárními váčky v dřívějších fázích maturace, např. ještě v samčím pohlavním traktu.

2.3 Role integrinů při reorganizaci a stabilitě membrán

Během akrozomální reakce dochází k výrazné reorganizaci membrán spermie zahrnující splynutí vnější akrozomální membrány s plazmatickou membránou spermie v důsledku rychlé depolymerizace aktinových vláken (Brenner a kol., 2003) a k exocytóze akrozómu² (Toshimori a Eddy, 2015)*. Jeho vyjitím dochází k uvolnění obsahu, jenž způsobí narušení *zona pellucida* a umožní spermii dostat se do perivitelinního prostoru (obrázek 2.2), a tím do přímého kontaktu s plazmatickou membránou vajíčka.

Na povrch hlavičky spermie se zároveň dostává vnitřní akrozomální membrána, a tím i nové proteiny (např. Cuasnicú a kol., 2016; Hirohashi a Yanagimachi, 2018)*. Během akrozomální reakce se proteiny z akrozómu relokalizují na plazmatickou membránu a do dalších kompartmentů spermie, hlavně do ekvatoriálního segmentu, jenž je primárním fúzo-
genním místem spermie. V této samotné části sice nedochází ke strukturálním změnám, ale dochází zde k relokaci klíčových proteinů, které se později účastní vazby spermie a plazmatické membrány vajíčka i splynutí membrán obou buněk (viz kapitola 3), mezi jinými např. IZUMO1 (Satouh a kol., 2012), tetraspaninů CD9 a CD81 a proteinu CD46 (Frolíková

²Jedná se o specializované organely, váčky proteolytických enzymů obalené membránou, vyskytující se pouze u spermii.



Obrázek 2.2: Schématické znázornění jednotlivých kroků při překonávání spermie extracelulárních obalů a plazmatické membrány vajíčka. A a B: Průchod skrz kumulární buňky a *corona radiata*. C a D: Vazba spermie k *zona pellucida*, akrozomální reakce a penetrace *zona pellucida*. E a F: Vazba spermie k plazmatické membráně vajíčka a průnik do buňky. Převzato a přeloženo z Carlson (2018)*.

a kol., 2016, 2018) a dalších. Při akrozomální reakci se do ekvatoriálního segmentu relokují také integriny (Frolíková a kol., 2016; Jankovicová a kol., 2020), což naznačuje jejich možnou funkci při dalších procesech následujících po akrozomální reakci. Jednou z možností relokace proteinů je transport prostřednictvím hybridních váčků, které se uvolňují během fúze plazmatické a vnější akrozomální membrány spermie a následně zpětně fúzí s dalšími částmi plazmatické membrány (Zanetti a Mayorga, 2009). Mimo jiné je známo, že kromě integrinů obsahují také např. protein CD46 (Frolíková a kol., 2016).

Klíčovou roli v signálních dráhách a procesech během akrozomální reakce hrají aktinové sítě. Otázkou zůstává, které další proteiny kromě aktinu, jsou do reorganizace a stabilizace sítě zapojené. Úlohu zde sehrávají pravděpodobně také integriny, díky své schopnosti interagovat přímo anebo nepřímo s aktinovým cytoskeletem a kontrolovat a řídit jeho přestavbu

(Liu a kol., 2000)*. Vzhledem k nedávným výzkumům potvrzující existenci tetraspaninové sítě i u spermií (Frolíková a kol., 2019; Jankovicová a kol., 2020), můžeme předpokládat, že podstatnou úlohu hrají i vazby s dalšími proteiny této sítě.

Ukázalo se, že vazebným partnerem $\beta 1$ integrinů na spermiích je transmembránový protein CD46, který s integrinem $\beta 1$ sdílí stejnou lokalizaci, a zároveň dochází k jejich společné dynamické relokaci během akrozomální reakce (Frolíková a kol., 2016). CD46 je navíc buď prostřednictvím přímé vazby na aktin, nebo prostřednictvím $\beta 1$ integrinů zodpovědný za stabilizaci akrozomální membrány potažmo celého akrozómu. Experimentálně bylo ukázáno, že u myších spermií, které tento protein v akrozomální membráně postrádaly (přirozeně u myšic, nebo CD46 knock-out myši), docházelo ke zrychlené (tzv. spontánní) akrozomální reakci ve zvýšené míře (Frolíková a kol., 2012).

Kromě $\beta 1$ integrinů hrají roli při akrozomální reakci i $\beta 4$ integriny, které byly detekované jak na lidských (Glander a kol., 1998), tak na myších spermiích (Frolíková a kol., 2019). Frolíková a kol. (2019) detekovali $\beta 4$ podjednotky integrinů v plazmatické membráně překrývající apikální část akrozómu a v ekvatoriálním segmentu myší spermie. Cytoplazmatický ocásek $\beta 4$ integrinu je výrazně delší než u ostatních β podjednotek (viz kapitola 1.1) a má schopnost zapojovat se do reorganizace cytoskeletu. Ovlivňuje například Rac1 protein (ang. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 protein*) a jeho aktivaci (Colburn a Jones, 2017), který hraje významnou roli při kapacitaci a akrozomální reakci, především při remodelaci aktinu v apikální části akrozómu (Ramírez-Ramírez a kol., 2019).

$\beta 4$ se na rozdíl od ostatních integrinů díky strukturní odlišnosti cytoplazmatické domény váže nejenom na aktin a tubulin, ale také na intermediální filamenta (např. na keratin 5 přes plektin, který obklopuje jádro spermie; Kierszenbaum a kol., 2003). Tato vazba může přispívat k mechanické a strukturní stabilitě buňky.

Obdobně jako je to u $\beta 1$ integrinů, i v tomto případě je možné, že $\beta 4$ integriny interagují při stabilizaci a remodelaci cytoskeletu s tetraspaniny. Jankovicová a kol. (2020) totiž v nedávné studii prezentovali objev molekuly CD151 v ekvatoriálním segmentu spermií a potvrdili její interakci s integrinovou podjednotkou $\alpha 6$, díky čemuž se v tomto primárním fúzogenním místě vytváří stabilizující proteinový komplex během průběhu akrozomální reakce.

2.4 Integriny při organizaci proteinových komplexů

Mezi hlavní vazebné partnery integrinů v gametách patří tetraspaniny, proteiny se čtyřmi transmembránovými doménami a dvěma extracelulárními úseky. Hlavní úlohou těchto pro-

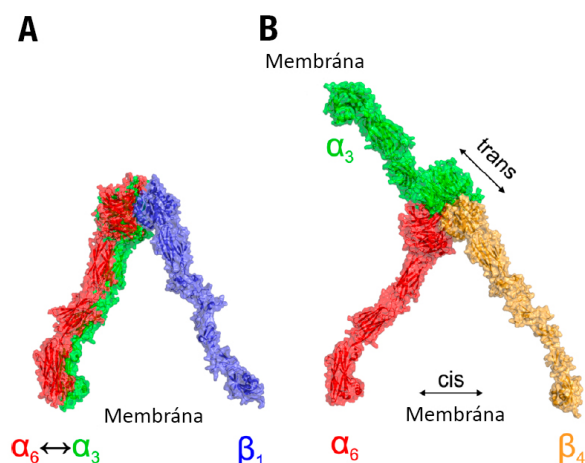
teinů v tetraspaninových sítích je regulace uspořádání membrány a proteinových komplexů v nich (receptorů, signálních proteinů, fúzogenů apod.) a také modulace jejich funkce, a to hlavně prostřednictvím asociace právě s integriny např. $\alpha3\beta1$ a $\alpha6\beta1$ (Miyado a kol., 2000), $\alphaV\beta3$ (Yu a kol., 2017). Tyto vazby mohou být buďto přímé (CD151), anebo nepřímé prostřednictvím jiných tetraspaninů (CD9, CD81).

Za nepostradatelný tetraspanin je považován CD9 na vajíčku. Protilátky proti CD9 výrazně snižují fertilizační schopnost v in vitro experimentech (Chen a kol., 1999). Knock-out genu pro tento protein způsobuje téměř úplnou sterilitu samic myší, kdežto samci zůstávají plně fertilní (Miyado a kol., 2000; Rubinstein a kol., 2006).

Hlavní rolí CD9 je nejen jejich interakce s „cis-partnery“ na vajíčku (obrázek 3.1), ale i úloha ve formaci mikrovilů na jeho povrchu (Runge a kol., 2007). CD9 má pravděpodobně podíl i na posílení adheze mezi gametami. Na druhou stranu Miyado a kol. (2008) považuje za hlavní roli CD9 podíl na tvorbě mikroveziklů, které se z vajíčka těsně před oplozením uvolňují do jeho okolí (Barraud-Lange a kol., 2007a; Miyado a kol., 2008). Transport CD9 z vajíček, na kterých se tento protein nacházel, prostřednictvím exozómů na spermie, jim umožnil v jejich experimentu vazbu i na vajíčka s deficientem CD9. Tento experiment se však považuje za kontroverzní, protože jeho výsledky nebylo možné potvrdit v jiných laboratořích, a navíc byla přítomnost CD9 objevená také na spermích (Ito a kol., 2010). Stále je však možné, že prostřednictvím exozómů dochází i k výměně jiných proteinů mezi gametami, např. integrinů (Boissonnas a kol., 2010).

Dalším důležitým tetraspaninem u myší je CD81, jehož knock-out sice způsobuje méně výrazné snížení fertility v porovnání s CD9, ale v případě, že tyto dva tetraspaniny chybí zároveň, jsou samice úplně sterilní (Rubinstein a kol., 2006). Je nutné dodat, že u různých druhů mohou hlavní roli hrát různé tetraspaniny, podobně jako je to u integrinů (viz kapitola 3). Protilátky proti CD81 výrazně snižují fertilizační schopnost u myší (Rubinstein a kol., 2006), kdežto u lidských vajíček nemají žádný vliv (Ziyyat a kol., 2006). Na druhou stranu protilátky proti CD151 blokují fúzi hlavně u lidských vajíček (Ziyyat a kol., 2006).

