# UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie

**Mechanismy přenosu chemických signálů u myšic rodu *Apodemus***

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Bc. Leona Havrdová**

Vedoucí práce: Mgr. Romana Stopková, Ph.D.

Konzultant: doc. Mgr. Pavel Stopka, Ph.D.

Praha, 2014

**Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci „Mechanismy přenosu chemických signálů u myšic rodu *Apodemus*“ vypracovala samostatně pod odborným dohledem Mgr. Romany Stopkové, Ph.D. a doc. Pavla Stopky, Ph.D. a s použitím literatury uvedené na konci práce. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 12. 8. 2014

Podpis

**Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala především své školitelce Romaně Stopkové za její odborné rady, trpělivost během vedení magisterského studia a ochotu kdykoliv konzultovat výsledky. Nemohu opominout Pavla Stopku, bez jehož podnětných nápadů a dohledu by tato práce nemohla vzniknout. Za analýzu proteinů děkuji Zbyňkovi Zdráhalovi.

Moc děkuji Davidovi Vinklerovi, Petrovi Klemptovi, Báře Dudkové, Martině Černé, Lucce Obstové, Honzovi Suchanovi, Karolíně Klinovské a Lucce Novákové, kteří se podíleli nejen na experimentech nebo terénních odchytech, ale také příjemných posezení v Mrtvé Rybě.

Děkuji také Lence Bulvové, Ludmile Pospíšilové a Heleně Uhlířové, a to nejen za pomoc v laboratoři, ale především za jejich přátelský a pozitivní přístup.

V neposlední řadě děkuji své rodině a příteli Tomášovi Adámkovi za to, že tu pro mne jsou.

# Obsah

Obsah ..... 4
Abstrakt ..... 5
Seznam použitých zkratek ..... 7
1. Úvod k chemické komunikaci ..... 8
2. Chemické signály ..... 10
3. Lipokaliny ..... 12
3.1. Struktura lipokalinů ..... 12
3.1.1. Lipokaliny s funkcí v chemické komunikaci ..... 15
3.1.1.1. Hlavní močové proteiny (MUPs) ..... 15
3.1.1.2. Informační charakter MUPs ..... 16
3.1.1.3. $\alpha_{2u}$- globuliny ..... 20
3.1.1.4. Slinný lipokalin (SAL1) ..... 20
3.1.2. Další lipokaliny s možnou účastí v chemické komunikaci ..... 21
3.1.2.1. Odoranty vázající proteiny (OBPs) ..... 21
3.1.2.2. Lipokalin 3 a 4 (Vomeronasal secretory protein 1 a 2) ..... 23
4. Cílová tkáň ..... 24
4.1. Vomeronasální orgán a hlavní čichový systém ..... 24
4.1.1. Vomeronasální orgán (VNO) ..... 24
4.1.2. Hlavní čichový systém (MOS) ..... 25
4.1.3. Další čichové subsystémy ..... 26
5. Ekologie a etologie myšic rodu *Apodemus* ..... 27
6. Materiál a metody ..... 29
6.1. Materiál ..... 29
6.2. Metody ..... 32
6.2.1. Čipová gelová elektroforéza (Experion) ..... 32
6.2.2. 2D – elektroforéza ..... 34
6.2.3. Vyhodnocení 2D gelů ..... 36
7. Výsledky ..... 39
7.1. Analýza proteinového složení moči a slin ..... 39
7.2. Kvantitativní analýza proteinů obsažených ve slinách ..... 41
7.3. Identifikace proteinů ..... 42
8. Diskuze a závěr ..... 44
9. Seznam citované literatury ..... 47
10. Seznam příloh ..... 55
Příloha 1: Virtuální gely ..... 55

# Abstrakt

Proteiny z rodiny lipokalinů zaujímají významnou roli při přenosu chemických signálů. Tyto globulární proteiny o molekulové hmotnosti 17,7 – 21,7 kDa jsou schopny vázat široké spektrum těkavých ligandů a svou postupnou degradací prodlužují účinek pachové stopy. Mezi lipokaliny řadíme Hlavní močové proteiny (angl. Major urinary proteins - MUPs), k jejichž expresi dochází především v moči. U myší se MUPs uplatňují při olfaktorické komunikaci. Zdrojem chemických signálů však nemusí být pouze moč. Mnohé druhy savců prezentují chemické signály slinami do srsti v procesu hygienického chování (tzv. selfgrooming). Cílem této diplomové práce bylo identifikovat hlavní bílkoviny účastnící se chemické komunikace u myšic rodu *Apodemus* a určit hlavní zdroj jejich exkrece (moč/sliny). S využitím čipové gelové elektroforézy (Experion) byla vyloučena přítomnost lipokalinů v moči dvou druhů myšic (*A. uralensis*, *A. sylvaticus*). 2D elektroforézou slinných proteinů a jejich identifikací pomocí hmotnostní spektrometrie (MALDI MS/MS) byla vyhodnocena kvantita a typy lipokalinů u tří zástupců myšic rodu *Apodemus* (*A. uralensis*, *A. sylvaticus* a *A. flavicollis*). Výsledky mezidruhového srovnání naznačují, že socialita (t.j. intenzita samčí kompetice o samice) je v přímé souvislosti s evolucí chemických signálů.

**Klíčová slova**: chemická komunikace, lipokaliny, *Apodemus*, MUP, OBP

# Abstract

Proteins from the lipocalin family play significant roles during the transport of chemical signals. These globular proteins (molecular mass: 17,7 - 21,7 kDa) are able to bind a wide spectrum of volatile ligands. Since they decay continuously, the scent impact is prolonged. Major urinary proteins (MUPs) are lipocalins, typically found in the urine and used during olfactory communication in the house mouse. But the urine is not the only source of chemical signals. Many species of mammals perform selfgrooming – a technique in which saliva is transported into the fur. The goal of the thesis is to identify main proteins that are involved in chemical communication by selected species of the genus *Apodemus*, and to discover the source of production (i.e. saliva or urine). The Experion capillary electrophoresis system was used to confirm the absence of lipocalins in the urine in two *Apodemus* species (*A. uralensis*, *A. sylvaticus*). Furthermore, a lot of lipocalins is present in the saliva of above-mentioned species. The quantity and types of salivary lipocalins was identified by 2D electrophoresis along with mass spectrometry analyses (MALDI MS/MS) in three species of the genus *Apodemus* (*A. uralensis*, *A. sylvaticus* and *A. flavicollis*). The conclusion of this inter-specific comparison suggests, that sociality (i.e. male-male competition for females) has driven the evolution of chemical communication.

**Key words**: chemical communication, lipocalins, *Apodemus*, MUP, OBP

# Seznam použitých zkratek

| Zkratka | Anglicky/v latině | Český ekvivalent |
|---|---|---|
| **ABP** | Androgen-binding protein | Protein vázající androgen |
| **AF** | Apodemus flavicollis | Myšice lesní |
| **AOB** | Acessory olfactory bulb | Vedlejší čichový lalok |
| **AS** | Apodemus sylvaticus | Myšice křovinná |
| **AU** | Apodemus uralensis | Myšice malooká |
| **cAMP** | Cyclic adenosine monophosphate | Cyklický adenosinmonofosfát |
| **FABP** | Fatty-acid-binding protein | Proteiny vázajícími mastné kyseliny |
| **GG** | Grüneberg ganglion | Grünebergův ganglion |
| **GPCR** | G-protein coupled receptor | Receptorů spřažený s G-proteinem |
| **GS** | Gel stain | Gel s fluorescenční barvou |
| **IAA** | Iodoacetamide | Iodacetamid |
| **IEF** | Isoelectric focusing | Izoelektrická fokusace |
| **LDL** | Low density lipoprotein | Lipoprotein o nízké hustotě |
| **MOB** | Main olfactory bulb | Hlavní čichový lalok |
| **MOE** | Main olfactory epithelum | Hlavní čichová sliznice |
| **MOS** | Main olfactory systém | Hlavní čichový systém |
| **MPI** | Metalloproteinase inhibitors | Metaloproteinázové inhibitory |
| **MUP sg. /MUPs pl.** | Major urinary protein | Hlavní močový protein |
| **OBP sg. /OBPs pl.** | Odorant-binding protein | Odorant vázající protein |
| **OSN sg./OSNs** | Olfactory sensory neuron | Čichový senzorický neuron |
| **SCR sg. / SCRs pl.** | Structurally conserved protein region | Strukturně konzervovaný region proteinu |
| **SDS** | Sodium dodecyl sulfate | Dodecylsíran sodný |
| **SOM** | Septal organ of Masera | Septální orgán Masera |
| **VNO** | Vomeronasal organ | Vomeronasální orgán |
| **VNS** | Vomeronasal system | Vomeronasální systém |
| **VNSP** | Vomeronasal secretory protein | |

# 1. Úvod k chemické komunikaci

U terestrických živočichů došlo k vytvoření specializovaných orgánů[1] a rozvinutí chování, díky kterému jsou chemické látky rozptylovány do okolí. Produkce chemických signálů (tj. transport z míst vzniku do míst, kde dochází k jejich vyloučení) jde ruku v ruce s chemorecepcí (tj. transport chemického signálu k danému receptoru) a obě tyto úrovně zaujímají nezbytnou roli v chemické komunikaci. S přechodem na souš došlo k postupnému zdokonalení olfaktorického systému a u většiny obojživelníků, plazů a savců nacházíme dva způsoby detekce čichového vjemu, a to prostřednictvím hlavního čichového systému (angl. main olfactory system – MOS) a vomeronasálního systému (angl. vomeronasal system – VNS).

Pachové značky nacházejí své důležité uplatnění v komunikaci obzvláště u živočichů s noční aktivitou. Nejlépe dokumentovaná je chemická komunikace u hlodavců, zejména u myši domácí, potkanů a křečků. Samci myší používají močové značky ke značení svých teritorií (Desjardins et al., 1973; Rich & Hurst, 1999). V jejich moči nacházíme malé extracelulární proteiny patřící do rodiny lipokalinů - Hlavní močové proteiny (angl. Major urinary proteins – MUPs). Moč dospělých samců myši domácí může být až z 99 % tvořena MUPs (Humphries et al., 1999). Hlavní močové proteiny vytvářejí tzv. kapsu, do níž dokážou vázat malé hydrofobní ligandy (Robertson et al.; 1998), čímž jim umožňují ochranu, snižují jejich evaporaci a v konečném důsledku prodlužují účinek pachové stopy. Tímto způsobem je zajištěna přítomnost pachové stopy i v nepřítomnosti daného jedince (Hurst et al., 1998). Detekce těchto pachových stop poskytuje příjemci mnohé důležité informace o druhu, příbuznosti, sociálním statusu a pohlaví jedince, jehož moč je zdrojem pachové stopy. Tvorba MUPs je energeticky náročná a právě jejich vysoká koncentrace v moči poukazuje na jejich důležitou úlohu v sociální komunikaci.

Existuje poměrně málo publikací věnujících se MUPs u divoce žijících hlodavců. Jedna z nich se zaměřuje na analýzu moči tří druhů podzemních hlodavců (*Fukomys*, *Spalax* a *Spalacopus*), ve které nebyl identifikován žádný MUP (Hagemeyer et al., 2011). Stejně i v případě norníka rudého (*Myodes glareolus),* nebyla odhalena přítomnost MUPs v moči, naopak se stává dominantním jiný typ lipokalinů, a to Odorant vázající protein (angl. Odorant-binding protein – OBP) (Stopková et al., 2010).

[1] Vomeronasální orgán - VNO; u mnohých zástupců třídy savců byl identifikován septální orgán Masera (SOM) a Grünebergův ganglion (GG)

Statisticky nevýznamné množství nejen MUPs, ale i OBPs v moči prezentují i naše výsledky u myšic rodu *Apodemus* a naznačují tak, že jejich strategie chemické komunikace je jiná než doposud známá u myši domácí.

# Cíle práce

- Potvrzení či vyloučení přítomnosti lipokalinů v různých sekretech (moč, sliny) myšic rodu *Apodemus*.

- Podrobná analýza proteinového složení slin u myšic rodu *Apodemus* (*A. flavicollis*, *A. uralensis* a *A. sylvaticus*).

- Analýza vztahu mezi komplexitou lipokalinů a sociální organizací daného druhu.

# 2. Chemické signály

Chemická komunikace je zprostředkovávána feromony, jejichž existenci prokázal roku 1959 A. F. J. Butenandt. První látkou, označovanou jako feromon, byl bombykol, který je uvolňován samicemi bource morušového (*Bombyx mori*). Jeho působením dochází k lákání samců těchto nočních motýlů. Ve stejném roce byl entomology Karlsonem a Lünscherem pojem feromon poprvé definován jako látka produkovaná jedním organismem, která specificky mění chování nebo fyziologii jiného jedince stejného druhu.

Vedle feromonů existují odoranty, které poskytují informace o individualitě a pravděpodobně také ovlivňují chování jedinců stejného druhu (Beauchamp & Yamazaki, 2003). Protože odoranty nevyvolávají specifické chování, nemůžeme je tak na základě definice výše považovat za feromony. Chemické signály je tedy možné rozdělit na feromony a odoranty, ale vzhledem k nejasné hranici mezi těmito pojmy je budeme pro účely této práce souhrnně nazývat chemickými signály.

Někteří autoři navíc definují feromony pouze jako:

i. Těkavé látky, které by neměly být detekovány smysly (Stern & McClintock, 1998).
ii. Další definují feromon jako jednotlivou chemickou substanci (Johnston, 2003).
iii. Někteří považují za feromon samotný protein[2] (Roberts et al., 2010).

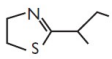
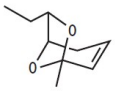
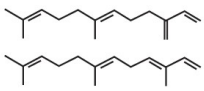
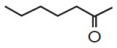
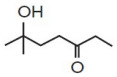
Směsi více molekul, které jsou používané za účelem odlišení jedince nebo kolonie (u sociálního hmyzu) jsou označovány jako tzv. signalizační směsi (angl. signature mixture) (Wyatt, 2005). Takové pachové značky vylučované močí používá například dominantní samec myši ke značení svého teritoria (Hurst, 1993).

Feromony můžeme podle reakce příjemce rozdělit na tzv. „releaser“ a „primer“, kdy první z nich vyvolávají okamžitou behaviorální odpověď (např. agresivní útok, páření, značení teritoria), nazývat je můžeme také signalizační feromony. Naopak „primer“ feromony způsobují dlouhotrvající změny neuroendokrinního či vývojového charakteru (Wilson & Bossert, 1963; Johnston, 2003). Jeden chemický signál může mít oba tyto účinky[3]. Ve funkci „releaser“ feromonů působí tyto látky na jedince obou pohlaví - na samice působí jako atraktant, u samců vyvolávají agresi. V případě jejich účinku jako „primer“ feromonů indukují estrus a urychlují nástup puberty samic (Novotny, 2003).

[2] V moči samců myší (C57BL/6) byl identifikován MUP (pojmenován Darcin), který na samice (*M. m. domesticus*) působí jako atraktant.
[3] Například dehydro-*exo*-brevicomin a 2-*sec*-butyl-4,5-dihydrothiazolu přítomný v moči samců myší.

U savců koreluje produkce feromonů s hladinou hormonů, proto je možné pachové značky považovat za tzv. upřímné signály (angl. honest signals) (Ferkin et al., 1994). Lze to uvést na příkladu, kdy dominantní a/nebo lépe živení samci produkují více feromonů a stávají se tak pro samice více atraktivními (Ferkin et al., 1994; Hurst, 2009).

Nejvýznamnějším zdrojem látek s feromonální aktivitou je u myši (outbrední kmen CD-1) obsah močového měchýře a prepuciálních žláz (Tabulka 1). Tyto látky jsou popisovány jako těkavé substance, které mají schopnost vazby k proteinům vylučovaným močí (Novotny, 2003). Nověji objeveným feromonem je (methylthio) methanethiol, jehož zdrojem je také moč, a to samců inbredního kmene myší BALB/c (Lin et al., 2005). Transportu těkavých feromonů se účastní proteinové přenašeče náležící do rodiny lipokalinů (Kapitola 3).

| NÁZEV | STRUKTURNÍ VZOREC | ZDROJ | PŮSOBENÍ NA SAMICE MYŠI | DETEKČNÍ LIMIT |
|---|---|---|---|---|
| 2,5-dimethylpyrazin | | samičí moč | oddálení nástupu puberty | $10^{-6}$-$10^{-7}$M |
| 2-*sec*-butyl-4,5-dihydrothiazol |  | samčí moč | synchronizace estrálního cyklu urychlení nástupu puberty | $10^{-10}$-$10^{-9}$M |
| 2,3-dehydro-*exo*-brevicomin |  | samčí moč | synchronizace estrálního cyklu urychlení nástupu puberty | $10^{-10}$-$10^{-9}$M |
| *α*- a *β*-famesen |  | samčí prepuciální žlázy | urychlení nástupu puberty | $10^{-11}$-$10^{-10}$M |
| 2-heptanon |  | samčí nebo samičí moč | prodloužení estru | $10^{-11}$-$10^{-10}$M |
| 6-hydroxy-6-methyl-3-heptanon |  | samčí moč | urychlení nástupu puberty | $10^{-8}$-$10^{-7}$M |

**Tabulka 1: Struktura, funkce a zdroj chemických signálů.** Tabulka převzata z článku: LEINDERS-ZUFALL, Trese, Andrew P. LANE, Adam C. PUCHE, Weidong MA, Milos V. NOVOTNY, Michael T. SHIPLEY a Frank ZUFALL, 2000. Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. Nature. roč. 405, č. 6788, s. 792–796.

Zvláštností je, že existují strukturní podobnosti mezi chemickými signály identifikovanými u savců a feromony hmyzu. Například dehydro-*exo*-brevicomin, nacházející se v moči samců myši, se liší přítomností dvojité vazby od brevicominu feromonu brouků podčeledi kůrovci (*Scolytinae*) (Novotny, 2003). Použití stejných molekul může odrážet omezený počet látek s nízkou molekulovou hmotností, které jsou těkavé, stabilní a relativně netoxické (Wyatt, 2010).

Existují i další kandidátní molekuly, které se mohou účastnit chemické komunikace, a to proteiny vázající androgeny (ABPs) (Bímová et al., 2005; Bímová et al., 2011; Karn 2013), nicméně zatím není znám přesný mechanismus jejich účinku.

# 3. Lipokaliny

Lipokaliny jsou skupinou malých, extracelulárních proteinů molekulové hmotnosti 17,7-21,7 kDa (průměrná molekulová hmotnost je 19,4 kDa). U myši nacházíme minimálně 55 genů pro lipokaliny (Stopková et al., 2014). Jejich název je odvozen ze dvou řeckých slov „calyx“ = pohár a „lipos“ = tuk, což napovídá o jejich uplatnění v přenosu hydrofobních ligandů. Do této skupiny řadíme proteiny na základě jejich terciární strukturní podobnosti s ostatními jejich členy. Společně s Proteiny vázajícími mastné kyseliny (angl. Fatty-acid-binding protein – FABP), avidiny, metaloproteinázovými inhibitory (MPI) a triabiny jsou lipokaliny součástí souhrnné skupiny - Calyciny.

Významnou charakteristikou lipokalinů je jejich funkční rozmanitost. Všechny lipokaliny mají schopnost vázat malé, extracelulární, obecně hydrofobní ligandy, do centrální hydrofobní kapsy vznikající ze dvou antiparalelních β-listů (Lücke et al., 1999; Cavaggioni a Mucignat-Caretta, 2000). Dále se účastní vazby ke specifickým buněčným receptorům a mohou vytvářet makromolekulární komplexy. Uplatňují se při transportu retinolu, regulaci buněčné homeostaze a modulaci imunitní odpovědi, kryptickém zbavení u bezobratlých, syntéze prostaglandinu a také hrají roli při transportu feromonů (Flower, 1996).

Jejich přítomnost je potvrzena u většiny organismů, od bakterií (Bishop et al., 1995) přes rostliny (Bugos et al., 1998; Charron & Sarhan, 2006) až po savce.

