

**Karlova Univerzita**  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Vývojová a buněčná biologie

Studijní obor: Vývojová a buněčná biologie



**Mgr. Martina Černá**

Chemické signály a reprodukční procesy u myši domácí (*Mus musculus*)  
Chemical signals and reproductive processes of the house mouse (*Mus musculus*)

Disertační práce

Školitel: Doc. Mgr. Pavel Stopka, Ph.D.  
Konzultant: Mgr. Romana Stopková, Ph.D.

Praha 2017

## **Prohlášení**

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

V Praze

Podpis

## Poděkování

Mé studium Ph.D. trvalo několik let a za tu dobu jsem navštívila několik laboratoří a byla součástí několika projektů, při kterých jsem potkala mnoho lidí, kteří mi k ukončení velice pomohli. Obohatili mne svými zkušenostmi, naučili mne nové techniky či mě povzbuzovali ve studiu. Během té doby jsem se naučila mnohé techniky, které nejsou součástí publikací, ale pomohly nám nasměrovat náš výzkum. Naučila jsem se různorodé techniky, jako například terénní práce při odchytu divokých myší a myšic, mikromanipulace s oocyty a spermii, *in vitro* fertilizaci myších oocytů, imunofluorescence spermií a oocytů, histologické techniky (tvorba kryořezů z různých tkání a jejich barvení), práci na průtokovém cytometru, cytologie buněk, molekulární techniky (genotypizace, plasmidová izolace, RNA izolace), proteomické techniky a práci s různými typy mikroskopů.

Na tomto místě bych chtěla nejprve poděkovat mému školiteli Doc. Pavlu Stopkovi, Ph.D., za vedení disertační práce. Chtěla bych poděkovat za čas a ochotu, kterou mi věnoval během mého studia. Dále bych chtěla poděkovat konzultantce Mgr. Romaně Stopkové, Ph.D., za cenné rady a její čas během psaní disertační práce, za její povzbudivý úsměv a milá slova. Mé poděkování zde patří i mé předchozí školitelce RNDr. Kateřině Hortové, Ph.D., která mi pomáhala první polovinu mého studia ve vedení experimentů, která mi dávala cenné rady a pomáhala v sepisování publikací.

Dále bych chtěla poděkovat mé drahé kolegyni RNDr. Nataše Šebkové, Ph.D., se kterou jsem první roky strávila hodiny a hodiny v laboratoři, kde jsme se mimo pokusů i příjemně bavily a užily si spolu legraci. Hodiny pak utekly mnohem rychleji. Později Natašu vystřídala další kolegyně Mgr. Barbora Kuntová, se kterou jsem trávila jak čas v laboratoři, kde jsme začínaly v šest hodin ráno a končily o půlnoci, tak v terénu, kde jsme po nocích chytaly myšice a někdy i nějaké parazity od nich. Bára nebyla jen kolegyně, ale i kamarádka, se kterou jsme se během studia snažily držet v pozitivní náladě. V terénních pracích, kdy jsme vyjížděli ráno a po nocích pokládali pasti a sbírali za každého počasí hlodavce, jsem měla oporu v dalších kolezích, kterým zde patří poděkování, Mgr. Leoně Havrdové, Mgr. Petru Klemptovi, Mgr. Petře Hájkové, Ph.D., Mgr. Lucii Novákové.

Chytání hlodavců v terénu nebylo vždy jednoduché, a proto bych chtěla poděkovat RNDr. Vladimíru Vohralíkovi, CSc. za rady a cenné zkušenosti.

První polovinu studia jsem trávila hodně času se dvěma studentkami, které mi dodávaly sílu v pokračování, a během společné práce s nimi jsem se učila nové techniky. Děkuji i Mgr. Adéle Kodíčkové a Mgr. Kateřině Veselé.

Dále bych chtěla poděkovat kolegům z BTÚ a ČZU, kde jsem při některých experimentech měla příjemné zázemí a vzájemně jsme si sdělovali zkušenosti. Děkuji také Lence Bulvové a Helence Uhlířové, dámám, které mi byly pravou rukou a vytvářely víc než příjemné pracovní prostředí.

Chtěla bych zde zmínit i poděkování za finanční pomoc Hlávkově nadaci, díky níž jsem se mohla účastnit zahraniční konference v USA. Zde jsem navázala nová přátelství a konzultovala vědecké otázky.

Velké díky patří mé rodině, která několik let čekala na úspěšné dokončení a ve dnech, kdy už jsem nedoufala, že budu v bádání pokračovat, mě povzbuzovala. Tatínkovi a bratrům za to, že se mnou po nocích jezdili do terénu chytat myši, mamince, že mne uměla obejmout a vytvářela pro mne zázemí, bez něhož bych nikdy studium Ph.D. nemohla začít ani ukončit.

## Obsah

1. Literární přehled .....	12
1.1. Chemická komunikace .....	12
1.1.1. Lipokality .....	14
1.1.2. Odorant vázající proteiny (OBP).....	16
1.1.3. Hlavní močové proteiny – Major urinary proteins (MUPs).....	18
1.1.4. Efekty chemické komunikace .....	20
1.1.5. Detoxifikační a antibakteriální funkce lipokality .....	22
1.1.6. Sekretoglobiny .....	23
1.2. Procesy spojené s reprodukcí .....	25
1.2.1. Estrální cyklus .....	25
1.2.2. Působení estrogenních hormonů na reprodukci samců myši .....	38
1.2.3. Kapacitace a tyrosinová fosforylace .....	41
1.2.4. Akrozomální reakce .....	44
2. Přehled publikací .....	48
3. Příspěvek autorky .....	49
4. Seznam citací.....	71
5. Přílohy .....	98

## Seznam zkratek

	Anglický název	Český název	Synonymum
A2UG	$\alpha$ 2- microglobulins		
AC	Adenylyl cyclase		
BPB	Pyrazine binding protein	Protein vázající pyrazin	
BPI	Bactericidal/permeability increasing protein	Protein zvyšující permeabilitu membrány bakterií	
BPIFA1	BPI fold containing family A member 1		
BPIFD2	BPI Fold containing family D member 2		
BSA	Bovine serum albumine	Albumin kravského séra	
CaI	Calcium ionophore	kalcium ionofor	
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate		
CAMP	Cathelicidin-related antimicrobial peptides		hCAP18 CRAMP
CatSper	Cation channel of sperm		
CC10	Clara cell	Clarova buňka	
CCPBP	Clara cell phospholipid-binding protein		
CDSN	Corneodesmosin	Korneodesmosin	
CTS	cathepsin	Katepsin	CAT
DAG	dystroglycan	Dystroglykan	DG
DES	diethylstilbestrol		
DHB	2,3-dihydro-exo-brevicommin	2,3-dihydro-exo-brevicommin	
DMDS	Dimethyldisulfide	Dimethyldisulfid	
DNA	Deoxyribonucleic acid	Kyselina deoxyribonukleová	
DSC1	Desmokolín 1	Desmokolín	
DSG1	Desmoglein 1	Desmoglein	
EGF	epidermal growth factor	Epidermální růstový faktor	
ER $\beta$	Estrogen receptor $\beta$	Estrogenní receptor $\beta$	
PAR1	Coagulation Factor II (Thrombin) Receptor	Koagulační faktor II. (trombinový) receptor	F2R
FABP	Fatty acid-binding proteins	Vazebné proteiny mastných kyselin	

Fel d1	Felis catus allergen 1	Alergen 1 kočky domácí	
FGF	Fibroblast growth factor	Fibroblastový růstový faktor	
GPCR	G protein-coupled receptors	Receptory spřažené s trimerickými G proteiny	
hCAP18	Human cationic antimicrobial protein 18	Lidský kationtový antimikrobiální protein 18	
HE4	Human epididymis protein 4	Lidský epididymální protein	WFDC2
HMH	6-hydroxy-6-methyl-3-heptanone	6-hydroxy-6-methyl-3-heptanon	
HORN	Hornerin		Hmr
IMBP	2 - isobutyl- 3- methoxypyrazin	2-isobutyl 3-metoxypyrazin	
IP3	Inositol-trisphosphate	Inositol trifosfát	
KLK	Kallikrein	Kalikrein	
LBP	Lipopolysaccharides binding protein	Protein vázající lipopolysacharidy	
Lcn2	Lipocalin 2, neutrophil gelatinase-associated lipocalin	Lipocalin 2	NGAL 24P3
LEKTI1	Lympho-Epithelial Kazal-Type Inhibitor	Lymfo-epiteliální inhibitory kazálního typu	kódovaný genem SPINK5
LH	Luteinizing hormone	Luteinizační hormon	
LL-37	Cathelicidin-related antimicrobial peptides	Antimikrobiální peptidy příbuzné s katelicidinem	
LPS	Lipopolysaccharides	Lipopolysacharidy	
LSP	Lymphocyte specific protein 1		
LYG1	Lysozym-g-like-protein		
MPI	Metalloprotein inhibitors	Metaloproteinásové inhibitory	
MUC	Mucine	Mucin	
MUP	Major Urinary Proteins	Hlavní močové proteiny	
NO	Nitric oxide	Oxid dusnatý	
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain		
NRLs	NOD-like receptors	Receptory podobné NOD	

OBP	Odorant Binding Proteins	Odorant vázající proteiny	
OVOS	Ovostatin	Ovostatin	
OVGP1	Oviduct specific glycoprotein 1		MUC9
PAI2	Plasminogen activator inhibitor type 2		
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns		
PARs	Protease activated receptors	Receptory aktivované proteázami	
PCB	Polychlorinated biphenyl	Polychlorovaný bifenyl	
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate	Fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát	
PKA	Protein kinase A	Protein kináza A	
PKC	Protein kinase C	Protein kináza C	
PLA2	Phospholipase A2	Fosfolipáza A2	
PLC	Phospholipase C	Fosfolipáza C	
PLTP	Phospholipid transfer protein	Protein přenášeující fosfolipid	
PLUNC	Palate, lung, and nasal epithelium clone protein		
PR39	Proline-arginine rich peptide	Peptid bohatý na proline – arginin	
PRRs	Pattern recognition receptor		
Ps	Pseudogene	Pseudogen	
PTKs	Non-receptor tyrosine kinase	Nereceptorové proteiny tyrosinové kinázy	NRTKs
RBP1	Retinol-binding protein 1	Protein vázající retinol 1	
ROS	Reactive oxygen species	Volné kyslíkové radikály	
RTKs	Receptor tyrosine kinases	Receptorové proteiny tyrosinové kinázy	
SACY	Atypic adenylyl cyclase	Atypická adenylátcykláza	
SBT	2-sec-butyl-4,5 dihydrothiazole		
SCGB1A1	Secretoglobin family 1A member 1	Sekretoglobin rodiny 1A člen 1	uteroglobin
SCGBs	Secretoglobins	Sekretoglobiny	

SKALP	Skin derived antileukoproteinase		elafin
SLPI	Secretory leukocyte protease inhibitor	Sérový inhibitor leukocytárních proteáz	
SPINK5	Serine protease inhibitor Kazal-type 5	Inhibitor serinových proteáz kazálního typu 5	
SPURT	Secretory protein in upper respiratory tracts	Protein sekretující se v horním dýchacím ústrojí	
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin	2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin	
TFF1	Trefoil factor 1	Trefoil faktor 1	
TyrP	Tyrosine phosphorylation	Tyrosinová fosforylace	
UROM	Uromodulin	Uromodulin	
VNO	Vomeronasal organ	Vomeronasální orgán	
VOC	Volatile organic compound	Těkavá organická látka	
VOME	Vomeromodulin	Vomeromodulin	BPIFB9A
WAP	Whey acidic proteins		
WFDC	WAP disulphide four core	WAP čtyři disulfidická jádra	

## Latinské názvy

ZP	<i>Zona pellucida</i>
SC	<i>Stratum corneum</i> lat. vrstva kůže
SG	<i>Stratum granulosum</i> lat. vrstva kůže

## ABSTRAKT

Cílem mé disertační práce bylo identifikovat proteiny účastnící se chemické komunikace, a především pak ty, které jsou důležité pro sexuální signalizaci. Těkavé chemické signály jsou transportovány proteiny z rodiny lipokalinů uvnitř beta barelu směrem k receptorům, nebo z těla ven, kde jsou uvolňovány. Proto jsem se zaměřila na tyto proteiny ve slinách a ve vaginálním sekretu myši domácí, s využitím proteomických a transkriptomických přístupů. Vzhledem k cyklické povaze reprodukčního cyklu a jeho hormonální kontroly jsem se také zabývala detailní rolí estradiolu na fenotyp spermií u laboratorní myši.

Ve slinném proteomu jsme identifikovali pohlavní dimorfismus u 10 lipokalinů (tj. z celkem 20) a předpokládáme, že i ve slinách mohou hrát roli v pohlavní signalizaci, jak již bylo popsáno v moči. Ve vaginálním sekretu jsme také identifikovali několik lipokalinů, jejichž hladina exprese rostla z fáze proestru do estru, což by mohlo podporovat předpoklad, že i ve vagíně plní signalizační funkci. Hladina těchto lipokalinů však zůstávala zvýšená i ve fázi metestru, což by znamenalo, že by samice stimulovala samce ke kopulaci i ve fázi, kdy není receptivní. Pravděpodobně tedy záleží spíše na směsi ligandů přenášených lipokalinem, než na proteinech samotných. Dalším výsledkem bylo zjištění, že estrogenní hormony v závislosti na jejich koncentracích a době působení vykazují rozdílnou odpověď. Tato odpověď je dána tím, že různé estrogeny aktivují odlišné typy nebo části signálních drah, a nebo mohou vázat a aktivovat různé receptory, které spouští dráhy vedoucí k tyrosinové fosforylaci proteinů spermií během procesu kapacity.

Závěrem bych ráda zdůraznila, že regulace reprodukce a regulace sexuální signalizace je pod kontrolou steroidních hormonů – konkrétně estradiolu a progesteronu. Ve své práci jsem zároveň poskytla důkazy, že nejen samičí reprodukce, ale i fertilizační schopnost spermií je pod vlivem estradiolu.

## **ABSTRACT**

The aim of my thesis was to identify proteins involved in chemical communication and especially those that are involved in sexual signalling. Volatile chemical signals are transported with lipocalins in their beta-barrel structure to present their ligands to receptors or out of the body. Thus, I focused on the identification of these proteins in saliva and vaginal secretion of the house mouse using proteomic and transcriptomic approaches. Due to a cyclic manner of reproduction and its hormonal control, I have also focused on the role of estradiol on sperm phenotype in the laboratory mouse.

We have identified an elevated sexual dimorphism in several lipocalins (i.e. 10 out of 20) in the saliva proteome where they may play a role in sexual signalling (i.e. similar to their described roles in the mouse urine). Interestingly, vaginal secretion also contains lipocalins and they rise from proestrus to estrus and remain steady during metestrus. Such variation provides evidence that they serve sexual signalling, however, due to their elevated levels during metestrus it is most likely that their ligands function as signals and not the proteins themselves. On the level of sperm phenotype, we have provided evidence, that experimental concentrations of estradiol have differential effects on sperm. This is due to a differential activation of several signalling pathways via their receptors based on varying levels of estradiol.

To conclude, the regulation of reproduction and female sexual signalling are under the control of steroid hormones - namely estradiol and progesterone. In our study we provide evidence that the same female hormones are responsible for the variation in chemical signals and for the differences in fertilizing capacity of sperm.

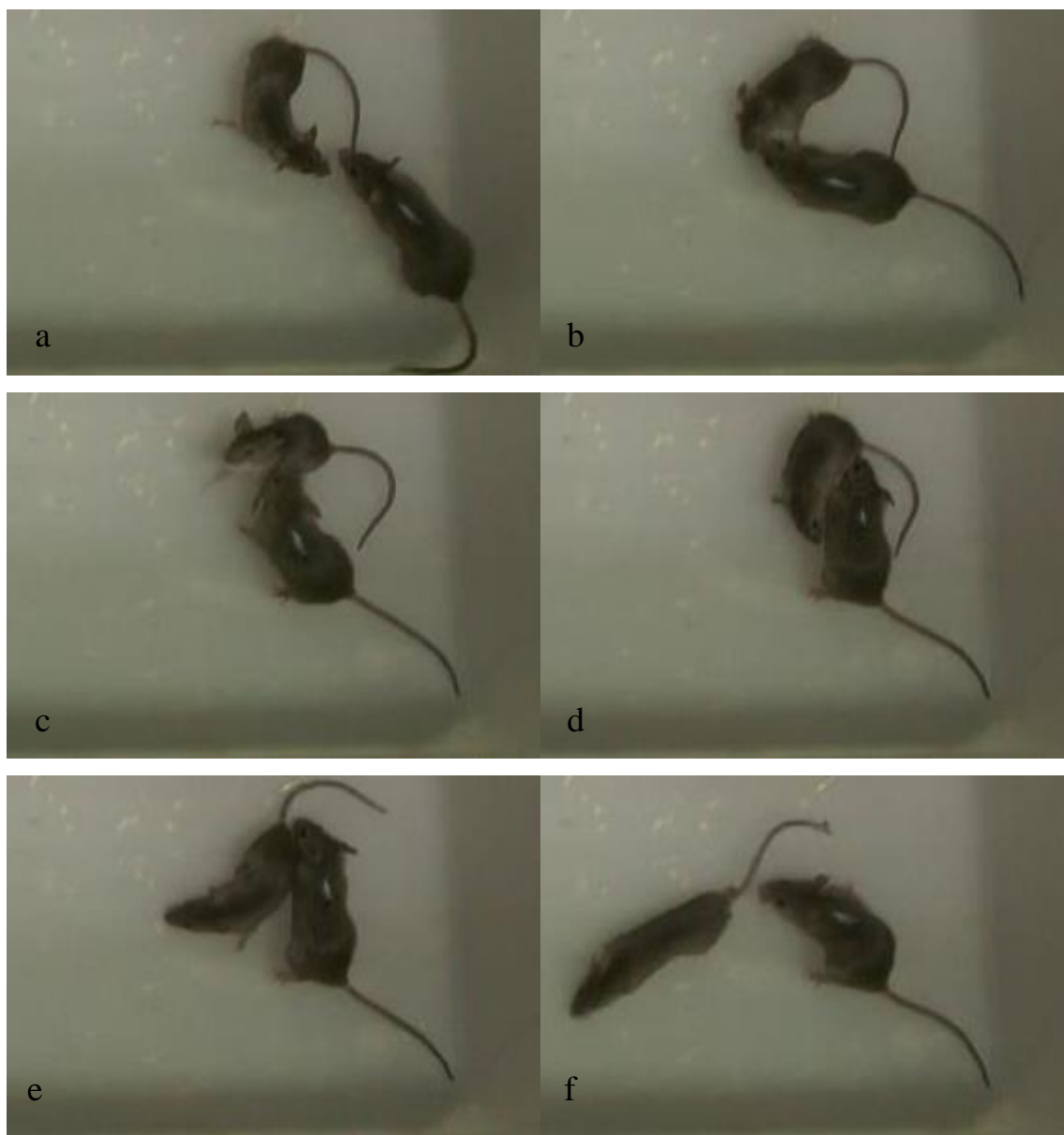
# 1. Literární přehled

## 1.1. Chemická komunikace

Chemická komunikace je jednou z nejstarších forem dorozumívání mezi buňkami či jedinci, přesto je oblastí, kde zůstává nezodpovězeno stále mnoho otázek. Některé principy chemické komunikace byly objeveny poměrně nedávno týmem R. Axel a L. Buck, kteří dokonce v roce 2004 získali Nobelovu cenu za objevení a popsání olfaktorických receptorů v čichovém epitelu.

Chemická komunikace se objevuje od buněčné úrovně až po úroveň jedince, a to napříč rostlinou i živočišnou říší. Taktéž je rozšířena napříč vodními i terestrickými ekosystémy. Jelikož se chemické signály šíří často vzduchem a na velké vzdálenosti, jsou obtížně detekovatelné a jejich koncentrace špatně měřitelná. Pro identifikaci jedinců ve skupině se během evoluce vytvářely různé systémy vzniku, přenosu a příjmu chemických látek. Přenos chemického signálu může probíhat jak přímým kontaktem jedinců, tak i nepřímo na dlouhé vzdálenosti. Jedinečnost chemického signálu, na rozdíl od vokálního či vizuálního, spočívá v tom, že může přetrvávat v prostředí po delší dobu a předávat tak informace jedincům vlastního či jiného druhu. Složení chemického signálu se odvíjí od individuálních fyzických vlastností jedince, např. zdravotního stavu, imunokompetence, složení stravy, je tudíž považován za tzv. "upřímný signál" (nelze ho vědomě ovlivnit). Tyto chemické signály jsou často produktem metabolických drah jedince a jsou vylučovány různými žlázami přímo na povrch těla (např. potní žlázy) nebo zprostředkovaně pomocí tělních tekutin, jako jsou moč (Janotova & Stopka 2011), sliny (Stopka et al. 2016), slzy (Stopkova et al. 2017) či vaginální sekret (Cerna et al. 2017).

Z pozorování jedinců myši domácí (*Mus musculus musculus*) lze usuzovat, že prvotní kontakt začíná v orofaciální oblasti, pokračuje přes linii těla a končí v anogenitální oblasti. V přímém kontaktu je aktivnější samec a samice spíše pasivně vyčkává (Obr.1). V orofaciální oblasti jsou zdrojem pachových informací sliny, slzy či produkty dalších menších žláz v hlavové oblasti. V anogenitální části jsou pachy produkovány prepuciálními žlázami, subkaudálními žlázami a u samic pak především vaginálním sekretem. Tento sekret zprostředkovává samci informace o reprodukčním stavu samice a může obsahovat látky stimulující kopulaci, jak bylo popsáno např. v případě křečka (Singer et al. 1976).



**Obrázek 1. Časový sled komunikace mezi samcem a samicí myši domácí (*Mus musculus musculus*). Samec je označen bílou skvrnou na zádech. Prvotní kontakt je zahájen přiblížením samce a dochází k němu v orofaciální oblasti (a, b). Pozvolna se zájem posouvá přes linii těla (c, d) až k anogenitální oblasti (e, f). Snímky byly pořízeny z videa.**

Chemické signály se mohou poskytovat informace jak o vnějším prostředí (t.j. odoranty), tak o individuálních vlastnostech jedince, jako je příbuznost, zdravotní stav, a je podstatnou součástí sexuální komunikace. U některých druhů živočichů se čich nevyvinul

příliš dobře – jsou to tzv. mikrosmaticí živočichové, jako je například člověk či někteří primáti, a u jiných živočichů je čich naopak velice dobře vyvinutý – tzv. makrosmaticí živočichové (Laska et al. 2000; Kornack & Rakic 2001). Takovým příkladem jsou hlodavci, především myš, která je jakožto modelový organismus nejlépe prostudována.

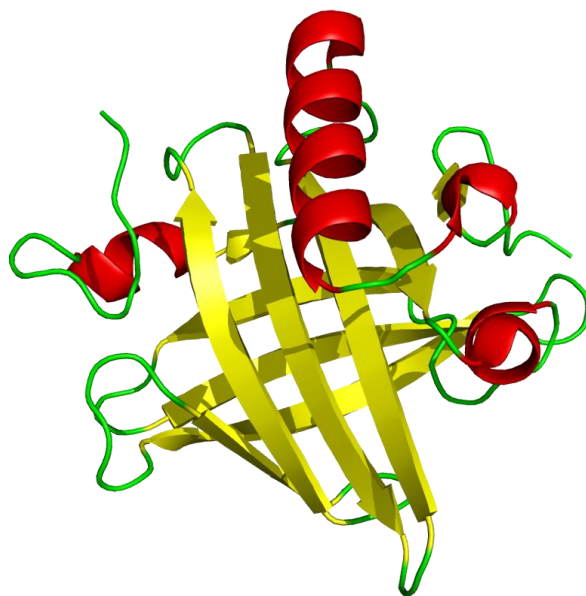
Nositelé chemických informací mohou být látky s různou chemickou strukturou, jednoduché i složitější. Často se chemické substance rozdělují na dvě hlavní kategorie, a to feromony a odoranty. Název feromon vznikl roce 1959, autory byli Peter Karlson a Martin Lüscher (Karlson & Lüscher 1959). Pojmenování je odvozeno z řeckých slov *pheroo* (nesu) a *hormon* (stimulační). Tito chemičtí poslové jsou produkováni jedincem a dostávají se do okolního prostředí, kde jsou následně zachyceni příjemcem a přes olfaktorický systém působí na nervovou soustavu. Feromony vedou ke změnám hormonálních hladin a následným fyziologickým, imunologickým či behaviorálním projevům příjemce a často mají pohlavně specifický efekt. Typickým znakem feromonů je to, že mohou působit i při velmi nízké koncentraci, například bombykol působí již při 170 molekulách (Tabuchi et al. 2013). Vnímání odorantů, na rozdíl od feromonů, vyžaduje řádově vyšší koncentrace a tyto substance předávají příjemcům informace především z vnějšího prostředí (t.j. přítomnost potravy, predátora, nebezpečných látek). Předpokládá se tedy, že detekce odorantů nebude mít pohlavně specifický efekt. Nicméně strukturálně mohou být odoranty i feromony velmi podobné látky, např. derivát pyrazinu, 2-isobutyl-3-methoxypyrazin (IMBP) je odorant charakteristický pro odrůdu vína Sauvignon blanc, zatímco jiný derivát pyrazinu 2,5-dimethylpyrazin byl popsán jako samičí feromon v moči myši (Daev & Dukelskaya 2003). Feromony či odoranty mohou být těkavé hydrofobní látky a jejich přenášení, ať už směrem z těla ven, či směrem k olfaktorickým receptorům, je usnadňováno specifickými bílkovinami z rodiny lipokalinů (Tegoni et al. 2000; Stopkova et al. 2017).

### **1.1.1. Lipokaliny**

Lipokaliny patří společně s proteiny vázajícími mastné kyseliny (angl. fatty-acid binding proteins, FABP), avidiny a metaloproteinasy inhibitory (MPI) do velké rodiny proteinů vázajících ligandy, která se nazývá calyciny (Flower 1996). Proteinová rodina lipokalinů je tvořena skupinou malých extracelulárních proteinů (150-250 AMK), jejichž sekvenční podobnost je nízká, avšak terciární struktura je zakonzervována a utváří

charakteristickou konformací těchto proteinů – kalich/barel (odtud název lipokalinů - „lipos“ = tuk a „calyx“= kalich).

Krystalografická struktura ukázala, že terciární struktura je tvořena osmi antiparalelními beta listy, spojenými vodíkovými můstky, jež vytváří tzv.  $\beta$ -barel, který tvoří vazebné místo pro různé ligandy (např. feromony, odoranty, retinol, lipidy, steroidy, biliny) – viz obr. 2. Lipokaliny tak mohou sloužit jako transportéry hydrofobních ligandů, které by se bez přenašečů nedostaly přes vodní bariéru, např. přes nosní mukózu k olfaktorickým receptorům. Lipokaliny se účastní celé škály biologických procesů, např. přenášení chemických signálů při chemické komunikaci, ale také hrají roli při syntéze prostaglandinů (Fujitani et al. 2002), regeneraci a vývoji tkání (Kim et al. 2005; Ganfornina et al. 2010; Petta et al. 2011; Spreyer et al. 1990; Playford et al. 2006), imunitní reakci organismu (Fujitani et al. 2002; Urade et al. 2013) či procesech spojených s reprodukcí (Stewart et al. 2000).



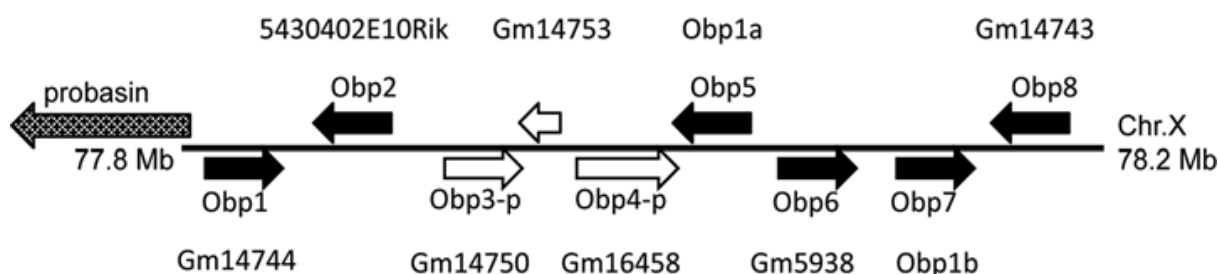
**Obrázek 2. Terciární struktura myšního lipokalinu je zobrazena na příkladu proteinu MUP. Žlutě je označeno 8 beta listů, které vytváří otevřený beta barel s alfa helixy (červené) a na konci jsou amino (N-terminus) a karboxylové (C-terminus) zbytky.**

U savců je známo asi 15 skupin lipokalinů, z nichž některé obsahují větší množství paralogů. U myši je známo přibližně 50 lipokalinů, z nichž nejvíce prostudované v souvislosti s chemickou komunikací jsou hlavní močové proteiny (angl. major urinary proteins, MUP) a odorant vázající proteiny (angl. odorant binding proteins, OBP).

### 1.1.2. Odorant vázající proteiny (OBP)

OBP je typickým zástupcem lipokalinů, jehož struktura vykazuje výše uvedené charakteristické znaky. První popsané OBP bylo izolováno z čichové sliznice krav a vzhledem k jeho schopnosti vázat známý odorant IMBP (derivát pyrazinu) byl nazván protein vázající pyrazin, angl. pyrazine binding protein neboli PBP (Bignetti et al. 1985). Další analýzou vazebné schopnosti kravského OBP vůči 80 ligandům se zjistilo, že tento protein je schopen vázat širokou škálu chemických substancí s různou chemickou strukturou, především pak odorantů (Pevsner et al., 1990). Výsledky ukázaly, že tento typ OBP je dimer skládající se ze dvou 19kDa podjednotek. Předpokládá se, že kromě vazebných míst uvnitř beta barelu vzniká při tvorbě dimeru uprostřed další vazebné místo pro hydrofobní ligandy (Tegoni et al. 1996). Struktura kravského OBP se však liší od struktury OBP u ostatních druhů nepřítomností disulfidické vazby, což může mít vliv na utváření konformace a počtu vazebných míst (Tegoni et al. 2000; Ramoni et al. 2002).

