

Souhrn

Různé druhy hlodavců se liší způsobem života, párovacími systémy a liší se i v morfologii spermií. U hlodavců se vyskytují různé úrovně kompetice spermií. Obecně u živočichů se má za to, že díky kompetici spermií dochází k prodlužování bičků spermií. Jak přesně působí kompetice spermií u hlodavců? Druhově specifický sexuální výběr může optimalizovat morfologii spermií. Fyziologii, morfologii a kompetici spermií mohou ovlivňovat i environmentální faktory.

Disertační práce byla zaměřena na reprodukční strategie hlodavců na úrovni spermií a to na základě morfologických a behaviorálních vlastností spermií. Práce obsahuje tři publikace (včetně jednoho odeslaného rukopisu) a v příloze jeden článek, který okrajově souvisí s tématem práce.

Morfologie spermií u hlodavců hraje důležitou roli v kompetici spermií. Delší bičky a apikální háčky jsou u druhů s relativně většími varlaty a vyšším procentem násobného otcovství (multiple paternity), tedy u druhů s vyšší mírou promiskuity a vyšší mírou kompetice spermií. Jedním z cílů bylo zjistit vztahy délky apikálních háčků a bičků spermií a variability v těchto znacích s relativní hmotností varlat. Výsledky této práce ukázaly, že průkazně delší apikální háčky byly u druhů s vyšší relativní hmotností varlat (tzn. vyšší mírou kompetice spermií), což poukázalo na usměrňující výběr na fenotyp spermií. Zvýšená míra kompetice spermií vedla ke snížení variability v délce apikálních háčků, což nasvědčuje na stabilizující výběr.

Další studie byla zaměřena na změny úhlů zahnutí apikálních háčků spermií v závěrečné fázi spermiogeneze a ve fázi před oplodněním. Průběh změn zahnutí byl opačný u myšic (*Apodemus sylvaticus* a *A. agrarius*) v porovnání s myší (*Mus musculus*). U myšic se značně lišily úhly u dormantních a aktivních spermií. U všech druhů, ve všech stádiích byl zjištěn velký rozsah hodnot úhlů zahnutí, z tohoto pohledu se jeví měření úhlů pro hodnocení míry kompetice spermií méně vhodné než měření délky apikálních háčků. Rozsah hodnot úhlů ukázal na míru flexibility apikálních háčků.

Cílem další studie bylo zjistit vliv účinku fluoridových iontů a fluorohlinitanových komplexů u myší na spermatogenezi *in vivo* a na kapacitaci spermií *in vitro*. Zjistili jsme, že zvýšená koncentrace iontů vedla ke snížení úrovně spermatogeneze, kvalitativnímu ovlivnění morfologické struktury tkáně varlat a ovlivnění schopnosti spermií úspěšně podstoupit kapacitaci.

Téma článku v příloze bylo zaměřeno na proteiny, které se podílejí na pachové (chemické) komunikaci u hlodavců a mohou ovlivňovat různé biologické procesy, včetně kompetice spermií.

1. Působení kompetice spermií na variabilitu v délkách apikálních háčků a bičků

Šandera M., Albrecht T., Stopka P., 2011: Variation in apical hook length reflects the intensity of post-copulatory sperm competition in murine rodents. Submitted to *Evolutionary Ecology*.

Post-kopulační sexuální výběr ovlivňuje morfologii spermií. U promiskuitních druhů se může projevovat usměrňující i stabilizující selekce. Jedním z cílů bylo zjistit vztahy délky apikálních háčků a bičků spermií a variability v těchto znacích s relativní hmotností varlat. Výsledky této práce ukázaly, že průkazně delší apikální háčky byly u druhů s vyšší relativní hmotností varlat (tzn. vyšší mírou kompetice spermií), což poukázalo na usměrňující výběr na fenotyp spermií. Zvýšená míra kompetice spermií vedla ke snížení variability v délce apikálních háčků, což nasvědčuje na stabilizující výběr. Druhově specifické sexuální výběr může optimalizovat morfologii spermií.