## *3.1. Struktura lipokalinů*

Primární a sekundární struktura

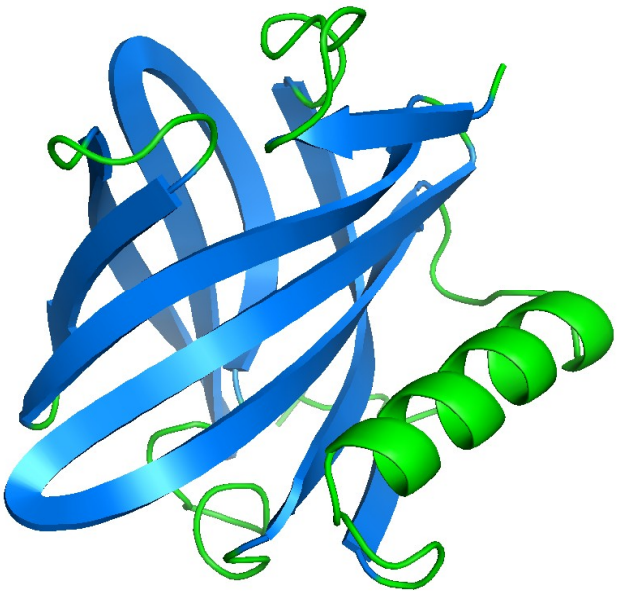
Nejčastěji mají geny pro lipokaliny typickou strukturu zahrnující sedm exonů a šest intronů (A-F) (Grzyb et al., 2006). Ty jsou až na malé výjimky transkribovány do 1,6 – 1kb dlouhých mRNA. Procesem translace dochází ke vzniku proteinů o délce 160 - 230 aminokyselin (Ganfornina et al., 2006). Oproti konzervované terciární struktuře vykazují aminokyselinové sekvence lipokalinů vysokou míru diverzity – párová srovnání většinou spadají pod 20 % podobnosti, nicméně většina sdílí tři krátké strukturně konzervované regiony (angl. structurally conserved protein regions – SCRs) (Flower et al., 1993). Prvním z nich je krátký GxW motiv (SCR1), který až na výjimky nacházíme ve druhém exonu (Salier, 2000; Sansom et al., 1994). Mezi SCRs patří: SCR1 (vlákno A a jemu předcházející $3_{10}$ helix), SCR2 (vlákna F a G a smyčka L6) a SCR3 (vlákno H a přilehlá residua) (Flower, 1996). SCR1 můžeme považovat za diagnostický a na základě jeho přítomnosti lze určit, zda

daný protein patří mezi lipokaliny. Lipokaliny mající všechny tři tyto regiony řadíme do skupiny „kernel“, zatímco menší a divergentnější skupina sdílí pouze jeden z motivů – nazýváme je tedy „outlier“ (Flower et al., 1993). Z lipokalinů zmíněných v této diplomové práci patří mezi „kernel“ lipokaliny MUPs a $\alpha_{2u}$-globuliny; OBPs, Afrodisin a VNSP náleží mezi „outlier“ lipokaliny.

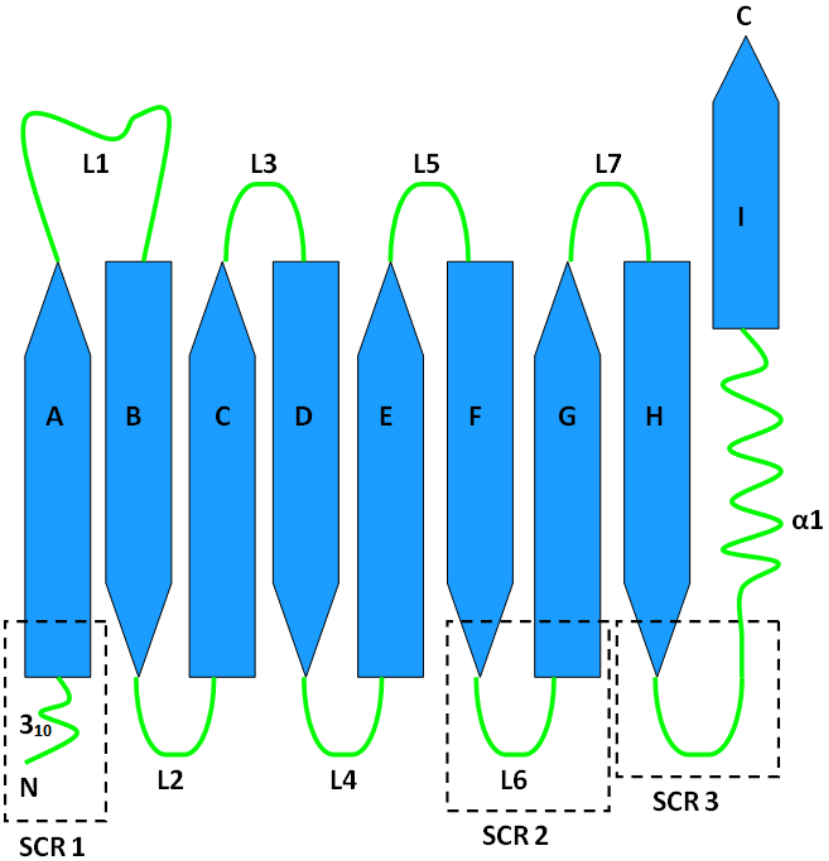
Terciární struktura

Terciární struktura je napříč lipokaliny velmi konzervovaná a představuje β-válec tvořený osmi antiparalelními strukturami (vlákny) β-skládaného listu, které obklopují vnitřní vazebná místa pro ligandy (Obrázek 1). Ligandy mohou mít různou velikost, tvar, a tak se i vazebná místa různých ligandů mohou lišit. β-válec má dva konce – otevřený a uzavřený, které se liší svou funkcí i strukturou.

Osm antiparalelních struktur je označeno písmeny A-H (Obrázek 2) a jsou propojeny příčnými vodíkovými můstky. Jednotlivá vlákna spolu interagují díky propojením (L1-L7), která jsou až na jedinou výjimku (tj. L1) utvářena β-vlásenkou. Na jednom konci nacházíme čtyři propojení (L1, L3, L5 a L7), na jejichž straně se nachází otvor pro přístup ligandů ke svým vnitřním vazebným místům, a proto ho nazýváme otevřeným koncem molekuly. Spojení vláken A a B (L1), je typem Ω - je větší a více flexibilnější a překrývá tak otevřený konec β-válce. Druhý konec vytváří tři β-vlásenky (L2, L4 a L6). Na N-terminálním konci je $3_{10}$helix a na C-terminálním konci nacházíme mezi vláknem H a krátkým terminálním vláknem I α-helix. α-helix je přítomný u všech lipokalinů, ovšem jeho pozice v rámci osy β-válce a délka se může lišit (Flower et al., 1996; Flower et al., 2000).



**Obrázek 1: Vizualizace 3D struktury myšího MUP-I**, kterou jsem vytvořila s použitím programu PyMOL. Zdroj sekvence: PubMed (Timm et al., 2001).




**Obrázek 2: Rozvolněná terciární struktura lipokalinů.** Upraveno podle: FLOWER, D.R, 2000. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochimica et Biophysica Acta*. roč. 2000. s. 9–23.

### 3.1.1. Lipokaliny s funkcí v chemické komunikaci

#### 3.1.1.1. Hlavní močové proteiny (MUPs)

Jedná se o proteiny o molekulové hmotnosti přibližně 18-19 kDa (Cavaggioni & Mucignat-Caretta, 2000; Robertson et al., 2007). Jsou kódovány velkým počtem genů, které u myši vytvářejí přibližně 2 Mb cluster na chromosomu 4 (Hastie et al., 1979). Nomenklatura MUPs je složitá. Dřívější označení genů pro MUPs (MUP I-VI) podle Shahana (1987) nepopisovalo jednotlivý gen, ale jejich větší množství. Novější publikace odhalují, že genů kódujících MUPs lze rozlišit 21, stejné množství je i pseudogenů (Logan et al., 2008; Stopková et al., 2009). Na základě genomické organizace MUPs u myši je můžeme rozdělit do dvou skupin – třída A - starší a divergentnější třída 6 genů (Mup1, Mup2, Mup18, Mup24, Mup25 a Mup26)[4] a 5 pseudogenů, dále pak třída B - recentně reduplikací vzniklá skupina 15 genů (Mup3 – Mup17)[5] s vysokou hladinou sekvenční a funkční homologie. Přestože je jejich polymorfismus v aminokyselinové sekvenci velmi nízký, odlišují se v substituci jednotlivých nukleotidů a deleci tripletů. Napříč vybranými zástupci placentálních savců je pozorován značný genetický polymorfismus pouze u *Mus musculus*, mírný pak u *Rattus norvegicus* (Logan et al., 2008).

K syntéze MUPs dochází v játrech, poté přechází do plazmy a jsou filtrované skrze ledviny do moči (Rümke & Thung, 1964). Moč myší domácích, *M. m. domesticus,* obsahuje vysokou koncentraci proteinů o hmotnosti 18 - 19 kDa z nichž 99 % představují právě MUPs (Humphries et al., 1999). Je publikováno, že moč samců divoce žijících myší domácích, *M. m. domesticus*, obsahuje výjimečné množství MUPs – 10-30 mg/ml (Beynon & Hurst, 2003).

Exprese MUPs v játrech podléhá hormonální kontrole androgenů, v první řadě testosteronu, dále je modulovaná thyroxinem a růstovými hormony. Přidání růstového hormonu či thyroxinu za přítomnosti testosteronu zvýšilo 150x expresi mRNA pro MUPs (Knopf et al., 1983).

[4, 5] Číslování MUPs je podle publikace Logan et al., 2008

K expresi genů pro MUPs však dochází i v dalších tkáních (Shahan et al., 1987):

i. MUP I játra
ii. MUP II játra a mléčné žlázy
iii. MUP III játra
iv. MUP IV slzné, příušní a podjazykové žlázy (jen u adultních jedinců)
v. MUP V podčelistní, podjazykové a slzné žlázy
vi. MUP VI příušní žlázy dospělých jedinců

#### 3.1.1.2. Informační charakter MUPs

Existuje několik hypotéz, které popisují zapojení MUPs v chemické komunikaci:

i. MUPs mají schopnost vázat široké spektrum ligandů, které vyvolávají fyziologickou a behaviorální dopověď (Jemiolo et al., 1986; Cavaggioni et al., 1987; Novotny et al., 1999; Novotny, 2003).
ii. MUP vazbou ligandu zpomaluje jeho evaporaci (Hurst, 1998).
iii. MUP samotný má informační charakter (Vandenbergh et al., 1975; Mucignat-Caretta et al., 1995; Morè, 2006; Chamero et al., 2007).
iv. MUP interaguje přímo s olfaktorickými nebo vomeronasálními receptory (Sharrow et al., 2002).

V následující části jsem shrnula nejvýznamnější poznatky o MUPs, které indikují jejich klíčové působení v olfaktorické komunikaci myšovitých hlodavců.

i. <u>Rozdílná exprese u jedinců opačného pohlaví</u>

Exprese MUPs je závislá na pohlaví jedince, samci na rozdíl od samic produkují více těchto proteinů (Wicks, 1941). Odlišná intersexuální kvantita mRNA kódující MUPs byla pozorována jak u poddruhu *M. m. domesticus*, tak i u poddruhu *M. m. musculus*, kde byl tento rozdíl výraznější (Sampsell & Held, 1985). To, že je produkce hlavních močových proteinů u těchto dvou podruhů myší pohlavně dimorfní potvrzují i další publikace věnující se zastoupení MUPs jak na úrovni exprese mRNA, tak i na jejich aktuální koncentraci v moči (Stopková et al., 2007; Janotová & Stopka, 2009). Pohlavní dimorfismus v produkci MUPs byl pozorován i u inbredního kmene myší C57BL/6, kdy byla koncentrace MUPs v moči samců 3 – 10x vyšší než u samic (Stopka et al., 2007).

ii. Poddruhově specifické zastoupení MUPs

Ukazuje se, že existují poddruhově specifické rozdíly v úrovni syntézy MUPs. Bylo tomu experimentálně prokázáno u *M. m. musculus* a *M. m. domesticus.* Hladina MUPs na úrovni proteinů v moči a stejně i exprese mRNA kódující MUPs v játrech byla u samců *M. m. musculus* vyšší než u *M. m. domesticus* (Stopková et al., 2007). Další publikace se zaměřuje na analýzu těkavých látek přítomných v moči těchto dvou poddruhů. Vyšší kvantita byla pozorována u poddruhu *M. m. domesticus* a rozpoznání poddruhu se děje pravděpodobně na základě jejich proporce v pachové stopy (Mucignat-Caretta et al., 2010).

Autoři další publikace analyzovali zastoupení jednotlivých variant MUPs napříč 30 inbredními kmeny laboratorních myší. Byly vyčleněny pouze dvě skupiny s podobným fenotypem MUPs, což je v kontrastu s výsledky u divoce žijících myší domácích (*M. m. domesticus*), kde byla odhalena velká variabilita v expresi MUPs u nepříbuzných jedinců. Inbrední kmeny jsou však geneticky homozygotní a projevují jednodušší profil MUPs s menším počtem izoforem. Odchylky chyběly nejen v rámci jednotlivých kmenů, ale i mezi nimi. Na rozdíl od scházející variance na úrovní kvalitativní, byl mezi jednotlivými kmeny zaznamenán rozdíl v celkové produkci močových proteinů (Cheetham et al., 2009).

iii. Vliv sociálního kontextu

Stopka a Macdonald (1998) poukazují na souhru Whittenova[6] a Lee-Boot[7] efektu v závislosti na sociálním kontextu. Samice myšice křovinné (*A. sylvaticus*) zkrátily estrální cyklus a prodloužily estrus v přítomnosti samců (samci byli izolováni za mřížkou). Tento efekt byl mnohem výraznější v případě obměňování jednotlivých samců každý den. Estrus se tak zdál být téměř kontinuální. K opačnému jevu (prodloužení estrálního cyklu a zkrácení estru) došlo v situaci, kdy byla samice chována jednotlivě. Tento jev byl ještě zřetelnější vlivem kontaktu samice s více samicemi (izolovaných opět za mřížkou).

U inbredního kmene myší C57BL/6 byla pozorována variance v produkci MUPs vlivem jejich chování individuálně nebo s jedincem opačného pohlaví. Jedinci obou pohlaví zvýšili produkci MUPs v sociálním kontextu. Ve stejném experimentu byly u samic pozorovány cyklické změny v míře exprese a koncentrace MUPs v moči. Maximum bylo dosaženo den před nástupem plodné fáze estrálního cyklu – tj. estru a je možné, že samice tak samcům dávají najevo svůj reprodukční status (Stopka et al., 2007).

[6] Whittenův efekt – způsobuje vyvolání estru a jeho synchronizaci (Whitten et al., 1968)
[7] Lee-Boot efekt – potlačuje estrus v přítomnosti pachu jiných samic (Lee & van der Boot, 1955)

Stejně tak i u divoce žijící myši domácí (*M. m. musculus*) došlo vlivem sociálního prostředí k regulaci hladiny MUPs v moči. V experimentu, kdy byli samci chováni se samicemi, zvýšili samci produkci těchto lipokalinů, k opačnému efektu došlo v podmínkách, kdy byli samci chováni s jedinci stejného pohlaví. Samice naopak v přítomnosti samce snížily produkci MUPs. To je však v protikladu s výsledky předchozího experimentu u inbredního kmene myší C57BL/6 (Stopka et al., 2007), kdy samice zvýšily jejich produkci. Tento rozdíl je možné vysvětlit tím, že k úbytku MUPs dochází vlivem stresu způsobeným přítomností neznámého samce (Janotová & Stopka, 2011). Jedinci inbredního kmene jsou geneticky identičtí a právě z toho důvodu nejspíš nepovažují samce stejného kmene za neznámého (Nevison et al., 2003).

iv. Individuální podpis a příbuznost

Nedochází k expresi všech 21 genů pro MUPs. Samci divoce žijící myši domácí (*M. m. domesticus*) stabilizují produkci jednotlivých 4-12 MUPs v průběhu svého života (Robertson et al., 1997). Pozdější publikace potvrdila variabilitu MUPs nejen u samců, ale i samic - ve vzorcích moči myší (*M. m. domesticus*) bylo detekováno 4-14 různých typů MUPs (Beynon & Hurst, 2003). Díky výraznému polymorfismu na proteinové úrovni a stabilitě tohoto profilu v průběhu života fungují jako tzv. individuální podpis (Hurst et al., 2001) a poskytují informaci o individualitě toho, který daný signál vydává, což by mohlo přispět k vyhnutí se inbreedingu, zachování genetické identity a zvýšení pravděpodobnosti výběru nejlepšího partnera k páření. U stejného poddruhu bylo odhaleno, že se většina jedinců snaží předejít příbuzenskému křížení na základě rozlišení haplotypů MUPs zděděných od rodičovských populací (Sherborne et al., 2007). Toto je však kontroverzní. Dospívající samci opouští svá rodná teritoria a zdá se nepravděpodobné, že by se setkali s jedinci se shodnými haplotypy (Janotová & Stopka, 2009).

v. Agresivní chování

MUPs mají schopnost vázat a uvolňovat chemické látky vyvolávající agresi (Novotny et al., 1985). Stejně tak i synteticky vytvořené MUPs mají potenciál k vyvolání teritoriální agrese mezi samci (Chamero et al., 2007). Současný výzkum se zaměřuje právě na samotné MUPs v souvislosti s agonistickým chováním, které v sobě zahrnuje prvky aktivního i pasivního bojovného chování při střetu jedinců stejného druhu.

Pravděpodobně existuje korelace agonistického chování samců myši (*M. m. domesticus*) a variant MUPs identifikovaných metodou isoelektrické fokusace (IEF). U agonisticky se chovajících samců bylo identifikováno více variant v oblasti MUPs. Tento vzor byl pozorován v době odstavení mláďat, později zmizel (Rusu et al., 2008). Recentní publikace odhalila dva specifické synteticky vytvořené rMUPs (rMUP20 a rMUP3), které vyvolávají agresi mezi samci. Tento efekt není modulován koncentrací, předchozí zkušeností a ani celým repertoárem MUPs, je však ovlivněn kontextem – vyžaduje fyzický kontakt s jedincem, ke kterému je agrese směřována (Kaur et al., 2014).

vi. Značení teritorií a sociální status

Byl pozorován rozdíl v produkci moči samců (*M. m. domesticus*), kdy jedinci s dominantním postavením produkují více moči (Drickamer, 1995) a močovými značkami označují celá svá teritoria (Desjardins et al., 1973; Hurst, 1990). U dospělých samců myši došlo ke spuštění agresivního chování a konkurenčního značení teritorií po vystavení stimulu obsahujícím MUPs jiného samce (Humphries et al., 1999; Chamero et al., 2007). Konkurenční značení teritorií bylo také vyvoláno detekcí MUPs bez navázaného ligandu (Beynon & Hurst, 2004). Naopak detekce vlastní močové značky nestimuluje značení teritoria (Nevison et al., 2000). Behaviorální výzkum potvrzuje, že konkurenční značení teritoria močovými značkami závisí na celém repertoáru MUPs v moči samců a rozlišení vlastní močové značky od cizí je dáno předchozí senzorickou zkušeností. Stejně tak záleží i na koncentraci MUPs. Pokud byla hladina jednoho rMUP čtyřnásobně zvýšena v porovnání s vlastní močovou značkou, samec na to odpověděl konkurenčním značením (Kaur et al., 2014).

vii. Pohlavní výběr

Samice myši domácí jsou na základě MUPs, obsažených v močové značce, schopné rozpoznat samce, se kterým se dříve setkaly. Nutný je však přímý fyzický kontakt se zdrojem těchto chemických signálů (Cheetham et al., 2007). Ukázalo se, že samice myši *M. m. domesticus* preferují heterozygotní samce a pro jejich identifikaci využívají specifický genetický marker - MUPs (Thom et al., 2008). Rozdíly v kvantitě chemických signálů odrážejí kvalitu jedince a ovlivňují tak samičí preference výběru partnera (Wyatt, 2009).