Z nosní sliznice myši byly OBP poprvé identifikovány v roce 1992 (Pes et al, 1992), a to jako dvě podjednotky heterodimeru OBP1 - OPB1a (18kDa) a OBP1b (19kDa). Později byl na základě bioinformatické analýzy u myši popsán podrobněji klastr šesti *Obp* genů a dvou *Obp* pseudogenů na chromosomu X (Stopková et al. 2009; Stopková et al. 2014) Obr. 3. Tyto proteiny byly potvrzeny i na úrovni exprese v různých tkáních (Stopková et al. 2016). *Obp* se vyskytují s větším či menším počtem paralogů u mnoha druhů savců, jako jsou např. norník rudý (*Myodes glareolus*) – (Stopková et al. 2010), sloni (Lazar et al., 2002), tur (*Bos taurus*) – (Bignetti et al. 1985), prase (*Sus scrofa*) – (Spinelli et al. 1998), dikobraz (*Hystrix cristata*) – (Felicoli et al. 1993) a rypoš (*Fukomys anelli*, *F. kafuensis*) – (Hagemeyer et al. 2011).



**Obrázek 3. Organizace genového uspořádání *Obp* na chromosomu X.**

Jednotlivé geny *Obp* byly očíslovány podle číselného kódu z databáze Ensembl (Stopková et al. 2014).

Jeden ze členů rodiny OBP je tzv. afrodisin, který byl objeven ve vaginálním sekretu samic křečka (*Mesocricetus auratus*) a jeho pojmenování souvisí s jeho vlastností stimulovat kopulaci u samců. V roce 1976 bylo studováno specifické chování samic křečka, které v období estru vylučují větší množství vaginálního sekretu (Singer et al. 1976). Dalšími pokusy bylo zjištěno, že potřeme-li uspaného samce tímto sekretem, stimuluje ostatní samce ke kopulaci s ním (Macrides et al. 1984). Z vaginálního sekretu byla extrahována látka dimetylsulfid (angl. dimethyl disulfide, DMDS) v domnění, že jde o feromon, který stimuluje samce. Avšak sama o sobě látka DMDS žádnou reakci nevyvolávala (Petruilis & Johnston 1995). Podrobnější analýza samičího sekretu vedla k izolaci abundantního proteinu afrodisinu a k názoru, že je to právě tento protein, který vyvolává specifickou behaviorální odpověď (Singer et al. 1986; Briand et al. 2000). Expres afrodisinu byla zatím potvrzena jen u samic křečka, zejména ve vaginální oblasti (Bartholihho žlázy, angl. Major vestibular glands) a děloze (Mägert et al. 1995), dále také v děložním čípku a ve snížené koncentraci ve vaječnicích (Kruhøffer et al. 1996). Z existujících pramenů vyplývá, že je afrodisin pohlavně specifický, nicméně u samců se přítomnost tohoto genu zjišťovala pouze v příušních žlázách (Mägert et al. 1999). Existují nové výsledky, které ukazují, že afrodisin je pomocí dnešních metod detekovatelný v mnoha dalších tkáních, a to jak u samice, tak i u samce (Stopkova et al. 2017). Můžeme se proto domnívat, že hlavní roli stimulu nehraje samotný protein, ale spíše látka/ligand, který tento protein váže a vynáší z vaginálního sekretu do vnějšího prostředí.

Nejčastější cestou, kudy se dostávají chemické signály z těla jedince, jsou různé tělní tekutiny, např. vaginální sekret (Singer & Macrides 1993), moč (Janotova & Stopka 2011), slzy (t.j. extraorbitální slzná žláza, lakrimální žláza) nebo sliny (t.j. podčelistní žláza, angl. submandibular gland) (Srikantan et al. 2005). Velká část lipokalinů se u myši syntetizuje v játrech, odkud se pak následně dostává močí ven z těla. Podobně např. slinná žláza produkuje velké množství OBP, které jsou poté vylučovány do slin, a dominantní oční žláza (t.j. extraorbitální slzná žláza) vylučuje lipokaliny do slz, například u křečků či lidí (Srikantan et al. 2005; Breustedt et al. 2005). Na těle savců dále existují rozmanité pachové žlázy, které také produkují přímo na povrch zvířete různé pachové informace. Kočkodanovití (*Mandrillus sphinx*) mají speciální žlázy umístěné ve sternální oblasti na hrudním koši, kde produkují různé pachové značky značící dominanci, pohlaví atd. (Setchell et al. 2010). U hlodavců jsou to např. prepuciální žlázy (Ponmanickam et al. 2010) nebo posterolaterální

žlázy. Jsou to místa, kterým jedinci opačného pohlaví věnují větší pozornost. Samice křečka dokonce očichávají boky samce více než např. moč (Tang-Martinez et al. 1993).

Exprese *Obp* u myši probíhá v různých tkáních v různém množství. Publikace Stopková et al. 2016 ukazuje, že *Obp* jsou v největším množství exprimovány v nosním epitelu a v slzných žlázách. Poprvé jsou zde analyzovány 4 různé geny pro *Obp* (t.j. *Obp1*, *Obp5*, *Obp6*, *Obp7*) v osmi různých tkáních (t.j. olfaktorický epitel, vomeronasální orgán, lymfoidní tkáň asociovaná s nosní sliznicí, lakrimální žláza, Harderianova žláza, slinná žláza, prepuciální žláza a játra) u obou pohlaví dvou poddruhů myši (t.j. *Mus musculus musculus* a *Mus musculus domesticus*). Některé geny *Obp* jsou exprimovány specificky pouze v jedné tkáni, např. *Obp6* je pouze v slzné žláze, zatímco jiné jsou jak v slzné, tak ve slinné žláze. Pohlavní dimorfismus byl detekován v expresi *Obp7* v slzné žláze, kde větší množství *Obp7* produkují samičky. Přítomnost OBP na proteinové úrovni byla také potvrzena ve slinách (Stopka et al. 2016), slzách (Stopkova et al. 2017) a vaginálním sekretu (Cerna et al. 2017).

Přesná funkce a způsob působení OBP nebyl dosud zcela objasněn. Předpokládá se, že OBP exprimované v nosní tkáni, ať už v hlavní čichové sliznici, či ve vomeronasálním orgánu (VNO), může sloužit k transportu hydrofobních molekul k olfaktorickým receptorům. Názory na to, zda OBP v nose pouze nespecificky usnadňuje pohyb hydrofobních ligandů směrem k receptorům (Pevsner et al. 1988; Pevsner & Snyder 1990) či se aktivně podílí přímo na aktivaci těchto receptorů (Taylor et al. 2008; Vidic et al. 2008), se různí. Je také možné, že role OBP spočívá naopak ve vychytávání přebytečných ligandů či odstraňování toxických substancí (Grolli et al. 2006; Boudjelal et al. 1996; Pelosi 1994), které by mohly poškodit sliznici. To by vysvětlovalo přítomnost těchto proteinů i v dalších sekretech, jako jsou slzy a sliny, kde není potřeba aktivovat receptory, ale spíše udržovat povrch sliznice a odnášet případné nadbytečné látky.

### **1.1.3. Hlavní močové proteiny – Major urinary proteins (MUPs)**

Hlavní močové proteiny (MUP) jsou dalšími členy rodiny Lipokalinů a stejně jako OBP mají schopnost vázat rozmanité ligandy. Z hlediska chemické komunikace jsou prostudovány mnohem podrobněji než OBP a jsou známy i konkrétní účinky feromonálních ligandů, které MUP vynáší močí ven z těla. Velikost těchto proteinů je kolem 20kDa a u myši tvoří 2Mb klastr recentně duplikovaných genů na chromosomu 4 (Mudge et al. 2008; Logan et al. 2008). U laboratorní myši C57BL bylo popsáno 42 genů pro MUP, polovinu z nich však

tvoří nekódující sekvence pseudogenů, přičemž většina kódujících sekvencí se nachází na 3'-5' revers řetězci DNA a naopak pseudogeny leží na 5'-3' forward řetězci. Kódující sekvence MUP se rozdělují do dvou klastrů – klastř A tvoří ancestrální typy *Mup* a zahrnuje 5 genů (*Mup3*, *Mup4*, *Mup5*, *Mup6*, *Mup20*, *Mup21*), z kterých je pravděpodobně odvozen druhý klastř B recentně duplikovaných 15ti genů (*Mup1*, *Mup2*, *Mup7-Mup19*), které mají na úrovni nukleotidové sekvence až 99% homologii. MUP se vyskytují i u jiných zvířat, nicméně největší množství paralogů nacházíme právě u myši, o něco méně jich má potkan (asi 8 genů - u potkana jsou pod názvem  $\alpha$ -2-microglobulins, A2UG) (Saito et al. 2000; Böcskei et al. 1992) a u jiných druhů se často nachází pouze jeden či několik málo MUP (Zhou et al. 2009).

MUP jsou syntetizovány zejména v játrech (Hastie et al. 1979) a přes glomerulární filtraci se dostávají do moči, která slouží jako zdroj chemických informací o daném jedinci. Především při značkování teritoria mají MUP významnou roli, protože díky pozvolnému uvolňování ligandů z MUP prodlužují pachovou informaci značky. Expres Mup byla ale prokázána i v jiných tkáních, např. ve slinných žlázách, slzných žlázách, mléčných žlázách apod. (Shahan et al. 1987; Sharrow et al. 2002; Mudge et al. 2008). Podobným způsobem se tedy do vnějšího prostředí dostávají i další pachové informace z jiných tělních tekutin, např. vaginálního sekretu, slz či slin, které ulpívají na srsti při tzv. selfgroomingu (čištění své srsti), kde zasychají a také uvolňují chemické signály (Ferkin et al. 1996).

Expres MUP je u myši pohlavně dimorfní, samci produkují mnohonásobně větší množství MUP v moči než samice. Tento dimorfismus byl zdokumentován u dvou myších poddruhů *Mus musculus musculus* i *Mus musculus domesticus* (Stopková et al. 2007), kde bylo navíc zjištěno, že rozdíl v produkci MUP mezi samcem a samicí je u poddruhu *M. m. musculus* výraznější než u *M. m. domesticus*. Chemické signály, které MUP zprostředkovávají, jsou tedy pohlavně specifické a nejvíce souvisí s reprodukčním chováním a agresivitou. Existuje jediná publikace, která ukazuje, že tyto proteiny (snad i bez přítomnosti ligandů) mohou vyvolat fyziologické a behaviorální odpovědi u příjemce (Chamero et al. 2007). Což se zdá být velice nepravděpodobné, jelikož jsou MUP proteiny produkovány oběma pohlavími, docházelo by k autostimulaci jedince.

Příkladem ligandů MUP jsou např. 2-sec-butyl-4,5-dihydrothiazole (SBT), 2,3-dihydro-exo-brevicomín (DHB), 6-hydroxy-6-methyl-3-heptanone (HMH) či farneseny ( $\alpha$  a  $\beta$  farnesen), které jsou dominantní v moči samců a působí jako atraktanty pro samice a zároveň jako averzivní signál pro samce (Novotny et al. 1990). V samičí moči se zase vyskytují látky

(např. 2,5 dimethylpyrazin), které u samců mohou vyvolávat například zvýšení hladiny gonadotropinů, především luteinizačního hormonu (LH), který vede ke zvýšení hladiny testosteronu (Maruniak & Bronson 1976).

#### **1.1.4. Efekty chemické komunikace**

Chemické signály se tedy významně podílí na fyziologických a behaviorálních změnách, ke kterým dochází u jedinců, jež jsou jim vystaveni. Některé konkrétní fyziologické změny vyvolané určitými pachovými signály byly již objasněny a nazvány podle autora/ů, který tento efekt poprvé prokázal.

##### **a) Whitten efekt**

V roce 1968 poprvé pozoroval Wesley K. Whitten, že vlivem přítomnosti samčí moči dochází u samic k indukci estru. V případě větší skupinky samic docházelo ke stimulaci všech samic ve skupině a tudíž k postupné synchronizaci estrů. Látky, které jsou hlavními spouštěči tohoto mechanismu, jsou především farneseny z moči samců (Whitten et al. 1968; Jemiolo et al. 1986).

##### **b) Bruce efekt**

V roce 1959 si Hilda M. Bruce všimla změny v chování u laboratorních myší (Heske & Nelson 1984; Becker & Hurst 2008). U březích samic myší docházelo častěji ke spontánním potratům v přítomnosti pachu neznámého samce. U myší dochází k potratům v časném stádiu implantace embrya, kdežto u jiných druhů může nastat přerušení i v pozdějším stupni březosti. Tento jev byl pozorován i u rodu křečičků (*Peromyscus*) (Eleftheriou et al. 1962), u hraboše pensylvánského (*Microtus pennsylvanicus*) (Clulow & Langford 1971), či u paviánů (*Theropithecus gelada*) (E. K. Roberts et al. 2012). Dominantními chemickými signály jsou opět hlavní komponenty v moči samce, a to farneseny, DHB a SBT. Tyto chemické signály společně s individuálním pachem cizího samce představují pro samici a její nenarozená mláďata potenciální riziko. Tento signál pravděpodobně působí přes dráhu vomeronasálního orgánu.

### c) **Lee-Boot efekt**

Nastává ve chvíli, kdy jsou spolu v jedné skupině společně dospělé samičky myši bez přítomnosti samce (objevuje se u jiných hlodavců, např. *Apodemus* (Cinquetti & Rinaldi 1989; Stopka & Macdonald 1998; Féron & Gheusi 2003). Z moči samic se uvolňuje estrogen dependentní feromon 2,5-dimethylpyrazin působící přes VNO na samičku (příjemce). Tento feromon snižuje koncentraci LH a zvyšuje hladinu prolaktinu. Tímto se potlačí fáze estru (zůstávají v tzv. anestru) u dospělých samic. U nedospělých samic může v důsledku podobného feromonu docházet k zpoždění nástupu puberty (Novotny et al. 1986).

### d) **Vandenbergh efekt**

Opačný účinek, kdy se samičkám nástup puberty urychluje v přítomnosti pachy samce, způsobují samčí feromony farneseny a HMH (Novotny et al. 1999a). Později byly v této souvislosti popsány účinky i dalších látek, jako jsou SBT a DHB (Novotny et al. 1999b). Tato změna reprodukčního chování byla popsána již v roce 1975 skupinou Vandenbergha (Vandenbergh et al. 1975).

### e) **McClintock efekt**

V roce 1971 popsala M. K. McClintock ve své publikaci, že u žen, které tráví mnoho času společně (např. studentky na kolejích), dochází postupně k synchronizaci jejich menstruačního cyklu (McClintock 1971). Synchronizace menstruačního či estrálního cyklu byla popsána i u jiných druhů, např. potkan (McClintock 1978), křeček (Handelmann et al. 1980) či šimpanz (Wallis 1985).

### f) **Singer efekt**

U samců křečků, kteří byli vystaveni pachu vaginálního sekretu samice, dochází ke stimulaci kopulačního chování. Podrobnější analýzou tohoto sekretu se zabývala skupina A. Singera. V sekretu identifikovali protein z rodiny lipokalinů afrodisin, který je pravděpodobně zodpovědný za afrodisiakální funkci tohoto sekretu (Singer et al. 1984; Singer et al. 1976; Singer et al. 1986).

## **g) Stopka efekt**

Efekt, při kterém dochází k častějšímu nástupu estrální fáze cyklu, byl popsán u samic druhu myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*). Při pokusu byly samice odděleny kovovou mřížkou tak, aby mohly cítit pachy a měly vizuální kontakt se samcem, ale aby nemohlo dojít k fyzickému kontaktu. Za mřížkou byl v kontrolním případě jeden samec, v testovací fázi se pak střídalo během krátké doby několik různých samců. U samic vystavených přítomnosti a pachům různých cizích sameců docházelo ke zkrácení nereceptivních fází cyklu, tudíž receptivní fáze (estrus) nastávala častěji než u kontrolních samic (Stopka & Macdonald 1998).

### **1.1.5. Detoxifikační a antibakteriální funkce lipokalinů**

V publikaci Stopková z roku 2009 je uveden předpoklad, že proteiny MUP mohou vázat a transportovat různé těkavé organické sloučeniny (angl. volatile organic compounds, VOCs) vzniklé během metabolických dějů a mohou být pro organismus toxické (Stopková et al. 2009; Kwak et al. 2011; Kwak et al. 2016).

V některých studiích bylo pozorováno, že větší množství xenobiotik je vynášeno močí z těla ven právě ve spojení s MUP. Skupina Larsena radioaktivně označila primární metabolit methylsulfonyl, který vzniká z polychlorovaného bifenyly (PCB; průmyslově vyráběná chemická látka, která může být karcinogenní nebo tzv. endokrinním disruptorem) a intraperitoneálně ji injikovali samečkům. Většina této značené látky byla v moči navázaná na MUP (Larsen et al. 1990). Podobnou situaci pozorovali po podkožním vpravení menadionu (synteticky vyrobená látka, nahrazující v myši stravě vitamin K), kdy byla chemická látka vylučována močí ve vazbě s MUP (Robertson et al. 1998). Dalším potvrzením byl experiment, kdy byl radioaktivně značený 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD; karcinogenní látka, vysoce znečišťující prostředí) podáván perorálně a nacházen v moči opět společně s MUP (Hakk et al. 2009). Zbavování se xenobiotik s navázanými MUP v moči bylo pozorováno i u samic myši (Staskal et al. 2005).

Některé lipokaliny jsou schopné vázat bakteriální siderofory a znemožňují tak růst bakterií (Goetz et al. 2002; Fischbach et al. 2006; Smith 2009; Hentze et al. 2005). Siderofory jsou peptidy, které mají schopnost vázat ionty  $Fe^{2+/3+}$  a jsou syntetizované, vylučované a reabsorbované mikroorganismy, např. bakteriemi. Železo je nepostradatelné pro růst mikroorganismů (Sutak et al. 2008) a v případě, že lipokaliny vycytávají siderofory

s navázaným železem, nemohou je bakterie reabsorbovat a dochází tak k inhibici jejich růstu. Nejznámější je Lipocalin 2 (LCN2, NGAL, 24P3) neboli Siderocalin. Další proteiny, jež mají nejspíše stejnou schopnost vázat siderofory, jsou např. LCN1 a myší LCN12 (Strong et al. 2005). V práci Petrak et al. z roku 2007 byla prokázána zvýšená exprese *Mup* u myší, které byly předávkovány železem. Je možné, že i jiné lipokaliny mohou mít podobnou schopnost vázat ionty kovů (Fe, Cu) a do určité míry mít antibakteriální funkci v organismu.

Kromě role v přenosu chemických signálů mají tedy lipokaliny i schopnost detoxifikace organismu, tím, že mohou vázat různé degradační produkty metabolismu, které by mohly být zdrojem poškození tkáně. Proto je nutné zmínit „Hypotézu toxického odpadu“, angl. The toxic waste hypothesis of chemical communication (Stopková et al. 2009), která definuje rámec, dle kterého chemická komunikace vznikla jako evoluční přizpůsobení čichu na toxické organické metabolity a především pak na ty, které korelují s tělesnou a reprodukční zdatností individua. Tato hypotéza dále předpokládá, že primární (ancestrální) rolí lipokalinů byl transport těkavých ligandů ven z těla, zatímco její role v chemické komunikaci se vyvinula později. Tato teorie je jednodušší alternativou k teorii Harper - Smith, která předpokládá nejprve vznik specifického chemického signálu za účelem komunikace a následně vznik chemosenzorické detekce tohoto signálu (Harper & Smith 2003). Toxická hypotéza je oproti tomu jednodušší ve smyslu nižšího počtu evolučních kroků (t.j. dle Harper - Smith jsou potřeba 2 kroky: nejdříve se musí vyvinout signál kvality za účelem komunikace a zároveň se vyvine systém detekce; „Hypotéza toxického odpadu“ předpokládá 1 krok: signál kvality již existuje jako produkt metabolismu a vyvíjí se pouze systém detekce (Stopková et al. 2009)).

### **1.1.6. Sekretoglobiny**

Rodina sekretoglobínů (angl. secretoglobins, SCGBs) je tvořena proteiny, které se nacházejí převážně u savců. Jsou exprimovány především ve sliznicích různých částí těla a pravděpodobně hrají roli v buněčné signalizaci, imunitní odpovědi či chemotaxi a mohou sloužit jako transportéry steroidních hormonů. U prasete bylo prokázáno, že jeden ze sekretoglobínů vyskytující se ve slinách samců je nosičem chemických signálů a stimuluje nástup estrální fáze u samic (Austin et al. 2004).

Tyto sekretorické proteiny se vyskytují ve formě dimeru. Struktura monomeru se skládá ze čtyř  $\alpha$ -helixů vytvářejících tvar bumerangu, angl. boomerang-shaped (Callebaut et

al. 2000), kde helixy H1, H3 a H4 jsou schopné vázat homodimericky partnery (Klug et al. 2000). Díky této struktuře vzniká uvnitř hydrofobní „kapsa“ pro další molekuly, například pro steroidy, např. progesteron či retinol (Beier 2000), ale také pro polychlorované bifenyly, fosfolipidy a prostaglandiny (Mukherjee et al. 2007; Stripp et al. 1996). Jednotlivé monomery mohou vytvářet homodimery či heterodimery a ty následně tetramery. Známý je například protein Fel d1 (*Felis catus* allergen 1), který je tvořen dvěma heterodimery. Tento protein vyvolává imunitní odpověď na srst koček v podobě IgE protilátek (Kaiser et al. 2007; Kaiser et al. 2003).

Vysoká míra exprese sekretoglobinů byla nalezena v děloze, prostatě, plicní tkáni, slzných a slinných žlázách. Například mRNA téměř všech členů SCGB (výjimkou je SCGB1D1) byla nalezena v dýchacích cestách lidí (Lu et al. 2011). Fyziologické funkce jednotlivých členů rodiny SCGB nebyly doposud objasněny a většina rolí nebyla definována. Nicméně bylo popsáno, že členové SCGB se podílí na udržování a opravování plicní tkáně a modulaci imunitní odpovědi (Mukherjee et al. 2007).

Jeden z členů této rodiny objeven už v časném stádiu těhotenství králíků a pojmenován jako blastokinin (Krishnan & Daniel 1967; Beier 1968), častěji se však objevuje v literatuře pod názvem uteroglobin (další názvy: secretoglobin family 1A member 1, SCGB1A1, clara cell phospholipid-binding protein, CCPBP, CC10). Exprese uteroglobinu je indukovaná steroidy a působí proti poškození oxidativním stresem (Li et al. 2007), protizánětlivě, účastní se autoimunity a jeho nedostatek vede ke vzniku rakoviny (Li et al. 2007; Kundu et al. 2000). Známým sekretoglobinem u lidí je mamaglobin, který je hojně exprimovaný v prsní tkáni a jeho zvýšená hladina se používá jako marker pro rakoviny prsou (Becker et al. 1998).

Funkce sekretoglobinu je zatím nejlépe popsána u feromaxeinu, což je protein sekretovaný podčelistní žlázou (angl. submaxillary gland) u samců prasat, jehož produkce se zvyšuje v přítomnosti samic. Tento protein váže ve své hydrofobní „kapse“ tři typy feromonů: 16-androstenon, 5 $\alpha$ -androsten-3 $\alpha$ -ol a 5 $\alpha$ -androsten-3-on. U samice dochází k indukci estru po přímé interakci se slinami samce. Feromaxein, jako jiné sekretoglobiny, váže steroidní typy látek, mezi které patří i testosteron a 5 $\alpha$ -dihydrotestosteron. (Austin et al. 2004).

## 1.2. Procesy spojené s reprodukcí

Následující část práce pojednává o proteinových změnách během vybraných reprodukčních procesů jako například estrální cyklus či maturace spermií.

### 1.2.1. Estrální cyklus

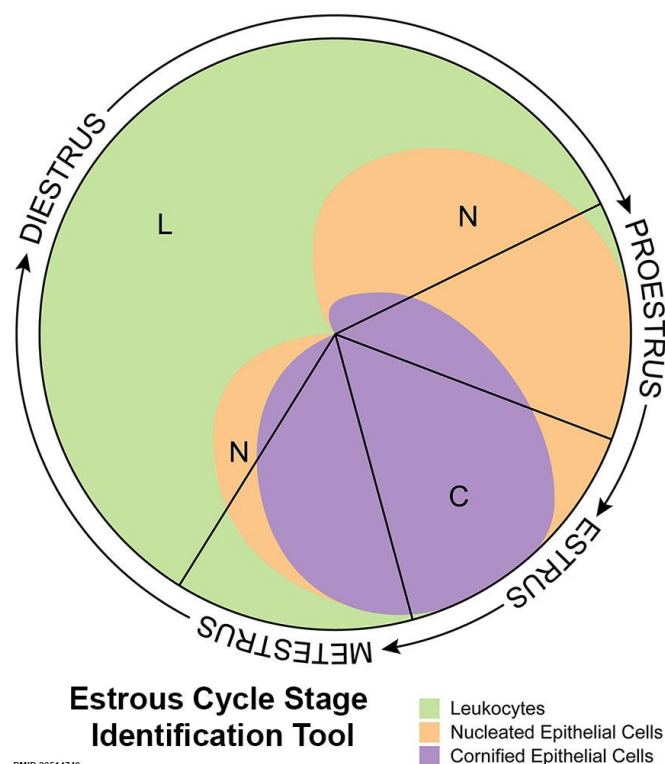
#### 1.2.1.1. Jednotlivé fáze estrálního cyklu

Estrální cyklus označuje periodické a fyziologické změny v těle placentálních samic savců. Tyto změny jsou navozeny působením pohlavních hormonů a slouží k zajištění reprodukce. Estrálními cykly prochází naprostá většina savců, pouze u lidoopů a u člověka jsou nahrazeny cyklem menstruačním (Rowell 1972). Dle zkušeností je možné vlivem různých pachů (feromonů) průběh estrálního cyklu ovlivňovat a to zejména délku estru, kdy je samice receptivní.

Nejlépe je průběh estrálního cyklu popsán na laboratorním kmenu myši C57BL/6J. Cyklus probíhá pod vlivem pravidelné fluktuace dvou pohlavních hormonů estradiolu a progesteronu. Střídají se tak čtyři fáze (proestrus, estrus, metestrus, diestrus).

Průměrná délka jednoho cyklu u potkanů a myší je 4–5 dní. V ojedinělých případech může být cyklus delší – 6 dní (Felicio et al. 1981; Anita M. Mandl 1951; Morrissey et al. 1988; Long & Evans 1922). Doba cyklu může být ovlivněna několika vlivy: věk, délka světelného dne, hluk, teplota, stres, sociální vztahy (Li & Davis 2007; Nelson et al. 1982; Campbell et al. 1976; Felicio et al. 1981; Goldman et al. 2007).

Obvykle je cyklus rozdělen na 4 fáze, avšak někteří autoři jej rozdělili pouze do 3 fází, proestrus, estrus a diestrus (Goldman et al. 2007). Pro jednotlivé fáze je charakteristická změna zastoupení poměrů buněk (Obr. 4) ve vaginálním sekretu a hodnotí se podle vaginálních roztěrů obarvených histologickými barvičkami, jako jsou například Wright-Giemsa, May-Grünwald či Toloudinova modř.



#### Obrázek 4. Nákres průběhu estrálního cyklu

Jednotlivá stadia estrálního cyklu (proestrus, estrus, metestrus, diestrus). Barevně jsou zobrazeny jednotlivé populace buněk (zeleně: L-leukocyty, oranžově: N-jaderné epiteliální buňky, fialově: C – keratinizované epiteliální buňky). Převzato (Byers et al. 2012).

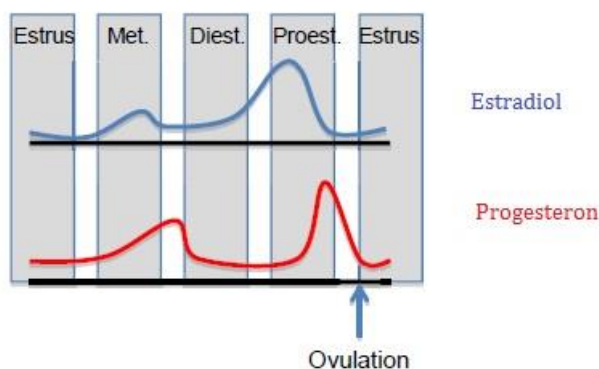
#### Proestrus

Je fáze trvající u myši méně než 24 hodin (Long & Evans 1922; Anita M. Mandl 1951; Allen 1922). V této fázi se výrazně zvyšuje hladina estradiolu, který však na konci fáze klesá a dochází ke zvyšování hladiny progesteronu (Obr. 4). Ve vaginálním sekretu nalezneme v této fázi zejména malé jaderné epiteliální buňky s relativně stejnou velikostí a vzhledem, obr. 6A, B (Cora et al. 2015). Ve velmi nízké míře lze pozorovat keratinocyty. Pokud je vzorek více koncentrovaný, můžeme pozorovat kohezivní shluky buněk. Na povrchu epiteliálních buněk můžeme pozorovat bakterie (Obr. 5).

