

**Karlova Univerzita**  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Vývojová a buněčná biologie

Studijní obor: Vývojová a buněčná biologie



**Mgr. Martina Černá**

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

Disertační práce

Školitel: Doc. Mgr. Pavel Stopka, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Romana Stopková, Ph.D.

Praha 2017

## **Prohlášení**

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

V Praze

Podpis

## Poděkování

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

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

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

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

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

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

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

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



## Obsah

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

## Seznam zkratek

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

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

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

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

## Latinské názvy

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

## ABSTRAKT

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

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

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

## **ABSTRACT**

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

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

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

# 1. Literární přehled

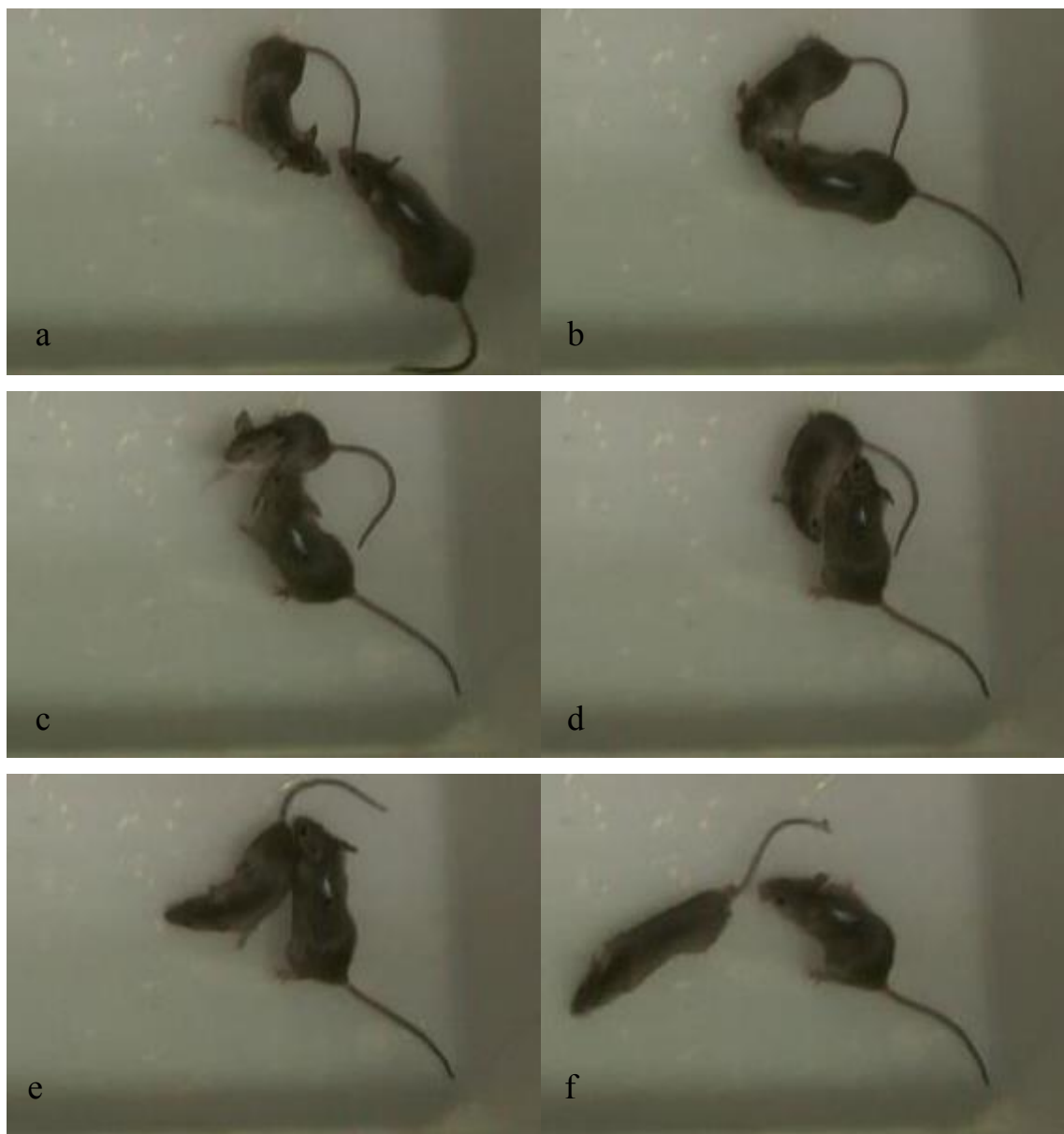
## 1.1. Chemická komunikace

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

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

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





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

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

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

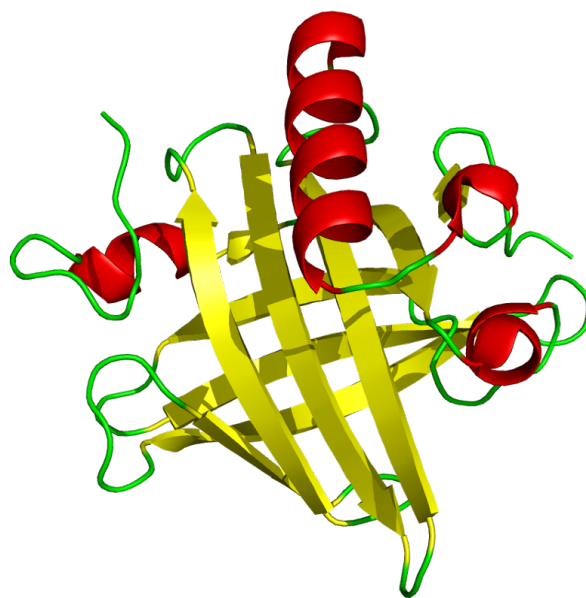
Nositelé chemických informací mohou být látky s různou chemickou strukturou, jednoduché i složitější. Často se chemické substance rozdělují na dvě hlavní kategorie, a to feromony a odoranty. Název feromon vznikl roce 1959, autory byli Peter Karlson a Martin Lüscher (Karlson & Lüscher 1959). Pojmenování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

### **1.1.1. Lipokaliny**

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

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

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



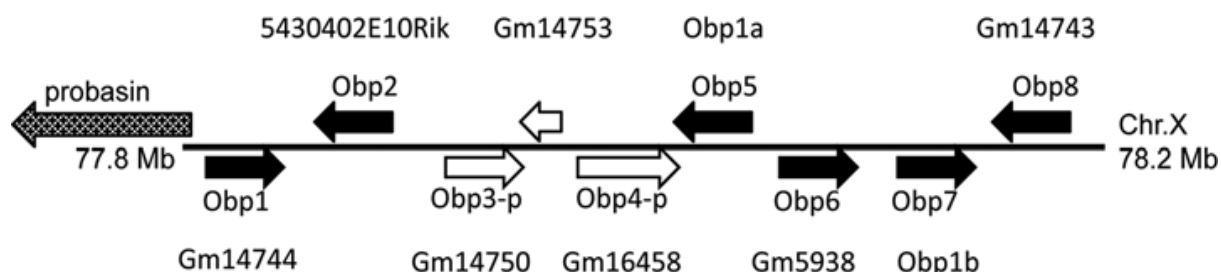
**Obrázek 2. Terciární struktura myšího lipokalinu je zobrazena na příkladu proteinu MUP. Žlutě je označeno 8 beta listů, které vytváří otevřený beta barel s alfa helixy (červené) a na konci jsou amino (N-terminus) a karboxylové (C-terminus) zbytky.**

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

### 1.1.2. Odorant vázající proteiny (OBP)

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

### **d) Vandenbergh efekt**

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

### **e) McClintock efekt**

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

### **f) Singer efekt**

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

## **g) Stopka efekt**

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

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

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

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

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

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

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

### 1.1.6. Sekretoglobiny

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

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

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

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

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

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

## 1.2. Procesy spojené s reprodukcí

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

### 1.2.1. Estrální cyklus

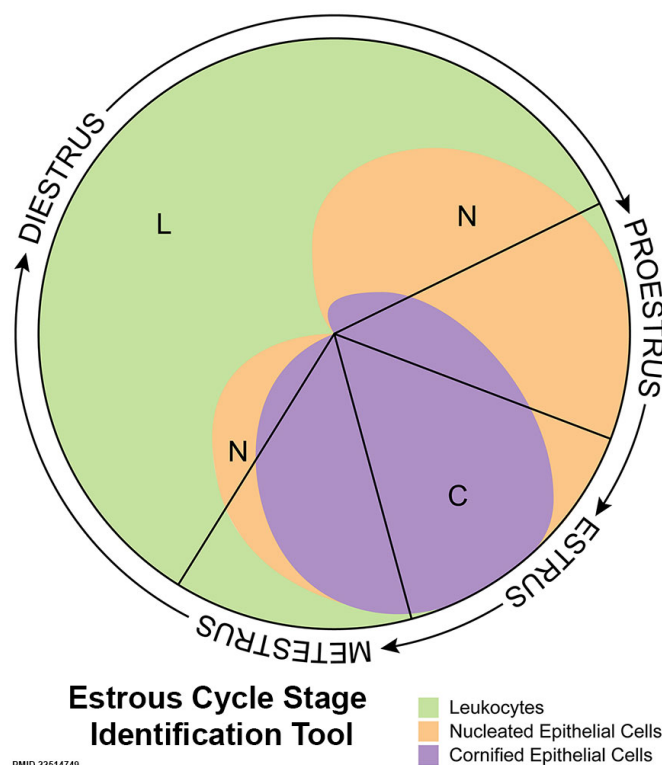
#### 1.2.1.1. Jednotlivé fáze estrálního cyklu

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

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

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

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



#### Obrázek 4. Nákres průběhu estrálního cyklu

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

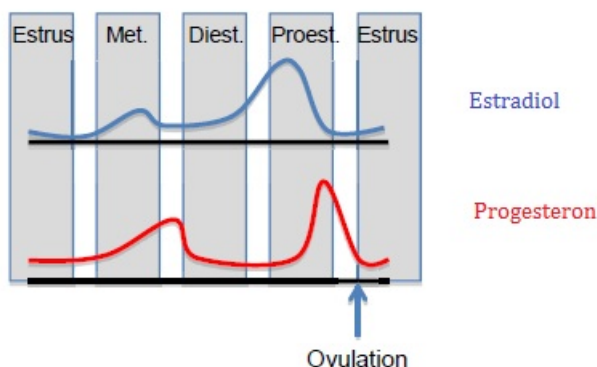
#### Proestrus

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

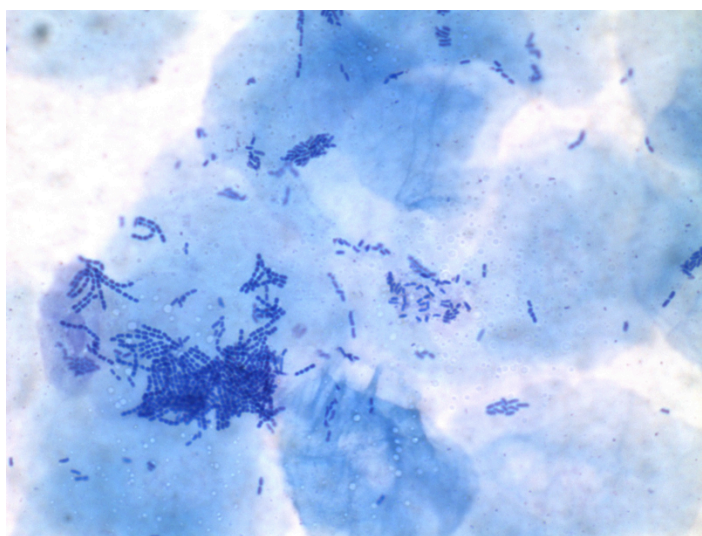
#### Estrus

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

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



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



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

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

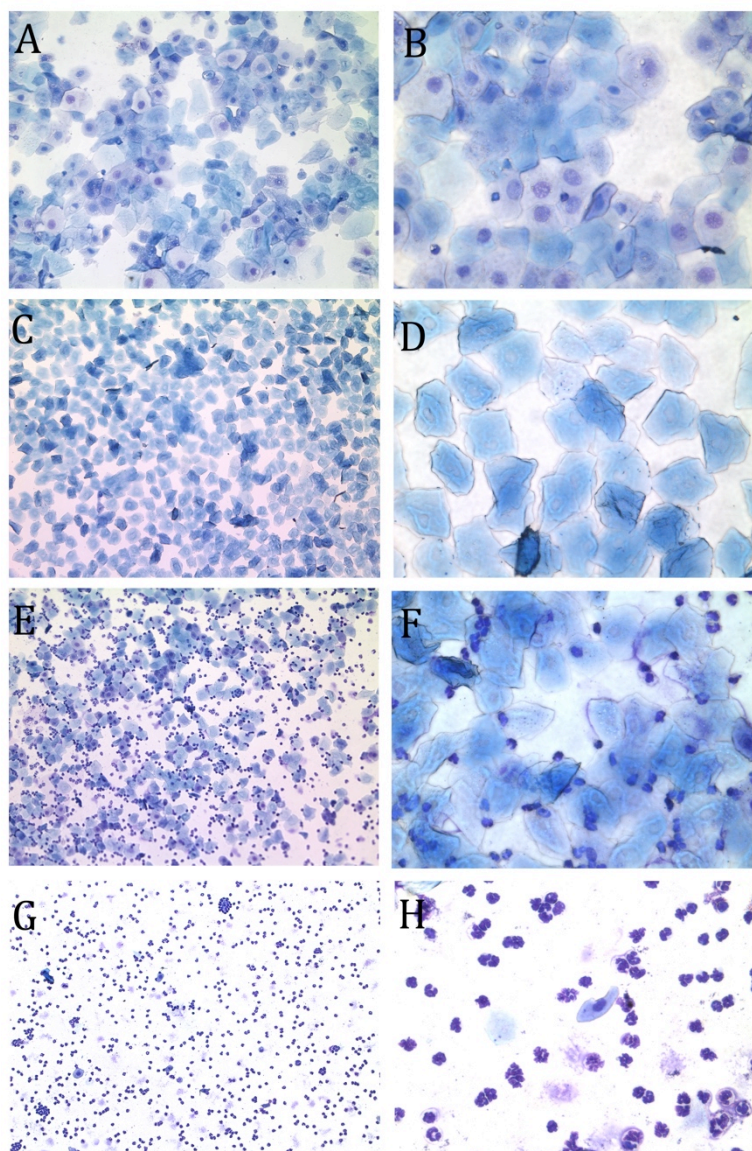
### Metestrus

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

## **Diestrus**

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





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

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

#### 1.2.1.2. Imunita spojená s estrálním cyklem

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### 1.2.1.4. Keratinizace povrchového epitelu

##### Struktura a evoluce kalikreinů

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

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

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

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

#### Exprese kalikreinů u myši

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

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

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

#### Procesy keratinizace pokožky

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

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

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

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

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

#### Antibakteriální funkce proteinů spojených s deskvamací pokožky

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

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

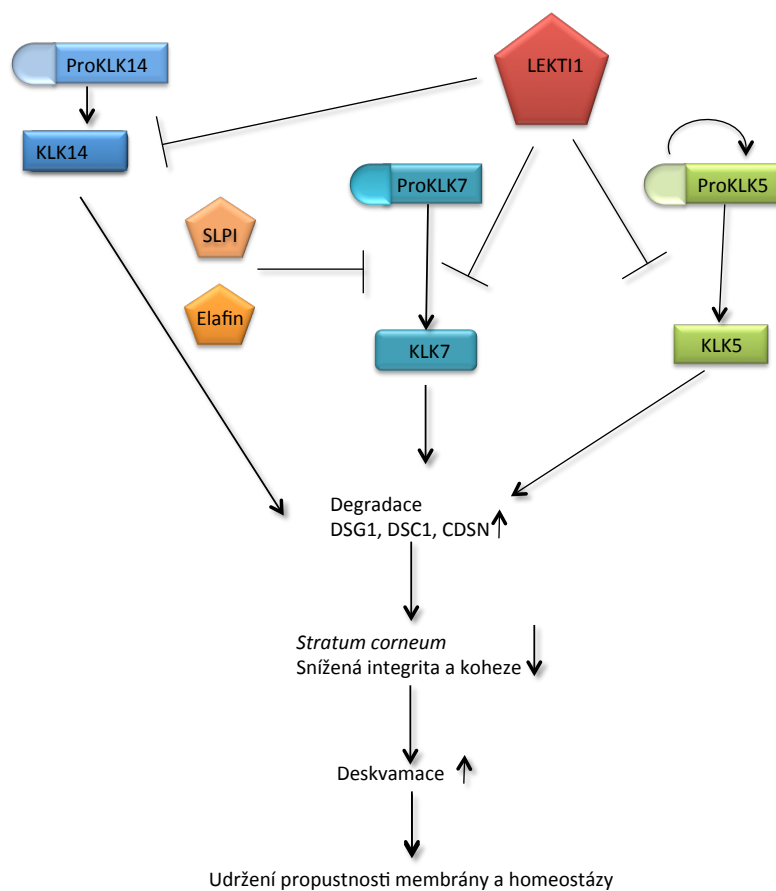
V pokožce se vyskytují malé inhibitory serinových proteáz SLPI a SKALP/elafin (Scott et al. 2011). Oba proteiny jsou z rodiny inhibitorů proteáz WFDC (angl. WAP disulphide four core). Vývoj WFDC genů u myši a potkanů je analogický vývoji a vzniku kalikreinů u těchto hlodavců. WFDC jsou inhibitory právě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



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

#### Proteiny účastníci se přirozené imunitní odpovědi

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



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

ProKLK14 se může měnit na aktivní KLK14 (např. pomocí KLK5, není na obrázku), která může být inhibována LEKT11. LEKT11 inhibuje změnu neaktivních kalikreinů 7 a 5. ProKLK5 se sama aktivuje v aktivní formu KLK5. Dalším inhibitorem, který znemožňuje změnu neaktivní formy ProKLK7, jsou SLPI či Elafin. Aktivní formy KLK14, KLK7, KLK5 vedou ke zvýšené degradaci proteinů DSG1, DSC1, CDSN a následně ke snížené integritě a kohezi svrchní vrstvy pokožky – *Stratum corneum* a tím pádem dochází ke zvýšené deskvamaci a následně ke změně v propustnosti membrány a udržení homeostázy.

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

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

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

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

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

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

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

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

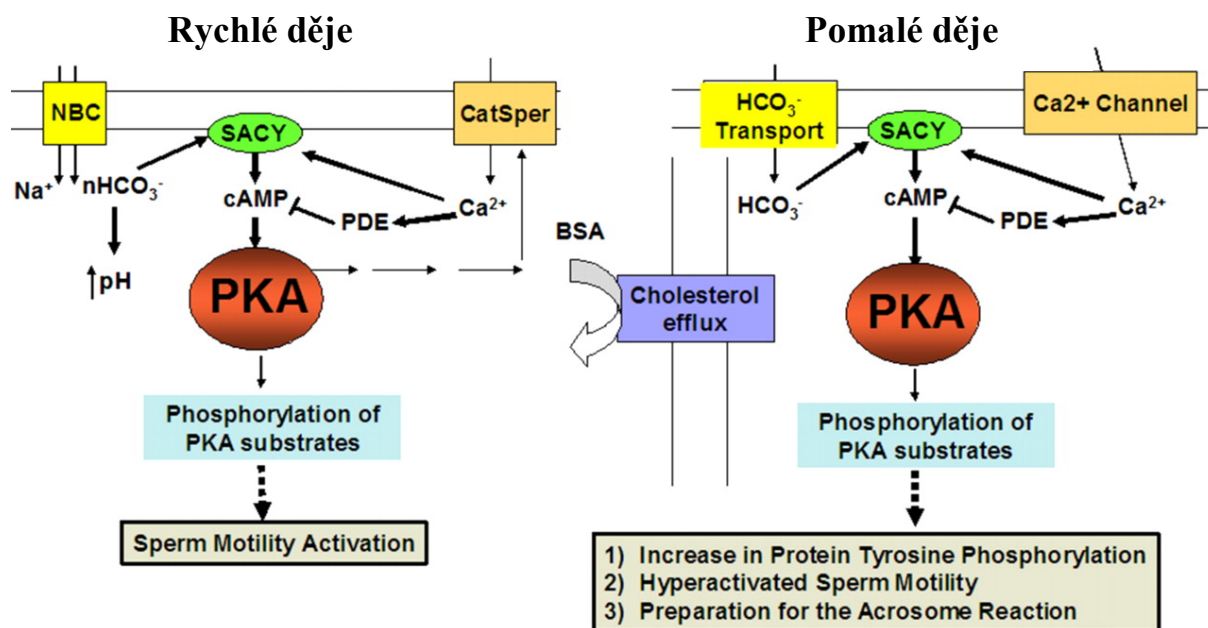
Endogenní disruptory a estrogenní hormony vyskytující se v prostředí se váží na estrogenní receptory spermií a spouští tak rychlou ne-genomickou signální odpověď (Kuiper et al. 1998; Sohoni & Sumpter 1998; Akingbemi & Hardy 2001). Důležitost estrogenních

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

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

### 1.2.3. Kapacitace a tyrosinová fosforylace

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



### Obrázek 9. Kapacitace

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

#### Rychlé děje

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

## Pomalé děje

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

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

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

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

#### **1.2.4. Akrozomální reakce**

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

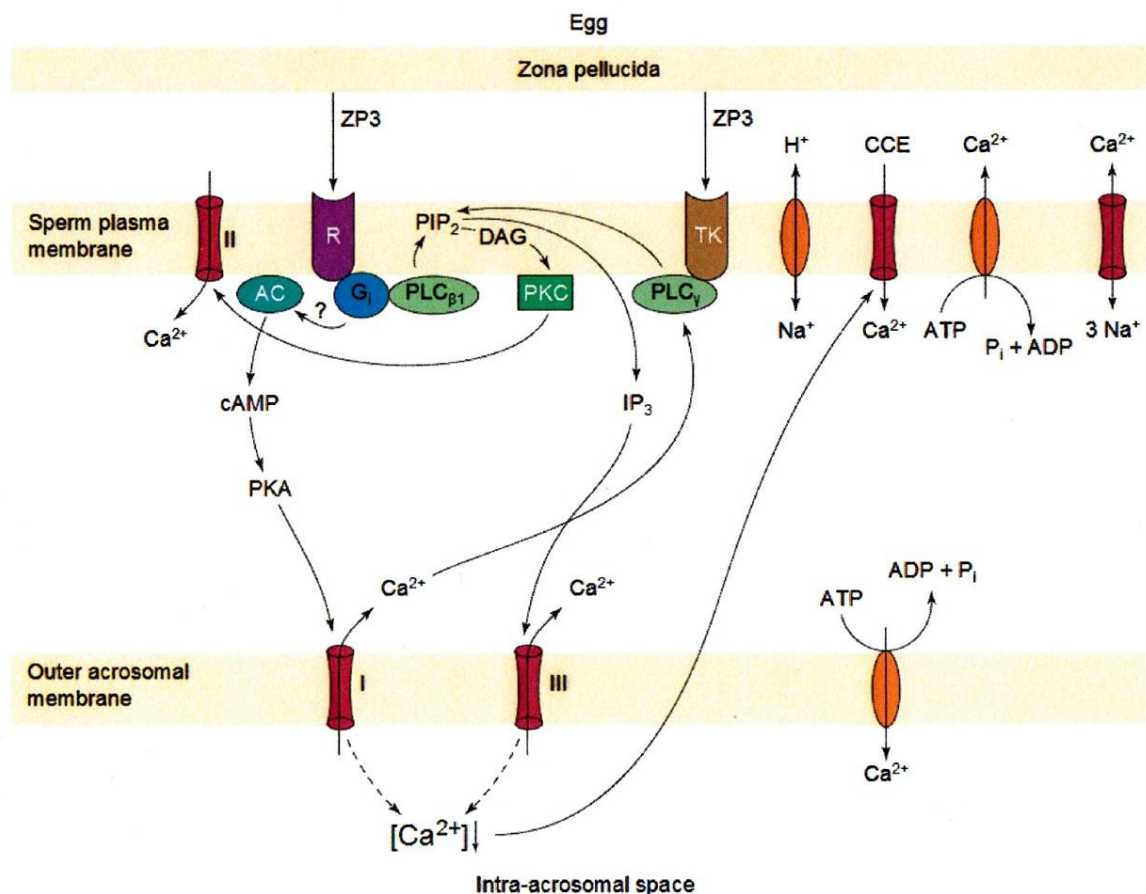
Spuštění AR je s největší pravděpodobností podmíněno přítomností dvou induktorů – ZP proteiny a progesteronem. V prvním případě se jedná o kontakt a vazbu proteinů na povrchu spermie a ZP. U myšovitých hlodavců obsahuje ZP tři proteiny: ZP1, ZP2, ZP3 o molekulových hmotnostech 200,000 (ZP1), 120,000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



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

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

Fyziologickým induktorem AR může být také progesteron (Kirkman-Brown et al. 2002; Garcia & Meizel 1999), který vazbou na receptory pro progesteron aktivuje shodný příliv  $\text{Ca}^{2+}$  iontů do cytosolu spermie, podobně jako u indukce ZP (Garcia & Meizel 1999). Naopak jako *in vitro* induktor je často používán kalcium ionofor (angl. calcium ionofor, CaI), který aktivuje intracelulární zvýšení  $\text{Ca}^{2+}$  iontů výměnou  $\text{Ca}^{2+}$  za  $2\text{H}^+$  (Spungin et al. 1995). Během takto indukované AR je klasická signální dráha vynechána, ale morfologicky je AR stejná jako ta, jež je indukována přes klasickou signální dráhu. Klasická signální dráha AR začíná kontaktem ZP proteinů a proteinů v anteriorní oblasti hlavičky spermie. ZP aktivuje signální dráhu vedoucí k AR přes receptory spojené s G proteiny (O'Toole et al. 2000), které aktivují fosfolipázu C (PLC)  $\beta 1$  nebo přes receptorové fosfotyrosinkinázy aktivující PLC  $\gamma$ . G proteiny aktivují zejména signální dráhu cAMP/PKA, ale známé jsou také další signální dráhy vedoucí k aktivaci Ser/Thr a Tyr kináz. PKA aktivuje otevření napětově závislých  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů a umožňuje tok  $\text{Ca}^{2+}$  iontů z akrozomální membrány do cytosolu (Obr. 10). Takto zvýšená koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  dále aktivuje protein kinázu C  $\gamma$  (PKC) (Spungin et al. 1995; Roldan 1998). Produktem hydrolýzy fosfatidylinositol bisfosfátu (PIP<sub>2</sub>) touto proteinkinázou je diacylglycerol (DAG) a inositol-trisfosfát (IP<sub>3</sub>) umožňující aktivaci a translokaci PKC k plazmatické membráně. Výsledkem je otevření napětově závislých  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů na plazmatické membráně a tím umožnění druhého zvýšení koncentrace těchto iontů v cytosolu, související s AR (Walensky & Snyder 1995).