Tak jak už bylo zmíněno, tetraspaniny se nacházejí i na spermích, např. CD9 (Ito a kol., 2010; Frolíková a kol., 2018), CD81 (Jankovicová a kol., 2016; Frolíková a kol., 2018), CD151 (Jankovicová a kol., 2020) a další. Obdobně jako na vajíčku zde tetraspaniny vytvářejí proteinové sítě a podílejí se na reorganizaci membrán a relokaci proteinů či stabilizaci jednotlivých kompartmentů. Jejich role během samotné fúze zůstává otázkou. Experimenty s knock-outem genů pro CD9 a CD81 totiž ukázaly, že jsou takoví samci plně fertilní (Rubinstein a kol., 2006). Stále je však tady možnost, že se tyto tetraspaniny přená-



Obrázek 2.3: Model aktivovaných stavů integrinových heterodimerů α/β . A: Cis interakce a možná výměna integrinových podjednotek. B: Trans interakce integrinových podjednotek. Převzato a přeloženo z Frolíková a kol. (2019).

šejí na deficientní spermii z vajíčka, a proto by výsledky těchto experimentů nemusely být dostatečně vypovídající.

Při organizaci membrán a proteinových komplexů v nich se tetraspaniny vážou s integriny prostřednictvím tzv. cis interakcí (laterální vazby mezi proteiny nebo podjednotkami v membráně jedné buňky, viz obr. 2.3A a obr. 3.1). Frolíková a kol. (2019) ukázali, že cis interakce mezi integrinovými podjednotkami jsou důsledkem uspořádání N-terminálních domén jednotlivých podjednotek. Taková vazba se pozoruje na spermii například u integrinů $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ a $\alpha_6\beta_4$. Je možné, že kromě cis interakcí mezi jednotlivými integrinovými podjednotkami a mezi integriny a tetraspaniny se prostřednictvím cis interakcí vážou integriny na spermii i s dalšími proteiny, např. CD46 či SPACA6 (viz kapitola 3.2).

Na druhou stranu, pozice N-terminálních domén u podjednotek α_3 a β_4 je vhodná pro vytvoření konformace, ve které obě podjednotky směřují v opačných směrech, což umožňuje trans interakci integrinu $\alpha_3\beta_4$ (obr. 2.3B). Trans interakce jsou důležité pro vazbu proteinů ze dvou různých buněk, interakce α_3 podjednotky s β_4 by proto mohla hrát roli při vazbě a fúzi gamet (viz kapitola 3 pro diskuzi role integrinů při oplození). Trans interakce může hrát roli i při navázání proteinu IZUMO1 na integrin jako potencionální sekundární receptor (viz kapitola 3.1).

3. Role integrinů při fúzi gamet

Poté co spermie penetrují *zona pellucida* a dostanou se tak do perivitelinního prostoru, dochází k jejich vazbě k plazmatické membráně vajíčka a následné fúzi. Dosud bylo navrženo mnoho kandidátních proteinů, mezi nimi i integriny, které by mohly být esenciální během vazby a fúze. V případě obou gamet se této vazby účastní specifické oblasti membrány.

Membrána spermie je rozdělená do mnoha kompartmentů, a do kontaktu s povrchem vajíčka musí přijít specifické domény s proteiny, které se nachází v ekvatoriálním segmentu a posteriorní části hlavičky spermie (Bedford a kol., 1979). Na plazmatické membráně vajíčka se na druhou stranu nacházejí oblasti bohaté na mikrokly a také oblasti bez mikrokly³. K vazbě spermie dochází právě v oblasti bohaté na mikrokly (Johnson a kol., 1975; Georgadaki a kol., 2016). Výzkumy ukazují, že fúze gamet je velice komplexní proces a zahrnuje celou řadu interakcí proteinových sítí na membránách obou germinálních buněk.

Na základě experimentů s využitím monoklonálních protilátek, in vitro fertilizací či organismů s knock-outovanou expresí určité molekuly, byly identifikovány důležité články těchto sítí. Zároveň již bylo mnoho z původně navržených kandidátních proteinů těmito experimenty vyloučeno. Jako zcela nepostradatelné pro procesy vazby/fúze jsou považovány proteiny IZUMO1 a SPACA6 na spermii a Juno a CD9 na vajíčku. Velká pozornost v tomto ohledu se věnuje také integrinům, jejichž role při vazbě/fúzi spermie a vajíčka je dodnes kontroverzní - několik studií ji úplně vyvrací, ale množství důkazů ukazuje, že určitou roli sehrávají.

Prvotní domněnky o možné roli integrinů při adhezi/fúzi gamet pramení z objevu jejich vazebních partnerů, proteinů z rodiny ADAM na spermii (Primakoff a kol., 1987; Blobel a kol., 1992). Jedná se o transmembránové a sekretované metaloendopeptidázy. Ze začátku byl zkoumaný zejména fertilin, heterodimer skládající se ze dvou podjednotek - fertilinu α (ADAM1B) a fertilinu β (ADAM2). Experimenty s protilátkami proti fertilinu β i knock-out genu pro tento protein ukázaly, že jeho zablokování vede k výraznému snížení adheze a fúze spermie na vajíčko (ne však k úplnému zablokování; Primakoff a kol., 1987; Evans a kol., 1997; Cho a kol., 1998; Nishimura a kol., 2001). Posléze se ukázalo, že ADAM proteiny hrají také roli při migraci spermii do oviduktu (viz kapitola 2.1) i při vazbě k *zona pellucida* (kapitola 2.3).

Většina z ADAM proteinů ve své struktuře obsahuje disintegrinovou doménu (integrin

³Ne u všech druhů savců se pozorují takovéto struktury na plazmatické membráně vajíčka. U lidských vajíček nacházíme rovnoměrné rozložení mikrokly na povrchu (Santella a kol., 1992).

ligand-like), prostřednictvím které se dokáží vázat na integriny, což bylo dokázáno při experimentech se somatickými buňkami (Blobel a kol., 1992). Přítomnost integrinů byla záhy potvrzena také na vajíčku (Fusi a kol., 1992, 1993; Campbell a kol., 1995) a interakce integrinů a jejich receptorů, ADAM proteinů na spermích, tak byla navržená jako mechanismus nutný pro adhezi a fúzi membrán obou gamet.

Jako hlavní vazebný partner fertilinu β byl navržen integrin $\alpha6\beta1$ (Chen a Sampson, 1999). Výzkumy s využitím protilátek z přelomu tisíciletí však byly velmi rozporuplné. Almeida a kol. (1995) ukázali, že protilátky proti integrinové podjednotce $\alpha6$ výrazně inhibují fúzi spermie s vajíčkem s odstraněnou *zona pellucida*, zatímco Evans a kol. (1997) takovýto efekt nepozorovali. Je nutné podotknout, že v obou případech byla využita odlišná metoda odstranění *zona pellucida*, která pravděpodobně výsledky ovlivnila, protože se tak výrazně mění lokální podmínky, a jak je dnes známé, i rozložení integrinů a tetraspaninů na vajíčku. Inhibiční efekt protilátek proti $\alpha6$ nepozorovali ani Evans (1999) a Miller a kol. (2000), kteří ve svých studiích neodstranili *zona pellucida*, případně ani kumulární buňky a interpretovali, že podjednotka $\alpha6$ do interakce gamet u myši zapojená není. Barraud-Lange a kol. (2007b) však upozornili na to, že metodika na detekci oplozených vajíček, jež ve své práci využili Evans (1999), nebyla tradiční a mohla vést k falešně pozitivním výsledkům. Také v případě studie Miller a kol. (2000) probíhala in vitro fertilizace v příliš malých objemech nevhodných k využití této metody, a z toho důvodu i kontrolní vzorky vykazovaly sníženou fertilizační schopnost. Proto je možné, že tyto dvě studie nemusely inhibici vůbec zaznamenat.

Na druhou stranu všechny čtyři zmiňované výzkumy ukázaly, že protilátky proti $\beta1$ integrinům fúzi zabraňují, z čehož vyplývá, že se $\beta1$ podjednotky na vajíčku mohou vázat s jinými α podjednotkami, a tyto heterodimery pak zapojují do adheze a fúze gamet (Almeida a kol., 1995; Evans a kol., 1997; Evans, 1999; Miller a kol., 2000).

Další světlo do problematiky role integrinů během vazby/fúze gamet vnesly experimenty s knock-outovanými geny. Vzhledem k tomu, že integriny jsou široce rozšířené v různých typech buněk, jejich úplný knock-out vede často k předčasné letalitě či vývojovým vadám (Hynes, 2002)*, a tomu tedy musí být metodika výzkumů přizpůsobená (např. odběr vaječnicku s vajíčky ihned po narození, nebo kondiční knock-out genu pro daný integrin specifický pouze pro vajíčko).

Tyto experimenty tak ukázaly, že knock-out genu pro $\beta3$ (Hodivala-Dilke a kol., 1999), $\alpha3$ a $\alpha6$ (Miller a kol., 2000; He a kol., 2003) nezpůsobuje sterilitu. He a kol. (2003) obdobný experiment provedli i pro podjednotku $\beta1$, která je schopna se vázat s největším počtem α podjednotek (viz obrázek 1.2), a její role ve fúzi byla navržená na základě předešlých

výsledků experimentů s protilátkami. Tak jako v předchozím případě, takový zásah do vajíčka neznemožnil vazbu a fúzi se spermii. K inhibici nedošlo ani v případě, kdy taková vajíčka byla inkubovaná s protilátkami proti $\beta 3$ a αv podjednotkám, z čehož He a kol. (2003) usoudili, že „žádný z integrinů, který je známý na myším vajíčku, není důležitý pro adhezi a fúzi gamet“.