2. Změny pozic zahnutí apikálních háčků spermií

Šandera M., Andrlíková P., Frolíková M., Stopka P., 2011: Changes in the curvature of sperm apical hooks in murine rodents. *Biologia*: in press.

Apikální háčky spermií hlodavců hrají důležitou roli v kompetici spermií. Apikální háčky jsou více zahnuté a delší u druhů s vyšší mírou kompetice spermií. Spermiie mohou tvořit shluky „vláčky“, které se mohou pohybovat rychleji než jednotlivé spermiie, a tím dosáhnout vajíčka dříve. Apikální háček je důležitý pro zapojování se do vláček. Tato studie byla zaměřena na změny v délce a v zahnutí apikálních háčků v závěrečné fázi spermiogeneze a fázi před oplodněním. Délky apikálních háčků zůstávají mezi jednotlivými stádii bez výrazných změn. Průběh změn zahnutí byl opačný u myšic (*Apodemus sylvaticus* a *A. agrarius*) v porovnání s myší (*Mus musculus*). U myšic se značně lišily úhly u dormantních a aktivních spermií. U všech druhů, ve všech stádiích byl zjištěn velký rozsah hodnot úhlů zahnutí, z tohoto pohledu se jeví měření úhlů pro hodnocení míry kompetice spermií méně vhodné než měření délky apikálních háčků. Rozsah hodnot úhlů ukázal na míru flexibility apikálních háčků.

5. Conferences

10th Ordinary General Meeting of *Societas Europaea*

Herpetologica, 6.-10.9. 1999 Irakleio, poster and abstract: Šandera M., 1999: *Rana arvalis wolterstorffi* in context of variation of the species. In: Mylonas et al. (eds.): Book of Abstracts, 10th OGM SEH. Natural History Museum of Crete: 232 – 234.

De Agamis - 1st International Symposium on Agamid Lizards, 22.-24.2. 2008 Bonn, oral presentation and abstract: Šandera M., Starostová Z., 2008: A record of Asian Agama of the Genus *Calotes* in Kenya. Book of Abstracts, 1st International Symposium on Agamid Lizards – De Agamis, Zoologisches Forschungsmuseum Alexander Koenig, Bonn, Germany.

Central European Meeting on Mouse Epigenetics, 5.-7.11. 2009 Nové Hradky, oral presentation: Šandera M., Stopka P.: Variation in the curvature of sperm apical hooks in murine rodents.

The Central European Meeting on Genes, Gene Expression and Behaviour, 4.-7.11. 2010 Hrubá Skála, oral presentation and abstract: Šandera M., Albrecht T., Stopka P.: Murine rodent sperm and promiscuity limit.

6. Grant projects

Ecological processes in the evolution of model groups of organisms (MSMT 0021620828) 2005 – 2011, member of research team

Social Modulation: genetic variability of mice in a social context (GA CR 206/07/077) 2007 – 2009, member of research team

Unique adaptations of sperm represent specific reproductive strategies in the family Muridae (GA CAS KJB601110923) 2009 – 2010, co-investigator

Gene expression and gene copy number of significant behavioral-mammalian genes (GA CAS IAA601110908) 2009 – 2013, member of research team

4. Other selected publications

Šandera M., Jeřábková L., Kučera Z., 2008: *Rana arvalis* in the Czech Republic: Recent occurrence and surveillance problems. In: Glandt D., Jehle R. (Hrsg.): Der Moorfrosch/The Moor Frog. Zeitschrift für Feldherpetologie, Supplement 13: 249 – 254.

Roček Z., **Šandera M.**, 2008: Distribution of *Rana arvalis* in Europe: a historical perspective. In: Glandt D., Jehle R. (Hrsg.): Der Moorfrosch/The Moor Frog. Zeitschrift für Feldherpetologie, Supplement 13: 135 – 150.