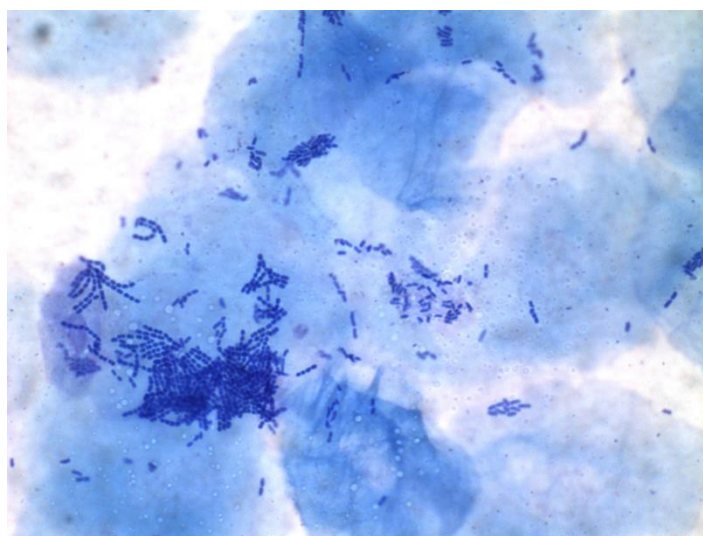
#### Estrus

Délka této důležité fáze, kdy je samička vysoce fertlní, je 12–48 hodin (Long & Evans 1922; Anita M. Mandl 1951; Allen 1922). Charakteristické je převažující množství keratinocytů (bezjaderných epiteliálních buněk) s občasným výskytem epiteliálních buněk

(Obr.7 C, D). Na povrchu buněk se často objevuje vyšší koncentrace bakterií viz. obr. 6 (Cora et al. 2015).



**Obrázek 5. Hladiny estradiolu a progesteronu během estrálního cyklu (potkan).**  
Převzato a upraveno (Lebron-Milad & Milad 2012).



**Obrázek 6. Shluky bakterií na povrchu epitelálních buněk**

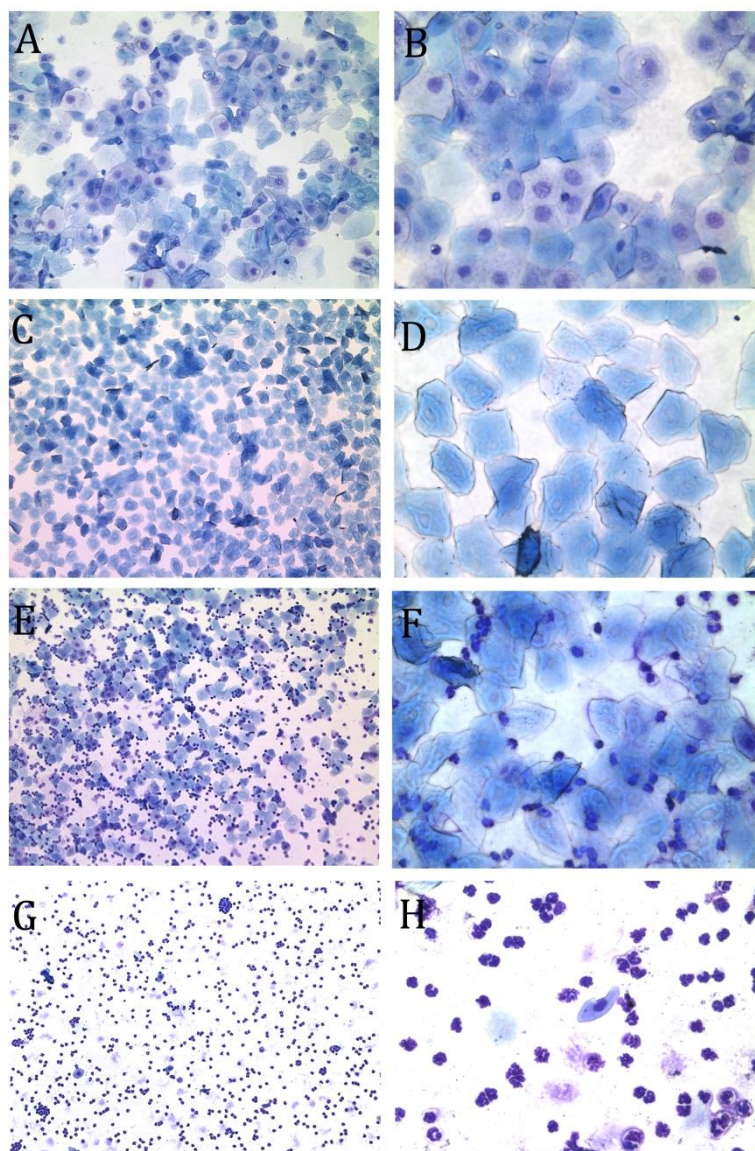
Cytologie vaginálních buněk během estru se shluky bakterií. Obarveno May-Grünwaldem a Giemsou. Zvětšení 1000krát.

### Metestrus

U myši tato fáze trvá do 24 hodin, je značně delší než u potkanů, kde trvá 6–8 hodin (Astwood 1939; Long & Evans 1922; Anita M Mandl 1951). V této fázi se objevují neutrofilů, které jsou ve stejném poměru s keratinocyty (Obr.7 E, F). V malém procentu jsou pak viditelné jaderné epitelální buňky.

## **Diestrus**

Nejdelší ze všech fází je diestrus, který trvá u myši 48–72 hodin (Astwood 1939; Long & Evans 1922). Typickým znakem pro diestrus je zvýšená viskozita vaginálního sekretu, která je dána zvýšenou produkcí mucinů, zejména MUC1 (Carson et al. 1998; Petrova et al. 2013). Klesá počet bezjaderných epitelálních buněk a mírně roste počet jaderných epitelálních buněk, kde můžeme rozeznat dvě velikosti: velké a malé. Stále je zde velký počet leukocytů. V pozdním diestru (Obr.7 G, H) se jaderné epitelální buňky dostávají blízko sebe a převažují spíše kulaté, což vypovídá o blížícím se proestru.



**Obrázek 7. Zobrazení jednotlivých stadií estrálního cyklu myši (*Mus musculus musculus*)**

Na obrázku jsou vaginální roztěry obarvené May-Grünwaldem a Giemsou, vyfotografované pod světelným mikroskopem, představující jednotlivá stadia estrálního cyklu. A, B – proestrus; C, D- estrus; E, F – metestrus; G, H – diestrus (A, C, E, G je zvětšeno 200krát; B, D, F, H je zvětšeno 400krát).

#### 1.2.1.2. Imunita spojená s estrálním cyklem

Mnohé studie prokázaly, že ženy mají vyvinutější systémovou imunitu než muži. To ovšem zvyšuje množství tzv. autoimunitních onemocnění. Ženy mají vyšší koncentraci Ig protilátek v krevním séru,  $CD4^+$  T buněk a větší poměr  $CD4/CD8$  (Whitacre et al. 1999;

Olsen & Kovacs 1996). To vede k větší produkci cytokinů a silnější humorální imunitní odpovědi např. na infekci či odmítnutí transplantovaných orgánů.

Ženám se na rozdíl od mužů mění nastavení imunitního systému vlivem měnících se hormonálních hladin (Beagley & Gockel 2003). Snížení imunitní odpovědi je důležité pro průnik ejakulátu a následnou nidaci blastocysty. V době ovulace a většiny doby těhotenství (během těhotenství rostou hladiny progesteronu a estradiolu, jež ve svém maximu vedou k porodu) jsou hladiny estradiolu a progesteronu velice nízké, což vede k inhibici imunitní odpovědi (Miller & Hunt 1996; Ansar Ahmed et al. 1985; Olsen & Kovacs 2002; Kincade et al. 1994; Sacks et al. 1999; Wilder 1998). Inhibice imunitní odpovědi vede ke snížení projevů autoimunitních chorob, jako jsou například roztroušená skleróza, Graves-Basedowova nemoc, Systémový lupus erythematoses či Hashimotova nemoc (Whitacre 2001; Olsen & Kovacs 1996).

#### 1.2.1.3. Molekulární změny spojené s menstruačním či estrálním cyklem

Změny hormonálních hladin ovlivňují také expresi některých genů vedoucích k regulaci imunitní odpovědi uvnitř samičího pohlavního ústrojí, například genu *Muc1* (Surveyor et al. 1995; Bowen et al. 1997). Ženské pohlavní ústrojí lze rozdělit na dvě části: horní a dolní. Horní část, kam patří vaječníky, vejcovody, děloha, a vnitřní část děložního hrdla tzv. endocervix. Dolní část je tvořena pochvou a vnitřní částí děložního hrdla, tzv. ectocervix (Wira et al. 2005). Horní část samičího pohlavního ústrojí je charakterizována přítomností sliznice, jež je tvořena jednovrstevným cylindrickým řasinkovým epitelem, jehož buňky jsou spojeny přes tzv. těsná spojení, angl. tight junction (Hickey et al. 2011).

Dolní část pohlavního ústrojí samice je tvořena mnohavrstevnatým nekeratinizovaným dlaždicovým epitelem. Povrch tohoto epitelu tvoří ploché buňky, které se směrem k bazální membráně mění na cylindrické. Jako v prvním případě i tyto buňky jsou mezi sebou úzce spojeny těsnými spojeními, čímž mechanicky znemožňují průniku patogenů. Řada patogenních (mikro)organismů má na svém povrchu určité velmi konzervované molekulární vzory, tzv. PAMP, angl. pathogen-associated molecular patterns (Chalovich & Eisenberg 2005), které jsou pro ně nezbytné, a které na svém povrchu hostitelské buňky nemají. Přes tyto struktury jsou rozpoznávány pomocí speciálních receptorů tzv. angl. PRRs – pattern recognition receptor (Schaefer et al. 2004; Schaefer et al. 2005). Tyto receptory (PRRs) se vyskytují na povrchu bílých krvinek, ale i na povrchu plochých epitelálních buněk

reprodukčního traktu. Mezi tyto receptory patří receptory podobné genu Toll (angl. Toll-like receptor) a receptory podobné genu NOD (angl. nucleotide binding oligomerization domain like receptors, NOD-like receptor, NLRs), jež zprostředkovávají sekreci cytokinů, chemokinů a antimikrobiálních peptidů. Samičí dolní část pohlavního ústrojí se chrání před případnými patogeny, které se dovnitř mohou dostat během kopulace, pomocí receptorů na svém povrchu a následnou produkcí již zmíněných cytokinů, chemokinů a antimikrobiálních proteinů (Wira et al. 2005). Další bariéru proti vniknutí patogenních bakterií tvoří vrstva sliznice s velkou vrstvou mucinů. Mucin (MUC) je označení pro velkou skupinu glykoproteinů. V tomto případě jsou to O-glykoproteiny, které tvoří hlen (mukus) na povrchu epitelových buněk v dolní části pohlavního traktu (Andersch-Björkman et al. 2007). Těsné spoje mezi buňkami a silná vrstva mucinů tak tvoří hlavní bariéry proti vniku patogenních bakterií. Pokud dojde k jejich narušení, dochází k zánětlivé reakci nebo infekci (Zahl & Bjerknes 1943; Coid 1976; Gower et al. 1990). Složení mucinů uvnitř děložního hrdla je neměnné po celou dobu menstruačního cyklu: MUC1, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6 (Gipson et al. 1997). Avšak ve vnější části děložního hrdla a vagíny se exprese mucinu mění s hladinou estrogenu a progesteronu. Během estrogenní fáze (proliferační a ovulační) je viskozita hlenu velice nízká až vodová a tím umožňuje průchod spermií (DeLoia et al. 1998). Naproti tomu ve fázi po ovulaci a během sekreční fáze je viskozita hlenu zvýšená až lepivá, znemožňuje tak průchod spermiím. Další bariéru proti vstupu bakterií a virů tvoří nízké pH (4–5) sekretu v děložním hrdle a vagíně (Hickey et al. 2011).

Horní část samičího reprodukčního traktu je bez mikroorganismů (Heinonen et al. 1985), jelikož je to uzavřený systém a působí zde velké množství dendritických buněk, makrofágů, neutrofilních granulocytů, NK buněk (angl. natural killer) a vyskytují se zde i Langerhansovy buňky (Pudney et al. 2005). V dolní části je zapotřebí větší ochrana organismu, a proto je zde tolerován přirozeně se vyskytující mikrobiom.

V roce 1892 německý vědec Albert Döderlein (Döderlein 1892) zpozoroval v dolní části reprodukčního traktu přítomnost gram-pozitivních bakterií, které produkují kyselinu mléčnou a  $H_2O_2$  (Macklaim et al. 2011) a tím mohou inhibovat růst patogenních bakterií. Později bylo zjištěno, že bakterie objevené A. Döderleinem jsou bakterie rodu *Lactobacillus*, které tvoří většinu vaginálního mikrobiomu (Thomas S 1928; Miller et al. 2016). Vaginální mikrobiom žen se v průběhu let mění. Během prepuberty, kdy je hladina estrogenu nejnižší a pH je vysoké, je zastoupení bakterií variabilnější než v období dospělosti, kdy je hladina

estrogenu značně vyšší, pH je nízké, sliznice vaginálního epitelu je silná a objevují se různé bakterie rodu *Lactobacillus*, např. *iners*, *crispatus* atd. (Brotman et al. 2014; Petrova et al. 2013). V menopauze se vaginální mikrobiom i struktura sliznice podobá období prepuberty (Petrova et al. 2013). Množství a zastoupení „přátelských“ bakterií se mění i během menstruačního či estrálního cyklu.

U různých druhů savců (myš, křeček, králík, pes) bylo zjištěno, že větší koncentrace symbiotických bakterií ve vagíně je v období proestru a maximální koncentrace je v estru, tj. v období, kdy je samice receptivní (Noguchi et al. 2003). V tomto období je zapotřebí zvýšená ochrana vaginální sliznice proti průniku patogenních bakterií, které mohou pronikat společně s ejakulátem. Přirozeně se vyskytující bakterie ulpívají po celou dobu menstruačního či estrálního cyklu na epitelálních buňkách, udržují pH ve vaginálním sekretu a tím udržují a omezují růst patogenních bakterií. V případě estrálního cyklu dochází během pozdního proestru k tzv. keratinizaci a epitelální buňky se stávají bezjadernými (keratinizují) a uvolňují se ze stěn epitelu. Právě proto jsou bakterie na uvolněných keratinocytech a epitelálních buňkách v proestru a estru hojně pozorovatelné během cytologické analýzy. V dalších fázích jejich koncentrace klesá společně se vzrůstajícím množstvím neutrofilních leukocytů.

Průběh keratinizace během estru ve své podstatě připomíná proces hojení ran či keratinizaci buněk, jež probíhá na povrchu pokožky (Hardman & Ashcroft 2008; Lee et al. 2010; Zhou et al. 2016).

#### 1.2.1.4. Keratinizace povrchového epitelu

##### Struktura a evoluce kalikreinů

Proces keratinizace epitelu je podmíněn přítomností kalikreinů, které vykazují (chymo)trypsinovou substrátovou specifitu a společně s chymotrypsinogenem, trypsinogenem a proelastázou patří do rodiny serinových proteáz (Diamandis et al. 2000; Lundwall et al. 2006). Proteázy se primárně v těle vyskytují v neaktivní formě tzv. zymogenu. Mohou být aktivovány samy sebou nebo vnějším stimulem a poté tvoří kaskádu proteinů, na jejímž konci mohou regulovat například intravaskulární koagulaci, zkapalnění ejakulátu, deskvamaci pokožky, mají antimikrobiální účinky a podílí se na hojení ran (Yoon et al. 2007; Emami & Diamandis 2008).

V živočišné říši jsou známy příklady zvířat, které ve svém genomu kalikreiny nekódují. Za použití bioinformatiky nebyl genom pro tyto proteázy nalezen u žab a drůbeže (Elliott et al. 2006). U člověka je dosud popsáno patnáct členů kalikreinů (Diamandis et al. 2000; Lundwall et al. 2006) a tvoří předlohu pro popis kalikreinů u placentálních savců. Všichni placentální savci kódují ve svém genomu *Klk1* a *Klk4-15*. Jejich pozice a struktura je velice konzervativní, z čehož lze usuzovat, že mají důležité fyziologické funkce.

Lidské *Klk2* a *Klk3* mají zcela odlišný evoluční původ než ostatní lidské *Klk*. Dle fylogenetické analýzy segregovaly společně s *Klk1* a mají tedy i podobnou strukturu. V časném vývoji u placentálních savců došlo k duplikaci *Klk1* a byl založen progenitor pro *Klk2*. U lidí, psů a některých primátů *Klk2* přetrvává (Morris 1989; Elliott et al. 2006; Chapdelaine et al. 1988; Lawrence et al. 2010; Clark & Swanson 2005; Lazure et al. 1984). Naopak u potkanů a myši je umlčen a v genomu je pouze jako pseudogen. U jiných druhů, jako je prase či skot, je *Klk2* úplně deletován (Lundwall et al. 2006). *Klk3* vznikl duplikací genu pro *Klk2* a je přítomen u lidí a několika druhů lidoopů, kočkodanů a nevyskytuje se u ploskonosých opic a psů (Lundwall 1989; Dorus et al. 2004; Mubiru et al. 2008; Sato et al. 2007; Valtonen-André et al. 2005). Ztráta *Klk2* a naopak získání genu pro *Klk3* u některých druhů zvířat může reflektovat rozdílné reprodukční strategie. Produkty obou dvou genů jsou exprimovány v prostatě a jsou součástí seminální plasmy, KLK2 jako semenogelin I a KLK3 jako semenogelin II. (Jonsson et al. 2006).

Největší počet kalikreinů byl nalezen v genomu myši a potkana, a to z důvodu rozsáhlé duplikace *Klk1*. Myší DNA obsahuje oblast o 290kb ležící mezi *Klk1* a *Klk15*, kde se nachází 24 *Klk1* paralogů (*Klk1b1-24*) z nichž 10 je pseudogenů (B. A. Evans et al. 1987; Yvonne Olsson & Lundwall 2002). Dalším značným rozdílem mezi lidským a myším uspořádáním kalikreinů je orientace *Klk2*. Lidské geny pro *Klk2* a *Klk3* leží obdobně mezi *Klk4* a *Klk15*, ale opačně než *Klk2-ps* u myši.

#### Exprese kalikreinů u myši

Exprese kalikreinů je tkáňově specifická a vysoce konzervativní napříč savčí říší. Například exprese KLK1 byla detekována ve slinných žlázách a pankreatu u myši, člověka, psa či kočky (Schachter 1979). KLK8 se účastní pochodů v mozku a pokožce jak u myši, tak u člověka (Chen et al. 1995; Inoue et al. 1998; Kuwae et al. 2002; Mitsui et al. 1999).

Genová exprese některých kalikreinů (např. kalikreiny typu B u myši) může být ovlivněna měnicí se hladinou androgenních hormonů (Clements et al. 1988; van Leeuwen et al. 1987) Naopak, KLK1 není ovlivněn hladinou androgenů, protože jeho exprese probíhá v buňkách, které nejsou pod jejich přímým vlivem (Penschow et al. 1991). Naše práce z roku 2016 potvrdila toto pozorování. Hladina KLK1 se ve slinách mezi samci a samicemi významně nelišila. Stejnou situaci vykazovaly KLK10 a KLK14. Dále jsme detekovali ve slinách myši téměř všechny kalikreiny typu B – KLK1B16, KLK1B3, KLK1B1, KLK1B21, KLK1B22, KLK1B24, KLK1B26, KLK1B27, KLK1B4, KLK1B5, KLK1B8, KLK1B9, jejichž hladina byla vyšší u samic než u samců (Stopka et al. 2016).

Výskyt řady kalikreinů ve slinách nabízí teorii, že olizování napomáhá hojení ran v pokožce, jelikož některé z KLK mohou aktivovat některé růstové faktory. KLK1B9, KLK1B22 a KLK1B26 mohou aktivovat proepidermální růstový faktor (Isackson et al. 1987). Ve vaginálním sekretu jsme také detekovali přítomnost kalikreinů, což dosud ještě nebylo popsáno a jejich funkce zde není zatím známa (více v části příspěvek autorky).

#### Procesy keratinizace pokožky

V epidermis pokožky lidí a v dalších vrstvách kůže zahrnující i mazové žlázy je exprimováno osm kalikreinů: KLK5, 6, 7, 8, 10, 11, 13 a 14 (Lundwall & Brattsand 2008). Z těchto kalikreinů pouze KLK7 má chymotrypsinovou substrátovou specifitu (Yousef & Diamandis 2001). Ostatní kalikreiny vykazují trypsinovou aktivitu (Eissa & Diamandis 2008; Yousef & Diamandis 2002). Hlavními kalikreiny účastníci se keratinizace jsou KLK5, 7, 14. *In vitro* pokusy předpokládají, že KLK5 je klíčová protéaza jelikož aktivuje sama sebe a dále aktivuje KLK7 a KLK14 (Brattsand et al. 2005). Dále se předpokládá, že aktivovaná KLK14 posiluje zpětnovazebně aktivitu KLK5.

Proces deskvamace je zahájen na rozhraní dvou svrchních vrstev pokožky, *stratum granulosum* (SG) a *stratum corneum* (SC). Vrstva SG je tvořena zejména lamelárními tělísky (angl. lamellar bodies) které putují do horní vrstvy SC, kde se uvolní jejich obsah mezi buňky a napomáhá tak k jejich deskvamaci. Uvnitř každého lamelárního tělíska jsou KLK5, 7, 8 ve formě zymogenu společně s jejich inhibítorem LEKTI1 (angl. serine protease inhibitor Kazal type 5, kódovaný genem SPINK5), s katepsinem D (angl. cathepsin D) a substrátem pro KLK7, corneodesmosinem (Elias et al. 1998). Aktivace serinových proteáz uvnitř lamelárních

tělisek je podmíněna změnou pH v jejich okolí. Během jejich přirozeného prostupu ze SG do SC se mění gradient pH z neutrálního do kyselého a tato změna pH oslabuje funkci inhibitoru jež vede k aktivaci kalikreinů (Deraison et al. 2007). Veškeré enzymy štěpící proteiny ve SC potřebují pro svou funkci optimální pH. Jakékoliv změny v pH vyvolávají abnormální deskvamaci a výsledkem je nadměrná keratinizace pokožky (Roelandt et al. 2009).

Deskvamace zahrnuje několik enzymatických procesů, při kterých dochází k degradaci desmosomálních adhezních proteinů zahrnující korneodesmosin (angl. corneodesmosin, CDSN), desmoglein-1 (DSG1) a desmokolín-1 (DSC1) (Caubet et al. 2004). Je známo, že se právě šupinatění pokožky účastní kalikreiny a to zejména KLK5 a KLK7, které se aktivují změnou pH prostředí v jejich blízkosti. KLK5 dokáže rozštěpit všechny tři uvedené komponenty, kdežto KLK7 a KLK14 jsou schopny rozštěpit pouze CDSN a DSG1 (Caubet et al. 2004; Borgoño et al. 2007). K dalším kalikreinům, které se účastní odlupování povrchových buněk pokožky patří KLK8, která přes proteolytickou kaskádu vede k degradaci DSG1 a CDSN (Borgoño et al. 2007; Komatsu et al. 2006; Shaw & Diamandis 2007). Nedávno byla objevena degradace DSG1 pomocí KLK6, 13, 14, které jsou inhibovány LEKTI1 (Borgoño et al. 2007). Poruchy ve štěpení desmosomálních adhezních proteinů nebo chybná regulace proteolytické kaskády vede k různým kožním problémům, jako je např. Nethertonův syndrom (Yang et al. 2004).

Analogický proces ke keratinizaci na povrchu pokožky může probíhat uvnitř částečně uzavřeného vaginálního prostředí (Muytjens et al. 2016). Mírně kyselý pH (od 4,5 do 5,5) je na povrchu SC. Ve srovnání s normálním fyziologickým pH uvnitř těla je tedy mírně kyselý. Stejně tak i pH ve vagíně je mírně kyselý, ale během estrálního cyklu se mění: pH v proestru je 5,57, v estru je 4,53 a v diestru 7,52 (Ganesan M. & Kadalmani B. 2016). Naše publikace popisuje kompletní proteom vaginálního sekretu myši domácí během estrálního cyklu. Výsledky ukazují zvyšující se množství DSC1, CDSN, DSG1A a KLK8 ve fázi estru, kdy se zvyšuje množství keratinocytů. Dále jsme detekovali maximální množství SPINK5 ve fázích proestru a metestru, kdy jsou kalikreiny inhibovány a ke keratinizaci dochází minimálně.

Antibakteriální funkce proteinů spojených s deskvamací pokožky

KLK5 a KLK7 plní antimikrobiální funkci v pokožce prostřednictvím štěpení neaktivní verze katelicidinu (angl. human cationic antimicrobial protein 18, hCAP18, LL-37)

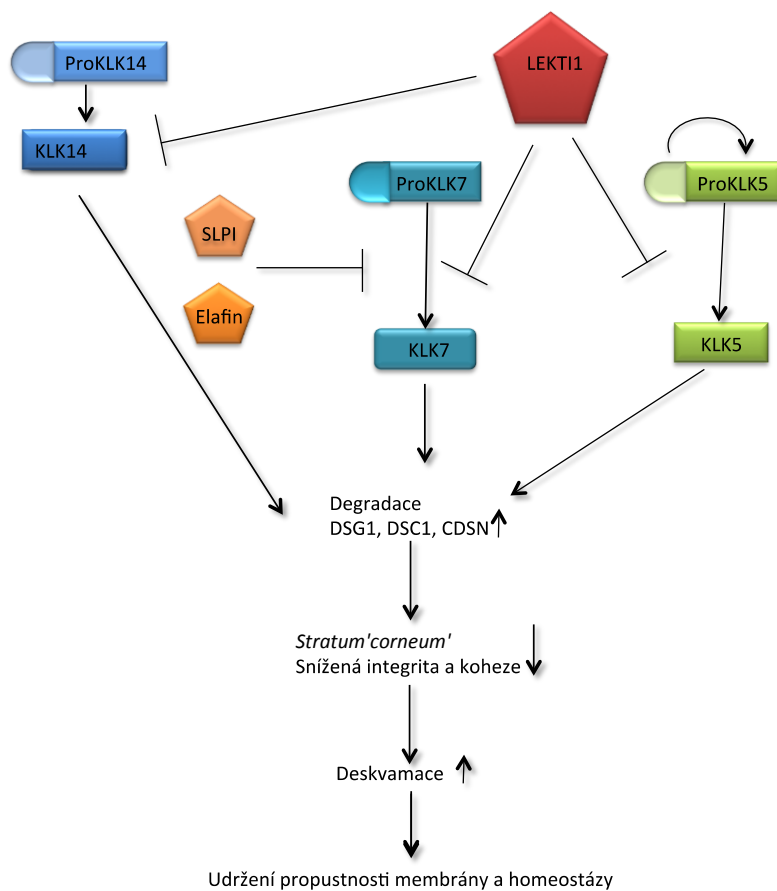
z lamelárních tělísek, čímž vzniká jeho aktivní forma (Yamasaki et al. 2006; Elias et al. 1998). Homologem pro lidský LL-37 je myší antimikrobiální peptid příbuzný s katelicidinem (angl. cathelin related antimicrobial peptide, CRAMP, CAMP) (Yamasaki et al. 2006). Katelicidiny jsou evolučně konzervativní antimikrobiální peptidy vyskytující se u savců, ptáků, ryb i plazů. Tato skupina peptidů slouží jako první obranná linie proti infekci, tím, že eliminuje výskyt patogenů. V rámci této rodiny peptidů existují rozdíly v míře působení vůči rozdílným skupinám patogenů (Wu et al. 2010). Mechanismus působení většiny katelicidinů je založen na elektrostatických interakcích mezi kladně nabitým antimikrobiálním peptidem a bakteriální membránou vykazující záporný náboj (Lai & Gallo 2009; Wu et al. 2010). Kationické peptidy se poté vkládají do bakteriální membrány, tím dochází k jejich permeabilizaci a negativně ovlivňují funkci bakterií. Někteří zástupci z této rodiny, např. prasečí peptid bohatý na prolin-arginin (proline-arginine rich peptide, PR-39), zabíjí bakterie intracelulárně (Holani et al. 2016). Mimo jejich přímého antimikrobiálního působení mají katelicidiny vliv na reparaci tkání a vrozenou imunitu. V roce 2016 byl CAMP detekován ve slinách myši domácí, a to ve stejné míře u samců i samic (Stopka et al. 2016). Dále bylo zjištěno, že protein CAMP je součástí vaginálního sekretu myši a jeho hladina je nejnižší během estrální fáze, kdy je imunitní systém tolerogenní k přítomným bakteriím. A jeho hladina roste v metestru, což je období, kdy se stabilizuje vaginální mikrobiom (Cerna et al. 2017).

V pokožce se vyskytují malé inhibitory serinových proteáz SLPI a SKALP/elafin (Scott et al. 2011). Oba proteiny jsou z rodiny inhibitorů proteáz WFDC (angl. WAP disulphide four core). Vývoj WFDC genů u myši a potkanů je analogický vývoji a vzniku kalikreinů u těchto hlodavců. WFDC jsou inhibitory právě těchto serinových proteáz (Clauss et al. 2005). Tyto proteiny se skládají přibližně z 50 aminokyselin zahrnujících osm konzervativních cysteinových zbytků, které jsou na určité pozici a mohou tak formovat čtyři disulfidické můstky (Ranganathan et al. 1999). WFDC proteiny jsou součástí vrozené imunitní odpovědi, které působí například přes inhibici neutrofilní serinové proteázy nebo svými antimikrobiálními vlastnostmi inhibují zánětlivou odpověď na lipopolysacharidy (LPS), které jsou důležitou součástí vnější membrány Gram-negativních bakterií (Glasgow et al. 2014; Focà et al. 2012). Na stejném principu jako katelicidiny jsou založeny i antimikrobiální proteiny SLPI a elafin. SLPI a elafin jsou pozitivně nabitě proteiny (+12, +3) a působí jak na Gram-negativní, tak na Gram-pozitivní bakterie (Williams et al. 2005). Ve

slinách myši byli nalezeni zástupci antimikrobiálních proteinů WFDC2, WFDC12 (Glasgow et al. 2015), WFDC18, které chrání zuby, měkké tkáně v dutině ústní a tvoří neimunitní složku obrany proti patogenům (Blanchard et al. 2015). V našem experimentu jsme našli zástupce WFDC2 ve vaginální tekutině prominující ve fázi proestru. Je možné, že napomáhá udržovat stabilní mikrobiom uvnitř vagíny (Cerna et al. 2017). Existuje teorie, že expanze kalikreinového lokusu je spojena s vývojem rodiny inhibitorů serinových proteáz (WFDC), které jsou homologní se semenogeliny a hrají svou roli v imunitním systému citace (Clauss et al. 2005). Stejně jako kalikreinový lokus, klastr WFDC prodělal ve srovnání s lidmi samostatnou expanzi u myši a potkanů.