Takové tvrzení a hlavně jeho následné zevšeobecnění na další druhy savců mnohými autory (např. zde: Florman a Fissore, 2015)* se ukazuje poněkud předčasné, a to hned z několika důvodů. Experimenty s protilátkami ani knock-outem genů nebyly (tehdy a ani dodnes) prováděny proti všem známým kombinacím integrinových heterodimerů, ani proti většímu množství integrinových podjednotek současně. Později se například ukázalo, že částečný knock-out podjednotky $\alpha 9$ (vedoucí ke snížení množství této podjednotky na vajíčku cca o polovinu) způsobí zaznamatelné snížení fertilizační schopnosti u myši (Vjugina a kol., 2009). Je proto možné, že za nepřítomnosti jedné podjednotky zastupuje tuto roli jiná podjednotka. Například v případě nedostatku jinak velmi rozšířené $\beta 1$, se podjednotky α naváží na jinou β . Desiderio a kol. (2010) takto detekovali heterodimer $\alpha 9\beta 7$ na lidských lymfoblastických B buňkách linie RPMI 8866, na kterých se přirozeně nenachází $\beta 1$, a potvrdili i jeho schopnost vázat se k molekule ADAM2. Je nutné dodat, že žádná jiná studie existence takového heterodimeru na jiném typu buňky zatím nepotvrdila, ale teoretický výzkum ukázal, že tato i další zatím neobjevené kombinace jsou možné (Lin a kol., 2006).

Dalším důvodem zpochybňující zevšeobecnování výsledků dosažených využitím myších gamet na další druhy (např. na člověka) je fakt, že míra zapojení jednotlivých integrinů do adheze a fúze gamet je s velkou pravděpodobností druhově specifická. Zatímco protilátky proti $\alpha 6$ mají u myši zanedbatelný vliv (viz výše), u lidských gamet blokují fúzi velmi významně (Sengoku a kol., 2004; Ziyat a kol., 2006). Sengoku a kol. (2004) pozorovali u lidských gamet částečnou inhibici (až do 55 %) také u dalších podjednotek - $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, αv , αM , $\beta 1$, $\beta 2$ a $\beta 3$.

Zároveň je potřeba mít na paměti, že při interpretaci myších modelů v kontextu lidské reprodukce existují mezi těmito dvěma skupinami výrazné rozdíly (Vjugina a kol., 2009). Myši mají krátký estrální cyklus a uvolňují současně více vajíček, kdežto u lidí dochází většinou k uvolnění pouze jednoho vajíčka jednou za zhruba 28 dní. Pokud se tedy v nějakém experimentu u myši ukazuje, že daná molekula má malý (částečný) vliv na vazbu gamet, např. neoploď se polovina vajíček, stejný defekt může být u lidí mnohem výraznější, s 50% pravděpodobností nedojde k oplození v daném cyklu vůbec. Je tedy žádoucí posuzovat nejen na škále nějaký potomek vs. žádný potomek, ale i jednotlivé subfenotypy, příkladem může

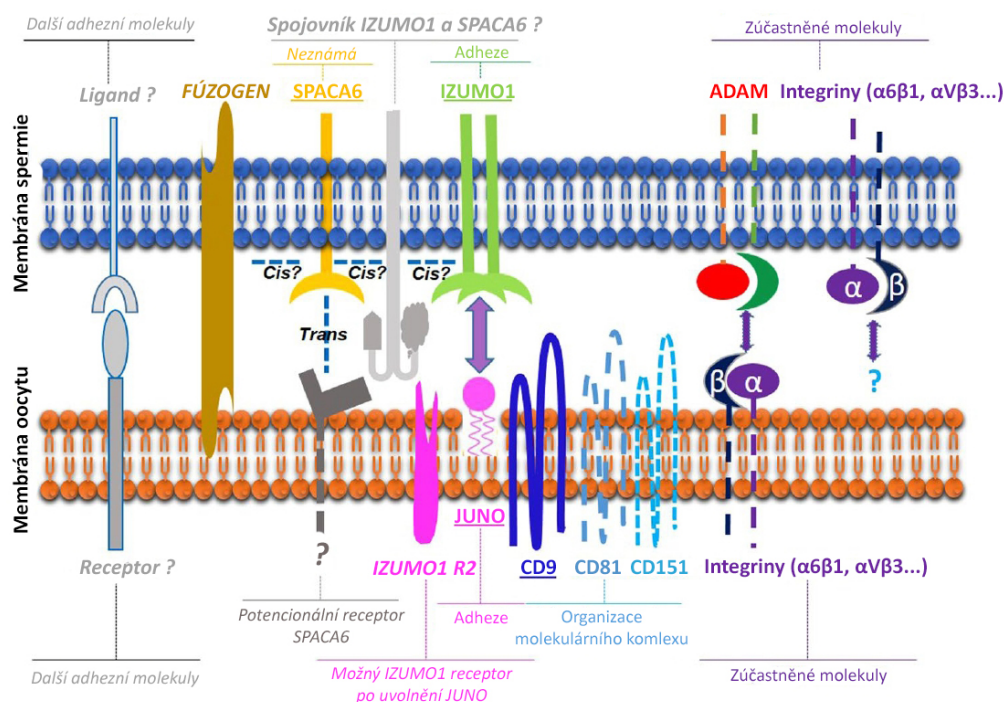
být současný knock-out molekul CD9 a CD81 (viz kapitola 2.4).

Nejsilnějším důvodem pro podporu role integrinů je jejich existence na spermii, což už sice bylo v době experimentů s protilátkami i s knock-outy genů známo (detekováno např. v pracích Glander a Schaller, 1993; Fusi a kol., 1996; Glander a kol., 1998), ale žádná ze zmiňovaných studií se jejich rolí nezabývala. Navíc ve všech těchto experimentech byly při in vitro fertilizaci používány wild-type spermie a při páření a následném oplození in vivo wild-type samci. Jak ukázaly následné experimenty, inkubace spermií s protilátkami proti $\alpha 6$ (Barraud-Lange a kol., 2007b), αV a $\beta 3$ (Boissonnas a kol., 2010) snižuje schopnost těchto spermií vázat se k vajíčku. Tento efekt byl výraznější, když byly s protilátkami inkubované před interakcí obě gamety.

Tyto výsledky naznačují, že za optimálních podmínek se do interakce zapojují integriny na obou gametách, ale postačující je jejich přítomnost alespoň na jedné z nich. Současně některé výzkumy naznačují, že může docházet k různým proteinovým výměnám mezi gametami, což by takovou hypotézu podporovalo (viz kapitola 2.4). Role integrinů na spermii při vazbě a fúzi s vajíčkem je výrazně podporována skutečností, že během akrozomální reakce, dochází k jejich relokaci do primární fúzogenní oblasti, ekvatoriálního segmentu spermie (Frolíková a kol., 2016; Jankovicová a kol., 2020), podobně jak je to u dalších molekul nutných k úspěšné fúzi (IZUMO1, SPACA6, viz kapitoly 3.1 a 3.2).

Současná přítomnost integrinových podjednotek na spermii a vajíčku poskytuje i jinou možnost interakce spermie a vajíčka, jako je původně navržená vazba mezi ADAM proteiny a jejich receptory, integriny na vajíčku. Integriny v gametách mohou interagovat i prostřednictvím ligandů, ke kterým jsou schopni se vázat, např. k fibronektinu či vitronektinu, molekul, které byly na spermii detekovány a jejichž zablokování také snižuje schopnost vazby a fúze gamet (Boissonnas a kol., 2010). Zároveň je také možná interakce integrinů na spermii s dosud neznámou molekulou na vajíčku (obrázek 3.1; Barbaux a kol., 2020).

Integriny pravděpodobně hrají při vazbě a fúzi gamet i nepřímou roli, jako možný sekundární receptor molekuly IZUMO1 (kapitola 3.1), jako potencionální vazebný partner proteinu SPACA6 na spermii (kapitola 3.2) či prostřednictvím interakce s tetraspaniny (kapitola 2.4). Navíc, i když je pravděpodobné, že existují další komplementární molekuly, které mohou funkci integrinů doplňovat, jejich snížená exprese u gamet může být evoluční nevýhodou, např. nedostatek $\beta 1$ integrinů způsobuje pomalejší navázání spermií (Baessler a kol., 2009).



Obrázek 3.1: Hypotetický model adheze/fúze savčích gamet. Pro detailní popis funkce jednotlivých molekul viz text práce. Převzato a přeloženo z Barbaux a kol. (2020).

3.1 Integriny jako sekundární receptor IZUMO1

Bezpochyby jedním z nepostradatelných proteinů na spermii je membránový protein IZUMO1, člen imunoglobulinové superrodiny typu I s extracelulární imunoglobulinovou doménou (Inoue a kol., 2005). Vazebným partnerem IZUMO1 na vajíčku je protein Juno, protein v membráně zakotven pomocí GPI kotvy (Bianchi a kol., 2014). Po rozeznání proteinu Juno však dochází pravděpodobně k sekundární vazbě IZUMO1 k jinému receptoru, kterým by mohl být integrin (obrázek 3.1). Zatím však není vyloučené, že se může jednat i o jinou adhezní molekulu, případně neproteinový faktor jako např. fosfolipid (Inoue a kol., 2015).

IZUMO1 je na spermii detekován pouze po akrozomální reakci, při které se dostává do ekvatoriálního segmentu (Satouh a kol., 2012). Využitím protilátek proti IZUMO1 bylo zabráněno fúzi spermie s vajíčkem, a zároveň knock-out IZUMO1 experiment ukázal, že samci bez IZUMO1 jsou sterilní, i přesto, že vykazují normální chování, vývoj, motilitu spermií i migraci v oviduktu samice, akrozomální reakci i průnik přes *zona pellucida*. Takové spermie se však akumulují v perivitellinním prostoru vajíčka a nejsou schopny fúze. Pokud však byly spermie injektovány přímo do vajíčka (intra-cytoplasmic sperm injection, ICSI),

další vývoj nebyl absencí IZUMO1 narušen (Inoue a kol., 2005). Podobně i v případě proteinu Juno se ukázalo, že samice postrádající tento protein jsou sterilní. Navíc, po oplození tento protein mizí z povrchu vajíčka, což naznačuje jeho úlohu v blokování polyspermie.