#### 3.1.1.3. $\alpha_{2u}$- globuliny

Strukturou jsou $\alpha_{2u}$-globuliny podobné MUPs, v nativním stavu jsou monomery, současně s MUPs sdílejí schopnost transportovat malé hydrofobní molekuly (Böcskei et al., 1992). První $\alpha_{2u}$-globulin, jehož exprese je hormonálně regulovaná, byl objeven v moči dospělých potkanů, kde zaujímal 30-50 % z celkové proteinové složky moči (Roy & Neuhaus, 1966). Elektroforetická mobilita $\alpha_{2u}$-globulinu je podobná $\alpha_2$-globulinu v plazmě, index „u“ označuje, že ho nacházíme v moči. K jeho tvorbě dochází v parenchymálních hepatocytech u dospělých samců potkanů, v menším množství je syntetizován i v jiných tkáních (Roy et al., 1983). Nyní však víme, že se jedná o rodinu více proteinů o molekulární hmotnosti přibližně 20 kDa, jejich přítomnost byla potvrzena v játrech, podčelistních, slzných a mléčných žlázách potkanů (MacInnes et al., 1986). Celkem je popsáno 9 genů a 13 pseudogenů a předpokládá se, že k expanzi genů pro MUPs a $\alpha_{2u}$-globuliny došlo nezávisle z jednoho nebo malého počtu ancestrálních genů (Logan et al., 2008).

#### 3.1.1.4. Slinný lipokalin (SAL1)

Nejen moč je zdrojem chemických signálů. V experimentu, kdy byly samice myši vystaveny několika vzorkům samčí homogenizované tkáně, došlo v případě expozice prepuciálními a slinnými žlázami k indukci estru (Marchlewska-Koj et al., 1990). Role slin v intersexuální komunikaci je nejlépe prozkoumaná u prasat (Signoret et al., 1970), podobně jako role moči u myší. Proteiny fungující jako transportéry chemických signálů ve slinách prasat byly označeny jako pheromaxeiny (Booth et al., 1988; Booth et al., 1991). Později byla v podčelistních žlázách popsána přítomnost prasečího lipokalinu SAL1 (angl. salivary lipocalin), který se však liší od dříve popsaných pheromaxeinů vyšší molekulovou hmotností. Jeho exprese je sexuálně dimorfní (u samic a subadultních samců ho nenacházíme) a podobně jako MUPs váže ligandy (5α androstenon, 5α androstenol a 2-isobutyl-3-methoxypyrazin) (Marchese et al., 1998). Ukázalo se, že SAL1 existuje ve dvou isoformách, které se liší substitucí tří aminokyselin (Loebel et al., 2000). Terciární struktura SAL1 je vytvářena β-válcem, který obsahuje jednu hlavní dutinu, která je v porovnání se stejnou strukturou u ostatních lipokalinů menší. Ovšem díky přítomnosti dvou menších dutin dosahuje vnitřní dutina stejné velikosti jako OBPs (Spinelli et al., 2002).

### 3.1.2. Další lipokaliny s možnou účastí v chemické komunikaci

#### 3.1.2.1. Odoranty vázající proteiny (OBPs)

Další lipokaliny, jejichž exprese byla poprvé popsána v nosní sliznici, jsou Odoranty vázající proteiny (angl. Odorant-binding proteins – OBPs). První savčí OBP byl izolován z čichové sliznice krávy a je charakteristický svou specifickou afinitou k 2-isobutyl-3-methoxypyrazinu (Bignetti et al., 1985). Tyto lipokaliny jsou obsaženy ve slizové vrstvě chránící čichové neurony a účastní se transportu odorantů k olfaktorickým receptorům (Pevsner & Snyder, 1990). Později se ukázalo, že místem exprese OBPs je nejen nosní sliznice, ale i vomeronasální orgán (Guiraudie et al., 2003).

V nosní sliznici myši byly identifikovány nejprve dva OBPs – OBP-I a OBP-II (Pes et al., 1992). OBP-I je heterodimer skládající se ze dvou podjednotek o hmotnosti 18 a 19 kDa, popsaný v NCBI jako OBP1a a OBP1b. OBP-II je monomer jehož molekulární hmotnost je 21 kDa. Stejnou metodou byly izolovány další lipokaliny, a to OBP-III a OBP-IV, ale na základě analýzy sekvencí byly zařazeny k MUPs (Pes & Pelosi, 1995).

Recentní publikace popisují genový shluk velikosti 0,5 Mb na myším X chromosomu (Stopková et al., 2009; Stopková et al., 2014). Bylo identifikováno celkem 6 genů a dva pseudogeny (pseudogeny jsou označeny písmenem P). Všechny geny mají na proteinové úrovni typický CxxxC motiv. Tři aminokyseliny nacházející se mezi těmito cysteiny můžeme považovat za diagnostické (uvedeny v závorce níže). Geny pro OBP vznikly opakovanou duplikací tří původních genů a mohou být rozděleny do tří strukturně odlišných skupin:

i. 1. skupina (CNDDC) - Obp1, Obp2 a Obp3P (odpovídá OBP-II)
ii. 2. skupina (CEKEC) - Obp4P, Obp5 a Obp6 (odpovídá OBP1a)
iii. 3. skupina (CDEGC) – Obp7 a Obp8 (odpovídá OBP1b)

**Afrodisin**, který vykazuje největší homologii s myšími geny pro OBP (Stopková et al., 2010), byl poprvé popsán ve vaginálním sekretu křečků zlatých (*Mesocricetus auratus*). Tento protein izolovaný ze samičího sekretu má schopnost stimulovat kopulační chování samců (Singer et al., 1986). Patří také mezi lipokaliny a jeho hmotnost je přibližně 17 kDa (Henzel et al., 1988). Vzhledem k přítomnosti pouze jednoho z motivů (SCR1) jej řadíme mezi tzv. „outlier“ lipokaliny (Flower, 1996).

Afrodisin je utvářen v Bartholiho žlázách a děloze a k expresi genu pro Afrodisin dochází také v příušních žlázách samic křečka (Mägert et al., 1995; Mägert et al., 1999).

Oproti MUP a $\alpha_{2u}$-globulinu se u Afrodisinu na proteinové úrovni nevyskytuje polymorfismus. Pro jeho funkčnost je nutný komplex protein-ligand, účinek Afrodisinu naklonovaného v *E. coli* je mnohem nižší (Singer & Macrides, 1990). Kromě prvotně identifikovných tří ligandů (2-isobutyl-3-methoxypyrazin, methyl thiobutyrat a dimethyl disulfid) bylo identifikováno dalších pět ligandů, které se nacházejí ve vaginálním sekretu (1-hexadecanol, 1-octadecanol, Z-9-octadecen-1-ol, E-9-octadecen-1-ol a kyselina palmitová) a které mají schopnost vazby k Afrodisinu (Briand et al., 2000; Briand et al., 2004).

V moči a slinách norníka rudého, *Myodes glareolus*, byla prokázána převažující přítomnost OBPs podobných Afrodisinu. Na nukleotidové i proteinové úrovni byly identifikovány tři jejich varianty (Obp1, Obp2 a Obp3) a je možné, že zastávají podobnou úlohu v chemické komunikaci jako MUPs u myší (Stopková et al., 2010).

**Funkce OBPs**

Zpočátku se myslelo, že OBPs jsou pouhými pasivními transportéry a sběrateli odorantů, ale prokázalo se, že interagují i s dalšími strukturami. Níže jsem popsala vybrané hypotézy týkající se uplatnění OBPs v chemické komunikaci.

i. **OBPs hrají aktivnější úlohu**, ve které olfaktorické neuroreceptory rozpoznávají komplex OBP/odorant. Několik autorů popisuje výrazné strukturní změny, které vznikají právě v odpovědi na vytvoření komplexu OBP/odorant (Nespoulous et al., 2004; Löbel et al, 1998; Pelosi, 1998) a právě tato změna může dát podnět pro vznik transdukční kaskády.
ii. Briand et al. (2000) jako první předeslal uplatnění OBPs **jako nosičů organoleptických směsí k odorantovým receptorům**. První evidence o OBPs a jejich komunikaci s čichovými receptory byla zaznamenána *in vitro* u prasečího OBP a lidského olfaktorického receptoru OR17-210 (Matarazzo et al., 2002). Zdá se pravděpodobné, že právě v důsledku navázání ligandu uvnitř β-barelu došlo k rozevření jeho párových vláken a je možné, že právě tato změna je signálem pro olfaktorické receptory (Hajjar et al., 2006).
iii. Matarazzo a jeho spolupracovníci zároveň navrhují, že při vysoké koncentraci ligandů fungují OBPs jako jejich sběratelé **bránící saturaci olfaktorických receptorů**, zatímco při jejich nízkých koncentracích fungují jako transportéry, aktivně k nim

dopravující tyto odoranty (Matarazzo et al., 2002). V souladu s tím je i publikace, kde se spekuluje o uplatnění OBPs v deaktivaci těchto ligandů (Lazar et al., 2002).

iv. OBPs možná **prodlužují aktivitu daného signálu** tím, že zadržují a postupně uvolňují ligandy, které jsou těmito proteiny obaleny (Taylor et al., 2008).

v. Novější výsledky poukazují na n**ezbytnost komplexu OBP/odorant pro rozpoznání čichovým epitelem**. Ve stejném experimentu bylo popsáno, že k odstranění odorantů z mukózní sliznice prostřednictvím OBPs dochází v řádu několik sekund a že jsou tyto komplexy selektivně přijímány sustentakulárními buňkami, které se nacházejí v apikální vrstvě epitelu. Dále bylo odhaleno, že vhodným receptorovým kandidátem přítomným v těchto buňkách by mohl být megalin[8], který patří mezi LDL[9]-receptory (Strotmann & Breer, 2011).

#### 3.1.2.2. Lipokalin 3 a 4 (Vomeronasal secretory protein 1 a 2)

Ve vomeronasálním orgánu dochází k produkci LCN3 (VNSP1) a LCN4 (VNSP2), jejich molekulová hmotnost je 19 a 20 kDa. K expresi isoformy VNSP1 u myši dochází jen v prvních týdnech života a na počátku puberty. Jeho přítomnost právě v těchto periodách je spojována s jeho rolí v rozpoznání matky a vyhledání partnera. Pravděpodobně plní stejnou funkci jako OBP v nosní sliznici (Miyawaki et al., 1994).

[8] Megalin (LRP2) – membránový receptor, který zprostředkovává endocytózu ligandů
[9] LDL – angl. low density lipoprotein (lipoprotein o nízké hustotě)

# 4. Cílová tkáň

## *4.1. Vomeronasální orgán a hlavní čichový systém*

Po dlouhou dobu se věřilo v to, že existují dva oddělené chemosenzorické systémy, které zastávají odlišné funkce. Prvním z nich je hlavní čichový systém (angl. main olfactory system - MOS), který býval spojován pouze s detekcí těkavých odorantů, nikoliv feromonů. Druhým je vomeronasální systém (angl. vomeronasal system - VNS), který se uplatňuje při detekci feromonů. Nicméně oba tyto systémy vnímají oba typy těchto chemických signálů. Existují však i další struktury, které mají chemosenzorickou aktivitu, a těmi je septální orgán Masera (SOM) a Grünebergovo ganglium (GG).

Čichový epitel hlavního čichového orgánu (angl. main olfactory epithelum - MOE) a stejně i vomeronasální orgán (angl. vomeronasal organ – VNO) obsahuje receptorové proteiny patřící do rodiny receptorů spřažených s G-proteinem (angl. G-protein coupled receptor - GPCR). Jedná se o transmembránové receptory, které se skládají ze sedmi membránou procházejících domén. Oblast kolem receptorů senzorických neuronů označujeme jako perireceptorový prostor a perireceptorové události jsou chemické interakce mezi odoranty/feromony s rozpustnými makromolekulami, které se nachází v tomto prostoru (Getchell et al., 1984). U terestrických živočichů je čichový epitel pokryt slabou vrstvou hutného slizu, ten vytvářejí velké glykoproteiny, které ve velkém množství váží vodu, čímž snižují evaporaci a mimo to zajišťuje tento slizový obal fyzickou a chemickou ochranu před cizími látkami (Pelosi, 2001).

### 4.1.1. Vomeronasální orgán (VNO)

Vomeronasální, nebo také Jacobsonův orgán, který poprvé popsal roku 1981 dánský anatom L. L. Jacobson, je slepě ukončenou trubicí vyplněnou mukózní tekutinou. Jedná se o párový orgán, který je u některých živočichů chráněn kostěným či chrupavčitým pouzdrem (Døving & Trotier, 1998).

Vomeronasální epitel, který je součástí VNO je umístěn na spodině nosní dutiny a jeho sliznice je prostoupena senzorickými neurony, které na svůj povrch vystavují chemoreceptory. Senzorické neurony pak aktivací těchto receptorů vedou signál do přídatného čichového bulbu (angl. acessory olfactory bulb – AOB), následně signál putuje přes amygdalu až hypothalamu (Munger et al., 2009).

VNO je bohatě prokrven a díky přítomnosti hladké svaloviny, která obklopuje jednu až dvě žíly (Døving & Trotier, 1998) dochází při stimulaci k vasokonstrikci a vasodilataci cév, což lze přirovnat k čerpadlu (Keverne, 1999). Tento mechanismus umožňuje vomeronsálnímu orgánu nasát netěkavé látky jako jsou třeba lipokaliny z močových značek, vaginálních sekretů, sekretů pachových žláz či slin. U některých druhů (kopytníci, šelmy) je VNO přes ductus nasopalatinus propojen s dutinou ústní a tzv. flémováním mohou být nasáty sekrety stimulující VNO (Briand et al., 2004).

Důkazem, že VNO nevnímá pouze feromony je experiment, ve kterém byl zkoumán účinek ethylvanilinu. Tato látka, která není známa svou feromonální aktivitou, přesto byla schopná aktivovat VNO (Thinh & Storm, 2003). Výsledkem další publikace je pozorování, že vomeronasální senzorické neurony reagují na 18 z celkových 82 testovaných odorantů (Sam et al., 2001). Pro aktivaci neuronů vedoucích signál k AOB je však nezbytný přímý kontakt mezi nosem jednoho jedince a tváří nebo anogenitální oblastí druhého jedince, který daný stimulus vytváří. Dále byla potvrzena nezbytnost čerpacího mechanismu VNO, který u jedinců pod anestezií nebyl schopný nasát těkavé odoranty a aktivovat tak AOB (Luo et al., 2003).

### 4.1.2. Hlavní čichový systém (MOS)

Signalizační kaskáda probíhající prostřednictvím tohoto systému se liší od VNS. Axony senzorických neuronů hlavního čichového epitelu se sbíhající v I. hlavový nerv – *nervus olfactorius*. Ty pak předávají vzruch mitrálním buňkám, které se nacházejí ve specifickém regionu hlavního čichového bulbu (angl. main olfactory bulb – MOB), které signál postupují vyšším centrům jako je pyriform cortex a kortikomediální amygdala odkud signál putuje do hypothalamu (Shipley et al., 2008).

Olfaktorické senzorické neurony nacházející se v MOE jsou bipolárního typu s jedním rozvětveným dendritovým výběžkem, který zasahuje do mukózní sliznice. Právě tyto dendrity jsou cílovým místem pro odoranty a pravděpodobně také feromony. Funkční magnetickou rezonancí (fMRI) bylo prokázáno, že jak odoranty, tak i feromony mohou být detekovány MOS i VNO (Xu et al., 2005).

### 4.1.3. Další čichové subsystémy

Septální orgán Masera (SOM) je malým ostrůvkem čichového epitelu uvnitř čichové sliznice a nacházíme ho po obou stranách nosní přepážky. Důkaz o citlivosti SOM na chemické signály byl prvně demonstrován u potkanů s využitím elektroolfaktogramu, a to v roce 1986 (Marshall & Maruniak, 1986), schopnost SOM vnímat pachy potvrzují i novější publikace (Munger et al., 2009). Stejně jako i v případě MOE je k signální transdukci většiny OSNs nacházejících se v oblasti SOM potřeba tzv. druhého posla. Tím je cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) a cílem projekce čichových senzorických neuronů (angl. Olfactory sensory neurons – OSNs) je hlavní čichový lalok (Ma et al., 2003).

Další strukturou Grünebergovo ganglium (GG), který byl poprvé popsán v roce 1973 jako neuronální struktura nacházející se v přední části nosní dutiny (Grueneberg, 1973). Aferentní vlákna OSNs nacházejících se v oblasti Grünebergova ganglia vstupují do MOB (Storan & Key, 2006; Zufall & Leinders-Zufall, 2007). Umístění GG a časný vývoj (16. den embryonálního vývoje) naznačují jeho možné uplatnění jako chemosenzorického orgánu v novorozeneckém období, v průběhu postnatálního vývoje dochází k poklesu buněk GG (Fuss et al., 2005). Strategická poloha GG napovídá o možném uplatnění v detekci netěkavých látek, jejichž příjem vyžaduje přímý kontakt se zdrojem stimulu (Fuss et al., 2005).

# 5. Ekologie a etologie myšic rodu *Apodemus*

Myšice malooká (*Apodemus uralensis*)

Areál výskytu *A. uralensis*[10] je ostrůvkovitý, v České republice se s ní můžeme setkat v oblasti jižní Moravy, Slezska a Žatecka - pouze na 7,6 % areálu ČR (Anděra, 2011). Myšice malooká se, dle svého názvu, vyznačuje drobnějšíma očima a menšími ušními boltci. Délka zadní tlapky dosahuje délky max. 20,5 mm. Její ocas je dvoubarevný ocas a je vždy kratší než tělo. Osidluje především stepní oblasti. Malé oči, uši a vibrisy nasvědčují fosoriálnímu způsobu života (Anděra & Horáček, 2005). Fylogenetická analýza naznačuje, že *A. uralensis* je společně s *A. cf. hyrcanius* sesterským druhem s *A. sylvaticus*, *A. flavicollis*, *A.alpicola* a *A. hermone*nsis (Filippucci et al., 2002).

Agresivita tohoto druhu (intra- i inter- sexuální) je velmi nízká (Suchomelová & Frynta, 2000). Allogrooming[11] mezi jedinci stejného pohlaví probíhá recipročně, a to i u samců, což také dokumentuje nízkou míru agresivního chování tohoto druhu. Naopak intersexuální byl nerovnoměrný, samicím bylo ze strany samců poskytováno více allogroomingu (Stopka & Graciasová, 2001).

Tento druh je spíše monogamní. Je popisován nízký podíl mimopárových paternit. Nízká míra samičí promiskuity se lišila v průběhu testovaného období. Tento trend byl pravděpodobně způsoben měnící se hustotou populace a typem stanoviště. Ke zvýšení úrovně samičí promiskuity dochází v závislosti na zvyšující se hustotu populace (Bryja & Stopka, 2005; Bryja et al., 2008).

Myšice křovinná (*Apodemus sylvaticus*)

Myšice křovinná je často zaměňován s myšicí lesní. K morfometrickému určení druhu je nejlepší využití délky zadní tlapky s nejčastějšími hodnotami mezi 20,5 až 23 mm. Ocas obvykle nepřesahuje délku těla a hranice zbarvení boků a břicha není oproti myšici lesní příliš výrazná (Anděra & Horáček, 2005).

Jedná se o běžný, eurytopní druh, který je přizpůsoben k životu v různých habitatech. Obývá lesy, agrikulturní oblasti, ale i města. K roku 2011 byl zaznamenán výskyt tohoto druhu na 92,6 % České republiky (Anděra, 2011).

Myšice křovinná je promiskuitní druh (Bryja et al., 2008). Samci i samice zvětšují rozsah svých domovských okrsků v období rozmnožování. V tomto období je teritorium

[10] V některých publikacích je používán alternativní název *Apodemus microps*.
[11] Allogrooming - jedinec čistí srst druhému jedinci stejného nebo opačného pohlaví

samce signifikantně větší (1,44 ha : 0,49 ha). Nejméně se překrývají okrsky samic, naopak samčí teritorium překrývá okrsky několika samic a samice se tak mohou potenciálně pářit s několika samci (Tew & Macdonald, 1994).

Samice požadují allogrooming ze strany samce, který působí jako prekopulační stimulace (Stopka & Macdonald, 1998). Samci se snaží docílit anogenitálního kontaktu, pravděpodobně za účelem zjištění reprodukčního stavu samice. Pokud je samice odmítne, poskytují samicím allogrooming. Ten je nerovnoměrný, samec jej samici poskytuje častěji (Stopka & Macdonald, 1999).