Šandera M., Starostová Z., 2009: A record of Asian agama of the genus *Calotes* Cuvier, 1817 (Squamata: Agamidae) in Kenya. Bonner zoologische Beiträge 56 (4): 225 – 228.

Brejcha J., Miller V., Jeřábková L., **Šandera M.**, 2009: Výskyt *Trachemys scripta* na území České republiky (Distribution of pond slider (*Trachemys scripta*) in the Czech Republic – English summary). Herpetologické informace 8: 14 – 29.

3. Vliv fluoridů na kapacitaci myších spermií

Dvořáková-Hortová K., **Šandera M.**, Jursová M., Vašinová J., Pěkníková J., 2008: The influence of fluorides on mouse sperm capacitation. Animal Reproduction Science 108 (1-2): 157 – 170.

Zvyšující se neplodnost v důsledku patologických změn spermií je čím dál tím častější. Eko-toxikologické účinky fluoridů mohou být zvýšeny v přítomnosti iontů hliníku tím, že vytvoří fluorohlinitanové komplexy, které narušují činnost G-proteinů a P-ATPáz, které jsou součástí některých signálních drah během maturace a kapacitace spermií (procesů důležitých pro fertilizační schopnost spermií). Tato práce byla zaměřena na zjišťování působení fluoridových iontů a iontů hliníku na spermatogenezi a na kvalitu spermií savců (laboratorních myší). Zmiňované ionty se vyskytují v látkách přítomných v životním prostředí. Po tříměsíčním působení fluoridů v koncentracích 0, 1, 10 a 100 ppm a paralelním synergickém působení s hliníkovými ionty v dávce 10 ppm nebyly zjištěny žádné úhyny a viditelné ovlivnění kondice. Koncentrace fluoridů 10 a 100 ppm se projeví ve snížení spermatogeneze *in vivo* a snížení fertilizačních schopností spermií *in vitro*. Zvýšené dávky fluoridů představují potenciální riziko tím, že ovlivňují spermatogenezi a fyziologii spermií, a tím mohou přispět k rostoucí neplodnosti.

Životopis

Jméno:	Martin Šandera
Místo a datum narození:	Jičín, Česká republika, 1. 8. 1976
Adresa pracoviště:	Katedra zoologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Viničná 7, Praha 2, 128 44
Vzdělání:	
2003 – současnost:	postgraduální studium, obor: zoologie, katedra zoologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
1994 – 2001:	magisterské studium, obor: biologie, specializace: zoologie obratlovců, katedra zoologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Diplomová práce: <i>Rana arvalis wolterstorffi</i> v kontextu variability druhu
Zaměstnání:	
	asistent a vědecký pracovník, katedra zoologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
	pracovník Muzea přírody Český ráj, Prachov, Jičín
Navštívené kurzy:	
2005	Kurz pro získání způsobilosti k provádění experimentů na zvířatech podle § 17 zákona ČNR č. 246/1992 Sb., Ministerstvo zemědělství, Praha, Česká republika.

Bibliography

1. Publications in peer reviewed international journals

Babik W., Branicki W., **Šandera M.**, Litvinchuk S., Borkin L. J., Irwin J. T., Rafinski J., 2004: Mitochondrial phylogeography of the moor frog, *Rana arvalis*. *Molecular Ecology* 13 (6), 1469–1480.

Dvořáková-Hortová K., **Šandera M.**, Jursová M., Vašinová J., Pěkníková J., 2008: The influence of fluorides on mouse sperm capacitation. *Animal Reproduction Science* 108 (1-2): 157 – 170.

Stopková R., Zdráhal Z., Ryba Š., Šedo O., **Šandera M.**, Stopka P., 2010: Novel OBP genes similar to hamster Aphrodisin in the bank vole, *Myodes glareolus*. *BMC Genomics* 11:45

Šandera M., Andrlíková P., Frolíková M., Stopka P., 2011: Changes in the curvature of sperm apical hooks in murine rodents. *Biologia*: in press.