3.2 Integriny jako vazebný partner SPACA6 na spermii

Integriny byly nedávno také navrženy jako možný vazebný partner proteinu SPACA6 (ang. *sperm acrosome membrane-associated protein 6*) na spermii. Prostřednictvím integrinů může SPACA6 interagovat a ovlivňovat další molekuly v membráně spermie, např. fúzogen (obrázek 3.1). Toto však nebylo zatím experimentálně potvrzeno, a je proto možné, že k vazbě dochází prostřednictvím jiných proteinů, nebo přímo (Barboux a kol., 2020).

SPACA6 je transmembránový imunoglobulinu podobný protein, který je po akrozomální reakci lokalizován v ekvatoriálním segmentu spermií (Lorenzetti a kol., 2014; Barboux a kol., 2020), obdobně jako je to u integrinů. Jeho klíčová role ve fertilizační schopnosti spermií byla potvrzena experimenty s protilátkami u lidských gamet i knock-outem genu pro tento protein u myši. Fenotyp samců v tomto případě je velice podobný jako v případě chybějícího IZUMO1. Samčí spermie postrádající tento protein proniknou až k vajíčku, hromadí se však v periviteliním prostoru a nejsou schopné fúze (Barboux a kol., 2020). Vazebný partner SPACA6 na vajíčku není doposud znám.

SPACA6 i všechny ostatní molekuly (CD9, Juno na vajíčku a IZUMO1 na spermii), které dnes považujeme za esenciální pro úspěšné oplození, pravděpodobně zaujímají spíše roli během vazby spermie a vajíčka, neboť jim chybí základní charakteristiky fúzogenních molekul, například fúzogenní domény známé u virových systémů fúze (Evans, 2012; Klínovska a kol., 2014)*. Otevřenou otázkou proto zůstává, na které z gamet se fúzogen nachází, a také proč dosud nebyl identifikován. Komplikací při genetickém přístupu prostřednictvím experimentů s knock-outem genů může být smrt jedince, nebo vývojové vady bránící dosažení reprodukčního věku. Na druhou stranu, biochemický přístup a využití protilátek tuto molekulu nemusí odhalit v případě, že je přítomná jen v nižších množstvích, nebo je aktivovaná pouze na přechodnou dobu (Evans, 2012)*.

Za poslední tři dekády v rámci genomických a proteomických analýz bylo objeveno několik dalších molekul (např. protein SLLP1 na spermii a jeho partner SASB1 na vajíčku Herrero a kol., 2005; Sachdev a kol., 2012), které se také ve větší či menší míře podílejí na zprostředkování vazby/fúze spermie a vajíčka. To jenom potvrzuje fakt, že na obou gametách existují v rámci multiproteinových sítí další molekuly, které prostřednictvím vzájemných vazeb i s integriny hrají při oplození důležitou roli (obrázek 3.1).

Závěr

Integriny představují velké, transmembránové heterodimery nekovalentně asociovaných podjednotek α a β , s různými vazebnými vlastnostmi, které jsou jakožto receptory buněčné adheze přenášející obousměrně signály přes plazmatickou membránu pro existenci živočichů zcela nepostradatelné. Zprostředkovávají připojení buněčného cytoskeletu k extracelulární matrix, ale také se účastní specializovaných interakcí mezi buňkami.

Integriny byly detekované i na germinálních buňkách, u kterých hrají významnou roli při maturačních procesech i při samotné vazbě a fúzi gamet během oplození. U savců bylo do současnosti detekováno 9 α podjednotek a 7 β podjednotek na vajíčku, zejména na plazmatické membráně a o něco méně na spermii, a to 5 α podjednotek a 3 β podjednotky. U spermií detekujeme integriny v různých kompartmentech (plazmatická membrána, vnější i vnitřní akrozomální membrána, ekvatoriální segment a další).

Na vajíčku jsou integriny součástí tzv. tetraspaninových sítí, které se podílejí na vazbě a fúzi se spermii. Zároveň zde mají roli i během zrání vajíčka ve vaječniku. To je regulováno okolním prostředím a interakcí s komponenty extracelulární matrix (membrána folikulu, granulózní buňky, folikulární tekutina) a do vzájemné komunikace vajíčka s nimi se velice pravděpodobně zapojují integriny.

Na rozdíl od vajíček, které jsou od uvolnění z folikulu až do oplození ve svém vývoji zastaveny v metafázi II., spermie musí v samičím reprodukčním traktu při samotné cestě k vajíčku projít maturačními procesy a překonat také mechanické bariéry, zejména uterotubulární spojení. Do vejcovodu se dostávají jenom morfologicky nezávadné, pohyblivé spermie, bez defektů v expresi některých proteinů, například z rodiny ADAM (pro které jsou hlavními vazebnými partnery integriny). V oviduktu dochází k tvorbě oviduktálního rezervoáru spermií, prostřednictvím interakce s epitelem. Mezi mechanismy navržené jako podílející se na vazbě je i interakce integrinů na plazmatické membráně spermie a fibronektinu na apikální části řasinkových buněk, ale možných variant je více (např. vazba BSP proteinů a anexinů, interakce β -defenzinu s neznámým receptorem na epitelu). Podobně jako při dalších procesech diskutovaných v této bakalářské práci je možné, že jednotlivé mechanismy se liší mezi druhy, anebo jsou zprostředkovány komplexem proteinových interakcí.

Během této vazby dochází k iniciaci kapacitace, nutným změnám ve struktuře membrány spermie, pro kterou je důležitá interakce spermie se složkami oviduktální tekutiny. Prostřednictvím oviduktozómů z oviduktální tekutiny dochází také k přenosu důležitých proteinů na povrch spermie (např. PMCA4). Při fúzi oviduktozómů s plazmatickou membránou

spermie hrají integriny zcela zásadní roli, neboť jsou to právě ony, které prostřednictvím fibronektinu a vitronektinu umožňují vazbu váčků. Po kapacitaci je spermie schopná reagovat na chemoatraktanty vajíčka a také se dostává do hyperaktivovaného stavu, nutného pro pohyb k samičí gametě.

Vyvrcholením kapacitace je akrozomální reakce, při které dochází ke splynutí plazmatické a vnější akrozomální membrány a exocytóze akrozómu. Integriny (zejména $\beta 1$, $\beta 4$) se zde, ve spolupráci s tetraspaniny a dalšími molekulami, podílejí na udržení stability důležitých kompartmentů spermie. Podjednotka $\beta 4$, pro kterou je typický dlouhý cytoplazmatický ocásek se navíc podílí na komunikaci s intermediálními filamenti tvořícími cytoskelet buňky. Během fúze membrán zároveň dochází k relokaci proteinů, zejména do ekvatoriálního segmentu spermie, který je primárním fúzogenním místem. K přenosu může docházet i prostřednictvím hybridních váčků, které se ze spermie uvolňují a pro jejichž tvorbu jsou integriny zásadní.

I samotné integriny se na spermii relokují do primárního fúzogenního místa. Zároveň je detekujeme i na plazmatické membráně vajíčka, proto je zřejmé, že se zapojují také do procesu adheze/fúze gamet. Do vazby se pravděpodobně zapojují i přímo, přestože dosavadní výzkumy jsou stále poněkud kontroverzní. Integriny na vajíčku, pravděpodobně fungují jako receptory ADAM proteinů na spermii, integriny na spermii zase mohou fungovat jako receptor doposud neobjevené molekuly na vajíčku. K vazbě integrinů obou gamet může docházet také prostřednictvím určitého ligandu, např. fibronektinu či vitronektinu. Hrají zde však i nepřímou roli při interakci s ostatními zúčastněnými molekulami jako jsou tetraspaniny, které zodpovídají za organizaci proteinových komplexů na membránách, také možná fungují jako sekundární receptory proteinu IZUMO1, jenž se primárně váže ke svému vazebnému partnerovi Juno na vajíčku. Existuje také hypotéza, že na spermii jsou integriny potenciálními vazebnými partnery proteinu SPACA6, kde zprostředkovávají interakci SPACA6 a IZUMO1 nebo komunikaci tohoto proteinu a potenciálního fúzogenu. Jmenované proteiny (IZUMO1 a SPACA6 na spermii, Juno a tetraspanin CD9 na vajíčku) jsou dnes považovány za zcela nepostrádatelné pro úspěšnou vazbu/fúzi gamet, a proto si i tato nepřímá role integrinů zasluhuje pozornost.

Tak jak je diskutováno v této bakalářské práci, integriny zastávají během příprav gamet na oplození, samotné interakce germinálních buněk i v následujících procesech embryonálního vývoje mnoho důležitých úloh. Právě z tohoto důvodu se v posledních letech opět dostávají do popředí mnohých výzkumů a nové poznatky budou zajisté užitečné i při léčení neplodnosti, jakožto stále aktuálnějšího problému moderní civilizace.