#### Proteiny účastníci se přirozené imunitní odpovědi

Dalšími antimikrobiálními proteiny, které jsou součástí vrozené imunity, jsou proteiny zvyšující permeabilitu bakteriálních membrán (angl. bactericidal/permeability increasing protein, BPI). Stejně jako CAMP, WFDC, tak i BPI se váže na LPS buněčných stěn bakterií a zvyšuje její propustnost. BPI je vysoce kationický protein o 456 AMK (~55 kDa) s aktivitou zaměřenou zejména proti gram-negativním bakteriím. Tyto antimikrobiální proteiny byly nejprve identifikovány v buňkách lidských neutrofilních granulocytů, ale v myších leukocytech nalezeny nebyly (Calafat et al. 2000; Elsbach & Weiss 1985). Myši BPI (54kDa) vykazuje 53% AMK shodu a 71% podobnost s lidským BPI. Geny kódující BPI se vyskytují u lidí na chromosomu 20 a u myši na chromosomu 2. Geny vykazují podobnost v organizaci exonů a intronů a také výskyt mRNA pro BPI byla u myši i lidí nalezena i v jiných tkáních, například v testes, nadvarletech (epididymis), kostní dřeni či Sertoliho buňkách (Lennartsson et al. 2005; Elsbach 1998). Mezi BPI patří i strukturálně podobný lipopolysacharidy vázající protein (angl. LPS binding protein, LBP, BPIFD2) a fosfolipidy transferující protein (phospholipid transfer protein, PLTP). Dále do rodiny BPI patří dva proteiny, které jsou hojně sekretovány v horní části dýchací soustavy, a to *Palate, lung, and nasal epithelium clone protein (PLUNC)* a *Secretory protein in upper respiratory tracts* neboli *SPURT* (Bingle & Craven 2002). Protein SPURT je kódován genem *BPI fold containing family A member 1* neboli *BPIFA1* (Bingle & Bingle 2000). Všechny uvedené antimikrobiální proteiny jsou typické pro vrozenou imunitu a vyskytují se u obou pohlaví.



### Obrázek 8. Dráhy kalikreinů a jejich inhibitorů při deskvamaci

ProKLK14 se může měnit na aktivní KLK14 (např. pomocí KLK5, není na obrázku), která může být inhibována LEKTI1. LEKTI1 inhibuje změnu neaktivních kalikreinů 7 a 5. ProKLK5 se sama aktivuje v aktivní formu KLK5. Dalším inhibitorem, který znemožňuje změnu neaktivní formy ProKLK7, jsou SLPI či Elafin. Aktivní formy KLK14, KLK7, KLK5 vedou ke zvýšené degradaci proteinů DSG1, DSC1, CDSN a následně ke snížené integritě a kohezi svrchní vrstvy pokožky – *Stratum corneum* a tím pádem dochází ke zvýšené deskvamaci a následně ke změně v propustnosti membrány a udržení homeostázy.

### 1.2.2. Působení estrogenních hormonů na reprodukci samců myši

Reprodukční strategie se mohou odehrávat na úrovni chemické komunikace, kde si samec, ale i samička zvolí jedince, s nímž se rozhodnou kopulovat na základě složení přijímaného chemického signálu. Další úroveň je podmíněna interakcemi mezi pohlavními gametami. Spermie jednotlivých druhů se liší svou morfologií, motilitou, spotřebou ATP či počtem a jejich variabilita odráží různorodost životních strategií jednotlivých druhů (vodní vs. terestrické, polygamní vs. monogamní, dobou oplození, hodiny vs. měsíce). Kvalitativní a

kvantitativní parametry spermií se samozřejmě neliší jen mezidruhově, ale také vnitrodruhově. Jedinci s celkovou lepší „fitness“ vykazují lepší hodnoty měřených parametrů u spermií (např. množství –(Snook 2017), životaschopnost (Crichton et al. 1994; Folk 1940), rychlost (Fitzpatrick et al. 2009 Laskemoen et al. 2010), morfologie (Tourmente et al. 2011)). Výběr spermií neprobíhá pasivně, ale předpokládá se, že k další aktivní selekci dochází uvnitř samičího reprodukčního traktu, kde dochází k tzv. kryptickému výběru samičky, z angl. cryptic female choice (Jones 2002; Ball & Parker 2003; Holt & Fazeli 2016). Kvalita spermie je dána mnohými faktory, jako je morfologie hlavičky spermie, integrita membrány bičíku, maturace či motilita (Golas et al. 2011; Tayama et al. 2006).

Další část mé práce byla věnována kvalitě spermií, zejména procesu maturace a jejího ovlivnění estrogenními hormony, které se vyskytují v prostředí a ve větších dávkách působí jako endogenní disruptory (Shore & Shemesh 2016). Naproti tomu jsou estrogenní hormony součástí reprodukčních pochodů samic, kdy estradiol dosahuje maximální hladiny během estrální fáze, kdy je samice receptivní. Proto jsme se pozorovali mimo jiné právě vliv estradiolu na molekulární procesy spojené s maturací spermií, ke kterým dochází uvnitř samičího pohlavního traktu.

V prostředí se vyskytuje přibližně 300 přírodních sloučenin a ještě více antropogenních, které vykazují estrogenní nebo anti-estrogenní aktivitu. Tuto velkou skupinu látek můžeme rozdělit do čtyř skupin: 1) přirozeně se vyskytující ne-steroidní rostlinné estrogény čili fytoestrogény (genistein, resveratrol); 2) steroidní estrogény: 17 $\beta$ -estradiol, a estron jakožto produkty lidí a zvířat; 3) mykotoxiny, zearalenon a zearalenol; 4) syntetické látky obsahující fenolovou skupinu, bisfenol A, diethylstilbestrol (DES), vinclozolin (Shemesh & Shore 1987; Lintemann et al. 2003). Všechny uvedené látky se dostávají do prostředí prostřednictvím povrchových, podzemních vod a zůstávají ve vodních nádržích. Například jen jedna těhotná žena každý den vyloučí močí 10  $\mu$ mol estrogenů (estradiolu a estronu). V současné době dosahuje koncentrace těchto disruptorů v životním prostředí takové míry, že prokazatelně ovlivňuje fyziologické funkce určitých druhů (Shemesh & Shore 1987; Lintemann et al. 2003; Shore & Shemesh 2016). Přirozená hladina estrogenů u samic krav a ovcí indukuje nástup estrální fáze včetně změny chování. Pokud je v organismu skotu hladina estrogenu ve vyšší míře než fyziologické, dochází ke konstantnímu trvání estrální fáze, výskytu ovariálních cyst a předčasnému vývoji vemen. U prasat je běžným jevem prolaps dělohy způsobený zearalenonem (Shore & Bar-El Cohen 2010). Reprodukční problémy

vzniklé fytoestrogeny se projevují ve snížené fertilitě dobytka (Shemesh & Shore 1987). Poruchy spojené s reprodukcí byly prokázány i u lidí (Akingbemi 2005; Mathur & D'Cruz 2011; Colborn et al. 1993). Jedním z příkladů je synteticky vyrobený estrogen DES, který měl v letech 1948–1971 sloužit jako lék proti spontánním potratům. Dcery matek, které ho užívaly, trpěly dysfunkcemi reprodukčních orgánů, sníženou reprodukční schopností, imunitními problémy a opakovanými depresemi (Takasugi 1988; Colborn & Clement 1992). Další látky negativně ovlivňují průběh spermatogeneze a mění měřené parametry spermií (Kyselova et al. 2004; Kyselova et al. 1999; Peknicova et al. 2002; Elzeinova et al. 2008).

Estrogeny u samic i samců savců ovlivňují reprodukční systém (Free & Jaffe 1979) a u samic i imunitní systém (Whitacre 2001). Koncentrace estrogenů se mezi samcem a samicí kvantitativně liší a je druhově specifická (Overpeck et al. 1978; Ganjam & Amann 1976). U potkana a myši je koncentrace  $17\beta$ -estradiolu v krevní plazmě 2–25 pg/ml, což je méně než v tekutině *rete testis*, 250pg/ml (Free & Jaffe 1979). Rozdíly koncentrací byly detekovány i u samic potkana a myši, kde koncentrace estrogenů v ovariální tekutině byla alespoň dvakrát vyšší ve srovnání s jejich koncentrací v krevní plazmě. U samic potkana a myši se koncentrace estrogenů mění v závislosti na období estru, u  $17\beta$ -estradiolu dosahuje hodnot v rozmezí 145–2100 pg/ml (Shaikh 1971). Tento typ hormonů se vyskytuje ve spermatu, koncentrace je zde také závislá na druhu a dosahuje přibližně hodnot 14–900 pg/ml (Eiler & Graves 1977; Claus et al. 1985).

Estrogenní hormony regulují buněčnou funkci pomocí jaderných estrogenních receptorů (ER), ER $\alpha$  a ER $\beta$  (Lubahn et al. 1993), které patří do rodiny ligand-aktivujících transkripčních faktorů (M. I. Evans et al. 1987). Velké množství ER $\alpha$  (Fisher et al. 1997; Hess et al. 1997) je exprimováno v odvodných kanálcích varlete (*ductus efferent*), dokonce větší množství než v děložní tkáni, dále je tato forma exprimována v játrech, prsních žlázách, podvěsku mozkovém a hypotalamu. ER $\beta$  je exprimován ve vaječnicích, plicní tkáni a prostatě (Couse et al. 1997). Obě formy jsou exprimovány v odvodných kanálcích a v nadvarleti (Hess et al. 1997). Tyto transkripční faktory jsou lokalizované v jádře, kde regulují genovou transkripci vazbou na DNA regulační sekvence a ovlivňují tak expresi cílových genů (Hall et al. 2001).

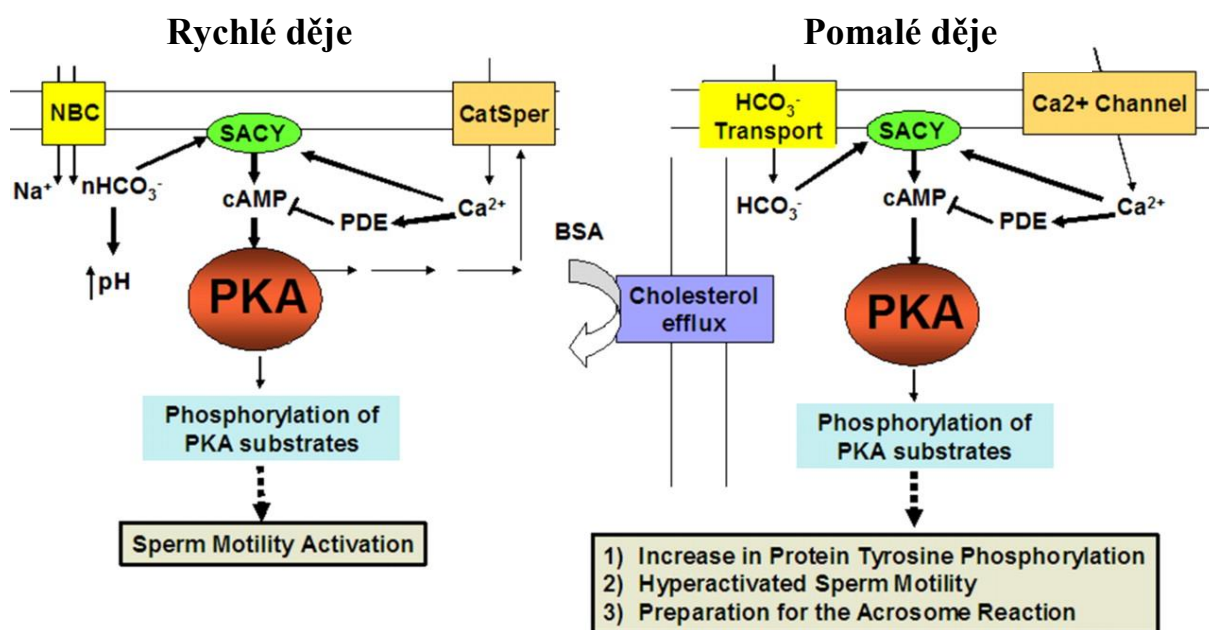
Endogenní disruptory a estrogenní hormony vyskytující se v prostředí se váží na estrogenní receptory spermií a spouští tak rychlou ne-genomickou signální odpověď (Kuiper et al. 1998; Sohoni & Sumpter 1998; Akingbemi & Hardy 2001). Důležitost estrogenních

receptorů byla experimentálně vyzkoušena za pomoci knock-outované myši pro ER $\alpha$ , kdy nebyla myš po tomto zákroku fertilní (Dupont et al. 2000).

Na základě výzkumu zánětlivých onemocnění střev, která mohou končit rakovinou, a výzkumů rakoviny prsu, byla objevena přímá souvislost exprese estrogenů a trefoil faktor genu 1, z angl. trefoil factor gene 1 neboli *Tff1* (J Kim et al. 2000; Park et al. 2012). TFF1 je protein skládající se ze 40 aminokyselinových zbytků, obsahující tři disulfidické můstky. Tento protein je exprimován gastrointestinální mukózou uvnitř střev. Protein stabilizuje mukózní vrstvu a má ochrannou funkci v hojení epiteliální vrstvy. Přesná funkce není doposud známa (Ribieras et al. 1998; Crosier et al. 2001; Jongsook Kim et al. 2000).

### 1.2.3. Kapacitace a tyrosinová fosforylace

Čas, kdy může dojít k úspěšnému oplození vajíčka spermii, je omezen a přesně definován předchozími molekulárními změnami. Poté, co je spermie uvolněna z *cauda epididymis* a dostává se v podobě ejakulátu do samičího pohlavního traktu, není schopná okamžitého oplození zralého vajíčka. Spermie jsou pozastaveny a zůstávají v isthmu vejcovodu (*caudal isthmus*) samičího pohlavního traktu, kde dozrávají. V době ovulace se některé z nich dostávají do ampuly, kde dochází k samotnému oplození vajíčka. Během maturace probíhají dva důležité procesy: kapacitace a akrozomální reakce (AR). Oba procesy potřebují pro svůj průběh specifické fyziologické podmínky, které jsou přirozeně v samičím pohlavním traktu nebo mohou-li probíhat *in vitro*, je pro správný průběh přesně definované médium a podmínky vnějšího prostředí. Kapacitace zahrnuje změny v plasmatické membráně, modifikace enzymatických aktivit a změny koncentrací iontů uvnitř spermie. Navzdory tomu, že je kapacitace popsána Changem a Austinem jako jev nutný pro oplození vajíčka spermii již od roku 1951, nejsou zcela jasné molekulární principy, jež se při ní odehrávají. Kapacitaci můžeme rozdělit na dvě události: 1) rychlé děje, jako je iniciace motility spermie, jakmile se spermie uvolní z nadvarlete, a na 2) pomalé děje, jako jsou změna motility (hyperaktivace) a následně probíhající AR. Zajímavé je, že oba děje, jak pomalé tak rychlé, jsou centrálně regulovány protein kinázou A (PKA) – viz obr. 9 (Visconti 2009).



### Obrázek 9. Kapacitace

Rychlé děje: Jakmile se spermie dostane do blízkého kontaktu s isotonickým roztokem obsahujícím HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> a Ca<sup>2+</sup>, je pozorován silný flagelární pohyb. Se zvyšující se koncentrací iontů HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> a Ca<sup>2+</sup> se aktivuje atypická adenylátcykláza (SACY), která zvyšuje aktivitu PKA. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> je dovnitř buňky transportováno kontransportérem (Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a vápenaté ionty jsou transportovány dovnitř přes specifický Ca<sup>2+</sup> kanál (angl. Cation channels of sperm, CatSper). Pomalé děje: Přítomnost příjemce cholesterolu v médiu je nezbytná pro rostoucí tyrosinovou fosforylaci (TyrP) a zároveň samotná TyrP stimuluje PKA aktivitu. Převzato a upraveno: Visconti 2009.

#### Rychlé děje

Povrch spermie je pokryt molekulami, které jsou známy jako dekapacitační faktory (angl. decapacitation factors, DF) a které udržují spermie v nekapacitovaném stavu, dokud nedojde k ejakulaci. DF jsou odstraněny po kontaktu se seminální tekutinou (Yanagimachi 1994). Seminální tekutina je isotonická tekutina, která obsahuje dva typy iontů, umožňujících přes jiné molekuly flagelární pohyb spermie: HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> a Ca<sup>2+</sup>. Tyto ionty aktivují atypickou adenylátcyklázu (SACY) a poté cyklické adenosinmonofosfáty (cAMP) a iniciují vzrůstající aktivitu PKA. Tyto procesy vedou k fosforylaci PKA substrátů a aktivují motilitu spermie. Tyrosinová fosforylace (angl. tyrosine phosphorylation, TyrP) představuje důležitý regulační systém, který ovlivňuje děje vedoucí ke kapacitaci spermií (Visconti, Bailey, et al. 1995). Po rychlých dějích následují pomalé.

## Pomalé děje

Procesy jsou obvykle spuštěny samotnou spermií. Začínají spontánním efluxem cholesterolu a dalších sterolů z plasmatické membrány spermie, čímž se zvyšuje fluidita a permeabilita pro některé ionty, jako jsou vápenaté a hydrogenuhličitanové ( $\text{HCO}_3^-$ ) (Yanagimachi 1994; Visconti et al. 1999). Zvyšující se koncentrace těchto iontů uvnitř buňky aktivuje adenylátcyklázu (AC), která zvyšuje tvorbu cAMP a následně aktivuje PKA. Aktivace PKA vede k aktivaci tyrosinové kinázy uvnitř spermie. Eflux cholesterolu může být urychlen přítomností vnějšího příjemce v médiu, jako je sérum albumin. Visconti a jeho kolegové toto zjištění vyzkoušeli s použitím média bez přítomnosti albuminu kravského séra (angl. bovine serum albumin, BSA) a výsledkem byla inhibice tyrosinové fosforylace, a tudíž nedocházelo ani ke kapacitaci spermií (Visconti et al. 1999). Pomalé děje vedou ke vzrůstající TyrP, hyperaktivaci a přípravě spermie k AR.

Dalšími možnými fyziologickými modulátory TyrP během kapacitace jsou tzv. volné kyslíkové radikály (angl. reactive oxygen species, ROS), které jsou produkovány leukocyty (jsou přítomny v ejakulátu) nebo se nachází uvnitř spermie na počátku kapacitace (Baldi et al. 2000). Nedávné publikace popisují, že další produkty lidských spermií jako oxid dusnatý (NO) mohou podporovat kapacitaci a vzrůstá i TyrP (Belén Herrero et al. 2000; Herrero & Gagnon 2001). Leyton a Saling v roce 1989 jako první identifikovali tři různé fosfoproteiny o hmotnostech 52, 75 a 95kDa v buňkách myších spermiích. Proteiny o hmotnosti 52 a 75kDa byly pomocí specifických protilátek proti fosfotyrosinu detekovány pouze u kapacitovaných spermiích, kde mohou sloužit jako specifické markery právě pro TyrP. Poslední protein o hmotnosti 95kDa, kde je tyrosin fosforylován, byl detekován jak v čerstvých, tak kapacitovaných spermiích. Pro tento protein není hladina imunoreaktivity spojena s motilitou spermie, ale je zesílena kapacitací a interakcí se solubilními proteiny *zona pellucida* (ZP). Stejný efekt jako ZP má hormon progesteron, obojí zvyšuje fosforylací na tyrosinových zbytcích během kapacitace (Tesarik et al. 1993).

V roce 1989 bylo objeveno, že stav kapacitace koreluje s mírou TyrP na proteinech o molekulových hmotnostech 40-120kDa (L. Leyton & Saling 1989). TyrP proteinů je časově závislá a kapacitaci a maximální množství fosforylovaných proteinů je dosaženo po 90 minutách kapacitace (Visconti, Moore, et al. 1995). TyrP hraje důležitou roli v regulaci dějů vedoucích ke kapacitaci a následně k akrozomální reakci. Otázkou zůstává, jaké signální dráhy ovlivňují zvýšení TyrP a dráhy, které vedou k finální kapacitaci spermie. Spermie v

*cauda epididymis* jsou zralé a obsahují vysoce kondenzovaný chromatin (kondenzace DNA ji chrání před poškozením). V této fázi nedochází ani k transkripční ani k translační aktivitě, a proto je zde pouze jediný funkční regulační systém a tím je postranlační aktivita (acetylace nebo fosforylace). Mimo známou Ser/Thr fosforylaci existuje právě TyrP, jež je mnohem důležitější pro přenos signálu ve spermii (Visconti, Bailey, et al. 1995). TyrP se odehrává v cytosolu spermie, na povrchu hlavičky a bičíku. Tyrosinové kinázy lze rozdělit na dvě skupiny: receptorové protein tyrosinové kinázy (angl. receptor tyrosine kinases, RTKs) a nereceptorové protein tyrosinové kinázy (angl. non-receptor tyrosine kinases, NRTKs) lokalizované volně v cytosolu, jádře či vázané k cytosolové straně plasmatické membrány (Fisher et al. 1998). Skupina NRTKs zahrnuje kinázy Src, Jak a jiné (Fisher et al. 1998). RTKs jsou transmembránové glykoproteiny, jež jsou aktivovány navázáním souvisejících ligandů a přenášejí extracelulární signál do cytoplasmy pomocí své vlastní fosforylace na reziduích tyrosinu (autofosforylace) a přenášejí signál na další signální proteiny. RTKs aktivují mnoho signálních drah uvnitř buněk vedoucích k buněčné proliferaci, migraci, diferenciaci či metabolickým změnám. Do této rodiny patří receptory pro insulin a receptory růstových faktorů, např. receptor pro epidermální růstový faktor (angl. epidermal growth factor receptor, EGF), receptor pro fibroblastový růstový faktor (angl. fibroblast growth factor receptor, FGF) a jiné.

#### **1.2.4. Akrozomální reakce**

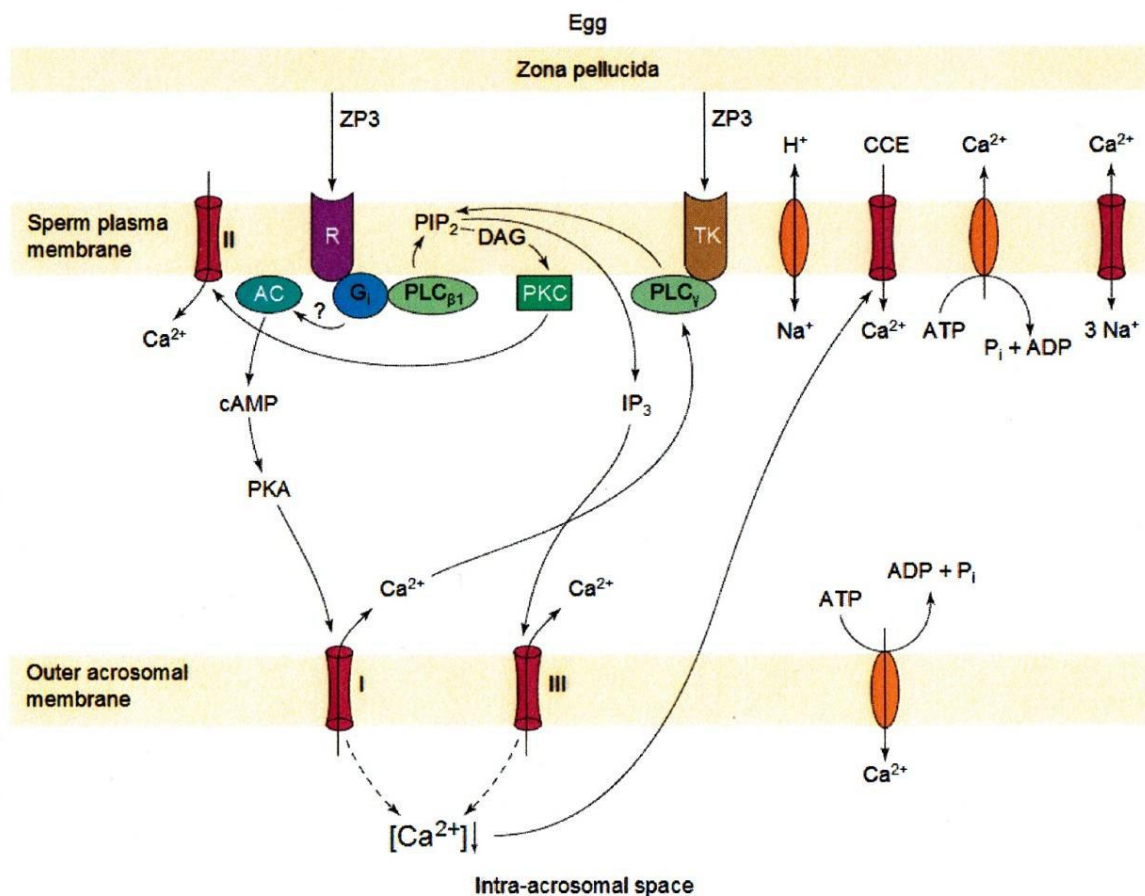
Spermie, která oplodnila vajíčko, musela projít celým procesem kapacitace, rozpoznat proteiny na povrchu ZP a navázat s nimi vazbu. Rozpoznání proteinů na povrchu spermie a obalu vajíčka a průnik spermie popisuje děj, při kterém probíhá tzv. akrozomální reakce (angl. acrosome reaction, AR).

Spuštění AR je s největší pravděpodobností podmíněno přítomností dvou induktorů – ZP proteiny a progesteronem. V prvním případě se jedná o kontakt a vazbu proteinů na povrchu spermie a ZP. U myšovitých hlodavců obsahuje ZP tři proteiny: ZP1, ZP2, ZP3 o molekulových hmotnostech 200,000 (ZP1), 120,000 (ZP2), 83,000 (ZP3) – (Bleil & Wassarman 1980). Protein ZP3 zprostředkovává primární vazbu spermie-vajíčko, ZP2 sekundární vazbu a ZP1 tvoří spojníky mezi ZP3 a ZP2. V případě lidské ZP existuje ještě ZP4, který je u myši pouze jako pseudogen. ZP4 se naproti tomu objevuje i u jiných živočichů

(šimpanz, kuře, potkan, člověk) a předpokládá se, že vznikl duplikací ZP1 genu, a tudíž je jeho struktura velice podobná ZP1 (Conner et al. 2005).

U většiny savců se předpokládá, že se spermie váže k ZP přes specifické receptory, vázané v anteriorní oblasti hlavičky spermie. Tato vazba aktivuje signální dráhy vedoucí k AR, při kterých dochází k fúzi vnější akrozomální membrány a plazmatické membrány spermie (Yanagimachi 1994).

Fyziologickým induktorem AR může být také progesteron (Kirkman-Brown et al. 2002; Garcia & Meizel 1999), který vazbou na receptory pro progesteron aktivuje shodný příliv  $\text{Ca}^{2+}$  iontů do cytosolu spermie, podobně jako u indukce ZP (Garcia & Meizel 1999). Naopak jako *in vitro* induktor je často používán kalcium ionofor (angl. calcium ionofor, CaI), který aktivuje intracelulární zvýšení  $\text{Ca}^{2+}$  iontů výměnou  $\text{Ca}^{2+}$  za  $2\text{H}^+$  (Spungin et al. 1995). Během takto indukované AR je klasická signální dráha vynechána, ale morfologicky je AR stejná jako ta, jež je indukována přes klasickou signální dráhu. Klasická signální dráha AR začíná kontaktem ZP proteinů a proteinů v anteriorní oblasti hlavičky spermie. ZP aktivuje signální dráhu vedoucí k AR přes receptory spojené s G proteiny (O'Toole et al. 2000), které aktivují fosfolipázu C (PLC)  $\beta 1$  nebo přes receptorové fosfotyrosinkinázy aktivující PLC  $\gamma$ . G proteiny aktivují zejména signální dráhu cAMP/PKA, ale známé jsou také další signální dráhy vedoucí k aktivaci Ser/Thr a Tyr kináz. PKA aktivuje otevření napětově závislých  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů a umožňuje tok  $\text{Ca}^{2+}$  iontů z akrozomální membrány do cytosolu (Obr. 10). Takto zvýšená koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  dále aktivuje protein kinázu C  $\gamma$  (PKC) (Spungin et al. 1995; Roldan 1998). Produktem hydrolýzy fosfatidylinositol bisfosfátu (PIP2) touto proteinkinázou je diacylglycerol (DAG) a inositol-trisfosfát (IP3) umožňující aktivaci a translokaci PKC k plazmatické membráně. Výsledkem je otevření napětově závislých  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů na plazmatické membráně a tím umožnění druhého zvýšení koncentrace těchto iontů v cytosolu, související s AR (Walensky & Snyder 1995).



### Obrázek 10. Molekulární interakce probíhající během akrozomální reakce

Fosfolipáza C (PLC), proteinkináza C (PKC), adenylátcykláza (AC), diacylglycerol (DAG), fosfatidylinositol 4,5- bisfosfát (PIP<sub>2</sub>), inositol- trifosfát (IP<sub>3</sub>), proteinkináza A (PKA), tyrosinkináza (TK), receptor spojený s G proteinem (R, G<sub>i</sub>). Převzato (Breitbart & Naor 1999).