Myšice lesní (*Apodemus flavicollis*)

Jedná se o největšího zástupce ze studovaných druhů. Délka zadní tlapky bývá 23 - 27 mm (Anděra & Horáček, 2005). Ze všech testovaných druhů vykazuje myšice lesní nejvýraznější pohlavní dimorfismus (Frynta et al., 2005). Dříve se označovala jako myšice žlutohrdlá, protože je u některých jedinců přítomná výrazně žlutě zbarvená skvrna na hrdle. Délka ocasu dospělých jedinců je spíše delší nebo stejně dlouhá jako délka těla (Anděra & Horáček, 2005).

Setkat se s ní můžeme téměř na celém území České republiky (na 86,6 % ČR). Upřednostňuje nadmořské výšky v rozsahu 200 – 600 m n. m. Její výskyt byl však zaznamenán i na hřebenech Krkonoš a Jeseníků (Anděra, 2011). Bylo vypozorováno, že myšice lesní mají tendenci ke šplhavému pohybu, a tak se jejich habitat oproti myšici křovinné liší ve vertikálním směru. Dále byly sledovány jejich vnitrodruhové a mezidruhové interakce. Byla rozlišena aktivní a pasivní dominance. Aktivní dominancí rozumíme situaci, kdy byl ústup jednoho jedince vyvolán agonistickým chováním jedince druhého (útok, pronásledování, hrozba). V situaci, kdy byl ústup jedince způsoben pouhou blízkostí protivníka, nazýváme tento postoj pasivní dominancí. Myšice křovinné byly oproti myšicím lesní agresivnější mezi jedinci téhož druhu. Jejich dominance byla zprostředkována aktivní cestou. Naopak u myšic lesních byly vnitrodruhové interakce vyvážené. V mezidruhových interakcích byly myšice lesní pasivně dominantní, patrně z důvodu větší velikosti (Hoffmeyer, 1973).

Samice se pravděpodobně páří pouze s dominantním samcem, avšak s cílem zvýšení reprodukčního úspěchu zřejmě dochází ke kopulaci i s jinými samci (Bryja et al., 2008).

# 6. Materiál a metody

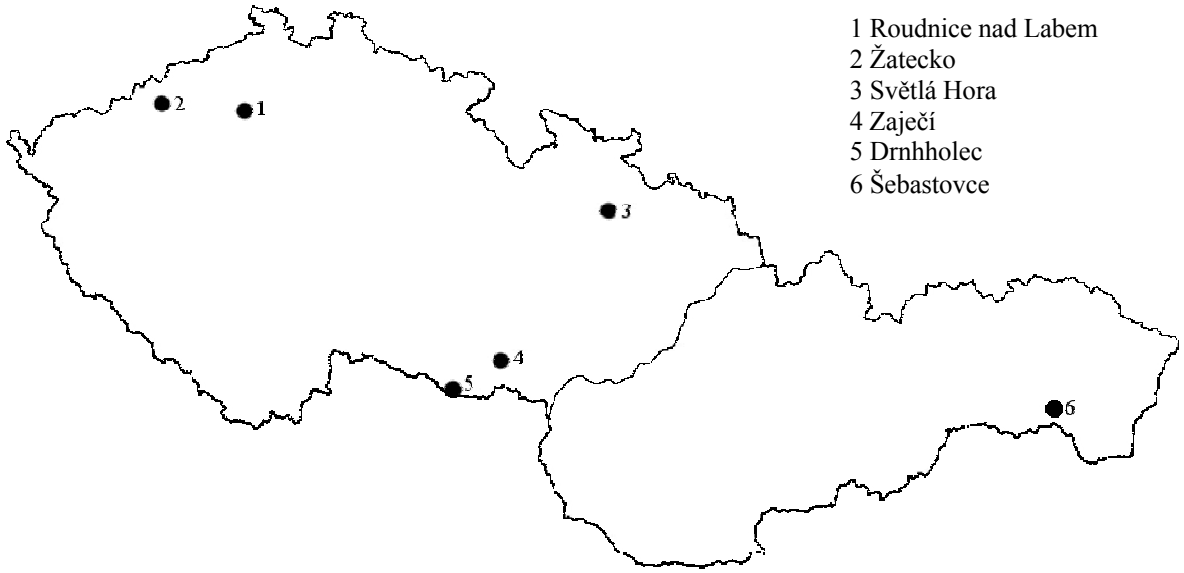
V rámci diplomové práce bylo provedeno několik metod, s jejichž pomocí bylo možné testovat vytyčené hypotézy. Práce počínala odchytem zvířat na jednotlivých lokalitách, vyhodnocení vzorků zahrnovalo proteomické metody, hmotnostní spektrometrii a analýzu získaných sekvencí. Mou náplní byla především proteomická část, metodika zobrazená v boxech je výsledkem spolupráce kolegů a externích pracovníků.

## *6.1. Materiál*

### Experimentální zvířata

Odchyty zvířat probíhaly v průběhu let 2011 – 2014 na několika lokalitách České a Slovenské republiky (Obrázek 3). K chytání byly použity živolovné pasti (Sherman a Chmela). Jedinci byli označeni jedinečným číslem např. 1/130510 (tedy jedinec č. 1 odchycený dne 10. 5. 2013), čímž bylo zbráněno opakovanému testování stejných individuí. Po převozu byli chováni jednotlivě v teráriích T4 (Velaz) se světelným režimem 12:12. Podávána jim byla voda a krmná směs pro myši a potkany ST-1 (Velaz) a to *ad libitum*. Vzorky byly odebrány pouze od dospělých jedinců (starších 6 týdnů).

**Myšice malooká** (*Apodemus uralensis*) (N = 10; 5♂ a 5♀)
**Myšice křovinná** (*Apodemus sylvaticus*) (N = 10; 5♂ a 5♀)
**Myšice lesní** (*Apodemus flavicollis*) (N = 10; 5♂ a 5♀)
**Myš domácí** (*Mus musculus*) (N = 10; 5♂ a 5♀)




**Obrázek 3:Oblasti odchytu experimentálních jedinců v České a Slovenské republice.**

## Chemikálie

Aceton p.a.

Agaróza (A9539, Sigma)

0,5%Bromfenolová modř

DL-Dithiothreitol (D9163, Sigma)

Dodecylsíran sodný – SDS (L3771, Sigma)

Ethanol – denaturovaný

Flamingo Fluorescent Gel Stain (161-0492, BIO-RAD)

Glycerol (G7893, Sigma)

CHAPS hydrát (C9426, Sigma)

Iodoacetamid – IAA (161-0378, BIO-RAD)

36%Kyselina chlorovodíková p.a.

99%Kyselina octová p.a.

Minerální olej (163-2129, BIO-RAD)

Močovina (U6504, Sigma)

β-merkaptoethanol (161-0710, BIO-RAD)

Thiomočovina (T8656, Sigma)

Trizma (T3771-5006, Sigma)

### *Roztoky*

Ekvilibrační pufr – příprava 30 ml (pro 10 gelů)
10,8 g močovina (U6504, Sigma)

7,5 ml Tris-HCl (pH 8, 8; 1, 5 M)

0,6 g Dodecylsíran sodný (L3771, Sigma)

6 ml glycerol (G7893, Sigma)

7,5 ml destilovaná voda

0,6 g DTT (D9163, Sigma) / 0,75 g IAA (161-0378, BIO-RAD)

Fixační roztok
40%denaturovaný ethanol

10%kyselina octová p.a.

Barvící roztok
Flamingo™ Fluorescent Gel Stain(161-0492, BIO-RAD)

Rehydratační pufr – příprava 1 ml

0,42 g močovina (U6504, Sigma)

0,15 g thiomočovina (T8656, Sigma)

0,01 g CHAPS hydrát (C9426, Sigma)

0,0031 g DL-Dithiothreitol (D9163, Sigma)

500 µl $dH_2O$

10 µl amfolyty ReadyStrip 100x pH 3.9.-5.1. (163-2098, BIO-RAD)

10 µl bromfenolová modř

## Další materiál

4-20% Criterion™TGX™ Precast Gel, IPG+1 Well Comb, 11 cm (567-1091, BIO-RAD)

Elektrodové papírky (165-4071, BIO-RAD)

Experion Pro260 Starter Kit (700-7110, BIO-RAD)

ReadyStrip™ IPG Strips (163-2024, BIO-RAD)

Rounded-Bottom Microplates (165-7217, BIO-RAD)

SigmaMarker™low range, mol wt 6,500-66,000 Da (M3913, Sigma)

11cm Focusing Tray With Lid (165-4020, BIO-RAD)

11 cm Rehydration/Equilibration Trays (165-4025, BIO-RAD)

## Přístrojové vybavení

Elektroforéza CRITERION DODECA™CELL (BIO-RAD)

zdroj: POWER-PAC 3000 (BIO-RAD)

chladič: MultiTemp III (Amersham Biosciences)

Experion™ Automated Electrophoresis System (BIO-RAD)

Experion Priming Station (BIO-RAD)

EXQuest Spot Cutter (BIO-RAD)

Fokusátor PROTEAN IEF Cell (BIO-RAD)

Molecular Imager®FX (BIO-RAD)

## 6.2. *Metody*

### 6.2.1. Čipová gelová elektroforéza (Experion)

Výhodou čipové gelové elektroforézy je rychlá simultánní analýza několika vzorků. Jedná se o automatizovaný systém využívající fluorimetrickou detekci. Běh Experionu trvá 30 minut a za tu dobu je možné vyhodnotit 10 vzorků. Kromě rychlé analýzy je dalším pozitivem potřeba minimálního objemu vzorku. Vzorky byly analyzovány za redukujících podmínek.

***Příprava roztoků a vzorků***

Odběr vzorků moči byl proveden jemným stiskem břišní stěny, případně ponecháním jedince v čistém teráriu. Pokud nebyl vzorek vyhodnocen ihned, byl skladován v -20° C.

| DRUH JEDINCE | OBJEM VZORKU SLIN | OBJEM VZORKU MOČI |
|---|---|---|
| *M. musculus musculus* | 1 µ | 0, 1 µ |
| *Apodemus sylvaticus* | 1 µ | 1 µ |
| *Apodemus uralensis* | 1 µ | 1 µ |

**Tabulka 2: Objem vzorků slin a moči**

V první řadě bylo nutné dodané reagencie (součást kitu Experion Pro260) nechat 15 minut vytemperovat při pokojové teplotě a chránit je před světlem. Následně byly krátce promíchány na vortexu a centrifugovány. Příprava bezbarvého gelu, gelu s fluorescenční barvou vzorkového pufru proběhla podle dle následujícího postupu:

<u>Bezbarvý gel (G)</u>

- Celý obsah dodané reagencie G (520 µl) byl přenesen do mikrozkumavky s filtrační kolonkou.
- Filtrace byl provedena centrifugací po dobu 5 minut při 10 000 g.
- Poté byla kolonka vyjmuta a z důvodu citlivosti na světlo byla mikrozkumavka obalena alobalem.

<u>Gel s fluorescenční barvou (GS)</u>

- Nejprve bylo k bezbarvému gelu (520 µl) přidáno 20 µl barvy (Pro260 Stain).
- Vzniklý obarvený gel byl přenesen do mikrozkumavky s filtrační kolonkou a následující potup byl shodný s přípravou bezbarvého gelu (G).

Vzorkový pufr

- Do nové mikrozkumavky bylo aplikováno 30 µl vzorkového pufru a k němu byl přidán 1 µl BME (β-merkaptoethanol).
- Následovalo promíchání na vortexu a centrifugace.

Příprava vzorků a hmotnostního markeru

Příprava vzorků a hmotnostního markeru proběhla stejným způsobem:

- Ke 2 µl vzorkového pufru byly přidány 4 µl vzorku/markeru.
- Po jejich promíchání na vortexu a centrifugaci byly vorky a hmotnostní marker zahřívány ve vodní lázni při teplotě 95 - 100° C po dobu 5 minut.
- Po krátkém ochlazení bylo ke vzorkům i markeru přidáno 84 µl destilované vody a opět následovalo promíchání a centrifugace.

***Příprava čipu***

Nejprve bylo nutné zavést gel do systému mikrokanálků čipu. 12 µl filtrovaného gelu s fluorescenční barvou (GS) bylo opatrně a bez bublin naneseno do jamky značené GS v pravém horním rohu. Čip byl vložen do tzv. „Priming station“ a v průběhu 60 s došlo k iniciaci čipu.

Přebytečný gel byl z jamky GS odstraněn a poté bylo 12 µl roztoku GS aplikováno do všech takto označených jamek (i té sloužící k iniciaci čipu). Do jamky G bylo pipetováno stejné množství bezbarvého gelu (G) a vzorky o objemu 6 µl byly naneseny do jamek 1 - 10. Do poslední zbylé jamky značené L bylo aplikováno 6 µl hmotnostního markeru.

Čip byl ve správné orientaci (podle šipky B3) umístěn do elektroforetické stanice a stiskem zeleného tlačítka a softwaru Experion byla zahájena analýza trvající 30 minut. Po každé analýze bylo nutné očistit elektrody s pomocí čistícího čipu naplněným 800 µl destilované vody.

***Vyhodnocení dat z Experionu***

Výsledkem analýzy je virtuální gel a grafický záznam separačního průběhu analýzy jednotlivých vzorků. Pro následnou kvantitativní analýzu byla použita data shrnutá ve výsledné tabulce (Single Table) a zvolená byla metoda procentuálního určení, protože tato metoda dobře pracuje se vzorky se stejným či podobným proteinovým složením. Další výhodou této metody je, že se obejde bez vnitřních standardů.

### 6.2.2. 2D – elektroforéza

Dvourozměrná elektroforéza je separační technikou, která umožňuje rozdělit proteiny na základě jejich izoelektrických bodů v gradientu pH a ve druhém směru podle jejich velikosti. Prvním metodou je izoelektrická fokusace a ve druhém rozměru dochází s využitím SDS-elektroforézy k rozlišení proteinů dle velikosti. Denaturace proteinů se děje vlivem dodecylsíranu sodného (SDS). Výsledkem je tzv. proteinová mapa. Výhodou oproti předešlé metodě (Experion) je možnost proteiny dále analyzovat.

***Odběr a příprava vzorku***

Vzorek byl získán vypláchnutím ústní dutiny 3x 50 µl destilované vody v rozmezí minimálně jedné hodiny (v ranních hodinách). Pokud nedošlo k okamžitému vyhodnocení s pomocí 2D elektroforézy, byl vzorek zmražen a uchován v -20°C.

Reverzním pipetováním byl vypočítán objem vzorku a následně byl vzorek vysrážen acetonem v poměru 1 : 10 (vzorek : aceton). Vzniklá suspenze byla promíchána na vortexu a centrifugována 5 minut při 13 400 RPM. Aceton byl odsát špičkou. K odpaření zbylého množství acetonu došlo volně na vzduchu, ovšem s ochranou před kontaminací.

***Izoelektrická fokusace (IEF)***

Díky IEF dochází k separaci proteinů dle jejich izoelektrických bodů v gradientu pH (3,9 – 5,1). Proteiny tak putují do místa, kde nemají žádný povrchový náboj, tedy kde pH odpovídá jejich izoelektrickému bodu (pI). S použitím této metody je možné rozlišit proteiny lišící se hodnotami svých izoelektrických bodů pouze o 0,01.

Hodnoty pH stoupají od anody ke katodě. Gradient pH vzniká mezi dvěma elektrodami díky přítomnosti amfolytů a je založen na elektrochemické reakci:

- na anodě $6H_20 \rightarrow 4H_3O^+ + 4e^-$
- na katodě $4H_20 + 4e^- \rightarrow 2H_2 + 4OH^-$

| CHEMICKÁ LÁTKA | ÚČINEK |
|---|---|
| Močovina a thiomočovina | chaotropní činidlo - ruší nekovalentní interakce proteinů a způsobuje jejich denaturaci |
| CHAPS | čistý zwitteriontový detergent – zvyšuje rozpustnost makromolekul |
| DTT | redukční činilo - redukce disulfidických můstků |
| Amfolyty | vytvářejí potřebný pH gradient |
| Bromfenolová modř | umožňuje snazší manipulaci |

**Tabulka 3: Rehydratační pufr pro IEF a účinek jednotlivých složek.**

Po vysušení bylo do pelety přidáno 200 µl rehydratačního pufru. Vzorek byl průběžně po dobu 30 minut promícháván na vortexu a krátce centrifugován.

Rehydratovaný vzorek byl nanesen rovnoměrně po celé délce fokusačního tácku a strip ReadyStrip™ IPG Strips (163-2024, BIO-RAD) byl vložen na vzorek gelem dolů. V průběhu 4 hodin došlo k úplné absorpci vzorku stripem.

Do připraveného fokusačního tácku byly umístěny na katodu i anodu navlhčené elektrodové papírky (165-4071, BIO-RAD). Plochý gel, neboli strip byl umístěny gelem dolů a orientovány dle katody a anody. Následně byl jednotlivý gel zalit 3 ml minerálního oleje (163-2129, BIO-RAD). Připravený tácek byl vložen do fokusátoru PROTEAN IEF Cell (BIO-RAD).

| FÁZE | NAPĚTÍ | ČAS/ Vh | NÁRŮST NAPĚTÍ | TEPLOTA |
|---|---|---|---|---|
| **0** | 50 V | 9 hodin | Lineární | 20° C |
| **1** | 250 V | 15 minut | Strmý | 20° C |
| **2** | 8 000 V | 1 hodina | Strmý | 20° C |
| **3** | 8 000 V | 30 000 V/h | Strmý | 20° C |
| **4** | 500 V | 99 hodin | Strmý | 20° C |

**Tabulka 4: Nastavení izoelektrické fokusace (IEF).**

Druhý den, po dokončení izoelektrické fokusace, byly ploché gely lehce omyty destilovanou vodou a SDS elektrodovým pufrem. Poté byl každý strip umístěn do čistého 11 cm ekvilibračního tácku, zalit 3 ml ekvilibračního pufru DTT a 10 minut třepán na třepačce. Po uplynutí této doby byl strip opláchnut destilovanou vodou a celý postup byl opakován s ekvilibračním pufrem IAA. Nakonec byl strip opláchnut destilovanou vodou a SDS elektrodovým pufrem.

***SDS – elektroforéza***

Rychlost pohybu částic v elektrickém poli je daná jejich velikosti, celkovým povrchovým nábojem, tvarem a velikostí molekuly a její koncentrací. Elektroforéza probíhala ve vertikálním směru a k separaci proteinů docházelo v síti polyakrylamidového gelu. Stupeň polymerizace akrylamidu určuje velikost pórů. Jelikož byly analyzovány neznámé vzorky, byly využity gradientové gely (4 - 20%).

Do jamky gelu 4-20% Criterion™TGX™ Precast Gel (567-1091, BIO-RAD) bylo aplikováno 3,5 µl markeru (SigmaMarker™ low range, M3913, Sigma). Před umístěním

stripu byla velká jamka zalita zahřátou agarózou. Gel byl umístěn do aparatury CRITERION DODECA™CELL (BIO-RAD) a elektroforéza probíhala přibližně 50 minut při napětí 200 V. Vlivem stejnosměrného elektrického pole tak byly proteiny rozděleny na základě jejich molekulové hmotnosti.

***Fixace a barvení gelu***

Gel byl v první fázi fixován za stálého třepání na třepačce ve 200 ml fixačním roztoku po dobu dvou hodin. Po uplynutí této doby byl roztok vyměněn za roztok barvící.

K vizualizaci proteinů došlo díky fluorescenčnímu barvení (Flamingo). Barvivo obsažené v roztoku se navázalo na denaturované proteiny a vznikem této vazby byla detekována fluorescence. K barvení byl využit, přes vakuovou vývěvu, filtrovaný roztok (100 ml/gel). Barvení probíhalo přes noc a vzhledem k citlivosti roztoku na světlo byl gel v průběhu barvení i uchování chráněn před světlem. K vyhodnocení gelů došlo vždy následující den. Gely bylo možné uchovávat ve tmě až 6 měsíců při 2-8°C aniž by došlo k signifikantnímu zhoršení vizualizace.