Seznam použité literatury

- ADAMS, M. D., CELNIKER, S. E., HOLT, R. A., EVANS, C. A., GOCAYNE, J. D., AMANATIDES, P. G., SCHERER, S. E., LI, P. W., HOSKINS, R. A., GALLE, R. F. A KOL. (2000). The genome sequence of drosophila melanogaster. *Science*, **287**(5461), 2185–2195.
- AL-DOSSARY, A. A., STREHLER, E. E. a MARTIN-DELEON, P. A. (2013). Expression and secretion of plasma membrane ca^{2+} -atpase 4a (pmca4a) during murine estrus: association with oviductal exosomes and uptake in sperm. *PloS one*, **8**(11).
- AL-DOSSARY, A. A., BATHALA, P., CAPLAN, J. L. a MARTIN-DELEON, P. A. (2015). Oviductosome-sperm membrane interaction in cargo delivery detection of fusion and underlying molecular players using three-dimensional super-resolution structured illumination microscopy (sr-sim). *Journal of Biological Chemistry*, **290**(29), 17710–17723.
- ALMEIDA, E. A., HUOVILA, A.-P., SUTHERLAND, A., STEPHENS, L., CALARCO, P., SHAW, L. M., MERCURIO, A. M., SONNENBERG, A., PRIMAKOFF, P., MYLES, D. A KOL. (1995). Mouse egg integrin $\alpha 6\beta 1$ functions as a sperm receptor. *Cell*, **81**(7), 1095–1104.
- ANDERSON, D. J., ABBOTT, A. F. a JACK, R. M. (1993). The role of complement component c3b and its receptors in sperm-oocyte interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **90**(21), 10051–10055.
- AUSTIN, C. (1952). The 'capacitation' of the mammalian sperm. *Nature*, **170**(4321), 326–326.
- BAESSLER, K. A., LEE, Y. a SAMPSON, N. S. (2009). $\beta 1$ integrin is an adhesion protein for sperm binding to eggs. *ACS chemical biology*, **4**(5), 357–366.
- BARBAUX, S., IALY-RADIO, C., CHALBI, M., DYBAL, E., HOMPS-LEGRAND, M., DO CRUZEIRO, M., VAIMAN, D., WOLF, J.-P. a ZIYYAT, A. (2020). Sperm spaca6 protein is required for mammalian sperm-egg adhesion/fusion. *Scientific Reports*, **10**(1), 1–15.
- BARCZYK, M., CARRACEDO, S. a GULLBERG, D. (2010). Integrins. *Cell and tissue research*, **339**(1), 269.
- BARRAUD-LANGE, V., NAUD-BARRIANT, N., BOMSEL, M., WOLF, J.-P. a ZIYYAT, A. (2007a). Transfer of oocyte membrane fragments to fertilizing spermatozoa. *The FASEB Journal*, **21**(13), 3446–3449.
- BARRAUD-LANGE, V., NAUD-BARRIANT, N., SAFFAR, L., GATTEGNO, L., DUCOT, B., DRILLET, A.-S., BOMSEL, M., WOLF, J.-P. a ZIYYAT, A. (2007b). Alpha6beta1 integrin expressed by sperm is determinant in mouse fertilization. *BMC developmental biology*, **7**(1), 102.
- BAUM, P. D. a GARRIGA, G. (1997). Neuronal migrations and axon fasciculation are disrupted in ina-1 integrin mutants. *Neuron*, **19**(1), 51–62.
- BECKMANN, S., QUACK, T., DISSOUS, C., CAILLIAU, K., LANG, G. a GREVELDING,

- C. G. (2012). Discovery of platyhelminth-specific α/β -integrin families and evidence for their role in reproduction in schistosoma mansoni. *PLoS One*, **7**(12).
- BEDFORD, J., MOORE, H. a FRANKLIN, L. (1979). Significance of the equatorial segment of the acrosome of the spermatozoon in eutherian mammals. *Experimental cell research*, **119**(1), 119–126.
- BIANCHI, E., DOE, B., GOULDING, D. a WRIGHT, G. J. (2014). Juno is the egg izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature*, **508**(7497), 483–487.
- BLOBEL, C. P., WOLFSBERG, T. G., TURCK, C. W., MYLES, D. G., PRIMAKOFF, P. a WHITE, J. M. (1992). A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm–egg fusion. *Nature*, **356**(6366), 248–252.
- BOILARD, M., REYES-MORENO, C., LACHANCE, C., MASSICOTTE, L., BAILEY, J., SIRARD, M.-A. a LECLERC, P. (2004). Localization of the chaperone proteins grp78 and hsp60 on the luminal surface of bovine oviduct epithelial cells and their association with spermatozoa. *Biology of Reproduction*, **71**(6), 1879–1889.
- BOISSONNAS, C. C., MONTJEAN, D., LESAFFRE, C., AUER, J., VAIMAN, D., WOLF, J.-P. a ZIYYAT, A. (2010). Role of sperm $\alpha v \beta 3$ integrin in mouse fertilization. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, **239**(3), 773–783.
- BRENER, E., RUBINSTEIN, S., COHEN, G., SHTERNALL, K., RIVLIN, J. a BREITBART, H. (2003). Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of reproduction*, **68**(3), 837–845.
- BROWN, N. H. (1993). Integrins hold drosophila together. *BioEssays*, **15**(6), 383–390.
- BURKE, R. D., MURRAY, G., RISE, M. a WANG, D. (2004). Integrins on eggs: the βc subunit is essential for formation of the cortical actin cytoskeleton in sea urchin eggs. *Developmental biology*, **265**(1), 53–60.
- CABALLERO, J., FRENETTE, G. a SULLIVAN, R. (2011). Post testicular sperm maturational changes in the bull: important role of the epididymosomes and prostasomes. *Veterinary medicine international*, **2011**.
- CALDERWOOD, D. A. (2004). Integrin activation. *Journal of cell science*, **117**(5), 657–666.
- CAMPBELL, I. D. a HUMPHRIES, M. J. (2011). Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **3**(3), a004994.
- CAMPBELL, S., SWANN, H., SEIF, M., KIMBER, S. a APLIN, J. (1995). Integrins and adhesion molecules: Cell adhesion molecules on the oocyte and preimplantation human embryo. *Human Reproduction*, **10**(6), 1571–1578.
- CARLSON, B. M. (2018). *Human Embryology and Developmental biology E-book*. Elsevier Health Sciences.
- CHA, I. J., LEE, J. H., CHO, K. S. a LEE, S. B. (2017). Drosophila tensin plays an essential role in cell migration and planar polarity formation during oogenesis by mediating integrin-dependent extracellular signals to actin organization. *Biochemical*

- and *biophysical research communications*, **484**(3), 702–709.
- CHANG, M. C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, **168**(4277), 697–698.
- CHEN, H. a SAMPSON, N. S. (1999). Mediation of sperm-egg fusion: evidence that mouse egg $\alpha 6\beta 1$ integrin is the receptor for sperm fertilin β . *Chemistry & biology*, **6**(1), 1–10.
- CHEN, M. S., TUNG, K. S., COONROD, S. A., TAKAHASHI, Y., BIGLER, D., CHANG, A., YAMASHITA, Y., KINCADE, P. W., HERR, J. C. a WHITE, J. M. (1999). Role of the integrin-associated protein cd9 in binding between sperm adam 2 and the egg integrin $\alpha 6\beta 1$: implications for murine fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**(21), 11830–11835.
- CHO, C., BUNCH, D. O., FAURE, J.-E., GOULDING, E. H., EDDY, E. M., PRIMAKOFF, P. a MYLES, D. G. (1998). Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin β . *Science*, **281**(5384), 1857–1859.
- COLBURN, Z. T. a JONES, J. C. (2017). $\alpha 6\beta 4$ integrin regulates the collective migration of epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, **56**(4), 443–452.
- CORTÉS, P. P., ORIHUELA, P. A., ZÚÑIGA, L. M., VELÁSQUEZ, L. A. a CROXATTO, H. B. (2004). Sperm binding to oviductal epithelial cells in the rat: role of sialic acid residues on the epithelial surface and sialic acid-binding sites on the sperm surface. *Biology of reproduction*, **71**(4), 1262–1269.
- COUX, G. a CABADA, M. O. (2006). Characterization of bufo arenarum oocyte plasma membrane proteins that interact with sperm. *Biochemical and biophysical research communications*, **343**(1), 326–333.
- CROSS, N. L. (2003). Decrease in order of human sperm lipids during capacitation. *Biology of reproduction*, **69**(2), 529–534.
- CUASNICÚ, P. S., DA ROS, V. G., MUNOZ, M. W. a COHEN, D. J. (2016). Acrosome reaction as a preparation for gamete fusion. In *Sperm acrosome biogenesis and function during fertilization*, pages 159–172. Springer.
- DARRIBÈRE, T., GUIDA, K., LARJAVA, H., JOHNSON, K. E., YAMADA, K. M., THIERY, J.-P. a BOUCAUT, J.-C. (1990). In vivo analyses of integrin beta 1 subunit function in fibronectin matrix assembly. *The Journal of Cell Biology*, **110**(5), 1813–1823.
- DESIDERIO, U. V., ZHU, X. a EVANS, J. P. (2010). Adam2 interactions with mouse eggs and cell lines expressing $\alpha 4/\alpha 9$ (itga4/itga9) integrins: implications for integrin-based adhesion and fertilization. *PLoS One*, **5**(10).
- DESIMONE, D. a HYNES, R. (1988). *Xenopus laevis* integrins. structural conservation and evolutionary divergence of integrin beta subunits. *Journal of Biological Chemistry*, **263**(11), 5333–5340.
- DICKINSON, C. D., VEERAPANDIAN, B., DAI, X.-P., HAMLIN, R. C., XUONG, N.-H., RUOSLAHTI, E. a ELY, K. R. (1994). Crystal structure of the tenth type iii cell