2. Manuscripts under revision

Šandera M., Albrecht T., Stopka P., 2011: Variation in apical hook length reflects the intensity of post-copulatory sperm competition in murine rodents. Submitted to *Evolutionary Ecology*.

3. Manuscripts currently in preparation

Hortová K., **Šandera M.**, Šebková N., Albrecht T., 2011: Assessment of testicular function by histometric analyses in fluoride exposed mice: in prep.

Andrlíková P., **Šandera M.**, Stopka P., 2011: *Apodemus* sperm are protected against complement-mediated damage by expression of CD55 and CD59 in the absence of CD46: in prep.

Curriculum Vitae

Name: Martin Šandera

Born: Jičín, Czech Republic, 1st August 1976

Work address: Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 7, Prague 2, CZ-128 44, Czech Republic

Education:
2003 – present: Ph.D. studies in zoology, Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University in Prague
1994 – 2001: M.Sc. studies: biology – vertebrate zoology, thesis: *Rana arvalis wolterstorffi* in context of the species variability. Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University in Prague.

Present position: assistant and researcher, Department of Zoology, Faculty of Sciences, Charles University in Prague.
researcher, Museum of Nature 'Bohemian Paradise', Prachov, Jičín

Attended courses:
2005 Acquisition of the licence for conducting experimental work on vertebrates in accordance with Czech legal requirements, Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Prague, Czech Republic.

Bibliografie

1. Publikace v recenzovaných časopisech s IF

Babik W., Branicki W., Šandera M., Litvinchuk S., Borkin L. J., Irwin J. T., Rafinski J., 2004: Mitochondrial phylogeography of the moor frog, *Rana arvalis*. *Molecular Ecology* 13 (6), 1469–1480.

Dvořáková-Hortová K., Šandera M., Jursová M., Vašinová J., Pěkníková J., 2008: The influence of fluorides on mouse sperm capacitation. *Animal Reproduction Science* 108 (1-2): 157 – 170.

Stopková R., Zdráhal Z., Ryba Š., Šedo O., Šandera M., Stopka P., 2010: Novel OBP genes similar to hamster Aphrodisin in the bank vole, *Myodes glareolus*. *BMC Genomics* 11:45

Šandera M., Andrlíková P., Frolíková M., Stopka P., 2011: Changes in the curvature of sperm apical hooks in murine rodents. *Biologia*: in press.

2. Publikace v recenzním řízení

Šandera M., Albrecht T., Stopka P., 2011: Variation in apical hook length reflects the intensity of post-copulatory sperm competition in murine rodents. Submitted to *Evolutionary Ecology*.

3. Aktuálně připravované publikace

Hortová K., Šandera M., Šebková N., Albrecht T., 2011: Assessment of testicular function by histometric analyses in fluoride exposed mice: in prep.

Andrlíková P., Šandera M., Stopka P., 2011: *Apodemus* sperm are protected against complement-mediated damage by expression of CD55 and CD59 in the absence of CD46: in prep.

4. Ostatní vybrané publikace

Šandera M., Jeřábková L., Kučera Z., 2008: *Rana arvalis* in the Czech Republic: Recent occurrence and surveillance problems. In: Glandt D., Jehle R. (Hrsg.): Der Moorfrosch/The Moor Frog. Zeitschrift für Feldherpetologie, Supplement 13: 249 – 254.

Roček Z., Šandera M., 2008: Distribution of *Rana arvalis* in Europe: a historical perspective. In: Glandt D., Jehle R. (Hrsg.): Der Moorfrosch/The Moor Frog. Zeitschrift für Feldherpetologie, Supplement 13: 135 – 150.

Šandera M., Starostová Z., 2009: A record of Asian agama of the genus *Calotes* Cuvier, 1817 (Squamata: Agamidae) in Kenya. Bonner zoologische Beiträge 56 (4): 225 – 228.

