

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Monika Hortová

Molekulární mechanismy účastníci se interakce spermie a vajíčka

Molecular mechanisms involved in sperm-egg interaction

Bakalářská práce

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

Praha, 2017

Prohlášení:

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

V Praze dne.....

.....

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala RNDr. Kateřině Hortové, Ph.D. za vedení práce a její připomínky při vypracovávání práce. Dále bych rád poděkovala všem, kteří mě během studia podporovali.

Abstrakt

Pohlavní reprodukce zajišťuje šíření téměř všech živočišných druhů. Dvě morfologicky velmi odlišné buňky, které se vyvíjí výhradně u samce nebo samice, hrají roli při vytváření nového a geneticky odlišného organismu. U savců se tyto dvě haploidní buňky, spermie a vajíčko, setkávají v samičím reprodukčním traktu, interagují a nakonec fúzí, aby se staly jedinou diploidní buňkou.

Na základě *in vitro* fertilizace byl tento proces dobře popsán, ale molekulární detaily, a především receptorové proteiny, zůstávají předmětem vědeckého zkoumání. Charakterizace těchto molekulárních mechanismů, které jsou zásadní pro interakci membrán spermie a vajíčka včetně jejich vazby a fúze, je tedy výzvou novodobé reprodukční biologie, jejíž výstupy mají zásadní přesah do asistované reprodukce ve veterinární praxi i humánním lékařství, především v asistované reprodukci.

Doposud byla prokázána nezastupitelnost proteinů, účastnících se primární vazby a fúze spermie s vajíčkem (IZUMO1, CD9, JUNO) a u dalších (CD46, tetraspaniny) byly objeveny funkce zcela nové, pro reprodukční proces však nezbytné. Jednotlivé i komplexní interakce proteinů a jejich receptorů jsou klíčovým bodem pro pochopení procesu oplození a jeho dílčích kroků. Vyřazením funkce genů pro jednotlivé proteiny se potvrzuje jejich nezastupitelnost při adhezi či fúzi.

Klíčová slova:

Spermie, vajíčko, IZUMO1, CD9, JUNO, ADAM, tetraspaninová síť, interakce gamet

Abstract

Sexual reproduction ensures spread of almost every animal species. Two morphologically very different cells, which develop exclusively in males or females, play role in the formation of new and genetically different organism. In mammals, these two haploid cells, the sperm and the egg, meet in the female reproductive tract. After the interaction, they fuse and later become the diploid cell. Based on *in vitro* fertilization, this process has been well described, but molecular details and especially receptor proteins remain the subject of scientific research.

Determining the molecular mechanisms important for the sperm-egg membrane interaction, including the binding and fusion, is a major challenge for current reproductive biology with a significant importance on animal and human reproductive programmes. So far, many proteins have been selected to be fusion candidates, some of them (IZUMO1, CD9, JUNO) were proven to be essential, whereas others were discovered to play an unsuspected new active role (CD46, tetraspanins). The individual and complex proteins' and receptors' interactions are the key for understanding the fertilization process and its sub-steps. Removing the gene function for individual proteins confirms their irreplaceability in adhesion and fusion.

Keywords:

Sperm, egg, IZUMO1, CD9, JUNO, ADAM, tetraspanin web, gametes interaction

Obsah

Seznam použitých zkratké.....	1
Úvod.....	2
1 Samčí a samičí gamety	3
1.1. Spermie	3
1.2. Vajíčko.....	7
2 Interagující proteiny.....	13
2.1. Interagující proteiny u spermie.....	13
2.2. Interagující proteiny u vajíčka.....	17
3 Interakce proteinů	22
Závěr	24
Seznam obrázků	25
Seznam literatury.....	26

Seznam použitých zkratk

ADAM	a disintegrin and metalloprotease
AR	akrozomální reakce
ATP	adenosintrifosfát
CD	cluster of differentiation
DNA	deoxyribonukleová kyselina
IgSF	immunoglobulin superfamily
KO	knock-out
Tssk	testis-specific serine kinase
VM	vitelinní membrána
WT	wild-type
ZP	zona pellucida

Úvod

Po splnutí haploidních gamet dochází k vývoji a růstu nového diploidního organismu, jehož genom je složen z genetické informace obou rodičů. Tento přenos genů na potomstvo je jedním z existenčních důvodů pohlavního rozmnožování.

Tato bakalářská práce se v úvodní části zabývá vývojem a maturačními procesy, kterými spermie prochází, jejich strukturou a pohybem. Před prvním kontaktem spermie s vajíčkem dochází k maturačním procesům (akrozomální reakce, kapacitace), které mění fyziologii spermie, a jsou nezbytné pro její další interakce. U vajíčka je popsána maturace a struktura, včetně porovnání struktury vaječných obalů různých živočišných druhů. Práce se rovněž věnuje procesům, které samotnému splnutí spermie a vajíčka předcházejí. Již vzájemné rozpoznání gamet je podstatnou součástí oplození. V případě mnoha vodních živočichů s vnějším oplozením (obojživelníci, ryby) vylučuje tento krok mezidruhové oplození. Současně popisuje molekulární reakce jako je chemotaxe či termotaxe, usnadňující atrakci gamet, nebo mechanismy zabraňující polyspermii, tedy vniku více spermií do vajíčka.

Nejobsáhlejší částí práce je popis struktury a funkce proteinů lokalizovaných na gametách. U spermie se jedná o IZUMO1, člena IgSF považovaného za esenciální fúzní protein, nebo proteiny z rodiny ADAM, které jsou nezbytné pro adhezi. Na vajíčku je zásadní přítomnost JUNO a jeho kooperace s CD9, hlavním organizátorem tetraspaninové sítě. Tetraspaniny také spolupracují s proteiny, jako jsou IgSF (IZUMO1), integriny ($\alpha_6\beta_1$), GPI kotvené proteiny (JUNO) nebo ve spojení tetraspanin-tetraspanin (CD9, CD81). Tetraspaninová síť se jako celek podílí na adhezi a fúzi gamet. Dále jsou popsány proteiny CD9 a CD81, které jsou lokalizované na obou gametách. Jejich funkce se ovšem během adhezních a fúzních procesů liší.

Závěrečná kapitola bakalářské práce je věnována proteinovým interakčním sítím, které zprostředkovávají interakci gamet. Vzájemné rozpoznání, první kontakt a adheze spermie a vajíčka jsou klíčové okamžiky, předcházející fúzi membrán pohlavních buněk, jejichž podstata je náplní této bakalářské práce.

1 Samčí a samičí gamety

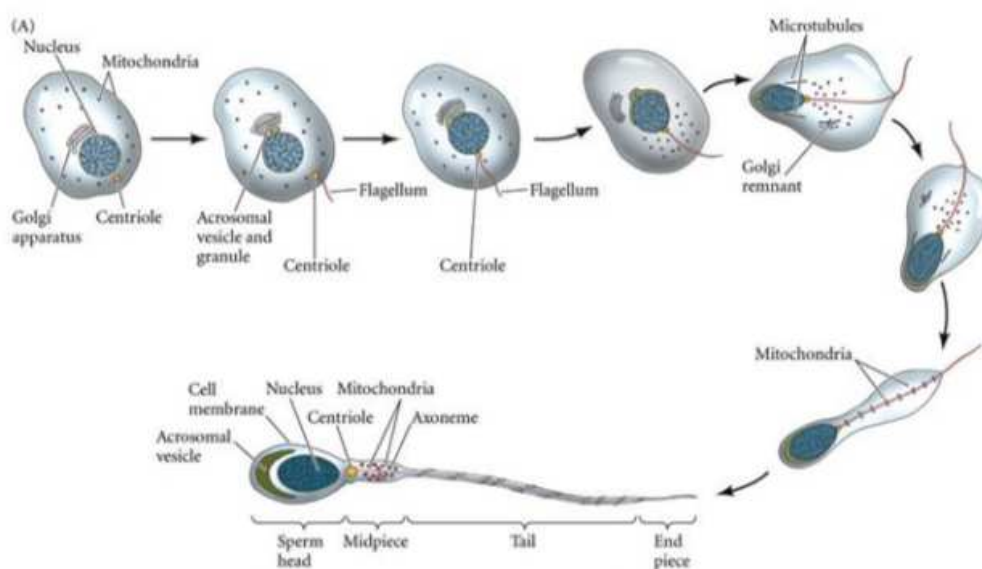
1.1. Spermie

Již od 17. století byly spermie zájmem studia mnoha biologů. Anton van Leeuwenhoek se domníval, že se jedná pouze o parazity v ejakulátu. Později objevil jejich nezbytnou funkci při oplodnění a zveřejnil, že se jedná o semínka, která již obsahují malé embryo tzv. Homunculus, které pak v matce, jakožto vhodném prostředí, dozrává a tím vzniká nový jedinec [1].

Velmi podrobné a přesnější informace pak získali Oscar Hertwig a Herman Fol (1876), kteří prokázali vstup pouze jedné spermie do vajíčka a následné spojení jader. Pozorování prováděli na mořské ježovce, nejen kvůli její dobré dostupnosti a pohlavní zralosti, ale především kvůli velké produkci vajíček [1].

Modifikací zárodečných buněk se během spermatogeneze utváří jednotlivé části spermie, viz obrázek č. 1. Dochází k elongaci kulaté zárodečné buňky do typické podlouhlé struktury spermie s pohyblivým bičíkem. Z centrioly vyrůstá dlouhý bičík na budoucí posteriorní straně gamety. Zdrojem jeho pohybu je svazek mikrotubulů uvnitř bičíku tzv. axonema, tvořený dvěma centrálními a devíti soustřednými páry mikrotubulů. Základním stavebním proteinem je tubulin, který úzce kooperuje s dyneinem. Dynein, jakožto ATPáza, přeměňuje chemickou energii na mechanickou (pohyb vláken mikrotubulů), což se projeví jako ohýbání bičíku a tedy samotný pohyb spermie. Golgiho aparát uvolňuje váčky, které formují tzv. akrozom na anteriorní straně. Enzymy a cukry z Golgiho aparátu, později uvolněné z akrozomu, se podílí na akrozomální reakci (viz kapitola 1.2) a tedy na průchodu vnějšími obaly vajíčka [1]. Během elongace buňky se specificky formuje také hlavička obsahující kondenzované haploidní jádro. Histony jsou během spermatogeneze postupně nahrazeny protaminy, jejichž vazba na DNA má za následek vznik nenabitého chromatinu, který je možné kondenzovat až do objemu dvacetiny somatického jádra. Tím lze nepřímo ovlivnit malý, hydrodynamický tvar hlavičky [2]. Mitochondrie se shromažďují ve střední části bičíku, tzv. midpiece. Jedná se o strategické místo: mitochondrie vytváří spirály okolo axonemy, ze kterých efektivně dodávají ATP dyneinu. Spermie savců obsahuje 50–75 mitochondrií, zatímco vajíčko 10^5 až 10^8 [3]. Jak bylo prokázáno u býků, spermie jsou uspořádány do tří spirál, každá z nich má cca 24 - 25 otáček, což odpovídá jedné mitochondrii na otáčku [4].