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

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

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

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

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

## 2. Přehled publikací

### *Publikované články*

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

### *Článek po druhé revizi*

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

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

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

### 3. Příspěvek autorky

#### Příloha I.

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

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

#### Úvod

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

#### Cíle práce

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

#### Výsledky práce

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

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

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

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

## **Diskuze**

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

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

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

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

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

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

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

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

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



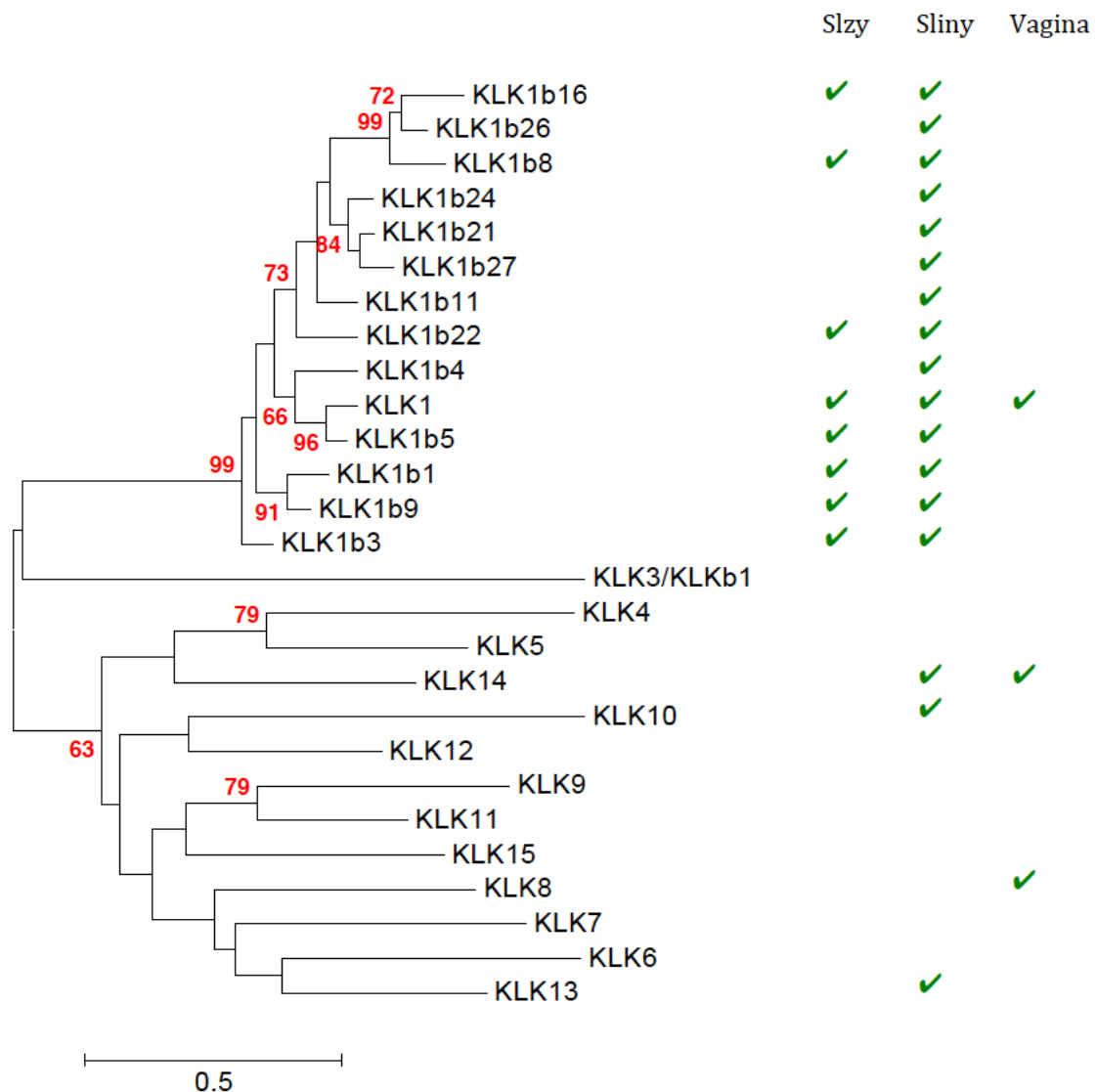
podílí se na hojení tkání (Mukherjee et al. 2007). Naše výsledky přispěly k upřesnění repertoáru SCGB ve slinách, nicméně otázky o jejich funkci zůstávají stále nezodpovězené.

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

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

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

u obou pohlaví stejně, a to jak v případě myší laboratorních, tak divokých (Stopka et al. 2016; van Leeuwen et al. 1987; Karn & Laukaitis 2015). Je možné, že i kalikreiny typu B příbuzné s KLK1 mají některé z vlastností dalších členů této serinové rodiny proteáz, jako je schopnost urychlit hojení ran nebo zprostředkovaná antimikrobiální funkce. Je možné, že tato adaptace divokých myší napomáhá matkám udržovat zdravou pokožku mláďat při pravidelném deponování slin do srsti během péče o mláďata (tzv. allogrooming).



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

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

## **Příloha II.**

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

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

### **Úvod**

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

### **Cíle práce**

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

### **Výsledky práce**

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

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

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

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

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

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

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

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

## Diskuze

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

### **Závěr příloh I. a II.**

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

### **Příloha III.**

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

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

### **Úvod**

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

### **Cíle práce**

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

## Výsledky práce

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

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

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

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

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

## Diskuze

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

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

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

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

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

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

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

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

#### **Příloha IV.**

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

#### **Úvod**

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

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

#### **Cíle práce**

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

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

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

## Výsledky práce

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

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

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



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

## Diskuze

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

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

### **Závěr příloh III. a IV.**

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

## 4. Seznam citací

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

Exocytosis-6.

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

enzymic lipocalin.

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

1278.

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

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

## **5. Přílohy**

# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

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

Received: 27 April 2016  
Accepted: 08 August 2016  
Published: 31 August 2016

Pavel Stopka, Barbora Kuntová, Petr Klempt, Leona Havrdová, Martina Černá & Romana Stopková

Chemical communication is mediated by sex-biased signals abundantly present in the urine, saliva and tears. Because most studies concentrated on the urinary signals, we aimed to determine the saliva proteome in wild *Mus musculus musculus*, to extend the knowledge on potential roles of saliva in chemical communication. We performed the gel-free quantitative LC-MS/MS analyses of saliva and identified 633 proteins with 134 (21%) of them being sexually dimorphic. They include proteins that protect and transport volatile organic compounds in their beta barrel including LCN lipocalins, major urinary proteins (MUPs), and odorant binding proteins (OBPs). To our surprise, the saliva proteome contains one MUP that is female biased (MUP8) and the two protein pheromones MUP20 (or 'Darcin') and ESP1 in individuals of both sex. Thus, contrary to previous assumptions, our findings reveal that these proteins cannot function as male-unique signals. Our study also demonstrates that many olfactory proteins (e.g. LCNs, and OBPs) are not expressed by submandibular glands but are produced elsewhere—in nasal and lacrimal tissues, and potentially also in other oro-facial glands. We have also detected abundant proteins that are involved in wound healing, immune and non-immune responses to pathogens, thus corroborating that saliva has important protective roles.

The sequence of the mouse genome provided a tool to study blueprints for all RNAs and proteins in mice<sup>1</sup>. Progenitors of modern laboratory mice were hybrids among *Mus musculus domesticus*, *Mus musculus musculus* and other subspecies. Though, laboratory mice have been widely and successfully used as experimental organisms in studies of biomarkers of physiological states<sup>2</sup> and of human pathological conditions, they may be less suitable to study chemical communication, a process which is driven by sexual selection. This is due to the differential contribution of blocks of genes from the two house-mouse subspecies *M. m. domesticus* and *M. m. musculus* to current laboratory strains<sup>1</sup> that may mask typical intra- and inter-specific differences. One of our aims, therefore, was to define the saliva proteome in *M. m. musculus* to provide the array of proteins and their quantity characteristic for saliva in a wild living mouse species. This study also represents a baseline for future comparative studies focusing on chemical communication and immunity.

In mice, the most published studies in chemical communication focused on the major urinary proteins (MUPs)<sup>3–7</sup>, which are expressed by the liver and transport volatile organic compounds (VOCs) in their beta barrel structure to the urine<sup>6–11</sup>. VOCs are slowly released from different urinary MUPs, and have been proposed to function in a variety of social signals, including identity, territorial marking, mate choice etc.<sup>3,12–14</sup>. Thus, lipocalins and their specific ligands together form a signal<sup>15</sup>. Differential ligand binding may have a potential influence on sub-species recognition between *M. m. musculus* and *M. m. domesticus*<sup>16–18</sup>. These two sub-species have been previously shown to vary in the abundance of male VOCs<sup>19</sup> and in MUP expression between the two subspecies and individuals of the opposite sex<sup>9</sup>. Moreover, scent signals have been shown to be an integral part of subspecies recognition and could play important roles in preventing interspecific mating between the two house mouse subspecies<sup>18</sup>.

Increasing number of papers, however, show that MUP expression is linked to reproduction and sociality, and not just to competitive ability<sup>3,4,20–23</sup>. The expression of urinary MUPs is socially regulated in that males excrete

BIOCEV group, Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 7, CZ 12844, Czech Republic. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.S. (email: pstopka@natur.cuni.cz)

higher quantities of MUPs in contacts with females in the laboratory mouse<sup>23</sup> as well as in wild *M. m. musculus*<sup>21</sup>, and in *M. m. domesticus*<sup>3</sup>. Furthermore, MUPs have a predictive value for the onset of aggressive behaviour and dispersal tendency in male wild house mice<sup>24</sup> and it is evident that scent marking signals have strong effects on the reproductive success of the signaller<sup>20</sup>. Furthermore, amongst MUPs, MUP20 (or 'Darcin') has been reported to predict the outcome of male-male territorial competition<sup>3</sup>.

MUPs are products of a gene cluster that contains 21 coding genes (and a similar number of pseudogenes), and can be divided into two groups, the group-A (ancestral), containing *Mup3*, *Mup4*, *Mup5*, *Mup6*, *Mup20* and *Mup21*, and the group-B, consisting of 15 other *Mups* (i.e. *Mup1*, *Mup2*, *Mup7-Mup19*) sharing almost 99% sequence identity<sup>25,26</sup>, reviewed in refs 22,27. Different MUPs were originally supposed to present an individual 'barcode' signal<sup>13</sup> by which different individuals recognize each other. However, a recent study with a sufficient sample size shows that the urinary profiles of wild male house mice *M. m. musculus* are not individually unique but are dynamic over time with significant changes after puberty and during adulthood<sup>28</sup>. Moreover, the variation in pheromone affinities of the urinary MUP isoforms provides low support for the proposal that heterogeneity in MUPs plays a role in regulating profiles of available pheromones<sup>10</sup>. However, MUPs have also been reported in several tissues other than the liver including salivary glands, olfactory/vomer nasal epithelia, and nasal-associated lymphoid tissues<sup>2,8,29-31</sup>, but their functions are not yet fully understood.

Another interesting group of lipocalins involved in chemical communication are products of the odorant binding protein genes (*Obp*). The X-linked *Obp* genes were thought to involve just two nasal members—*Obp1a*, and *Obp1b*<sup>32</sup>. However, *Obp* genes have undergone a series of duplications in mice, and they occur in a cluster of seven genes (i.e. including *Prb*, Probasin) and two pseudogenes on the X chromosome<sup>27,31,33</sup>. All OBPs including Probasin have a specific disulfide bond (Cys38–Cys42), which represents a strong OBP-diagnostic motif CXXXC–Cys-Xaa-Xaa-Xaa-Cys<sup>27,33</sup>. To date, *Obps*/OBPs were detected in various mammalian taxa, e.g., house mice<sup>31</sup>, bank voles<sup>34</sup>, porcupines<sup>35</sup>, elephants<sup>36</sup>, cows<sup>37</sup>, and boar<sup>38,39</sup>. Interestingly, pigs have OBPs and SAL. SAL is the major salivary protein in pigs with affinity to steroids and to 2-isobutyl-3-methoxy pyrazine, it is phylogenetically close to MUPs and is expressed by the male submaxillary glands<sup>40</sup>. Furthermore, aphrodisin is an OBP<sup>34</sup> described as the major pheromone transporter in vaginal flushes of hamsters (*Cricetus cricetus*)<sup>41</sup>.

In our latest study<sup>31</sup>, we described particular mRNA expression sites for the newly described odorant binding proteins in wild mice (*M. m. musculus*, *M. m. domesticus*). They are highly expressed with other lipocalins (LCNs, MUPs) in the mouse lacrimal, nasal, and vomeronasal tissues with the normalized expression levels being as high or higher as those described for the urinary group-B *Mup* genes in the liver. Lacrimal glands expressed the mRNA coding OBP5, OBP6 and OBP7 whilst the mRNAs coding OBP1/OBP2, OBP5, and OBP7 were highly abundant in the olfactory epithelia (OE), vomeronasal organ (VNO), and nasal-associated lymphoid tissue (NALT) in the both house mouse subspecies. No *Obp* mRNA was detected in submandibular glands but at least one OBP protein (i.e. OBP5) was detected in the saliva. We have also provided evidence that *Obp* transcripts are co-expressed in combination with other lipocalin transcripts (e.g. nasal and lacrimal *Obp5* and *Obp7* with *Mup4* and *Lcn11*), presumably to widen the spectrum of ligands that OBP, MUP, and LCN proteins may sequester and transport<sup>31</sup>. Thus, this study also aims to detect particular OBPs in the mouse saliva to test whether OBPs are involved in the transport of VOCs and various degradation products from the nasal and lacrimal tissues to the oral cavity where digestion starts.

This study was conducted to detect the level of sexual dimorphisms with a particular interest in lipocalins that have potential roles in chemical communication as transporters of salivary VOCs. We used sensitive proteomic techniques to identify proteins and partially also RNAseq on GS Junior to detect a potential expression site for some of the lipocalins of particular interest (i.e. MUP20, OBPs). Because eyes, nose and mouth are primary gates for various pathogens to enter the body and at the same time a route of receiving or transmitting pheromones, it is believed that an organismal detoxification, immunity and chemical communication might have been driven by similar evolutionary forces<sup>27,33,42</sup>. Thus, we also discuss our results on other protein families significantly enriched in the saliva proteome of the house mouse.

## Materials and Methods

**Ethical Standards.** All animal procedures were carried out in strict accordance with the law of the Czech Republic paragraph 17 no. 246/1992 and the local ethics committee of the Faculty of Science, Charles University in Prague specifically approved this study in accordance with the accreditation no. 27335/2013-17214 valid through 2019.

**Animals.** To allow for natural variation between samples we selected individuals of similar weight, in reproductive condition, but from different sites: 1M+1F locality Břiza (50.3605111N, 14.2162558E), 1M+3F Velke Bilovice (48.8492886N, 16.8922736E), 3M Bohnice (50.1341539N, 14.4142189E), 1F Dolni Brezany (49.9632106N, 14.4585047E), 1F Bruntal (49.9884447N, 17.4647019E). After the protein sample collection, all experimental individuals were sacrificed by cervical dislocation and tissues were further used for the transcriptome analyses.

**Samples.** The saliva samples were collected by gentle flushing with a pipette using 50 µl of the 0.9% saline solution from six female and five male biological replicates, and each sample was analysed twice to produce the mean values from the methodology duplicates. This was done in the 'in-house' Mass Spectrometry and Proteomics Service Laboratory, Faculty of Science, Charles University in Prague.

**Protein Digestion.** The protein concentration of each lysate was determined using the BCA assay kit (Fisher Scientific). Cysteins in 200 µg of proteins were reduced with the final concentration of 5 mM TCEP (60 °C for



60 min) and blocked with 10 mM (10 min Room Temperature). Samples were cleaved with trypsin (i.e. 1/100, trypsin/protein). Peptides were desalted on Michrom C18 column.

**nLC-MS<sup>2</sup> Analysis.** Nano Reversed phase columns were used (EASY-Spray column, 50 cm × 75 μm ID, PepMap C18, 2 μm particles, 100 Å pore size). Mobile phase buffer A was composed of water, 2% acetonitrile and 0.1% formic acid. Mobile phase B contained 80% acetonitrile, and 0.1% formic acid. Samples were loaded onto the trap column (Acclaim PepMap300, C18, 5 μm, 300 Å Wide Pore, 300 μm × 5 mm, 5 Cartridges) for 4 min at 15 μl/min loading buffer was composed of water, 2% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid. After 4 minutes ventile was switched and Mobile phase B increased from 2% to 40% B at 60 min, 90% B at 61 min, hold for 8 minutes, and 2% B at 70 min, hold for 15 minutes until the end of run.

Eluting peptide cations were converted to gas-phase ions by electrospray ionization and analysed on a Thermo Orbitrap Fusion (Q-OT-qIT, Thermo). Survey scans of peptide precursors from 400 to 1600 *m/z* were performed at 120 K resolution (at 200 *m/z*) with a  $5 \times 10^5$  ion count target. Tandem MS was performed by isolation at 1.5 Th with the quadrupole, HCD fragmentation with normalized collision energy of 30, and rapid scan MS analysis in the ion trap. The MS<sup>2</sup> ion count target was set to  $10^4$  and the max injection time was 35 ms. Only those precursors with charge state 2–6 were sampled for MS<sup>2</sup>. The dynamic exclusion duration was set to 45 s with a 10 ppm tolerance around the selected precursor and its isotopes. Monoisotopic precursor selection was turned on. The instrument was run in top speed mode with 2 s cycles.

**Data analysis.** All data were analysed and quantified with the MaxQuant software (version 1.5.3.8)<sup>43</sup>. The false discovery rate (FDR) was set to 1% for both proteins and peptides and we specified a minimum peptide length to seven amino acids. The Andromeda search engine was used for the MS/MS spectra search against the Uniprot *Mus musculus* database (downloaded on June, 2015, containing 44,900 entries. Enzyme specificity was set as C-terminal to Arg and Lys, also allowing cleavage at proline bonds and a maximum of two missed cleavages. Dithiomethylation of cysteine was selected as fixed modification and N-terminal protein acetylation and methionine oxidation as variable modifications.

The “match between runs” feature of MaxQuant was used to transfer identifications to other LC-MS/MS runs based on their masses and retention time (maximum deviation 0.7 min) and this was also used in all quantification experiments. Quantifications were performed with the label-free algorithms described recently<sup>43</sup>.

**Gene ontology analysis.** We used the PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) Classification System to classify proteins according to Biological process, which is the function of the protein in the context of a larger network of proteins that interact to accomplish a process at the level of the tissue<sup>44</sup>. Each analysis involved Bonferroni corrections for multiple testing.

**RNaseq.** The submandibular glands were homogenized in RLT buffer (Qiagen) with MagNalyser (Roche) for 30 s at 6000 rpm. We used the RNeasy Mini Kit (Qiagen) for RNA isolation following the manufactures protocol with on-column DNase I treatment. The purity and concentration of eluted RNA was measured with NanoDrop ND1000. The quality of RNA was checked using the agarose gel electrophoresis and pre-selected samples were further analysed with Agilent Bioanalyzer using the RNA Nano 6000 chip to obtain information on the RNA integrity. Treated samples were cleaned using the RNA cleanup procedure (RNeasy Mini Kit) and checks of the quality with AGE and Bioanalyzer were repeated as well as the measurement with NanoDrop. RIN of twelve submandibular gland samples after this procedures ranged from 4.60 to 7.6. We decided to eliminate the worst two samples (i.e. one from female with RIN 4.60, and one from male with RIN 6.00). The remaining ten RNA samples RIN values were following: 4.70, 5.90, 7.00, 6.70, 5.90 for females and 6.40, 6.70, 7.60, 7.30 and 7.10 for males. RNA samples were standardly stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

cDNA was prepared using the SMARTer PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech) and amplified with Advantage 2 PCR Kit (Clontech). Both procedures were handled according to the Trimmer-2 Normalization Kit (Evrogen) protocol. The products of optimized cDNA amplification were then loaded on AGE. For each sample, only the area of product in range from ~500 bp to ~1300 bp (well visible area full of bands) was excized from the gel and the DNA products were extracted using the Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid). To avoid potential contaminants we performed AMPure XP cleanup (Beckman-Coulter). Purified products (and the range where they emerge) were checked on AGE. DNA concentration was determined using Quant-it Pico Green dsDNA Assay Kit (Invitrogen) and fluorimeter (Hoefer DQ 300). For each obtained submandibular gland size-selected transcriptomes from 5 males and 5 females we prepared Rapid Libraries (RL) according to Rapid Library Preparation Manual (my454.com). Rapid libraries were checked for the presence of small fragments on BioAnalyzer using the High Sensitivity DNA kit. Equal amount from each of 10 Rapid Libraries (107 molecules per μl dilution) were mixed and then used for emPCR. Further steps were following the provider's instructions for sequencing with GS Junior+ (Roche; emPCR Amplification Method Manual Lib-L and Sequencing Method Manual, my454.com). In order to reach better sequencing depth we combined two sequencing runs (140 000 HQ reads and 120 000 HQ reads). Both.sff datasets were merged using the sff file tool (part of GS Junior+ Roche system software). Merged reads were then multiplexed, trimmed (i.e. using trimming database that contains primers used for the libraries preparation), filtered and aligned into contigs against *Mus musculus* cDNA database (“the super-set of all known, novel and pseudo gene predictions”; ensembl.org) and using GS Reference Mapper (Roche). Highly detected transcripts are graphically represented in Supplementary Figure 1.

**Phylogenetic analysis by Maximum Likelihood method.** The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the JTT matrix-based model<sup>45</sup>. The tree with the highest log likelihood (−1578.6730) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying

Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 24 nucleotide sequences from the mouse genome. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All positions with less than 95% site coverage were eliminated. That is, fewer than 5% alignment gaps, missing data, and ambiguous bases were allowed at any position. Evolutionary analyses were conducted in MEGA5<sup>46</sup>. We followed the standard MGI/NCBI nomenclature for all proteins with the exception of OBPs where our recently<sup>31</sup> submitted *M. m. musculus* names/synonyms were used (i.e. *Obp1* - KJ605390, *Obp2* - KJ605391, *Obp5* - KJ605392, *Obp6* - KJ605393, and *Obp7* - KJ605394) instead of the old names originally provided for all *Obp* predicted transcripts and proteins of the laboratory mouse.

**Protein structures.** The protein PDBs were downloaded from RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>) and visualized in a molecular visualization system PyMOL software v.1.5. (<http://pymol.org>). Examples of immunity-related proteins in the Results section are visualized on human homologs i.e. Cathelin-like domain of human Cathelicidin LL-37 (4EYC), Cystatin D (1ROA) and KLK1 (1SPJ) because no mouse structures exist to date. The last structure is an example of murine ESP1 (2LMK).

**Data availability.** Proteomic data from LC-MS/MS are provided publically available in Supplementary Data file 1. RNAseq data from GS Junior are provided as Supplementary Data file 2.

## Results

**The saliva proteome.** We have generated the saliva proteome from the house mouse, *M. m. musculus* and detected a total of 633 proteins at 0.01 FDR (i.e. False Discovery Rate for all peptides and proteins). Successful identifications of these proteins resulted from a relatively high number of peptides per identification ( $11.33 \pm 11.30$ , mean  $\pm$  sd), sequence coverage ( $35.1 \pm 20.2\%$ ), and unique sequence coverage ( $28.6 \pm 17.8$ ), Fig. 1a. Moreover, Spearman's rank correlation between coverage and unique peptide coverage was high and significant  $\rho = 0.74$ ,  $S = 10866000$ ,  $p\text{-value} < 2.2e-16$  as well as the correlation between the number of MS/MS spectra and coverage ( $\rho = 0.71$ ,  $S = 12230000$ ,  $p\text{-value} < 2.2e-16$ ). Thus, the most abundant proteins have higher coverage and unique peptide coverage than those that were less abundant.

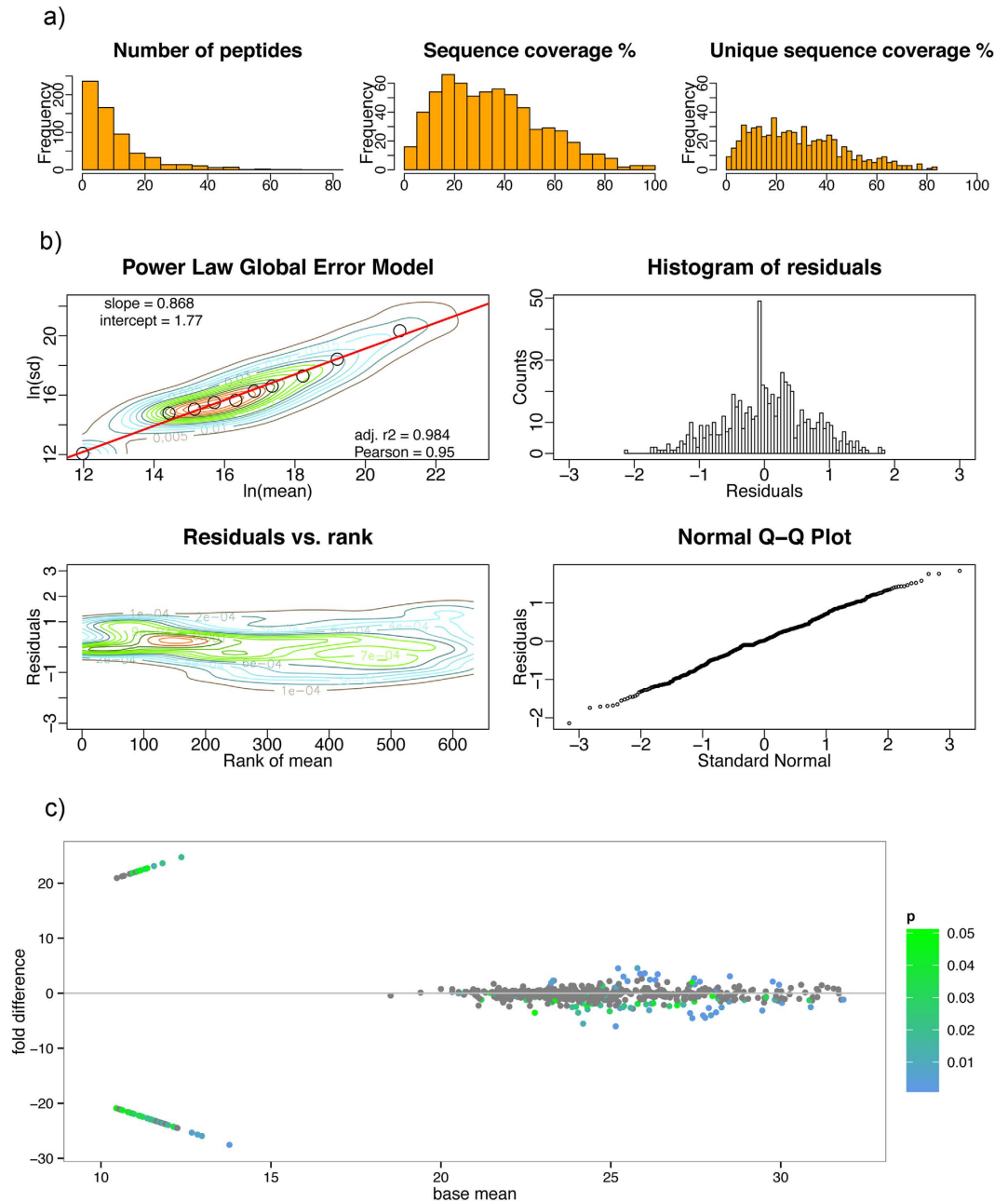
Having produced the saliva proteome we next performed the analysis of differentially abundant proteins between males and females using the Power Law Global Error Model (PLGEM)<sup>47</sup>. First of all, we calculated the signal-to-noise ratio - STN, because it explicitly takes unequal variances into account and because it penalizes proteins that have higher variance in each class more than those proteins that have a high variance in one class and a low variance in another<sup>47</sup>. Because PLGEM can only be fitted on a set of replicates of a same experimental condition we have done this for female data, Fig. 1b. Correlation between the mean values and standard deviations was high ( $r^2 = 0.98$ , Pearson = 0.95) so we continued with the resampled STNs and calculated differences with corresponding p-values between males and females. We used the MA plot as a method of showing sex differences where fold differences are plotted against the base mean. Significant differentially abundant proteins are colored from green ( $p < 0.05$ ) to blue ( $p < 0.01$ ) in Fig. 1c.

PLGEM analysis of the level of sexual dimorphism revealed that 132 (21%) out of 633 identified proteins at 1% FDR and  $p < 0.05$  were sexually dimorphic. Male biased proteins included 92 (14.5%) and female biased proteins included 40 (6.3%) successful identifications. Thus, the male-biased proteins were more common than the female-biased proteins in the saliva proteome of the house mouse subspecies *M. m. musculus*.

**The most abundant salivary proteins.** Based on the median value we sorted our data to detect the most abundant proteins in the saliva proteome. We have filtered out potential contaminants such as keratins and also trypsins which are the enzymes that cleave all peptides before LC-MS in this study. The top five percent of the most abundant proteins included (i.e. in descending order): MUP6, BPIFB9B, ALBU, OBP5, OBP7, MUP5, CAH6, SCGB2B2, OBP1, ADA, SCGB1B2, AMY1, ACTB, PIP, LCN11, LACREIN, SCGB1B27, LCN13, KLK1KB9, OVOS, OBP2 (lipocalins are underlined). Out of these top abundant proteins, a third (i.e. seven proteins) was sex biased with male-biased OBP1, OBP2, LCN13, BPIFB9B, OVOS, AMY1 and female-biased KLK1B9.