Brejcha J., Miller V., Jeřábková L., Šandera M., 2009: Výskyt *Trachemys scripta* na území České republiky (Distribution of pond slider (*Trachemys scripta*) in the Czech Republic – English summary). Herpetologické informace 8: 14 – 29.

angle values point to a level of flexibility of the apical hooks. The lengths of sperm hooks in individual species do not change during particular stages. The length and flexibility of the sperm apical hooks are important for the formation of sperm aggregations, thus these sperm characters indicate the risk of sperm competition and the sperm strategies in murine rodents.

3. Dvořáková-Hortová K., Šandera M., Jursová M., Vašinová J., Pěkníková J., 2008: The influence of fluorides on mouse sperm capacitation. Animal Reproduction Science 108 (1-2): 157 – 170.

Increasing infertility, due to pathological changes on sperm, has become a serious issue. Eco-toxicological effect of rising concentration of fluorides can be enhanced in the presence of aluminium ions by forming fluorometallic complexes, analogues of phosphate groups that interfere with the activity of G-proteins and P-typeATPases, which are part of several signalling pathways during sperm maturation. In order for sperm to gain fertilizing ability, they must undergo in the female reproductive tract, capacitation that includes tyrosine phosphorylation and consequent actin polymerization. The present paper reports the findings of 3-month oral toxicity in mice of fluorides at the concentrations 0, 1, 10, and 100 ppm and their synergic action with aluminium at dose of 10 ppm. There were no mortalities, clinical signs of discomfort or body weight loss during the experiment. The analysis revealed, for the concentrations of 10 and 100 ppm, abnormalities of spermatogenesis and ability of epididymal spermatozoa to capacitate *in vitro*, as the result of decreased sperm head tyrosine phosphorylation and actin polymerization. The enhancing overload caused by fluorides represents a potential factor, having an impact on function of sperm, hence contributing to a growing infertility in the human population.

1. **Šandera M.**, Albrecht T., Stopka P., 2011: Variation in apical hook length reflects the intensity of post-copulatory sperm competition in murine rodents. Submitted to *Evolutionary Ecology*.

Post-copulatory sexual selection has been shown to shape morphology of male gametes. Both directional and stabilizing selection on sperm phenotype have been documented in vertebrates in response to sexual promiscuity. Here we investigated the degree of variance in apical hook length and tail length in six taxa of murine rodents. Tail sperm length and apical hook length were positively associated with relative testis mass, our proxy for levels of sperm competition, thus indicating directional post-copulatory selection on sperm phenotypes. Moreover, our study shows that increased levels of sperm competition lead to the reduction of variance in the hook length, indicating stabilizing selection. Hence, the higher risk of sperm competition affects increasing hook length together with decreasing variance in the hook length. Species-specific post-copulatory sexual selection likely optimizes sperm morphology.

2. **Šandera M.**, Andrlíková P., Frolíková M., Stopka P., 2011: Changes in the curvature of sperm apical hooks in murine rodents. *Biologia*: in press.

Sperm apical hooks in murine rodents play an important role in sperm competition. Apical hooks are more curved and longer in species with relatively larger testes, that is in species with a higher risk of sperm competition. The sperm can form aggregations, 'trains', that can move faster than individual sperm, thus reaching the egg earlier as was observed in *Apodemus sylvaticus*. The apical hook plays an important role for train formation. This study focuses on the changes in the curvature of sperm apical hooks during the final stages of spermiogenesis and stages before fertilization (sperm-life span). Apical hook curvatures of field mice (*A. agrarius* and *A. sylvaticus*) vary significantly between dormant and active sperm. In contrast, there are no significant differences among the stages in the eastern house mouse. Since there are high ranges of angle values in all stages, the mean angles of apical hook curvature are not appropriate for evaluating risk of sperm competition. The ranges of

5. Účast na konferencích

10th Ordinary General Meeting of *Societas Europaea Herpetologica*, 6.-10.9. 1999 Irakleio, poster a abstrakt: Šandera M., 1999: *Rana arvalis wolterstorffi* in context of variation of the species. In: Mylonas et al. (eds.): Book of Abstracts, 10th OGM SEH. Natural History Museum of Crete: 232 – 234.