Pohyb spermie je ovlivněn látkami produkovanými samičím traktem. Směr je rozpoznán jednak na základě teploty, kterou kapacitované spermie savců rozpoznají až s rozdílem 2°C, jedná se o tzv. termotaxi [5], a také pomocí chemotaxe. Do suspenze spermií byla injikována folikulární tekutina a spermie pak změnily směr pohybu právě k folikulární tekutině [6]. Záleží zde také na zralosti gamet. U většiny savců je oocyt schopný oplození v druhém meiotickém dělení (viz kapitola 2), v této fázi již označovaný jako vajíčko, kdy vykazuje zmiňovanou chemotaktickou aktivitu. U ježovky působí chemotakticky peptid RESACT, produkovaný slizovým obalem, který v nízkých koncentracích aktivuje syntézu dyneinu. Tím dojde ke zrychlení pohybu spermie a směřování ke zdroji, tedy k vajíčku [7].



Obrázek 1: Vývoj spermie; Zdroj: [8]

Spermie savců uvolněné z nadvarlat, ačkoli schopné výše popisované pohybu a plně maturované, nejsou okamžitě schopné fúze s vajíčkem. Nejdůležitější procesy proběhnou právě během jejich průniku samčím, a především samičím traktem. Ačkoli se obecně uvádí, že pouze nejrychlejší spermie oplodní vajíčko, je nasnadě si připomenout, že se nejedná pouze o rychlost pohybu gamety, ale především o její fyziologickou zralost. Nejrychlejší spermie tedy často neprojde potřebnými procesy a není možné její splnutí s vajíčkem.

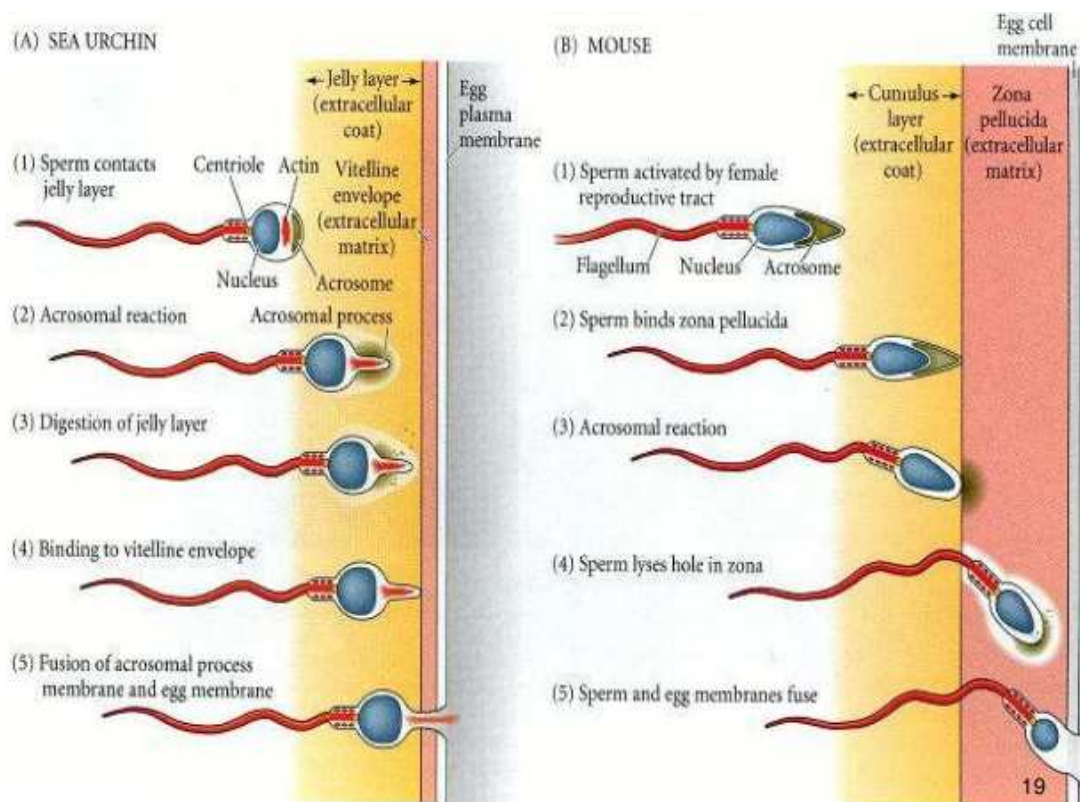
Veškeré tyto procesy jsou souhrnně označovány jako kapacitace. Veškeré molekulární mechanismy, ke kterým během kapacitace dochází, nejsou doposud podrobně specifikovány. Mezi nejdůležitější patří hyperpolarizace membrány (vstup Ca^{2+} a aktivace cAMP, který funguje jako druhý posel a spouští proces kapacitace pomocí aktivace tyrozinových kináz); fosforylace

proteinů, které později utváří receptory na povrchu nebo odstraňování cholesterolu z membrány, tím také dochází ke změně lokace lipidových raftů, které se později účastní akrozomální reakce (*viz níže*), na anteriorní stranu hlavičky spermie [9]. Kapacitovaná spermie je u savců schopná proniknout vrstvou kumulárních buněk a především začít i dokončit akrozomální reakci již před kontaktem s glykoproteinovým obalem vajíčka, tzv. zona pellucida (ZP).

Nekapacitované spermie se před vstupem do krčku vejcovodu vážou na membránu oviduktálních buněk, toto spojení je pak přerušeno dosažením kapacitace [10]. Tím zřejmě dochází k prodloužení času, kdy může dojít ke kapacitaci a následné AR a zároveň k prodloužení doby, během které je možné setkání gamet v oviduktu. Další funkcí se jeví prevence polyspermie, dochází totiž k postupnému uvolňování spermií.

Po vzájemném rozpoznání gamet a kapacitaci je dalším klíčovým procesem právě akrozomální reakce. Pouze spermie, které prošly akrozomální reakcí, jsou schopny proniknout do periviteliní oblasti vajíčka, a to díky fúzi akrozomální a plazmatické membrány spermie. To má za následek exocytózu akrozomu a odhalení proteinů na vnitřní membráně spermie, které se podílejí na navázání spermie na vajíčko. Během exocytózy dochází k uvolnění proteolytických enzymů a proteasomů, které umožní proniknutí skrz obaly vajíčka [11]. U savců iniciuje exocytózu akrozomu kontakt spermie na ZP, viz obrázek č. 2(B). Uvolněné enzymy naruší strukturu ZP a umožní průnik skrz ni k membráně vajíčka, se kterou spermie fúzuje.

U mořských ježovek, kde se jedná o vnější oplození, iniciuje AR již kontakt se slizovým obalem vajíčka, viz obrázek č. 2(A). Dochází k vazbě membránových proteinů spermie a komplexu cukrů ve slizovém obalu, k exocytóze akrozomu, průniku spermie slizovým obalem k vitelinní membráně (VM) (*viz kapitola 1.2*) a vazbě akrozomálního proteinu bindinu na receptory vajíčka. Jedná se přísně o specifickou vazbu, která zamezuje mezidruhovému oplození. Následuje adheze a fúze spermie s buněčnou membránou vajíčka [12].

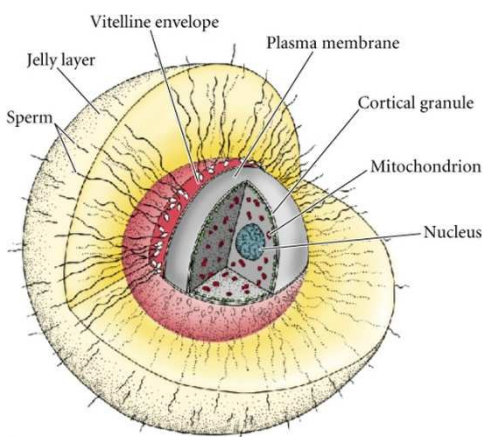


Obrázek 2: Exocytóza akrozomu (A) u ježovky (B) u myši; Zdroj: [1]

Během AR tedy také dochází k relokaci fúzního proteinu IZUMO1 (viz kapitola 3.1) z membrány do ekvatoriální roviny hlavičky spermie, tedy do oblasti, kde později interaguje s vazebným partnerem na vajíčku. Pohyb proteinu je závislý na aktinovém cytoskeletu a serin kináze Tssk (testis-specific serine kinase) [13]. Kinázy z rodiny Tssk jsou, jak je podle názvu patrné, produkovány téměř výhradně varlaty. Konkrétně kinázy Tssk 1, 2, 4 a 6 u myši a Tssk 1, 2 a 6 u člověka jsou detekovány na spermích. Tssk 1 a 4, lokalizované jak na anteriorní straně hlavičky, tak v bičíku, nejsou po dokončení AR dále detekovatelné. Zatímco Tssk 2 a 6, po AR stále přítomné, jsou lokalizované právě v oblasti hlavičky spermie, kde je zároveň vysoká koncentrace aktinu, a pravděpodobně se nepřímou účastní i fúze membrán. Důkazem je fakt, že u knock-out (KO) Tssk 6 spermí nedochází k žádoucí relokaci IZUMO1, s čímž úzce souvisí nemožnost fúze těchto spermí s vajíčkem [14].