Takto zvýšená koncentrace Ca<sup>2+</sup> aktivuje aktin vázající proteiny a vede k depolymerizaci aktinového cytoskeletu a kontaktu a fúzi membrán a uvolnění obsahu akrozómu. Diacylglycerol (DAG) hraje ještě další roli, a to v aktivaci fosfolipázy A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) a fosfatidylcholinu specifické fosfolipázy (PLC). Produktem aktivace PLA<sub>2</sub> je arachidonová kyselina a lysosfosfolipidy, důležité látky regulující fúzi membrán (Roldan 1998; De Blas et al. 2002). Receptory vázající ZP aktivují také otevření Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> výměníku vedoucí k alkalizaci cytosolu. Zvýšení pH a Ca<sup>2+</sup> iontů vede k fúzi vnější akrozomální membrány a plazmatické membrány spermie a vede k AR (Kopf 2002).

V roce 1989 se ukázalo, že AR u lidských spermii může být zahájena spontánně bez přítomnosti ZP či progesteronu (Mortimer et al. 1989). Bez induktorů AR k ní docházelo i u

některých zástupců hlodavců, což bylo pozorováno při analýze průběhu a rychlosti AR u myši (Inoue et al. 2003) a později u myšic (Johnson et al. 2007). Přestože v médiu nebyly žádné induktory, AR samovolně probíhala a její rychlost byla navíc nejvyšší u nejvíc promiskuitního druhu *A. Agrarius* (Johnson et al. 2007). V roce 1992 se ukázalo, že pro úspěšné oplození není nezbytný kontakt spermie se ZP a tím indukovaná AR. Naito a jeho skupina mechanicky odstranili ZP, pozorovali *in vitro* oplození myších vajíček, následný embryonální vývoj do blastocysty, kterou vložili do receptivní samice a ta porodila zdravé mládě (Naito et al. 1992). Dalším experimentem provedeným *in vitro* na transgenně značených myších spermích bylo prokázáno, že spermie prochází AR i během průchodu přes vrstvu kumulárních buněk směrem k ZP. A dokonce dochází k AR i bez přítomnosti kumulárních buněk či bez exprese ZP2 a ZP3 na povrchu ZP. Z toho plyne, že AR může být spouštěna i jiným systémem než jsou proteiny ZP a progesteron (Jin et al. 2011).

## 2. Přehled publikací

### *Publikované články*

1. On the saliva proteome of the Eastern European house mouse (*Mus musculus musculus*) focusing on sexual signalling and immunity. Stopka P., Kuntová B., Klempt P., Havrdová L., **Černá M.**, Stopková R. (2016), *Scientific reports* 6., doi:10.1038/srep32481 (IF = 5,228; 2015/2016)
2. *In vivo* exposure to 17 $\beta$ -estradiol triggers premature sperm capacitation in cauda epididymis. Ded L., Sebkova N., **Cerna M.**, Elzeinova F., Dostalova P., Peknicova J., Dvorakova-Hortova K. (2013), *Reproduction*, **145**: 255-263. doi: 10.1530/REP-12-0472 (IF = 3,1; 2016)
3. The slower the better: how sperm capacitation and acrosome reaction is modified in the presence of estrogens. Sebkova N., **Cerna M.**, Ded L., Peknicova J., Dvorakova-Hortova K. (2011), *Reproduction*, **143**: 1-11. doi: 10.1530/REP-11-0326 (IF = 3,1; 2016)

### *Článek po druhé revizi*

1. The vagina monologues: differential regulation of lipocalin expression (OBP, MUP) throughout the mouse estrous cycle. **Cerna M.**, Kuntová B., Talacko P., Stopková R., Stopka P. (2017), *Scientific reports*

### *Článek, jehož téma není zahrnuto v disertační práci*

1. Genome wide identification of promoter binding sites for H4K12ac in human sperm and its relevance for early embryonic development. Paradowska-Dogan A.S., Miller D., Spiess A.-N., Vieweg M., **Cerna M.**, Dvorakova-Hortova K., Bartkuhn M., Schuppe H. Ch., Weidner W., Steger K. (2012), *Epigenetics*, 7(9): 1057-70. doi: 10.4161/epi.21556 (IF = 4,774; 2015/2016)

### 3. Příspěvek autorky

#### Příloha I.

On the saliva proteome of the Eastern European house mouse (*Mus musculus musculus*) focusing on sexual signalling and immunity

Stopka P., Kuntová B., Klempt P., Havrdová L., **Černá M.**, Stopková R. (2016), *Scientific reports* 6., doi:10.1038/srep32481 (IF = 5,228; 2015/2016)

#### Úvod

Většina prací týkajících se chemické komunikace u myší je zaměřena především na chemické signály přítomné v moči. Nicméně při přímém kontaktu dvou jedinců dochází nejprve k identifikaci signálů v orofaciální oblasti, proto jsme se v této práci zaměřili na identifikaci možných chemických signálů a jejich přenašečů vylučovaných ve slinách myší. Díky moderní metodice celkové identifikace proteinů pomocí kapalinového chromatografu spojeného s tandemovým hmotnostním spektrometrem (angl. Nano-flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry, nLC-MS<sup>2</sup>) tato práce přináší mnoho nových poznatků v oblasti proteinů účastnících se chemické komunikace a imunitních pochodů.

#### Cíle práce

1. Identifikace slinného proteomu u divoké myši domácí (*Mus musculus musculus*) se zaměřením na proteiny účastnící se chemické komunikace pomocí metody nLC-MS<sup>2</sup>.
2. Zhodnocení celkové míry pohlavního dimorfismu slinného proteomu.

#### Výsledky práce

1. Celkově jsme u 11 zvířat identifikovali ve slinách 633 proteinů. Mezi nejvíce exprimované geny ve slinách myší patří několik zástupců rodiny lipokalinů, především pak MUP6, OBP5, OBP7, MUP5, OBP1, LCN11, LCN13, OBP2 (uvedeno v sestupném pořadí). Kromě lipokalinů patří mezi nejhojnější proteiny některé sekretoglobiny (SCGB2B2, SCGB1B2, SCGB1B27), antimikrobiální proteiny (BPIFB9B) a jeden zástupce kalikreinů (KLK1B9). V celkovém počtu detekovaných proteinů jsme našli 20 zástupců rodiny lipokalinů (z 55 známých), jež by mohli plnit roli přenašečů signálů

v chemické komunikaci. Ze skupiny proteinů LCN jsme detekovali: LCN2, LCN3, LCN4, LCN11, LCN12, LCN13. Mezi zástupce OBP jsme našli: OBP1, OBP2, OBP5, OBP6, OBP7, a z rodiny MUP: MUP4, MUP5, MUP6, MUP8, MUP14, MUP17, MUP20, MUP21. Některé z těchto proteinů navíc vykazovaly signifikantní míru pohlavního dimorfismu, podobně jako je tomu u lipokalinů produkovaných v moči.

2. Z celkových 633 proteinů bylo pohlavně dimorfních 134 (21 %), z čehož 92 (14,5 %) proteinů bylo signifikantně více exprimováno samci, zatímco pouze 40 (6,3 %) proteinů bylo více exprimováno samicemi. Lze tedy říci, že slinné proteiny exprimované více samci jsou v převaze.

Expresce poloviny z 20 lipokalinů vykazovala signifikantní míru pohlavního dimorfismu, a to ve prospěch samců (OBP1, OBP2, LCN3, LCN4, LCN13, LCN14, MUP4, MUP14 a MUP20). Výjimku tvořil MUP8, který byl více exprimován samicemi. Hladina sekretoglobinů, které jsme identifikovali jako pohlavně dimorfní (7 ze 13 identifikovaných: SCGB1B20, SCGB1B3, SCGB2A2, SCGB2B20, SCGB2B24, SCGB2B3, SCGB2B7), byla vždy vyšší u samců. Stejně tak zástupci antimikrobiálních proteinů, u nichž byl detekován pohlavní dimorfismus, byli více exprimováni samci. Nejvíce proteinů, které byly naopak více exprimovány samicemi, patří do rodiny kalikreinů, konkrétně se jedná o 13 zástupců kalikreinů typu B, které byly dosud popsány pouze v genomu myši a potkana (Lawrence et al. 2010).

## **Diskuze**

Chemická komunikace mezi dvěma jedinci probíhá přes chemické signály hojně se vyskytující v moči, slinách a slzách. Většina publikací se zaměřuje na chemické signály v moči a uvažují tak spíše o komunikaci, která může probíhat na delší vzdálenost. Naše práce se zaměřuje na zmapování kompletního proteomu slin u myši domácí. Jelikož první kontakt mezi samicí a samcem je zahájen v orofaciální oblasti, zajímalo nás složení slin na proteinové úrovni, abychom mohli rozšířit znalosti o potenciální roli slin v chemické komunikaci.

Analyzované sliny byly odebírány šetrnou metodou, pomocí výplachu dutiny ústní malým množstvím fyziologického roztoku, za plného vědomí zvířete, a to proto, aby nedocházelo ke zkreslení výsledků vnějšími vlivy. Za použití citlivých proteomických

technik, jako je nLC-MS<sup>2</sup>, a následné statistické analýzy pomocí metody PLGEM (Power Law Global Error Model) jsme vytvořili komplexní seznam proteinů obsahující signální přenašeče, antibakteriální proteiny, proteiny účastníci se vrozené imunity a mnoho dalších přirozeně se vyskytujících v ústní dutině.

Mnoho proteinů nalezených ve slinách nemusí být exprimováno pouze slinnými žlázami, ale pochází také z nasálních nebo lakrimálních žláz. Příkladem toho může být detekce lipokalinů LCN3 a LCN4, které jsou specificky exprimované ve vomeronasálním orgánu (Miyawaki et al. 1994), přesto byly detekovány ve velkém množství ve slinách (Stopka et al. 2016; Stopková et al. 2016). Další z lipokalinů, OBP proteiny, také nejsou exprimovány v podčelistní slinné žláze, přesto jejich množství ve slinách je značné. Jako nejčastější místo jejich exprese se uvádí žlázy nosní dutiny. Jelikož terciární struktura lipokalinů umožňuje navázat a transportovat těkavé organické látky (angl. volatile organic compound, VOC), mohou být tyto proteiny důležité pro přenos částečně degradovaných VOC do slin, odkud mohou být distribuovány na srst zvířete a sloužit jako identifikační pach, anebo transportovány dále do trávicího traktu, kde se degradují.

Ve slinách jsme našli i zástupce proteinů, které byly popsány jako hlavní močové proteiny (MUP) a slouží jako přenašeče chemických signálů z moči. Tam se dostávají z jater, kde je jejich hlavní místo exprese, samci pak produkují několikanásobně větší koncentraci MUP než samice (Stopková et al. 2007). Přítomnost MUP proteinů ve slinách tedy může naznačovat možnost, že i sliny mohou plnit významnou funkci v chemické komunikaci. Detekovali jsme ve slinách dokonce i MUP20 zvaný „darcin“, a to dokonce u obou pohlaví, což bylo nečekané, neboť dle předchozích autorů byl tento protein detekován pouze v moči samce myši západoevropské (*Mus musculus domesticus*) a laboratorní myši kmene C57BL/6 (Nelson et al. 2015). Protein darcin je dle jiných autorů popsán jako protein, který je feromonem a působí atraktivně pro samice a také jim zlepšuje prostorovou paměť (Roberts et al. 2010; S. A. Roberts et al. 2012). MUP20 může být i indikátorem zdravotního stavu zvířete (Lopes & König 2016). Naše identifikace MUP20 v slinném proteomu je v souladu i s jinými autory, kteří taktéž potvrdili přítomnost tohoto proteinu ve slinách myši (Logan et al. 2008). Množství tohoto proteinu ve slinách je sice větší u samců než u samic, nicméně je těžké si představit, že by tento protein sloužil sám o sobě jako samčí specifický feromon, když je produkován i samičí podčelistní žlázou a sekretován do slin samic. Je tedy pravděpodobné, že

MUP20 není výhradním produktem samců, nevyskytuje se pouze v moči a feromonální funkci nemá samotný protein, ale spíše navázané ligandy, které přenáší.

U některých lipokalinů jsme zjistili pohlavní dimorfismus v jejich expresi, např. u OBP1, OBP2 a MUP8. OBP1 a OBP2 jsou více exprimovány u samců a naproti tomu MUP8 zejména u samic. Je možné, že pohlavně rozdílná exprese OBP proteinů odraží možné rozdíly v čichových schopnostech samic a samců. V případě nálezů MUP8 je zapotřebí blíže specifikovat místo translace a transkripce tohoto proteinu.

Dalším zajímavým proteinem, který jsme potvrdili ve slinách myši, je protein nazvaný peptid exokrinní žlázy (angl. exocrine gland-secreted peptide-1, ESP1), který byl popsán jako protein specifický pro samce u laboratorní myši BALB/c (Kimoto et al. 2007; Kimoto et al. 2005). ESP1 je produkován v lakrimální žláze samce, sekretovaný do slz a při bližším kontaktu se samicí je transferován do VNO samice, kde stimuluje vomeronasální sensorické neurony (Kimoto et al. 2005), z čehož autoři usuzují, že může mít feromonální efekt. Naše výsledky na divoké myši domácí (*Mus musculus musculus*) však tuto výhradní expresi ESP1 u samců nepotvrdily. Přestože byl ESP1 exprimován víc u samců, byl detekován i ve slinách samic. U obou pohlaví jsme našli i dalšího zástupce této proteinové rodiny, ESP6. To může být podnětem k dalším diskuzím o roli těchto proteinů u myši a nabízí se teorie, že na základě jejich typické terciární struktury s amfipatickou elektrostatikou, která je velice podobná struktuře antimikrobiálního proteinu CAMP, by mohla být jejich funkce spíše baktericidní (Gallo et al. 1997; Stopka et al. 2016).

Sekretoglobiny jsou další skupinou proteinů, která je některými autory považována za kandidátní transportéry chemických signálů. V některých publikacích, které jsou založené na jednodušších metodologických přístupech identifikace proteinů, bylo popsáno, že existují konkrétní zástupci této rodiny, kteří jsou unikátní pro různé sekrety (sliny, slzy) či pohlaví, a tudíž hrají specifickou roli v chemické komunikaci. Díky přesnější metodice, pomocí které jsme identifikovali proteom slin mnohem detailněji, jsme ukázali, že ani jeden z detekovaných sekretoglobinů není unikátní pro jedno pohlaví. Zhruba polovina detekovaných sekretoglobinů má stejnou hladinu exprese u obou pohlaví, druhá polovina je více exprimována samci. Dle dalších experimentů se SCGB vyskytují i v dalších tělních tekutinách, jako je plicní a děložní sliznice, nosní a ústní dutina, a v slzách lidí či myši. Prostřednictvím transportu steroidních látek se SCGB účastní protizánětlivých pochodů a

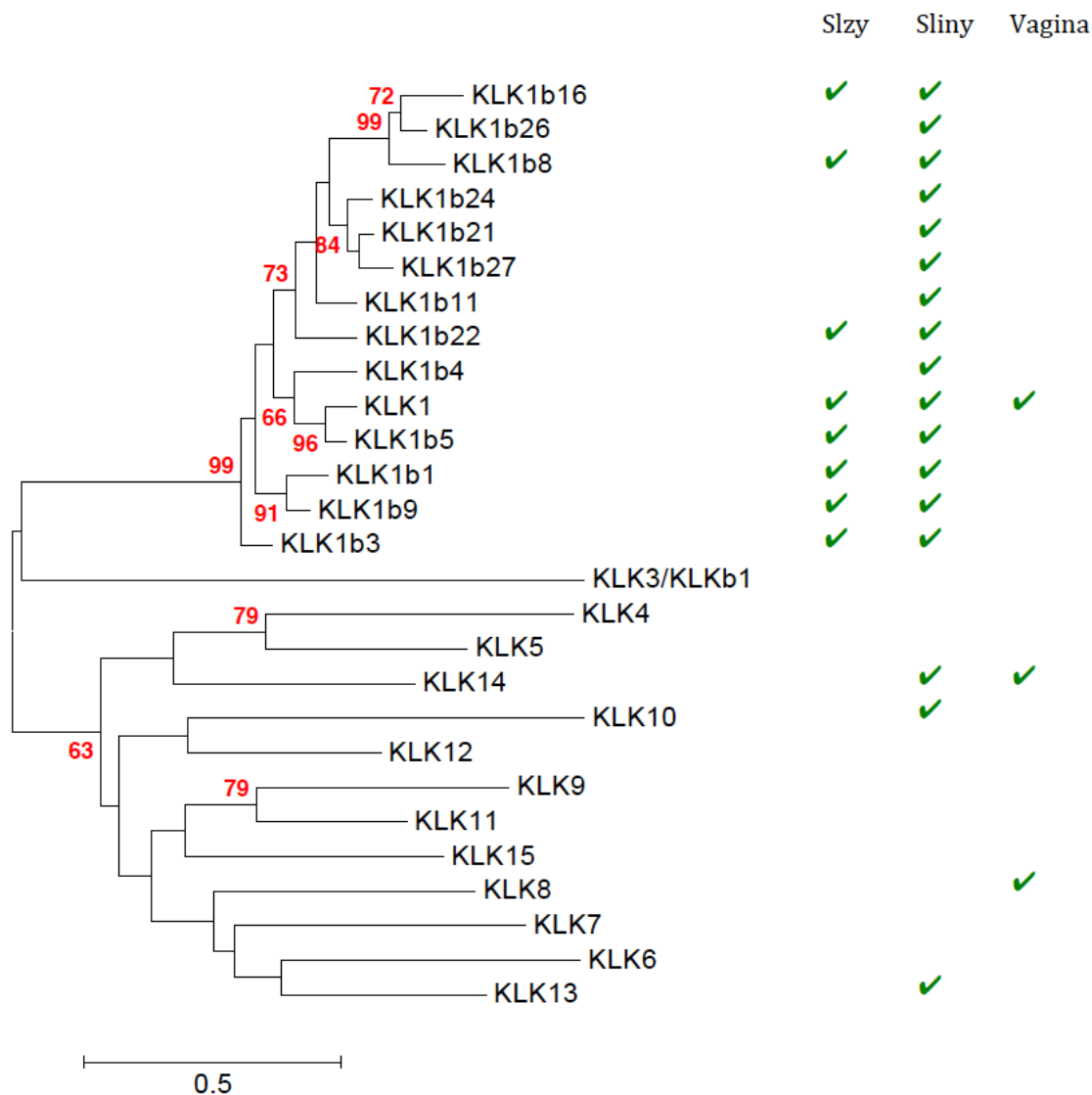
podílí se na hojení tkání (Mukherjee et al. 2007). Naše výsledky přispěly k upřesnění repertoáru SCGB ve slinách, nicméně otázky o jejich funkci zůstávají stále nezodpovězené.

Ústní dutina tvoří vstupní bránu pro různé druhy bakterií, a proto jsme se zaměřili v této práci i na detekci antimikrobiálních proteinů. Výsledná data nám potvrdila řadu antimikrobiálních proteinů, jejichž mechanismus působení je založen na elektrostatických interakcích mezi kladně nabitým antimikrobiálním peptidem a bakteriální membránou vykazující záporný náboj. Touto interakcí dochází ke zvýšení permeability bakteriálních membrán (Lai & Gallo 2009; Wu et al. 2010). K těmto antimikrobiálním proteinům patří i řada BPI (bactericidal/permeability increasing protein) proteinů, u nichž jsme našli rozdílnou expresi mezi pohlavími. Ve slinách jsme našli 7 BPI proteinů; BPIA1, BPIB1, BPIB2, BPIB3, BPIFA2, BPIFB5, BPIFB9B, které vykazovaly zdatelně vyšší expresi u samců. Je možné, že zvýšená exprese těchto proteinů kompenzuje testosteronem sníženou imunitní obranu u samců (Klein 2000). Dále jsme ve slinách našli BPIFA1 (neboli PLUNC/SPURT) a protein, který patří do rodiny proteinů PLUNC, a to protein BPIFB1. Oba proteiny jsou exprimovány v čichovém epitelu Bowmanovými neboli olfaktorními žlázami (Musa et al. 2012). Mezi BPI proteiny se řadí i protein s názvem vomeromodulin (VOME, synonymum BPIFB9A), který byl dříve popsán jako protein se specifickým místem exprese pouze ve VNO (Khew-Goodall et al. 1991). Detekce vomeromodulinu ve slinách tak může být důkazem toho, že se zde nachází i proteiny sekretované VNO. Podobně je tomu i v případě proteinů LCN3 a LCN4 (viz výše).

Na podobném principu jako jsou BPI funguje i antibakteriální protein CAMP, jehož hladina exprese ve slinách je u samic i samců stejná. Dalšími antibakteriálními proteiny zvyšujícími permeabilitu bakterií jsou WFDC proteiny, z nichž jsme ve slinách detekovali dva zástupce WFDC2 a WFDC18. WFDC2 protein byl více exprimován u samců a hladina WFDC18, proteinu, který chrání zuby a měkké tkáně v dutině ústní, byla u obou pohlaví stejná (Blanchard et al. 2015).

Další proteinovou skupinou, která je v této publikaci popsána, je skupina kalikreinů. Nejhojněji jsou ve slinách zastoupeny kalikreiny ze skupiny B příbuzné s KLK1 a jsou signifikantně více exprimovány samicemi. Výsledky ostatních studií na laboratorních myších C57BL/6 jsou rozporuplné, některé publikace popisují opačný trend exprese KLK typu B (více mají samci), naopak některé práce naše výsledky podporují, např. exprese KLK1B5 u samic (Karn & Laukaitis 2015). Ve všech publikacích je shodné to, že KLK1 je exprimovaný

u obou pohlaví stejně, a to jak v případě myší laboratorních, tak divokých (Stopka et al. 2016; van Leeuwen et al. 1987; Karn & Laukaitis 2015). Je možné, že i kalikreiny typu B příbuzné s KKL1 mají některé z vlastností dalších členů této serinové rodiny proteáz, jako je schopnost urychlit hojení ran nebo zprostředkovaná antimikrobiální funkce. Je možné, že tato adaptace divokých myší napomáhá matkám udržovat zdravou pokožku mláďat při pravidelném deponování slin do srsti během péče o mláďata (tzv. allogrooming).



**Obrázek 7. Kladogram myších (*Mus musculus musculus*) kalikreinů**

Na obrázku je fylogenetický strom rodiny kalikreinů u myši domácí (*Mus musculus musculus*). Kalikreiny tvoří dvě hlavní skupiny. Jedna vznikla duplikací genu KLK1 a tvoří ji především kalikreiny b (13 členů). Druhá skupina je velice konzervativní a tyto kalikreiny nacházíme u většiny placentálních savců (myš, potkan, člověk, pes, prase). Ve sloupcích vpravo je označen výskyt jednotlivých kalikreinů v analyzovaných sekretech – v slzách, slinách a vagínách – na základě výsledků publikací (Stopka et al. 2016; Stopkova et al. 2017; Cerna et al. 2017). Fylogenetický strom byl konstruován na základě metody „maximum likelihood“ (Jones et al. 1992). Procento replikovaných stromů (2000 replikací), ve kterých se testované proteiny řadily k sobě (bootstrap number), je vyznačeno u těch skupin, kde byla hodnota větší než 70. Za monofyletickou skupinu můžeme považovat takovou, kde hodnota bootstrapu je vyšší než 75. Celkem bylo analyzováno 27 aminokyselinových sekvencí a ve finálním souboru dat bylo k porovnání 239 pozicí. Strom byl generován softwarem MEGA 5.1. (Tamura et al. 2011).

## **Příloha II.**

The vagina monologues: differential regulation of lipocalin expression (OBP, MUP) throughout the mouse estrous cycle

**Cerna M.**, Kuntová B., Talacko P., Stopková R., Stopka P. (2017), Scientific reports– IN REVISION AFTER THE 1ST REVIEW

### **Úvod**

Prvotní kontakt samce a samice myši domácí je zahájen v orofaciální oblasti a směřuje k anogenitální části těla (Luo 2003). První identifikace zvířete tedy probíhá pravděpodobně prostřednictvím chemických signálů pocházejících ze slin, nicméně vzápětí probíhá kontakt s anogenitální oblastí zvířete a jedinci tak detekují signály produkované v této oblasti. Ty mohou pocházet např. z prepuciálních žláz, u samic pak bude významnou roli hrát vaginální sekret. Je známo již z dřívějších publikací, že samice křečků vylučují právě ve vaginálním sekretu látku feromonálního charakteru, která u samců stimuluje kopulační chování. Proto jsme se rozhodli identifikovat kompletní složení samičího vaginálního sekretu u myši domácí, především s ohledem na možné transportéry chemických signálů, a stanovit i proměnlivost proteinového složení v různých fázích estrálního cyklu samice. Naše práce jako první přináší výsledky tohoto druhu u divoké myši domácí (*Mus musculus musculus*), které mohou, na rozdíl od laboratorních myší, lépe dokumentovat přirozené mechanismy spojené s chemickou komunikací. Nabízí tak nový pohled na dynamiku estrálního cyklu myši a objasňuje některé pochody, které zde probíhají.

### **Cíle práce**

1. Charakterizovat proteiny obsažené ve vaginálním sekretu divokých myší *Mus musculus musculus* během estrálního cyklu pomocí metody nLC-MS<sup>2</sup>.
2. Detekovat potenciální signální transportéry ve vaginálním sekretu.

### **Výsledky práce**

1. V celkovém vaginálním proteomu jsme identifikovali 2507 proteinů, přičemž některé z nich se však vyskytovaly pouze u jedné či dvou samic, což nás vedlo k větší selekci dat a k finálnímu počtu analyzovaných proteinů, což bylo 986. Z celkového počtu proteinů je

pouze sedmnáct více exprimováno v estru než v proestru a zároveň jejich exprese následně klesá v metestru. Dalo by se tedy říci, že mohou být považovány za markery estru. Mezi tyto proteiny patří: SPA9, LYG1, PHLA, HGFA, ASAH1, HORN, DAG1, CPO89, AOC1, CTL4, PPBT, CATC, MA2B2, PPGB, DPP2, FUCO, TGM3. Největší rozdíl v expresi mezi proestrem a estrem, kdy exprese rostla, a zároveň estrem a metestrem, kdy jeho exprese klesala, měl protein SPA9 (Serpín A9). SPA9 patří do rodiny serpinů, což jsou inhibitory serinových proteáz. Mezi další marker patří například protein hornerin (HORN, Hrn), který je součástí keratinizujícího epitelu a zajišťuje společně s mucinem/episialinem (MUC1), jehož exprese byla zvýšena také v estru, protizánětlivou epidermální bariéru proti vnějším patogenům.

K dalším proteinům, které se účastní antimikrobiální ochrany, patří další z rodiny mucinů, MUC9/OVGP1 (angl. oviduct specific glykoprotein), jehož exprese roste v estru a v metestru. Ve výsledném seznamu proteinů byl i protein uromodulin (UROM), který se podílí na vytváření viskózní bariéry na povrchu epitelálních buněk během estrální fáze. Na antimikrobiální ochraně se nepřímo podílí i další dva proteiny, ovostatin (OVOS) a lysozyme g-like protein 1 (LYG1), jejichž exprese je zvýšená v estru a klesá v metestru. Z celé rodiny BPI proteinů jsme ve vaginálním sekretu našli pouze jednoho zástupce, jehož exprese rostla během estru a zůstávala stejná i během metestru. Tím byl protein BPIFD2, jehož terciární struktura umožňuje zvyšovat membránovou propustnost bakterií.

V estrální fázi se objevuje na epitelálních buňkách více bakterií a celkově se zvyšuje jejich počet, což v další fázi indukuje zvýšení počtu neutrofilních granulocytů a umožňuje stabilizovat vaginální mikrobiom. Našli jsme celkem 10 proteinů, které se významně zvýšily ve fázi metestru, a mohou tak být považovány za markery tohoto stadia (MMP8, S10A9, UBP5, HCLS1, NGP, LASP, PSME2, LAP2B, CAMP, LSP1). Mnoho z nich má antimikrobiální funkci (S10A9, NGP, CAMP).

Ve všech třech fázích estrálního cyklu jsme našli řadu členů z rodiny kalikreinů, jejichž exprese byla po celou dobu cyklu stejná. Například: KLK1, 10, 11, 12, 13 a 14. Jediný kalikrein, jehož exprese se v průběhu cyklu měnila, byl KLK8. Největší množství dosahoval ve dvou fázích, a to v proestru a estru a klesal v metestru. Inhibitorem KLK5 a KLK7 je SPINK5, jehož exprese během estrální fáze klesla.

2. Dalším cílem bylo určit, zda se ve vaginálním sekretu vyskytují proteiny, které by mohly sloužit jako transportéry pro VOC. Z našich výsledků je patrný výskyt MUP proteinů i ve vaginálním sekretu a jejich zvýšená exprese během estru a následné přetrvávání zvýšené hladiny i během metestru. Mezi identifikované proteiny z rodiny MUP patří: MUP20 (darcin), MUP3, MUP5 a dva MUP bez unikátní sekvence patřící do skupiny MUP B, které jsme nazvali jako nejpravděpodobnější variantu – sMUP17 („similar to“ MUP17, který může být MUP13 a/nebo MUP17) a sMUP9 („similar to“ MUP9, jehož identifikační peptid je shodný u 13 druhů MUP ze skupiny B, konkrétně MUP1, 2, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 19). Nejvyšší nárůst MUP proteinů z proestru do estru byl zaznamenán konkrétně pro MUP20, sMUP9 a sMUP17.

Dle dostupných publikací jsme byli první, kdo detekoval členy OBP rodiny proteinů ve vaginálním sekretu myši domácí. Nalezli jsme čtyři zástupce: OBP1, 2, 5, 7. Průběh exprese během estrálního cyklu byl podobný jako u MUP proteinů, signifikantně vyšší nárůst OBP byl zaznamenán během estru a přetrvával v metestru, nicméně rozdíl hladin mezi proestrem a estrem nebyl tak vysoký jako u MUP.