**Lipocalins and other proteins involved in chemical communication.** One of the most interesting results in our study is a finding that the saliva proteome is very rich of lipocalins belonging to different lipocalin sub-families and originating from several oro-facial expression sites. We have detected 20 (out of 55) mouse lipocalins belonging to the well annotated groups of LCNs (LCN2, LCN3, LCN4, LCN11, LCN12, LCN13, LCN14), OBPs (OBP1, OBP2, OBP5, OBP6, OBP7)<sup>31,33</sup>, and MUPs (MUP4, MUP5, MUP6, MUP8, MUP14, MUP17, MUP20, MUP21)<sup>26</sup>. A total of 10 lipocalins (50%) was significantly ( $p < 0.05$ ) sexually dimorphic (OBP1, OBP2, LCN3, LCN4, LCN13, LCN14, MUP4, MUP8, MUP14, and MUP20). Only MUP8 was female biased ( $p = 0.026$ ), while all other sexually dimorphic lipocalins were male biased. Furthermore, we have detected MUPs from the both earlier described phylogenetic groups (i.e. the ancestral group-A MUPs, and the later evolved group-B MUPs, refs 25,26) in the saliva. Moreover, OBPs and MUPs each belong to monophyletic groups of genes (bootstrap  $> 75$ ) whilst LCNs are more heterogeneous and only LCN3, LCN4, LCN13, LCN14 form a monophyletic group previously detected in the mouse nasal and vomeronasal tissues. The complete mouse lipocalin phylogeny is provided elsewhere<sup>27,33</sup>.

The abundance of the male-biased MUP20 ( $p = 0.017$ ) in the saliva was unexpected (Diagnostic peptides: FAQLSEEHGIVR, ENIIDLTNANR) because MUP20 has previously been detected only in the urine of male *Mus musculus domesticus* and C57BL/6. Therefore, we performed RNAseq-based analysis of the submandibular gland transcriptome to support this identification. We have detected the mRNA expression of several *Mup* genes



**Figure 1.** Details of the Power Law Global Error Model<sup>47</sup>: (a) histograms of the sequence coverage and the unique sequence coverage, (b) the model fitting on a female experimental condition, (c) MA plot with the differentially abundant proteins where significant points are colored from green ( $p < 0.05$ ) to blue ( $p < 0.01$ ).

including *Mup20*, *Mup4*, *Mup5*, and *Mup9*. However, all *Obp* members were absent in SMG transcriptome which supports our previous observations that OBPs are mainly expressed by the nasal (OE, VNO, NALT) and lacrimal glands/tissues<sup>31</sup>, and/or other as yet understudied oro-facial mouse glands. Similarly, male biased lipocalins LCN3 (VNSP1), LCN4 (VNSP2), LCN13 (OBP2A), LCN14 (OBP2B) are encoded by *Lcn* genes expressed by the nasal and vomeronasal tissues, but we detected them being highly abundant in the saliva proteome but not in the SMG transcriptome.

Along with lipocalins, we have also detected two male-biased exocrine glands-secreted peptides ESP1 ( $p = 0.006$ ) and marginally ESP6 ( $p = 0.08$ ), putative protein pheromones that are abundant in tears along with as yet uncharacterized lacrimal protein-Lacrein—which is also present in the saliva proteome of males and females but not in the transcriptome (SMG) in this study. Furthermore, we have also detected male-biased vomeromodulin (VOME,  $p = 0.003$ ) in the saliva, however its expression site is also known to be exclusively the mouse vomeronasal organ<sup>48</sup>.

**Secretoglobins.** In the saliva proteome of the mouse, we have detected 13 secretoglobin members with 7 of them being sexually dimorphic (i.e. male-biased: SCGB1B20, SCGB1B3, SCGB2A2, SCGB2B20, SCGB2B24, SCGB2B3, SCGB2B7) at  $p < 0.05$ . None of the salivary SCGB members was either male or female unique. On the level of SMG transcriptome, we have detected the expression of mRNA coding only three secretoglobins SCGB1B27, SCGB2B26, and SCGB2B27. The most abundant secretoglobin in the saliva proteome was a secretoglobin from family 2B, member 2 or SCGB2B2. However, we did not detect the mRNA coding SCGB2B2 in our transcriptomic (SMG) data, thus, suggesting that SCGB2B2 (=ABPBG2) is also transported to the oral cavity from other tissues—most likely from the lacrimal or nasal glands/tissues<sup>49</sup>.

**Kallikreins and wound healing.** Kallikreins are a group of serine proteases, which are capable of cleaving peptide bonds in various proteins also including some kallikreins. They have an antimicrobial activity and are involved in wound healing<sup>50</sup>. We have detected 4 kallikreins (KLK1, KLK10, KLK13, KLK14) and 13 kallikrein 1-related peptidases in saliva (KLK1B11, KLK1B16, KLK1B3, KLK1B1, KLK1B21, KLK1B22, KLK1B24, KLK1B26, KLK1B27, KLK1B4, KLK1B5, KLK1B8, KLK1B9). Kallikrein 1 and all kallikrein 1-related peptidases form a monophyletic cluster and it is notable in Fig. 2 that Kallikrein 1 is not an outgroup (i.e. the ancestral gene) to all other Kallikrein 1-related peptidases. Kallikreins KLK1, KLK10, and KLK14 were not sexually dimorphic whilst KLK13 was female biased but only marginally significant ( $p = 0.054$ ) because it was detected only in three females. Almost all kallikrein 1-related peptidases were female biased ( $p < 0.01$ ), except KLK1B5 ( $p = 0.08$ ) that only revealed a trend. On the level of SMG transcriptome we have detected KLK1 and all Kallikrein 1-related peptidases. Furthermore, we have also detected angiotensinogen (ANGT) a substrate for KLK1 activity and CRAMP (i.e. Cathelicidin related anti-microbial peptide)—an antimicrobial peptide which is regulated by Kallikreins 5 and 7<sup>50</sup>.

**Proteins involved in innate immunity.** Based on the functional classification and gene ontology, we have selected those genes that match our criteria, thus limiting the function to two keywords—immunity and antimicrobial. We have detected a total of 56 proteins fitting our criteria with 21 of them being significantly sexually dimorphic, Fig. 2. Additionally, we have identified 9 annexins equally expressed by individuals of both sex and which have strong effect upon the mechanism by which glucocorticoids (such as cortisol) inhibit inflammation.

Levels of sexual dimorphism are graphically represented in Fig. 2 with the full protein list provided in Data set 1. Interestingly, the immunity heat map in Fig. 2 shows rather low levels of the immunity-linked protein abundances except the three highly expressed ‘bactericidal permeability-increasing proteins’ (BPIB1, BPIFA2, and BPIFB9B) and one immunoglobulin (IGKC, Ig kappa chain C region). BPI proteins have an antibacterial activity against the gram-negative bacteria<sup>51</sup>. We have detected seven BPI members and all of them were male biased ( $p < 0.05$ ): BPIA1, BPIB1, BPIB2, BPIB3, BPIFA2, BPIFB5, BPIFB9B. On the level of the mouse SMG transcriptome, however, we have detected only *Bpifa2* which has previously been detected as a transcript in the mouse parotid glands, and is also known as the parotid secretory protein - PSP<sup>52</sup>. Furthermore, BPIFA1 (PLUNC/SPLUNC1) and BPIFB1 (LPLUNC1) are known to be expressed by Bowman’s glands of the nasal passage<sup>53</sup>. Remaining members were most likely expressed by other oro-facial tissues (i.e. nasal, lacrimal, palatal, and salivary). Moreover, we have also detected CRAMP, a cathelin-related antimicrobial peptide, in the saliva of males and females.

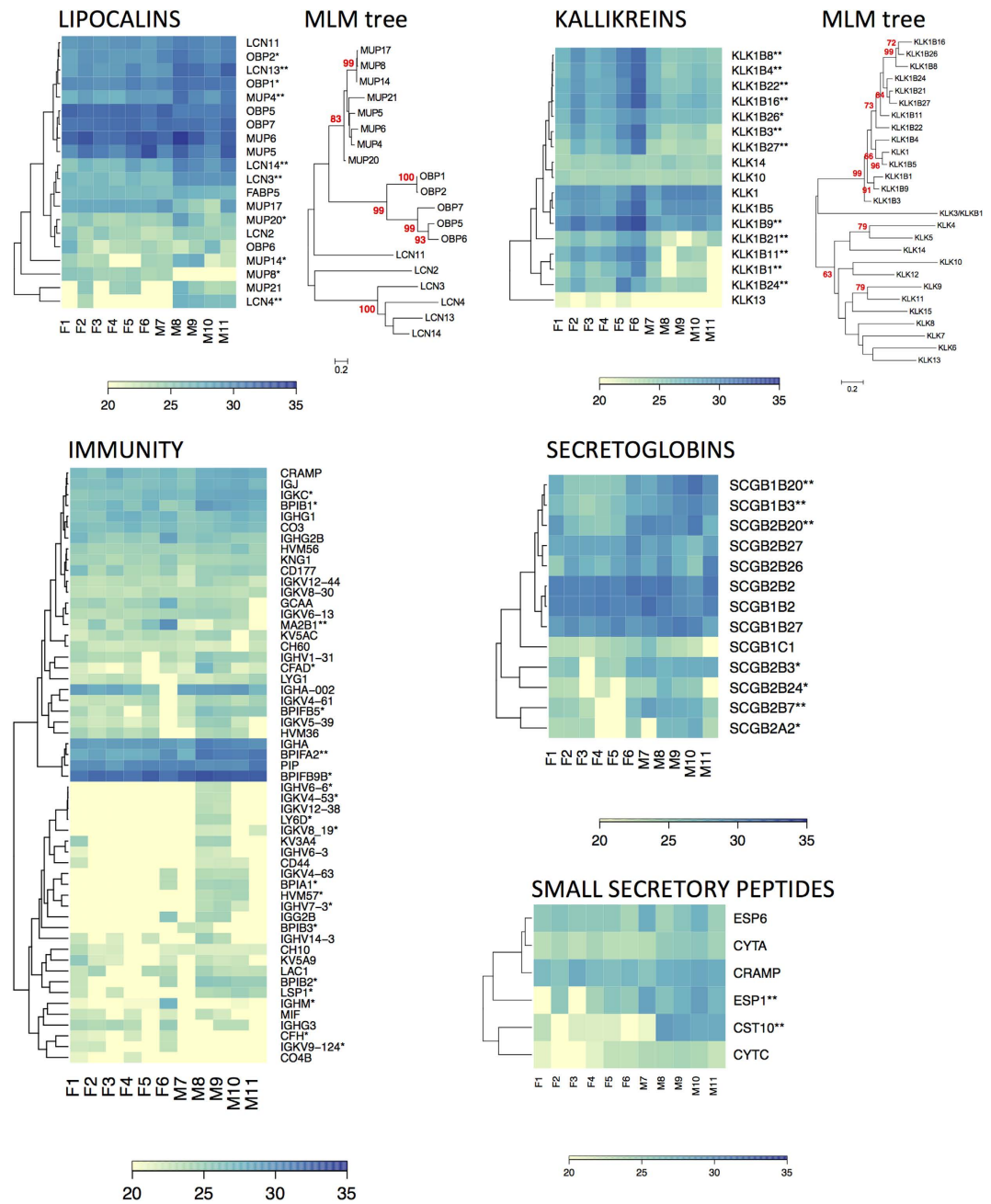
## Discussion

With the use of sensitive proteomic techniques, we show that saliva is a complex system containing chemical signal transporters, antibacterial and immunity linked proteins, and many other proteins that are involved in general physiology of the oral cavity. We also show that many nasal and lacrimal proteins are abundant in the saliva proteome, presumably as a consequence of their final transport to the oral cavity from tissues where they are expressed and where they function as VOC transporters. These include a group of odorant binding proteins (OBP) that we previously identified as predicted transcripts in the mouse genome<sup>27,33</sup>, detected their expression sites in various oro-facial tissues<sup>31</sup>, and finally detected them as proteins in the saliva proteome in this study. Because OBPs, MUPs and LCNs have similar tertiary structure (Fig. 3) with the capacity to transport VOCs, it is likely that together, nasal lipocalins, could be important for signal transduction but even more for a consequent neuronal desensitisation by transporting partially degraded VOCs to the oral cavity and then further to the digestive tract. However, it is in question why OBP1 and OBP2 are sexually dimorphic. It is possible that different levels of expression may reflect potential differences in the olfactory abilities between sexes. To further support the claim that these proteins originate only in the nasal and lacrimal tissues, it would help to analyse other independent oro-facial glands (i.e. parotid, sublingual, or von Ebner glands) and lymphoid tissues that are present in the oral cavity.

Because mice begin social interactions by investigating facial areas<sup>54</sup> it is also likely that salivary proteins expressed by salivary glands along with those that were transported from the nose serve chemical communication together. It is however in question how would an individual benefit from having lipocalins with ligands that were inhaled from another individual. We suggest that a mixture of the self and of the other individual’s smell, that is spread on the receiver’s body during selfgrooming, could mediate peaceful social contacts between individuals within a deme—a structure typical for the house mouse social groups<sup>55</sup>.

Among MUPs, MUP20 or ‘Darcin’ was previously described as a protein pheromone that stimulates female attraction for particular *M. m. domesticus* males, improves spatial learning<sup>56,57</sup>, has been shown to function as an indicator of current health status of males<sup>58</sup>, and to predict the outcome of male-male territorial competition<sup>3</sup>. MUP20 expression levels are higher in dominant males during and prior to competition, making it predictive of dominance status<sup>3</sup>. However, we detected MUP20 being significantly male-biased ( $p = 0.017$ ) but abundant in the saliva proteomes in individuals of both sex in *M. m. musculus*, and our RNAseq data revealed that MUP20 is coded by *Mup20* gene in the mouse submandibular gland. Thus, it is hard to imagine that this protein functions

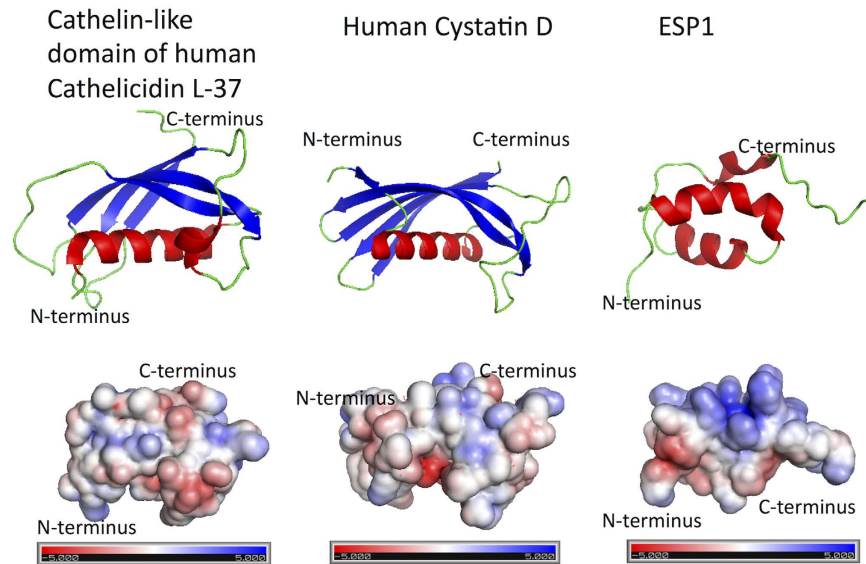




**Figure 2.** Graphical representation of the protein abundance values in heat maps shows sexually dimorphic proteins (labelled with stars: \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ ) with notable variation between individuals. We provide the phylogeny dendrogram for kallikreins and a partial dendrogram for the detected lipocalins. The Maximum likelihood trees are showing the protein phylogeny based on the number of substitutions per site and with the bootstrap values. We consider a group of proteins monophyletic when bootstrap values are above 75.

as a male-only pheromone (i.e. at least in this subspecies) if females produce such signal too. There is at least one study demonstrating that MUP20 is also present in the submandibular gland transcriptome of the laboratory mouse<sup>25</sup>. Therefore, previous studies describing MUP20 as a male-specific signalling protein that is present only in the urine of *M. m. domesticus*<sup>56,57</sup> need to be further supported with more sensitive techniques. To add, we are also showing that MUP8 is among all MUPs the only one that is significant female biased. However, it remains to be determined where it is transcribed and translated.

Another protein that has been described as a male-specific signalling protein in the laboratory mouse is a 7 kDa protein, named as the exocrine gland-secreted peptide-1 or ESP1<sup>59,60</sup>. ESP1 is produced by the mouse lacrimal glands, secreted with tears and when experimentally transferred to the female vomeronasal organ, it stimulates V2R-expressing vomeronasal chemosensory neurons, and thus elicits an electrical response<sup>60</sup>. In *M. m. musculus* under this study, however, ESP1 and ESP6 were sex biased with the female levels being lower than those detected in males (Fig. 2). If ESPs cannot function as pheromones due to their occurrence in individuals of



**Figure 3. Graphical representation of structural and biochemical properties of murine salivary protein homologs - Cathelin-like domain of human Cathelicidin L-77, human Cystatin D and murine ESP1.** Upper row: Cartoon representation of selected proteins where  $\alpha$ -helices are in red, and beta sheets in blue color. Below are provided 3D representations of surface charge distribution of respective proteins, the charge scale is shown under each structure.

both sex, it is in question what are their other potential roles. One obvious role stems out of visualizing the electrostatics properties of ESP1 in Fig. 3. ESP1 has three  $\alpha$ -helices with two helices being negatively charged and one (middle) being positively charged. This structural amphipathy fits the description of antimicrobial peptides (i.e. similar to CRAMP<sup>61</sup>). Thus it is possible that ESP1 and also other ESPs are involved in the host-defence against bacteria.

Secretoglobins (SCGBs or ABPs) were also suggested to play roles in chemical communication<sup>62</sup>. However, when experimentally tested, wild mice of the two subspecies did not show any difference in time spent sniffing urine to sniffing the urine with added ABPs<sup>18</sup>. In our data, some SCGBs/ABPs were male-biased but no member of this family was sex unique in the mouse saliva. Secretoglobins were previously detected in most body fluids and mucosa including lungs, uterus, nasal and oral cavities, and tears in many mammals including rabbits, mice, and humans. They are presumably involved in various processes including tissue repair, eye protection, and anti-inflammatory responses due to their capacity to transport various steroids<sup>63</sup>. Moreover, the PANTHER Overrepresentation test in this study did not identify any involvement in any known biological process of the mouse, which makes this family functionally understudied though an interesting system for future studies.

The saliva proteome also contains proteins that are involved in the regulation of harmonious symbiosis with bacteria and of potential risk of exogenous bacterial infection. A strategy called “nutritional immunity” prevents pathogens from acquiring the host iron<sup>64</sup>, which is an essential nutrient, but only small amounts of free iron are accessible. Therefore, bacteria acquire iron by a secretion of high-affinity iron sequestering siderophores. The mammalian host, however, limits this process by the production of Lipocalin 2 (LCN2)<sup>65</sup> which efficiently scavenges for catecholate-type siderophores (i.e. such as enterochelin, mycobactin)<sup>66</sup>. In our data the production of LCN2 (and also LCN11) was equal between sexes, thus suggesting that males and females similarly regulate such symbiosis with pathogens and/or the defence against them. Interestingly, when the lipocalin-acquired iron is transported to the oral cavity, which is the beginning of the digestive tract, the complex is in fact running towards the enzymatic digestion and thus iron is freed, and can presumably be used by symbiotic bacteria in the lower digestive tract. However, mammalian hosts evolved almost an array of other mechanisms of defence.

Other mechanisms of defence involve bactericidal proteins defending the mucosal layers of the body against pathogenic microbiota. In our data, we have detected seven members of the PLUNC (palate, lung, and nasal epithelium clone) protein family. These included bactericidal/permeability-increasing proteins<sup>51,52</sup>. All detected BPI proteins in the saliva proteome were male biased and at least three members were characteristic of being within the top ten of the most abundant salivary proteins (Fig. 2). It is possible that various antimicrobial proteins are male biased simply to compensate for the testosterone dependent immunosuppression of reproducing males<sup>67</sup>. Moreover the sex-dependent resistance against bacteria (*Salmonella typhimurium*) has also been demonstrated in the house mouse where males were more resistant than females<sup>68</sup>. We have also detected high levels of the prolactin-inducible protein (PIP) which is a submandibular gland protein with the ability to bind immunoglobulin G (IgG), IgG-Fc, CD4-T cell receptor, and different species of bacteria (mainly streptococci), thus playing an important role in non-immune defense<sup>69</sup>. A natural antibiotics CRAMP was detected in individuals of both sex. CRAMP forms an amphipathic alpha-helix similar to other antimicrobial peptides, whilst functional studies showed that CRAMP is a potent antibiotics against gram-negative bacteria by inhibiting the growth of a variety of bacterial strains<sup>61</sup>.

Kallikrein 1-related peptidases were female-biased in our data—a trend, described for the first time in wild mice. In the laboratory mouse, kallikreins seem to be male-biased and only the kallikrein 1-related peptidase b5 was female-biased<sup>70,71</sup>. These serine proteases are involved in the wound healing processes and have a strong antimicrobial activity<sup>50</sup>. Thus it is possible that the higher abundance of kallikrein 1-related peptidases in female saliva is adaptive as it may, for example, help females to maintain healthy skin development of their juveniles via kallikrein administration during a frequent allogrooming care. Moreover, we have also detected four chitinases (i.e. CH3L1, CHIA, CHIL3, CHIL4) in the saliva of males and females, which may aid removing the chitinous mouthparts of ectoparasites via administration of chitinases during the selfgrooming and allogrooming behaviour.

From the above list of proteins it is evident that saliva is a complex biological system that compromises between various functions including chemical communication, immunity and tissues repair. Because many lipocalins that we detected in the mouse saliva are known to be expressed by other tissues (e.g. nasal, lacrimal) it is likely that these proteins also act as scavengers that bind and excrete toxic compounds. We have already suggested that evolution of chemical communication and of the system of detoxification might have been driven by similar selective forces because both systems use the same pool of lipocalin transporters<sup>27,31</sup>. This hypothesis or as we call it the ‘toxic waste hypothesis’<sup>27</sup> has later been suggested by another laboratory<sup>72</sup> with the first experimental evidence provided in a recent paper<sup>42</sup>. They demonstrated that mice loaded with an industrial chemical, 2,4-di-tert-butylphenol (DTBP) use MUPs for a consequent detoxification<sup>42</sup>. Here we suggest that the nasal and olfactory lipocalins (including MUPs) transport potential toxic waste and various degradation products from chemical signals to the oral cavity, and further to the digestive tract where they are decomposed.

To conclude, we have provided the saliva proteome from wild-living individuals of the house mouse *Mus musculus musculus*. We aimed to identify the level of sexual dimorphism in the abundance of proteins that are involved in chemical communication because most studies focused on the western house mouse subspecies (*M. m. domesticus*) and on various inbred lines. Novelty of our findings includes the detection of sexually dimorphic proteins that were previously detected only in males with MUP20 and ESP1 being a good example. For the first time, we have also shown that the saliva proteome includes proteins that are produced mainly (but not exclusively) by olfactory tissues and which are presumably transported to the oral cavity. Altogether, that makes this system (saliva) interesting and an important source of chemical signals necessary for communication as well as an interesting source of multiple markers of physiological states.

## References

1. Mouse Genome Sequencing, C. *et al.* Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**, 520–562, doi: 10.1038/nature01262 (2002).
2. Blanchard, A. A. *et al.* Towards further defining the proteome of mouse saliva. *Proteome science* **13**, 10, doi: 10.1186/s12953-015-0068-3 (2015).
3. Nelson, A. C., Cunningham, C. B., Ruff, J. S. & Potts, W. K. Protein pheromone expression levels predict and respond to the formation of social dominance networks. *Journal of Evolutionary Biology* **28**, 1213–1224, doi: 10.1111/jeb.12643 (2015).
4. Cunningham, C. B., Nelson, A. C., Ruff, J. S. & Potts, W. K. MUP expression is linked with sociality not competitive ability in male house mice. *Integr Comp Biol* **53**, E46–E46 (2013).
5. Novotny, M. V. Pheromones, binding proteins and receptor responses in rodents. *Biochemical Society* **31**, 117–122 (2003).
6. Timm, D. E., Baker, L. J., Mueller, H., Zidek, L. & Novotny, M. V. Structural basis of pheromone binding to mouse major urinary protein (MUP-I). *Protein Science* **10**, 997–1004 (2001).
7. Novotny, M. V., Ma, W., Wiesler, D. & Zidek, L. Positive identification of the puberty-accelerating pheromone of the house mouse: the volatile ligands associating with the major urinary protein. *Proc. R. Soc. Lond. B* **266**, 2017–2022 (1999).
8. Shahan, K., Denaro, M., Gilmartin, M., Shi, Y. & Derman, E. Expression of six mouse major urinary protein genes in the mammary, parotid, sublingual, submaxillary, and lacrimal glands and in the liver. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 1947–1954 (1987).
9. Stopková, R., Stopka, P., Janotová, K. & Jedelsky, P. L. Species-specific expression of major urinary proteins in the house mice (*Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus*). *J Chem Ecol* **33**, 861–869 (2007).
10. Sharrow, S. D., Vaughn, J. L., Židek, L., Novotny, M. V. & Stone, M. J. Pheromone binding by polymorphic mouse major urinary proteins. *Protein Science* **11**, 2247–2256 (2002).
11. Zidek, L. *et al.* NMR Mapping of the Recombinant Mouse Major Urinary Protein I Binding site Occupied by the Pheromone 2-sec-Butyl-4,5-dihydrothiazole. *Biochemistry* **38**, 9850–9861 (1999).
12. Hurst, J. L. & Beynon, R. J. Scent wars: the chemobiology of competitive signalling in mice. *BioEssays* **26**, 1288–1298 (2004).
13. Hurst, J. L. *et al.* Individual recognition in mice mediated by major urinary proteins. *Nature* **414**, 631–634 (2001).
14. Mucignat-Caretta, C. & Caretta, A. In *Advances in Chemical Communication in Vertebrates* (eds R. E. Johnston, D. Muller-Schwarze & P. Sorensen) 359–364 (Plenum Press, 1999).
15. Novotny, M. V., Harvey, S., Jemiolo, B. & Alberts, J. Synthetic pheromones that promote inter-male aggression in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 2059–2061 (1985).
16. Smadja, C. & Ganem, G. Subspecies recognition in the house mouse: a study of two populations from the border of a hybrid zone. *Behav. Ecol.* **13**, 312–320 (2002).
17. Smadja, C. & Ganem, G. Divergence of odorant signals within and between the two European subspecies of the house mouse. *Behavioral Ecology* **19**, 223–230 (2008).
18. Bimová, B., Albrecht, T., Macholán, M. & Piálek, J. Signalling components of mate recognition system in the house mouse. *Behavioural Processes* **80**, 20–27 (2009).
19. Mucignat-Caretta, C. *et al.* Urinary volatile molecules vary in males of the 2 European subspecies of the house mouse and their hybrids. *Chem Senses* **35**, 647–654, doi: 10.1093/chemse/bjq049 (2010).
20. Thonhauser, K. E., Raveh, S., Hettyey, A., Beissmann, H. & Penn, D. J. Scent marking increases male reproductive success in wild house mice. *Anim Behav* **86**, 1013–1021, doi: 10.1016/j.anbehav.2013.09.004 (2013).
21. Janotova, K. & Stopka, P. The level of major urinary proteins is socially regulated in wild *Mus musculus musculus*. *J Chem Ecol* **37**, 647–656, doi: 10.1007/s10886-011-9966-8 (2011).
22. Janotová, K. & Stopka, P. Mechanisms of chemical communication: the role of Major Urinary Proteins. *Folia Zool.* **58**, 41–55 (2009).
23. Stopka, P., Janotova, K. & Heyrovsky, D. The advertisement role of major urinary proteins in mice. *Physiology & Behavior* **91**, 667–670 (2007).
24. Rusu, A. S., Krackow, S., Jedelsky, P. L., Stopka, P. & König, B. 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* **26**, 127–135 (2008).