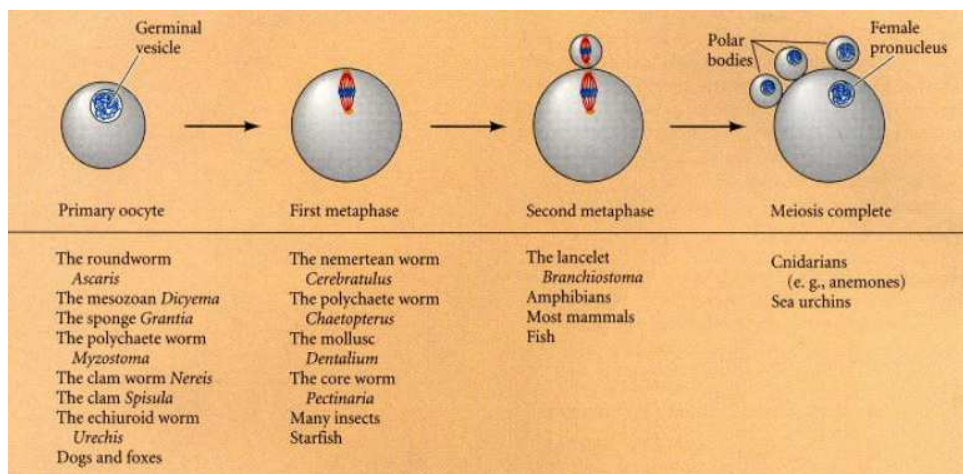
1.2. Vajíčko

Ačkoli mají obě pohlavní buňky rovnocenné haploidní jádro, samičí gameta je na rozdíl od spermie velmi bohatě zásobená cytoplazmatickým materiálem, obsahuje proteiny s vyživující funkcí (žloutek), tRNA, mRNA, ribozomy, ale i morfogenní faktory a protektivní látky. To se projevuje i na velikosti buňky, například vajíčko mořské ježovky je až 10 000krát větší než spermie [1], viz obrázek č. 3.



Obrázek 3: Struktura vajíčka ježovky; Zdroj: [15]

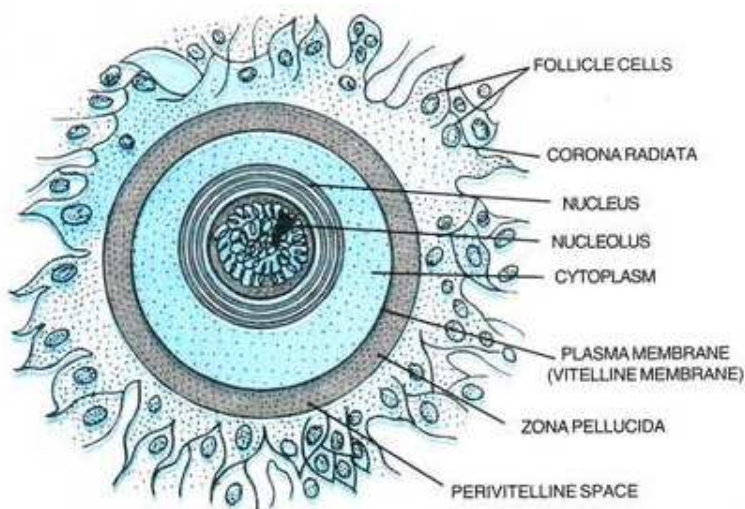
Maturující gameta je označována jako oocyt až do fáze meiózy, ve které je schopna oplození. U většinu savců, ale také u obojživelníků a ryb, je tedy označována jako vajíčko ve druhé metafázi. Výjimku u savců tvoří lišky a psi, jejichž vajíčka jsou schopna oplození již v podobě primárního oocytu. Tímto se liší například od ježovky, jejíž vajíčka jsou schopna oplození až po dokončení meiózy [16] viz obrázek č. 4. Zajímavý je tedy i rozdíl ve velikosti jader. Zatímco vajíčko ježovky má po dokončeném meiotickém dělení již haploidní jádro, vajíčko většiny savců obsahuje při splynutí se spermii stále diploidní jádro, až poté je dokončena meióza.



Obrázek 4: Maturace vajíčka; Zdroj: [16]

Cytoplazma vajíčka (obalující jádro, mitochondrie aj.) je ohraničena plazmatickou membránou, která hraje důležitou roli při fúzi gamet a regulaci transportu iontů. Další vrstvou s ochrannou a selekční funkcí je u savců glykoproteinový obal, tzv. ZP. Mezi plazmatickou membránou a ZP tak vzniká tzv. periviteliní oblast. Vnější obal pak tvoří souvislá vrstva kumulárních buněk (cumulus oophorus) s ochrannou a vyživující funkcí. Vnitřní vrstva kumulárních buněk, těsně přiléhající k ZP, se nazývá corona radiata. Všechny uvedené vaječné obaly jsou zobrazeny na obrázku číslo 5.

U zmiňované ježovky, ale i jiných živočišných druhů jako jsou ptáci, je ZP nahrazena VM (viz níže). Alternativou kumulárních buněk je u ježovky slizový obal, který má ochrannou funkci a zároveň se podílí na atrakci spermií.

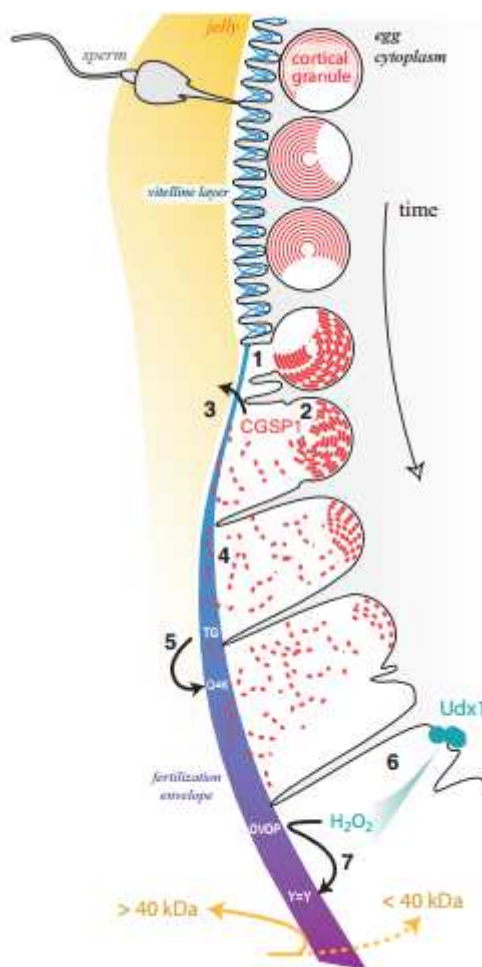


Obrázek 5: Struktura vajíčka savců; Zdroj: [17]

Buněčná membrána tedy uzavírá cytoplazmatický obsah vajíčka, u savců je rozdělena na dvě oblasti: hladká část přímo obalující metafázující chromosomy, a druhá část, pokrytá mikrokilky (microvilli), kde dochází ke kontaktu se spermii (*viz níže*) [9].

Tenká vrstva cytoplazmatických buněk těsně přiléhající k membráně tvoří tzv. cortex, která obsahuje aktin. Během oplození aktin polymerizuje do dlouhých mikrofilament, která jsou nezbytná pro další diferenciaci buňky. Dále utváří zmiňované mikrokilky na povrchu vajíčka, které pomáhají při atrakci spermie (*viz kapitola 2.2*). Uvnitř cortex se vyskytují kortikální granula, produkty Golgiho aparátu obsahující proteolytické enzymy, podobná akrozomálním enzymům u spermie. Zatímco spermie ježovky má jeden akrozomální váček, u vajíčka nalezneme až 15 000 granul [1]. K uvolnění kortikálních granul dochází během pomalého bloku polyspermie (*viz níže*).

Kortikální reakce, která je iniciována zvýšením koncentrace Ca^{2+} , který je způsobený narušením vaječných obalů. Obrázek č. 6 zobrazuje schéma kortikální reakce: v prostředí bohatém na vápník fúzí kortikální granula s buněčnou membránou a vylučují svůj obsah pomocí exocytózy. Uvolněné serin proteázy štěpí proteiny vázající VM (*viz níže*) a buněčnou membránu mezi sebou, mukopolysacharidy umožňují vstup vody právě do oblasti mezi vitelinní a buněčnou membránou a tím je od sebe oddalují. Transoxidázy (např. OVOP) způsobují ztvrdnutí VM a tvoří tzv. fertilizační obal [18] znemožňující vazbu dalších spermii.



Obrázek 6: Schéma kortikální reakce; Zdroj: [18]

Polyspermie, neboli vstup více než jedné spermie, má skrz živočišnou říši odlišný efekt. Zatímco u ptáků je polyspermie nepostradatelná pro časný vývoj embrya, u savců je oplodnění vajíčka více než jednou spermií letální [19]. Procesy zabráňující polyspermii jsou rozděleny do rychlého a pomalého bloku.

Zajímavý rozdíl v časovém rozmezí rychlého bloku polyspermie najdeme u mořských živočichů, jako jsou ježovky, nebo u obojživelníků a savců. Například u jmenované ježovky se jedná o vnější oplození: spermie jsou tedy uvolněné v blízkosti vajíčka [20], čímž se snaží fyzicky omezit konkurenci spermií jednoho druhu a případně zabránit možnému mezidruhovému oplození. Spermie mají tedy oproti spermiím savců mnohem snadnější přístup k vajíčku a je zde větší pravděpodobnost průniku většího počtu spermií. Proto je nutné rychlý blok co nejvíce zefektivnit, jedná se o pouhé vteřiny, kdy dochází k vtoku sodných iontů a depolarizaci membrány, čímž je zabráněno vazbě další spermie na vajíčko [20]. Pozitivní potenciál membrány je pouze přechodný, další - pomalá blokáce - probíhá na základě uvedené kortikální reakce.