- adhesion module of human fibronectin. *Journal of molecular biology*, **236**(4), 1079–1092.
- EVANS, J. P. (1999). Sperm disintegrins, egg integrins, and other cell adhesion molecules of mammalian gamete plasma membrane interactions. *Front Biosci*, **4**(1), 114–131.
- EVANS, J. P. (2012). Sperm-egg interaction. *Annual review of physiology*, **74**, 477–502.
- EVANS, J. P., KOPF, G. S. a SCHULTZ, R. M. (1997). Characterization of the binding of recombinant mouse sperm fertilin β subunit to mouse eggs: Evidence for adhesive activity via an egg β 1 integrin-mediated interaction. *Developmental biology*, **187**(1), 79–93.
- FERNÁNDEZ-MIÑÁN, A., MARTÍN-BERMUDO, M. D. a GONZÁLEZ-REYES, A. (2007). Integrin signaling regulates spindle orientation in drosophila to preserve the follicular-epithelium monolayer. *Current Biology*, **17**(8), 683–688.
- FERRAZ, M., CAROTHERS, A., DAHAL, R., NOONAN, M. a SONGSASEN, N. (2019). Oviductal extracellular vesicles interact with the spermatozoon's head and mid-piece and improves its motility and fertilizing ability in the domestic cat. *Scientific reports*, **9**(1), 1–12.
- FLORMAN, H. a FISSORE, R. (2015). Chapter 4—fertilization in mammals. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, **1**, 149–196.
- FROLÍKOVÁ, M., STOPKOVÁ, R., ANTALÍKOVÁ, J., JOHNSON, P. M., STOPKA, P. a DVOŘÁKOVÁ-HORTOVÁ, K. (2012). Role of complement regulatory proteins cd46, cd55 and cd59 in reproduction. *Journal of Vertebrate Biology*, **61**(1), 84–94.
- FROLÍKOVÁ, M., ŠEBKOVÁ, N., DĚD, L. a DVOŘÁKOVÁ-HORTOVÁ, K. (2016). Characterization of cd46 and β 1 integrin dynamics during sperm acrosome reaction. *Scientific reports*, **6**, 33714.
- FROLÍKOVÁ, M., MAŇÁSKOVÁ-POSTLEROVÁ, P., ČERNÝ, J., JANKOVICOVÁ, J., ŠIMONÍK, O., POHLOVÁ, A., SEČOVÁ, P., ANTALÍKOVÁ, J. a DVOŘÁKOVÁ-HORTOVÁ, K. (2018). Cd9 and cd81 interactions and their structural modelling in sperm prior to fertilization. *International journal of molecular sciences*, **19**(4), 1236.
- FROLÍKOVÁ, M., VALÁŠKOVÁ, E., ČERNÝ, J., LUMEAU, A., ŠEBKOVÁ, N., PÁLENÍKOVÁ, V., SANCHEZ-HERNANDEZ, N., POHLOVÁ, A., MAŇÁSKOVÁ-POSTLEROVÁ, P. a DVOŘÁKOVÁ-HORTOVÁ, K. (2019). Addressing the compartmentalization of specific integrin heterodimers in mouse sperm. *International journal of molecular sciences*, **20**(5), 1004.
- FUSI, F., VIGNALI, M., BUSACCA, M. a BRONSON, R. A. (1992). Evidence for the presence of an integrin cell adhesion receptor on the oolemma of unfertilized human oocytes. *Molecular reproduction and development*, **31**(3), 215–222.
- FUSI, F., VIGNALI, M., GAILIT, J., a BRONSON, R. (1993). Mammalian oocytes exhibit specific recognition of the rgd (arg-gly-asp) tripeptide and express oolemmal integrins. *Molecular reproduction and development*, **36**(2), 212–219.
- FUSI, F., TAMBURINI, C., MANGILI, F., MONTESANO, M., FERRAI, A. a BRONSON, R. (1996). The expression of α v, α 5, β 1, and β 3 integrin chains on ejaculated human

- spermatozoa varies with their functional state. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, **2**(3), 169–175.
- GABLER, C., CHAPMAN, D. a KILLIAN, G. (2003). Expression and presence of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the oestrous cycle. *Reproduction*, **126**(6), 721–729.
- GADDUM-ROSSE, P. a BLANDAU, R. (1976). Comparative observations on ciliary currents in mammalian oviducts. *Biology of reproduction*, **14**(5), 605–609.
- GADELLA, B. M. a LUNA, C. (2014). Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. *Theriogenology*, **81**(1), 74–84.
- GAWANTKA, V., ELLINGER-ZIEGELBAUER, H. a HAUSEN, P. (1992). Beta 1-integrin is a maternal protein that is inserted into all newly formed plasma membranes during early xenopus embryogenesis. *Development*, **115**(2), 595–605.
- GEORGADAKI, K., KHOURY, N., SPANDIDOS, D. A. a ZOUMPOURLIS, V. (2016). The molecular basis of fertilization. *International journal of molecular medicine*, **38**(4), 979–986.
- GETTNER, S. N., KENYON, C. a REICHARDT, L. F. (1995). Characterization of beta pat-3 heterodimers, a family of essential integrin receptors in *c. elegans*. *The Journal of cell biology*, **129**(4), 1127–1141.
- GINSBERG, M. H., DU, X. a PLOW, E. F. (1992). Inside-out integrin signalling. *Current opinion in cell biology*, **4**(5), 766–771.
- GLANDER, H.-J. a SCHALLER, J. (1993). Beta 1-integrins of spermatozoa: a flow cytometric analysis. *International journal of andrology*, **16**(2), 105–111.
- GLANDER, H.-J., SCHALLER, J., ROHWEDDER, A. a HENKEL, R. (1998). Adhesion molecules and matrix proteins on human spermatozoa. *Andrologia*, **30**(4-5), 289–296.
- GONG, Q., GARVEY, K., QIAN, C., YIN, I., WONG, G. a TUCKER, R. P. (2014). Integrins of the starlet sea anemone *nematostella vectensis*. *The Biological Bulletin*, **227**(3), 211–220.
- HARPER, M. (1982). Sperm and egg transport. *Reproduction in Mammals. I. Germ Cells and Fertilization*, pages 102–127.
- HE, Z.-Y., BRAKEBUSCH, C., FÄSSLER, R., KREIDBERG, J. A., PRIMAKOFF, P. a MYLES, D. G. (2003). None of the integrins known to be present on the mouse egg or to be adam receptors are essential for sperm–egg binding and fusion. *Developmental biology*, **254**(2), 226–237.
- HERRERO, M. B., MANDAL, A., DIGILIO, L. C., COONROD, S. A., MAIER, B. a HERR, J. C. (2005). Mouse *sllp1*, a sperm lysozyme-like protein involved in sperm–egg binding and fertilization. *Developmental biology*, **284**(1), 126–142.
- HERTZLER, P. L. a MCCLAY, D. R. (1999). α su2, an epithelial integrin that binds laminin in the sea urchin embryo. *Developmental biology*, **207**(1), 1–13.

- HIROHASHI, N. a YANAGIMACHI, R. (2018). Sperm acrosome reaction: its site and role in fertilization. *Biology of reproduction*, **99**(1), 127–133.
- HODIVALA-DILKE, K. M., MCHUGH, K. P., TSAKIRIS, D. A., RAYBURN, H., CROWLEY, D., ULLMAN-CULLERÉ, M., ROSS, F. P., COLLER, B. S., TEITELBAUM, S. a HYNES, R. O. (1999). β 3-integrin-deficient mice are a model for glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. *The Journal of clinical investigation*, **103**(2), 229–238.
- HOGG, N., HENDERSON, R., LEITINGER, B., MCDOWALL, A., PORTER, J. a STANLEY, P. (2002). Mechanisms contributing to the activity of integrins on leukocytes. *Immunological reviews*, **186**(1), 164–171.
- HUMPHRIES, M. (2000). Integrin structure. *Biochem Soc Trans*, **28**(4), 311–340.
- HUNTER, R. a LEGLISE, P. (1971). Polyspermic fertilization following tubal surgery in pigs, with particular reference to the role of the isthmus. *Reproduction*, **24**(2), 233–246.
- HYNES, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, **110**(6), 673–687.
- IGNOTZ, G. G., CHO, M. Y. a SUAREZ, S. S. (2007). Annexins are candidate oviductal receptors for bovine sperm surface proteins and thus may serve to hold bovine sperm in the oviductal reservoir. *Biology of reproduction*, **77**(6), 906–913.
- IGUCHI, A., MÁRQUEZ, L. M., KNACK, B., SHINZATO, C., VAN OPPEN, M. J., WILLIS, B. L., HARDIE, K., CATMULL, J. a MILLER, D. J. (2007). Apparent involvement of a β 1 type integrin in coral fertilization. *Marine biotechnology*, **9**(6), 760–765.
- IKAWA, M., INOUE, N., BENHAM, A. M. a OKABE, M. (2010). Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *The Journal of clinical investigation*, **120**(4), 984–994.
- INOUE, N., IKAWA, M., ISOTANI, A. a OKABE, M. (2005). The immunoglobulin superfamily protein izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*, **434**(7030), 234–238.
- INOUE, N., HAGIHARA, Y., WRIGHT, D., SUZUKI, T. a WADA, I. (2015). Oocyte-triggered dimerization of sperm izumo1 promotes sperm-egg fusion in mice. *Nature communications*, **6**(1), 1–12.
- ISENBERG, W. M., MCEVER, R. P., PHILLIPS, D. R., SHUMAN, M. A. a BAINTON, D. F. (1987). The platelet fibrinogen receptor: an immunogold-surface replica study of agonist-induced ligand binding and receptor clustering. *The Journal of cell biology*, **104**(6), 1655–1663.
- ITO, C., YAMATOYA, K., YOSHIDA, K., MAEKAWA, M., MIYADO, K. a TOSHIMORI, K. (2010). Tetraspanin family protein cd9 in the mouse sperm: unique localization, appearance, behavior and fate during fertilization. *Cell and tissue research*, **340**(3), 583–594.
- JAHN, R., LANG, T. a SÜDHOF, T. C. (2003). Membrane fusion. *Cell*, **112**(4), 519–533.