Kromě OBP a MUP jsme našli další členy lipokalinů, a to lipokalin 11 (LCN11) a Siderocalin (LCN2). Celkově byla exprese LCN11 nižší než u MUP, ale průběh nárůstu hladin byl stejný, t.j. nejvíce v estru a metestru. Hladina LCN2 byla naopak konstantní během všech tří stadií a navíc patřil celkově k nejvíce exprimovaným genům ve vaginálním sekretu. Do lipokalinů řadíme i protein vázající retinol 1 (angl. retinol-binding protein 1, RBP1), který jsme detekovali, a jeho exprese byla v kontrastu s ostatními lipokaliny, dosahovala nejnižších hodnot během estru a zvýšení v metestru a proestru.

## Diskuze

Abychom dostali ucelenější obraz proteinů účastnících se chemické komunikace divoké myši domácí, bylo nutné udělat komplexní analýzu proteinového složení, a to nejprve slin a posléze i vaginálního sekretu. Jako modelový organismus jsme si vybrali divokou myš domácí (*Mus musculus musculus*), jelikož představuje organismus s uměle nezměněným genomem, zachovaným mikrobiomem a s přirozeným chováním. Naproti tomu laboratorní myši vznikly křížením dvou poddruhů (*M. m. domesticus* a *M. m. musculus*) a mohlo tak dojít

ke změně distribuce či blokace některých genů, což vedlo ke změnám na proteinové úrovni a čímž je také ovlivněno jejich chování.

Vaginální tekutina představuje důležitý zdroj informací o tom, v jakém stadiu se samice zrovna nachází. Tuto tekutinu jsme odebírali pomocí neinvazivní metody a analyzovali pomocí nejmodernějších proteomických technik. Obsah vaginálního sekretu tvoří směs sekretovaných proteinů z různých tkání reprodukčního traktu samice, jako jsou: vaječníky, děložní stěna, děložní hrdlo, rohy dělohy, vejcovody a další vnitřní vaginální žlázy. Tento sekret jsme využili jak pro detekci stádií estrálního cyklu, tak pro další proteinovou analýzu.

Pro konkrétní určení fáze estrálního cyklu jsme provedli cytologickou analýzu. Pro každé stadium je charakteristická změna zastoupení poměrů buněk. Proestrus je popsán jako fáze, kde převažují malé jaderné epitelální buňky s minoritním zastoupením keratinocytů. Později začne počet keratinocytů narůstat, což je typické pro estrus, kde keratinocyty převažují (Cora et al. 2015). V těchto dvou fázích dochází k pomnožení bakterií, ty ulpívají na odlupujících se keratinocytech a jsou viditelné na cytologických vzorcích (Noguchi et al. 2003). Pro udržení přirozeného mikrobiomu ve vagíně dochází v následující fázi, metestru, k pomnožení neutrofilních granulocytů, jejichž počet kulminuje v diestru. Vaginální povrch se během čtyř fází estrálního cyklu pravidelně obměňuje a během estrální fáze dochází ke zvýšení deskvamace buněk, tudíž je nutné, aby byla zajištěna ochrana sliznice před možným průnikem patogenů.

Analogický proces ke keratinizaci na povrchu pokožky může probíhat uvnitř částečně uzavřeného vaginálního prostředí (Muytjens et al. 2016). Ve srovnání s normálním fyziologickým pH uvnitř těla je na povrchu SC pH mírně kyselé (od 4,5 do 5,5). Stejně tak i pH ve vagíně je mírně kyselé, ale během estrálního cyklu se mění: pH v proestru je 5,57 v estru je 4,53 a v diestru 7,52 (Ganesan M. & Kadalmani B. 2016). Hodnota pH je pro deskvamační pochody důležitý a spouštěcí činitel. Naše výsledky nám ukazují, že množství proteinů účastnících se určitým způsobem deskvamace buněk se během estrální fáze zvyšuje. U těchto proteinů je maximální exprese v estru: DSC1, DSC3, CDSN, DSG1A, KLK8, HORN, DAG1/DG (angl. dystroglycan), PAI2 (angl. plasminogen activator inhibitor type 2), SLPI. Opačný trend vykazuje exprese SPINK5, což je inhibitor kalikreinů. Maximální množství SPINK5 je proto ve fázích proestru a metestru, kdy se zde vyskytuje minimální množství bezjaderných epitelálních buněk.

Během proestru a estru dochází ke zmnožení jak symbiotických, tak patogenních bakterií, jelikož schopnost imunitního systému je vlivem estrogenních hormonů snížena. Je možné, že částečnou ochranu tvoří proteiny, které zvyšují propustnost bakteriálních membrán, jako např. LYG1 a OVOS, které jsou v estru nejvíce exprimované a v další fázi jejich exprese klesá. Ochrannou funkci za některé antimikrobiální proteiny mohou v metestru převzít mnohonásobně pomnožené neutrofilní granulocyty.

V metestru nacházíme zvýšenou expresi těchto dvou proteinů z rodiny katelicidinů: CAMP a NGP. CAMP protein může být produktem několika typů buněk přítomných v pokožce a to včetně keratinocytů (Frohm et al. 1997; Sørensen et al. 2003), neutrofilních granulocytů (Turner et al. 1998) či žírných buněk (Di Nardo et al. 2003). Byl již prokázán přímý vliv CAMP produkovaného keratinocyty na antimikrobiální ochranu (Braff et al. 2005).

Z rodiny WFDC proteinů jsme ve vaginálním sekretu detekovali pouze jednoho člena, jehož koncentrace byla během všech tří stadií neměnná. Někteří členové této rodiny se podílí na antimikrobiální ochraně, přičemž námi nalezenému proteinu WFDC2 nebyla dosud tato funkce přímo prokázána. Ale jeho terciární struktura by tuto funkci mohla umožňovat. U lidí je znám jako lidský epididymální protein 4 (angl. human epididymis protein 4, HE4) (Heliström et al. 2003; Kirchoff et al. 1991) a jeho nadměrná exprese bývá často detekována v buňkách vaječníků napadených rakovinou. Využívá se jako marker pro rakovinu vaječníků (Molina et al. 2011).

Součástí antibakteriální ochrany je i rodina katepsinů. Ve vaginálním sekretu jsme našli tyto proteiny: CTSB, CTSC, CTSD, CTSE, CTSG, CTSH, CTSL a CTSZ. Katepsiny jsou lysozomální, většinou cysteinové proteázy (vyjma CTSG – serinová proteáza, CTSD – aspartová proteáza), katalyticky aktivní jen při kyselém pH. Zničení cílových buněk cytotoxickými T lymfocyty nebo NK buňkami vyžaduje koordinovaný účinek perforinu tvořícího póry a granzymu. Aktivace řady serinových proteáz, jako jsou granzym A a B, je převážně zprostředkována CTSC (Andoniou et al. 2011). U lidí gen CTSC kóduje enzym dipeptidyl-peptidázu 1, která hraje důležitou úlohu v imunitní a zánětlivé odpovědi. Mutace tohoto genu způsobuje Papillon-Lefevre syndrom. Nemoc se projevuje závažnou destrukcí parodontálních tkání, postihující jak dočasnou, tak i stálou dentici, spolu s kožními změnami charakteru palmoplantární hyperkeratózy (Meade et al. 2006). Katepsin C hraje důležitou úlohu v imunitní a zánětlivé odpovědi. Dále je klíčovým enzymem v aktivaci elastázy a

katapsinu G uvnitř neutrofilních granulocytů (Olson & Joyce 2015). CTSL se účastní podobným způsobem jako CTSC stavby pórů z perforinů (Olson & Joyce 2015). V našich výsledcích jsme zaznamenali největší expresi dvou katapsinů CTSC a CTSB, a to během estrální fáze.

Zajímavý efekt vytvořila řada proteinů účastnících se protizánětlivých procesů, které jsou úzce spojeny s chemotaxí, produkcí či funkcí neutrofilních granulocytů, lymfocytů a makrofágů. Tyto proteiny jsou exprimovány maximálně v době metestru a s mírným nebo žádným klesáním hladiny exprese přetrvávají do proestru. V estru jsou naopak jejich hladiny nejnížší. Předpokládáme, že se tyto proteiny mohou do vaginálního sekretu dostat přímo z neutrofilních granulocytů nacházejících se ve spodní části reprodukčního traktu a zároveň část z nich může pocházet z horní části, kde je velké a konstantní zastoupení NK buněk, makrofágů, lymfocytů a neutrofilů po celou dobu estrálního cyklu (Pudney et al. 2005). Mezi tyto proteiny patří S10A9 (gen *S100a9*), S10A8 (gen *S100a8*), MMP8 (gen *Mmp8*), LSP1 (gen *Lsp1*), NGP, CAMP. S100A8 a S100A9 jsou malé proteiny vázající vápník, které jsou hojně exprimovány v cytosolu neutrofilů a monocytů. Dále je jejich koncentrace vysoká v extracelulárním prostředí během zánětlivých stavů. S100A8/A9 jsou silnými stimulatory neutrofilů a zároveň působí v místě zánětu chemotakticky a způsobují migraci neutrofilů (Ryckman et al. 2003). *Lsp1* (angl. lymphocyte-specific protein 1, LSP1) gen kóduje protein, který se intracelulárně váže na F-aktin a je exprimovaný v lymfocytech, makrofázích a neutrofilních granulocytech (Pulford et al. 1999). Snížená exprese LSP1 rapidně snižuje fagocytární schopnost makrofágů (Maxeiner et al. 2015). Dále se zdá, že LSP1 hraje důležitou roli v neutrofilních granulocytech, a to tím, že reguluje jejich morfologii, motilitu a produkci superoxidů (Hannigan et al. 2001).

Jedním z hojně se vyskytujících proteinů v proestru a metestru je neutrofilní kolagenáza jinak známá jako metaloproteináza 8 (angl. neutrophil collagenase / matrix metalloproteinase 8, *Mmp8*). Tento protein je uchováván v granulích neutrofilních granulocytů v neaktivní formě a po jeho sekreci dochází k aktivaci štěpením extracelulárními proteinázami. *Mmp8* se účastní štěpení extracelulární matrix a tudíž je důležitý pro embryonální vývoj a remodelaci tkání (Manicone & McGuire 2008). Nedostatek *Mmp8* při zvýšeném počtu ran výrazně zpomaluje jejich hojení (Gutierrez-Fernandez et al. 2007).

LCN2 byl jedním z nejhojnějších proteinů exprimovaných během celého estrálního cyklu. Je známo, že tento protein je schopen vázat tzv. siderofory. Siderofory jsou proteiny

produkované bakteriemi sloužící jako chelatační látky pro železnaté a železité ionty. LCN2 navazuje siderofory a znemožňuje tak bakteriím získávat nezbytné ionty železa a tím pádem inhibuje jejich růst (Goetz et al. 2002). Očekávali bychom jeho největší expresi během proestru a estru, kdy se bakteriální populace rozrůstá, nicméně jeho hladina je po celou dobu cyklu velice podobná s mírným zvýšením v metestru. Z toho lze usuzovat, že exprese LCN2 kopíruje narůstající trend bakterií závislých na iontech železa směrem k metestru.

Expese dalších detekovaných lipokalinů jako MUP3, 4, 5, 6, 9 a 20 roste mírně od estru směrem k metestru. Narůstající množství *Mup* proteinů mezi proestrem a estrem bylo také detekováno za pomoci RNA čipů (angl. RNA microarray) ze tkání děložních rohů i v případě laboratorních myší (Yip et al. 2013). Podobnou dynamiku exprese jako u MUP jsme pozorovali i u OBP proteinů, které jsme ve vaginálním sekretu našli, a to jmenovitě OBP1, 2, 5, 7.

### **Závěr příloh I. a II.**

Ukazuje se tedy, že exprese některých MUP proteinů vykazuje pohlavní dimorfismus i v jiných sekretech než jenom v moči, a tudíž i tady mohou hrát roli v pohlavní signalizaci. Tuto roli by mohli v některých tkáních zastávat i zástupci OBP proteinů, nicméně tato hypotéza musí být ještě potvrzena dalšími výsledky. Naše výsledky však mohou naznačovat i obecnější funkci těchto lipokalinů, jako je detoxifikace sliznic a jejich ochrana před toxickými metabolity vznikajícími degradačními procesy. Očekávali jsme, že pokud by hlavní funkcí MUP a OBP byla signalizace estru samice, pak by jejich hladina byla nejvyšší v proestru, případně v estru. Naše výsledky však ukazují nejvyšší hladiny těchto lipokalinů nejen v estru, ale následně přetrvávají i v metestru, kdy je schopnost oplození samice nulová, a tudíž by pak samec dostával falešný signál ke kopulaci. Je možné, že spíše než samotný protein je důležitý ligand, který je v jednotlivých fázích vázán, a ten určuje povahu signálu. Zdrojem těchto ligandů mohou být metabolity odrážející zdravotní stav jedince.

### **Příloha III.**

The slower the better: how sperm capacitation and acrosome reaction is modified in the presence of estrogens

Sebkova N., **Cerna M.**, Ded L., Peknicova J., Dvorakova-Hortova K. (2011), *Reproduction*, **143**: 1-11. doi: 10.1530/REP-11-0326 (IF = 3,1; 2016)

### **Úvod**

Ejakulované spermie nejsou schopny okamžitého oplození vajíčka. Spermie musí projít kapacitací a následně AR, přičemž dochází k mnoha molekulárním změnám. Proto jsme se rozhodli pro bližší studium těchto dvou pochodů. Je známo, že se v prostředí vyskytují ať už přirozeně nebo uměle vyprodukované různé estrogení látky. Jejich koncentrace v přírodě, zejména ve vodě, je natolik vysoká, že ovlivňuje některé fyziologické pochody živočichů i rostlin. Taktéž jsou estrogény nezbytné pro reprodukční pochody samic i samců (Free & Jaffe 1979). V této práci jsme se zaměřili na pozorování vlivu estrogenů v různých koncentracích na kapacitaci a AR myších spermií (BALB/c), a tedy zda mohou být potenciálním rizikem pro probíhající mechanismy vedoucí ke schopnosti spermie oplodnit vajíčko.

### **Cíle práce**

1. Určit lokalizaci specifického ER $\beta$  na spermiích izolovaných z *cauda epididymis* myši BALB/c.
2. Kvantitativně zhodnotit vliv přírodních estrogenů (estron, 17 $\beta$ -estradiol, estriol) a syntetického estrogenu (17 $\alpha$ -ethynylestradiol) na míru tyrosinové fosforylace hlavičky během *in vitro* kapacity.
3. Kvantitativně zhodnotit pomocí SDS-PAGE elektroforézy množství proteinů po tyrosinové fosforylaci ve vzorcích lyzátu celých spermií ovlivněných vybranými estrogény.
4. Určit vliv estrogeních hormonů na schopnost spermií projít akrozomální reakcí po indukci kalcium ionoforem (CaI).

## Výsledky práce

1. U myších spermií získaných z *cauda epididymis* byl detekován imunofluorescenčním značením ER $\beta$  na apikální straně akrozomálního regionu hlavičky spermie.
2. Spermie odebrané z *cauda epididymis* byly ponechány kapacitovat v přítomnosti různých koncentrací (0,02; 0,2; 2; 20; 200 ng/ml) přírodních estrogenů – estronu, 17 $\beta$ -estradiolu, estriolu a syntetického estrogenu – 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu v kapacitačním médiu. Odebrané a označené spermie monoklonální protilátkou na přítomnost TyrP v hlavičce spermie byly spočteny a data byla statisticky vyhodnocena.

Z výsledků vyplývá, že všechny výše vyjmenované estrogeny zvyšují počet spermií pozitivních na TyrP v hlavičce spermie během procesu kapacitace. Zvýšený počet spermií s TyrP se projevuje jak na počátku kapacitace v časech 30 a 60 min., tak i v pozdější době měření, 90 a 120 min. Rozdíl působení vybraných estrogenů je také dán odlišným vlivem jejich koncentrací. Vysokou míru TyrP jsme pozorovali u spermií, na které působily hormony s vyšší koncentrací 200 a 20 ng/ml (estron, 17 $\beta$ -estradiol a 17 $\alpha$ -ethynylestradiol). Naopak odlišně působí estriol, který vykazuje zvýšenou TyrP zejména při nízkých koncentracích 0,02; 0,2 a 2 ng/ml. Se zvyšující se koncentrací 17 $\beta$ -estradiolu oproti kontrolním vzorkům vzrůstá procento spermií pozitivních na TyrP. Koncentrace tohoto estrogenu při hodnotách 0,2 a 2 ng/ml zvyšuje TyrP zejména ve 30 minutách kapacitace, u koncentrací 20 a 200 ng/ml je výrazně zvýšena míra TyrP zejména od času 30 minut až do 90 minut kapacitace. Téměř shodný vliv jsme pozorovali v případě působení estronu. Zejména obě nejvyšší koncentrace 20 a 200 ng/ml 17 $\alpha$ -ethynylestradiolu výrazně ovlivnily dráhy vedoucí ke kapacitaci v časech od 30 minut až do 120 minut kapacitace. Tento estrogen nejdéle ovlivňoval procesy v hlavičce spermie. Počet spermií pozitivních na TyrP v hlavičce během inkubace náhle roste, ale jejich počet zůstává poměrně nízký a stálý, jelikož proces TyrP a kapacitace neprobíhá synchronně (Stewart-Savage 1993).

3. TyrP ve vzorcích lyzátu celých spermií jsme detekovali pomocí SDS-PAGE elektroforézy s následným western blotem a chemiluminiscenční detekcí. Výsledky nám ukazují zvýšení TyrP proteinů o molekulové hmotnosti 40–120 kDa. Maximálních hodnot TyrP dosahuje v čase 90–120 minut kapacitace. V tomto čase inkubované spermie

procházejí kompletním procesem kapacitace, po níž jsou schopné projít AR a následně oplodnit vajíčko. Z výsledků je patrné, že zvyšující se koncentrace estrogenů koreluje se zvýšeným počtem proteinů, které jsou fosforylované na tyrosinových reziduiích. Při použití nižších koncentrací a to 0,02 a 0,2 ng/ml u 17  $\beta$ -estradiolu, estronu a estriolu docházelo také ke zvýšenému počtu proteinů s TyrP. Tato metoda nám nezobrazuje probíhající TyrP proteinů pouze v hlavičce spermií, ale také v oblasti bičíku, která je úzce spjata se stavem hyperaktivace spermie.

4. Celkově výsledky tohoto pokusu ukázaly, že estrogény použité v našem pokusu výrazně snížily procento spermií, které byly schopné projít procházejí CaI indukovanou AR. Všechny přírodní estrogény estriol, estron a 17  $\beta$ -estradiol vykazovaly velice podobný efekt ovlivnění AR spermií. Výrazné snížení počtu spermií procházejících AR nastalo u spermií, jež prošly kapacitací po dobu 30 minut s navazující inkubací CaI po dobu 5 minut. Tento efekt se lišil v rámci různého použití koncentrací estrogenů. Koncentracemi, způsobující tento efekt se některé tyto estrony lišily. Zejména tři nejvyšší koncentrace 200; 20 a 2 ng/ml u 17  $\beta$ -estradiolu a estronu ovlivňovaly AR, u estriolu tři nižší koncentrace 0,02; 0,2 a 2 ng/ml. Tři největší koncentrace 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu snižovaly indukovanou AR zejména v časech 30 a 60 minut kapacitace po následné indukci AR 60 minut.

## Diskuze

Estrogény byly dlouho považovány pouze za samičí hormony, hrají však důležitou roli také v samčím reprodukčním traktu. U lidí jsou estrogény (estradiol, estron, estriol) syntetizovány zejména z cholesterolu a sekretovány pohlavními žlázami. Také mohou být vytvořeny z androgenů v tukové tkáni nadledvinek (Hornstein & Schwerin 2012). Estron slouží jako prekurzor pro vznik estriolu. Přeměna estronu na estriol probíhá v játrech. Největší účinek má v těle estradiol a v porovnání s ním je aktivita estronu a estriolu značně slabší. Je prokázáno, že androstenedione a testosteron slouží v *testis* jako prekurzory pro syntézu 17  $\beta$ -estradiolu a estronu, která je umožněna díky přítomnosti enzymu cytochrom P450 aromatáza. Vznik a jednotlivé přeměny se odehrávají i v organismu samců a podílejí se na regulaci reprodukčních parametrů (Broeder et al. 2000). Vybrané koncentrace estrogenních

hormonů v experimentu odpovídají většinou fyziologickým hodnotám koncentrací estrogenů u myši. Nejnižší vybraná koncentrace je shodná s koncentrací estrogenů v krevní plasmě, druhá odpovídá koncentraci v *rete testis* a třetí koncentrace se shoduje s koncentrací estrogenů v ovariální tekutině. Pro účely experimentu jsme vybrali navíc ještě dvě vyšší koncentrace, než jsou maximální koncentrace estrogenů, které byly naměřeny u myši.

Výsledky provedených experimentů ukazují na prokapacitační účinek estrogenů na myších spermii *in vitro*. Procento spermií, jejichž proteiny mají pozitivní TyrP v hlavičce u kontrolní skupiny, dosahuje 8–12 %, kdežto u experimentální skupiny roste tato hodnota na 18 %. Celková TyrP populace spermií je menší než 15 %. Avšak 90–100 % těchto spermií mají schopnost vazby k ZP. Pouze tyto spermie (15 %) jsou určeny k rozpoznání a vazbě ZP (Asquith et al. 2004).

Uvedené výsledky ukazují, že estrogeny zvyšují TyrP spermií, nicméně každý estrogen může vyvolat odezvu různé síly s ohledem na jeho koncentraci a také čas kapacitace. Rozdílná estrogenní odpověď může být způsobena tím, že estrogeny aktivují různé typy nebo části signálních drah nebo mohou vázat a aktivovat různé receptory, které spouští dráhy vedoucí k proteinové TyrP spermii během procesu kapacitace. Každý z estrogenů se pravděpodobně chová odlišně, jejich účinek není shodný.

Signální dráhy vedou od TyrP k aktivaci aktinové polymerace, která zabraňuje předčasné fúzi plazmatické membrány s vnější akrozomální membránou, vedoucí k AR. Pokud působením estrogenů dojde ke zvýšení TyrP, dochází pravděpodobně k silnější stimulaci aktinové polymerace, výsledkem je neschopnost aktinových filament depolymerace a dochází k blokování AR (Brener et al. 2003). Pokud jsou nadměrným množstvím estrogenů estrogenní receptory hyperstimulovány, je zvýšena aktivita tyrosinkináz, TyrP zůstává spuštěna. Tím dochází k dlouhodobé aktivaci fosfolipázy D (PLD) a polymeraci aktinu (Mbizvo et al. 1990). Během AR, aktivita PLC zvyšuje koncentraci intracelulárních  $Ca^{2+}$ , vedoucí k depolymeraci aktinu. Pokud však PLD zůstane aktivována přetrvávající stimulací estrogenních receptorů a tyrosinkináz, aktivita PKC může být zpožděna a depolymerace aktinu zpomalena. Důležité je v tomto případě načasování jednotlivých po sobě jdoucích dějů vedoucích ke kapacitaci a k AR. Ovlivnění těchto dějů může vést ke snížení, či ztrátě schopnosti oplození.

Právě tyto děje mohou být ovlivněny narůstající koncentrací estrogenních hormonů v prostředí. Nesmíme zapomínat, že spermie během cesty přes reprodukční trakt samice jsou

vystaveny rozdílným koncentracím estrogenů, podobně jak je tomu v tomto *in vitro* experimentu. Koncentrace estrogenů je nízká během pre-ovulační fáze, kdy 17  $\beta$ -estradiol je spojený s viabilitou spermií (Mbizvo et al. 1990) a v době ovulace jeho koncentrace roste (Shaikh 1971).

V souvislosti s výsledky našeho pokusu jsou kapacitace a AR modulovány vyššími koncentracemi estrogenů a ty mohou sloužit jako specifická selekční bariéra spermií, kde tyto koncentrace fungují jako inhibitor pro indukovanou AR (Vigil et al. 2008). Je možné, že estrogény mohou představovat mechanismus pro samičí specifický výběr nejlepších spermií pro oplození.

#### **Příloha IV.**

*In vivo* exposure to 17 $\beta$ -estradiol triggers premature sperm capacitation in cauda epididymis  
Ded L., Sebkova N., **Cerna M.**, Elzeinova F., Dostalova P., Peknicova J., Dvorakova-Hortova K. (2013), *Reproduction*, **145**: 255-263. doi: 10.1530/REP-12-0472 (IF = 3,1; 2016)

#### **Úvod**

V předchozí práci, která probíhala *in vitro*, jsme zaznamenali výrazný prokapacitační efekt vybraných estrogenů (Sebkova et al. 2012). Proto jsme se rozhodli v další práci tento efekt pozorovat *in vivo*. Vliv estrogenů s různými koncentracemi na reprodukční schopnost některých organismů byl prokázán mnoha *in vitro* pokusy (Adeoya-Osiguwa et al. 2003; Sebkova et al. 2012; Ded et al. 2010). Estrogény ovlivňují signální dráhy uvnitř spermie, vedoucí k procesu kapacitace a následně k procesům, které vedou k fúzi vnější plasmatické membrány s vnější akrozomální membránou při AR, rovněž umožňují kontakt spermie s kumulárními buňkami či ZP a fúzi s oolemou vajíčka.

Tato publikace popisuje *in vivo* efekt 17 $\beta$ -estradiolu na průběh kapacitace. Zaměřili jsme se na sledování vlivu tohoto estrogenu na stimulování fosforylace na tyrosinových zbytcích a na změny v *Tff1* genové expresi, který je znakem aktivity ER $\alpha$ .

#### **Cíle práce**

1. Stanovit míru působení 17 $\beta$ -estradiolu *in vivo* na míru tyrosinové fosforylace ve hlavičce spermie po kapacitaci za pomoci imunofluorescenčního značení. Kvantitativně zhodnotit

pomocí SDS-PAGE elektroforézy množství proteinů po tyrosinové fosforylaci ve vzorcích lyzátu celých spermií u všech tří skupin.

2. Vyhodnocení změn homeostázy vápníku ve spermiích po působení 17 $\beta$ -estradiolu.
3. Pozorování vztahu mezi tyrosinovou fosforylací proteinů (mírou kapacitace) a množstvím 17 $\beta$ -estradiolu v séru a exprese genu *Tff1*.

## Výsledky práce

1. Spermie byly získány z *cauda epididymis* od tří skupin samců BALB/c. První skupina samců byla vystavena účinkům 17 $\beta$ -estradiolu během puberty od 4. do 7. týdnu věku (tzv. pubertální skupina), druhou skupinu tvořili samci vystavení kontinuálnímu působení 17 $\beta$ -estradiolu v době od narození do 12. týdne věku (tzv. kontinuální skupina). U obou pokusných skupin byla použita koncentrace 20 ng/ml. Třetí skupina samců byla pak kontrolní, která nebyla vystavena žádným estrogením účinkům.

Spermie používané pro detekci TyrP byly odebrány ve stejných časech jako v minulé publikaci (0, 30, 60, 90 a 120 minut). U obou experimentálních skupin byl větší počet spermií s vyšší mírou TyrP na hlavičce oproti kontrolní. Statisticky největší rozdíl v míře TyrP vykazovala kontinuální skupina oproti ostatním skupinám. Nejvyšších hodnot TyrP dosahovaly všechny skupiny v čase 90 minut kapacitace. Stejný trend vykazovala kontinuální skupina během hodnocení TyrP za použití lyzátu celých spermií, SDS-PAGE elektroforézy, western blotu a chemiluminiscence.

2. V průběhu kapacitace jsou aktivovány signální dráhy, které zahrnují, mezi jinými, zvýšení intracelulární koncentrace Ca<sup>2+</sup>. Ke stanovení míry TyrP byl proto proveden další experiment, ve kterém byly spermie myši použity pro tzv. chlortetracyklinové (CTC) stanovení množství Ca<sup>2+</sup>. Z výsledků byl patrný podobný prokapacitační efekt stanovení CTC jako u detekce míry TyrP. Počet CTC značených spermií byl největší u kontinuální skupiny, a to nejen v porovnání s kontrolní skupinou, ale také s pubertální skupinou. Počet spermií pubertální skupiny vykazoval rozdíly také oproti kontrolní skupině, i když na rozdíl od kontinuální skupiny nebyl tak vysoký.

3. Výsledky měření ukazují, že míra TyrP, hodnoty koncentrace  $17\beta$ -estradiolu v séru i míra exprese *Tff1* genu vzájemně korelují. Statisticky významné rozdíly v hodnotách měření byly pouze mezi kontrolní a kontinuální skupinou. U pubertální skupiny byly hodnoty ve srovnání s kontrolní skupinou také vyšší, avšak nebyly o tolik výrazné, aby byly statisticky prokazatelné. Zjišťovali jsme rozdíl v míře TyrP v hlavičkách spermií mezi spermii získanými z *cauda epididymis* a *testis*. Žádný rozdíl v míře TyrP jsme nepozorovali.

## Diskuze

Tato publikace navazuje a rozšiřuje tak výsledky předchozí práce. Pro studie stavu kapacitace je často vybírán přírodní estrogen  $17\beta$ -estradiol, jehož působení na tento děj byl součástí i této práce. Stimulační prokapacitační účinek tohoto estrogenu byl detekován *in vitro* v těchto pracích (Ded et al. 2010; Sebkova et al. 2012). Výsledky *in vitro* pokusů nemusí vždy odrážet situaci *in vivo* a vykazovat tak shodné účinky. Z těchto důvodů byl připraven analogický experiment k experimentu předchozímu s výjimkou, že  $17\beta$ -estradiol byl podáván v pitné vodě experimentálním myším a jeho působení tedy probíhalo *in vivo*.