U savců a živočichů s vnitřním oplozením dochází k první selekci spermií již během jejich průniku samičím traktem. Vyřadí se tak nekapacitované či jinak defektní spermie, které nebyly schopny překonat anatomické či fyziologické filtry samičího traktu [21]. Samice tím rovněž přispívají k zabránění polyspermii. Již počet spermií, které se k vajíčku skrz samičí trakt dostávají, je nižší než u ježovky a jiných vodních živočichů [21]. Rychlá blokace u savců není zcela objasněna, depolarizace membrány nebyla u savců detekována. To se odráží i v předpokládaném čase rychlého bloku, který je např. u myši cca 40 minut [20].

Pomalá blokace (trvajíc déle než 1 hodinu) je u savců také zprostředkována kortikální reakcí, látky uvolněné z kortikálních granul modifikují proteinovou strukturu zona pellucida, která není nadále schopna navázat kontakt s receptory na spermii. Tím je biochemicky a v podstatě i mechanicky (ztvrdnutí ZP, stejně jako VM) zabráněno průniku dalších spermií.

Opakem je polyspermie u obojživelníků nebo ptáků, která je považována za standardní součást oplození. U zebřiček je vajíčko penetrováno 4-388 spermii [19]. Spermie jsou v perivitelinární oblasti shlukovány nejvíce v oblasti germinálního terčíku, ovšem jen jedna spermie respektive její jádro fúzuje s jádrem vajíčka. Polyspermie má u ptáků vliv na ranou embryogenezi, při průniku tří nebo méně spermií byla prokázána vysoká mortalita embryí [19]. Vysoký počet spermií poskytuje vyvíjející se zygotě potřebné látky (např. fosfolipázu C-zeta), u kterých se předpokládá, že vyvolávají okamžitou i dlouhodobou oscilaci Ca^{2+} nezbytnou pro postup dalších buněčných cyklů během rané embryogeneze.

Ochrannou vrstvu vajíčka ježovky místo ZP tvoří vrstva extracelulární matrix, VM, která hraje důležitou roli při druhově specifickém oplození. Na VM je přítomen glykoprotein EBR1 (egg bindin receptor), který slouží jako receptor pro akrozomální protein – bindin [22]. Jedná se o vysoce specifickou vazbu, která zabraňuje mezidruhovému oplození včetně blízce příbuzných druhů.

Vajíčko ptáků obsahuje na rozdíl od savců velké množství žloutku, právě VM jej odděluje od okolního prostředí a reguluje propustnost živin. Je tvořena třemi vrstvami. Vnitřní, označovanou také jako perivitelinární, vrstvou přímo obklopující žloutek, střední pojivovou vrstvou a vnější vrstvou, která odděluje bílek. Slouží tedy jako vrstva oddělující žloutek od bílku a zároveň jako bariéra proti mikrobiální infekci [23]. Vnitřní vrstva VM je ekvivalentem zmiňované ZP u savců, jedním z důkazů je přítomnost stejného stavebního glykoproteinu ZP3 (*viz níže*). Je produkována folikulárními buňkami, zatímco další vrstvy se tvoří až při zahájení cesty vajíčka vejcovodem [24].

Buněčnou membránu vajíčka savců obklopuje zmiňovaná glykoproteinová vrstva ZP. Jedná se o poměrně široký (1-27 nm) kompaktní obal, který má jak ochrannou, tak selektivní funkci [25]. Stejně jako VM zajišťuje ZP druhově specifické rozpoznání spermií, není ovšem absolutní. ZP je tvořena třemi (u myši) nebo čtyřmi (u člověka) glykoproteiny ZP1, ZP2, ZP3 a ZP4. Jedná se o vysoce konzervované proteiny. Tvorba a sekrece se u různých druhů liší, např. u myši jsou ZP1 - ZP3 syntetizovány pouze oocytem [25].

U modelu myši je ZP3 primární receptor, který váže kapacitovanou spermii a iniciuje AR. Spermie, která prošla AR, se dále váže na ZP2, ten se účastní fúze membrán a po rozštěpení hraje roli při zmiňovaném pomalém bloku polyspermie. ZP1 slouží jako strukturální spoj glykoproteinů, udržuje stabilitu a integritu ZP [25].

U člověka je rozdílný již počet glykoproteinů, ZP3 rovněž váže kapacitovanou spermii a zahajuje AR, ale zároveň s ním působí i ZP1. ZP2 jako druhý receptor váže spermii po AR, jeho funkce při zabránění polyspermii není jasná. ZP4, který se u myši vyskytuje pouze jako pseudogen Zp4, se účastní vazby kapacitované spermie a indukuje exocytózu akrozomu [25]. Na povrchu spermie se vyskytují tisíce ZP3 vazebných látek, mezi nejznámější ZP3 vazebné partnery patří multidoménové proteiny ze skupiny ADAM (viz kapitola 3.1). Zajímavý je také názor, že k průniku spermie do vajíčka je důležitá i mechanická síla spermie, tedy pohyb bičíku [26].

Nejtěsněji přiléhající vrstva kumulárních buněk k ZP se nazývá corona radiata. Je tvořena folikulárními buňkami a spojena s oocytem pomocí vodivých buněčných spojů, umožňuje průchod látek a malých molekul nezbytných pro vývoj oocytu.

U vajíček savců se vyskytuje vrstva kumulárních buněk tzv. cumulus oophorus, syntetizovaná ovariálními folikuly. Má především ochrannou funkci, ale také zprostředkovává atrakci spermie a produkuje progesteron, který indukuje AR [27]. U ježovky je vnější vrstva buněk tvořena tzv. slizovým obalem. Je tvořen sítí krátkých peptidů, produkovanou oocytem, jehož primární funkcí je atrakce (produkují RESACT) a aktivace spermií (iniciace AR).

2 Interagující proteiny

2.1. Interagující proteiny u spermie

IZUMO1

IZUMO1 je testikulární imunoglobulin typu 1 situovaný na akrozomální membráně patřící do imunoglobulinové superrodiny (IgSF) [28]. Je tvořen 397 jednotkami se samostatnou imunoglobulinovou doménou uprostřed extracelulární smyčky a Izumo doménou, kterou lze dále rozdělit na N-terminální a α -helikální oblast důležitou pro vazbu gamet [29]. Izumo doména tvoří pro svou jedinečnost pojítko s dalšími zástupci tzv. IZUMO family. Jedná se o IZUMO2, IZUMO3 a IZUMO4 detekované u myši, ovšem s homologickými sekvencemi u člověka [30].

IZUMO1-3 jsou transmembránové proteiny výhradně produkované ve varlatech, zatímco IZUMO4 je rozpustný protein, produkovaný jak ve varlatech, tak v jiných oblastech. Zástupci skupiny IZUMO tvoří dimery či větší komplexy. Tvorba dimerů byla prokázána nejen u myši, ale také u křečků a krys, což naznačuje, že je tato schopnost konzervována právě u hlodavců. Tvorba větších komplexů je napříč živočišnými druhy proměnlivá [30]. Jednotlivé domény IZUMO1 se podílejí na tvorbě různých komplexů. Izumo doména formuje menší komplexy, případně IZUMO1 dimery, zatímco transmembránová doména tvoří složitější komplexy a možné IZUMO1 polymery [30]. U IZUMO1, na spermii se vyskytující jako monomer, bylo popsáno jeho seskupování a přechodná dimerizace při navázání s JUNO (viz kapitola 2.2) [31]. Struktura IZUMO1 je mírně změněna, N-doména je složena na vnitřní stranu a takto uzavřený dimer se váže na receptor na vajíčku [31].

Jak bylo uvedeno v kapitole 1.2, během AR dochází k relokaci IZUMO1 z membrány do ekvatoriální roviny hlavičky spermie, na místo, kde dochází ke kontaktu gamet. Bez uskutečnění tohoto přesunu, společně s reorganizací cytoskeletonu, nedosahuje IZUMO1 své funkce. IZUMO1 KO spermie vykazují normální pohyblivost, dochází k AR, jsou schopné projít ZP, ale poté jsou nahromaděny v periviteliní oblasti. Při použití vajíček bez ZP a spermií bez IZUMO1 nedojde k fúzi ani za podmínek, kdy wild-type (WT) spermie dosahují polyspermie. Na druhou stranu spermie bez IZUMO1 použité při intra-cytoplazmatické inseminaci produkují stejně potomků jako WT spermie. To naznačuje, že další vývoj již není IZUMO1 ovlivněn [28]. IZUMO1 nebyla dosud přiřazena jasná funkce, ale je nepostradatelný jak při adhezi, tak fúzi spermie a vajíčka. Na základě popisu struktury IZUMO1 uvedené výše lze předpokládat, že absence

IZUMO1 naruší organizaci nebo stabilitu proteinového komplexu na spermii, který je klíčový pro proces oplození.

Jako vazebný partner na vajíčku byl dlouho považován CD9 [9], ale při KO CD9 u vajíčka je adheze stále uskutečňována [32]. Nejedná se tedy o výhradního vazebného partnera. Vazebným partnerem na vajíčku je transmembránový protein JUNO [32], jehož KO vede k nulové plodnosti, stejně jako je tomu u IZUMO1 KO spermii [28].

ADAM family

Jedná se o multidoménové proteiny z tzv. rodiny ADAM cca 750 AK dlouhé, které obsahují mimo jiné disintegrinovou a metaloproteázovou doménu (odtud zkratka ADAM „a disintegrin and metalloprotease“), díky kterým jsou schopné adhezní nebo proteázové aktivity [33]. Ze 40 zástupců je 15 produkováno varlaty [9] a pět z nich je detekovaných na maturovaných spermii. Jedná se o ADAM 2 (fertilin β), ADAM 3 (cyritestin), ADAM 5, ADAM 16 a ADAM 18 [34].

Mezi nejznámější ADAM protein účastníci se interakce gamet patří tzv fertilin. Jedná se o heterodimer složený z ADAM1 a ADAM2 označovaných také jako fertilin α a fertilin β [33]. Disintegrinové domény fertilinu α a β umožňují zmiňovanou adhezní aktivitu, díky možné vazbě s integriny.