- JANKOVICOVÁ, J., FROLÍKOVÁ, M., ŠEBKOVÁ, N., ŠIMON, M., CUPPEROVÁ, P., LIPCSEYOVÁ, D., MICHALKOVÁ, K., HOROVSKÁ, L., SEDLÁČEK, R., STOPKA, P. A KOL. (2016). Characterization of tetraspanin protein cd81 in mouse spermatozoa and bovine gametes. *Reproduction*, **152**(6), 785–793.
- JANKOVICOVÁ, J., FROLÍKOVÁ, M., PÁLENÍKOVÁ, V., VALÁŠKOVÁ, E., ČERNÝ, J., SEČOVÁ, P., BARTÓKOVÁ, M., HOROVSKÁ, L., MAŇÁSKOVÁ-POSTLEROVÁ, P., ANTALÍKOVÁ, J. A KOL. (2020). Expression and distribution of cd151 as a partner of alpha6 integrin in male germ cells. *Scientific Reports*, **10**(1), 1–12.
- JOHNSON, M. H., EAGER, D., MUGGLETON-HARRIS, A. a GRAVE, H. M. (1975). Mosaicism in organisation of concanavalin a receptors on surface membrane of mouse egg. *Nature*, **257**(5524), 321–322.
- JOOS, T. O., WHITTAKER, C. A., MENG, F., DESIMONE, D. W., GNAU, V. a HAUSEN, P. (1995). Integrin $\alpha 5$ during early development of xenopus laevis. *Mechanisms of development*, **50**(2-3), 187–199.
- KIERSZENBAUM, A. L., RIVKIN, E. a TRES, L. L. (2003). Acroplaxome, an f-actin–keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. *Molecular biology of the cell*, **14**(11), 4628–4640.
- KLÍNOVSKA, K., ŠEBKOVÁ, N. a DVOŘÁKOVÁ-HORTOVÁ, K. (2014). Sperm-egg fusion: a molecular enigma of mammalian reproduction. *International journal of molecular sciences*, **15**(6), 10652–10668.
- KOZLOV, M., LEIKIN, S., CHERNOMORDIK, L., MARKIN, V. a CHIZMADZHEV, Y. A. (1989). Stalk mechanism of vesicle fusion. *European Biophysics Journal*, **17**(3), 121–129.
- LEFEBVRE, R., LO, M. C. a SUAREZ, S. S. (1997). Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition. *Biology of Reproduction*, **56**(5), 1198–1204.
- LIN, X., TAN, S. M., LAW, S. A. a TORRES, J. (2006). Unambiguous prediction of human integrin transmembrane heterodimer interactions using only homologous sequences. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **65**(2), 274–279.
- LINDEMANN, C. a KANOUS, K. (1989). Regulation of mammalian sperm motility. *Archives of andrology*, **23**(1), 1–22.
- LIU, S., CALDERWOOD, D. A. a GINSBERG, M. H. (2000). Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *Journal of cell science*, **113**(20), 3563–3571.
- LORENZETTI, D., POIRIER, C., ZHAO, M., OVERBEEK, P. A., HARRISON, W. a BISHOP, C. E. (2014). A transgenic insertion on mouse chromosome 17 inactivates a novel immunoglobulin superfamily gene potentially involved in sperm–egg fusion. *Mammalian genome*, **25**(3-4), 141–148.
- LOVEGROVE, H. E., BERGSTRALH, D. T. a ST JOHNSTON, D. (2019). The role of integrins in drosophila egg chamber morphogenesis. *Development*, **146**(23).
- LUO, B.-H. a SPRINGER, T. A. (2006). Integrin structures and conformational signaling. *Current opinion in cell biology*, **18**(5), 579–586.

- LYONS, A., NARCIANDI, F., DONNELLAN, E., ROMERO-AGUIRREGOMEZCORTA, J., O'FARRELLY, C., LONERGAN, P., MEADE, K. G. a FAIR, S. (2018). Recombinant β -defensin 126 promotes bull sperm binding to bovine oviductal epithelia. *Reproduction, Fertility and Development*, **30**(11), 1472–1481.
- MARSDEN, M. a BURKE, R. (1997). Cloning and characterization of novel β integrin subunits from a sea urchin. *Developmental biology*, **181**(2), 234–245.
- MEEHAN, T. L., KLEINSORGE, S. E., TIMMONS, A. K., TAYLOR, J. D. a MCCALL, K. (2015). Polarization of the epithelial layer and apical localization of integrins are required for engulfment of apoptotic cells in the drosophila ovary. *Disease models & mechanisms*, **8**(12), 1603–1614.
- MEIGHAN, C. M. a SCHWARZBAUER, J. E. (2014). α integrin cytoplasmic tails have tissue-specific roles during c. elegans development. *The International journal of developmental biology*, **58**(5), 325.
- MIKI, K. a CLAPHAM, D. E. (2013). Rheotaxis guides mammalian sperm. *Current Biology*, **23**(6), 443–452.
- MILLER, B. J., GEORGES-LABOUESSE, E., PRIMAKOFF, P. a MYLES, D. G. (2000). Normal fertilization occurs with eggs lacking the integrin $\alpha 6\beta 1$ and is cd9-dependent. *The Journal of cell biology*, **149**(6), 1289–1296.
- MIYADO, K., YAMADA, G., YAMADA, S., HASUWA, H., NAKAMURA, Y., RYU, F., SUZUKI, K., KOSAI, K., INOUE, K., OGURA, A. a KOL. (2000). Requirement of cd9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science*, **287**(5451), 321–324.
- MIYADO, K., YOSHIDA, K., YAMAGATA, K., SAKAKIBARA, K., OKABE, M., WANG, X., MIYAMOTO, K., AKUTSU, H., KONDO, T., TAKAHASHI, Y. a KOL. (2008). The fusing ability of sperm is bestowed by cd9-containing vesicles released from eggs in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**(35), 12921–12926.
- MOUGUELAR, V. S., CABADA, M. O. a COUX, G. (2011). The integrin-binding motif rgds induces protein tyrosine phosphorylation without activation in bufo arenarum (amphibia) oocytes. *Reproduction*, **141**(5), 581.
- MÜLLER, A. H., GAWANTKA, V., DING, X. a HAUSEN, P. (1993). Maturation induced internalization of $\beta 1$ -integrin by xenopus oocytes and formation of the maternal integrin pool. *Mechanisms of development*, **42**(1-2), 77–88.
- MURRAY, G., REED, C., MARSDEN, M., RISE, M., WANG, D. a BURKE, R. D. (2000). The $\alpha b\beta c$ integrin is expressed on the surface of the sea urchin egg and removed at fertilization. *Developmental biology*, **227**(2), 633–647.
- NAKANISHI, T., ISOTANI, A., YAMAGUCHI, R., IKAWA, M., BABA, T., SUAREZ, S. S. a OKABE, M. (2004). Selective passage through the uterotubal junction of sperm from a mixed population produced by chimeras of calmegin-knockout and wild-type male mice. *Biology of reproduction*, **71**(3), 959–965.
- NEGREIROS, É., FONTENELE, M., CÂMARA, A. R. a ARAUJO, H. (2010). $\alpha ps1\beta ps$ integrin receptors regulate the differential distribution of sog fragments in polarized epithelia. *genesis*, **48**(1), 31–43.

- NICHOLSON, A. C., MALIK, S.-B., LOGSDON, J. M. a VAN MEIR, E. G. (2005). Functional evolution of adamts genes: evidence from analyses of phylogeny and gene organization. *BMC evolutionary biology*, **5**(1), 11.
- NISHIMURA, H., CHO, C., BRANCIFORTE, D. R., MYLES, D. G. a PRIMAKOFF, P. (2001). Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin β . *Developmental biology*, **233**(1), 204–213.
- OKABE, M. (2013). The cell biology of mammalian fertilization. *Development*, **140**(22), 4471–4479.
- OSYCKA-SALUT, C. E., CASTELLANO, L., FORNES, D., BELTRAME, J. S., ALONSO, C. A., JAWERBAUM, A., FRANCHI, A., DÍAZ, E. S. a PEREZ MARTINEZ, S. (2017). Fibronectin from oviductal cells fluctuates during the estrous cycle and contributes to sperm–oviduct interaction in cattle. *Journal of cellular biochemistry*, **118**(11), 4095–4108.
- PANCER, Z., KRUSE, M., MÜLLER, I. a MÜLLER, W. (1997). On the origin of metazoan adhesion receptors: cloning of integrin alpha subunit from the sponge geodia cydonium. *Molecular biology and evolution*, **14**(4), 391–398.
- PARK, Y., AHN, S.-J., VOGEL, H. a KIM, Y. (2014). Integrin β subunit and its rna interference in immune and developmental processes of the oriental tobacco budworm, *heliothis virescens*. *Developmental & Comparative Immunology*, **47**(1), 59–67.
- PRIMAKOFF, P., HYATT, H. a TREDICK-KLINE, J. (1987). Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *The Journal of cell biology*, **104**(1), 141–149.
- PUGA MOLINA, L. C., LUQUE, G. M., BALESTRINI, P. A., MARÍN-BRIGGILER, C. I., ROMAROWSKI, A. a BUFFONE, M. G. (2018). Molecular basis of human sperm capacitation. *Frontiers in cell and developmental biology*, **6**, 72.
- RAMÍREZ-RAMÍREZ, D., SALGADO-LUCIO, M. L., ROA-ESPITIA, A. L., FIERRO, R., GONZÁLEZ-MÁRQUEZ, H., CORDERO-MARTÍNEZ, J. a HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, E. O. (2019). Rac1 is necessary for capacitation and acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Journal of cellular biochemistry*.
- RAPOSO, G. a STOOORVOGEL, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, **200**(4), 373–383.
- REBER-MÜLLER, S., STUDER, R., MÜLLER, P., YANZE, N. a SCHMID, V. (2001). Integrin and talin in the jellyfish podocoryne carnea. *Cell biology international*, **25**(8), 753–769.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H., SARAVIA, F., WALLGREN, M., TIENHAI, P., JOHAN-
NISSON, A., VÁZQUEZ, J. M., MARTÍNEZ, E., ROCA, J., SANZ, L. a CALVETE,
J. J. (2005). Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology*, **63**(2), 514–535.
- RUBINSTEIN, E., ZIYYAT, A., PRENANT, M., WROBEL, E., WOLF, J.-P., LEVY, S.,
LE NAOUR, F. a BOUCHEIX, C. (2006). Reduced fertility of female mice lacking cd81. *Developmental biology*, **290**(2), 351–358.