25. Logan, D. W., Marton, T. F. & Stowers, L. Species Specificity in Major Urinary Proteins by Parallel Evolution. *PLoS ONE* **3**, doi: 10.1371/journal.pone.0003280 (2008).
26. Mudge, J. M. *et al.* Dynamic instability of the major urinary protein gene family revealed by genomic and phenotypic comparisons between C57 and 129 strain mice. *Genome Biol* **9**, R91, doi: 10.1186/gb-2008-9-5-r91 (2008).
27. Stopková, R., Hladovcová, D., Kokavec, J., Vyoral, D. & Stopka, P. Multiple roles of secretory lipocalins (MUP, OBP) in mice. *Folia Zool.* **58**, 29–40 (2009).
28. Thoß, M., Luzynski, K., Ante, M., Miller, I. & Penn, D. J. Major urinary protein (MUP) profiles show dynamic changes rather than individual 'barcode' signatures. *Frontiers in Ecology and Evolution* **3**, doi: 10.3389/fevo.2015.00071 (2015).
29. Utsumi, M. *et al.* Expression of major urinary protein genes in the nasal glands associated with general olfaction. *Journal of Neurobiology* **39**, 227–236 (1999).
30. Cavaggoni, A., Mucignat, C. & Tirindelli, R. Pheromone signalling in the mouse: role of urinary proteins and vomeronasal organ. *Archives Italiennes de Biologie* **137**, 193–200 (1999).
31. Stopkova, R. *et al.* Mouse lipocalins (MUP, OBP, LCN) are co-expressed in tissues involved in chemical communication. *Frontiers in Ecology and Evolution* **4**, doi: 10.3389/fevo.2016.00047 (2016).
32. Pes, D., Dal Monte, M., Ganni, M. & Pelosi, P. Isolation of two odorant-binding proteins from mouse nasal tissue. *Comp. Biochem. Physiol.* **103B**, 1011–1017 (1992).
33. Stopkova, R., Dudkova, B., Hajkova, P. & Stopka, P. Complementary roles of mouse lipocalins in chemical communication and immunity. *Biochem Soc T* **42**, 893–898, doi: 10.1042/Bst20140053 (2014).
34. Stopkova, R. *et al.* Novel OBP genes similar to hamster Aphrodisin in the bank vole, *Myodes glareolus*. *BMC Genomics* **11**, 45, doi: 10.1186/1471-2164-11-45 (2010).
35. Felicioli, A., Ganni, M., Garibotti, M. & Pelosi, P. Multiple types and forms of odorant-binding proteins in the Old-World porcupine *Hystrix cristata*. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry* **105**, 775–784 (1993).
36. Lazar, J., Greenwood, d. R., Rasmussen, L. E. L. & Prestwich, G. D. 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* **41**, 11786–11794 (2002).
37. Bignetti, E. *et al.* Purification and characterisation of an odorant-binding protein from cow nasal tissue. *Eur. J. Biochem.* **149**, 227–231 (1985).
38. Spinelli, S. *et al.* The Structure of the Monomeric Porcine Odorant Binding Protein Sheds Light on the Domain Swapping Mechanism. *Biochemistry* **37**, 7913–7918 (1998).
39. Nagnan-Le Meillour, P., Vercoutter-Edouart, A. S., Hilliou, F., Le Danvic, C. & Levy, F. Proteomic Analysis of Pig (*Sus scrofa*) Olfactory Soluble Proteome Reveals O-Linked-N-Acetylglucosaminylation of Secreted Odorant-Binding Proteins. *Frontiers in endocrinology* **5**, 202, doi: 10.3389/fevo.2014.00202 (2014).
40. Marchese, S., Pes, D., Scalonì, A., Carbone, V. & Pelosi, P. Lipocalins of boar salivary glands binding odours and pheromones. *Eur J Biochem* **252**, 563–568 (1998).
41. Macrides, F., Clancy, A. N., Singer, A. G. & Agosta, W. C. Male hamster investigatory and copulatory responses to vaginal discharge: An attempt to impart sexual significance to an arbitrary chemosensory stimulus. *Physiology & Behavior* **33**, 627–632 (1984).
42. Kwak, J., Strasser, E., Luzynski, K., Thoss, M. & Penn, D. J. Are MUPs a Toxic Waste Disposal System? *PLoS One* **11**, e0151474, doi: 10.1371/journal.pone.0151474 (2016).
43. Cox, J. *et al.* Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics* **13**, 2513–2526, doi: 10.1074/mcp.M113.031591 (2014).
44. Mi, H., Poudel, S., Muruganujan, A., Casagrande, J. T. & Thomas, P. D. PANTHER version 10: expanded protein families and functions, and analysis tools. *Nucleic acids research* **44**, D336–D342, doi: 10.1093/nar/gkv1194 (2016).
45. Jones, D. T., Taylor, W. R. & Thornton, J. M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer applications in the biosciences: CABIOS* **8**, 275–282 (1992).
46. Tamura, K. *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731–2739, doi: 10.1093/molbev/msr121 (2011).
47. Pavelka, N. *et al.* A power law global error model for the identification of differentially expressed genes in microarray data. *BMC Bioinformatics* **5**, 203, doi: 10.1186/1471-2105-5-203 (2004).
48. Khew-Goodall, Y. *et al.* Vomeronodulin, a putative pheromone transporter: cloning, characterization, and cellular localization of a novel glycoprotein of lateral nasal gland. *FASEB J* **5**, 2976–2982 (1991).
49. Laukaitis, C. M., Dlouhy, S. R., Emes, R. D., Ponting, P. C. & Karn, R. C. Diverse spatial, temporal, and sexual expression of recently duplicated androgen-binding protein genes in *Mus musculus*. *BMC Evolutionary Biology* **5**, 1–16 (2005).
50. Yamasaki, K. *et al.* Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. *FASEB J* **20**, 2068–2080, doi: 10.1096/fj.06-6075com (2006).
51. LeClair, E. E. Four reasons to consider a novel class of innate immune molecules in the oral epithelium. *J Dent Res* **82**, 944–950 (2003).
52. Leclair, E. E. Four BPI (bactericidal/permeability-increasing protein)-like genes expressed in the mouse nasal, oral, airway and digestive epithelia. *Biochem Soc Trans* **31**, 801–805, doi: 10.1042/ (2003).
53. Musa, M. *et al.* Differential localisation of BPIFA1 (SPLUNC1) and BPIFB1 (LPLUNC1) in the nasal and oral cavities of mice. *Cell Tissue Res* **350**, 455–464, doi: 10.1007/s00441-012-1490-9 (2012).
54. Luo, M., Fee, M. S. & Katz, L. C. Encoding pheromonal signals in the accessory olfactory bulb of behaving mice. *Science* **299**, 1196–1201, doi: 10.1126/science.1082133 (2003).
55. Berry, R. J. & Bronson, F. H. Life-History and Bioeconomy of the House Mouse. *Biological Reviews* **67**, 519–550, doi: 10.1111/j.1469-185X.1992.tb01192.x (1992).
56. Roberts, S. A. *et al.* Darcin: a male pheromone that stimulates female memory and sexual attraction to an individual male's odour. *BMC Biol.* **8**, doi: 10.1186/1741-7007-1188-1175 (2010).
57. Roberts, S. A., Davidson, A. J., McLean, L., Beynon, R. J. & Hurst, J. L. Pheromonal induction of spatial learning in mice. *Science* **338**, 1462–1465, doi: 10.1126/science.1225638 (2012).
58. Lopes, P. C. & König, B. Choosing a healthy mate: sexually attractive traits as reliable indicators of current disease status in house mice. *Animal Behaviour* **111**, 119–126, doi: 10.1016/j.anbehav.2015.10.011 (2016).
59. Kimoto, H. *et al.* Sex- and strain-specific expression and vomeronasal activity of mouse ESP family peptides. *Current biology: CB* **17**, 1879–1884, doi: 10.1016/j.cub.2007.09.042 (2007).
60. Kimoto, H., Haga, S., Sato, K. & Touhara, K. Sex-specific peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons. *Nature* **437**, 898–901 (2005).
61. Gallo, R. L. *et al.* Identification of CRAMP, a cathelin-related antimicrobial peptide expressed in the embryonic and adult mouse. *J Biol Chem* **272**, 13088–13093 (1997).
62. Laukaitis, C. M., Critser, E. S. & Karn, R. C. Salivary androgen-binding protein (ABP) mediates sexual isolation in *Mus musculus*. *Evolution* **51**, 2000–2005 (1997).
63. Jackson, B. C. *et al.* Update of the human secretoglobin (SCGB) gene superfamily and an example of 'evolutionary bloom' of androgen-binding protein genes within the mouse *Scgb* gene superfamily. *Hum Genomics* **5**, 691–702 (2011).



64. Porcheron, G., Garenaux, A., Proulx, J., Sabri, M. & Dozois, C. M. Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **3**, 90, doi: 10.3389/fcimb.2013.00090 (2013).
65. Goetz, D. H. *et al.* The Neutrophil Lipocalin NGAL is a Bacteriostatic Agent that Interferes with Siderophore-Mediated Iron Acquisition. *Molecular Cell* **10**, 1033–1043 (2002).
66. Flo, T. H. *et al.* Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* **432**, 917–921, doi: 10.1038/nature03104 (2004).
67. Klein, S. L. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neurosci Biobehav Rev* **24**, 627–638 (2000).
68. Thonhauser, K. E., Raveh, S., Thoss, M. & Penn, D. J. Does multiple paternity influence offspring disease-resistance? *J Evol Biol*, doi: 10.1111/jeb.12854 (2016).
69. Lee, B., Bowden, G. H. W. & Myal, Y. Identification of mouse submaxillary gland protein in mouse saliva and its binding to mouse oral bacteria. *Arch Oral Biol* **47**, 327–332 (2002).
70. Lundwall, A. Old genes and new genes: the evolution of the kallikrein locus. *Thromb Haemost* **110**, 469–475, doi: 10.1160/TH12-11-0851 (2013).
71. Karn, R. C. & Laukaitis, C. M. Positive selection shaped the convergent evolution of independently expanded kallikrein subfamilies expressed in mouse and rat saliva proteomes. *PLoS One* **6**, e20979, doi: 10.1371/journal.pone.0020979 (2011).
72. Kwak, J. *et al.* Butylated hydroxytoluene is a ligand of urinary proteins derived from female mice. *Chem Senses* **36**, 443–452, doi: 10.1093/chemse/bjr015 (2011).

## Acknowledgements

The research of PS team was supported by the project BIOCEV (CZ.1.05/1.1.00/02.0109) and National Program for Sustainability II (LQ1604) from the Ministry of Education, Youth and Sports. We are also grateful to Helena Uhlířová for the lab assistance, Dr. Marian Novotný for introducing us to the protein electrostatics modelling, and to Dr. Karel Harant from the Mass Spectrometry and Proteomics Service Laboratory, Faculty of Science, Charles University in Prague for performing the LC-MS/MS run.

## Author Contributions

P.S. and R.S. wrote the main manuscript text, B.K. helped to prepare Figures 1–3 and with L.H. did the sample collections. P.K. produced the transcriptomic data. M.Č. had responsibilities over the animal trapping and housing. All authors have participated during experimental procedures and reviewed the manuscript.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**How to cite this article:** Stopka, P. *et al.* On the saliva proteome of the Eastern European house mouse (*Mus musculus musculus*) focusing on sexual signalling and immunity. *Sci. Rep.* **6**, 32481; doi: 10.1038/srep32481 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016

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

Martina Černá<sup>1</sup>, Barbora Kuntová<sup>1</sup>, Pavel Talacko<sup>1</sup>, Romana Stopková<sup>1</sup>, & Pavel Stopka<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> *BIOCEV group, Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University, Viničná 7, CZ 12844, Czech Republic*

\* Correspondence: Pavel Stopka [pstopka@natur.cuni.cz](mailto:pstopka@natur.cuni.cz)

## Abstract

Female house mice produce pheromone-carrying Major Urinary Proteins (MUPs) in a cycling manner, thus reaching the maximum urinary production just before ovulation. This is thought to occur to advertise the time of ovulation via deposited urine marks. This study aimed to characterize the protein content from the mouse vaginal flushes to detect whether vaginal advertising occurs in the house mouse for a direct identification of reproductive states by males. Here we show that the mouse vaginal discharge contains lipocalins including those from the odorant binding (OBP) and major urinary (MUP) protein families. OBPs were highly expressed but only slightly varied throughout the cycle, whilst several MUPs were differentially abundant. MUP20 or ‘darcin’, was thought to be expressed only by males. However, in females it was significantly up-regulated during estrus similarly as the recently duplicated group-B MUPs (sMUP17 and highly expressed sMUP9), and which in the mouse urine are male biased. Their productions rise between proestrus and estrus, remain steady throughout metestrus, and are co-expressed with antimicrobial proteins. Thus, we suggest that MUPs rather than OBPs are involved in the vaginal advertising of the mouse via ligands that they transport out of the body where they may function as chemical signals.

**Key words:** estrus, estrous cycle, mouse, lipocalin, chemical communication bactericidal, darcin

## Introduction

During an estrous cycle, most mammalian females will pass through the four consecutive phases including proestrus, estrus, metestrus, and diestrus (e.g. *Mus*<sup>1,2</sup>, *Apodemus*<sup>3</sup>, *Rattus*<sup>4</sup>). The estrous cycle in mice is strongly affected by pheromones. Suppression of estrus in single-sex populations<sup>5</sup>, rapid return to estrus when paired with males<sup>6</sup> or exposed to male urine<sup>7</sup> are well known effects and they were also observed in other mammals<sup>3,8</sup>. The house mouse (*Mus musculus*) uses a system of lipocalin transporters of active volatile organic compounds (VOCs), which together serve as signals. In mice, these signals are manifested via expression of large quantities of male-biased<sup>9</sup> and highly homologous<sup>10-12</sup> major urinary proteins (MUPs) in the liver. MUPs are products of a gene cluster on the chromosome 4, that contains 21 coding genes (and a similar number of pseudogenes), and can be divided into two groups, the group-A (ancestral), containing *Mup3*, *Mup4*, *Mup5*, *Mup6*, *Mup20* and *Mup21*, and the group-B, consisting of 15 other *Mups* (i.e. *Mup1*, *Mup2*, *Mup7-Mup19*) sharing almost 99% sequence identity<sup>13,14</sup>, reviewed in citations<sup>15,16</sup>. They bind some volatile organic compounds (VOCs) in their eight-stranded beta barrel and transport them to the urine<sup>17-19</sup>, where they act as an honest, cheat-proof

display of an individual's health and condition<sup>20</sup>. Such scent-marking signals have strong effects on the reproductive success of the signaller<sup>21</sup>. However, most studies focused on the male components of chemical signalling and, thus, there is very little evidence on the role of female MUPs.

A group of lipocalins that may be involved in the transport of chemical signals and potentially also in the mouse vaginal advertising are members of the odorant binding protein family (OBPs), because in other mammals, they were detected in their vaginal secretions (e.g. hamsters<sup>22</sup>, and potentially bank voles<sup>23</sup>) and/or urine (e.g. mole rats<sup>24</sup> and bank voles<sup>23</sup>). The X-linked *Obp* genes of the mouse were thought to involve just two nasal members – *Obp1a*, and *Obp1b*<sup>25</sup>. However, *Obp* genes have also undergone a series of duplications in mice, and they occur in a cluster of seven genes (i.e. including *Prb*, Probasin) and two pseudogenes on the X chromosome<sup>15,26,27</sup>. In wild *M. m. musculus* mice, *Obps* were predicted from the genome data<sup>15</sup>, detected as transcripts (*Obp1* - KJ605390, *Obp2* - KJ605391, *Obp5* (*Obp1a*) - KJ605392, *Obp6* - KJ605393, and *Obp7* (*Obp1b*) - KJ605394)<sup>27</sup> and their expression was corroborated on the level of protein in the mouse saliva<sup>28</sup>. Mouse OBPs are produced by various oro-facial tissues including nasal, vomeronasal, nasal-lymphoid, and lacrimal glands/tissues<sup>27</sup> and they are naturally transported with mucosal secrets to the oral cavity, where they are highly abundant<sup>28</sup>. It has also been demonstrated that they are involved in the process of rapid ligand internalization by means of removing small organic molecules including odorants from nasal mucosa, this has been demonstrated for OBP5 (i.e. OBP1a in olfactory epithelia)<sup>29</sup>. However, data on expression of these proteins from the mouse vaginal secretions were missing.

In mice, chemical signalling was thought to be manifested via urine marks, and so many experiments have been performed to study in detail this component of chemical signalling. For example, female house mice use major urinary proteins to advertise their estrus with urine marks. It has been shown in the laboratory mice<sup>30</sup> and in wild house mice (*M. m. musculus*)<sup>31</sup> that (i) males up-regulate urinary MUPs during social contacts, and that (ii) females use MUPs to advertise their reproductive state by varying the concentration of MUPs in the urine during the estrous cycle<sup>30</sup>. However, it is possible that direct contact and chemical signals on bodies of interacting individuals could be more important during an interaction because this component of signalling is directly linked to an interacting individual, i.e. the signal owner. Thus, the aim of our study was to analyse the protein content of vaginal flushes and its variation throughout the cycle to detect potential signalling proteins, and to evaluate the role of particular estrous phases in regulating the expression of these proteins. Furthermore, we also aimed to determine the level of correlation between the house mouse estrous cycle and the host regulation and degradation of bacteria to further the understanding of the emergence of complex odour mixtures.

## **Materials and methods**

### **Ethical Standards**

All animal procedures were carried out in strict accordance with the law of the Czech Republic paragraph 17 no. 246/1992 and the local ethics committee of the Faculty of Science, Charles University in Prague chaired by Dr. Stanislav Vybíral specifically approved this study in accordance with accreditation no. 27335/2013-17214 valid until 2019.

### Subjects, housing conditions and experimental design

In this experiment, we used a total of 9 G1 wild-derived *Mus musculus musculus* females (120 days old) and 9 unfamiliar males (120 days old) for a period of social stimulation during which vaginal fluid samples were collected on a daily basis. Females were housed in pairs with a male and in cages divided by a wire mesh from individual males with square openings (diameter was 1cm) allowing communication but suppressing direct contact (13:11 hrs, D:N, temperature  $t=23^{\circ}\text{C}$ ). The experimental cages were supplied with fresh bedding at the beginning of the experiment and provided with water and food ad libitum. Vaginal lavage was performed daily between 8:00 and 9:00am by gentle flushing with a pipette using 20 $\mu\text{l}$  of the 0.9% saline solution. Samples were centrifuged at 300 rcf for 10minutes,  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatant was used for the protein analysis and the cell pellet was used to prepare slides on a concentrator (StatSpin) for further cytological analyses. These slides were differentially stained to visualize nucleated and cornified cells with May-Gruenwald (3 min) and Giemsa (10 min) staining solutions.

### Protein Digestion

Prior to our experiments, we tested the efficiency of ethanol and acetone precipitation of proteins from the vaginal lavage samples. Some acetone precipitated samples did not enter the gel (PAGE) whilst all proteins entered the gel after cold ethanol precipitation. Thus, all protein samples were precipitated with the ice-cold ethanol (20minutes) and centrifuged at 10 000 rcf for 10minutes,  $0^{\circ}\text{C}$ . This was followed by a re-suspension of dried pellets in the digestion buffer (1% SDC, 100mM TEAB – pH=8.5). Protein concentration of each lysate was determined using the BCA assay kit (Fisher Scientific). Cysteines in 20 $\mu\text{g}$  of proteins were reduced with a final concentration of 5mM TCEP ( $60^{\circ}\text{C}$  for 60 min) and blocked with 10mM MMTS (i.e. S-methyl methanethiosulfonate, 10 min Room Temperature). Samples were cleaved with trypsin (1  $\mu\text{g}$  of trypsin per sample) in  $37^{\circ}\text{C}$  overnight. Peptides were desalted on a Michrom C18 column.

### nLC-MS<sup>2</sup> Analysis

Nano Reversed phase columns were used (EASY-Spray column, 50 cm x 75  $\mu\text{m}$  ID, PepMap C18, 2  $\mu\text{m}$  particles, 100  $\text{\AA}$  pore size). Mobile phase buffer A was composed of water, and 0.1% formic acid. Mobile phase B contained acetonitrile, and 0.1% formic acid. Samples were loaded onto a trap column (Acclaim PepMap300, C18, 5  $\mu\text{m}$ , 300  $\text{\AA}$  Wide Pore, 300  $\mu\text{m}$  x 5 mm, 5 Cartridges) for 4 min at 15  $\mu\text{l}/\text{min}$  loading buffer was composed of water, 2% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid. After 4 minutes ventile was switched and Mobile phase B increased from 4% to 35% B at 60 min, 75% B at 61 min, hold for 8 minutes, and 4% B at 70 min, hold for 15 minutes until the end of run.

Eluting peptide cations were converted to gas-phase ions by electrospray ionization and analysed on a Thermo Orbitrap Fusion (Q-OT-qIT, Thermo). Survey scans of peptide precursors from 350 to 1450  $m/z$  were performed at 120K resolution (at 200 $m/z$ ) with a  $5 \times 10^5$  ion count target. Tandem MS was performed by isolation at 1.5 Th with the quadrupole, HCD fragmentation with normalized collision energy of 30 and rapid scan MS analysis in the ion trap. The MS<sup>2</sup> ion count target was set to  $10^4$  and the max injection time was 35ms. Only those precursors with charge state 2–6 were sampled for MS<sup>2</sup>. The dynamic exclusion duration was set to 45s with a 10ppm

tolerance around the selected precursor and its isotopes. Monoisotopic precursor selection was turned on. The instrument was run in top speed mode with 2s cycles.

#### Protein analysis

LC-MS data were analysed and quantified with MaxQuant software (version 1.5.3.8)<sup>32</sup>. The false discovery rate (FDR) was set to 1% for both proteins and peptides and we specified a minimum peptide length of seven amino acids. The Andromeda search engine was used for the MS/MS spectra search against our modified Uniprot *Mus musculus* database (downloaded on June, 2015), containing 44,900 entries. We modified our databases such that all MUP, OBP sequences were removed and instead of them we have added a complete list of MUPs from Ensembl database, and OBPs from NCBI (sensu - citation<sup>27</sup>). Next we added some Tremble sequences that were missing in Uniprot, for example KLKs, BPIs, SPINKs, SCGB/ABPs, and LCNs. Enzyme specificity was set as C-terminal to Arg and Lys, also allowing cleavage at proline bonds<sup>33</sup> and a maximum of two missed cleavages. Dithiomethylation of cysteine was selected as fixed modification and N-terminal protein acetylation and methionine oxidation as variable modifications. The “match between runs” feature of MaxQuant was used to transfer identifications to other LC-MS/MS runs based on their masses and retention time (maximum deviation 0.7 min) and this was also used in all quantification experiments. Quantifications were performed with the label-free algorithms described recently<sup>32</sup> using a combination of unique and razor peptides. All statistical analyses were performed in R software<sup>34</sup>. First, the dataset was normalized to diminish potential differences due to differential protein extractability and also due to potential differences caused by different signal intensity between samples. We used a normalization based upon quantiles, which normalizes a matrix of peak areas / intensities with the function `normalize.quantiles` from ‘preprocessCore’ routines under the Bioconductor package<sup>35</sup>. This method is based upon the concept of a quantile-quantile plot extended to n dimensions. To check that the data distribution conforms to the same type of distribution after normalization, we used ‘mixtools’<sup>36</sup>. Second, we used the Power Law Global Error Model (PLGEM)<sup>37</sup> to detect differentially expressed / abundant proteins using the functions `plgem.fit` and `plgem-stn`<sup>36</sup>. Original and normalized LC-MS/MS data are provided in Dataset 1.

#### Data validation with targeted quantification of selected proteins

To corroborate evidence on the variation of protein abundances obtained by LC-MS approach, we have selected several ‘key’ proteins (i.e. significant lipocalins that were discussed in the manuscript) and quantified them by Selected Reaction Monitoring (SRM) using triple quadrupole MS/MS instrument TSQ Quantiva (Thermo Scientific). Targeted SRM assays are the mass spectrometry equivalent of a Western blot and are intended to complement discovery-based analysis<sup>38</sup>. Based on the data from untargeted LC-MS experiment we chose 2 proteotypic peptides per protein for SRM experiment. For each peptide 3 transitions were selected (Dataset 1). LC separation was done with the same setup and conditions as for untargeted LC-MS experiment. Samples were analysed in positive mode with resolution for both Q1 and Q3 set to 0.7, collision gas pressure was set to 1.5 mTorr, cycle time was 1.5 s. Collision energy for each peptide was predicted and results were obtained using Skyline Daily 3.6.1.<sup>39</sup>. Datasets were normalized the same way as LC-MS data – see above.

## Results

### *The vaginal fluid proteome of the house mouse*

We have generated the vaginal fluid proteome of the house mouse, *M. m. musculus* from 9 females, each in three estrous phases (i.e. proestrus, estrus, metestrus) and detected a total of 2507 proteins at 0.01 FDR (i.e. False Discovery Rate for all peptides and proteins). However, some proteins were detected only in one or two instances per individual. Thus, we reduced our dataset such that all the rows that had just two counts per row were deleted as well as those rows where the median expression in all three groups was lower than 1 (i.e. number of proteins decreased to N=986). To reduce the influence of false positive abundances due to differences in signal intensities between individuals we quantile-normalized a matrix of protein abundances with 'preprocessCore' routine within the *Bioconductor package* in R software<sup>36</sup>; this step ensures that differential expression (i.e. abundance) is measured instead of differential extractability of proteins from complex mucosal secretions. This normalization strategy has resulted in highly similar datasets with similar data distribution, almost the same mean values, and lower standard deviation (i.e. RAW DATA: 19.2±4.9, NORMALIZED DATA: 26.4±0.1, see Fig.1A) thus decreasing the potential of obtaining false positive values.

After normalization of our data, many of those proteins that were invariant throughout the cycle and most expressed belong to a group of "housekeeping" genes (HK) which are used in many experiments for normalization. In our data, these included: beta actin (ACTB), serum albumin (ALB), phosphoglycerate kinase 1 (PGK1), fructose-bisphosphate aldolase (ALDOA), Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3P, gapdh), and for example all of the 16 detected proteasomal subunits that are provided in Dataset 1. Thus, the lack of any variation in these highly expressed proteins signifies that the quantile-normalization of our data was sufficiently robust and does not require further HK normalization.

Next, we searched for differentially expressed proteins throughout the cycle using the Power Law Global Error Model (PLGEM)<sup>37</sup>. This model was first developed to quantify microarray data<sup>37</sup>, however, due to similar statistical properties – namely the n-binomial distributions of signal values (i.e. deviating from normality) – it has proved to be an amenable model for the quantification of label-free MS-based proteomics data<sup>40</sup>. We calculated the signal-to-noise ratio – STN (equation provided in citation<sup>40</sup>), because it explicitly takes unequal variances into account and because it penalizes proteins that have higher variance in each class more than those proteins that have a high variance in one class and a low variance in another<sup>37</sup>. To create statistical baseline, PLGEM can only be fitted on a set of replicates from the same experimental condition, so we have done this for estrus phase. Correlation between the mean values and standard deviations was high ( $r^2=0.985$ , Pearson=0.977, Supplemental Fig. 1) so we continued with the resampled STNs and calculated differences with corresponding p-values between proestrus and estrus, and between metestrus and estrus. Mean value differences between proestrus and estrus (Fig. 1B), and metestrus and estrus (Fig. 1C) are visualized with MA plots (only protein names with  $P<0.05$  and fold change  $FC>2$  or  $FC<-2$  are shown), where in both the plots Fig. 1B,C it is obvious that prevailing number of proteins that are differentially expressed are those that are abundant in estrus (i.e. lower parts of Fig. 1B,C). The plot also demonstrates that the most expressed and at the same time differentially regulated protein is sMUP9 (proestrus→estrus 2fold, see below).

### *Differentially expressed proteins – markers of estrus*

PLGEM analysis of protein abundances on the level of  $FC > 2$  revealed that a total of 69 proteins (i.e. 7%) were up-regulated in estrus. Of these 69 proteins, a total of 17 proteins (1.7%) were consequently down-regulated in metestrus (Fig. 2A), whilst 52 (5.3%) of them remained unchanged on the level of  $P < 0.05$  and  $FC > 2$ . This means that only 1.7% of all proteins were detected as significant markers of estrus. These are: SPA9, LYG1, PHLD, HGFA, ASAH1, HORN, DAG1, CP089, AOC1, CTL4, PPBT, CATC, MA2B2, PPGB, DPP2, FUCO, TGM3. Gene ontology analysis with STRING (<https://string-db.org/>) revealed that – on the level of  $FDR = 0.007$  – these 17 genes are concurrently involved in catalytic (N=12 proteins,  $p = 0.0047$ ) or hydrolase (10 proteins,  $p = 0.0005$ ) activities (GO functions), and that their functions are localized in extracellular regions (N=14,  $p = 8.11 \times 10^{-7}$ ) or extracellular exosome (N=12,  $p = 8.11 \times 10^{-7}$ ) and or lysosome (N=6,  $p = 3.67 \times 10^{-5}$ ). Thus, the proteins involved in the detected degradation processes – typically occurring during cornification and bacterial invasions during estrus (i.e. a phase, which is characteristic of producing enucleated keratinized cells) – can be treated as markers of this particular phase. For example, Hornerin (HORN) is a component of the epidermal cornified cell envelopes<sup>41</sup> and a marker of cell differentiation<sup>42</sup>. In our data, Hornerin was upregulated in estrus (3.9 fold) and significantly down-regulated in metestrus (3.4 fold). Hornerin is involved in the process of cell differentiation and with mucin/episialin (MUC1)<sup>43</sup> forms anti-inflammatory epidermal barriers during estrus. The most differentially expressed protein in estrus (i.e. proestrus→estrus 5.5fold, estrus→metestrus -5.1fold) was Serpin A9 (SPA9). SPA9 is a member of the serpin family of serine protease inhibitors.