Integriny jsou membránové glykoproteiny tvořící heterodimery, které jsou složené z podjednotek α a β . Jsou považovány za hlavní adhezní receptory při adhezi buňky k extracelulární matrix, ale i při adhezi buněk mezi sebou. Uskutečňují kontakt buněk a zároveň předávají informaci o jeho uskutečnění. To je umožněno stavbou integrinů, která je tvořena dvěma extracelulárními doménami s vazebnými místy (za každou podjednotku jedna) a jednou společnou cytoplasmatickou doménou, která kooperuje s cytoskeletem buňky. Různá kombinace podjednotek vede k rozdílné preferenci ligandů a různá konformace extracelulárních domén se odráží v jejich afinitě [35]. U savců je doposud známo 18 α a 8 β podjednotek tvořících 24 heterodimerů – integrinů [35]. Na vajíčku se jedná o integrin $\alpha_6\beta_1$, který je považován za adhezní receptor na jeho membráně [33]. U spermie byla potvrzena přítomnost β_1 integrinů s podjednotkami α_3 , α_6 [36], které se podílí na reorganizaci aktinového cytoskeletonu během AR.

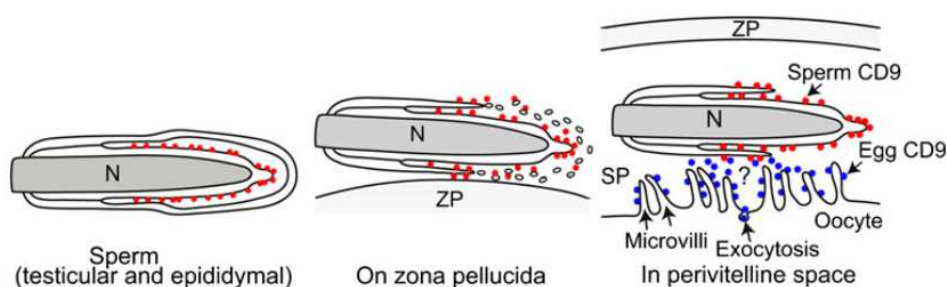
U ADAM3 KO spermii se snižuje jejich schopnost navázání na ZP [34] a ADAM2 (fertilin β) KO spermie nejsou schopny adheze [9], není ale ovlivněna fúzní kompetence těchto spermii. To dokazuje, že ADAM proteiny svou funkcí zprostředkovávají navázání gamet, nikoli fúzi. Stejně tak vazba ADAM-integrin není nezbytná pro fúzi, jak bylo původně myšleno. Vajíčko myši

s knockoutovanou podjednotkou α_6 (nebo delecí genů pro jiné doposud známé integriny) bylo schopné fúze *in vitro* [37]. Integrin $\alpha_6\beta_1$ je však na vajíčku součástí tetraspaninové sítě organizované CD9 (*viz níže*), který je významným receptorem na povrchu vajíčka.

Cluster of differentiation

Cluster of differentiation (CD) nebo také diferenační skupina je označení pro molekuly, především membránové glykoproteiny, nesoucí stejné antigenní označení. Lze je (a tím celou buňku) detekovat jednou monoklonální protilátkou. U člověka známe 371 druhů CD [38]. Mezi nejznámější zástupce patří CD4 a CD8 přítomné na T-lymfocytech. Pro naše téma jsou zásadní typy CD9, CD46, CD81, které se účastní signalizace, adheze i fúze buněk. Jsou součástí významné rodiny tzv. tetraspaninů (*viz níže*), která se podílí na stavbě proteinových komplexů na spermii i vajíčku nezbytných pro interakci gamet.

Velmi zajímavý je fakt, že se CD9 nachází nejen na vajíčku, ale rovněž na spermii. Přítomnost CD9 v maturovaných spermii prokázal Ito a kol. (2010), čímž prolomili názor, že CD9, podílející se na adhezi a fúzi, je sekretován pouze vajíčkem. CD9 detekovali na vnitřní straně akrozomální membrány, viz obrázek č. 7. Na obrázku je také znázorněno uvolnění proteinu během AR [39]. Ačkoli se tedy přítomnost CD9 na spermii potvrdila, nepotvrdila se jeho adhezivní či fúzní funkce. CD9 KO spermie jsou i nadále schopné fúze [39]. Jednou z potenciálních funkcí CD9 na spermii je organizace jiných proteinů, není ovšem známa jeho vazba s jinými proteiny, např. integriny (jako vazba CD9 a $\alpha_6\beta_1$ na vajíčku), nebo přímá kooperace CD9 na spermii s CD9 na vajíčku usnadňující fúzi [39].



Obrázek 7: Lokalizace CD9 na spermii; Zdroj:[39]

Membránový proteinový kofaktor CD46 chrání somatické buňky před negativním působením komplementu. U hlodavců je produkován pouze varlaty, zatímco u člověka je exprimován na membráně různých druhů jaderných buněk. U spermii je situován na vnitřní straně akrozomální membrány, nikoli však na povrchu a nemůže tak neutralizovat případné škodlivé látky komplementu jako u somatických buněk. Například u myšice není exprimován vůbec a spermie tak využívají membránové kofaktory CD55 a CD59 [40], které se jako komplex podílí na ochraně

buňky. Protože nebyla potvrzena ochranná funkce CD46, byl před objevením IZUMO1 považován za primární fúzní protein na spermii právě CD46 (oba lokalizované na akrozomální membráně), byla také prokázána jeho vazba s β_1 integriny i tetraspaniny. Během AR dochází k odhalení CD46 na povrch (v tomto okamžiku může působit jako ochranná složka spermie [41]) a relokizaci (stejně jako u IZUMO1) [36]. Jeho možná kooperace s proteiny na spermii tak naznačuje případnou interakci s proteiny na vajíčku (např. s CD9). Deficitem CD46 však není ovlivněna fertilita [41].

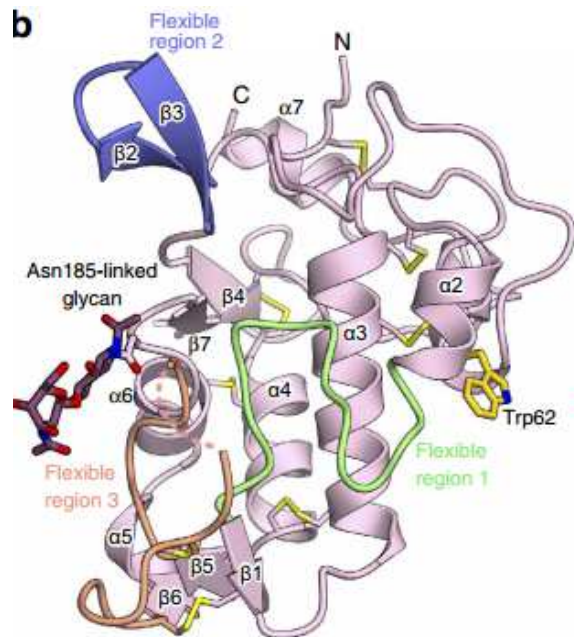
Stejný pohyb během AR jako CD46 vykazuje integrinová podjednotka β_1 , jejichž kooperace je potvrzena jak na somatických buňkách, tak na spermii [36]. Podjednotky β jsou úzce spojeny s vazbou aktinu, proto kooperace CD46 a β_1 ovlivňuje uspořádání aktinového cytoskeletu během AR [36]. Spermie CD46 deficitní myši dosahují vyššího stupně spontánní AR, než WT jedinci. To naznačuje, že se CD46 podílí na stabilizaci akrozomální membrány [41]. Jak již bylo uvedeno, akrozomální reakce, která zahrnuje přestavbu cytoskeletu a relokizaci proteinů, je nezbytná pro další interakci spermie. CD46, který se na procesech AR podílí, je tedy vhodné považovat za protein nepřímo se účastnící adhezních a fúzních okamžiků.

CD81 je spojen s výskytem na vajíčku, byla ovšem prokázána jeho přítomnost na spermii. Konkrétně u spermie býka byl detekován na buněčné membráně v apikální části hlavičky, po proběhnutí AR již nikoli [42]. Předpokládá se, že přítomnost CD81 a CD9 na spermii je součástí organizační struktury proteinů na membráně spermie. Neúčastní se však fúzních procesů, protože CD81 KO spermie myši jsou schopné fúze, stejně jako CD9 KO spermie [43].