### 6.2.3. Vyhodnocení 2D gelů

Gel byl zobrazen díky Molecular Imager®FX s externím laserovým modulem (BIO-RAD) a po jeho exportu do požadovaného formátu byl vyhodnocen v programu PDQuest. Spoty pro další analýzu byly z gelu vyjmuty přístrojem EXQuest Spot Cutter a analyzovány hmotnostní spektrometrií. Získané sekvence byly porovnány s databází NCBI a naší lokální (získanou 454 sekvenováním, Sangerovou metodou nebo *de novo* vytvořenými sekvencemi z předchozích analýz hmotnostní spektrometrií).

***Vyhodnocení v programu PDQuest***

Po skenování 2D gelů byly gely zobrazeny v programu PDQuest, který umožňuje analýzu jednotlivých spotů. S pomocí funkce „Advanced crop“ vznikl u všech gelů výřez stejné velikosti a ve stejné oblasti (Obrázek 7B), což je nutným předpokladem pro další analýzu. Poté byl každý gel zbaven nečistot funkcí „Filter Wizard“.

Takto připravené výřezy v oblasti přibližně 0 - 24 kDa mohly být dále analyzovány. Na jednom z gelů byly zvýrazněny tři velikosti spotů (malý, velký a jeden na hranici viditelnosti) a na základě této konfigurace program nastavil automatickou detekci spotů na všech gelech.

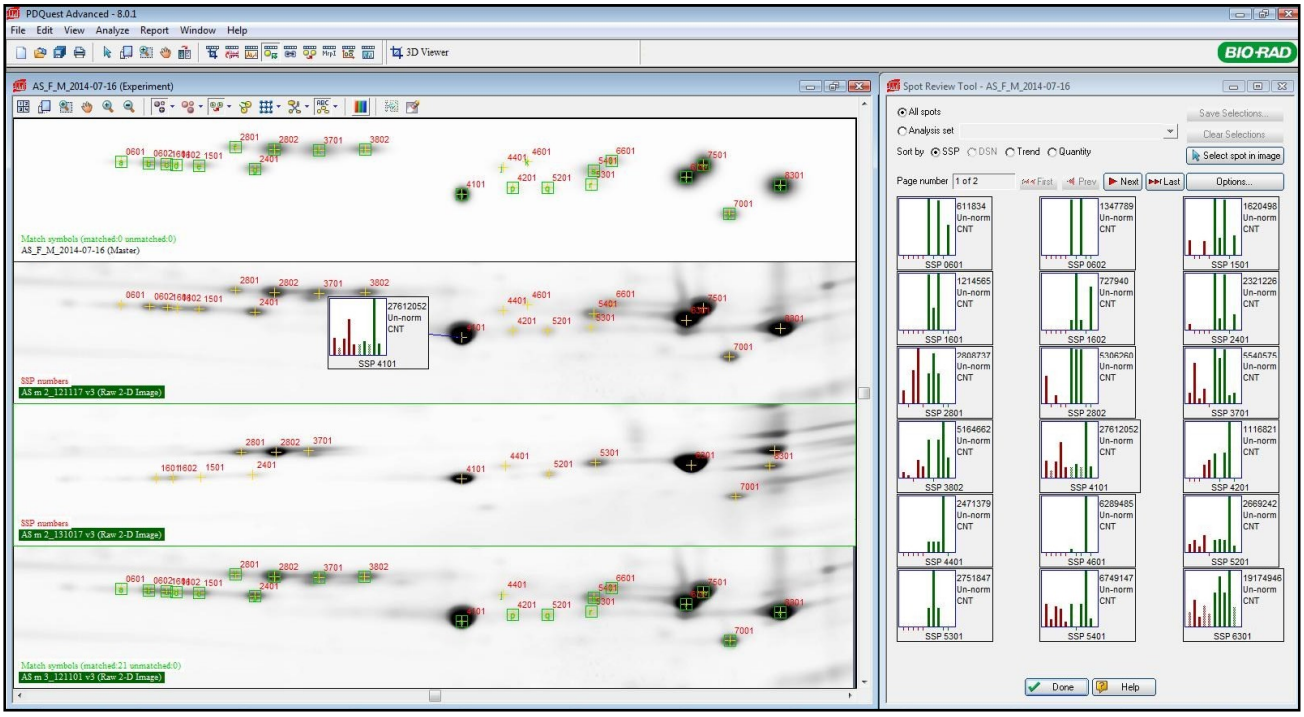
Před experimentem byla data normalizována lokální regresí. Ve finální tabulce byla provedena kontrola detekovaných a spárovaných spotů. Protože program nedokázal přesně rozlišit jednotlivé spoty, musely být některé z nich ručně editovány. Posledním krokem analýzy bylo pospojování stejných spotů na všech gelech. Díky tomu program těmto spotům přiřadil stejné číslo (angl. standard spot number – SSP), které specifikuje jednotlivý spot a jeho XY souřadnice v rámci gelu. Z exportovaných dat, jsem provedla kvantitativní a kvalitativní analýzu.

***Vyříznutí spotů***

Přístroj EXQuest Spot Cutter (BIO-RAD) umožňuje přesnou separaci vybraných spotů, které je pak slouží k další analýze hmotnostní spektrometrií. Je možné zobrazit a separovat spoty ze čtyř gelů (Criterion$^{TM}$, BIO-RAD) zároveň. Vybrané proteiny byly označeny prostřednictvím funkce „Manual Excision Tool“ integrované v softwaru PDQuest a po separaci z gelu přeneseny robotem na destičku obsahující 96 jamek (Rounded-Bottom Microplate, BIO-RAD). V průběhu procesu byla nastavena automatická hydratace gelu a celý průběh bylo možné v reálném čase sledovat v programu.

***Analýza sekvenčních dat***

Získané aminokyselinové sekvence byly převedeny do FASTA formátu a porovnány s databází NCBI a naší lokální databází (vzniklou ze 454 sekvenování, Sangerovou metodou nebo *de novo* vytvořenými sekvencemi z předchozích analýz hmotnostní spektrometrií). Pro srovnání (alignment) sekvencí byl využit program BLAST a ClustalW2.




**Obrázek 4: Prostředí programu PDQuest.** Vlevo nahoře je zobrazen tzv. master gel – průměr z vybraných gelů. Jednotlivé proteiny jsou označeny SSP číslem.

### *Hmotnostní spektrometrie (angl. Mass spectrometry – MS)*

Vybrané spoty byly vyhodnoceny doc. RNDr. Z. Zdráhalem, Ph.D. Vzorky byly nejprve podrobeny proteolýze trypsinem a analyzovány metodou MALDI MS/MS. Hmotnostní spektrometrie je separační technikou, která vzorek převede na ionizovanou plynnou fázi a takto vzniklé ionty separuje podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje fragmentu (m/z). V případě metody MALDI (Matricí Asistovaná Laserová Desorpce) probíhá ionizace laserem za přítomnosti organické matrice. K separaci iontů na základě hodnoty m/z byl využit Orbitrap. MS/MS označuje tandemovou hmotnostní spektrometrii, kdy je detekována jak molekulová hmotnost celého peptidu, tak i jednotlivých fragmentů.

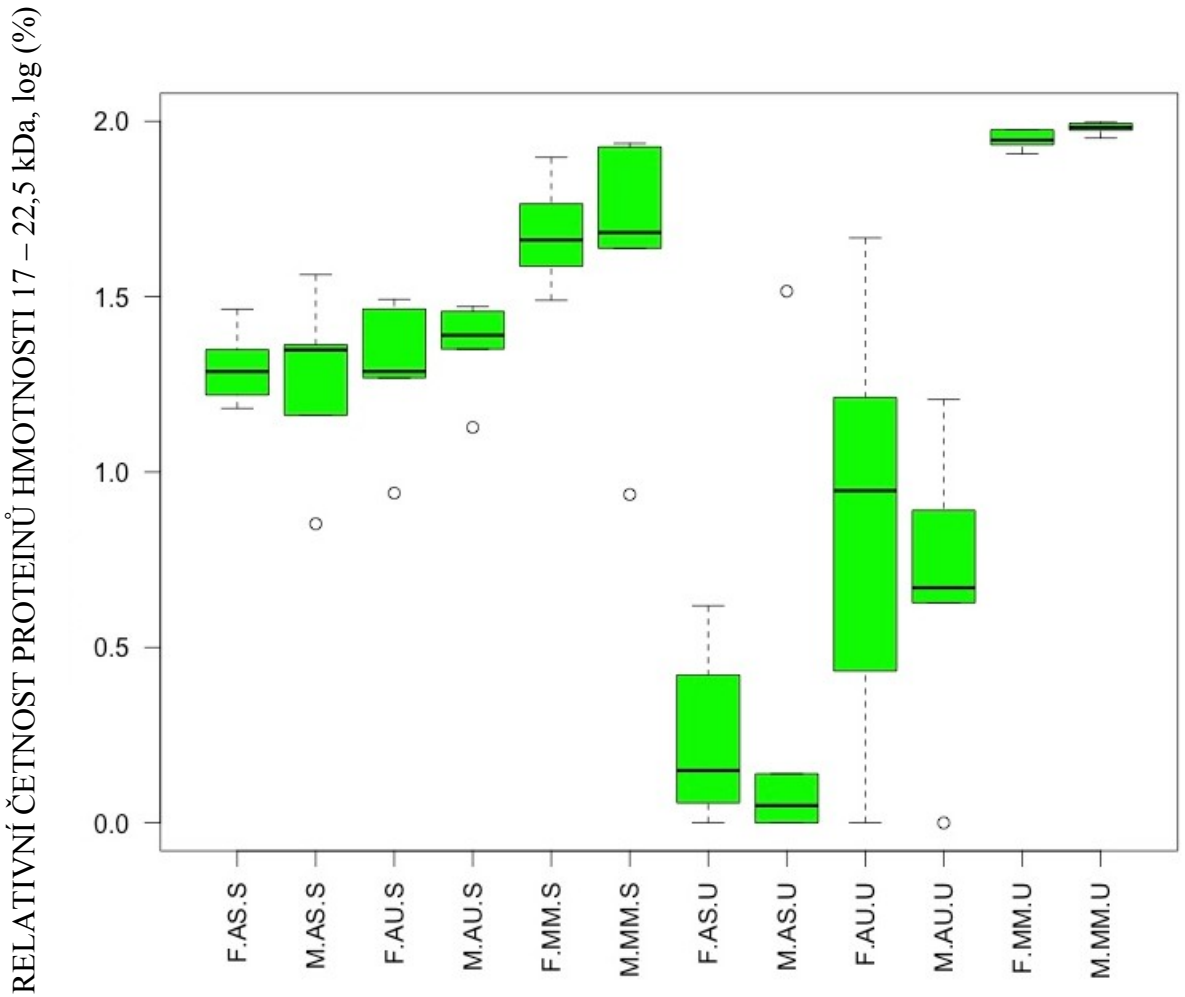
### *Vytvoření lokální databáze*

K usnadnění identifikace proteinů pomocí MS sloužila databáze, která byla vytvořena skupinou doc. P. Stopky, Ph.D. na základě nukleotidových sekvencí lipokalinů (především Obps a Mups) získaných i) sekvenováním (Sanger) a ii) 454 sekvenováním transkriptomu dvou druhů myšic (*A. sylvaticus* a *A. uralensis*).

# 7. Výsledky

## *7.1. Analýza proteinového složení moči a slin*

Prvním z cílů diplomové práce bylo potvrzení či vyvrácení přítomnosti lipokalinů v různých sekretech (moč, sliny) u myšic rodu *Apodemus*. Analýza byla provedena u dvou druhů myšic - *A. sylvaticus* & *A. uralensis*, pozitivní kontrolou byly vzorky (moči, slin) myši domácí, *M. m. musculus*. Použitou metodikou byla čipová gelová elektroforéza – Experion (BIO-RAD). Vzniklé virtuální grafy jsou zobrazeny v Příloze 1. Jelikož byl studován vliv tří kategoriálních faktorů (DRUH, SEX, SEKRET) na sledovanou proměnnou byla data vyhodnocena vícecestnou ANOVOU. Graficky byla data vizualizována boxplotem (Obrázek 5).

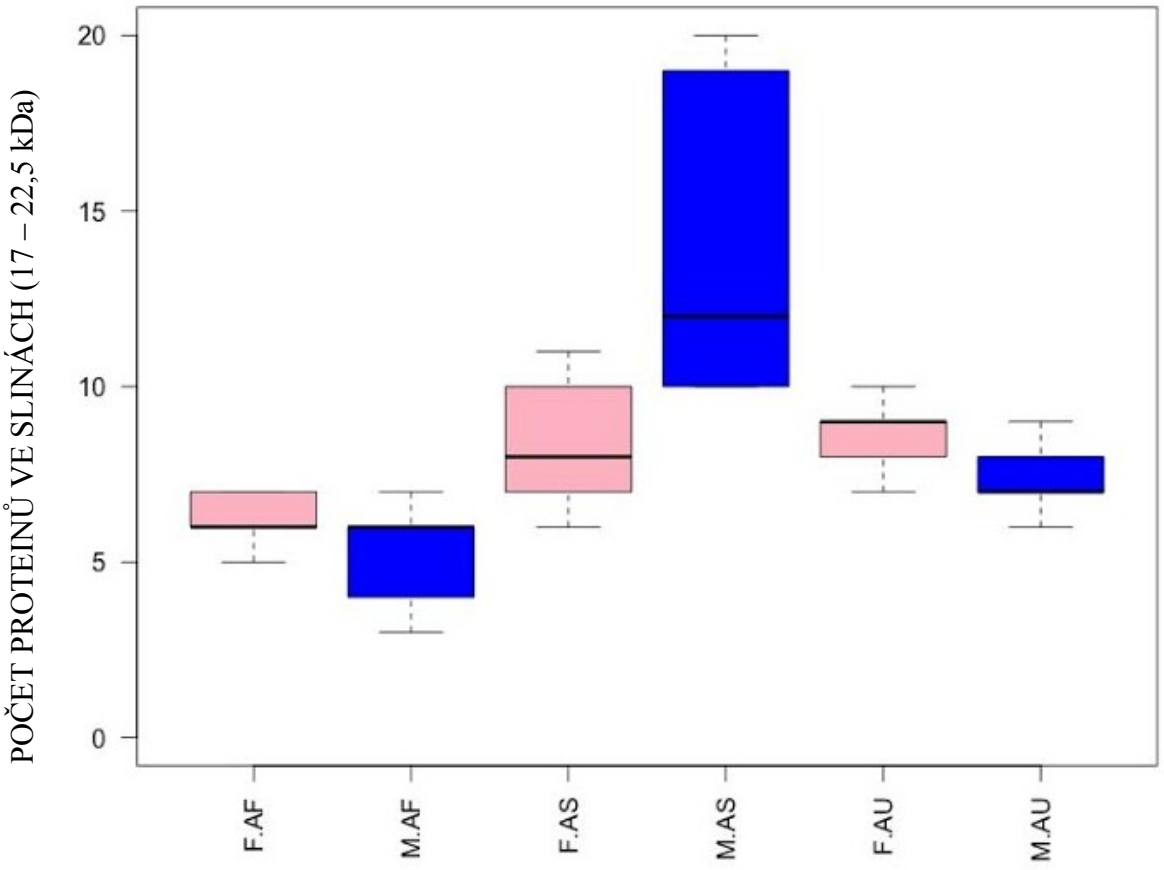



**Obrázek 5: Relativní četnost proteinů hmotnosti 17- 22,5 kDa v moči (U) a slinách (S) myšic rodu *Apodemus* (*A. uralensis* - AU & *A. sylvaticus* - AS), pozitivní kontrolou jsou vzorky moči a slin myši domácí (*M. m. musculus - MM*). Samice (F) a samci (M). Konfidenční interval (α = 0,05).**

Celkem bylo posouzeno 30 vzorků slin ($N_{AS;\ AU;\ MM} = 10$; 5 ♂ a 5 ♀) a stejné množství bylo i vzorků moči. Ke statistickému zpracování bylo využito procentuální určení a vybraná data odpovídala rozmezí 17 – 22,5 kDa. Protože data neměla normální rozdělení, byla před analýzou desítkově logaritmována. Analýza variance prokázala signifikantní vliv faktoru DRUH ($F = 50,66$; $df = 2$; $p < 0,001$), SEKRET ($F = 22,72$; $df = 1$; $p < 0,001$) i aditivní vliv obou těchto faktorů ($F = 19,61$; $df = 2$; $p < 0,001$) na celkové množství lipokalinů. Výsledky post-hoc analýzy (HSD Tukey test) odhalily signifikantní rozdíl v zastoupení lipokalinů v moči a slinách u myšic rodu *Apodemus*. Více lipokalinů ve slinách než v moči bylo identifikováno u *A. sylvaticus* ($p_{AS} = 0,0000003$) i *A. uralensis* ($p_{AU} = 0,0054906$). U myši domácí nebyl tento trend pozorován.

## 7.2. *Kvantitativní analýza proteinů obsažených ve slinách*

S využitím 2D gelové elektroforézy a analýzy v programu PDQuest bylo vyhodnoceno kvantitativní zastoupení slinných proteinů v oblasti přibližně 17 - 22,5 kDa u jednotlivých druhů rodu *Apodemus* (*A. flavicollis*, *A. sylvaticus* & *A. uralensis*). Vzorky slin byly odebrány celkem od 30 jedinců ($N_{AS;\ AU;\ AF} = 10$; 5♂ a 5♀). K ověření homogenity variance byl využit Bartlettův test ($p = 0{,}2349$). Data byla následně analyzována vícecestnou ANOVOU. Ta prokázala signifikantní vliv faktoru DRUH ($F = 17{,}276$; $df = 2$; $p < 0{,}000$) a aditivní vliv faktorů DRUH : SEX ($F = 6{,}525$, $df = 2$, $p = 0{,}005$) . Mnohočetná porovnání (HSD Tukey test) prokázala signifikantní pohlavní dimorfismus v počtu proteinů u druhu *A. sylvaticus* ($p = 0{,}037$). U samců druhu *A. sylvaticus* byla pozorována nejvyšší variabilita v zastoupení jednotlivých proteinů. Post-hoc analýza dále odhalila signifikantní rozdíl v počtu proteinů mezi samci jednotlivých druhů ($p_{AS:AF} = 0{,}0000154$; $p_{AU:AS} = 0{,}0069982$).