### *Differentially expressed anti-microbial proteins*

Our analysis (above) revealed that a biological process that is tightly linked to cell proliferation during the estrous cycle involves mechanisms of anti-microbial defence, because the total number of bacteria is highest during estrus and declines during metestrus<sup>44</sup>. Mucins, particularly MUC1, are effective barriers in the protection from microbial infection<sup>43</sup>. In our data, MUC1 was significantly up-regulated in estrus (4.5fold). Similarly, MUC9 (i.e. OVGPI - Oviduct-specific glycoprotein also known as mucin-9) was also up-regulated during estrus (4fold) and metestrus. Another protein, which forms viscous barriers in oviducts under low pH during estrus, and which is up-regulated during estrus is Uromodulin (UROM, 2.3fold). Significantly up-regulated anti-microbial proteins during estrus also involved alpha-macroglobulin or OVOS (Ovostatin, 3fold) which is slightly down-regulated but not significantly during metestrus. Similar pattern is also typical for the Lysozyme g-like protein 1 (LYG1) which is up-regulated during estrus (2.5fold) and down-regulated (4.8fold) during metestrus. Other secretory antimicrobial proteins expressed in polarized epithelial cells involve those that bind to particular structures of bacterial membranes and those that physically break the membranes due to their amphipathic electrostatics. We have detected a member of the PLUNC family – the Lipopolysaccharide-binding protein (LBP, BPIFD2). The saliva proteome of the mouse contains seven members of the bactericidal/permeability-increasing proteins (i.e. BPI<sup>45,46</sup>) which are male biased<sup>28</sup> and include BPIA1, BPIB1, BPIB2, BPIB3, BPIFA2, BPIFB5, BPIFB9B<sup>28</sup>. BPI/PLUNC proteins have an antibacterial activity against gram-negative bacteria<sup>45</sup>. The vaginal fluid proteome, however, contains only LBP (BPIFD2), which is up-regulated during estrus (4.4fold) and remains expressed during metestrus.

Anti-microbial proteins, which are significantly up-regulated during metestrus include the Cathelicidin antimicrobial peptide or CAMP/CRAMP (3fold). A natural antibiotics CAMP forms an amphipathic alpha-helix similar to other antimicrobial peptides, and functional studies showed that CAMP is a potent antibiotics against gram-negative bacteria by inhibiting the growth of a variety of bacterial strains and is expressed by neutrophils and macrophages<sup>47</sup>. NGP (Neutrophilic granule protein) or ‘bectenecin’ – also belongs to cathelicidins, has a cathelicidin protein domain, and in our data, it is also significantly up-regulated in metestrus (2.8fold), likely because it is co-expressed with CAMP in neutrophils which invade vaginal environment during metestrus. CAMP is regulated by the serine-proteases Kallikreins 5 and 7<sup>48</sup> and thus belongs to an extended KLK/LEKTI network members that are crucial for homeostasis of stratified epithelia<sup>49</sup>. We did not detect KLK5 and KLK7 in the vaginal secretion. However, we have detected KLK1, KLK10, KLK11, KLK12, KLK13, and KLK14 invariantly expressed throughout the cycle, whilst KLK8 varied such that it was up-regulated during proestrus and estrus and down-regulated during metestrus (4.9fold). SPINK5, which negatively regulates KLK5 expression was down-regulated (2.5fold) during estrus.

### *Lipocalins*

Previously, it has been shown with microarrays that the mouse (CD 1) uterine transcriptome contains transcripts coding several major urinary proteins, namely *Mup3*, *Mup4*, *Mup5*, *Mup6*, *Mup9*, and *Mup20*<sup>50</sup>. In their experiment, all detected *Mup* transcripts were significantly up-regulated in estrus (i.e. when compared to proestrus). Our data revealed a support for this trend on the level of protein. We have detected MUP20-darcin (unique peptides: VFVEYIHVLENSLALK, FAQLSEEHGIVR), MUP3, MUP5, and also a group of MUP proteins with no unique peptides. These peptides, however, are shared between the recently duplicated group-B MUPs and are, therefore, visualized in Fig. 2B as the most likely hits though they are mixtures of several MUPs: sMUP17 (i.e. either MUP13 and/or MUP17), sMUP9 (i.e. MUPs 1, 2, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 19). From the biological function perspective, it is plausible to group them simply for the fact that most group-B MUPs are highly homologous in *M. m. musculus*, have similar beta barrel structures, and there is almost no individual variability in the production of these proteins (i.e. at least in the liver/urine) in this sub-species of the house mouse<sup>10-12</sup>. Our proteomic data included also metestrus (i.e. when compared to citation<sup>50</sup> where they concentrated on the proestrus/estrus analyses), thus we were interested whether MUPs and other lipocalins are predominantly expressed during estrus and declining in metestrus. A total of three MUPs were up-regulated in estrus: MUP20 (4.2fold), the highly expressed sMUP9 (2.1fold), and sMUP17 (3.2fold) but all of them remained abundant in metestrus.

To provide further evidence on the variation of significant MUPs and LCN11 (see below) and particularly MUP20-darcin, we have selected specific unique-peptide peaks and analysed their variation with Selected Reaction Monitoring (SRM) using triple quadrupole MS/MS instrument. This method is a MS-based equivalent to Western blotting but without antibodies<sup>38</sup>. We have chosen last three females of the dataset (F7, F8, F9) where two of them (F7, F8) followed the trend from PLGEM analysis whilst one female (F9) had a delay in the rising phase of protein abundance (F9 - green colour in Fig. 3). On the level of  $p < 0.05$ , the correlation between LC-MS and SRM data for particular females (differentiated by unique colours in Fig. 3) was



high in all three females (note the insets with the correlation coefficients in Fig. 3). Thus, our SRM approach corroborated some the trends detected with untargeted LC-MS/MS based approach.

For the first time (i.e. to our knowledge), we have detected the four members of the recently described<sup>27</sup> family of odorant binding proteins OBP1 (KJ605390), OBP2 (KJ605391), OBP5 (KJ605392), and OBP7 (KJ605394) in vaginal fluids of the house mouse as highly abundant proteins. Our PLGEM analysis revealed significant up-regulations during estrus (e.g. OBP5 1.6fold, p=0.0027). However, the fold change is below 2 and it is in question whether these differences are biologically relevant. We have also detected lipocalins that have not been linked to chemical communication before. Lipocalin 11 (LCN11) (i.e. proestrus→estrus 2.3fold) follows similar and significant trend as MUPs but its total expression is lower. Retinol-binding protein 1 (RBP1) had an opposite trend (i.e. proestrus→estrus -2.13, estrus→metestrus 2.8fold) with the lowest abundances during estrus. Siderocalin (LCN2) belongs to a group of the most abundant proteins and was invariant throughout the cycle.

## Discussion

Vaginal fluids represent an important source of markers of reproductive state. Proteins obtained from the vaginal secretions by non-invasive lavage methods, and identified with the state-of-the-arts label-free proteomics enabled us to ask questions related to reproduction, chemical communication and evolution but with a detail that may help to support particular hypotheses dealing with the function of signalling proteins. The samples, however, are a mixture of proteins stemming out of multiple processes that take place in ovaries, uterine walls and horns, cervix, and various internal vaginal glands. In this paper, we aimed to characterize the expression pattern of proteins, which are known for their involvement in chemical communication with a particular focus on their variation throughout the estrous cycle of the wild derived house mice *Mus musculus musculus*. We used wild derived mice for the fact that the laboratory mice are influenced by the differential contribution of blocks of genes from the two house-mouse subspecies *M. m. domesticus* and *M. m. musculus* to current laboratory strains<sup>51</sup> that may mask their natural behaviour.

We used the cytology screening of the cells from vaginal lavage and selected samples according to predominance of the cell types typical for each phase<sup>1-3</sup>. Consequent analysis of the vaginal fluid proteome served to corroborate our cytology determination. We have detected a total of 1.7% of proteins that are prevalingly expressed during estrus, Fig. 2B. They involve markers of cell keratinization as well as markers of catalytic activity and anti-microbial defence. Anti-microbial proteins function as natural innate-immune responses to an outburst of bacteria typically occurring during estrus<sup>44</sup> such as Lysozyme G1 (LYG1) which has a hydrolase activity and is involved in the degradation of peptidoglycans from bacterial membranes (i.e. GO:0009253 peptidoglycan catabolic process). Bacterial peptidoglycans are continuously recognized by Peptidoglycan recognition protein 1 (PGRP1) which activates bacterial toll-component systems<sup>52</sup> and is logically invariant throughout the cycle in our data.

A marker of interactions between symbiotic bacteria and the host is the highly expressed lipocalin 2 / siderocalin (LCN2). In our data, the highly abundant LCN2 was invariantly expressed throughout the cycle, thus demonstrating that bacteria are present in all phases of the cycle. It is known that during metabolic degradation in most mucosal tissues, bacteria attempt to acquire ‘free’ iron by a secretion of high-affinity iron sequestering siderophores. The mammalian host, however, limits this process by the production of Lipocalin 2<sup>53</sup> which efficiently scavenges for catecholate-type siderophores<sup>54</sup>. Thus, high amounts of produced LCN2 represent an efficient regulatory element that prevents uncontrolled bacterial growth also in the mouse vaginal environment. WFDC proteins (i.e. ‘Whey acidic proteins four disulphide core’) were also shown to have anti-microbial properties<sup>55</sup> and the two members WFDC12 and WFDC18 are present in the house mouse mouse saliva as proteins encoded by the submandibular gland transcripts *Wfdc12* and *Wfdc18*<sup>28</sup>. In this study, we have detected WFDC2 also invariantly expressed throughout the cycle. To add, an antimicrobial system of defence in vaginal environment, thus, seems to have two components, one that is static and invariant over the cycle, and another (dynamic) that reacts to bacterial growth and dynamically functions during estrus (e.g. LYG1, LBP, OVOS) and metestrus (e.g. CAMP, NGP).

Lipocalins of the laboratory mouse were already reported to vary between proestrus and estrus with the use of microarrays of the uterine horns<sup>50</sup>. They have provided evidence that all the detected lipocalin-coding transcripts, namely *Mup3*, *Mup4*, *Mup5*, *Mup6*, *Mup9*, and *Mup20* rise from proestrus to estrus. Our protein analysis corroborates their findings to some extent and extends their view because we included also metestrus. We show for the first time in wild-derived *M. m. musculus* mice that, MUP20 or ‘darcin’ is the most up-regulated lipocalin when passing from proestrus to estrus. This is interesting because some studies originally thought that urinary MUP20 is a male unique lipocalin with pheromonal effects even without ligands and which stimulates an inherent attraction for particular males<sup>56</sup>. Here we provide evidence, that MUP20 is definitely not male-unique because it is produced by females throughout the mouse estrous cycle (i.e. *M. m. musculus*) and also by females of the laboratory mice in their uterine horns<sup>50</sup>. Because MUP20 production significantly rises and reaches its peak in estrus, it is unlikely that MUP20 is a pheromone because its elevated levels during estrus would clearly mask an effect of MUP20 produced by males. Interestingly, major urinary proteins were also detected in metestrus which – if they were supposed to signal receptivity – would decrease a male’s chances to correctly evaluate the best time for mating. Furthermore, although male-biased, MUP20 and other MUPs are also produced by salivary glands of males and females<sup>28</sup>. Thus it is likely that it is the ligands of MUPs that serve as signals and not proteins themselves.

There is as yet another alternative explanation to why are MUPs expressed also during metestrus. It is possible that MUPs play other roles besides sexual signalling. We already suggested this alternative to a common notion that MUPs serve only to chemical communication by providing evidence that MUPs are expressed in a sexually dimorphic manner in one tissue (e.g. liver,<sup>9</sup>) but are non-dimorphic and with lower expression levels elsewhere (e.g. saliva<sup>28</sup>). Here we suggest a likely hypothesis that lipocalins (i.e. including Major urinary proteins, and Odorant binding proteins) may have the potential to detoxify mucosal tissues by removing various organic compounds. We have postulated this explanation as the ‘Toxic waste hypothesis’<sup>15</sup>

which states that the same products of metabolic degradation might have been an ideal source of signals that have driven the evolution of chemical communication by means of a consequent toxic-waste perception and recognition. Some of these organic compounds might have come from bacterial degradation because we found various antimicrobial proteins differentially acting during estrous cycle. This hypothesis, however, needs to be further tested with GC-MS techniques. Furthermore, lipocalin involvement in detoxification has been experimentally evidenced, so for example MUPs are already known to transport toxic substances (i.e. other than known pheromones) out of the body<sup>57</sup>.

To conclude, we tested the hypothesis that MUPs and OBPs may function as the transporting devices of volatiles to signal receptivity in females of the house mouse, *M. m. musculus*. The most abundant lipocalins during estrus were MUP20, and the group-B MUPs - sMUP9 and sMUP17. However, they remain expressed during metestrus. Thus, it is likely that these proteins may have other roles besides sexual signalling, or if MUPs and OBPs are involved in signalling receptivity, it must be their ligands that signal individual quality and not the proteins themselves because of their expression pattern lasting from estrus to metestrus (i.e. MUPs) or even from proestrus to metestrus (OBPs).

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Author contributions statements**

PS, MC, and RS wrote the main manuscript text, BK helped to annotate proteomic datasets. PT performed experiments on MS instruments. MC had responsibilities over the animal housing and performed animal experiments. All authors have reviewed the manuscript.

### **Acknowledgement**

This research was supported by the project BIOCEV (CZ.1.05/1.1.00/02.0109) and National Program for Sustainability II (LQ1604) from the Ministry of Education, Youth and Sports. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. We are also grateful to Helena Uhlířová for her careful and patient lab assistance and to Karel Harant and Pavel Talacko from the Mass Spectrometry and Proteomics Service Laboratory, Faculty of Science, Charles University for performing the LC-MS/MS run.

### **References**

- 1 Cora, M. C., Kooistra, L. & Travlos, G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicol Pathol* **43**, 776-793, doi:10.1177/0192623315570339 (2015).
- 2 Byers, S. L., Wiles, M. V., Dunn, S. L. & Taft, R. A. Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS One* **7**, e35538, doi:10.1371/journal.pone.0035538 (2012).
- 3 Stopka, P. & Macdonald, D. W. Signal interchange during mating in the Wood mouse (*Apodemus sylvaticus*): the concept of active and passive signalling. *Behaviour* **135**, 231-249 (1998).

- 4 Goldman, J. M., Murr, A. S. & Cooper, R. L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* **80**, 84-97, doi:10.1002/bdrb.20106 (2007).
- 5 Whitten, W. K. Occurrence of anoestrus in mice caged in groups. *Journal of Endocrinology* **18**, 102-107 (1959).
- 6 Whitten, W. K. Modification of the oestrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male. Changes in the oestrous cycle determined by vaginal smears. *J. Endocrinol.* **17**, 307-313 (1958).
- 7 Marsden, H. M. & Bronson, F. H. Estrus Synchrony in Mice: Alteration by Exposure to Male Urine. *Science* **144**, 1469 (1965).
- 8 Bronson, F. H. & Marsden, H. M. Male-Induced synchrony of estrus in deermice. *General and comparative endocrinology* **4**, 634-637 (1964).
- 9 Stopková, R., Stopka, P., Janotová, K. & Jedelsky, P. L. Species-specific expression of major urinary proteins in the house mice (*Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus*). *J Chem Ecol* **33**, 861-869 (2007).
- 10 Enk, V. M. *et al.* Regulation of highly homologous major urinary proteins in house mice quantified with label-free proteomic methods. *Mol Biosyst* **12**, 3005-3016, doi:10.1039/c6mb00278a (2016).
- 11 Thoss, M. *et al.* Diversity of major urinary proteins (MUPs) in wild house mice. *Sci Rep* **6**, 38378, doi:10.1038/srep38378 (2016).
- 12 Thoß, M., Luzynski, K., Ante, M., Miller, I. & Penn, D. J. Major urinary protein (MUP) profiles show dynamic changes rather than individual 'barcode' signatures. *Frontiers in Ecology and Evolution* **3**, doi:10.3389/fevo.2015.00071 (2015).
- 13 Logan, D. W., Marton, T. F. & Stowers, L. Species Specificity in Major Urinary Proteins by Parallel Evolution. *PLoS ONE* **3**, doi: 10.1371/journal.pone.0003280 (2008).
- 14 Mudge, J. M. *et al.* Dynamic instability of the major urinary protein gene family revealed by genomic and phenotypic comparisons between C57 and 129 strain mice. *Genome Biol* **9**, R91, doi:10.1186/gb-2008-9-5-r91 (2008).
- 15 Stopková, R., Hladovcová, D., J., K., Vyoral, D. & Stopka, P. Multiple roles of secretory lipocalins (MUP, OBP) in mice. *Folia Zool.* **58**, 29-40 (2009).
- 16 Janotová, K. & Stopka, P. Mechanisms of chemical communication: the role of Major Urinary Proteins. *Folia Zool.* **58**, 41-55 (2009).
- 17 Kwak, J. *et al.* Changes in volatile compounds of mouse urine as it ages: their interactions with water and urinary proteins. *Physiol Behav* **120**, 211-219, doi:10.1016/j.physbeh.2013.08.011 (2013).
- 18 Timm, D. E., Baker, L. J., Mueller, H., Zidek, L. & Novotny, M. V. Structural basis of pheromone binding to mouse major urinary protein (MUP-I). *Protein Science* **10**, 997-1004 (2001).
- 19 Sharrow, S. D., Vaughn, J. L., Židek, L., Novotny, M. V. & Stone, M. J. Pheromone binding by polymorphic mouse major urinary proteins. *Protein Science* **11**, 2247-2256 (2002).
- 20 Zala, S. M., Potts, W. K. & Penn, D. J. Scent-marking displays provide honest signals of health and infection. *Behavioral Ecology* **15**, 338-344, doi:10.1093/beheco/arh022 (2004).
- 21 Thonhauser, K. E., Raveh, S., Hettyey, A., Beissmann, H. & Penn, D. J. Scent marking increases male reproductive success in wild house mice. *Anim Behav* **86**, 1013-1021, doi:10.1016/j.anbehav.2013.09.004 (2013).

- 22 Singer, A., Macrides, F., Clancy, A. N. & Agosta, W. C. Purification and  
Analysis of a Proteinaceous Aphrodisiac Pheromone from Hamster Vaginal  
Discharge. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 13323-13326 (1986).
- 23 Stopkova, R. *et al.* Novel OBP genes similar to hamster Aphrodisin in the  
bank vole, *Myodes glareolus*. *BMC Genomics* **11**, 45, doi:10.1186/1471-2164-  
11-45 (2010).
- 24 Hagemeyer, P. *et al.* Searching for major urinary proteins (MUPs) as  
chemosignals in urine of subterranean rodents. *J Chem Ecol* **37**, 687-694,  
doi:10.1007/s10886-011-9971-y (2011).
- 25 Pes, D., Dal Monte, M., Ganni, M. & Pelosi, P. Isolation of two odorant-  
binding proteins from mouse nasal tissue. *Comp. Biochem. Physiol.* **103B**,  
1011-1017 (1992).
- 26 Stopkova, R., Dudkova, B., Hajkova, P. & Stopka, P. Complementary roles of  
mouse lipocalins in chemical communication and immunity. *Biochem Soc T*  
**42**, 893-898, doi:10.1042/Bst20140053 (2014).
- 27 Stopkova, R. *et al.* Mouse lipocalins (MUP, OBP, LCN) are co-expressed in  
tissues involved in chemical communication. *Frontiers in Ecology and*  
*Evolution* **4**, doi:10.3389/fevo.2016.00047 (2016).
- 28 Stopka, P. *et al.* On the saliva proteome of the Eastern European house mouse  
(*Mus musculus musculus*) focusing on sexual signalling and immunity. *Sci*  
*Rep* **6**, 32481, doi:10.1038/srep32481 (2016).
- 29 Strotmann, J. & Breer, H. Internalization of odorant-binding proteins into the  
mouse olfactory epithelium. *Histochemistry and cell biology* **136**, 357-369,  
doi:10.1007/s00418-011-0850-y (2011).
- 30 Stopka, P., Janotova, K. & Heyrovsky, D. The advertisement role of major  
urinary proteins in mice. *Physiology & Behavior* **91**, 667-670 (2007).
- 31 Janotova, K. & Stopka, P. The level of major urinary proteins is socially  
regulated in wild *Mus musculus musculus*. *J Chem Ecol* **37**, 647-656,  
doi:10.1007/s10886-011-9966-8 (2011).
- 32 Cox, J. *et al.* Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed  
normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol*  
*Cell Proteomics* **13**, 2513-2526, doi:10.1074/mcp.M113.031591 (2014).
- 33 Rodriguez, J., Gupta, N., Smith, R. D. & Pevzner, P. A. Does trypsin cut  
before proline? *J Proteome Res* **7**, 300-305, doi:10.1021/pr0705035 (2008).
- 34 Crawley, M. J. *The R Book*. (Wiley Publishing, 2007).
- 35 Bolstad, B. M., Irizarry, R. A., Astrand, M. & Speed, T. P. A comparison of  
normalization methods for high density oligonucleotide array data based on  
variance and bias. *Bioinformatics* **19**, 185-193 (2003).
- 36 Gentleman, R. C. *et al.* Bioconductor: open software development for  
computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* **5**, R80,  
doi:10.1186/gb-2004-5-10-r80 (2004).
- 37 Pavelka, N. *et al.* A power law global error model for the identification of  
differentially expressed genes in microarray data. *BMC Bioinformatics* **5**, 203,  
doi:10.1186/1471-2105-5-203 (2004).
- 38 Arnott, D. *et al.* Selective detection of membrane proteins without antibodies:  
a mass spectrometric version of the Western blot. *Mol Cell Proteomics* **1**, 148-  
156 (2002).
- 39 MacLean, B. *et al.* Skyline: an open source document editor for creating and  
analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* **26**, 966-968,  
doi:10.1093/bioinformatics/btq054 (2010).

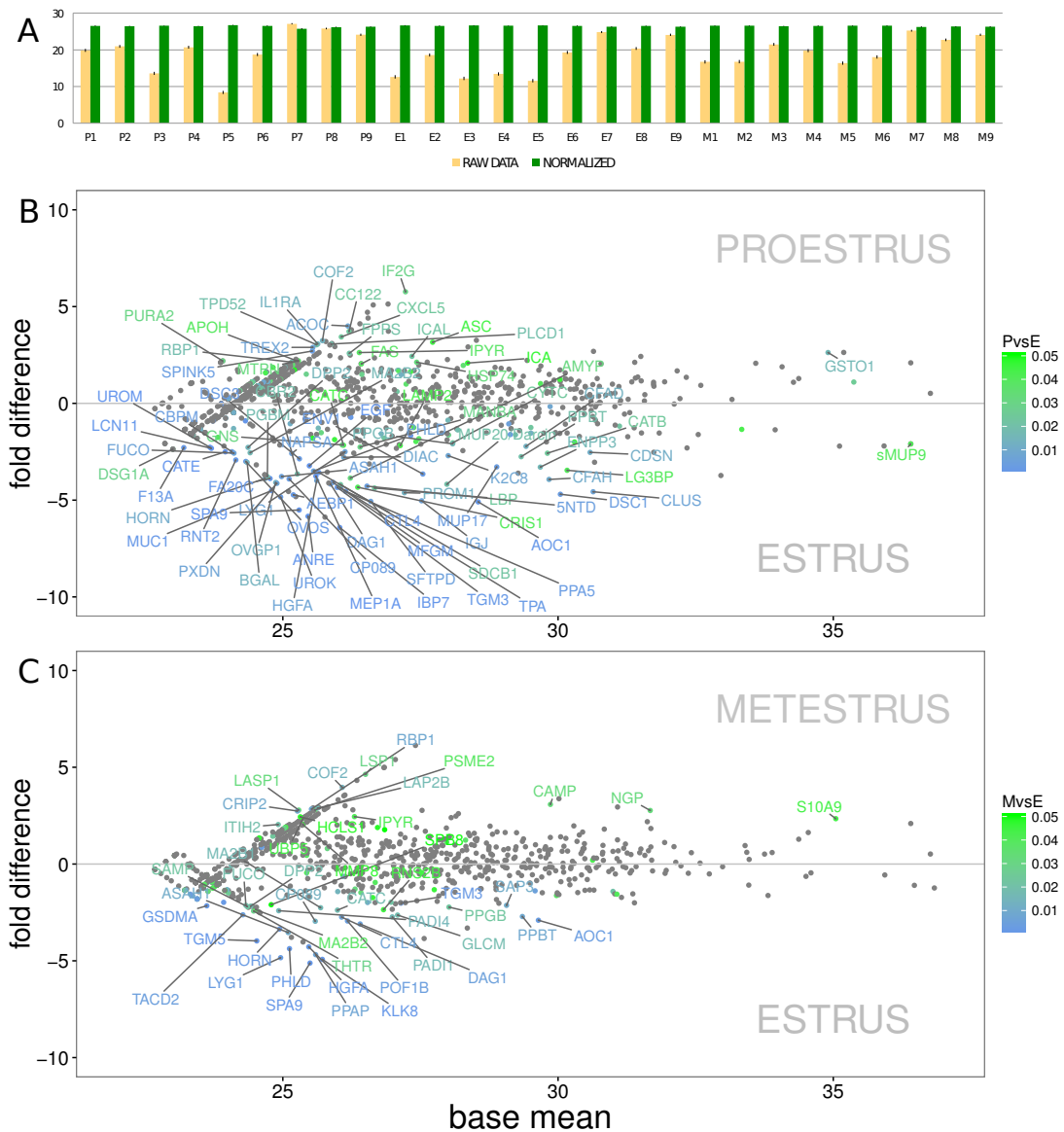
- 40 Pavelka, N. *et al.* Statistical similarities between transcriptomics and quantitative shotgun proteomics data. *Mol Cell Proteomics* **7**, 631-644, doi:10.1074/mcp.M700240-MCP200 (2008).
- 41 Henry, J. *et al.* Hornerin is a component of the epidermal cornified cell envelopes. *FASEB J* **25**, 1567-1576, doi:10.1096/fj.10-168658 (2011).
- 42 Makino, T., Takaishi, M., Morohashi, M. & Huh, N. H. Hornerin, a novel profilaggrin-like protein and differentiation-specific marker isolated from mouse skin. *J Biol Chem* **276**, 47445-47452, doi:10.1074/jbc.M107512200 (2001).
- 43 DeSouza, M. M. *et al.* MUC1/episialin: a critical barrier in the female reproductive tract. *Journal of Reproductive Immunology* **45**, 127-158 (1999).
- 44 Noguchi, K., Tsukumi, K. & Urano, T. Qualitative and quantitative differences in normal vaginal flora of conventionally reared mice, rats, hamsters, rabbits, and dogs. *Comp Med* **53**, 404-412 (2003).
- 45 LeClair, E. E. Four reasons to consider a novel class of innate immune molecules in the oral epithelium. *J Dent Res* **82**, 944-950 (2003).
- 46 Leclair, E. E. Four BPI (bactericidal/permeability-increasing protein)-like genes expressed in the mouse nasal, oral, airway and digestive epithelia. *Biochem Soc Trans* **31**, 801-805, doi:10.1042/ (2003).
- 47 Gallo, R. L. *et al.* Identification of CRAMP, a cathelin-related antimicrobial peptide expressed in the embryonic and adult mouse. *J Biol Chem* **272**, 13088-13093 (1997).
- 48 Yamasaki, K. *et al.* Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. *FASEB J* **20**, 2068-2080, doi:10.1096/fj.06-6075com (2006).
- 49 Kasperek, P. *et al.* KLK5 and KLK7 Ablation Fully Rescues Lethality of Netherton Syndrome-Like Phenotype. *PLoS Genet* **13**, e1006566, doi:10.1371/journal.pgen.1006566 (2017).
- 50 Yip, K. S., Suvorov, A., Connerney, J., Lodato, N. J. & Waxman, D. J. Changes in mouse uterine transcriptome in estrus and proestrus. *Biol Reprod* **89**, 13, doi:10.1095/biolreprod.112.107334 (2013).
- 51 Mouse Genome Sequencing, C. *et al.* Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**, 520-562, doi:10.1038/nature01262 (2002).
- 52 Royet, J., Gupta, D. & Dziarski, R. Peptidoglycan recognition proteins: modulators of the microbiome and inflammation. *Nat Rev Immunol* **11**, 837-851, doi:10.1038/nri3089 (2011).
- 53 Goetz, D. H. *et al.* The Neutrophil Lipocalin NGAL Is a Bacteriostatic Agent that Interferes with Siderophore-Mediated Iron Acquisition. *Molecular Cell* **10**, 1033-1043 (2002).
- 54 Flo, T. H. *et al.* Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* **432**, 917-921, doi:10.1038/nature03104 (2004).
- 55 Scott, A., Weldon, S. & Taggart, C. C. SLPI and elafin: multifunctional antiproteases of the WFDC family. *Biochem Soc Trans* **39**, 1437-1440, doi:10.1042/BST0391437 (2011).
- 56 Roberts, S. A. *et al.* Darcin: a male pheromone that stimulates female memory and sexual attraction to an individual male's odour. *BMC Biol.* **8**, doi:10.1186/1741-7007-1188-1175. (2010).