2.2. Interagující proteiny u vajíčka

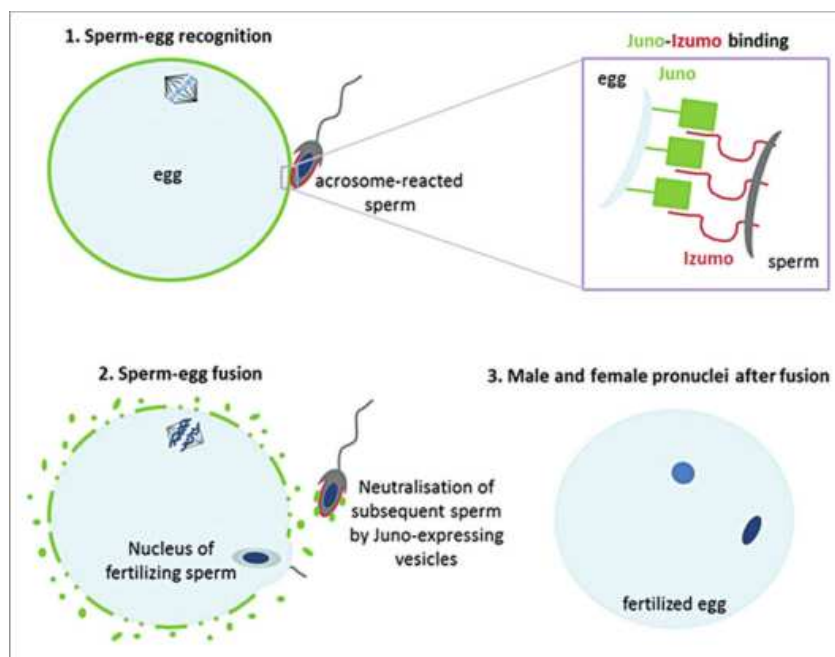
JUNO

Jedná se o GPI kotvený, folátový receptor 4 nebo také JUNO, pojmenovaný po římské bohyni plodnosti a manželství. Neváže ovšem kyselinu listovou a její deriváty, jak by se podle názvu a podobné struktury s folátovými receptory 1 a 2 očekávalo. Struktura myšního JUNO (popsaná podle vykrytalizované mutantní N73D ektodomény JUNO) je tvořena dvěma dlouhými šroubovicemi ($\alpha 3$, $\alpha 4$), které jsou obklopené pěti krátkými šroubovicemi ($\alpha 1$, $\alpha 2$ a $\alpha 5$ - $\alpha 7$), dále ji tvoří dvouvláknové antiparalelní β -listy ($\beta 2$ a $\beta 3$), dvouvláknové paralelní β -listy ($\beta 4$ a $\beta 7$) a smíšené tří vláknové β -listy ($\beta 1$, $\beta 5$ a $\beta 6$), viz obrázek č. 7 [29]. Na obrázku jsou zároveň znázorněny flexibilní oblasti 1-3 a Trp62. Právě tryptofan je konzervovaná jednotka JUNO, která hraje důležitou roli ve vazbě JUNO-IZUMO1 (viz kapitola 2.1). Oblasti 1-3 se podle výzkumu také účastní vazby IZUMO1 a díky možné variabilitě mají význam v druhově specifické vazbě. Namísto folátu váže JUNO tedy IZUMO1, jak bylo uvedeno výše, JUNO mění konformaci IZUMO1 a umožňuje jeho navázání na vajíčko. Jejich interakce je nezbytná pro oplození vajíčka. To potvrzuje skutečnost, že JUNO KO vajíčka jsou infertilní i po odstranění ZP [32]. Na druhou stranu po 40 minutách od navázání spermie není JUNO na vajíčku dále detekovatelný, to znamená ještě před dokončením fúze membrán.



Obrázek 8: Struktura JUNO; Zdroj: [29]

Poměrně novou informací je, že se JUNO podílí na blokaci polyspermie a to vyvázáním hlavního vazebného proteinu na vajíčku do váčků, které samy interagují se spermii a znemožňují tak jejich vazbu na vajíčko [20] , viz obrázek č. 10, fig. 2. Jak již bylo zmíněno, JUNO není na oplozeném vajíčku detekovatelný po 30-40 minutách, což odpovídá uváděnému času rychlé blokace.

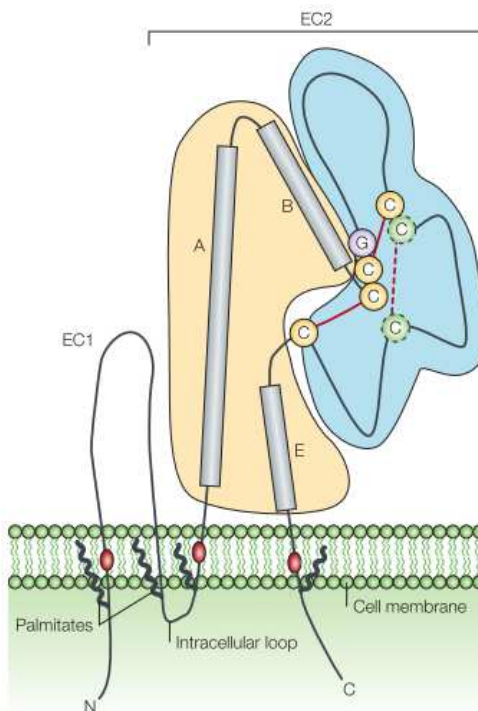


Obrázek 8: Vyvázání JUNO z vajíčka; Zdroj: [20]

Tetraspaninová síť

U savců známe až 40 zástupců tetraspaninů, jejich typická struktura je tvořena malou a velkou extracelulární smyčkou a jednou intracelulární smyčkou. Velká extracelulární smyčka je rozdělena na dvě části: konstantní (oranžovou) část obsahující α helixy a variabilní (modrou) část s různými proteinovými interakcemi, viz obrázek č. 7 [44]. Transmembránové domény 1, 3 a 4 obsahují polární aminokyseliny (Asn, Glu, Gln) [44]. Tetraspaniny prochází membránou a jsou považovány za organizátory transmembránových a cytoplazmatických proteinů. Spolupracují ale i s dalšími proteiny jako jsou IgSF (IZUMO1), integriny ($\alpha_6\beta_1$), GPI kotvené proteiny (JUNO) nebo také ve spojení tetraspanin-tetraspanin (CD9, CD81). Veškeré tyto interakce tetraspaninů mezi sebou nebo s jinými proteiny tvoří tzv. tetraspaninovou síť, která vykonává funkci, ke které je jinak nutná několikanásobná intramolekulární interakce [9].

Některé tetraspaniny jsou exprimovány téměř ve všech buněčných typech, např. CD81, ale existují také zástupci, kteří se exprimují pouze na určitých buněčných typech, jako je CD151 na epiteliálních, endoteliálních a fibroblastických buňkách nebo úzce specifikovaný CD37 na lymfoidních buňkách [44].



Obrázek 10: Struktura tetraspaninu; Zdroj: [44]

CD9, který je produkován samotným oocytem [45] [46], patří do rodiny tetraspaninů a je považován za hlavního organizátora tetraspaninové sítě na vajíčku. Najdeme jej na povrchu oolemy bohatém na mikrokšky, na jejíž struktuře se podílí. Mikrokšky z CD9 KO vajíčka jsou v porovnání s mikrokšky z WT vajíčka kratší, tenčí a vyskytují se v menší hustotě [47]. Jak již bylo uvedeno, kontakt gamet probíhá právě v oblasti bohaté na mikrokšky. CD9 se pak nachází i na jiných somatických buňkách [9], kde se podílí na různých procesech (adheze, proliferace, diferenciace), ale negativně ovlivňuje fúzi [48]. Například fúze monocytů ve vícejaderné buňky je úspěšnější u CD9 KO buněk. To naznačuje, že důležitou roli hrají také proteiny, se kterými CD9 vytváří komplex [9].

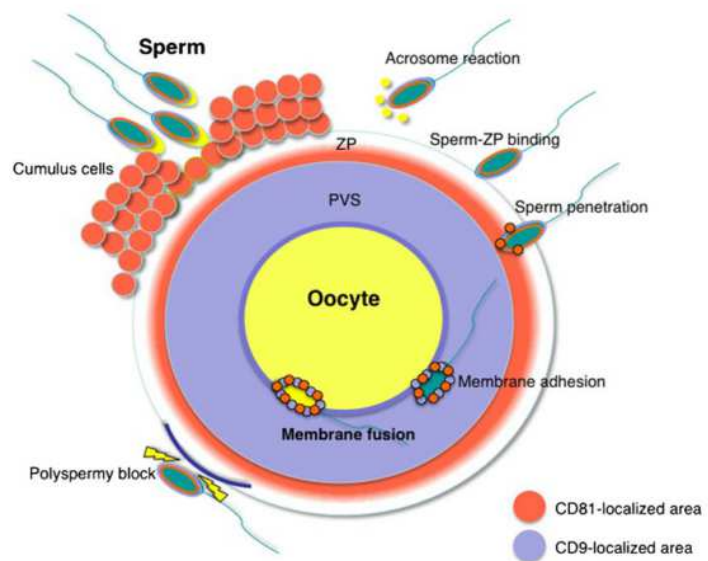
CD9 se potvrdil jako možný vazebný partner pro IZUMO1, ale zároveň kooperuje na vajíčku s JUNO, jejichž společná interakce je nutná pro adhezi a fúzi gamet [28]. Rovněž kooperuje s integrinem $\alpha_6\beta_1$, nejedná se o ovšem o tak zásadní spolupráci jako v předchozím případě.

Vajíčka bez $\alpha_6\beta_1$ jsou totiž na rozdíl od JUNO deficitních vajíček nadále schopná fúze [37]. Zajímavá je možnost interakce CD9-CD9 nebo CD9-CD81 (viz níže).

Při *in vitro* pokusu o splnutí WT spermií a CD9 deficitních vajíček myši byla prokázána velmi nízká fertilita vajíčka. Spermie sice pronikly skrz ZP, ale zůstaly nahromaděny v periviteliní oblasti a nebyly schopny splnutí s oolemou [45]. Po intra-cytoplazmatické injekci WT spermií do deficitních vajíček však dochází k standardnímu vývoji vajíčka a později zygoty [28]. CD9 interaguje během adheze gamet a zároveň je součástí sítě proteinů společně kooperujících při fúzi.

CD81 je strukturně a v některých funkcích podobný CD9, s nímž sdílí funkci ve fúzi gamet. Na rozdíl od CD9 je CD81 u myši produkován především kumulárními buňkami vajíčka a je situován na vnitřní straně ZP, viz obrázek č. 11. V případě exprese na jedné somatické buňce se CD9 a CD81 formují v komplex. Zatímco u vajíčka, se tvorba komplexu už kvůli různému původu nepředpokládá. Jejich interakce s jinými proteiny probíhají současně, nikoli však společným přičiněním [45]. To však neznamená, že je vyloučena jejich spolupráce. Ještě před oplozením dochází k uvolnění CD9 do periviteliní oblasti a k transportu CD9 váčků na spermii, který je zprostředkován právě CD81. V okamžiku průniku spermie do periviteliní oblasti, jsou CD9 i CD81 lokalizovány ve formě exozomů na spermii [45] (viz obrázek č. 11) a účastní se fúze membrán spermie a vajíčka.

CD81 KO vajíčka, co se možnosti oplození týče, nejsou tolik diskriminovány jako CD9 KO. Poměr snížení fertility *in vitro* oplozených CD81:CD9 deficitních vajíček činí 40:95 [49]. Nepřítomnost CD81 je částečně nahraditelná dodatečnou expresí CD9, nikoli však naopak [45]. Ke snížení neplodnosti až o 40 % CD81 deficitních myší přispívá fakt, že spermie, které pronikly do periviteliní oblasti, neprošly AR a nejsou tedy schopny fúze s vajíčkem [45]. Nepřítomností CD81 je zřejmě narušen i průběh AR. Při kombinaci CD81 KO a CD9 KO je oplození téměř nemožné, protože více než 95% vajíček není schopných fúze [49]. Odráží se zde fakt, že jsou tetraspaniny organizátory proteinových komplexů a jejich nepřítomnost narušuje celkovou strukturu proteinů buňky, která pak není schopna fúze.