**Obrázek 6: Kvantitativní zastoupení proteinů ve slinách u myšic rodu *Apodemus* (*A. flavicollis* – AF; *A. sylvaticus* – AS a *A. uralensis* – AU). Samice (F) a samci (M). Konfidenční interval (α = 0,05).**

## 7.3. *Identifikace proteinů*

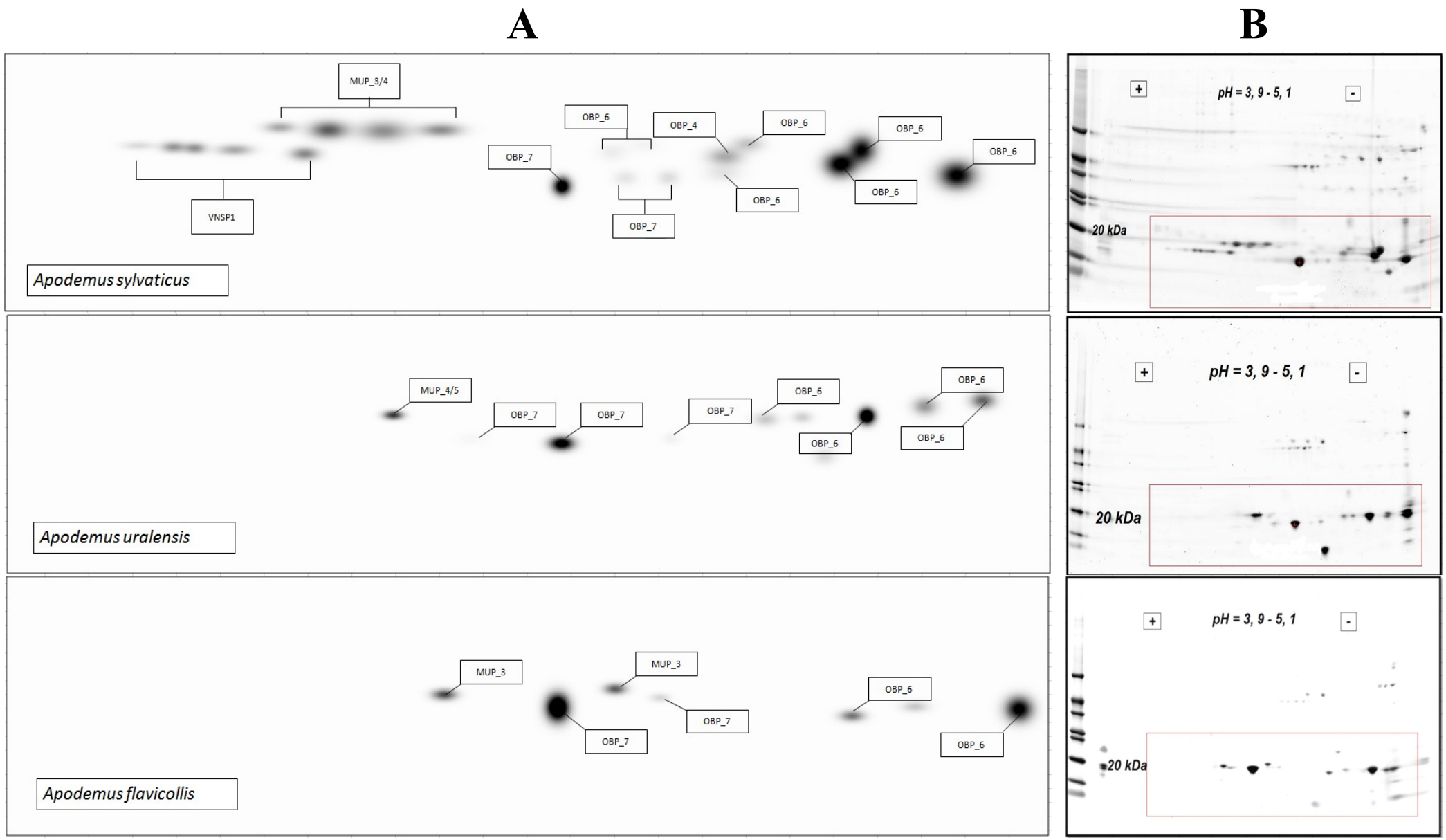
Proteinové sekvence získané metodou MALDI MS/MS byly porovnávány jak s veřejnou databází NCBI tak s naší lokální databází lipokalinů různých druhů hlodavců, které zatím nejsou v NCBI publikované. K porovnání sekvencí byl použit program ClustalW2. Na základě přítomnosti GxW motivu bylo možné rozpoznat proteiny náležící do rodiny lipokalinů. Dle hodnoty SCORE bylo možné nově získané sekvence blíže určit.

U všech tří druhů myšic byly ve slinách identifikovány dva druhy lipokalinů - MUPs a OBPs, u *A. sylvaticus* navíc třetí druh – VNSP1 (LCN3), jehož přítomnost u ostatních dvou druhů nebyla potvrzená (Tabulka 5). MUPs se nacházejí v kyselejší části spektra než OBP, pH VNSP je podobnější MUPs. Vzhledem k neúplnosti identifikovaných sekvencí a poměrně vysoké sekvenční homologii MUPs clusteru nebylo možné zcela přesně určit odpovídající myší ortholog. Nicméně, s jistotou lze říci, že všechny identifikované MUPs exprimované ve slinách myšic náleží do třídy A, tedy starší a divergentnější skupiny těchto lipokalinů. Zajímavostí je, že ve slinách *A. flavicollis* byly identifikovány dvě isoformy MUP3, které se liší svými izoelektrickými body (pI) (Obrázek 7A). U *A. uralensis* byla identifikována pouze jedna isoforma MUP, kdežto u *A. sylvaticus* byly přítomny celkem čtyři isoformy MUPs.

| DRUH | MUP dle NCBI (v závorce podle Logana et al., 2008) | OBP | OSTATNÍ LIPOKALINY |
|---|---|---|---|
| *Apodemus sylvaticus* | MUP 3 (25) nebo 4 (1) | OBP6, OBP7, OBP4 | VNSP1 |
| *Apodemus uralensis* | MUP 4 (1) nebo 5 (18) | OBP6, OBP7 | |
| *Apodemus flavicollis* | MUP 3 (25) | OBP6, OBP7 | |

**Tabulka 5:Identifikované lipokaliny ve slinách myšic rodu *Apodemus*.**

U *A. sylvaticus* byla potvrzena přítomnost OBP4. Ten je na základě přítomnosti motivu (CEKEC) na proteinové úrovni blízký s OBP5 a OBP6 a můžeme je zařadit do jedné skupiny (Stopková et al., 2009). Vzhledem k velké sekvenční podobnosti OBP4 a OBP6 je možné, že OBP6 budou ve skutečnosti také OBP4. Myš má OBP4 jako pseudogen, kdežto u myšice je aktivní a možná i v několika isoformách.




**Obrázek 7: Identifikace lipokalinů ve slinách myšic rodu *Apodemus*.**

A – Průměrné gely jednotlivých druhů myšic (N = 5♂ a 5♀) získané vyhodnocením v programu PDQuest. K identifikaci lipokalinů byla použita hmotnostní spektrometrie MALDI MS/MS. Nepopsané proteiny se nepodařilo blíže určit.



B – Orámován je vybraný výřez proteinů molekulové hmotnosti cca 0 – 24 kDa, které byly dále analyzovány v programu PDQuest.

# 8. Diskuze a závěr

Hlodavci využívají širokou škálu signálů pro získání komplexních informací o okolním světě. Vedle optických, hmatových a akustických jsou zvlášť pro noční živočichy (jakými jsou i myšice rodu *Apodemus*) důležité signály chemické. Výzkum na poli chemické komunikace zahrnuje mnoho vědních disciplín a objasnil řadu faktů, od struktury jednotlivých signálů po behaviorální či fyziologické odpovědi příjemce. Modelovým organismem pro studium chemické signalizace jsou především inbrední kmeny myší. Menší je počet publikací, které se věnují chemické komunikaci u divoce žijících hlodavců.

Myši k chemické signalizaci využívají především moč[12]. Prvním z cílů diplomové práce bylo ověřit, zda je i u myšic moč významným zdrojem MUPs. Prezentované výsledky odhalily, že moč dvou druhů myšic (*A. uralensis* a *A. sylvaticus*) neobsahuje statisticky významné množství proteinů[13], které by odpovídaly lipokalinům. Z tohoto důvodu jsme usoudili, že myšice využívají chemickou komunikaci založenou na jiném principu. Vzhledem k faktu, že k expresi genů pro MUPs nedochází pouze v játrech, ale i v podjazykových, slzných, příušních a mléčných žlázách (Shahan et al., 1987), jsme se zaměřili na analýzu slinných proteinů. Uplatnění slin v chemické komunikaci je dobře prozkoumáno u prasat, u nichž byl identifikován slinný lipokalin (SAL1), který podobně jako MUPs váže ligandy (Marchese et al., 1998). Stejnou metodou jako v případě močových proteinů bylo vyhodnoceno zastoupení slinných proteinů u *A. uralensis* a *A. sylvaticus*. V porovnání s močí bylo zastoupení slinných proteinů signifikantně vyšší u obou těchto druhů myšic. U myši nebyl tento trend pozorován. Zdá se, že myši využívají oba tyto sekrety – moč i sliny.

Podrobná analýza proteinového složení slin tří druhů myšic (*A. uralensis*, *A. sylvaticus* a *A. flavicollis*) potvrdila přítomnost MUPs ve slinách všech testovaných druhů. Nebylo možné přesně určit odpovídající myší ortholog, nicméně všechny identifikované MUPs náleží do třídy A, tedy starší a divergentnější skupiny těchto lipokalinů (Logan et al., 2008). Je známo, že MUPs v moči myší prodlužují účinek pachové stopy (Hurst et al., 1998). Stejným způsobem by mohly fungovat MUPs přítomné ve slinách, tedy snižovat evaporaci ligandů. V procesu hygienického chování (angl. selfgrooming) dochází k deponaci slin do srsti a právě to by mohlo být mechanismem, kterým se MUPs dostávají do kontaktu s vnějším prostředím.

---

[12] Proteinová složka jejich moči obsahuje až 99 % MUPs (Humphries et al., 1999).
[13] Molekulová hmotnost v rozmezí 17 – 22, 5 kDa.

Ve slinách *A. sylvaticus* i *A. flavicollis* byl zastoupen lipokalin MUP3, jehož přítomnost v moči myší je spojována s agonistickým chováním (Kaur et al., 2014). Bylo publikováno, že interexuální i intrasexuální agresivita *A. uralensis* je velmi nízká (Suchomelová & Frynta, 2000), to by mohlo souviset s deficitem MUP3 u tohoto druhu. Ve slinách byly dále identifikovány OBPs. U všech druhů bylo ve slinách přítomno několik isoforem OBP6 i OBP7, u *A. sylvaticus* navíc ještě OBP4. Zajímavostí je, že Obp4, který byl u myši popsán jako nefunkční, je u *A. sylvaticus* aktivní, tedy je překládán do proteinu, který se nám podařilo analyzovat. Ve slinách *A. sylvaticus* jsme dále potvrdili přítomnost dalšího lipokalinu VNSP1, jehož exprese byla popsána ve vomeronasálním orgánu myší (Miyawaki et al., 1994). VNSP1 je kódován geny, které jsou lokalizovány na chromosomu 4 a neobsahuje typický CxxxC motiv. Tato disulfidická vazba byla popsána pouze u OBPs, jejichž geny jsou lokalizovány na myším chromosomu X (Stopková et al., 2014).

Zatímco u *A. sylvaticus* se na proteinové úrovni vyskytují celkem čtyři isoformy MUPs, u *A. flavicollis* nacházíme pouze dvě a u *A. uralensis* jen jednu. Selekčním tlakem, který působí na kvantitu těchto proteinů by mohla být právě intenzita samčí kompetice o samice. Mezi samci a samicemi *A. sylvaticus* byl pozorován nerovnoměrný allogrooming, kdy samci poskytovali péči o srst samic častěji, než se jim dostávalo zpět (Stopka & Macdonald, 1999). Protože více samců pokrývá okrsek samic, může se samice potenciálně pářit s více samci (Tew & Macdonald, 1994), to by mohlo vysvětlovat zvýšenou produkci těchto proteinových přenašečů samci, kteří by mohli jejich prostřednictvím do srsti samic deponovat chemické signály. Behaviorální data naznačují, že k přenosu chemických signálů, které jsou shromažďovány do slin z různých orofaciálních sekrečních tkání, by mohlo docházet přímým kontaktem mezi dvěma jedinci. Tuto hypotézu bych ráda ověřila v budoucím studiu.

Vnitrodruhové srovnání kvantity lipokalinů prokázalo signifikantní pohlavní dimorfismus pouze u druhu *A. sylvaticus*. V mezidruhovém srovnání měli samci *A. sylvaticus* ve srovnání se samci *A. flavicollis* a *A. uralensis* nejvyšší množství těchto slinných proteinů. Mezi samci *A. sylvaticus* byla navíc pozorována značná variabilita v jejich kvantitě. Vyšší hodnoty by mohly souviset s dominantním postavením samce ve skupině. O této možnosti však můžeme jen spekulovat, k ověření by bylo potřeba většího vzorku jedinců.

Lipokaliny nacházíme u prokaryot i eukaryot. Jejich primárním funkcí je zbavování se toxických metabolitů. Lipokaliny pravděpodobně zastávají komplementární úlohu jak v imunitní ochraně organismu, tak i v chemické komunikaci. Je možné, že se funkce OBPs

a MUPs překrývají či doplňují. U norníka rudého (*Myodes glareolus),* nebyla odhalena přítomnost MUPs v moči, naopak se stává dominantním OBPs (Stopková et al., 2010). Recentní publikace přicházejí s hypotézou, že spíše dochází ke komplementaritě jejich funkcí, a to z důvodu jejich aktivní role v jiných hladinách pH (Stopková et al., 2014). Zajímavostí je, že jsme u *A. flavicollis* odhalili dvě genové varianty, případně dvě isoformy, MUP3, které se liší svým umístěním v gradientu pH, což možná souvisí právě s výše zmíněnou komplementaritou.

# Závěr

- S využitím čipové gelové elektroforézy (Experion) jsme analyzovali zastoupení slinných a močových proteinů u *A. sylvaticus* a *A. uralensis*. Ve slinách těchto druhů jsme potvrdili signifikantně vyšší kvantitu kandidátních lipokalinů.

- 2D elektroforéza a následná identifikace proteinů hmotnostní spektrometrií (MALDI MS/SM) potvrdila přítomnost MUPs u všech myšic rodu *Apodemus*. Kromě MUPs jsme ve slinách identifikovali několik variant OBPs a dále VNSP1.

- Vnitrodruhové srovnání potvrdilo signifikantní pohlavní dimorfismus v kvantitě lipokalinů u *A. sylvaticus*.

- Post-hoc analýza (Tukey HSD) odhalila signifikantní rozdíl v kvantitě lipokalinů mezi samci jednotlivých druhů. Největší množství lipokalinů a zároveň i variabilita mezi jedinci byla pozorována u samců promiskuitního druhu *A. sylvaticus*.

# 9. Seznam citované literatury


ANDĚRA, Miloš a Ivan HORÁČEK, 2005: Poznáváme naše savce. *Sobotáles, Praha*, 227 s.

ANDĚRA, Miloš, 2011. Current distributional status of rodents in the Czech Republic (Rodentia). *Lynx, ns*. roč. 42, s. 5–82.

BACCHINI, A., E. GAETANI a A. CAVAGGIONI, 1992. Pheromone binding proteins of the mouse, Mus musculus. *Experientia*. roč. 48, č. 4, s. 419–421.

BEYNON, R. J. a J. L. HURST, 2003. Multiple roles of major urinary proteins in the house mouse, Mus domesticus. *Biochemical Society Transactions*. roč. 31, č. 1, s. 142–146.

BIGNETTI, Enrico, Andrea CAVAGGIONI, Paolo PELOSI, Krishna C. PERSAUD, Robert T. SORBI a Roberto TIRINDELLI, 1985. Purification and characterisation of an odorant-binding protein from cow nasal tissue. *European journal of biochemistry*. roč. 149, č. 2, s. 227–231.

BÍMOVÁ, Barbora, Robert C. KARN a Jaroslav PIÁLEK, 2005. The role of salivary androgen-binding protein in reproductive isolation between two subspecies of house mouse: Mus musculus musculus and Mus musculus domesticus. *Biological Journal of the Linnean Society*. roč. 84, č. 3, s. 349–361.

BÍMOVÁ, Barbora Vošlajerová, Miloš MACHOLÁN, Stuart JE BAIRD, Pavel MUNCLINGER, Petra DUFKOVÁ, Christina M. LAUKAITIS, Robert C. KARN, Kenneth LUZYNSKI, Priscilla K. TUCKER a Jaroslav PIÁLEK, 2011. Reinforcement selection acting on the European house mouse hybrid zone. *Molecular Ecology*. roč. 20, č. 11, s. 2403–2424.

BISHOP, Russell E., 2000. The bacterial lipocalins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. roč. 1482, č. 1, s. 73–83.

BÖCSKEI, Zsolt, Colin R. GROOM, Darren R. FLOWER, Charles E. WRIGHT, Simon EV PHILLIPS, Andrea CAVAGGIONI, John BC FINDLAY a Anthony CT NORTH, 1992. Pheromone binding to two rodent urinary proteins revealed by X-ray crystallography.

BOOTH, W. D. a K. I. VON GLOS, 1991. Pheromaxein, the pheromonal steroid-binding protein, is a major protein synthesized in porcine submaxillary salivary glands. *Journal of endocrinology*. roč. 128, č. 2, s. 205–212.

BOOTH, W. D. a C. A. WHITE, 1988. The isolation, purification and some properties of pheromaxein, the pheromonal steroid-binding protein, in porcine submaxillary glands and saliva. *Journal of endocrinology*. roč. 118, č. 1, s. 47–NP.

BOSSERT, William H. a Edward O. WILSON, 1963. The analysis of olfactory communication among animals. *Journal of theoretical biology*. roč. 5, č. 3, s. 443–469.

BRIAND, Loïc, Jean-Claude HUET, Valérie PEREZ, Guillaume LENOIR, Claude NESPOULOUS, Yves BOUCHER, Didier TROTIER a Jean-Claude PERNOLLET, 2000. Odorant and pheromone binding by aphrodisin, a hamster aphrodisiac protein. *FEBS letters*. roč. 476, č. 3, s. 179–185.

BRIAND, Loïc, Didier TROTIER a Jean-Claude PERNOLLET, 2004. Aphrodisin, an aphrodisiac lipocalin secreted in hamster vaginal secretions. *Peptides*. roč. 25, č. 9, s. 1545–1552.

BRYJA, Josef, Hana PATZENHAUEROVÁ, Tomáš ALBRECHT, Ladislav MOŠANSKÝ, Michal STANKO a Pavel STOPKA, 2008. Varying levels of female promiscuity in four Apodemus mice species. *Behavioral ecology and sociobiology*. roč. 63, č. 2, s. 251–260.

BRYJA, Josef a Pavel STOPKA, 2005. Facultative promiscuity in a presumably monogamous mouse Apodemus microps. *Acta Theriologica*. roč. 50, č. 2, s. 189–196.

BUGOS, Robert C., A. David HIEBER a Harry Y. YAMAMOTO, 1998. Xanthophyll cycle enzymes are members of the lipocalin family, the first identified from plants. *Journal of Biological Chemistry*. roč. 273, č. 25, s. 15321–15324.

CAVAGGIONI, A. a C. MUCIGNAT-CARETTA, 2000. Major urinary proteins, α2Uglobulins and aphrodisin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. roč. 1482, č. 1, s. 218–228.

CAVAGGIONI, A., R. T. SORBI, J. N. KEEN, D. J. C. PAPPIN a J. B. C. FINDLAY, 1987. Homology between the pyrazine-binding protein from nasal mucosa and major urinary proteins. *FEBS letters*. roč. 212, č. 2, s. 225–228.

DA YU LIN, Shao-Zhong Zhang, Eric BLOCK a Lawrence C. KATZ, 2005. Encoding social signals in the mouse main olfactory bulb. *Nature*. roč. 434, č. 7032, s. 470–477.

DESJARDINS, Claude, J. A. MARUNIAK a F. H. BRONSON, 1973. Social rank in house mice: differentiation revealed by ultraviolet visualization of urinary marking patterns. *Science*. roč. 182, č. 4115, s. 939–941.

DØVING, KJELL B. a Didier TROTIER, 1998. Structure and function of the vomeronasal organ. *Journal of Experimental Biology*. roč. 201, č. 21, s. 2913–2925.

DRICKAMER, Lee C., 1995. Rates of urine excretion by house mouse (Mus domesticus): differences by age, sex, social status, and reproductive condition. *Journal of chemical ecology*. roč. 21, č. 10, s. 1481–1493.

FERKIN, Michael H., Evan S. SOROKIN, Michael W. RENFROE a Robert E. JOHNSTON, 1994. Attractiveness of male odors to females varies directly with plasma testosterone concentration in meadow voles. *Physiology & behavior*. roč. 55, č. 2, s. 347–353.

FILIPPUCCI, MAKIA GRAZIA, MILO MACHOLÁN a Johan R. MICHAUX, 2002. Genetic variation and evolution in the genus Apodemus (Muridae: Rodentia). *Biological Journal of the Linnean Society*. roč. 75, č. 3, s. 395–419.

FLOWER, 2000. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochimica et Biophysica Acta*. roč. 2000, s. 9–23.

FLOWER, D., 1996. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J*. roč. 318, s. 1–14.

FLOWER, Darren R., ANTHONY CT NORTH a Teresa K. ATTWOOD, 1993. Structure and sequence relationships in the lipocalins and related proteins. *Protein Science*. roč. 2, č. 5, s. 753–761.