De Agamis - 1st International Symposium on Agamid Lizards, 22.-24.2. 2008 Bonn, přednáška a abstrakt: Šandera M., Starostová Z., 2008: A record of Asian Agama of the Genus *Calotes* in Kenya. Book of Abstracts, 1st International Symposium on Agamid Lizards – De Agamis, Zoologisches Forschungsmuseum Alexander Koenig, Bonn, Germany.

Central European Meeting on Mouse Epigenetics, 5.-7.11. 2009 Nové Hradky, přednáška: Šandera M., Stopka P.: Variation in the curvature of sperm apical hooks in murine rodents.

The Central European Meeting on Genes, Gene Expression and Behaviour, 4.-7.11. 2010 Hrubá Skála, přednáška a abstrakt ve sborníku abstraktů: Šandera M., Albrecht T., Stopka P.: Murine rodent sperm and promiscuity limit.

6. Grantové projekty

Ekologické procesy v evoluci modelových skupin organismů (Výzkumný záměr MŠMT 0021620828) 2005 – 2011, člen řešitelského týmu

Sociální modulace: genetická proměnlivost myší v sociálním kontextu (GA ČR 206/07/077) 2007 – 2009, člen řešitelského týmu

Jedinečné adaptace spermií představují specifické reprodukční strategie u čeledi Muridae (GA AV KJB601110923) 2009 – 2010, spoluřešitel

Genová exprese a počet genových kopií u etologicky významných savčích genů (GA AV IAA601110908) 2009 – 2013, člen řešitelského týmu

Obojživelníci, plazi a lidé (SFŽP 00041062) 2010 – 2012, hlavní řešitel

Summary

Rodents exhibit diverse biology, mating systems and diverse sperm morphology. Different levels of sperm competition have therefore been found in this group. Generally, it is accepted that sperm competition in animals causes the prolongation of sperm tails. However, what other sperm morphological adaptations in rodents are affected by sperm competition? Species-specific sexual selection likely optimizes sperm morphology. Sperm physiology, morphology and competition may be influenced, ultimately, by environmental factors.

This Ph.D. thesis focuses on sperm competition in murine rodents. The thesis contains three research articles (including one as a submitted manuscript). In addition, another published article, partially related to the topic of this thesis, is represented in the Appendix.

The sperm morphology in rodents plays an important role in sperm competition. Longer tails and apical hooks are usually found in the species with relatively larger testes and with higher percentage of multiple paternity (i.e. rate of promiscuity), that is in species with the higher risk of sperm competition. The goal of the first study was to investigate the relationships between relative testis weight and sperm traits (apical hook and tail lengths and variance in this traits). The apical hook length was positively associated with relative testis mass thus indicating directional post-copulatory selection on sperm phenotypes. Moreover, our study shows that increased levels of sperm competition lead to the reduction of variance in the hook length, indicating stabilizing selection.

The second study focused on the changes in the curvature of sperm apical hooks during the final stages of spermiogenesis and stages before fertilization. Apical hook curvatures of field mice (*Apodemus agrarius* and *A. sylvaticus*) varied significantly between dormant and active sperm. In contrast, there was no significant difference among the stages in the eastern house mouse (*Mus musculus*). Since there are high ranges of angle values in all stages, the mean angles of apical hook curvature are not appropriate for evaluating the risk of sperm competition, though the ranges of angle values point to the level of flexibility of the apical hooks.

The objective of third study was to investigate the *in vivo* effect of fluoride and aluminium ions in mice on spermatogenesis and on capacitation *in vitro*. We found that the exposure of mice to an

increased concentration of ions resulted in a decreased level of spermatogenesis, qualitatively affected the morphological structure of the testicular tissue and modified the ability of mouse sperm to successfully undergo capacitation.

The paper in the Appendix is related to proteins that are involved in chemical communication in rodents and may have some impact on biological processes, including sperm competition.