57 Kwak, J., Strasser, E., Luzynski, K., Thoss, M. & Penn, D. J. Are MUPs a Toxic Waste Disposal System? *PLoS One* **11**, e0151474, doi:10.1371/journal.pone.0151474 (2016).

**Figure 1:** Graphical representation of differentially expressed/abundant proteins. Before normalization, the data revealed some variation between individuals (A – yellow bars) probably due to a differential extractability of proteins from complex mucosal samples. However, after the quantile-normalization procedure (A – green bars), the mean value and standard error bars show almost no variation between the samples. Significant differentially-expressed proteins are demonstrated with MA plots and are more common in estrus than in proestrus or metestrus (B, C). PLGEM model was involved in testing the differences in normalized signal values between proestrus and estrus (B), and between metestrus and estrus (C). The level of significance (PvsE, MvsE) is scaled from green (P<0.05) to blue (P<0.01) and only the data points with FC>2 are colored.

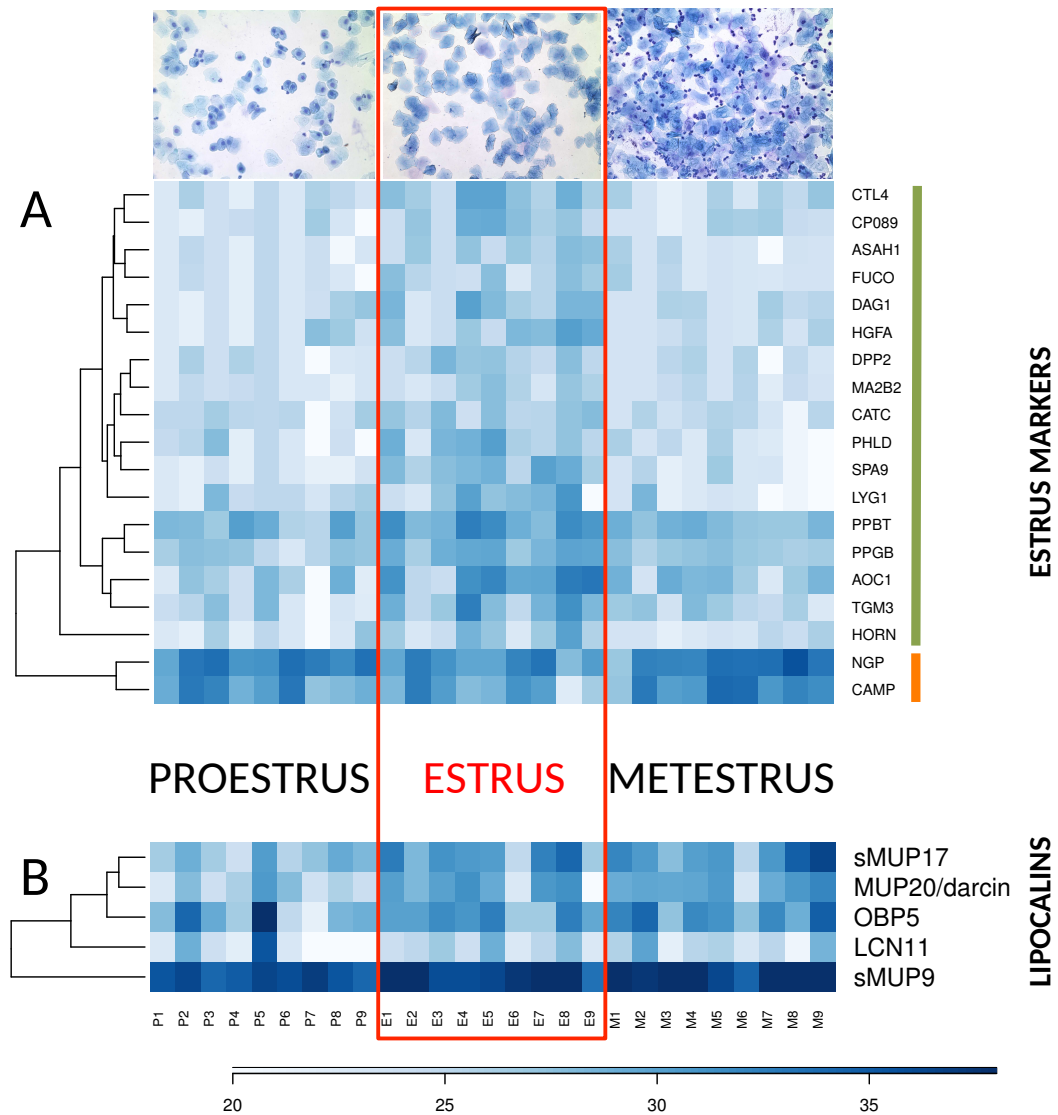
**Figure 2:** Graphical representation of individual changes in protein abundances (FC>2 and P<0.05) with heat maps. A - shows significant proteins abundant only in estrus (i.e. estrus markers, green bar next to the gene symbols) and the two bactericidal proteins NGP and CAMP which were downregulated in estrus (orange bar), these two groups were reliably separated by a hierarchical clustering method, B – shows the significant lipocalins MUP20-darcin, sMUP9, and sMUP17 with a notable variation between individuals. We have also added OBP5 with FC<2 (i.e. 1.6fold, P=0.0027). Representative microphotographs of the vaginal cytology were taken at magnification 100x after May-Gruendewald and Giemsa staining.

**Figure 3:** Selected Reaction Monitoring (SRM) of unique peptides for MUP20, sMUP9, sMUP17 and LCN11 using the triple quadrupole MS/MS instrument. We used this method as an alternative to Western blotting and revealed that untargeted LC-MS/MS data (first/grey column) are in a good agreement with targeted data from SRM (the second and the third columns). The level of agreement is supported by high correlation coefficients that are depicted in the inset of graphs with colours representing particular females. We have chosen two females representing the general trend from PLGEM modelling (females F7 – blue line, F8 – red line) and one female which up-regulated lipocalins in metestrus (F9 – green line). The x-axis labels represent proestrus (P), estrus (E), and metestrus (M).

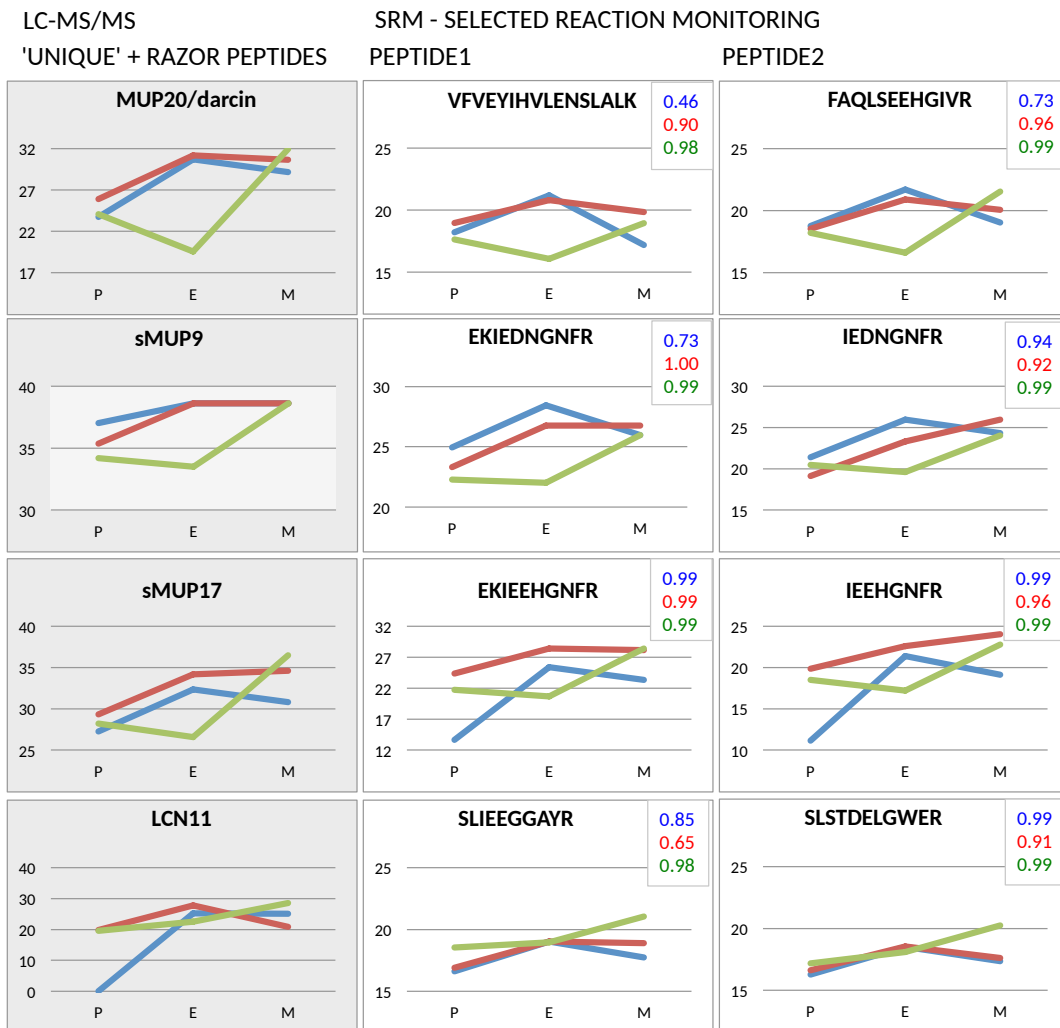


**Figure 1:** Graphical representation of differentially expressed/abundant proteins. Before normalization, the data revealed some variation between individuals (A – yellow bars) probably due to a differential extractability of proteins from complex mucosal samples. However, after the quantile-normalization procedure (A – green bars), the mean value and standard error bars show almost no variation between the samples. Significant differentially-expressed proteins are demonstrated with MA plots and are more common in estrus than in proestrus or metestrus (B, C). PLGEM model was involved in testing the differences in normalized signal values between proestrus and estrus (B), and between metestrus and estrus (C). The level of significance (PvsE, MvsE) is scaled from green (P<0.05) to blue (P<0.01) and only the data points with FC>2 are colored.





**Figure 2:** Graphical representation of individual changes in protein abundances ( $FC > 2$  and  $P < 0.05$ ) with heat maps. A - shows significant proteins abundant only in estrus (i.e. estrus markers, green bar next to the gene symbols) and the two bactericidal proteins NGP and CAMP which were downregulated in estrus (orange bar), these two groups were reliably separated by a hierarchical clustering method, B - shows the significant lipocalins MUP20-darcin, sMUP9, and sMUP17 with a notable variation between individuals. We have also added OBP5 with  $FC < 2$  (i.e. 1.6fold,  $P = 0.0027$ ). Representative microphotographs of the vaginal cytology were taken at magnification 100x after May-Gruendewald and Giemsa staining.



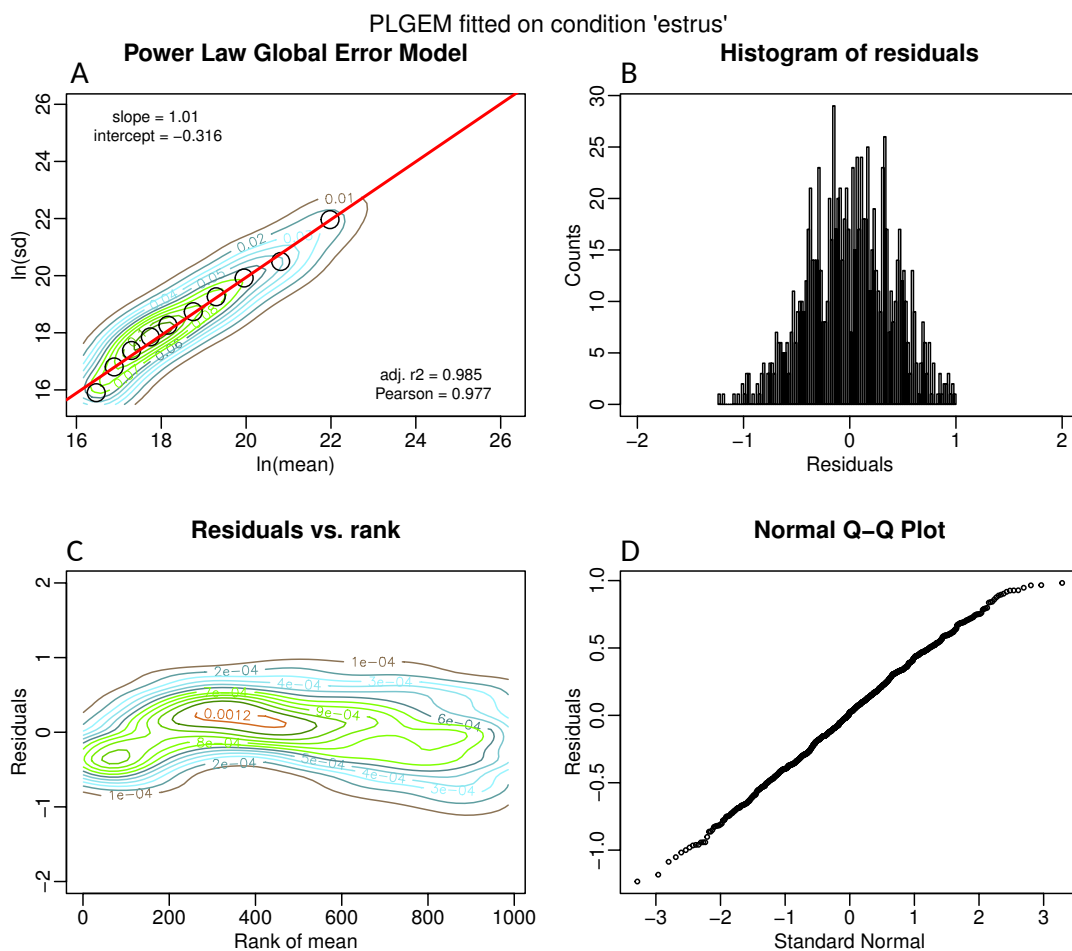
**Figure 3:** Selected Reaction Monitoring (SRM) of unique peptides for MUP20, sMUP9, sMUP17 and LCN11 using the triple quadrupole MS/MS instrument. We used this method as an alternative to Western blotting and revealed that untargeted LC-MS/MS data (first/grey column) are in a good agreement with targeted data from SRM (the second and the third columns). The level of agreement is supported by high correlation coefficients that are depicted in the inset of graphs with colours representing particular females. We have chosen two females representing the general trend from PLGEM modelling (females F7 – blue line, F8 – red line) and one female which up-regulated lipocalins in metestrus (F9 – green line). The x-axis labels represent proestrus (P), estrus (E), and metestrus (M).

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

Martina Černá<sup>1</sup>, Barbora Kuntová<sup>1</sup>, Pavel Talacko<sup>1</sup>, Romana Stopková<sup>1</sup>, & Pavel Stopka<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> *BIOCEV group, Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University, Viničná 7, CZ 12844, Czech Republic*

\* Correspondence: Pavel Stopka [pstopka@natur.cuni.cz](mailto:pstopka@natur.cuni.cz)



**Supplementary figure 1:** Details of the Power Law Global Error Model (PLGEM)<sup>37</sup>: A – the model fitting on a female experimental condition (i.e. estrus) thus setting the baseline for PLGEM modelling, B – the histogram of residuals shows symmetric data distribution over the  $x=0$ , C – distribution of residuals show a flat distribution over the  $y=0$ , and D – the normal quantile-quantile plot shows almost the straight line ( $y=x$ ) thus revealing that PLGEM is an amenable model to test differences in protein abundances from our normalized data (see citation<sup>37</sup>).

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

Natasa Sebkova<sup>1,2</sup>, Martina Cerna<sup>2</sup>, Lukas Ded<sup>3</sup>, Jana Peknicova<sup>3</sup> and Katerina Dvorakova-Hortova<sup>2</sup>

Departments of <sup>1</sup>Cell Biology and <sup>2</sup>Zoology, Faculty of Science, Charles University, Vinicna 7, Prague 2, 128 44, Czech Republic and <sup>3</sup>Laboratory of Diagnostics for Reproductive Medicine, Institute of Biotechnology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v. v. i., Videnska 1083, Prague 4, 142 20, Czech Republic

Correspondence should be addressed to K Dvorakova-Hortova; Email: hortova@natur.cuni.cz

## Abstract

In order for mammalian sperm to obtain a fertilizing ability, they must undergo a complex of molecular changes, called capacitation. During capacitation, steroidal compounds can exert a fast nongenomic response in sperm through their interaction with plasma membrane receptors, and activate crucial signaling pathways leading to time-dependent protein tyrosine phosphorylation (TyrP). Estrogen receptor beta was detected in epididymal mouse sperm; therefore, the effect of 17 $\beta$ -estradiol, estrone, estriol, and 17A-ethynylestradiol on mouse sperm capacitation *in vitro* was investigated. The effect was evaluated by positive TyrP in sperm heads and in the whole sperm lysates. Simultaneously, the state of the acrosome after the calcium ionophore-induced acrosome reaction was assessed. Generally, estrogens displayed a time and concentration-dependent stimulatory effect on sperm TyrP during capacitation. In contrast, the number of sperm that underwent the acrosome reaction was lower in the experimental groups. It has been demonstrated that both natural and synthetic estrogens can modify the physiological progress of mouse sperm capacitation. The potential risk in the procapacitation effect of estrogens can also be seen in the decreased ability of sperm to undergo the acrosome reaction. In conclusion, the capacitating ability of sperm can be significantly lowered by increasing the level of estrogens in the environment.

*Reproduction* (2011) **143** 1–11

## Introduction

The ejaculated mammalian sperm are unable to fertilize the egg. The spermatozoa must undergo a maturation process that is known as capacitation, and it takes place in the female reproductive tract. Only capacitated sperm are able to successfully fertilize the egg (Austin 1952). These morphological and biochemical changes allow sperm to bind to egg zona pellucida and undergo the acrosome reaction (Yanagimachi 1994). One of the processes triggering capacitation is a spontaneous efflux of cholesterol from the sperm plasma membrane. This increases its permeability and fluidity and activates intracellular signalization pathways leading to the activation of adenylyl cyclase, cAMP, cAMP-dependent protein kinase A, protein tyrosine kinase, and consequently to protein tyrosine phosphorylation (TyrP; Visconti *et al.* 1995b). The TyrP of proteins with a molecular weight (MW) between 40 and 120 kDa became an indicator of successfully ongoing capacitation and the ability of sperm to undergo the acrosome reaction (Visconti *et al.* 1995a). The other initiating process leading to the capacitation and acrosome reaction (AR) is the binding of estrogens onto estrogen receptors (ERs).

Estrogens play an important role in both the female and male reproductive systems (Free & Jaffe 1979). They regulate cell function through ERs (ERA and ERB $\beta$ ; Lubahn *et al.* 1993), which belong to a superfamily of ligand-activated transcription factors (Evans *et al.* 1987) and they are localized in the cytoplasm and nucleus of somatic and germinal cells. The nuclear receptors activate gene transcription by binding to DNA regulatory sequences (Hall *et al.* 2001). However, many nuclear receptors are translocated to the sperm plasma membrane and facilitate not only the gene transcription but also the rapid nongenomic signalization pathways (Pedram *et al.* 2007). Beside these, in sperm G protein-coupled receptors such as GPR30 are reported that trigger not only a rapid nongenomic signalization but also act independently of ERs (Filardo & Thomas 2005). Estrogens are mediated through rapid intracellular signaling in sperm by tyrosine and ser/thr kinases, influencing capacitation and acrosome reaction by activating phosphorylation of several proteins (Naz & Rajesh 2004). Estrogens activate ERs and consequently initiate several intracellular signaling enzymes such as receptor tyrosine kinase, epidermal growth factor receptor phosphatidylinositol 3-kinase, Src kinases,

mitogen-activated protein kinase (MAPK), protein kinase C, phospholipase D, and phospholipase C. This rapid pathway through MAPK is required for regulating protein phosphorylation in sperm (Aquila *et al.* 2004). Epididymal sperm are believed to have no transcription activity; therefore, a rapid nongenomic signalization plays the main role in this stage.

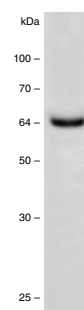
The concentration of estrogens quantitatively differs between males and females, and it is species specific, as well as the expression of steroid receptors. In males, the concentration of estrogens in the blood plasma is in a range of 2–180 pg/ml and depends on the species. In rat and mouse, the concentration of 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) is 2–25 pg/ml, and it is lower than in that rete testis fluid (250 pg/ml). The same applies to females where estrogen concentration in the ovarian fluid is at least twofold higher compared with plasma (Free & Jaffe 1979, Hess *et al.* 1995), and in rat and mouse it fluctuates during the estrus, e.g. for E<sub>2</sub> between 145 and 2100 pg/ml (Shaikh 1971). Besides physiologically endogenous estrogens, organisms including humans are exposed to environmental estrogens, which can display false hormone like activity. It is striking that the wastewater treatment technologies are not efficient enough to prevent a further contamination of surface water supplies (Kusk *et al.* 2011). There is enough evidence in literature showing a positive correlation between rising concentrations of environmental estrogens and increasing reproductive abnormalities (Storgaard *et al.* 2006) even their extremely low concentrations (ng/ml) can have an adverse effect on reproduction.

In this study, we localized ERB in mature mouse spermatozoa from cauda epididymis. In consequence to this finding, we aimed to look in detail, whether, selected estrogens (E<sub>2</sub>, estrone, estriol (E<sub>3</sub>), and 17 $\alpha$ -ethynylestradiol) can influence sperm ability to capacitate and undergo induced acrosome reaction *in vitro*. Monitoring of TyrP of specific proteins (MW 40–120 kDa) in the mouse sperm head and tail was taken as a marker of successfully ongoing capacitation reflecting male reproductive fitness.

## Results

### ERB is present in the epididymal mouse spermatozoa

As shown in Fig. 1, ERB was detected by chemiluminescence in a whole sperm lysate obtained from cauda epididymis. A single band was marked on a nitrocellulose membrane corresponding to a MW of 64 kDa. ERB was also detected by immunofluorescent labeling in fixed mouse spermatozoa from distal regions of cauda epididymis. ERB was clearly localized as a thin sickle over the apical acrosomal region of the sperm head protruding as far as the apical hook (Fig. 2A). The staining pattern was markedly speckled and uniformly present in all intact spermatozoa.

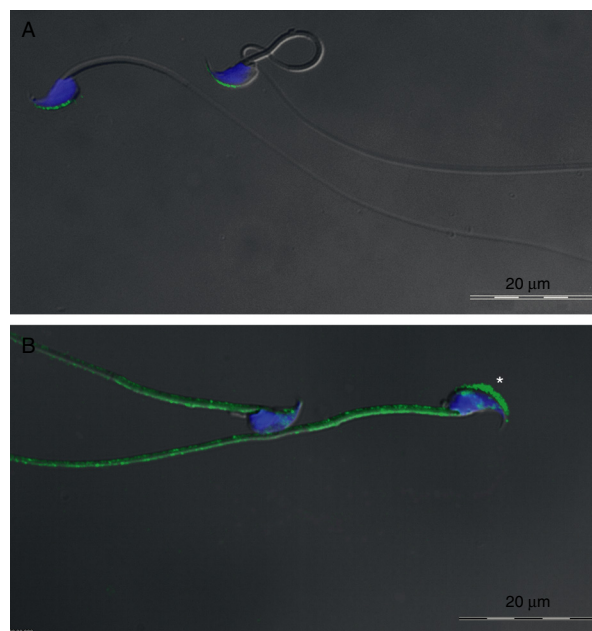


**Figure 1** SDS-PAGE and western blotting immunoprotein detection of ERB in a whole sperm cell sample corresponding to a band of molecular weight 64 kDa. The sample contained a protein equivalent of 10<sup>6</sup> cells. Representative result shown.

### Estrogens increase protein TyrP in the sperm head during capacitation *in vitro*

The positive staining for TyrP in epididymal mouse sperm was detected as a compact signal over the whole apical acrosomal region of the sperm head. There was also invariable positive labeling detected in the sperm tail, localized in clusters in the mid and principal piece (Fig. 2B). All sperm that displayed positive head TyrP displayed always a positive tail phosphorylation staining as well.

In general, using immunofluorescent labeling, there was a dose-dependent increase in the number of sperm,



**Figure 2** Immunofluorescent detection of ERB of tyrosine phosphorylation in mouse spermatozoa. (A) Immunostaining for ERB (green) over the apical acrosomal region and apical hook of the sperm head. (B) Tyrosine phosphorylation (green) over the apical acrosomal region of the sperm head and in the mid and principal piece of the sperm tail. Positive sperm head labeling is shown by asterisk. Nuclei are counterstained with DAPI (blue). Scale bar represents 20  $\mu$ m.



positive for TyrP in the sperm head during capacitation *in vitro* in the presence of E<sub>2</sub>, estrone, E<sub>3</sub>, and 17A-ethynylestradiol (Table 1). Results are shown for E<sub>2</sub>, as a linear time kinetics (Fig. 3A), and a log concentration kinetics (Fig. 3B) of positive sperm head TyrP during capacitation.

The sperm head TyrP increase in the presence of all estrogens occurred already at 30 min of capacitation (Fig. 3C) and carried to over 60 and 90 min, or even up to 120 min in case of 17A-ethynylestradiol (Table 1). In comparison with control, the two highest concentrations (20 and 200 ng/ml) of E<sub>2</sub>, estrone, and 17A-ethynylestradiol significantly increased the protein TyrP compared to E<sub>3</sub>, which was effective only at lower doses (0.02, 0.02, and 2 ng/ml; Table 1; Supplementary Figure 2C and D, see section on supplementary data given at the end of this article). Based on selected concentrations in presence of E<sub>2</sub> (Fig. 3A and B) and estrone (Supplementary Figure 1A and B, see section on supplementary data given at the end of this article), there was an increased activity of sperm signaling pathways leading to phosphorylation of specific sperm head proteins during capacitation in higher concentrations (0.2, 2, 20, and 200 ng/ml). Interestingly, compared to the natural estrogens, the stimulatory effect of synthetic 17A-ethynylestradiol on protein TyrP lasted until 120 min of

capacitation, especially in the presence of the two highest concentrations (20 and 200 ng/ml; Supplementary Figure 1E and F).