FRYNTA, D., A. EXNEROVÁ a A. NOVÁKOVÁ, 1995. Intraspecific behaviour interactions in the striped-field mouse (Apodemus agrarius) and its interspecific relationships to the wood mouse (Apodemus sylvaticus): dyadic encounters in a neutral cage. *Acta Soc Zool Bohem*. roč. 59, s. 53–62.

FUSS, Stefan H., Masayo OMURA a Peter MOMBAERTS, 2005. The Grueneberg ganglion of the mouse projects axons to glomeruli in the olfactory bulb. *European Journal of Neuroscience*. roč. 22, č. 10, s. 2649–2654.

GANFORNINA, M. D., Diego SANCHEZ, Lesley H. GREENE a Darren R. FLOWER, 2006. The lipocalin protein family: protein sequence, structure and relationship to the calycin superfamily. *Lipocalins*. s. 17–27.

GETCHELL, Thomas V., Frank L. MARGOLIS a Marilyn L. GETCHELL, 1984. Perireceptor and receptor events in vertebrate olfaction. *Progress in neurobiology*. roč. 23, č. 4, s. 317–345.

GRÜNEBERG, Hans, 1973. A ganglion probably belonging to the N. terminalis system in the nasal mucosa of the mouse. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*. roč. 140, č. 1, s. 39–52.

GRZYB, Joanna, Dariusz LATOWSKI a Kazimierz STRZAŁKA, 2006. Lipocalins–a family portrait. *Journal of plant physiology*. roč. 163, č. 9, s. 895–915.

GUIRAUDIE, Gaëlle, Patrick PAGEAT, Anne-Hélène CAIN, Iltud MADEC a Patricia NAGNAN-LE MEILLOUR, 2003. Functional characterization of olfactory binding proteins for appeasing compounds and molecular cloning in the vomeronasal organ of pre-pubertal pigs. *Chemical senses*. roč. 28, č. 7, s. 609–619.

HAGEMEYER, Petra, Sabine BEGALL, Katerina JANOTOVÁ, Josephine TODRANK, Giora HETH, Petr L. JEDELSKÝ, Hynek BURDA a Pavel STOPKA, 2011. Searching for major urinary proteins (MUPs) as chemosignals in urine of subterranean rodents. *Journal of chemical ecology*. roč. 37, č. 7, s. 687–694.

HAJJAR, Eric, David PERAHIA, Hélène DÉBAT, Claude NESPOULOUS a Charles H. ROBERT, 2006. Odorant binding and conformational dynamics in the odorant-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*. roč. 281, č. 40, s. 29929–29937.

HASTIE, Nicholas D., William A. HELD a John J. TOOLE, 1979. Multiple genes coding for the androgen-regulated major urinary proteins of the mouse. *Cell*. roč. 17, č. 2, s. 449–457.

HENZEL, W. J., Henry RODRIGUEZ, Alan G. SINGER, John T. STULTS, F. MACRIDES, W. C. AGOSTA a Hugh NIALL, 1988. The primary structure of aphrodisin. *Journal of Biological Chemistry*. roč. 263, č. 32, s. 16682–16687.

HOFFMEYER, Inge, 1973. Interaction and habitat selection in the mice Apodemus flavicollis and A. sylvaticus. *Oikos*. s. 108–116.

HUMPHRIES, R. E., D. H. L. ROBERTSON, R. J. BEYNON a J. L. HURST, 1999a. Unravelling the chemical basis of competitive scent marking in house mice. *Animal behaviour*. roč. 58, č. 6, s. 1177–1190.

HURST, Jane L., 1990. Urine marking in populations of wild house mice, Mus domesticus, rutty. I. Communication between males. *Animal Behaviour*. roč. 40, č. 2, s. 209–222.

HURST, Jane L., 2009. Female recognition and assessment of males through scent. *Behavioural brain research*. roč. 200, č. 2, s. 295–303.

HURST, Jane L. a Robert J. BEYNON, 2004. Scent wars: the chemobiology of competitive signalling in mice. *Bioessays*. roč. 26, č. 12, s. 1288–1298.

HURST, Jane L., Caroline E. PAYNE, Charlotte M. NEVISON, Amr D. MARIE, Richard E. HUMPHRIES, Duncan HL ROBERTSON, Andrea CAVAGGIONI a Robert J. BEYNON, 2001. Individual recognition in mice mediated by major urinary proteins. *Nature*. roč. 414, č. 6864, s. 631–634.

HURST, JANE L., DUNCAN HL ROBERTSON, URSULA TOLLADAY a ROBERT J. BEYNON, 1998a. Proteins in urine scent marks of male house mice extend the longevity of olfactory signals. *Animal behaviour*. roč. 55, č. 5, s. 1289–1297.

CHAMERO, Pablo, Tobias F. MARTON, Darren W. LOGAN, Kelly FLANAGAN, Jason R. CRUZ, Alan SAGHATELIAN, Benjamin F. CRAVATT a Lisa STOWERS, 2007. Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. *Nature*. roč. 450, č. 7171, s. 899–902.

CHARRON, Jean-Benoit F. a Fathey SARHAN, 2006. Plant lipocalins. *Lipocalins*. s. 41.

CHEETHAM, Sarah A., Abigail L. SMITH, Stuart D. ARMSTRONG, Robert J. BEYNON a Jane L. HURST, 2009. Limited variation in the major urinary proteins of laboratory mice. *Physiology & behavior*. roč. 96, č. 2, s. 253–261.

CHEETHAM, Sarah A., Michael D. THOM, Francine JURY, William ER OLLIER, Robert J. BEYNON a Jane L. HURST, 2007. The genetic basis of individual-recognition signals in the mouse. *Current Biology*. roč. 17, č. 20, s. 1771–1777.

JANOTOVÁ, Katerina a Pavel STOPKA, 2009. Mechanisms of chemical communication: the role of Major Urinary Proteins. *Folia Zool*. roč. 58, č. Supplement 1, s. 41–55.

JANOTOVÁ, Katerina a Pavel STOPKA, 2011. The level of major urinary proteins is socially regulated in wild Mus musculus musculus. *Journal of chemical ecology*. roč. 37, č. 6, s. 647–656.

JEMIOLO, Bozena, Scott HARVEY a Milos NOVOTNY, 1986a. Promotion of the Whitten effect in female mice by synthetic analogs of male urinary constituents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. roč. 83, č. 12, s. 4576–4579.

JOHNSTON, Robert E., 2003. Chemical communication in rodents: from pheromones to individual recognition. *Journal of Mammalogy*. roč. 84, č. 4, s. 1141–1162.

KARN, Robert C., 2013. Evolution of Rodent Pheromones: A Review of the ABPs with Comparison to the ESPs and the MUPs. *International Journal of Biochemistry Research & Review*. roč. 3, č. 4, s. 328–363.

KAUR, Angeldeep W., Tobias ACKELS, Tsung-Han KUO, Annika CICHY, Sandeepa DEY, Cristen HAYS, Maria KATERI, Darren W. LOGAN, Tobias F. MARTON a Marc SPEHR, 2014. Murine Pheromone Proteins Constitute a Context-Dependent Combinatorial Code Governing Multiple Social Behaviors. *Cell*. roč. 157, č. 3, s. 676–688.

KEVERNE, Eric B., 1999. The vomeronasal organ. *Science*. roč. 286, č. 5440, s. 716–720.

KNOPF, JOHN L., J. F. GALLAGHER a W. A. HELD, 1983. Differential, multihormonal regulation of the mouse major urinary protein gene family in the liver. *Molecular and cellular biology*. roč. 3, č. 12, s. 2232–2240.

LAZAR, Josef, David R. GREENWOOD, L. E. L. RASMUSSEN a Glenn D. PRESTWICH, 2002. Molecular and functional characterization of an odorant binding protein of the Asian elephant, Elephas maximus: implications for the role of lipocalins in mammalian olfaction. *Biochemistry*. roč. 41, č. 39, s. 11786–11794.

LEINDERS-ZUFALL, Trese, Andrew P. LANE, Adam C. PUCHE, Weidong MA, Milos V. NOVOTNY, Michael T. SHIPLEY a Frank ZUFALL, 2000. Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. *Nature*. roč. 405, č. 6788, s. 792–796.

LÖBEL, Dietrich, Silvana MARCHESE, Jürgen KRIEGER, Paolo PELOSI a Heinz BREER, 1998. Subtypes of odorant-binding proteins. *European Journal of Biochemistry*. roč. 254, č. 2, s. 318–324.

LOEBEL, Dietrich, Andrea SCALONI, Sara PAOLINI, Carlo FINI, Lino FERRARA, Heinz BREER a P. PELOSI, 2000. Cloning, post-translational modifications, heterologous expression and ligand-binding of boar salivary lipocalin. *Biochem. J*. roč. 350, s. 369–379.

LOGAN, Darren W., Tobias F. MARTON a Lisa STOWERS, 2008. Species specificity in major urinary proteins by parallel evolution. *PLoS One*. roč. 3, č. 9, s. e3280.

LÜCKE, Christian, Lorella FRANZONI, Francesco ABBATE, Frank LÖHR, Elena FERRARI, Robert T. SORBI, Heinz RÜTERJANS a Alberto SPISNI, 1999. Solution structure of a recombinant mouse major urinary protein. *European Journal of Biochemistry*. roč. 266, č. 3, s. 1210–1218.

LUO, Minmin, Michale S. FEE a Lawrence C. KATZ, 2003. Encoding pheromonal signals in the accessory olfactory bulb of behaving mice. *Science*. roč. 299, č. 5610, s. 1196–1201.

MA, Minghong, Xavier GROSMAITRE, Carrie L. IWEMA, Harriet BAKER, Charles A. GREER a Gordon M. SHEPHERD, 2003. Olfactory signal transduction in the mouse septal organ. *The Journal of neuroscience*. roč. 23, č. 1, s. 317–324.

MACINNES, J. I., E. S. NOZIK a D. T. KURTZ, 1986. Tissue-specific expression of the rat alpha 2u globulin gene family. *Molecular and cellular biology*. roč. 6, č. 10, s. 3563–3567.

MÄGERT, H. J., Thorsten HADRYS, A. CIESLAK, A. GRÖGER, Stephan FELLER a Wolf-Georg FORSSMANN, 1995. cDNA sequence and expression pattern of the putative pheromone carrier aphrodisin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. roč. 92, č. 6, s. 2091–2095.

MÄGERT, Hans-Jürgen, Alexandra CIESLAK, Ozan ALKAN, Bernhard LÜSCHER, Wolfgang KAUFFELS a Wolf-Georg FORSSMANN, 1999. The Golden Hamster Aphrodisin gene structure, expression in parotid glands of female animals, and comparison with a similar murine gene. *Journal of Biological Chemistry*. roč. 274, č. 1, s. 444–450.

MARCHESE, Silvana, Daniela PES, Andrea SCALONI, Virginia CARBONE a Paolo PELOSI, 1998. Lipocalins of boar salivary glands binding odours and pheromones. *European journal of biochemistry*. roč. 252, č. 3, s. 563–568.

MARCHLEWSKA-KOJ, A., E. POCHROŃ a A. ŚLIWOWSKA, 1990. Salivary glands and preputial glands of males as source of estrus-stimulating pheromone in female mice. *Journal of chemical ecology*. roč. 16, č. 10, s. 2817–2822.

MARSHALL, David A. a Joel A. MARUNIAK, 1986. Masera's organ responds to odorants. *Brain research*. roč. 366, č. 1, s. 329–332.

MATARAZZO, Valéry, Nicole ZSÜRGER, Jean-Claude GUILLEMOT, Olivier CLOT-FAYBESSE, Jean-Marie BOTTO, Claude DAL FARRA, Marc CROWE, Jacques DEMAILLE, Jean-Pierre VINCENT a Jean MAZELLA, 2002. Porcine odorant-binding protein selectively binds to a human olfactory receptor. *Chemical senses*. roč. 27, č. 8, s. 691–701.

MIYAWAKI, A., F. MATSUSHITA, Y. RYO a K. MIKOSHIBA, 1994. Possible pheromone-carrier function of two lipocalin proteins in the vomeronasal organ. *The EMBO journal*. roč. 13, č. 24, s. 5835.

MORÈ, Lorenzo, 2006. Mouse major urinary proteins trigger ovulation via the vomeronasal organ. *Chemical senses*. roč. 31, č. 5, s. 393–401.

MUCIGNAT-CARETTA, C., M. REDAELLI, A. ORSETTI, M. PERRIAT-SANGUINET, G. ZAGOTTO a G. GANEM, 2010. Urinary volatile molecules vary in males of the 2 European subspecies of the house mouse and their hybrids. *Chemical senses*. roč. 35, č. 8, s. 647–654.

MUCIGNAT-CARETTA, Carla, Antonio CARETTA a Andrea CAVAGGIONI, 1995. Acceleration of puberty onset in female mice by male urinary proteins. *The Journal of physiology*. roč. 486, č. Pt 2, s. 517–522.

MUNGER, Steven D., Trese LEINDERS-ZUFALL a Frank ZUFALL, 2009. Subsystem organization of the mammalian sense of smell. *Annual review of physiology*. roč. 71, s. 115–140.

NESPOULOUS, C., L. BRIAND, M.-M. DELAGE, V. TRAN a J.-C. PERNOLLET, 2004. Odorant binding and conformational changes of a rat odorant-binding protein. *Chemical senses*. roč. 29, č. 3, s. 189–198.

NEVISON, C. M., C. J. BARNARD a J. L. HURST, 2003. The consequence of inbreeding for modulating social relationships between competitors. *Applied Animal Behaviour Science*. roč. 81, č. 4, s. 387–398.

NEVISON, Charlotte M., Christopher J. BARNARD, Robert J. BEYNON a Jane L. HURST, 2000. The consequences of inbreeding for recognizing competitors. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. roč. 267, č. 1444, s. 687–694.

NOVOTNY, M. V., 2003. Pheromones, binding proteins and receptor responses in rodents. *Biochemical Society Transactions*. roč. 31, č. 1, s. 117–122.

NOVOTNY, Milos, Scott HARVEY, Bozena JEMIOLO a Jeffrey ALBERTS, 1985. Synthetic pheromones that promote inter-male aggression in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. roč. 82, č. 7, s. 2059–2061.

NOVOTNY, Milos V. a D. WIESLER, 1999. 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 of London. Series B: Biological Sciences*. roč. 266, č. 1432, s. 2017–2022.

PELOSI, P., 2001. The role of perireceptor events in vertebrate olfaction. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. roč. 58, č. 4, s. 503–509.

PELOSI, Paolo, 1998. Odorant-Binding Proteins: Structural Aspects. *Annals of the New York Academy of Sciences*. roč. 855, č. 1, s. 281–293.

PES, Daniela, Massimo DAL MONTE, Monica GANNI a Paolo PELOSI, 1992. Isolation of two odorant-binding proteins from mouse nasal tissue. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. roč. 103, č. 4, s. 1011–1017.

PES, Daniela a Paolo PELOSI, 1995. Odorant-binding proteins of the mouse. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. roč. 112, č. 3, s. 471–479.

PEVSNER, J., V. HOU, A. M. SNOWMAN a S. H. SNYDER, 1990. Odorant-binding protein. Characterization of ligand binding. *Journal of Biological Chemistry*. roč. 265, č. 11, s. 6118–6125.

RICH, Tracey J. a Jane L. HURST, 1999. The competing countermarks hypothesis: reliable assessment of competitive ability by potential mates. *Animal Behaviour*. roč. 58, č. 5, s. 1027–1037.

ROBERTS, Sarah A., Deborah M. SIMPSON, Stuart D. ARMSTRONG, Amanda J. DAVIDSON, Duncan H. ROBERTSON, Lynn MCLEAN, Robert J. BEYNON a Jane L. HURST, 2010. Darcin: a male pheromone that stimulates female memory and sexual attraction to an individual male's odour. *BMC biology*. roč. 8, č. 1, s. 75.

ROBERTSON, D. H., Jane L. HURST, Mark S. BOLGAR, Simon J. GASKELL a Robert J. BEYNON, 1997. Molecular heterogeneity of urinary proteins in wild house mouse populations. *Rapid communications in mass spectrometry*. roč. 11, č. 7, s. 786–790.

ROBERTSON, Duncan HL, Jane L. HURST, Jeremy B. SEARLE, İslam GÜNDÜZ a Robert J. BEYNON, 2007. Characterization and comparison of major urinary proteins from the house mouse, Mus musculus domesticus, and the aboriginal mouse, Mus macedonicus. *Journal of chemical ecology*. roč. 33, č. 3, s. 613–630.

ROBERTSON, Duncan, Jane HURST, Simon HUBBARD, Simon J. GASKELL a Robert BEYNON, 1998. Ligands of urinary lipocalins from the mouse: uptake of environmentally derived chemicals. *Journal of chemical ecology*. roč. 24, č. 7, s. 1127–1140.

ROY, Arun K., T. Surend NATH, N. M. MOTWANI a B. CHATTERJEE, 1983. Age-dependent regulation of the polymorphic forms of alpha 2u-globulin. *Journal of Biological Chemistry*. roč. 258, č. 16, s. 10123–10127.

ROY, Arun K. a Otto W. NEUHAUS, 1966. Proof of the hepatic synthesis of a sex-dependent protein in the rat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. roč. 127, č. 1, s. 82–87.

RÜMKE, Ph a P. J. THUNG, 1964. Immunological studies on the sex-dependent prealbumin in mouse urine and on its occurrence in the serum. *Acta endocrinologica*. roč. 47, č. 1, s. 156–164.

RUSU, Alina S., Sven KRACKOW, Petr L. JEDELSKY, Pavel STOPKA a Barbara KÖNIG, 2008. A qualitative investigation of major urinary proteins in relation to the onset of aggressive behavior and dispersive motivation in male wild house mice (Mus musculus domesticus). *Journal of Ethology*. roč. 26, č. 1, s. 127–135.

SALIER, Jean-Philippe, 2000. Chromosomal location, exon/intron organization and evolution of lipocalin genes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. roč. 1482, č. 1, s. 25–34.

SAM, Mehran, Sadhna VORA, Bettina MALNIC, Weidong MA, Milos V. NOVOTNY a Linda B. BUCK, 2001. Neuropharmacology: Odorants may arouse instinctive behaviours. *Nature*. roč. 412, č. 6843, s. 142–142.

SAMPSELL, Bonnie M. a William A. HELD, 1985. Variation in the major urinary protein multigene family in wild-derived mice. *Genetics*. roč. 109, č. 3, s. 549–568.

SANSOM, Clare E., Anthony CT NORTH a Lindsay SAWYER, 1994. Structural analysis and classification of lipocalins and related proteins using a profile-search method. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. roč. 1208, č. 2, s. 247–255.

SHAHAN, K., M. DENARO, M. GILMARTIN, Y. SHI a E. DERMAN, 1987. Expression of six mouse major urinary protein genes in the mammary, parotid, sublingual, submaxillary, and lachrymal glands and in the liver. *Molecular and cellular biology*. roč. 7, č. 5, s. 1947–1954.

SHARROW, Scott D., Jeffrey L. VAUGHN, Lukáš ŽÍDEK, Milos V. NOVOTNY a Martin J. STONE, 2002. Pheromone binding by polymorphic mouse major urinary proteins. *Protein Science*. roč. 11, č. 9, s. 2247–2256.

SHERBORNE, Amy L., Michael D. THOM, Steve PATERSON, Francine JURY, William ER OLLIER, Paula STOCKLEY, Robert J. BEYNON a Jane L. HURST, 2007. The genetic basis of inbreeding avoidance in house mice. *Current Biology*. roč. 17, č. 23, s. 2061–2066.

SHIPLEY, Michael T., Matthew ENNIS a Adam C. PUCHE, 2008. The olfactory system. In: *Neuroscience in Medicine*. B.m.: Springer, s. 611–622. ISBN 1603274545.

SIGNORET, J. P., 1970. Reproductive-behaviour of pigs. *Journal of reproduction and fertility*. č. Suppl. 11, s. 105–117.

SINGER, A. G., F. MACRIDES, A. N. CLANCY a W. C. AGOSTA, 1986. Purification and analysis of a proteinaceous aphrodisiac pheromone from hamster vaginal discharge. *Journal of Biological Chemistry*. roč. 261, č. 28, s. 13323–13326.