Je důležité neopomíjet fakt, že kromě experimentálně použité koncentrace estrogenu v tomto pokusu jsou spermie vystaveny také shodným koncentracím estrogenu v *rete testis* i v reprodukčním traktu samice a může v tomto případě docházet k dalším ovlivněním a molekulárním změnám. Tato souvislost je patrná z výše zmíněných experimentů, kdy molekulární změny související s mírou TyrP a CTC korelují s hodnotami  $17\beta$ -estradiolu v séru, podobná korelace hodnot byla detekovaná u exprese genu *Tff1*. Hodnoty TyrP jsou v maximálních časech inkubace nižší než v předchozím čase, což ukazuje, že molekulární změny v průběhu kapacitace nejsou trvalé a pokud jsou spermie dále vystaveny pouze nižším hodnotám estrogenů, mohou se účinky předchozí koncentrace zvrátit a vykazovat tak hodnoty jako kontrolní skupina. Přes to, že se hodnoty TyrP mezi kontrolní skupinou a pubertální skupinou významně liší, hodnota  $17\beta$ -estradiolu v séru mezi těmito skupinami zůstává stejná. Tento rozdíl je možné vysvětlit tím, že u pubertální skupiny je hodnota estrogenu shodná, ale může přetrvávat její vyšší koncentrace v reprodukčním traktu a silněji tak ovlivnit proces kapacitace. Tuto teorii potvrzují hodnoty exprese genu *Tff1* pubertální skupiny.

### **Závěr příloh III. a IV.**

Látky s estrogenní aktivitou, které se dostávají do prostředí a kde se postupně jejich koncentrace zvyšuje, tak potenciálně mohou mít negativní vliv na reprodukční schopnost organismů. I kdyby se každá jednotlivá látka v prostředí vyskytovala v nízké koncentraci či měla pouze malý negativní vliv na organismus, celkově mají tyto endogenní disruptory kumulativní účinky a výsledkem může být značně snížená fertilita jedince.

## 4. Seznam citací

- Adeoya-Osiguwa, S.A. et al., 2003.  $17\beta$ -Estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function. *Human Reproduction*, 18(1), s.100–107.
- Akingbemi, B.T., 2005. Estrogen regulation of testicular function. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3(1), s.51.
- Akingbemi, B.T. & Hardy, M.P., 2001. Oestrogenic and antiandrogenic chemicals in the environment: effects on male reproductive health. *Ann Med*, 33.
- Allen, E., 1922. The oestrous cycle in the mouse. *American Journal of Anatomy*, 30(3), s.297–371.
- Andersch-Björkman, Y. et al., 2007. Large Scale Identification of Proteins, Mucins, and Their O-Glycosylation in the Endocervical Mucus during the Menstrual Cycle\* □ S. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6, s.708–716.
- Andoniou, C.E. et al., 2011. Cathepsin C limits acute viral infection independently of NK cell and CD8+ T-cell cytolytic function. *Immunology and Cell Biology*, 89(4), s.540–548.
- Ansar Ahmed, S., Penhale, W.J. & Talal, N., 1985. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *The American journal of pathology*, 121(3), s.531–51.
- Asquith, K.L. et al., 2004. Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition. *Journal of cell science*, 117(16), s.3645–3657.
- Astwood, E.B., 1939. Changes in the weight and water content of the uterus of the normal adult rat. *American Journal of Physiology -- Legacy Content*, 126(1), s.162 LP-170.
- Austin, C.J., Emberson, L. & Nicholls, P., 2004. Purification and characterization of pheromaxin, the porcine steroid-binding protein: A member of the secretoglobulin superfamily. *European Journal of Biochemistry*, 271(13), s.2593–2606.
- Baldi, E. et al., 2000. Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 5(3), s.E110–E123.
- Ball, M.A. & Parker, G.A., 2003. Sperm competition games: Sperm selection by females. *Journal of Theoretical Biology*, 224(1), s.27–42.
- Beagley, K.W. & Gockel, C.M., 2003. Regulation of innate and adaptive immunity by the

- female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 38.
- Becker, R.M. et al., 1998. Identification of Mammaglobin B , a Novel Member of the Uteroglobulin Gene Family characterized the expression pattern of a novel hu-. , 78, s.70–78.
- Becker, S.D. & Hurst, J.L., 2008. Pregnancy Block from a Female Perspective. In J. L. Hurst et al., ed. *Chemical Signals in Vertebrates II*. New York, NY: Springer New York, s. 141–150.
- Beier, H.M., 2000. The discovery of uteroglobin and its significance for reproductive biology and endocrinology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 923(1), s.9–24.
- Beier, H.M., 1968. Uteroglobulin: A hormone-sensitive endometrial protein involved in blastocyst development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 160(2), s.289–291.
- Belén Herrero, M. et al., 2000. Nitric oxide interacts with the cAMP pathway to modulate capacitation of human spermatozoa. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(6), s.522–536.
- BIGNETTI, E. et al., 1985. Purification and characterisation of an odorant???binding protein from cow nasal tissue. *European Journal of Biochemistry*, 149(2), s.227–231.
- Bingle, C.D. & Bingle, L., 2000. Characterisation of the human plunc gene, a gene product with an upper airways and nasopharyngeal restricted expression pattern. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1493(3), s.363–367.
- Bingle, C.D. & Craven, C.J., 2002. PLUNC: a novel family of candidate host defence proteins expressed in the upper airways and nasopharynx. *Human molecular genetics*, 11(8), s.937–943.
- Blanchard, A.A. et al., 2015. Towards further defining the proteome of mouse saliva. *Proteome Science*, 13(1), s.10.
- De Blas, G. et al., 2002. The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(51), s.49326–49331.
- Bleil, J.D. & Wassarman, P.M., 1980. Mammalian sperm-egg interaction: Identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell*, 20(3), s.873–882.
- Böcskei, Z. et al., 1992. Pheromone binding to two rodent urinary proteins revealed by X-ray

- crystallography. *Nature*, 360, s.186–188.
- Borgoño, C.A. et al., 2007. A potential role for multiple tissue kallikrein serine proteases in epidermal desquamation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(6), s.3640–3652.
- Boudjelal, M., Sivaprasadarao, A. & Findlay, J.B., 1996. Membrane receptor for odour-binding proteins. *Biochem J*, 317 ( Pt 1, s.23–27.
- Bowen, J.A., Bazer, F.W. & Burghardt, R.C., 1997. Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophectoderm in vitro. *Biology of reproduction*, 56(2), s.409–415.
- Braff, M.H. et al., 2005. Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. *Journal of Investigative Dermatology*, 125(1), s.9–13.
- Brattsand, M. et al., 2005. A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum. *Journal of Investigative Dermatology*, 124(1), s.198–203.
- Breitbart, H. & Naor, Z., 1999. Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reviews of reproduction*, 4(3), s.151–159.
- Brener, E. et al., 2003. Remodeling of the Actin Cytoskeleton During Mammalian Sperm Capacitation and Acrosome Reaction1. *Biology of Reproduction*, 68(3), s.837–845.
- Breustedt, D.A. et al., 2005. The 1.8-Å crystal structure of human tear lipocalin reveals an extended branched cavity with capacity for multiple ligands. *Journal of Biological Chemistry*, 280(1), s.484–493.
- Briand, L. et al., 2000. Odorant and pheromone binding by aphrodisin, a hamster aphrodisiac protein. *FEBS Letters*, 476(3), s.179–185.
- Broeder, C.E. et al., 2000. The Andro Project. *Archives of Internal Medicine*, 160(20), s.3093.
- Brotman, R.M. et al., 2014. Microbiome, sex hormones, and immune responses in the reproductive tract: Challenges for vaccine development against sexually transmitted infections. *Vaccine*, 32(14), s.1543–1552.
- Byers, S.L. et al., 2012. Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. , 7(4), s.2–6.
- Calafat, J. et al., 2000. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is membrane-associated in azurophil granules of human neutrophils, and relocation occurs upon cellular activation. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 108(3), s.201–208.
- Callebaut, I. et al., 2000. The uteroglobin fold. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 923(1), s.90–112.

- Campbell, C.S., Ryan, K.D. & Schwartz, N.B., 1976. Estrous cycles in the mouse: relative influence of continuous light and the presence of a male. *Biology of reproduction*, 14(3), s.292–299.
- Carson, D.D. et al., 1998. Mucin expression and function in the female reproductive tract. *Human Reproduction Update*, 4(5), s.459–464.
- Caubet, C.C. et al., 2004. Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *The Journal of investigative dermatology*, 122(5), s.1235–1244.
- Cerna, M. et al., 2017. The vagina monologues: differential regulation of lipocalin expression (OBP, MUP) throughout the mouse estrous cycle. *Scientific reports*, In revisio.
- Cinquetti, R. & Rinaldi, L., 1989. Effects of changed social conditions on modulation of the oestrous cycle in mice. *Bolletino di zoologia*, 56(2), s.137–142.
- Clark, N.L. & Swanson, W.J., 2005. Pervasive adaptive evolution in primate seminal proteins. *PLoS Genetics*, 1(3), s.335–342.
- Claus, R., Schopper, D. & Hoang-Vu, C., 1985. Contribution of individual compartments of the genital tract to oestrogen and testosterone concentrations in ejaculates of the boar. *Acta endocrinologica*, 109(2), s.281–288.
- Clauss, A., Lilja, H. & Lundwall, Å., 2005. The evolution of a genetic locus encoding small serine proteinase inhibitors. *Biochemical and biophysical research communications*, 333(2), s.383–389.
- Clements, J.A. et al., 1988. Androgen dependence of specific kallikrein gene family members expressed in rat prostate. *Journal of Biological Chemistry*, 263(31), s.16132–16137.
- Coid, C.R., 1976. Bacterial endotoxin and impaired fetal development. *Experientia*, 32(6), s.735–736.
- Colborn, T. & Clement, C., 1992. *Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection*, Princeton Scientific Pub. Co.
- Colborn, T., vom Saal, F.S. & Soto, A.M., 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect*, 101.
- Conner, S.J. et al., 2005. Cracking the egg: increased complexity in the zona pellucida. *Human Reproduction*, 20(5), s.1148–1152.
- Cora, M.C., Kooistra, L. & Travlos, G., 2015. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal

- Smears. *Toxicologic pathology*, s.0192623315570339-.
- Couse, J.F. et al., 1997. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology*, 138(11), s.4613–4621.
- Crichton, E.G. et al., 1994. Hyperosmolality and sperm storage in hibernating bats: prolongation of sperm life by dehydration. *The American journal of physiology*, 267(5 Pt 2), s.R1363-70.
- Crosier, M. et al., 2001. High expression of the trefoil protein TFF1 in interval breast cancers. *The American journal of pathology*, 159(1), s.215–21.
- Daev, E. V & Dukelskaya, A. V, 2003. The Female Pheromone 2,5-Dimethylpyrazine Induces Sperm-Head Abnormalities in Male CBA Mice. *Russian Journal of Genetics*, 39(7), s.811–815.
- Ded, L. et al., 2010. Effect of estrogens on boar sperm capacitation in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(1), s.87.
- DeLoia, J. a et al., 1998. Regional specialization of the cell membrane-associated, polymorphic mucin (MUC1) in human uterine epithelia. *Hum Reprod*, 13(10), s.2902–2909.
- Deraison, C. et al., 2007. LEKTI Fragments Specifically Inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and Control Desquamation through a pH-dependent Interaction □ D. *Molecular Biology of the Cell*, 18, s.3607–3619.
- Diamandis, E.P. et al., 2000. New Nomenclature for the Human Tissue Kallikrein Gene Family. *Clinical Chemistry*, 46(11), s.1855 LP-1858.
- Döderlein, A., 1892. Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das Puerperalfieber. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 11, s.699.
- Dorus, S. et al., 2004. Rate of molecular evolution of the seminal protein gene SEMG2 correlates with levels of female promiscuity. *Nature genetics*, 36(12), s.1326–1329.
- Dupont, S. et al., 2000. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development (Cambridge, England)*, 127(19), s.4277–4291.
- Eiler, H. & Graves, C.N., 1977. Oestrogen content of semen and the effect of exogenous oestradiol-17beta on the oestrogen and androgen concentration in semen and blood plasma of bulls. *Journal of reproduction and fertility*, 50(1), s.17–21.

- Eissa, A. & Diamandis, E.P., 2008. Human tissue kallikreins as promiscuous modulators of homeostatic skin barrier functions. *Biological chemistry*, 389(6), s.669–680.
- Eleftheriou, B.E., Bronson, F.H. & Zarrow, M.X., 1962. Interaction of Olfactory and Other Environmental Stimuli on Implantation in the Deer Mouse. *Science*, 137(3532), s.764 LP-764.
- Elias, P.M. et al., 1998. The secretory granular cell: the outermost granular cell as a specialized secretory cell. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 3, s.87–100.
- Elliott, M.B., Irwin, D.M. & Diamandis, E.P., 2006. In silico identification and Bayesian phylogenetic analysis of multiple new mammalian kallikrein gene families. *Genomics*, 88(5), s.591–599.
- Elsbach, P., 1998. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in antibacterial host defense. *Journal of leukocyte biology*, 64(1), s.14–18.
- Elsbach, P. & Weiss, J., 1985. Oxygen-dependent and oxygen-independent mechanisms of microbicidal activity of neutrophils. *Immunology letters*, 11(3–4), s.159–163.
- Elzeinova, F. et al., 2008. Effect of low dose of vinclozolin on reproductive tract development and sperm parameters in CD1 outbred mice. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 26(3–4), s.231–238.
- Emami, N. & Diamandis, E.P., 2008. Human kallikrein-related peptidase 14 (KLK14) is a new activator component of the KLK proteolytic cascade: Possible function in seminal plasma and skin. *Journal of Biological Chemistry*, 283(6), s.3031–3041.
- Evans, B.A., Drinkwater, C.C. & Richards, R.I., 1987. Mouse glandular kallikrein genes. Structure and partial sequence analysis of the kallikrein gene locus. *Journal of Biological Chemistry*, 262(17), s.8027–8034.
- Evans, M.I. et al., 1987. Developmental Regulation of the Estrogen-Receptor and the Estrogen Responsiveness of 5 Yolk Protein Genes in the Avian Liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(23), s.8493–8497.
- Felicio, S. et al., 1981. Altered Profiles of Estradiol and Progesterone Associated with Prolonged Estrous Cycles and Persistent Vaginal Cornification in Aging C57BL / 6J of Biological a well ogy of acyclicity before are anovulatory. *Biol Reprod*, 794(24), s.784–794.
- Felicioli, A. et al., 1993. Multiple types and forms of odorant-binding proteins in the old-

- world porcupine *Hystrix cristata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 105(3), s.775–784.
- Ferkin, M.H., Sorokin, E.S. & Johnston, R.E., 1996. Self-grooming as a sexually dimorphic communicative behaviour in meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*. *Animal Behaviour*, 51(4), s.801–810.
- Féron, C. & Gheusi, G., 2003. Social regulation of reproduction in the female mound-builder mouse (*Mus spicilegus*). *Physiology and Behavior*, 78(4–5), s.717–722.
- Fisher, H.M. et al., 1998. Phosphoinositide 3-kinase is involved in the induction of the human sperm acrosome reaction downstream of tyrosine phosphorylation. *Molecular Human Reproduction*, 4(9), s.849–855.
- Fisher, J.S. et al., 1997. Immunolocalisation of oestrogen receptor-alpha within the testis and excurrent ducts of the rat and marmoset monkey from perinatal life to adulthood. *The Journal of endocrinology*, 153(3), s.485–495.
- Fischbach, M.A. et al., 2006. The pathogen-associated *iroA* gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(44), s.16502–7.
- Fitzpatrick, J.L. et al., 2009. Female promiscuity promotes the evolution of faster sperm in cichlid fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(4), s.1128–1132.
- Flower, D.R., 1996. The lipocalin protein family: structure and function. *The Biochemical journal*, 318 ( Pt 1, s.1–14.
- Focà, A. et al., 2012. Lipopolysaccharides: From erinyes to charites. *Mediators of Inflammation*, 2012(Figure 1).
- Folk, G.E., 1940. The longevity of sperm in the female bat. *The Anatomical Record*, 76(1), s.103–109.
- Free, M.J. & Jaffe, R.A., 1979. Collection of rete testis fluid from rats without previous efferent duct ligation. *Biology of reproduction*, 20(2), s.269–278.
- Frohm, M. et al., 1997. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *The Journal of biological chemistry*, 272(24), s.15258–15263.
- Fujitani, Y. et al., 2002. Pronounced eosinophilic lung inflammation and Th2 cytokine release in human lipocalin-type prostaglandin D synthase transgenic mice. *J Immunol*, 168(1), s.443–449.

- Gallo, R.L. et al., 1997. Identification of CRAMP, a cathelin-related antimicrobial peptide expressed in the embryonic and adult mouse. *Journal of Biological Chemistry*, 272(20), s.13088–13093.
- Ganesan, Mahadevan, B.K., 2016. Ganesan\_PHASE DEPENDENT DISCREPANCY IN MURINE VAGINAL MICRO-ENVIRONMENT- A CORRELATIVE ANALYSIS OF pH, GLYCOGEN AND SERUM ESTROGEN UPON EXPOSURE TO LAPATINIB DITOSYLATE. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 8(5), s.404–407.
- Ganformina, M.D. et al., 2010. ApoD, a glia-derived apolipoprotein, is required for peripheral nerve functional integrity and a timely response to injury. *Glia*, 58(11), s.1320–1334.
- Ganjam, V.K. & Amann, R.P., 1976. Steroids in fluids and sperm entering and leaving the bovine epididymis, epididymal tissue, and accessory sex gland secretions. *Endocrinology*, 99(6), s.1618–1630.
- Garcia, M.A. & Meizel, S., 1999. Progesterone-mediated calcium influx and acrosome reaction of human spermatozoa: pharmacological investigation of T-type calcium channels. *Biology of reproduction*, 60(1), s.102–109.
- Garner, D.L. et al., Dual DNA Staining Assessment of Bovine Sperm Viability Using SYBR-14 and Propidium Iodide. *Journal of Andrology*, 15(6).
- Gipson, I.K. et al., 1997. Mucin Genes Expressed by Human Female Reproductive Tract Epithelia1. *Biology of Reproduction*, 56(4), s.999–1011.
- Glasgow, A. et al., 2014. A role for the WFDC protein, WAP2, in regulation of innate host defence in the lung. *European Respiratory Journal*, 44(Suppl 58).
- Glasgow, A.M.A. et al., 2015. A role for whey acidic protein four-disulfide-core 12 (WFDC12) in the regulation of the inflammatory response in the lung. *Thorax*, 70(5), s.426–432.
- Goetz, D.H. et al., 2002. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Molecular Cell*, 10(5), s.1033–1043.
- Golas, A. et al., 2011. Semen quality parameters and embryo lethality in mice deficient for Trp53 protein. *Reproductive biology*, 11(3), s.250–63.
- Goldman, J.M., Murr, A.S. & Cooper, R.L., 2007. The rodent estrous cycle: Characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research Part B*

- *Developmental and Reproductive Toxicology*, 80(2), s.84–97.
- Gower, J.D. et al., 1990. Protection against Endotoxin-Induced Fetal Resorption in Mice by Desferrioxamine and Ebselen. *International Journal of Experimental Pathology*, 71(4), s.433–440.
- Grolli, S. et al., 2006. Odorant binding protein has the biochemical properties of a scavenger for 4-hydroxy-2-nonenal in mammalian nasal mucosa. *FEBS Journal*, 273(22), s.5131–5142.
- Gutierrez-Fernandez, A. et al., 2007. Increased inflammation delays wound healing in mice deficient in collagenase-2 (MMP-8). *The FASEB Journal*, 21(10), s.2580–2591.
- Hagemeyer, P. et al., 2011. Searching for Major Urinary Proteins (MUPs) as Chemosignals in Urine of Subterranean Rodents. *Journal of Chemical Ecology*, 37(7), s.687–694.
- Hakk, H., Diliberto, J.J. & Birnbaum, L.S., 2009. The effect of dose on 2,3,7,8-TCDD tissue distribution, metabolism and elimination in CYP1A2 (-/-) knockout and C57BL/6N parental strains of mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 241(1), s.119–126.
- Hall, J.M., Couse, J.F. & Korach, K.S., 2001. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 276(40), s.36869–36872.
- Handelmann, G., Ravizza, R. & Ray, W.J., 1980. Social dominance determines estrous entrainment among female hamsters. *Hormones and Behavior*, 14(2), s.107–115.
- Hannigan, M. et al., 2001. Leukocyte-specific gene 1 protein (LSP1) is involved in chemokine KC-activated cytoskeletal reorganization in murine neutrophils in vitro. *Journal of Leukocyte Biology*, 69(3), s.497–504.
- Hardman, M.J. & Ashcroft, G.S., 2008. Estrogen, not intrinsic aging, is the major regulator of delayed human wound healing in the elderly. *Genome biology*, 9(5), s.R80.
- Harper, D. & Smith, J.M., 2003. *Animal signals: John Maynard-Smith*, Oxford University Press.
- Hastie, N.D., Held, W.A. & Toole, J.J., 1979. Multiple genes coding for the androgen-regulated major urinary proteins of the mouse. *Cell*, 17(2), s.449–457.
- Heinonen, P.K. et al., 1985. Anatomic sites of upper genital tract infection. *Obstetrics and gynecology*, 66(3), s.384–390.
- Heliström, I. et al., 2003. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Research*, 63(13), s.3695–3700.
- Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U. & Andrews, N.C., 2005. Contents, Ed. Board + Forthc.

- articles. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(3), s.i.
- Herrero, M.B. & Gagnon, C., 2001. Nitric oxide: a novel mediator of sperm function. *Journal of andrology*, 22(3), s.349–56.
- Heske, E.J. & Nelson, R.J., 1984. Pregnancy interruption in *Microtus ochrogaster*: Laboratory artifact or field phenomenon? *Biology of Reproduction*, 31(1), s.97–103.
- Hess, R.A. et al., 1997. Estrogen ducts receptor of the adult ( $\alpha$  and  $\beta$ ) expression male rat reproductive in the excurrent tract. *Journal of Andrology*, 18(6), s.602–611.
- Hickey, D.K. et al., 2011. Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: Stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections. *Journal of Reproductive Immunology*, 88(2), s.185–194.
- Holani, R. et al., 2016. Proline-arginine rich (PR-39) cathelicidin: Structure, expression and functional implication in intestinal health. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 49, s.95–101.
- Holt, W. V & Fazeli, A., 2016. Sperm selection in the female mammalian reproductive tract. Focus on the oviduct: Hypotheses, mechanisms, and new opportunities. *Theriogenology*, 85(1), s.105–112.
- Hornstein, T. & Schwerin, J.L., 2012. *Biology of Women*, Nelson Education.
- Chalovich, J.M. & Eisenberg, E., 2005. Glycans In The Immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: A Critical Review. *Biophysical Chemistry*, 257(5), s.2432–2437.
- Chamero, P. et al., 2007. Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. *Nature*, 450(7171), s.899–902.
- Chang, M.C., 1951. Fertilizing Capacity of Spermatozoa deposited into the Fallopian Tubes. *Nature*, 168(4277), s.697–698.
- Chapdelaine, P. et al., 1988. High level of expression in the prostate of a human glandular kallikrein mRNA related to prostate-specific antigen. *FEBS Letters*, 236(1), s.205–208.
- Chen, Z.L. et al., 1995. Expression and activity-dependent changes of a novel limbic-serine protease gene in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 15(7), s.5088–5097.
- Inoue, N. et al., 2003. Disruption of Mouse CD46 Causes an Accelerated Spontaneous Acrosome Reaction in Sperm. *Molecular and Cellular Biology*, 23(7), s.2614–2622.
- Inoue, N. et al., 1998. Expression of neuropsin in the keratinizing epithelial tissue–

- immunohistochemical analysis of wild-type and nude mice. *Journal of investigative dermatology*, 110(6), s.923–931.
- Isackson, P.J., Dunbar, J.C. & Bradshaw, R.A., 1987. Role of glandular kallikreins as growth factor processing enzymes: structural and evolutionary considerations. *Journal of cellular biochemistry*, 33(1), s.65–75.
- Janotova, K. & Stopka, P., 2011. The Level of Major Urinary Proteins is Socially Regulated in Wild Mus musculus musculus. *Journal of Chemical Ecology*, 37(6), s.647–656.
- Jemiolo, B., Harvey, S. & Novotny, M., 1986. Promotion of the Whitten effect in female mice by synthetic analogs of male urinary constituents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(12), s.4576–4579.
- Jin, M. et al., 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(12), s.4892–4896.
- Johnson, P.M. et al., 2007. Rapid sperm acrosome reaction in the absence of acrosomal CD46 expression in promiscuous field mice (*Apodemus*). *Reproduction (Cambridge, England)*, 134(6), s.739–47.
- Jones, A.G., 2002. The evolution of alternative cryptic female choice strategies in age-structured populations. *Evolution; international journal of organic evolution*, 56(12), s.2530–2536.
- Jones, D.T., Taylor, W.R. & Thornton, J.M., 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer applications in the biosciences: CABIOS*, 8(3), s.275–282.
- Jonsson, M., Lundwall, Å. & Malm, J., 2006. The semenogelins: proteins with functions beyond reproduction? *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63(24), s.2886–2888.
- Kaiser, L. et al., 2007. Structural characterization of the tetrameric form of the major cat allergen Fel d 1. *Journal of molecular biology*, 370(4), s.714–727.
- Kaiser, L. et al., 2003. The crystal structure of the major cat allergen Fel d 1, a member of the secretoglobulin family. *Journal of Biological Chemistry*, 278(39), s.37730–37735.
- Karlson, P. & Lüscher, M., 1959. ‘Pheromones’: a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, 183(4653), s.55–56.
- Karn, R. & Laukaitis, C., 2015. Comparative Proteomics of Mouse Tears and Saliva:

- Evidence from Large Protein Families for Functional Adaptation. *Proteomes*, 3(3), s.283–297.
- Khew-Goodall, Y. et al., 1991. Vomeromodulin, a putative pheromone transporter: cloning, characterization, and cellular localization of a novel glycoprotein of lateral nasal gland. *The FASEB journal*, 5(14), s.2976–2982.
- Kim, H.J. et al., 2005. Accumulation of 23kDa lipocalin during brain development and injury in *Hyphantria cunea*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 35(10), s.1133–1141.
- Kim, J. et al., 2000. Regulation of the estrogen-responsive pS2 gene in MCF-7 human breast cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 74(4), s.157–168.
- Kim, J. et al., 2000. Regulation of the estrogen-responsive pS2 gene in MCF-7 human breast cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 74(4), s.157–168.
- Kimoto, H. et al., 2007. Sex-and strain-specific expression and vomeronasal activity of mouse ESP family peptides. *Current Biology*, 17(21), s.1879–1884.
- Kimoto, H. et al., 2005. Sex-specific peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons. *Nature*, 437(7060), s.898–901.
- Kincade, P.W. et al., 1994. Pregnancy: a clue to normal regulation of B lymphopoiesis. *Immunology Today*, 15(11), s.539–544.
- Kirchhoff, C. et al., 1991. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors. *Biology of reproduction*, 45(2), s.350–357.
- Kirkman-Brown, J.C. et al., 2002. Zona pellucida and progesterone-induced Ca<sup>2+</sup> signaling and acrosome reaction in human spermatozoa. *Journal of andrology*, 23(3), s.306–315.
- Klein, S.L., 2000. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 24(6), s.627–638.
- Klug, J. et al., 2000. Uteroglobin/Clara cell 10-kDa family of proteins: nomenclature committee report. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 923, s.348–354.
- Komatsu, N. et al., 2006. Elevated human tissue kallikrein levels in the stratum corneum and serum of peeling skin syndrome-type B patients suggests an over-desquamation of corneocytes. *The Journal of investigative dermatology*, 126(10), s.2338–2342.
- Kopf, G.S., 2002. Signal Transduction Mechanisms Regulating Sperm Acrosomal

## Exocytosis-6.

- Kornack, D.R. & Rakic, P., 2001. The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(8), s.4752–4757.
- Krishnan, R.S. & Daniel, J.C., 1967. ‘Blastokinin’: Inducer and Regulator of Blastocyst Development in the Rabbit Uterus. *Science*, 158(3800), s.490 LP-492.
- Kruhøffer, M. et al., 1996. Gene expression of aphrodisin in female hamster genital tract segments. *Cell and Tissue Research*, 287(1), s.153–160.
- Kuiper, G.G. et al., 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, 139.
- Kundu, G.C. et al., 2000. Uteroglobin binding proteins: regulation of cellular motility and invasion in normal and cancer cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 923, s.234–248.
- Kuwae, K. et al., 2002. Epidermal expression of serine protease, neuropsin (KLK8) in normal and pathological skin samples. *Molecular Pathology*, 55(4), s.235–241.
- Kwak, J. et al., 2016. Are MUPs a Toxic Waste Disposal System? *PLoS ONE*, 11(3), s.e0151474.
- Kwak, J. et al., 2011. Butylated hydroxytoluene is a ligand of urinary proteins derived from female mice. *Chemical Senses*, 36(5), s.443–452.
- Kyselova, V. et al., 2004. Body and organ weight, sperm acrosomal status and reproduction after genistein and diethylstilbestrol treatment of CD1 mice in a multigenerational study. *Theriogenology*, 61(7–8), s.1307–1325.
- Kyselova, V. et al., 1999. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Andrologia*, 56(1), s.30.
- Lai, Y. & Gallo, R.L., 2009. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in Immunology*.
- Larsen, G.L., Bergman, Å. & Klasson-wehler, E., 1990. A methylsulphonyl metabolite of a polychlorinated biphenyl can serve as a ligand for  $\alpha_2\mu$ -globulin in rat and major-urinary-protein in mice. *Xenobiotica*, 20(12), s.1343–1352.
- Laska, M., Seibt, A. & Weber, A., 2000. ‘Microsmatic’ Primates Revisited: Olfactory Sensitivity in the Squirrel Monkey. *Chemical Senses*, 25(1), s.47.
- Laskemoen, T. et al., 2010. Sperm quantity and quality effects on fertilization success in a

- highly promiscuous passerine, the tree swallow *Tachycineta bicolor*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 64(9), s.1473–1483.
- Lawrence, M.G., Lai, J. & Clements, J.A., 2010. Kallikreins on steroids: Structure, function, and hormonal regulation of prostate-specific antigen and the extended kallikrein locus. *Endocrine Reviews*, 31(4), s.407–446.
- Lazure, C. et al., 1984. The major androgen-dependent protease in dog prostate belongs to the kallikrein family: confirmation by partial amino acid sequencing. *FEBS Letters*, 175(1), s.1–7.
- Lebron-Milad, K. & Milad, M.R., 2012. Sex differences, gonadal hormones and the fear extinction network: implications for anxiety disorders. *Biology of mood & anxiety disorders*, 2(1), s.3.
- Lee, S.H.S.E., Jeong, S.K. & Lee, S.H.S.E., 2010. Protease and Protease-activated Receptor-2 signaling in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Yonsei Medical Journal*, 51(6), s.808–822.
- van Leeuwen, B.H. et al., 1987. Cellular basis for the differential response of mouse kallikrein genes to hormonal induction. *The EMBO journal*, 6(6), s.1705.
- Lennartsson, A. et al., 2005. A murine antibacterial ortholog to human bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is expressed in testis, epididymis, and bone marrow. *Journal of leukocyte biology*, 77(3), s.369–77.
- Leyton, L. & Saling, P., 1989. 95 kd sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell*, 57(7), s.1123–1130.
- Leyton, L. & Saling, P., 1989. Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction. *The Journal of cell biology*, 108(6), s.2163–8.
- Li, C. et al., 2007. Interaction of antinflammin-1 with uteroglobin-binding protein induces phosphorylation of ERK1/2 in NIH 3T3 cells. *Peptides*, 28(11), s.2137–2145.
- Li, S. & Davis, B., 2007. Evaluating rodent vaginal and uterine histology in toxicity studies. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 80(3), s.246–252.
- Lintelmann, J. et al., 2003. Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 75(5), s.631–681.
- Logan, D.W., Marton, T.F. & Stowers, L., 2008. Species specificity in major urinary proteins by parallel evolution. *PloS one*, 3(9), s.e3280.