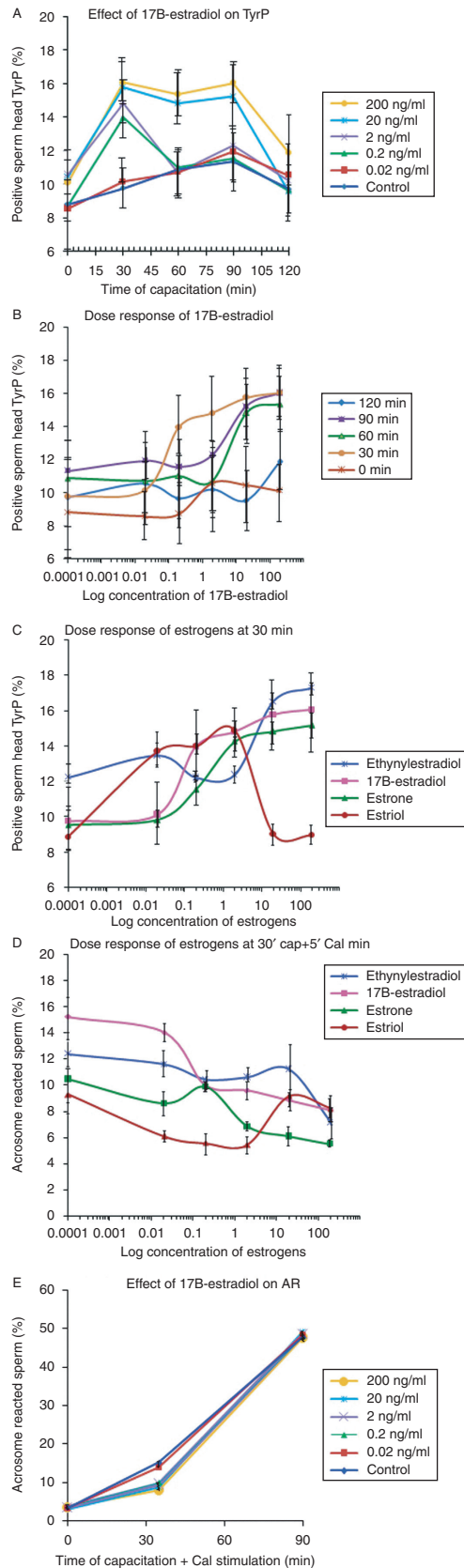
#### **Estrogens decrease the number of acrosome-reacted sperm after calcium ionophore-induced acrosome reaction**

E<sub>2</sub>, estrone, and E<sub>3</sub> displayed a similar effect on calcium ionophore (Cal)-induced acrosome reaction. These natural estrogens significantly reduced the number of acrosome-reacted mouse sperm *in vitro* (Table 2). The effect was prominent in those sperm that were capacitated for 30 min and then incubated with Cal for only 5 min, however, the effect differed among estrogen concentrations (Fig. 3D). E<sub>2</sub> and estrone significantly decreased the number of acrosome-reacted sperm particularly in the three highest concentrations of 2, 20, and 200 ng/ml (Fig. 3E, Supplementary Figure 2A). Moreover, in the case of E<sub>2</sub> the effect was also statistically significant for 0.2 ng/ml. A similar effect was observed in the case of E<sub>3</sub>, in whose presence, there was a statistically significant decrease in the number of acrosome-reacted sperm in the three lowest concentrations, 0.02, 0.2, and 2 ng/ml. The effect remained for the E<sub>3</sub> concentration of 0.2 ng/ml in a group of sperm,

**Table 1** Effect of estrogens on protein tyrosine phosphorylation in mouse sperm head during capacitation.

Concentration (ng/ml)	Time of capacitation (min)				
	0	30	60	90	120
<b>17B-estradiol</b>					
Control	8.797±3.038	9.744±1.772	10.856±1.634	11.322±1.793	9.701±2.275
0.02	8.544±1.432	10.121±1.815	10.710±1.929	11.931±1.811	10.533±1.991
0.2	8.714±1.519	<b>13.956±1.507<sup>‡</sup></b>	11.015±1.923	11.554±1.325	9.633±2.005
2	10.568±2.224	<b>14.814±1.664<sup>‡</sup></b>	10.715±1.937	12.298±1.261	10.201±2.148
20	10.431±2.262	<b>15.769±1.697<sup>‡</sup></b>	<b>14.834±1.772<sup>‡</sup></b>	<b>15.229±1.656<sup>‡</sup></b>	9.519±1.996
200	10.106±1.883	<b>16.062±1.595<sup>‡</sup></b>	<b>15.371±1.718<sup>‡</sup></b>	<b>16.051±1.331<sup>‡</sup></b>	11.866±1.889
<b>Estrone</b>					
Control	9.429±0.474	9.527±0.516	10.376±0.492	11.932±0.507	10.829±0.534
0.02	9.196±0.542	9.816±0.646	11.292±0.572	10.778±0.750	11.304±0.632
0.2	9.597±0.689	<b>11.535±0.738<sup>*</sup></b>	11.223±0.789	12.135±0.829	10.473±0.861
2	9.261±0.645	<b>14.266±0.672<sup>‡</sup></b>	10.994±0.858	10.501±0.726	9.653±0.897
20	9.380±0.734	<b>14.840±0.539<sup>‡</sup></b>	<b>14.921±0.581<sup>‡</sup></b>	<b>16.403±0.562<sup>‡</sup></b>	12.028±0.896
200	10.061±0.694	<b>15.165±0.527<sup>‡</sup></b>	<b>15.787±0.664<sup>‡</sup></b>	<b>16.833±0.590<sup>‡</sup></b>	11.150±0.492
<b>Estriol</b>					
Control	9.77±0.803	8.859±0.587	9.556±0.600	10.742±0.426	10.450±0.760
0.02	9.615±0.831	<b>13.706±0.915<sup>‡</sup></b>	<b>14.418±0.431<sup>‡</sup></b>	10.423±1.302	10.416±0.998
0.2	9.841±0.850	<b>13.995±0.609<sup>‡</sup></b>	<b>14.105±0.822<sup>‡</sup></b>	11.521±1.115	11.128±0.994
2	9.389±1.063	<b>14.880±0.609<sup>‡</sup></b>	9.640±0.825	10.623±0.834	10.866±0.955
20	9.495±0.857	9.033±0.620	9.088±0.435	9.897±0.718	10.269±0.652
200	9.934±0.862	8.955±0.599	10.183±0.507	10.581±0.750	11.246±0.591
<b>17A-ethynylestradiol</b>					
Control	12.675±0.714	12.232±0.562	12.567±0.500	12.994±0.459	11.954±0.600
0.02	12.830±0.548	13.478±0.507	12.139±1.143	12.835±0.616	11.835±0.622
0.2	12.530±1.300	12.229±0.310	13.157±0.910	13.188±0.644	12.484±0.768
2	11.770±0.738	12.400±0.515	<b>15.988±0.510<sup>*</sup></b>	13.735±0.664	12.668±0.516
20	11.444±0.979	<b>16.514±0.516<sup>‡</sup></b>	<b>17.907±0.578<sup>‡</sup></b>	<b>18.635±0.957<sup>‡</sup></b>	<b>16.243±0.600<sup>‡</sup></b>
200	11.095±0.854	<b>17.310±0.373<sup>‡</sup></b>	<b>17.458±0.428<sup>‡</sup></b>	<b>18.439±0.580<sup>‡</sup></b>	<b>17.412±0.388<sup>‡</sup></b>

Percentage of positive sperm head tyrosine phosphorylation. Mean ± S.E.M. Differences were analyzed by KW-ANOVA; *post-hoc* comparison was performed by multiple comparisons of mean ranks. \**P*<0.05, and <sup>‡</sup>*P*<0.001, comparison with control.



which were capacitated for 30 min and then further incubated for the standard 60 min with Cal (Supplementary Figure 2B and C). The same effect as in the case of natural estrogens was also observed for 17A-ethynylestradiol for the highest concentration of 200 ng/ml after 30 min sperm capacitation with a further incubation with Cal for 5 min (Fig. 3D). Moreover, statistically significant differences between 17A-ethynylestradiol compared with the control, as well as to other natural estrogens, were persisting for 2, 20, and 200 ng/ml over 30 and 60 min capacitation with a further incubation with Cal for the standard 60 min (Supplementary Figure 2B and C). The comparison between estrogens during Cal-induced acrosome reaction is shown for the concentration of 2 ng/ml (Supplementary Figure 2D).

### Estrogens increase overall sperm protein TyrP during capacitation *in vitro*

As shown in Fig. 4, natural estrogens increase the number of protein bands phosphorylated on tyrosine residues as well as the staining of certain bands. Compared with the control, all concentrations of E<sub>2</sub>, estrone, and E<sub>3</sub> increased TyrP. 17A-ethynylestradiol, increased TyrP at the three highest concentrations (2, 20, and 200 ng/ml). The increase of TyrP occurred mainly in the key times of capacitation between 60 and 90 min.

The SDS-PAGE results from the whole sperm lysate obtained during set time points of capacitation *in vitro* show an increasing effect, dependent on the time of capacitation and estrogen concentration. A higher concentration of estrogens in the capacitating medium and a greater number of proteins phosphorylated on tyrosine residues were detected. If comparing the differences between the amounts of protein TyrP changed in response to selected concentrations of estrogens during capacitation *in vitro*, 200 ng/ml of all selected estrogens led to an increased TyrP in the sperm in capacitation times of 30, 60, and 90 min. For estrone, E<sub>3</sub>, and 17A-ethynylestradiol, the increasing level of

**Figure 3** Effect of estrogens on mouse sperm tyrosine phosphorylation and acrosome reaction. (A) Linear time kinetics of a range of 17B-estradiol (E<sub>2</sub>) concentrations on positive sperm head TyrP. (B) Log concentration kinetics of 17B-estradiol at various time of capacitation. (C) Log concentration kinetics of the four studied estrogens at 30 min of capacitation. (D) Log concentration kinetics of the four studied estrogens at 30 min of capacitation and 5 min Cal-induced acrosome reaction. (E) Linear time kinetics of a range of 17B-estradiol concentrations on acrosome reaction up to 90 min. For all panels, data represent an average of five replicates as described in 'Materials and Methods' section. Mean  $\pm$  s.e.m. are shown in Tables 1 and 2 due to a clear transparency of all graphs. The arithmetic mean of total s.e.m. was 0.970 and the s.d. of the mean of s.e.m. was 0.553. In logarithmic graphs, the plotted value for 0.0001 ng/ml represents the zero control.

**Table 2** Effect of estrogens on mouse sperm acrosome reaction.

Concentration (ng/ml)	Time of capacitation+calcium ionophore stimulation (min)					
	cap0 bez Cal	cap30+Cal5	cap30+Cal60	cap60+Cal60	cap90+Cal60	cap120+Cal60
<b>17B-estradiol</b>						
Control	3.490±0.323	15.248±0.717	47.719±1.056	61.721±1.281	69.340±0.936	77.613±0.997
0.02	3.333±0.460	14.069±0.639	48.274±2.221	61.212±1.295	69.956±1.354	78.501±1.704
0.2	3.663±0.484	<b>10.035±0.471<sup>‡</sup></b>	47.984±1.718	59.661±1.758	70.491±2.048	79.924±2.155
2	3.579±0.263	<b>9.621±0.532<sup>‡</sup></b>	48.447±1.433	62.147±1.760	71.345±1.238	77.148±1.390
20	3.200±0.329	<b>8.873±0.411<sup>‡</sup></b>	49.111±1.864	58.969±1.553	70.587±0.824	78.454±1.486
200	3.545±0.435	<b>8.122±0.707<sup>‡</sup></b>	47.639±2.238	62.310±1.687	71.312±1.566	77.323±1.559
<b>Estrone</b>						
Control	2.706±0.352	10.496±0.556	37.639±0.931	57.166±1.700	71.955±1.636	82.069±1.015
0.02	2.783±0.262	8.631±0.744	39.005±1.180	56.876±2.043	72.662±2.405	81.118±2.051
0.2	2.413±0.216	9.907±0.366	38.361±1.229	57.891±1.201	71.505±0.961	82.645±1.509
2	2.409±0.316	<b>6.839±0.281<sup>‡</sup></b>	38.567±1.783	56.962±2.039	70.677±1.064	82.245±1.966
20	2.129±0.312	<b>6.123±0.644<sup>‡</sup></b>	37.707±1.051	54.460±2.418	69.302±2.105	80.622±1.604
200	2.433±0.272	<b>5.524±0.297<sup>‡</sup></b>	38.780±1.700	54.528±1.973	70.377±1.601	80.002±1.777
<b>Estriol</b>						
Control	2.420±0.218	9.307±0.645	35.306±1.209	50.054±1.205	65.100±1.978	76.940±1.144
0.02	2.403±0.270	<b>6.129±0.341<sup>*</sup></b>	33.733±1.190	49.755±1.726	60.868±2.032	72.425±1.729
0.2	2.330±0.197	<b>5.598±0.669<sup>‡</sup></b>	<b>27.559±1.226<sup>‡</sup></b>	48.668±0.951	58.127±1.640	74.397±2.662
2	2.435±0.279	<b>5.462±0.500<sup>‡</sup></b>	35.705±1.539	48.380±2.306	57.403±2.566	78.032±1.687
20	2.589±0.248	9.198±0.728	35.779±1.298	51.440±2.533	56.193±2.075	75.098±1.829
200	2.392±0.339	8.238±0.826	34.529±1.360	50.193±2.590	55.995±1.968	75.738±1.870
<b>17A-ethynylestradiol</b>						
Control	4.665±0.573	12.417±0.996	33.266±0.993	42.766±1.093	62.496±1.293	75.341±1.398
0.02	4.611±0.844	11.586±0.771	31.969±1.059	43.093±1.193	61.583±2.205	73.590±2.054
0.2	4.738±0.513	10.446±0.575	33.145±1.133	40.015±1.246	61.435±1.283	75.087±2.033
2	4.555±0.641	10.641±0.330	<b>24.550±0.870<sup>‡</sup></b>	<b>33.875±0.866<sup>‡</sup></b>	62.834±1.098	73.414±1.779
20	4.580±0.493	11.242±1.022	<b>23.194±0.928<sup>‡</sup></b>	<b>35.270±1.211<sup>‡</sup></b>	60.243±2.086	73.410±1.254
200	4.379±0.887	<b>7.157±0.734<sup>‡</sup></b>	<b>22.889±0.914<sup>‡</sup></b>	<b>33.389±1.632<sup>‡</sup></b>	63.528±2.378	76.496±1.708

Percentage of sperm after completed acrosome reaction. Mean ± S.E.M. Differences were analyzed by KW-ANOVA; *post-hoc* comparison was performed by multiple comparisons of mean ranks. \* $P < 0.05$ , <sup>‡</sup> $P < 0.01$ , and <sup>‡</sup> $P < 0.001$ , comparison with control.

TyrP was persisting up to 120 min of capacitation. The 20 ng/ml concentration elevated the protein TyrP in both estrone and E<sub>3</sub> at 30, 60, 90, and 120 min of capacitation. Unlike estrone and E<sub>3</sub>, 20 ng/ml E<sub>2</sub> and 17A-ethynylestradiol triggered an increase of TyrP in 60 and 90 min. The concentration of 2 ng/ml gave similar results for all estrogens when E<sub>2</sub> and estrone TyrP were elevated in 30, 60, and 90 min for E<sub>3</sub> in 30 and 60 min and for 17A-ethynylestradiol in 60 and 90 min. Very similar results were obtained for the 0.2 ng/ml concentration of estrogens, where E<sub>2</sub>, estrone, and E<sub>3</sub> significantly increased TyrP at 30 and 60 min and estrone at 60 and 90 min of capacitation, when comparing the results of the lowest 0.02 ng/ml concentration of estrogens, E<sub>2</sub>, estrone, and E<sub>3</sub> elevated TyrP at 60 min and E<sub>3</sub> at 30 and 60 min of capacitation.

The results show a very similar response to selected concentrations of all four estrogens in terms of the detection of protein TyrP from the whole sperm lysate at experimental capacitation times. The general pattern of estrogen response resulting in elevating TyrP can differ slightly between capacitation times but usually the final outcome of elevated TyrP is overlapping at standard key times of mouse capacitation, which are between 60 and 90 min.

Differences between control samples and samples of sperm affected by different concentrations of estrogens were detected by gel densitometry (see 'Materials and Methods' section).

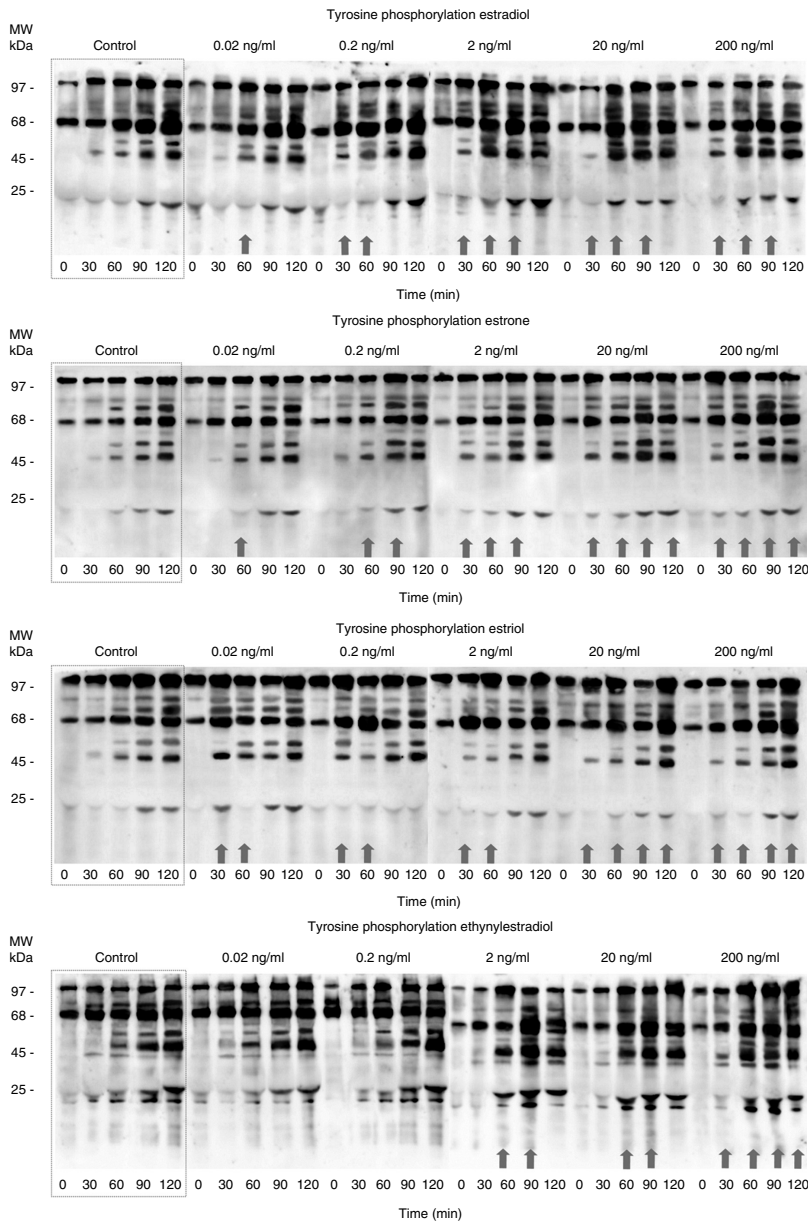
#### Comparison between spontaneous and Cal-induced acrosome reaction in control

The proportion of spontaneous and Cal-induced acrosome reaction in control sperm samples at all experimental times during sperm capacitation *in vitro* is shown in Fig. 5. There was a significantly increased number of acrosome-reacted sperm in the Cal-induced group (Mann-Whitney *U* test, \*\* $P = 0.0043/35$  min, \*\*\* $P < 0.001/90$  and 120 min) compared with a group with spontaneous acrosome reaction rate for all experimental times except the time zero representing less than a minute with or without an induction of acrosome reaction.

#### Discussion

Estrogens were considered only as female hormones, but they play an important role in the male reproductive system too. Testosterone and androstenedione are

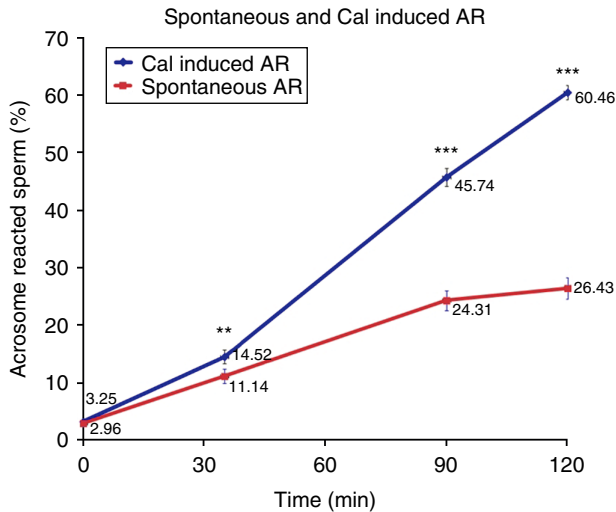




**Figure 4** Increasing effect of estrogens on protein TyrP during capacitation *in vitro*. Estrogen concentrations 0.02, 0.2, 2, 20, and 200 ng/ml. Time of capacitation 0, 30, 60, 90, and 120 min. Every sample contained a protein equivalent of  $10^6$  cells. Representative results shown.

precursors for the synthesis of  $E_2$  and estrone by cytochrome P450 aromatase. Consequent changes take place in the liver, where estrone is changed to  $E_3$ . This implies that estrogens are also produced in males and not only in females; therefore, they influence male reproductive parameters (Broeder *et al.* 2000). An estrogen action and specific cellular response are triggered through binding of these hormones to complementary ERs. ERs play an important role in activating signaling pathways leading to sperm capacitation, essential for further successful fertilization. ERs have been detected in the sperm of many species, for example, human (Aquila *et al.* 2004, Solakidi *et al.* 2005), boar (Mutembei *et al.* 2005), rooster (Kwon *et al.* 1995), rat (Pellettier *et al.* 2000), but failed to be detected

so far in mouse spermatozoa. In this study, the 64 kDa protein corresponding to ERB was detected to be present in sperm from cauda epididymis using immunoprotein detection. Moreover, localization of ERB was defined by immunofluorescent labeling as a thin sickle localized over the apical region of sperm head, covering also the apical hook region. While the presence of ERB on mature mouse epididymal sperm was confirmed, it could be considered to take part in activating signaling pathways leading to TyrP, during capacitation. GPR30 receptor could be another receptor responsible for interaction with estrogen hormones in sperm (Aquila *et al.* 2004); however, there is a recent work questioning its  $E_2$ -mediating role in mammalian reproductive organs (Otto *et al.* 2009).



**Figure 5** The comparison of spontaneous and Cal-induced acrosome reaction in control samples. Each data point represents five separate experimental observations. The statistical differences between a number of sperm after spontaneous and Cal-induced acrosome reaction at experimental times were analyzed by Mann–Whitney *U* test: 35 (\*\* $P=0.0043$ ), 90, and 120 min (\*\* $P<0.001$ ).

Protein TyrP that occurs during mammalian sperm capacitation is crucial for sperm to obtain the ability to undergo acrosome reaction. These events are, therefore, indicators of the sperm reproductive fitness leading to successful fertilization of the ova. TyrP is regulated by different intracellular pathways (Visconti *et al.* 2002) and these pathways are triggered by ligand-activated steroid and non-steroid receptors. Recently, the effect of estrogenic compounds on the reproductive potential of sperm has been studied (Breitbart & Etkovitz 2010, Carreau & Hess 2010). This paper addresses the question, whether a rising concentration of estrogens such as  $E_2$ , estrone,  $E_3$ , and 17 $\alpha$ -ethynylestradiol influences mouse sperm capacitation and acrosome reaction *in vitro*. Based on the presented results it can be concluded that these studied estrogens significantly stimulate the capacitation progress in a concentration-dependent manner. The number of sperm capable of undergoing head TyrP, as well as the overall TyrP, was generally higher compared with the control. Except  $E_3$ , all other estrogens increased the TyrP mainly at higher experimental concentrations. However, interestingly with  $E_3$ , this effect was observed mainly in the two lowest concentrations after 30 min of capacitation and it could be interpreted as a so-called U-shape effect. The dose–response relationships of certain hormones are often nonlinear and are characterized by the dose–response relationship displaying low-dose stimulation and high-dose inhibition (Calabrese & Baldwin 2002).

Synthetic estrogen 17 $\alpha$ -ethynylestradiol affected TyrP in the sperm head in all experimental times and its effect is different from other estrogens. Its influence on TyrP does not weaken during the capacitation period and the

effect is displayed even after 120 min. 17 $\alpha$ -ethynylestradiol compared to natural estrogens shows great stability, thanks to three strong bonds in its molecule, which make it extremely stable, and worsen its degradation in liver.

The percentage of sperm with positive head TyrP in our control samples was 8–12% in contrast to experimental groups where TyrP increased up to 18%. These results correlate with recent studies and denote that during sperm capacitation the percentage of sperm head TyrP in control is  $\sim 9\%$  compared to 3% TyrP in sperm heads when incubated for 90 min in non-capacitating medium (Asquith *et al.* 2004). However, one could expect that in the beginning of the sperm capacitation the amount of sperm positive for sperm head TyrP would be lower than that in a fully capacitated population. This was not, however, so obvious in our study. This could be explained by the fact that even at the starting time a sperm suspension was exposed to a complete capacitating medium for almost a minute; therefore, sperm were still subjected to all relevant ions and proteins. For this reason, we cannot rule out the possibility that signaling pathways could have been activated. Also, in our study, the sperm from a very distal region of cauda epididymis were used in contrast to study of Asquith *et al.* (2004) who used sperm from the whole cauda epididymis.

It needs to be stated that TyrP like capacitation does not take place synchronously (Stewart-Savage 1993); however, only those fewer than 15% of free-swimming population of sperm that are tyrosine phosphorylated can recognize zona pellucida.

The presented results show that estrogens in general increase sperm TyrP, however, each estrogen can trigger a response of different strength with respect to its concentration and also capacitation time. A possible explanation of a non-identical estrogenic response may be due to the fact that estrogens activate diverse types or parts of signaling pathways, or bind to and activate different receptors triggering pathways leading to sperm TyrP during capacitation.

Simultaneously the effect of estrogens on the number of acrosome-reacted sperm after Cal-induced acrosome reaction was studied. Cal is usually used for the activation of releasing lytic proteins from the acrosome and simulates the *in vivo* zona pellucida triggered acrosome reaction (Yamagata *et al.* 1998). All studied estrogens affected the onset of acrosome reaction; however, in this case, estrogens significantly reduced the percentage of sperm that completed the acrosome reaction. These results correlate with recent studies (Baldi *et al.* 2000, Vigil *et al.* 2008), which show a decreased ability of sperm to undergo the acrosome reaction after their capacitation with  $E_2$ . Similarly, our results summarizing the state of the acrosome after Cal-induced acrosome reaction correlate with an elevated amount of sperm head TyrP during sperm capacitation in presence of estrogens. On the other hand, it was presented (Adeoya-Osiguwa *et al.* 2003) that  $E_2$

stimulated acrosome reaction in uncapacitated sperm, but in capacitated sperm it had no effect. These results, however, are not in contrary to ours, as the acrosome reaction was not initiated in uncapacitated sperm, and moreover, no changes between the experimental groups and controls were observed after 90 min of capacitation, when this is more or less complete. The observed decrease of sperm ability to undergo acrosome reaction was obtained for sperm after 30 min of capacitation. On the other hand, those sperm capacitated with natural estrogens for a longer period did not show differences to the control, suggesting either the slowing down of capacitation or an effect that is lost or compensated in fully capacitated sperm. This was not the case, however, with 17 $\alpha$ -ethynylestradiol, where a decreased acrosome reaction persisted in sperm capacitated for 60 min, when mouse capacitation is completed. This proposes its prolonged adverse effect on the sperm-fertilizing ability.

In mice, there is a high spontaneous acrosome reaction (Johnson *et al.* 2007), whose rate depends on time of capacitation. The proportion of spontaneous and Cal-induced acrosome reaction gives, therefore, important information to assess the magnitude of the actual effect of estrogens on Cal-induced acrosome reaction. The decrease of sperm ability to undergo the induced acrosome reaction in presence of selected estrogens falls in early capacitating times below the spontaneous acrosome rate, which may emphasize the actual effect of estrogens on ability of sperm to undergo the acrosome reaction.

The results of TyrP from immunofluorescent analysis were confirmed by immunoprotein detection of the whole sperm samples. The characteristics of specific changes in the sperm head are crucial for judging the sperm ability to fertilize (Stewart-Savage 1993). For this reason, we have predominantly focused on the effect of different concentrations of selected estrogens on the TyrP in the sperm head. On the other hand, the status of the whole sperm considering TyrP in the flagellum could not be ignored. The SDS-PAGE results show that selected estrogens increase the overall protein TyrP in the whole sperm lysate during capacitation *in vitro*. In correlation with previously published results (Visconti *et al.* 1995a), our control protein samples showed a time-dependent increase in TyrP during mouse sperm capacitation. The results of protein phosphorylation from sperm capacitated with selected estrogens showed a significant increase in the number of proteins phosphorylated on tyrosine residues in higher concentrations for E<sub>2</sub>, estrone, and 17 $\alpha$ -ethynylestradiol, and in a lower concentration for E<sub>3</sub>. As protein TyrP is ongoing in the sperm head and the flagellum, results from immunoprotein detection of the whole sperm lysate samples and the immunofluorescence detection of TyrP in the sperm head cannot be fully compared. Nevertheless, some correlation could be made and a parallelism can be seen between these two groups of results.