SINGER, Alan G. a Foteos MACRIDES, 1990. Aphrodisin: pheromone or transducer? *Chemical Senses*. roč. 15, č. 2, s. 199–203.

SPINELLI, Silvia, Florence VINCENT, Paolo PELOSI, Mariella TEGONI a Christian CAMBILLAU, 2002. Boar salivary lipocalin. *European Journal of Biochemistry*. roč. 269, č. 10, s. 2449–2456.

STERN, Kathleen a Martha K. MCCLINTOCK, 1998. Regulation of ovulation by human pheromones. *Nature*. roč. 392, č. 6672, s. 177–179.

STOPKA, P. a D. W. MACDONALD, 1998. Signal interchange during mating in the wood mouse (Apodemus sylvaticus): the concept of active and passive signalling. *Behaviour*. s. 231–249.

STOPKA, Pavel a Romana GRACIASOVÁ, 2001. Conditional allogrooming in the herb-field mouse. *Behavioral Ecology*. roč. 12, č. 5, s. 584–589.

STOPKA, Pavel, Katerina JANOTOVA a David HEYROVSKY, 2007. The advertisement role of major urinary proteins in mice. *Physiology & behavior*. roč. 91, č. 5, s. 667–670.

STOPKA, Pavel a David W. MACDONALD, 1999. The market effect in the wood mouse, Apodemus sylvaticus: selling information on reproductive status. *Ethology*. roč. 105, č. 11, s. 969–982.

STOPKOVÁ, R., P. STOPKA, K. JANOTOVÁ a P. L. JEDELSKÝ, 2007. Species-specific expression of major urinary proteins in the house mice (Mus musculus musculus and Mus musculus domesticus). *Journal of chemical ecology*. roč. 33, č. 4, s. 861–869.

STOPKOVÁ, Romana, Denisa HLADOVCOVA, Juraj KOKAVEC, Daniel VYORAL a Pavel STOPKA, 2009. Multiple roles of secretory lipocalins (MUP, OBP) in mice. *Folia Zoologica*. roč. 58, s. 29–40.

STOPKOVÁ, Romana, Zbyněk ZDRÁHAL, Štěpán RYBA, Ondřej ŠEDO, Martin ŠANDERA a Pavel STOPKA, 2010. Novel OBP genes similar to hamster Aphrodisin in the bank vole, Myodes glareolus. *BMC genomics*. roč. 11, č. 1, s. 45.

STOPKOVÁ, Romana, Barbora DUDKOVÁ, Petra HÁJKOVÁ a Pavel STOPKA, 2014. Complementary roles of mouse lipocalins in chemical communication and immunity. *Biochemical Society Transactions*. roč. 42, č. 4, s. 893–898.

STORAN, Melonie Joanne a Brian KEY, 2006. Septal organ of Grüneberg is part of the olfactory system. *Journal of Comparative Neurology*. roč. 494, č. 5, s. 834–844.

STROTMANN, Jörg a Heinz BREER, 2011. Internalization of odorant-binding proteins into the mouse olfactory epithelium. *Histochemistry and cell biology*. roč. 136, č. 3, s. 357–369.

SUCHOMELOVÁ, E. a D. FRYNTA, 2000. Intraspecific behavioural interactions in Apodemus microps: a peaceful mouse? *Zeszyty Problemowe Postepow Nauk Rolniczych*. roč. 45, s. 201–209.

TAYLOR, Andrew J., David J. COOK a David J. SCOTT, 2008. Role of odorant binding proteins: Comparing hypothetical mechanisms with experimental data. *Chemosensory Perception*. roč. 1, č. 2, s. 153–162.

TEW, T. E. a D. W. MACDONALD, 1994. Dynamics of space use and male vigour amongst wood mice, Apodemus sylvaticus, in the cereal ecosystem. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. roč. 34, č. 5, s. 337–345.

THOM, Michael D., Paula STOCKLEY, Francine JURY, William ER OLLIER, Robert J. BEYNON a Jane L. HURST, 2008. The direct assessment of genetic heterozygosity through scent in the mouse. *Current Biology*. roč. 18, č. 8, s. 619–623.

TIMM, David E., L. J. BAKER, Heather MUELLER, Lukas ZIDEK a Milos V. NOVOTNY, 2001. Structural basis of pheromone binding to mouse major urinary protein (MUP-I). *Protein Science*. roč. 10, č. 5, s. 997–1004.

TRINH, Kien a Daniel R. STORM, 2003. Vomeronasal organ detects odorants in absence of signaling through main olfactory epithelium. *Nature neuroscience*. roč. 6, č. 5, s. 519–525.

VAN DER LEE, S. a L. M. BOOT, 1955. Spontaneous pseudopregnancy in mice. *Acta physiologica et pharmacologica Neerlandica*. roč. 4, č. 3, s. 442.

VANDENBERGH, John G., J. M. WHITSETT a JOSEPH R. LOMBARDI, 1975. Partial isolation of a pheromone accelerating puberty in female mice. *Journal of reproduction and fertility*. roč. 43, č. 3, s. 515–523.

WHITTEN, W. K., F. H. BRONSON a J. A. GREENSTEIN, 1968. Estrus-inducing pheromone of male mice: transport by movement of air. *Science*. roč. 161, č. 3841, s. 584–585.

WICKS, L. F., 1941. Sex and Proteinuria of Mice. *Experimental Biology and Medicine*. roč. 48, č. 2, s. 395–400.

WYATT, Tristram D., 2005. Pheromones: convergence and contrasts in insects and vertebrates. In: *Chemical Signals in Vertebrates 10*. B.m.: Springer, s. 7–19. ISBN 0387251596.

WYATT, Tristram D., 2009. Fifty years of pheromones. *Nature*. roč. 457, č. 7227, s. 262–263.

WYATT, Tristram D., 2010. Pheromones and signature mixtures: defining species-wide signals and variable cues for identity in both invertebrates and vertebrates. *Journal of Comparative Physiology A*. roč. 196, č. 10, s. 685–700.

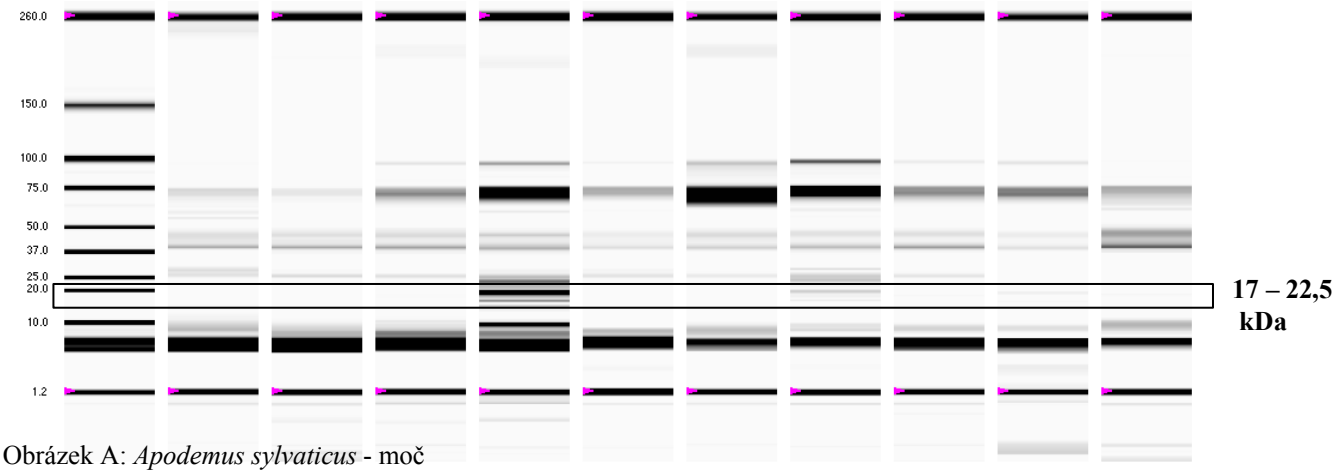
XU, Fuqiang, Michele SCHAEFER, Ikuhiro KIDA, James SCHAFER, Nian LIU, Douglas L. ROTHMAN, Fahmeed HYDER, Diego RESTREPO a Gordon M. SHEPHERD, 2005. Simultaneous activation of mouse main and accessory olfactory bulbs by odors or pheromones. *Journal of Comparative Neurology*. roč. 489, č. 4, s. 491–500.

ZUFALL, Frank a Trese LEINDERS-ZUFALL, 2007. Mammalian pheromone sensing. *Current opinion in neurobiology*. roč. 17, č. 4, s. 483–489.

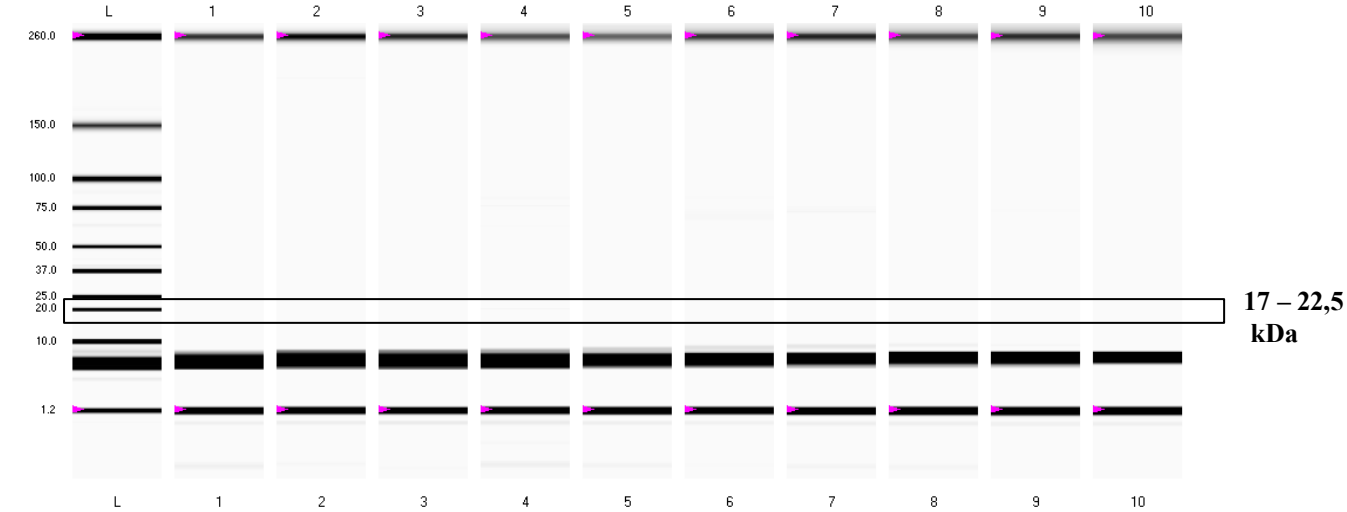
# 10. Seznam příloh

## Příloha 1: Virtuální gely

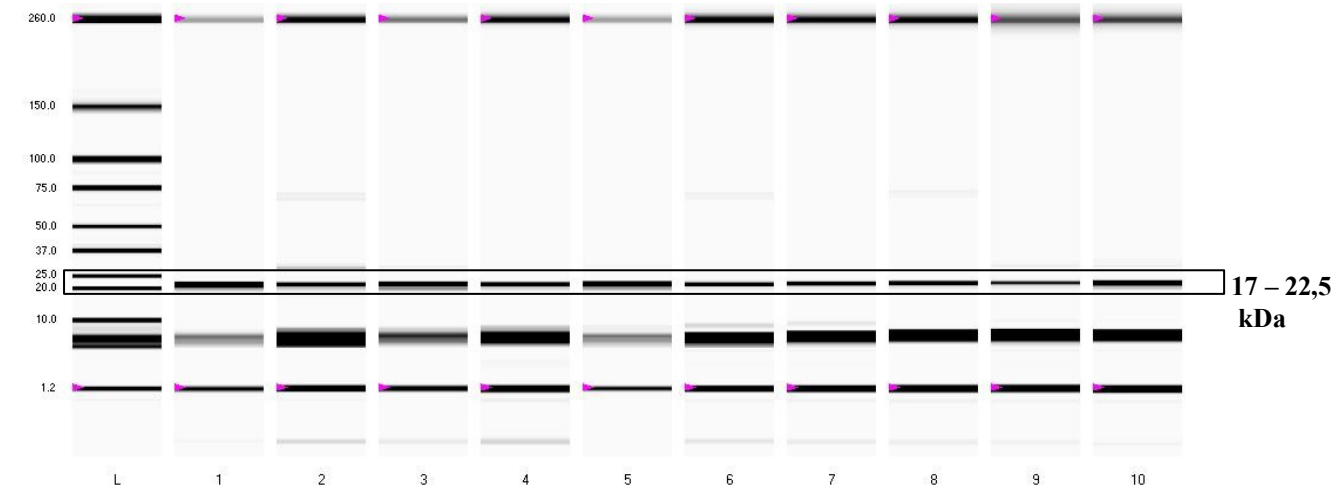
Virtuální gely byly získané metodou čipové gelové elektroforézy – Experion (BIO-RAD).
V jednotlivých vzorcích moči/slin je ohraničena oblast cca 17 - 22,5 kDa. L- marker; 1-5 samec; 6-10 samice.



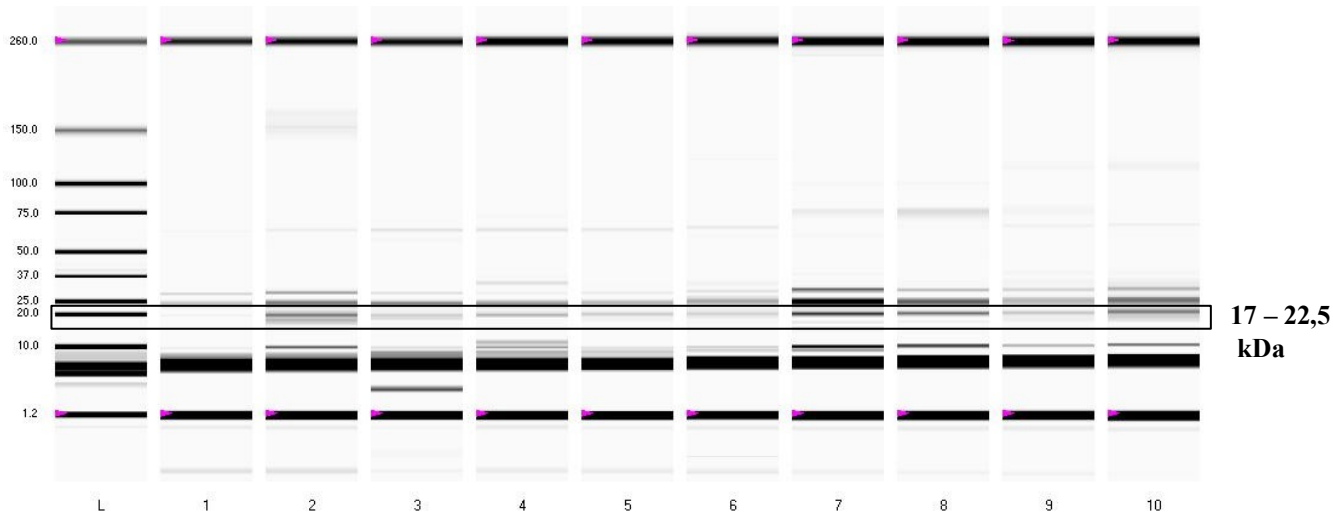

Obrázek A: *Apodemus sylvaticus* - moč



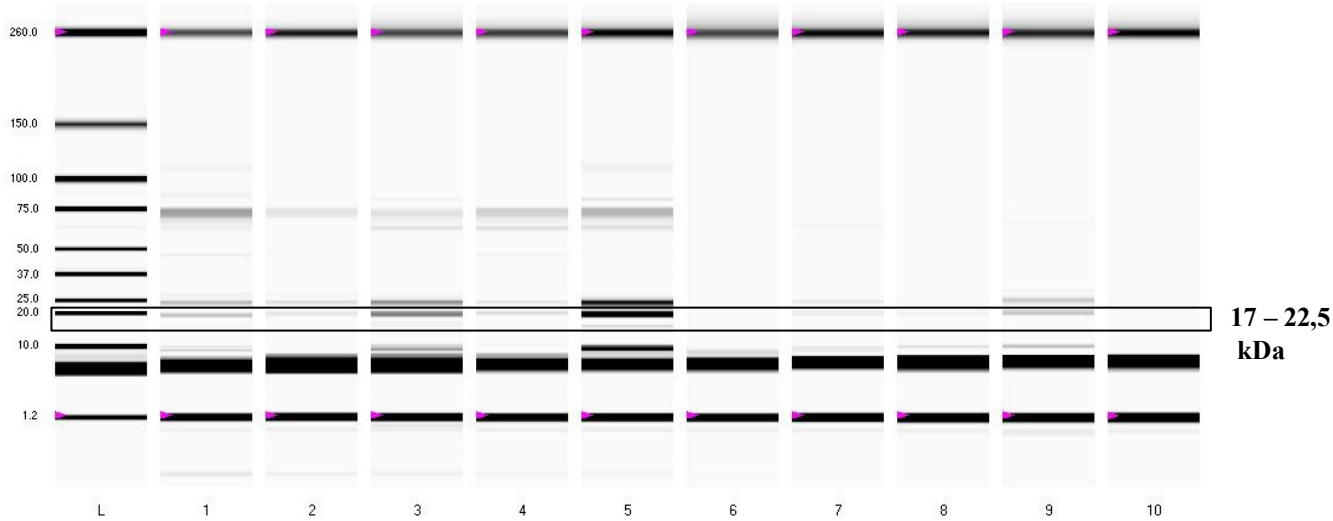

Obrázek B: *Apodemus uralensis* - moč



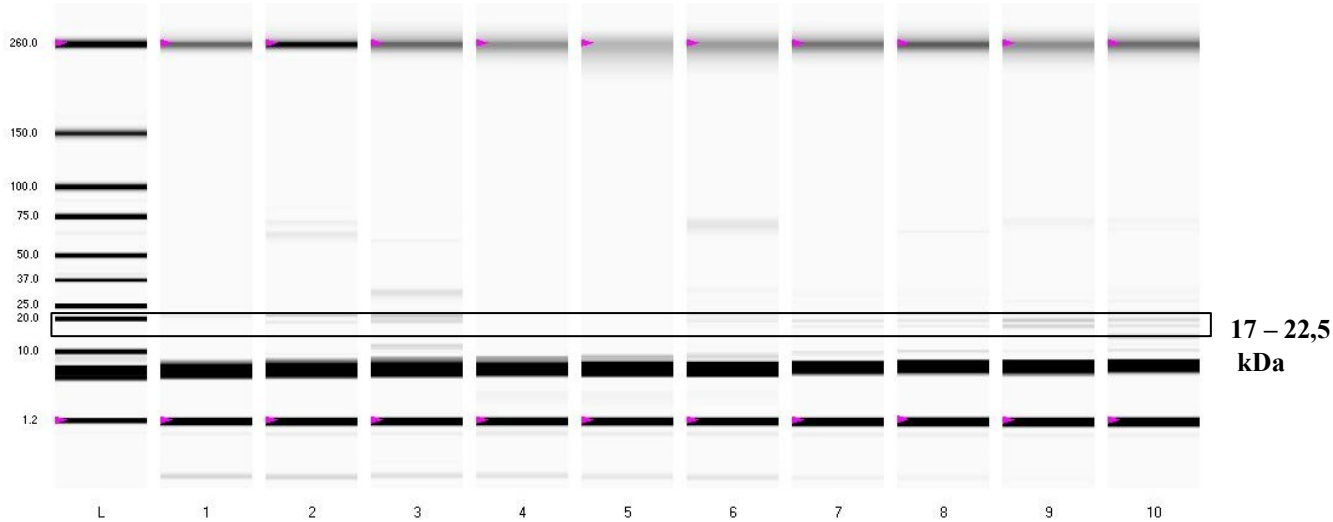

Obrázek C: *Mus musculus musculus* - moč




Obrázek A: *Apodemus sylvaticus* - sliny




Obrázek B: *Apodemus uralensis* - sliny




Obrázek C: *Mus musculus musculus* - sliny