Obrázek 11: Lokalizace CD9 a CD81 na vajíčku; Zdroj: [45]

3 Interakce proteinů

Akrozomální reakce (*viz kapitola 1*) je nezbytný proces, měnící fyziologii buňky a lokalizaci proteinů, kterým spermie před úspěšným oplozením prochází. Na stabilizaci akrozomální membrány a reorganizaci cytoskeletonu se podílí CD46 (společně s β_1 integriny) [41], který je zároveň během AR relokalizován (stejně jako IZUMO1). CD46 se tak nepřímou účastí adhezních a fúzních procesů, ale uvažuje se o jeho možné kooperaci s CD9 (byla prokázána u HeLA buněk [50]) a případném přímém působení během fúzních procesů. První kontakt gamet je zprostředkovaný proteiny z rodiny ADAM se ZP3 (stavební glykoprotein ZP), integriny a případnými ADAM receptory. Je doprovázen, případně nahrazen, a následován kooperací dalších proteinů a jejich komplexů. Např. ADAM 2 KO spermie nejsou schopny adheze, není ovšem ovlivněna jejich fúzní kompetence (dochází k fúzi s vajíčky bez ZP). Stejně jako u vajíček bez integrinu $\alpha_6\beta_1$, které jsou nadále schopna fúze [37]. To potvrzuje, že se nejedná o esenciální fúzní proteiny.

Jak ukazují studie s IZUMO1 deficitními spermii myši, IZUMO1 je doposud jediný protein spermie charakterizovaný jako primární receptor, bez něhož k fúzi spermie s vajíčkem u savců nedochází [28]. Dlouhou dobu byl za jeho vazebného partnera na povrchu vajíčka považován CD9, hlavní organizátor tetraspaninové sítě (*viz kapitola 2.2*). Jak bylo uvedeno výše, CD9 se vyskytuje i na spermii. Vazba CD9 se samotným CD9 pravděpodobně může usnadnit fúzi gamet. Ovšem při nepřítomnosti CD9 na spermii nedochází k poklesu plodnosti [39] a zároveň u CD9 KO vajíček stále dochází k vazbě spermie. Je tedy očividné, že CD9 není výhradním vazebným partnerem pro IZUMO1 [32]. Stejně jako u CD9 KO spermii, dochází u CD81 KO spermii nadále k fúzi [43], stejně tak v případě KO obou proteinů [49]. U CD81 KO vajíček je fertilita snížena. Ačkoli CD9 a CD81 na vajíčku tvoří komplex, jejich kooperace je nezbytná a souvisí s interakcí CD9 a IZUMO1. Jak již bylo uvedeno, nepřítomnost CD81 totiž snižuje plodnost o 40% [49]. Kombinace CD9 KO a CD81 KO vede k infertilitě vajíčka [9]. KO těchto tetraspaninů pravděpodobně vede k narušení organizace sítě proteinů na vajíčku, která je pro adhezi a následovnou fúzi nezbytná.

GPI kotvené proteiny jsou zásadní pro fúzní proces, v případě jejich odstranění, geneticky či enzymaticky, je vajíčko neplodné. Jedním z nich je právě JUNO, který je považován za hlavního vazebného partnera pro IZUMO1 [32]. Vazba IZUMO1-JUNO je zprostředkována tetraspaninovou sítí na vajíčku, na které se zjevně podílí CD9 a CD81. Vlastnosti CD9 a CD81 deficitních vajíček jsou popsány výše. Kooperací JUNO a IZUMO1 je umožněna adheze gamet,

kteřá bezpodmínečně předchází samotné fúzi. Tento fakt potvrzuje, že JUNO deficitní vajíčka nejsou schopná fúze ani s WT partnerskými gametami. Vazba JUNO-IZUMO1 je konzervovaná u všech savců včetně člověka [32].

Zajímavá je *in vitro* fertilizace vajíčka křečka zlatého, kterému byla odstraněna ZP, spermií jiných druhů, která prošla AR. Vajíčko překvapivě snadno fúzuje se spermií člověka, prasete či myši. IZUMO1 člověka tedy může interagovat s JUNO křečka zlatého, jehož proteinová sekvence je z 60 % totožná s JUNO člověka. To potvrzuje možnou fúzi těchto gamet [51]. Po *in vitro* pozorování JUNO člověka a JUNO myši (přesněji jejich imobilizovaných jednotek) však dochází primárně k vazbě IZUMO1 člověka právě s JUNO člověka [51]. To odráží fakt, že vazba IZUMO1-JUNO hraje roli při mezidruhovém rozpoznání a fúzi gamet.

Přes všechna uvedená fakta jsou JUNO-IZUMO1 považovány za esenciální vazebné partnery, nikoli však za primární fusogenní proteiny. Během fúze se membrány dvou buněk spojí, což umožňuje cytoplazmatickému obsahu promíchat se a vytvořit syncytium. JUNO a IZUMO1 neindukují vznik syncytií, na rozdíl od EEF-1 (u *Caenorhabditis elegans*) nebo syncytinů (u savců) [32].

Důsledkem popisovaných několikanásobných interakcí je fúze spermie a vajíčka, primárně tedy fúze buněčných membrán. Stejně jako u jiných fúzních událostí, např. fúze virových buněk a intracelulárních váčků, je fúze membrán dvoustupňový proces. Adheze a vazba membrán je následována fyzickým spojením plazmatických membránových lipidů [11]. Fúzované buňky mohou dále procházet dramatickými změnami v signalizaci nebo dalším chování. Během oplození však narážíme na bariéru, která tomu zabraňuje. U somatických buněk jsou fúzované buňky často kompetentní a tvoří syncytia, která se vyskytují například ve svalech. Gamety ke tvorbě syncytií využívají specifické proteiny, např. syncitiny u savců, které jejich vznik indukují [32].

Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo shrnutí nejdůležitějších procesů interakce gamet předcházejících jejich samotné fúzi. Úvodní část tvoří základní fakta o spermii, jejím vývoji a struktuře. Nedílnou součástí této kapitoly jsou maturační procesy (kapacitace, akrozomální reakce) podílející se na změně fyziologie buňky, která je nezbytná pro další interakci spermií. Současně je zde popsána maturace a stavba jednotlivých obalů vajíčka. Jako příklad byly využity především modely myši a ježovky, které patří k živočišným zástupcům s rozlišnou strukturou vajíčka a v současnosti k nejčastěji studovaným organismům.

Nejvíce diskutovaným tématem reprodukční biologie je existence a interakce adhezních a fúzních proteinů jakož i proteinů účastnících se obou uvedených momentů. Ve druhé kapitole této bakalářské práce jsou shrnuty právě nejvýznamnější proteiny, které se na adhezi a fúzi podílí. Jako zástupci interagujících proteinů na spermii byly v této kapitole obsaženy IZUMO1, jako zástupce IgSF, a zástupci CD (CD9, CD46, CD81) podílející se na organizaci proteinových interakčních sítí. Mezi proteiny zastoupené na vajíčku jsou zde zařazeny JUNO a tetraspaniny (CD9, CD81). Právě tetraspaninová síť, popisovaná v kapitole 2.2, zprostředkovává a organizuje mnohonásobné kooperace transmembránových proteinů mezi sebou nebo s dalšími tetraspaniny. Protože se nejedná pouze o popisované interakce proteinů ve třetí kapitole, ale desítky jednotlivých interakcí až po tvorbu zmiňovaných tetraspaninových sítí, není možné specifikovat adhezi a fúzi jako jedinou klíčovou spolupráci. Vazba JUNO a IZUMO1 se sice jeví do určité míry jako esenciální klíč k oplození, avšak tento klíč není jediný a snaha nalézt protein, který má výhradní fúzní funkci je stále aktuální. Toto téma je tudíž nadále předmětem dalších laboratorních výzkumů na molekulární úrovni.

Seznam obrázků

Obrázek 1: Vývoj spermie	4
Obrázek 2: Exocytóza akrozomu (A) u ježovky (B) u myši	6
Obrázek 3: Struktura vajíčka ježovky	7
Obrázek 4: Maturace vajíčka.....	8
Obrázek 5: Struktura vajíčka savců	8
Obrázek 6: Schéma kortikální reakce.....	10
Obrázek 7: Lokalizace CD9 na spermii	15
Obrázek 8: Struktura JUNO	17
Obrázek 9: Vyvázání JUNO z vajíčka.....	18
Obrázek 10: Struktura tetraspaninu	19
Obrázek 11: Lokalizace CD9 a CD81 na vajíčku.....	21

Seznam literatury

- [1] S. F. Gilbert, *Developmental Biology. 9th Editon.*, 9th ed. Sinauer Associates, Inc., 2010.
- [2] R. Balhorn, "Protein family review The protamine family of sperm nuclear proteins," 2007.
- [3] E. L. Simons, "Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization : Implications for theories on human evolution," vol. 93, no. November, pp. 13859–13863, 1996.
- [4] G. F. Bahr and W. F. Engler, "Considerations of volume, mass, DNA, and arrangement of mitochondria in the midpiece of bull spermatozoa," *Exp. Cell Res.*, vol. 60, no. 3, pp. 338–340, Jun. 1970.
- [5] A. Bahat and M. Eisenbach, "Sperm thermotaxis," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 252, no. 1–2, pp. 115–119, 2006.
- [6] D. Ralt, M. Goldenberg, P. Fetterolf, D. Thompson, J. Dor, S. Mashiach, D. L. Garbers, and M. Eisenbach, "Sperm attraction to a follicular factor(s) correlates with human egg fertilizability.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, no. 7, pp. 2840–2844, 1991.
- [7] W. I. Kaupp, U.B., Solzin, J., Hildebrand, E., Brown, J.E., Helbig, A., Hagen, V., Beyermann, M., Pampaloni, F., "The signal flow and motor response controlling chemotaxis of sea urchin sperm.," *Nat. Cell Biol.*, 2003.
- [8] Y. and C. P. L. Clermont, "Spermiogenesis of man, monkey, and other animals as shown by the 'periodic acid-Schiff' technique.," *Am. J. Anat.*, 1955.
- [9] P. Primakoff and D. G. Myles, "Cell – cell membrane fusion during mammalian fertilization," vol. 581, pp. 2174–2180, 2007.
- [10] S. S. Suarez, "Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct," *Int. J. Dev. Biol.*, vol. 52, no. 5–6, pp. 455–462, 2008.
- [11] K. K. Stein, P. Primakoff, and D. Myles, "Sperm-egg fusion : events at the plasma membrane," 2004.
- [12] W. D. Moy and V. D. Vacquier, "Immunoperoxidase localization of bindin during the adhesion of sperm to sea urchin eggsNo Title," *Curr. Top. Dev. Biol.*, 1979.