- Long, J.A. & Evans, H.M., 1922. *The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena*, Berkeley, Calif.: University of California Press.
- Lopes, P.C. & König, B., 2016. Choosing a healthy mate: Sexually attractive traits as reliable indicators of current disease status in house mice. *Animal Behaviour*, 111(January), s.119–126.
- Lu, X. et al., 2011. The cytokine-driven regulation of secretoglobins in normal human upper airway and their expression, particularly that of uteroglobin-related protein 1, in chronic rhinosinusitis. *Respiratory research*, 12, s.28.
- Lubahn, D.B. et al., 1993. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(23), s.11162–6.
- Lundwall, Å., 1989. Characterization of the gene for prostate-specific antigen, a human glandular kallikrein. *Biochemical and biophysical research communications*, 161(3), s.1151–1159.
- Lundwall, Å. & Brattsand, M., 2008. Kallikrein-related peptidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(13), s.2019–2038.
- Lundwall, Å., Clauss, A. & Olsson, A.Y., 2006. Evolution of kallikrein-related peptidases in mammals and identification of a genetic locus encoding potential regulatory inhibitors. *Biological Chemistry*.
- Luo, M., 2003. Encoding Pheromonal Signals in the Accessory Olfactory Bulb of Behaving Mice. *Science*, 299(5610), s.1196–1201.
- Macklaim, J.M. et al., 2011. At the crossroads of vaginal health and disease, the genome sequence of *Lactobacillus iners* AB-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl, s.4688–4695.
- Macrides, F. et al., 1984. Male hamster investigatory and copulatory responses to vaginal discharge: Relationship to the endocrine status of females. *Physiology & Behavior*, 33(4), s.633–637.
- Mägert, H.J. et al., 1995. cDNA sequence and expression pattern of the putative pheromone carrier aphrodisin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(6), s.2091–5.
- Mägert, H.J. et al., 1999. The Golden Hamster Aphrodisin Gene. *The Journal of Biological*

- Chemistry*, 274(1), s.444–450.
- Mandl, A.M., 1951. Cyclical Changes in the Vaginal Smear of Adult Ovariectomized Rats. *Journal of Experimental Biology*, 28(4), s.585–592.
- Mandl, A.M., 1951. The Phases of the Oestrous Cycle in the Adult White Rat. *J Exp Biol*, 28(4), s.576–584.
- Manicone, A.M. & McGuire, J.K., 2008. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 19(1), s.34–41.
- Maruniak, J.A. & Bronson, F.H., 1976. Gonadotropic responses of male mice to female urine. *Endocrinology*, 99(4), s.963–969.
- Mathur, P.P. & D’Cruz, S.C., 2011. The effect of environmental contaminants on testicular function. *Asian Journal of Andrology*, 13(4), s.585–591.
- Maxeiner, S. et al., 2015. Crucial role for the LSP1-myosin1e bimolecular complex in the regulation of Fc receptor-driven phagocytosis. *Molecular Biology of the Cell*, 26(9), s.1652–1664.
- Mbizvo, M.T. et al., 1990. Serum hormone levels affect sperm function\*\*Supported by a grant of the Contraceptive Research and Development Program (CONRAD), Eastern Virginia Medical School, under a Cooperative Agreement (DPE-2644-A-00-6063-00) with the United States Agency for Inter. *Fertility and Sterility*, 54(1), s.113–120.
- McClintock, M.K., 1978. Estrous synchrony and its mediation by Airborne chemical communication (*Rattus norvegicus*). *Hormones and Behavior*, 10(3), s.264–276.
- McClintock, M.K., 1971. Menstrual synchrony and suppression. *Nature*.
- Meade, J.L. et al., 2006. A family with Papillon-Lefèvre syndrome reveals a requirement for cathepsin C in granzyme B activation and NK cell cytolytic activity. *Blood*, 107(9), s.3665–3668.
- Miller, E.A. et al., 2016. Lactobacilli Dominance and Vaginal pH: Why is the Human Vaginal Microbiome Unique? *Frontiers in Microbiology*, 7(December), s.1936.
- Miller, L. & Hunt, J.S., 1996. Sex steroid hormones and macrophage function. *Life Sciences*, 59(1), s.1–14.
- Mitsui, S. et al., 1999. A novel form of human neuropsin, a brain-related serine protease, is generated by alternative splicing and is expressed preferentially in human adult brain. *European Journal of Biochemistry*, 260(3), s.627–634.
- Miyawaki, A. et al., 1994. Possible pheromone-carrier function of two lipocalin proteins in

- the vomeronasal organ. *The EMBO journal*, 13(24), s.5835–42.
- Molina, R. et al., 2011. HE4 a novel tumour marker for ovarian cancer: comparison with CA 125 and ROMA algorithm in patients with gynaecological diseases. *Tumor Biology*, s.1–9.
- Morris, B.J., 1989. hGK???: A KALLIKREIN GENE EXPRESSED IN HUMAN PROSTATE. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 16(4), s.345–351.
- Morrissey, R.E. et al., 1988. Evaluation of rodent sperm, vaginal cytology, and reproductive organ weight data from National Toxicology Program 13-week studies. *Fundamental and Applied Toxicology*, 11(2), s.343–358.
- Mortimer, D. et al., 1989. The spontaneous acrosome reaction of human spermatozoa incubated in vitro. *Human Reproduction*, 4(1), s.57–62.
- Mubiru, J.N. et al., 2008. Nonhuman primates as models for studies of prostate specific antigen and prostatic diseases. *The Prostate*, 68(14), s.1546–1554.
- Mudge, J.M. et al., 2008. Dynamic instability of the major urinary protein gene family revealed by genomic and phenotypic comparisons between C57 and 129 strain mice. *Genome biology*, 9(5), s.R91.
- Mukherjee, A.B., Zhang, Z. & Chilton, B.S., 2007. Uteroglobin: A steroid-inducible immunomodulatory protein that founded the Secretoglobin superfamily. *Endocrine Reviews*, 28(7), s.707–725.
- Musa, M. et al., 2012. Differential localisation of BPIFA1 (SPLUNC1) and BPIFB1 (LPLUNC1) in the nasal and oral cavities of mice. *Cell and Tissue Research*, 350(3), s.455–464.
- Muytjens, C.M.J. et al., 2016. Putative functions of tissue kallikrein-related peptidases in vaginal fluid. *Nature Reviews Urology*, 13(10), s.596–607.
- Naito, K., Toyoda, Y. & Yanagimachi, R., 1992. Production of normal mice from oocytes fertilized and developed without zonae pellucidae. *Human Reproduction*, 7(2), s.281–285.
- Di Nardo, A., Vitiello, A. & Gallo, R.L., 2003. Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. *The Journal of Immunology*, 170(5), s.2274–2278.
- Nelson, A.C. et al., 2015. Protein pheromone expression levels predict and respond to the

- formation of social dominance networks. *Journal of Evolutionary Biology*, 28(6), s.1213–1224.
- Nelson, J.F. et al., 1982. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. *Biology of reproduction*, 27(2), s.327–39.
- Noguchi, K., Tsukumi, K. & Urano, T., 2003. .<sub>2003</sub>\_Noguchi\_Qualitative and Quantitative Differences in Normal Vaginal Flora of Conventionally Reared Mice, Rats, Hamsters, Rabbits, and Dogs. , 53(4), s.404–412.
- Novotny, M. et al., 1986. Adrenal-mediated endogenous metabolites inhibit puberty in female mice. *Science*, 231(4739), s.722 LP-725.
- Novotny, M., Harvey, S. & Jemiolo, B., 1990. Chemistry of male dominance in the house mouse, *Mus domesticus*. *Experientia*, 46(1), s.109–113.
- Novotny, M. V et al., 1999b. Positive identification of the puberty-accelerating pheromone of the house mouse: the volatile ligands associating with the major urinary protein. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 266(1432), s.2017–2022.
- Novotny, M.V. et al., 1999a. A unique urinary constituent, 6-hydroxy-6-methyl-3-heptanone, is a pheromone that accelerates puberty in female mice. *Chemistry and Biology*, 6(6), s.377–383.
- Olfaction, M., 2002. Molecular and Functional Characterization of an Odorant Binding Protein of the Asian Elephant , *Elephas maximus*: Implications for the Role of Lipocalins in. , s.11786–11794.
- Olsen, N.J. & Kovacs, W.J., 1996. Gonadal Steroids and Immunity\*. *Endocrine Reviews*, 17(4), s.369–384.
- Olsen, N.J. & Kovacs, W.J., 2002. Hormones, pregnancy, and rheumatoid arthritis. *The journal of gender-specific medicine : JGSM : the official journal of the Partnership for Women's Health at Columbia*, 5(4), s.28–37.
- Olson, O.C. & Joyce, J.A., 2015. Cysteine cathepsin proteases: regulators of cancer progression and therapeutic response. *Nat Rev Cancer*, 15(12), s.712–729.
- Overpeck, J.G. et al., 1978. Concentrations of circulating steroids in normal prepubertal and adult male and female humans, chimpanzees, rhesus monkeys, rats, mice, and hamsters: A literature survey. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 4(5–6), s.785–803.
- Park, J.W. et al., 2012. Requirement of protein l-isoaspartyl O-methyltransferase for

- transcriptional activation of trefoil factor 1 (TFF1) gene by estrogen receptor alpha. *Biochemical and biophysical research communications*, 420(2), s.223–229.
- Peknicova, J. et al., 2002. Effect of an Endocrine Disruptor on Mammalian Fertility. Application of Monoclonal Antibodies against Sperm Proteins as Markers for Testing Sperm Damage. *American Journal of Reproductive Immunology*, 47(5), s.311–318.
- Pelosi, P., 1994. Odorant-Binding Proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 29(3), s.199–228.
- Penschow, J.D. et al., 1991. Sites of expression and induction of glandular kallikrein gene expression in mice. *Molecular and cellular endocrinology*, 81(1), s.135–146.
- Petrak, J. et al., 2007. Iron-independent specific protein expression pattern in the liver of HFE-deficient mice. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(5), s.1006–1015.
- Petrova, M.I. et al., 2013. Vaginal microbiota and its role in HIV transmission and infection. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), s.762–792.
- Petrulis, A. & Johnston, R.E., 1995. A reevaluation of dimethyl disulfide as a sex attractant in golden hamsters. *Physiology and Behavior*, 57(4), s.779–784.
- Petta, S. et al., 2011. High liver RBP4 protein content is associated with histological features in patients with genotype 1 chronic hepatitis C and with nonalcoholic steatohepatitis. *Digestive and Liver Disease*, 43(5), s.404–410.
- Pevsner, J. et al., 1988. Molecular cloning of odorant-binding protein: member of a ligand carrier family. *Science*, 241(4863), s.336 LP-339.
- Pevsner, J. & Snyder, S.H., 1990. Odorant-binding protein: odorant transport function in the vertebrate nasal epithelium. *Chemical Senses*, 15(2), s.217–222.
- Playford, R.J. et al., 2006. Effects of mouse and human lipocalin homologues 24p3/lcn2 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin on gastrointestinal mucosal integrity and repair. *Gastroenterology*, 131(3), s.809–817.
- Ponmanickam, P. et al., 2010. Identification of testosterone-dependent volatile compounds and proteins in the preputial gland of rat *Rattus norvegicus*. *General and Comparative Endocrinology*, 167(1), s.35–43.
- Pudney, J., Quayle, A.J. & Anderson, D.J., 2005. Immunological Microenvironments in the Human Vagina and Cervix: Mediators of Cellular Immunity Are Concentrated in the Cervical Transformation Zone1. *Biology of Reproduction*, 73(6), s.1253–1263.

- Pulford, K. et al., 1999. Lymphocyte-specific protein 1: A specific marker of human leucocytes. *Immunology*, 96(2), s.262–271.
- Ramoni, R. et al., 2002. Control of domain swapping in bovine odorant-binding protein. *The Biochemical journal*, 365(Pt 3), s.739–48.
- Ranganathan, S. et al., 1999. The whey acidic protein family: a new signature motif and three-dimensional structure by comparative modeling1. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 17(2), s.106–113.
- Ribieras, S., Tomasetto, C. & Rio, M.-C., 1998. The pS2/TFF1 trefoil factor, from basic research to clinical applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1378(1), s.F61–F77.
- Roberts, E.K. et al., 2012. A Bruce effect in wild geladas. *Science*, 335(6073), s.1222–1225.
- Roberts, S.A. et al., 2010. Darcin: a male pheromone that stimulates female memory and sexual attraction to an individual male's odour. *BMC biology*, 8(1), s.75.
- Roberts, S.A. et al., 2012. Pheromonal induction of spatial learning in mice. *science*, 338(6113), s.1462–1465.
- Robertson, D. et al., 1998. Ligands of Urinary Lipocalins from the Mouse: Uptake of Environmentally Derived Chemicals. *Journal of Chemical Ecology*, 24(7), s.1127–1140.
- Roelandt, T. et al., 2009. LEKTI-1 in sickness and in health. *International Journal of Cosmetic Science*, 31(4), s.247–254.
- Roldan, E.R.S., 1998. Role of phospholipases during sperm acrosomal exocytosis. *Frontiers in Bioscience*, 3(4), s.A348.
- Rowell, T.E., 1972. Female Reproduction Cycles and Social Behavior in Primates. *Advances in the Study of Behavior*, 4, s.69–105.
- Ryckman, C. et al., 2003. Proinflammatory Activities of S100: Proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 Induce Neutrophil Chemotaxis and Adhesion. *The Journal of Immunology*, 170(6), s.3233–3242.
- Sacks, G., Sargent, I. & Redman, C., 1999. An innate view of human pregnancy. *Immunology Today*, 20(3), s.114–119.
- Saito, K. et al., 2000. Molecular evidence of complex tissue- and sex-specific mRNA expression of the rat alpha(2u)-globulin multigene family. *Biochemical and biophysical research communications*, 272(2), s.337–344.
- Sato, I. et al., 2007. Seasonal Changes in Urinary Prostate-Specific Antigenic Activity in

- Male Japanese Macaques (*Macaca fusca fuscata*). *Journal of andrology*, 28(6), s.821–826.
- Scott, A., Weldon, S. & Taggart, C.C., 2011. SLPI and elafin: multifunctional antiproteases of the WFDC family. *Biochemical Society transactions*, 39(5), s.1437–40.
- Sebkova, N. et al., 2012. The slower the better: How sperm capacitation and acrosome reaction is modified in the presence of estrogens. *Reproduction*, 143(3), s.297–307.
- Setchell, J.M. et al., 2010. Chemical composition of scent-gland secretions in an Old World monkey (*Mandrillus sphinx*): Influence of sex, male status, and individual identity. *Chemical Senses*, 35(3), s.205–220.
- Shahan, K., Gilmartin, M. & Derman, E., 1987. Nucleotide sequences of liver, lachrymal, and submaxillary gland mouse major urinary protein mRNAs: mosaic structure and construction of panels of gene-specific synthetic oligonucleotide probes. *Molecular and cellular biology*, 7(5), s.1938–1946.
- Shaikh, A.A., 1971. Estrone and Estradiol Levels in the Ovarian Venous Blood from Rats During the Estrous Cycle and Pregnancy\*. *Biology of Reproduction*, 5(3), s.297–307.
- Sharrow, S.D. et al., 2002. Pheromone binding by polymorphic mouse major urinary proteins. , s.2247–2256.
- Shaw, J.L. V & Diamandis, E.P., 2007. Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids. *Clinical Chemistry*, 53(8), s.1423–1432.
- Shemesh, M. & Shore, L.S., 1987. Non-steroidal oestrogens of dietary origin: Activity, distribution and mechanism of action. *Isr. J. Vet. Med*, 43, s.192–197.
- Shore, L.S. & Bar-El Cohen, K., 2010. The environmental compartments of environmental hormones. *Reviews on environmental health*, 25(4), s.345.
- Shore, L.S. & Shemesh, M., 2016. Estrogen as an Environmental Pollutant. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 97(4), s.447–448.
- Schaefer, T.M. et al., 2005. Innate immunity in the human female reproductive tract: antiviral response of uterine epithelial cells to the TLR3 agonist poly(I:C). *Journal of Immunology*, 174(2), s.992–1002.
- Schaefer, T.M. et al., 2004. Toll-like receptor ( TLR ) expression and TLR-mediated cytokine / chemokine production by human uterine epithelial cells. *Immunology*, s.428–436.
- Schachter, M., 1979. Kallikreins (kininogenases)--a group of serine proteases with bioregulatory actions. *Pharmacological reviews*, 31(1), s.1–17.

- Singer, A.G. et al., 1976. Dimethyl disulfide: an attractant pheromone in hamster vaginal secretion. *Science*, 191(4230), s.948 LP-950.
- Singer, A.G. et al., 1984. Chemical studies of hamster vaginal discharge: effects of endocrine ablation and protein digestion on behaviorally active macromolecular fractions. *Physiology & behavior*, 33(4), s.639–643.
- Singer, A.G. et al., 1986. Purification and analysis of a proteinaceous aphrodisiac pheromone from hamster vaginal discharge. *Journal of Biological Chemistry*, 261(28), s.13323–13326.
- Singer, A.G. & Macrides, F., 1993. Composition of an aphrodisiac pheromone. *Chem. Senses*, 18, s.630.
- Smith, K.D., 2009. NIH Public Access. , 39(10), s.1776–1780.
- Snook, R.R., 2017. Sperm in competition: not playing by the numbers. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(1), s.46–53.
- Snowman, M. & Snyder, H., 1990. From Johns. , 265(11), s.6118–6125.
- Sohoni, P. & Sumpter, J.P., 1998. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *The Journal of endocrinology*, 158(3), s.327–339.
- Sørensen, O.E. et al., 2003. Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *The Journal of Immunology*, 170(11), s.5583–5589.
- Spinelli, S. et al., 1998. The Structure of the Monomeric Porcine Odorant Binding Protein Sheds Light on the Domain Swapping Mechanism. *Biochemistry*, 37(22), s.7913–7918.
- Spreyer, P. et al., 1990. Regeneration-associated high level expression of apolipoprotein D mRNA in endoneurial fibroblasts of peripheral nerve. *The EMBO journal*, 9(8), s.2479.
- Spungin, B., Margalit, I. & Breitbart, H., 1995. Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system: evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *Journal of cell science*, 108(6), s.2525–2535.
- Srikantan, S., Parekh, V. & De, P.K., 2005. cDNA cloning and regulation of two sex-hormone-repressed hamster tear lipocalins having homology with odorant/pheromone-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1729(3), s.154–165.
- Staskal, D.F. et al., 2005. Toxicokinetics of BDE 47 in female mice: Effect of dose, route of exposure, and time. *Toxicological Sciences*, 83(2), s.215–223.

- Stewart-Savage, J., 1993. Effect of Bovine Serum Albumin Concentration and Source on Sperm Capacitation in the Golden Hamster. *Biology of Reproduction*, 49(1), s.74–81.
- Stewart, F., Kennedy, M.W. & Suire, S., 2000. A novel uterine lipocalin supporting pregnancy in equids. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 57(10), s.1373–1378.
- Stopka, P. et al., 2016. On the saliva proteome of the Eastern European house mouse (*Mus musculus musculus*) focusing on sexual signalling and immunity. *Scientific Reports*, 6(1), s.32481.
- Stopka, P. & Macdonald, D.W., 1998. Signal Interchange During Mating in the Wood Mouse (*Apodemus Sylvaticus*): The Concept of Active and Passive Signalling. *Behaviour*, 135(2), s.231–249.
- Stopkova, R. et al., 2017. On the tear proteome of the house mouse (*Mus musculus musculus*) in relation to chemical signalling. *PeerJ*.
- Stopková, R. et al., 2014. Complementary roles of mouse lipocalins in chemical communication and immunity. *Biochemical Society transactions*, 42(4), s.893–8.
- Stopková, R. et al., 2016. Mouse Lipocalins (MUP, OBP, LCN) Are Co-expressed in Tissues Involved in Chemical Communication. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 4(April), s.47.
- Stopková, R. et al., 2009. Multiple roles of secretory lipocalins (Mup, Obp) in mice. *Folia Zoologica*, 58(SUPPL. 1), s.29–40.
- Stopková, R. et al., 2010. Novel OBP genes similar to hamster Aphrodisin in the bank vole, *Myodes glareolus*. *BMC genomics*, 11, s.45.
- Stopková, R. et al., 2007. Species-specific expression of major urinary proteins in the house mice (*Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus*). *Journal of Chemical Ecology*, 33(4), s.861–869.
- Stripp, B.R. et al., 1996. Clara cell secretory protein: a determinant of PCB bioaccumulation in mammals. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 271(4), s.L656 LP-L664.
- Strong, R., Akerstrom, B. & Borregaard, N., 2005. Siderocalins. *Lipocalins. Austin: Landes ...*, (Lipocalin 2), s.1–17.
- Surveyor, G.A. et al., 1995. Expression and steroid hormonal control of Muc-1 in the mouse uterus. *Endocrinology*, 136(8), s.3639–3647.
- Sutak, R. et al., 2008. Crusade for iron: iron uptake in unicellular eukaryotes and its

- significance for virulence. *Trends in Microbiology*, 16(6), s.261–268.
- Tabuchi, M. et al., 2013. Pheromone responsiveness threshold depends on temporal integration by antennal lobe projection neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(38), s.15455–60.
- Takasugi, N., 1988. Introduction: Abnormal Genital Tract Development in Mammals Following Early Exposure to Sex Hormones. *Toxicity of Hormones in Prenatal Life*, s.1–7.
- Tamura, K. et al., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28(10), s.2731–2739.
- Tang-Martinez, Z., Mueller, L.L. & Taylor, G.T., 1993. Individual odours and mating success in the golden hamster, *Mesocricetus auratus*. *Animal Behaviour*, 45(6), s.1141–1151.
- Tayama, K. et al., 2006. Measuring mouse sperm parameters using a particle counter and sperm quality analyzer: A simple and inexpensive method. *Reproductive Toxicology*, 22(1), s.92–101.
- Taylor, A.J., Cook, D.J. & Scott, D.J., 2008. Role of Odorant Binding Proteins: Comparing Hypothetical Mechanisms with Experimental Data. *Chemosensory Perception*, 1(2), s.153–162.
- Tegoni, M. et al., 1996. Domain swapping creates a third putative combining site in bovine odorant binding protein dimer. *Nature structural biology*, 3(10), s.863–7.
- Tegoni, M. et al., 2000. Mammalian odorant binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1482(1–2), s.229–240.
- Tesarik, J., Moos, J. & Mendoza, C., 1993. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by a progesterone receptor on the cell surface of human sperm. *Endocrinology*, 133(1), s.328–335.
- Thomas S, 1928. Döderlein's bacillus: *Lactobacillus acidophilus*. *The Journal of Infectious Diseases*, (43), s.218–227.
- Tourmente, M., Gomendio, M. & Roldan, E.R., 2011. Sperm competition and the evolution of sperm design in mammals. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), s.12.
- Turner, J. et al., 1998. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(9), s.2206–2214.
- Urade, Y., Eguchi, N. & Hayaishi, O., 2013. Lipocalin-type prostaglandin D synthase as an

enzymic lipocalin.

- Use, S., 1980. *Microtus pennsylvanicus*. , 71, s.65–71.
- Valtonen-André, C. et al., 2005. Ejaculates from the common marmoset (*Callithrix jacchus*) contain semenogelin and beta-microseminoprotein but not prostate-specific antigen. *Molecular reproduction and development*, 71(2), s.247–255.
- Vandenbergh, J.G., Whitsett, J.M. & Lombardi, J.R., 1975. Partial isolation of a pheromone accelerating puberty in female mice. *Journal of Reproduction and Fertility*, 43(3), s.515–523.
- Vidic, J. et al., 2008. On a chip demonstration of a functional role for Odorant Binding Protein in the preservation of olfactory receptor activity at high odorant concentration. *Lab on a chip*, 8(5), s.678–688.
- Vigil, P., Toro, A. & Godoy, A., 2008. Physiological action of oestradiol on the acrosome reaction in human spermatozoa. *Andrologia*, 40(3), s.146–151.
- Visconti, P.E., Bailey, J.L., et al., 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development (Cambridge, England)*, 121(4), s.1129–37.
- Visconti, P.E., Moore, G.D., et al., 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development*, 121(4), s.1139–1150.
- Visconti, P.E. et al., 1999. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Developmental biology*, 214(2), s.429–443.
- Visconti, P.E., 2009. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(3), s.667–668.
- Walensky, L.D. & Snyder, S.H., 1995. Inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *The Journal of cell biology*, 130(4), s.857–869.
- Wallis, J., 1985. Synchrony of estrous swelling in captive group-living chimpanzees (*Pan troglodytes*). *International Journal of Primatology*, 6(3), s.335–350.
- Whitacre, C.C. et al., 1999. A Gender Gap in Autoimmunity. *Science*, 283(5406), s.1277 LP-

1278.

- Whitacre, C.C., 2001. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol*, 2(9), s.777–780.
- Whitten, W.K., Bronson, F.H. & Greenstein, J.A., 1968. Estrus-Inducing Pheromone of Male Mice: Transport by Movement of Air. *Science*, 161(3841), s.584 LP-585.
- Wilder, R.L., 1998. Hormones, pregnancy, and autoimmune diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 840, s.45–50.
- Williams, S.E. et al., 2005. SLPI and elafin: one glove, many fingers. *Clinical Science*, 110(1), s.21 LP-35.
- Wira, C.R., Grant-Tschudy, K.S. & Crane-Godreau, M.A., 2005. Epithelial cells in the female reproductive tract: a central role as sentinels of immune protection. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)*, 53(2), s.65–76.
- Wu, W.K.K. et al., 2010. Cathelicidins in inflammation and tissue repair: Potential therapeutic applications for gastrointestinal disorders. *Acta pharmacologica Sinica*, 31(9), s.1118–22.
- Yamasaki, K. et al., 2006. Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. *Faseb J*, 20(12), s.2068–2080.
- Yanagimachi, R., 1994. Mammalian fertilization. *The physiology of reproduction*, 1, s.189–317.
- Yang, T. et al., 2004. Epidermal detachment, desmosomal dissociation, and destabilization of corneodesmosin in Spink5<sup>-/-</sup> mice. *Genes and Development*, 18(19), s.2354–2358.
- Yip, K.S. et al., 2013. Changes in mouse uterine transcriptome in estrus and proestrus. *Biology of reproduction*, 89(1), s.13.
- Yoon, H. et al., 2007. Activation profiles and regulatory cascades of the human kallikrein-related peptidases. *Journal of Biological Chemistry*, 282(44), s.31852–31864.
- Yousef, G.M. & Diamandis, E.P., 2002. Human tissue kallikreins: A new enzymatic cascade pathway? *Biological Chemistry*, 383(7–8), s.1045–1057.
- Yousef, G.M. & Diamandis, E.P., 2001. The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocrine reviews*, 22(February), s.184–204.
- Yvonne Olsson, A. & Lundwall, Å., 2002. Organization and evolution of the glandular kallikrein locus in *Mus musculus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 299(2), s.305–311.

- Zahl, P.A. & Bjerknes, C., 1943. Induction of Decidua-Placental Hemorrhage in Mice by the Endotoxins of Certain Gram-Negative Bacteria. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 54(3), s.329–332.
- Zhou, T. et al., 2016. Estrogen accelerates cutaneous wound healing by promoting proliferation of epidermal keratinocytes via Erk/Akt signaling pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 38(3), s.959–968.
- Zhou, Y., Jiang, L. & Rui, L., 2009. Identification of MUP1 as a regulator for glucose and lipid metabolism in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 284(17), s.11152–11159.

## **5. Přílohy**