- RUNGE, K. E., EVANS, J. E., HE, Z.-Y., GUPTA, S., McDONALD, K. L., STAHLBERG, H., PRIMAKOFF, P. a MYLES, D. G. (2007). Oocyte cd9 is enriched on the microvillar membrane and required for normal microvillar shape and distribution. *Developmental biology*, **304**(1), 317–325.
- SACHDEV, M., MANDAL, A., MULDER, S., DIGILIO, L. C., PANNEERDOSS, S., SURYAVATHI, V., PIRES, E., KLOTZ, K. L., HERMENS, L., HERRERO, M. B. A KOL. (2012). Oocyte specific oolemmal sas1b involved in sperm binding through intra-acrosomal sllp1 during fertilization. *Developmental biology*, **363**(1), 40–51.
- SANTELLA, L., ALIKANI, M., TALANSKY, B. E., COHEN, J. a DALE, B. (1992). Is the human oocyte plasma membrane polarized? *Human Reproduction*, **7**(7), 999–1003.
- SATOUH, Y., INOUE, N., IKAWA, M. a OKABE, M. (2012). Visualization of the moment of mouse sperm–egg fusion and dynamic localization of izumo1. *Journal of cell science*, **125**(21), 4985–4990.
- SCHWARZ, A., WENNEMUTH, G., POST, H., BRANDENBURGER, T., AUMÜLLER, G. a WILHELM, B. (2013). Vesicular transfer of membrane components to bovine epididymal spermatozoa. *Cell and tissue research*, **353**(3), 549–561.
- SENGOKU, K., TAKUMA, N., MIYAMOTO, T., HORIKAWA, M. a ISHIKAWA, M. (2004). Integrins are not involved in the process of human sperm–oolemmal fusion. *Human reproduction*, **19**(3), 639–644.
- SHILLING, F. M., KRÄTZSCHMAR, J., CAI, H., WESKAMP, G., GAYKO, U., LEIBOW, J., MYLES, D. G., NUCCITELLI, R. a BLOBEL, C. P. (1997). Identification of metalloprotease/disintegrins in xenopus laevis testis with a potential role in fertilization. *Developmental biology*, **186**(2), 155–164.
- SHOEMAKER, B. A., PORTMAN, J. J. a WOLYNES, P. G. (2000). Speeding molecular recognition by using the folding funnel: the fly-casting mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**(16), 8868–8873.
- STANTON, J. a GREEN, D. (2001). A set of 840 mouse oocyte genes with well-matched human homologues. *Molecular human reproduction*, **7**(6), 521–543.
- SUAREZ, S. S. (2015). Gamete and zygote transport. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, **1**, 197–232.
- SUAREZ, S. S. (2016). Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. *Cell and tissue research*, **363**(1), 185–194.
- SUSAN, J. M., JUST, M. L. a LENNARZ, W. J. (2000). Cloning and characterization of α p integrin in embryos of the sea urchin stronglyloccentrotus purpuratus. *Biochemical and biophysical research communications*, **272**(3), 929–935.
- TAKADA, Y., YE, X. a SIMON, S. (2007). The integrins. *Genome biology*, **8**(5), 215.
- TARONE, G., RUSSO, M. A., HIRSCH, E., ODORISIO, T., ALTRUDA, F., SILENGO, L. a SIRACUSA, G. (1993). Expression of beta 1 integrin complexes on the surface of unfertilized mouse oocyte. *Development*, **117**(4), 1369–1375.

- TEIJEIRO, J. M. a MARINI, P. E. (2012). The effect of oviductal deleted in malignant brain tumor 1 over porcine sperm is mediated by a signal transduction pathway that involves pro-akap4 phosphorylation. *Reproduction*, **143**(6), 773–785.
- TOSHIMORI, K. a EDDY, E. (2015). The spermatozoon. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, **1**, 99–148.
- VJUGINA, U., ZHU, X., OH, E., BRACERO, N. J. a EVANS, J. P. (2009). Reduction of mouse egg surface integrin alpha9 subunit (itga9) reduces the egg's ability to support sperm-egg binding and fusion. *Biology of reproduction*, **80**(4), 833–841.
- WAGNER, A., EKHLASI-HUNDRIESER, M., HETTEL, C., PETRUNKINA, A., WABERSKI, D., NIMTZ, M. a TÖPFER-PETERSEN, E. (2002). Carbohydrate-based interactions of oviductal sperm reservoir formation—studies in the pig. *Molecular reproduction and development*, **61**(2), 249–257.
- WEGENER, K. L., PARTRIDGE, A. W., HAN, J., PICKFORD, A. R., LIDDINGTON, R. C., GINSBERG, M. H. a CAMPBELL, I. D. (2007). Structural basis of integrin activation by talin. *Cell*, **128**(1), 171–182.
- WENNEMUTH, G., BABCOCK, D. F. a HILLE, B. (2003). Calcium clearance mechanisms of mouse sperm. *The Journal of general physiology*, **122**(1), 115–128.
- WHITTAKER, C. A. a DESIMONE, D. W. (1993). Integrin alpha subunit mrnas are differentially expressed in early xenopus embryos. *Development*, **117**(4), 1239–1249.
- YAMAGUCHI, R., FUJIHARA, Y., IKAWA, M. a OKABE, M. (2012). Mice expressing aberrant sperm-specific protein pmis2 produce normal-looking but fertilization-incompetent spermatozoa. *Molecular biology of the cell*, **23**(14), 2671–2679.
- YU, J., LEE, C.-Y., CHANGOU, C. A., CEDANO-PRIETO, D. M., TAKADA, Y. K. a TAKADA, Y. (2017). The cd9, cd81, and cd151 ec2 domains bind to the classical rgd-binding site of integrin $\alpha v\beta 3$. *Biochemical Journal*, **474**(4), 589–596.
- ZANETTI, N. a MAYORGA, L. S. (2009). Acrosomal swelling and membrane docking are required for hybrid vesicle formation during the human sperm acrosome reaction. *Biology of reproduction*, **81**(2), 396–405.
- ZIYYAT, A., RUBINSTEIN, E., MONIER-GAVELLE, F., BARRAUD, V., KULSKI, O., PRENANT, M., BOUCHEIX, C., BOMSEL, M. a WOLF, J.-P. (2006). Cd9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin $\alpha 6\beta 1$, which are involved in human and mouse gamete fusion. *Journal of cell science*, **119**(3), 416–424.
- ZUCCOTTI, M., PICCINELLI, A., ROSSI, P. G., GARAGNA, S. a REDI, C. A. (1995). Chromatin organization during mouse oocyte growth. *Molecular reproduction and development*, **41**(4), 479–485.
- ZUCCOTTI, M., ROSSI, P. G., FIORILLO, E., GARAGNA, S., FORABOSCO, A. a REDI, C. A. (1998). Timing of gene expression and oolemma localization of mouse $\alpha 6$ and $\beta 1$ integrin subunits during oogenesis. *Developmental biology*, **200**(1), 27–34.

A. Přílohy

A.1 Ligandy lidských integrinů

Tabulka A.1: Ligandy lidských integrinů. Převzato z Takada a kol. (2007).

Integrin	Ligandy
$\alpha 1\beta 1$	Laminin, kolagen
$\alpha 2\beta 1$	Laminin, kolagen, trombospondin, E-kadherin, tenascin
$\alpha 3\beta 1$	Laminin, trombospondin, uPAR
$\alpha 4\beta 1$	trombospondin, MAdCAM-1, VCAM-1, fibronektin, osteopontin, ADAM, ICAM-4
$\alpha 5\beta 1$	Fibronektin, osteopontin, fibrilin, trombospondin, ADAM, COMP, L1
$\alpha 6\beta 1$	Laminin, trombospondin, ADAM, Cyr61
$\alpha 7\beta 1$	Laminin
$\alpha 8\beta 1$	Tenascin, fibronektin, osteopontin, vitronektin, LAP-TGF- β , nefronektin
$\alpha 9\beta 1$	Tenascin, VCAM-1, osteopontin, uPAR, plasmin, angiostatin, ADAM, VEGF-C, VEGF-D
$\alpha 10\beta 1$	Laminin, kolagen
$\alpha 11\beta 1$	Kolagen
$\alpha V\beta 1$	LAP-TGF- β , fibronektin, osteopontin, L1
$\alpha L\beta 2$	ICAM, ICAM-4
$\alpha M\beta 2$	ICAM, iC3b, faktor X, fibrinogen, ICAM-4, heparin
$\alpha X\beta 2$	ICAM, iC3b, fibrinogen, ICAM-4, heparin, kolagen
$\alpha D\beta 2$	ICAM, VCAM-1, fibrinogen, fibronektin, vitronektin, Cyr61, plasminogen
$\alpha IIb\beta 3$	Fibrinogen, trombospondin, fibronektin, vitronektin, vWF, Cyr61, ICAM-4, L1, CD40 ligand
$\alpha V\beta 3$	Fibrinogen, vitronektin, vWF, trombospondin, fibrilin, tenascin, PECAM-1, fibronektin, osteopontin, BSP, MFG-E8, ADAM-15, COMP, Cyr61, ICAM-4, MMP, FGF-2, uPA, uPAR, L1, angiostatin, plasmin, kardiotoxin, LAP-TGF- β , Del-1
$\alpha 6\beta 4$	Laminin
$\alpha V\beta 5$	Osteopontin, BSP, vitronektin, CCN3, LAP-TGF- β
$\alpha V\beta 6$	LAP-TGF- β , fibronektin, osteopontin, ADAM
$\alpha 4\beta 7$	MAdCAM-1, VCAM-1, fibronektin, osteopontin
$\alpha E\beta 7$	E-kadherin
$\alpha V\beta 8$	LAP-TGF- β