- [13] N. Sebkova, L. Ded, K. Vesela, and K. Dvorakova-Hortova, "Progress of sperm IZUMO1 relocation during spontaneous acrosome reaction.," *Reproduction*, vol. 147, no. 2, pp. 231–40, 2014.
- [14] Y. Li, J. Sosnik, L. Brassard, M. Reese, N. A. Spiridonov, T. C. Bates, G. R. Johnson, J. Anguita, P. E. Visconti, and A. M. Salicioni, "Expression and localization of five members of the testis-specific serine kinase (Tssk) family in mouse and human sperm and testis," vol. 17, no. 1, pp. 42–56, 2011.
- [15] D. Epel, "The program of fertilization," *Sci. Am.*, 1977.
- [16] C. R. Austin, *Fertilization*. Englewood Cliffs N.J : Prentice-hall, 1965.
- [17] "www.yourarticlelibrary.com," 2016. [Online]. Available: <http://www.yourarticlelibrary.com/biology/human-reproduction/structure-of-human-sex-gametes-spermatozoan-and-ovum-biology/26913/>.
- [18] J. L. Wong and G. M. Wessel, "Renovation of the egg extracellular matrix at fertilization," vol. 550, no. July, pp. 545–550, 2008.
- [19] N. Hemmings and T. R. Birkhead, "Polyspermy in birds : sperm numbers and embryo survival," 2015.
- [20] E. Bianchi and G. J. Wright, "Preventing polyspermy in fertilization Izumo meets Juno," pp. 2019–2020, 2014.
- [21] S. S. Suarez, "Mammalian Sperm Interactions with the Female Reproductive Tract," vol. 363, no. 1, pp. 185–194, 2017.
- [22] N. Kamei and C. G. Glabe, "The species-specific egg receptor for sea urchin sperm adhesion is EBR1, a novel ADAMTS protein," *Genes Dev.*, vol. 17, no. 20, pp. 2502–2507, 2003.
- [23] K. Mann, "Proteomic analysis of the chicken egg vitelline membrane," pp. 2322–2332, 2008.
- [24] J. Waclawek, M. Foisner, R. Nimpf and S. WJ., "The chicken homologue of zona pellucida protein-3 is synthesized by granulosa cells.," *Biol Reprod.*, 1998.
- [25] S. K. Gupta, B. Bhandari, A. Shrestha, and B. K. Biswal, "Mammalian zona pellucida

- glycoproteins : structure and function during fertilization,” pp. 665–678, 2012.
- [26] B. Ravaux, N. Garroum, E. Perez, H. Willaime, and C. Gourier, “A specific flagellum beating mode for inducing fusion in mammalian fertilization and kinetics of sperm internalization,” *Nat. Publ. Gr.*, no. August, pp. 1–13, 2016.
- [27] N. Domi, E. O. Pietrobon, M. Soria, A. Luis, N. Monclus, and M. W. Forne, “Simultaneous Activation of PLA2 and PLC Are Required to Promote Acrosomal Reaction Stimulated by Progesterone Via G-Proteins,” vol. 63, no. April, pp. 58–63, 2004.
- [28] M. Chalbi, V. Barraud-lange, B. Ravaux, K. Howan, N. Rodriguez, P. Soule, A. Ndzoudi, C. Boucheix, E. Rubinstein, J. P. Wolf, A. Ziyat, E. Perez, F. De Pincet, and C. Gourier, “Binding of sperm protein Izumo1 and its egg receptor Juno drives Cd9 accumulation in the intercellular contact area prior to fusion during mammalian fertilization,” vol. 9, pp. 3732–3739, 2014.
- [29] K. Kato, Y. Satouh, H. Nishimasu, A. Kurabayashi, J. Morita, and Y. Fujihara, “Structural and functional insights into IZUMO1 recognition by JUNO in mammalian fertilization,” *Nat. Publ. Gr.*, vol. 7, pp. 1–9, 2016.
- [30] D. A. Ellerman, J. Pei, S. Gupta, W. J. Snell, and D. Myles, “Izumo Is Part of a Multiprotein Family Whose Members Form Large Complexes on Mammalian Sperm,” vol. 1199, pp. 1188–1199, 2009.
- [31] N. Inoue, Y. Hagihara, D. Wright, T. Suzuki, and I. Wada, “Oocyte-triggered dimerization of sperm IZUMO1 promotes sperm–egg fusion in mice,” *Nat. Commun.*, vol. 6, pp. 1–12, 2015.
- [32] E. Bianchi, B. Doe, D. Goulding, and G. J. Wright, “Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization,” *Nature*, vol. 508, no. 7497, pp. 483–487, 2014.
- [33] T. Cy, “The ADAM gene family surface proteins with adhesion and protease,” vol. 16, no. 2, pp. 83–87, 2000.
- [34] J. P. Evans, “Fertilin b and other ADAMs as integrin ligands : insights into cell adhesion and fertilization,” pp. 628–639, 2001.
- [35] R. O. Hynes, “Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines,” *Cell*, vol. 110, no. 6, pp. 673–687, 2002.

- [36] M. Frolikova, N. Sebkova, L. Ded, and K. Dvorakova-Hortova, "Characterization of CD46 and β 1 integrin dynamics during sperm acrosome reaction," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. April, p. 33714, 2016.
- [37] B. J. Miller, E. Georges-Labouesse, P. Primakoff, and D. G. Myles, "Normal fertilization occurs with eggs lacking the integrin alpha6beta1 and is CD9-dependent," *J. Cell Biol.*, vol. 149, no. 6, pp. 1289–1295, 2000.
- [38] "Human Cell Differentiation Molecules." [Online]. Available: <http://www.hcdm.org/index.php/molecule-information>. [Accessed: 01-Jan-2016].
- [39] C. Ito, K. Yamatoya, and K. Yoshida, "Tetraspanin family protein CD9 in the mouse sperm : unique localization , appearance , behavior and fate during fertilization," pp. 583–594, 2010.
- [40] L. E. Clift, K. Dvorakova-hortova, M. Frolikova, P. Andrlíkova, S. Salman, P. Stopka, B. F. Flanagan, and P. M. Johnson, "CD55 and CD59 protein expression by Apodemus (field mice) sperm in the absence of CD46," vol. 81, pp. 62–73, 2009.
- [41] N. Inoue, M. Ikawa, T. Nakanishi, M. Matsumoto, M. Nomura, T. Seya, and M. Okabe, "Disruption of Mouse CD46 Causes an Accelerated Spontaneous Acrosome Reaction in Sperm," vol. 23, no. 7, pp. 2614–2622, 2003.
- [42] D. Lipcseyova, K. Michalkova, L. Horovska, and R. Sedlacek, "Characterization of tetraspanin protein CD81 in mouse spermatozoa and bovine gametes," vol. 9, 2012.
- [43] M. Tanigawa, K. Miyamoto, S. Kobayashi, and M. Sato, "Possible Involvement of CD81 in Acrosome Reaction of Sperm in Mice," vol. 155, no. December 2006, pp. 150–155, 2008.
- [44] M. E. Hemler, "TETRASPANIN FUNCTIONS AND ASSOCIATED MICRODOMAINS," vol. 6, pp. 801–811, 2005.
- [45] N. Ohnami, A. Nakamura, M. Miyado, M. Sato, N. Kawano, and K. Yoshida, "CD81 and CD9 work independently as extracellular components upon fusion of sperm and oocyte," 2012.
- [46] G. J. Wright and E. Bianchi, "The challenges involved in elucidating the molecular basis of sperm – egg recognition in mammals and approaches to overcome them," pp. 227–

235, 2016.

- [47] K. E. Runge, J. E. Evans, Z. Y. He, S. Gupta, K. L. McDonald, H. Stahlberg, P. Primakoff, and D. G. Myles, "Oocyte CD9 is enriched on the microvillar membrane and required for normal microvillar shape and distribution," *Dev. Biol.*, vol. 304, no. 1, pp. 317–325, 2007.
- [48] Y. Takeda, I. Tachibana, K. Miyado, M. Kobayashi, T. Miyazaki, T. Funakoshi, H. Kimura, H. Yamane, Y. Saito, H. Goto, T. Yoneda, M. Yoshida, T. Kumagai, T. Osaki, S. Hayashi, I. Kawase, and E. Mekada, "Tetraspanins CD9 and CD81 function to prevent the fusion of mononuclear phagocytes," *J. Cell Biol.*, vol. 161, no. 5, pp. 945–956, 2003.
- [49] E. Rubinstein, A. Ziyat, M. Prenant, E. Wrobel, J. P. Wolf, S. Levy, F. Le Naour, and C. Boucheix, "Reduced fertility of female mice lacking CD81," *Dev. Biol.*, vol. 290, no. 2, pp. 351–358, 2006.
- [50] S. Lozahic, D. Christiansen, S. Manié, D. Gerlier, M. Billard, C. Boucheix, and E. Rubinstein, "CD46 (membrane cofactor protein) associates with multiple β 1 integrins and tetraspans," *Eur. J. Immunol.*, vol. 30, no. 3, pp. 900–907, 2000.
- [51] E. Bianchi, G. J. Wright, and E. Bianchi, "Cross-species fertilization : the hamster egg receptor , Juno , binds the human sperm ligand , Izumo1," pp. 1–4, 2014.