Comparing currently obtained results, it is clear that each of the selected estrogen significantly affects the two 'markers' of sperm capacitation such as TyrP and a consequent acrosome reaction in the opposite way. Before sperm-egg fusion, sperm undergoes molecular changes, which are indicated by the status of TyrP (Visconti *et al.* 1999), activation of acrosome response, and sperm binding to zona pellucida (Baldi *et al.* 2002). These processes strictly follow one another in a precisely set order. Among many, TyrP triggers actin polymerization, which prevents the premature fusion of the plasma and outer acrosomal membranes leading to acrosome reaction (Brener *et al.* 2003). If the ERs are hyperstimulated by an excessive amount of estrogens, the activity of the protein tyrosine kinase is elevated and the phosphorylation on tyrosine residues remains triggered. Therefore, the phospholipase D is constantly activated leading to a consequent polymerization of actin (Breitbart *et al.* 2005). During the acrosome reaction, the activation of phospholipase C leads to an increase of intracellular Ca<sup>2+</sup> ions causing actin depolymerization. However, if in the beginning of the acrosome reaction the phospholipase D remains constantly upregulated by protein tyrosine kinase, the activity of protein kinase C can be possibly delayed and depolymerization of actin slowed down. The timing of all the processes involved in the molecular changes leading to capacitation and acrosome reaction is very important and inaccurate time setting of consecutive events can result in a reduction in the sperm-fertilizing ability.

Spermatozoa face on their journey through the female reproductive tract under different concentrations of estrogen, similar to those selected in our *in vitro* experiments, depending on the phase of the cycle. Estrogens are low during the preovulatory stage and E<sub>2</sub> is associated with sperm longevity (Mbizvo *et al.* 1990), but the situation changes at the time of ovulation, when the concentration of estrogens released with follicular fluid rises (Shaikh 1971). In correlation to our result, the capacitation and acrosome reaction are modulated by higher concentrations of estrogens and these can serve as a sperm-specific selection barrier where inhibiting effect of estrogens on induced acrosome reaction may have a physiological relevance (Vigil *et al.* 2008). Therefore, estrogens may be seen as one of many preferred cryptic female mechanisms to select the best possible sperm to fulfil the task.

In conclusion, this study shows an existence of ERB in mature mouse spermatozoa. It also provides evidence that estrogens significantly stimulate the capacitation progress in a concentration-dependent manner. On the other hand, estrogens decrease the number of acrosome-reacted mouse sperm after the induced acrosome reaction. Based on our results, it can be inferred that a raising concentration of estrogens in the environment may represent a potential risk in altering certain mechanisms contributing to the fitness of sperm fertilization.



## Materials and Methods

### Animals

Inbred BALB/c mice were obtained from a breeding colony of the Laboratory of Reproduction, Faculty of Science, Charles University in Prague or purchased directly from Velaz (Unetice, Czech Republic). Mice were housed in the animal facilities and food and water were supplied *ad libitum*. Male mice used for all experiments, were in a reproductive age of 10–12 weeks. All animal procedures were carried out in strict accordance with the Animal Scientific Procedure, Art 2010, and subjected to review by the Local Ethics Committee.

### Capacitation

Sperm from the distal regions of cauda epididymis were released into M2 fertilizing medium (Sigma–Aldrich) under paraffin oil in 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Released sperm were assessed for motility and viability. Sperm stock was diluted to the required concentration ( $5 \times 10^6$ /ml) into M2 medium under paraffin oil with five different concentrations of selected estrogens (0.02, 0.2, 2, 20, and 200 ng/ml). Sperm capacitated in M2 medium without added estrogens were used as a control. Sperm samples were collected at 0, 30, 60, 90, and 120 min of capacitation *in vitro*. The time marked as 0 was the minimum time required for sperm being added to capacitated medium, removed out of the medium, and washed. This manipulation did not exceed 1 min. These samples served as a negative control. Sperm motility and viability were assessed at every experimental time point.

### Immunofluorescence detection of ERB

The distal region of mouse cauda epididymis was placed in 37 °C PBS in 5% CO<sub>2</sub>, for 10 min. Released sperm were washed in PBS, smeared onto glass slides, air-dried, and fixed with methanol for 7 min at –20 °C followed by 10 min in 0.2% Triton X-100. For immunofluorescent labeling, sperm were blocked with 3% BSA in PBS for 1 h, followed by incubation with the primary antibody BERB H150 (sc-8974, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany; 1:50) in PBS at 4 °C, followed by a secondary antibody Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L; A11008, Molecular Probes, Grand Island, NY, USA; 1:1000) in PBS. Slides were mounted into a Vectashield Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, Peterborough, UK). Samples were examined with an Olympus IX81 fluorescent microscope and photographed with a Hamamatsu ORCA C4742-80-12AG, using Olympus Soft Imaging Solutions Software.

### Immunofluorescent detection of TyrP

Sperm smears were air dried and fixed with 3.7% formaldehyde in PBS pH 7.34 at room temperature for 10 min, followed by washing in PBS, incubation with ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl) 15 mM for 5 min, and with 0.1% detergent Triton X-100 for 3 min. Slides were washed with PBS and left in PBS with sodium azide (NaN<sub>3</sub>) at 4 °C. For immunofluorescent labeling, slides were blocked with 10% BSA in PBS for 1 h and incubated

with primary MAB anti-phosphotyrosine (PTyr 01 112630025, Exbio Antibodies, Prague, Czech Republic) diluted 1:500 in 1% BSA in PBS for 2 h, followed with Alexa Fluor 488, donkey anti-mouse IgG (A21202, Molecular Probes) secondary antibody 1:1000 in PBS for 1 h. Irrelevant isotype-matched MABs and secondary antibodies (used without primary antibodies) served as negative controls. The MAB MM10 anti-mouse CD46 (HM1118, HyCult, Uden, The Netherlands), which recognizes an acrosome-associated antigen, was used as a positive control. Slides were mounted in Vectashield mounting medium with DAPI (Vector Laboratories). Slides were examined with an epifluorescent microscope (as stated above). For every experiment we collected sperm data from 10 mice. The positive or negative signal was evaluated from a total of 200 sperm on every slide. In each group, at least five samples were analyzed. Data were analyzed statistically by Kruskal-Wallis ANOVA (KW-ANOVA); *post-hoc* comparison was performed by multiple comparisons of mean ranks; for details see ‘Statistical analysis’ section.

### Acrosome reaction

Spermatozoa from cauda epididymis were capacitated as described earlier. During capacitation the acrosome reaction was induced by Cal (A23187 (Cal), Sigma–Aldrich) at a final concentration of 5 μM. At each experimental capacitating time of 30, 60, 90, and 120 min, the Cal was added for the standard 60 min incubation. Cal was also added into parallel sperm droplets after 30 min capacitation but only for 5 min. Sperm that served as zero control and their presence in capacitating medium did not exceed 1 min were not further induced with Cal. The control samples were also evaluated for a rate of spontaneous acrosome reaction at relevant times to Cal-induced AR at 35, 90, and 120 min. All the sperm samples were incubated at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub>. A drop of spermatozoa was placed onto a glass slide and 2.5 μM PNA lectin (peanut agglutinin lectin conjugate) (Molecular Probes) was added. The status of the acrosome was examined immediately under a fluorescent microscope. For every experiment we collect sperm data from 10 mice. A total of 200 cells were evaluated in each group and at least five samples were analyzed. Data were analyzed statistically by KW-ANOVA; *post-hoc* comparison was performed by multiple comparisons of mean ranks; for details see ‘Statistical analysis’ section.

### SDS–PAGE immunoblotting

SDS electrophoresis and immunoblotting technique were used for the TyrP assessment and ERB detection. They were performed by protocols based on standard methods (Laemmli 1970, Towbin *et al.* 1979). Sperm were collected at 0, 30, 60, 90, and 120 min of capacitation *in vitro*. A suspension of noncapacitated sperm from a sperm stock released from cauda epididymis was used. The sperm solution was diluted with PBS and the number of sperm cells was counted using a Bürker chamber to ascertain a final concentration of  $10^6$  cells in the sample. Sperm pellet was resuspended in an equal volume of SDS–PAGE nonreduced sample buffer and heated at 97 °C for 3 min. Samples containing a protein equivalent of  $10^6$

capacitated sperm cells were run on a 5% stacking and 10% running SDS–polyacrylamide gel using Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-Rad) as MW markers. Proteins were then transferred onto a nitrocellulose membrane. Non-specific sites on the membrane were blocked with PBS-blocking solution (5% skim milk and 0.05% Tween 20). ERB was identified by primary polyclonal antibody (H150, Santa Cruz Biotechnology) against N-terminal A/B domain, diluted 1:200 and secondary goat anti-rabbit antibody conjugated to HRP (170 5046, Bio-Rad) diluted 1:20 000. Proteins phosphorylated on tyrosine residues were identified by the primary MAB anti-phosphotyrosine (PTyr 01 112630025, Exbio Antibodies) diluted 1:500 followed by a peroxidase goat anti-mouse IgG secondary antibody (A 0168, Sigma–Aldrich) diluted 1:20 000. Protein staining was visualized by chemiluminescence (Super Signal West Dura Extended Duration Substrate, Thermo Fisher Scientific, Pardubice, Czech Republic). These experiments were performed at least three times with similar results. Representative results are shown.

Gel densitometry was performed with an Aida image analyzer 4.18 (Raytest GmbH, Straubenhardt, Germany) and the relative intensity of individual signals was determined.

### Statistical analysis

Experimental data were analyzed using a program STATISTICA 6.0 (StatSoft CR s.r.o, Czech Republic). The statistical differences among compared groups (number of cells with specific sperm head status in experimental samples vs control sample in appropriate time) were analyzed by one-way analysis of covariance (KW-ANOVA). The number of cells with specific sperm head status at the beginning of the capacitation process was used as a covariate to reduce the effect of differences in the capacitation status of the sperm among individual animals, which is not the result of estrogen treatment. *Post-hoc* comparison was done by multiple comparisons of mean ranks. The \**P* value <0.05 (\*\**P*<0.01 and \*\*\**P*=0.001 respectively) was considered significant. The results of statistical analysis including mean ± s.e.m. are presented in Tables 1 and 2.

### Supplementary data

This is linked to the online version of the paper at <http://dx.doi.org/10.1530/REP-11-0326>.

### Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

### Funding

This study was supported by Grants of the Ministry of Education of the Czech Republic VC No. 1M06011 and VZ No. 0021620828 and by the Institutional Research Support SVV263207.

### Acknowledgements

We are very thankful to Prof Ivan Lefkovits from Department of Biomedicine, Basel, Switzerland, for great help with presenting data in graphs and Timothy Paul Hort for English corrections.

### References

- Adeoya-Osiguwa SA, Markoulaki S, Pocock V, Milligan SR & Fraser LR 2003 17Beta-estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function. *Human Reproduction* **18** 100–107. (doi:10.1093/humrep/deg037)
- Aquila S, Sisci D, Gentile M, Middea E, Catalano S, Carpino A, Rago V & Andò S 2004 Estrogen receptor (ER) alpha and ER beta are both expressed in human ejaculated spermatozoa: evidence of their direct interaction with phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt pathway. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **89** 1443–1451. (doi:10.1210/jc.2003-031681)
- Asquith KL, Baleato RM, McLaughlin EA, Nixon B & Aitken RJ 2004 Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm–zona recognition. *Journal of Cell Science* **117** 3645–3657. (doi:10.1242/jcs.01214)
- Austin CR 1952 The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* **170** 326. (doi:10.1038/170326a0)
- Baldi E, Luconi M, Muratori M & Forti G 2000 A novel functional estrogen receptor on human sperm membrane interferes with progesterone effects. *Molecular and Cellular Endocrinology* **161** 31–35. (doi:10.1016/S0303-7207(99)00220-8)
- Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L & Forti G 2002 Signal transduction pathways in human spermatozoa. *Journal of Reproductive Immunology* **53** 121–131. (doi:10.1016/S0165-0378(01)00089-4)
- Breitbart H & Etkovitz N 2010 Role and regulation of EGFR in actin remodeling in sperm capacitation and the acrosome reaction. *Asian Journal of Andrology* **13** 106–110. (doi:10.1038/aja.2010.78)
- Breitbart H, Cohen G & Rubinstein S 2005 Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction* **129** 263–268. (doi:10.1530/rep.1.00269)
- Brener E, Rubinstein S, Cohen G, Shternall K, Rivlin J & Breitbart H 2003 Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of Reproduction* **68** 837–845. (doi:10.1095/biolreprod.102.009233)
- Broeder CE, Quindry J, Brittingham K, Panton L, Thomson J, Appakundu S, Breuel K, Byrd R, Douglas J, Earnest C *et al.* 2000 The Andro Project: physiological and hormonal influences of androstenedione supplementation in men 35 to 65 years old participating in a high-intensity resistance training program. *Archives of Internal Medicine* **160** 3093–3104. (doi:10.1001/archinte.160.20.3093)
- Calabrese EJ & Baldwin LA 2002 Hormesis: the dose–response revolution. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **43** 175–197. (doi:10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140223)
- Carreau S & Hess RA 2010 Oestrogens and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **365** 1517–1535. (doi:10.1098/rstb.2009.0235)
- Evans MI, O'Malley PJ, Krust A & Burch JB 1987 Developmental regulation of the estrogen receptor and the estrogen responsiveness of five yolk protein genes in the avian liver. *PNAS* **84** 8493–8497. (doi:10.1073/pnas.84.23.8493)
- Filardo EJ & Thomas P 2005 GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **16** 362–367. (doi:10.1016/j.tem.2005.08.005)
- Free MJ & Jaffe RA 1979 Collection of rete testis fluid from rats without previous efferent duct ligation. *Biology of Reproduction* **20** 269–278. (doi:10.1095/biolreprod20.2.269)
- Hall JM, Cause JF & Korach KS 2001 The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry* **276** 36869–36872. (doi:10.1074/jbc.R100029200)
- Hess RA, Bunick D & Bahr JM 1995 Sperm, a source of estrogen. *Environmental Health Perspectives* **103** 59–62.

- Johnson PM, Clif LE, Andrlíkova P, Jursova M, Flanagan BF, Cummerson JA, Stopka P & Dvorakova-Hortova K** 2007 Rapid sperm acrosome reaction in the absence of acrosomal CD46 expression in promiscuous field mice (*Apodemus*). *Reproduction* **134** 739–747. (doi:10.1530/REP-07-0363)
- Kusk KO, Krüger T, Long M, Taxvig C, Lykkesfeldt AE, Frederiksen H, Andersson AM, Andersen HR, Hansen KM & Nellemann C** 2011 Endocrine potency of wastewater: contents of endocrine disrupting chemicals and effects measured by *in vivo* and *in vitro* assays. *Environmental Toxicology and Chemistry* **30** 413–426. (doi:10.1002/etc.385)
- Kwon S, Hess RA, Bunick D, Nitta H, Janulis L, Osawa Y & Bahr JM** 1995 Rooster testicular germ cells and epididymal sperm contain P450 aromatase. *Biology of Reproduction* **53** 1259–1264. (doi:10.1095/biolreprod53.6.1259)
- Laemmli UK** 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** 680–685. (doi:10.1038/227680a0)
- Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS & Smithies O** 1993 Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *PNAS* **90** 11162–11166. (doi:10.1073/pnas.90.23.11162)
- Mbizvo MT, Thomas S, Fulgham DL & Alexander NJ** 1990 Serum hormone levels affect sperm function. *Fertility and Sterility* **54** 113–120.
- Mutembei HM, Pesch S, Schuler G & Hoffmann B** 2005 Expression of oestrogen receptors alpha and beta and aromatase in the testis of immature and mature boars. *Reproduction in Domestic Animals* **40** 228–236. (doi:10.1111/j.1439-0531.2005.00586.x)
- Naz RK & Rajesh PB** 2004 Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. *Reproductive Biology and Endocrinology* **2** 75–87. (doi:10.1186/1477-7827-2-75)
- Otto C, Fuchs I, Kauselmann G, Kern H, Zevnik B, Andreasen P, Schwarz G, Altmann H, Klewer M, Schoor M *et al.*** 2009 GPR30 does not mediate estrogenic responses in reproductive organs in mice. *Biology of Reproduction* **80** 34–41. (doi:10.1095/biolreprod.108.071175)
- Pedram A, Razandi M, Sainson RCA, Kim JK, Hughes CC & Levin ER** 2007 A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry* **282** 2278–2288. (doi:10.1074/jbc.M611877200)
- Pellettier G, Labrie C & Labrie F** 2000 Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *Journal of Endocrinology* **165** 359–370. (doi:10.1677/joe.0.1650359)
- Shaikh AA** 1971 Estron and estradiol levels in the ovarian venous blood from rats during the estrous cycle and pregnancy. *Biology of Reproduction* **5** 297–307.
- Solakidi S, Psarra A-MG, Nikolaropoulos S & Sekeris CE** 2005 Estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ER $\beta$  and AR in mitochondria of the midpiece. *Human Reproduction* **20** 3481–3487. (doi:10.1093/humrep/dei267)
- Stewart-Savage J** 1993 Effect of bovine serum albumin concentration and source on sperm capacitation in the golden hamster. *Biology of Reproduction* **49** 74–81. (doi:10.1095/biolreprod49.1.74)
- Storgaard L, Bonde JP & Olsen J** 2006 Male reproductive disorders in humans and prenatal indicators of estrogen exposure. A review of published epidemiological studies. *Reproductive Toxicology* **21** 4–15. (doi:10.1016/j.reprotox.2005.05.006)
- Towbin H, Staehelin T & Gordon J** 1979 Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS* **76** 4350–4354. (doi:10.1073/pnas.76.9.4350)
- Vigil P, Toro A & Godoy A** 2008 Physiological action of oestradiol on the acrosome reaction in human spermatozoa. *Andrologia* **40** 146–151. (doi:10.1111/j.1439-0272.2007.00814.x)
- Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P & Kopf GS** 1995a Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* **121** 1129–1137.
- Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, Olds-Clarke P & Kopf GS** 1995b Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* **121** 1139–1150.
- Visconti PE, Ning X, Fornés MW, Alvarez JG, Stein P, Connors SA & Kopf GS** 1999 Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Developmental Biology* **214** 429–443. (doi:10.1006/dbio.1999.9428)
- Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S & Diekman AB** 2002 Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *Journal of Reproductive Immunology* **53** 133–150. (doi:10.1016/S0165-0378(01)00103-6)
- Yamagata K, Murayama K, Okabe M, Toshimori K, Nakanishi T, Kashiwabara S & Baba T** 1998 Acrosin accelerates the dispersal of sperm acrosomal proteins during acrosome reaction. *Journal of Biological Chemistry* **273** 10470–10474. (doi:10.1074/jbc.273.17.10470)
- Yanagimachi R** 1994 Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction*, 1st edn, pp 189–317. Eds E Knobil & JD Neill. New York: Raven Press.

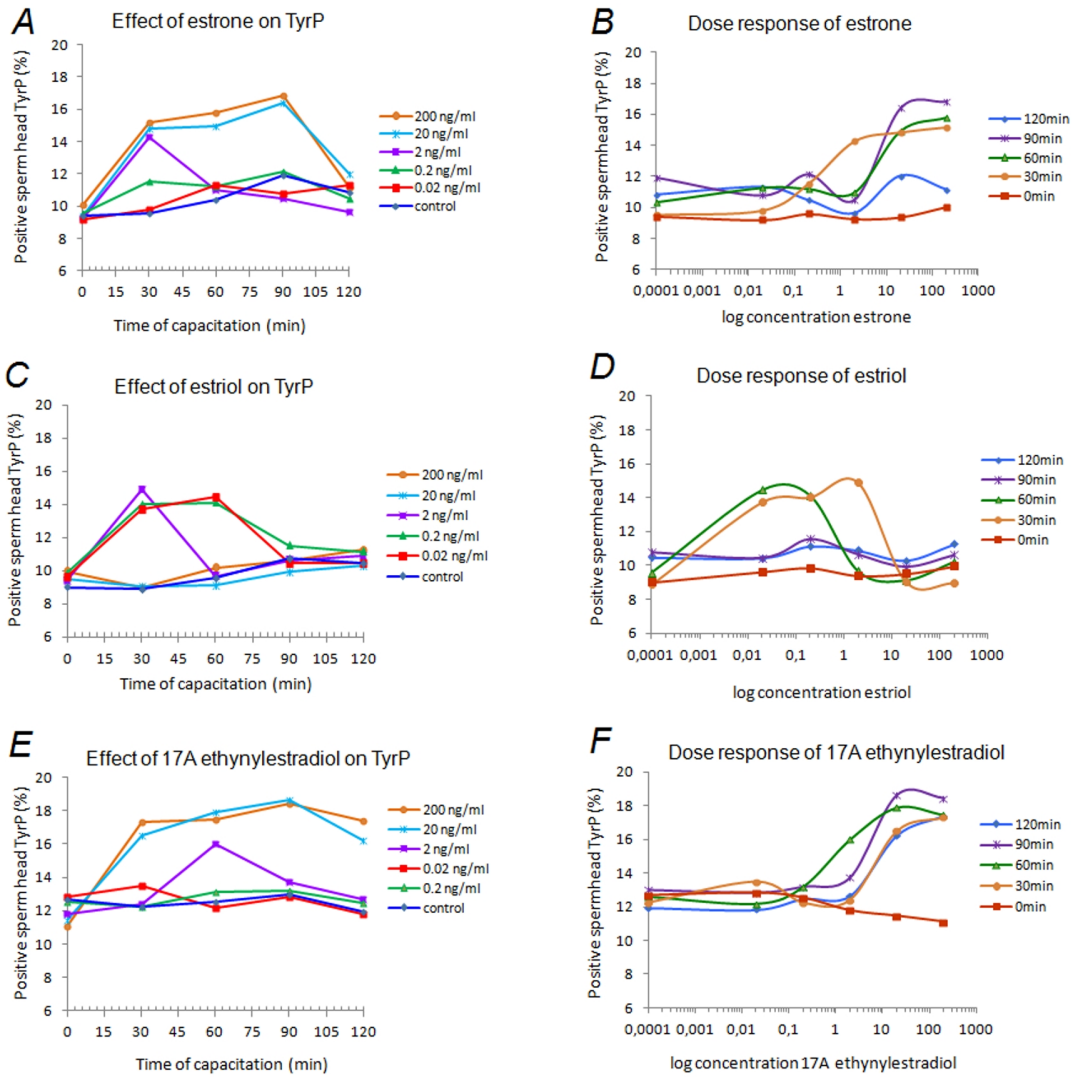
---

Received 31 August 2011

First decision 26 September 2011

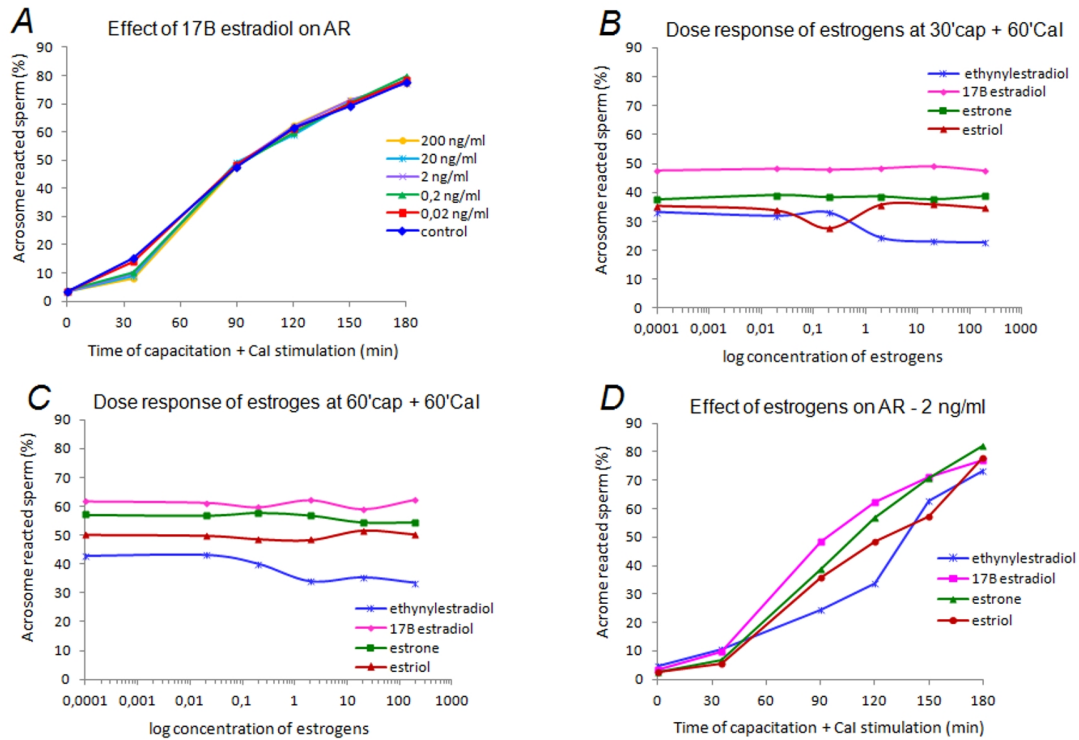
Revised manuscript received 15 November 2011

Accepted 1 December 2011



Supplementary Figure 1 - Effect of estrogens on mouse sperm tyrosine phosphorylation. (A, C, E) Linear time kinetics of a range of (A) estrone, (C) estriol and (E) 17A ethynylestradiol concentrations on positive sperm head TyrP. (B, D, F) Log concentration kinetics of (A) estrone, (C) estriol and (E) 17A ethynylestradiol at various time of capacitation. For all panels, data represent an average of 5 replicates as described in Methods. Mean  $\pm$ SEM are show in Table 1 and 2 due to a clear transparency of all graphs. The arithmetic mean of total SE was 0.970 and the standard deviation of the mean of SE was 0.553. In logarithmic graphs, the plotted value for 0.0001 ng/ml represents the zero control.





Supplementary Figure 2 - Effect of estrogens on mouse sperm acrosome reaction. (A) Linear time kinetics of a range of 17B estradiol concentrations on acrosome reaction. (B) Log concentration kinetics of the four studied estrogens at 30 minutes of capacitation and 60 minutes CaI induced acrosome reaction. (C) Log concentration kinetics of the four studied estrogens at 60 minutes of capacitation and 60 minutes CaI induced acrosome reaction. (D) Linear time kinetics of 2 ng/ml concentration of estrogens on acrosome reaction. For all panels, data represent an average of 5 replicates as described in Methods. Mean±SEM are show in Table 1 and 2 due to a clear transparency of all graphs. The arithmetic mean of total SE was 1,192 and the standard deviation of the mean of SE was 0,656. In logarithmic graphs, the plotted value for 0.0001 ng/ml represents the zero control.



## ***In vivo* exposure to 17 $\beta$ -estradiol triggers premature sperm capacitation in cauda epididymis**

Lukas Ded<sup>1</sup>, Natasa Sebkova<sup>2,3</sup>, Martina Cerna<sup>2</sup>, Fatima Elzeinova<sup>1</sup>, Pavla Dostalova<sup>1,3</sup>, Jana Peknicova<sup>1</sup> and Katerina Dvorakova-Hortova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Biotechnology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v. v. i., Videnska 1083, 142 20 Prague, Czech Republic, Departments of <sup>2</sup>Zoology and <sup>3</sup>Cell Biology, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic

Correspondence should be addressed to L Ded; Email: lukas.ded@img.cas.cz

### **Abstract**

Estrogens play a crucial role in spermatogenesis and estrogen receptor  $\alpha$  knock-out male mice are infertile. It has been demonstrated that estrogens significantly increase the speed of capacitation *in vitro*; however this may lead to the reduction of reproductive potential due to the decreased ability of these sperm to undergo the acrosome reaction. To date the *in vivo* effect of estrogens on the ability of sperm to capacitate has not been investigated. Therefore, in this study, we exposed mice ( $n=24$ ) to 17 $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) at the concentration of 20 ng/ml either during puberty from the fourth to seventh week of age ( $n=8$ ), or continuously from birth for a period of 12 weeks ( $n=8$ ) at which age the animals from both groups were killed. The capacitation status of epididymal and testicular sperm was analysed by tyrosine phosphorylation (TyrP) antibody (immunofluorescence and western blot) and chlortetracycline (CTC) assay. According to our results, *in vivo* exposure to increased  $E_2$  concentrations caused premature sperm capacitation in the epididymis. The effect of  $E_2$ , however, seems reversible because after the termination of the exposure premature epididymal sperm capacitation is decreased in animals treated during puberty. Furthermore the changes in epididymal sperm capacitation status detected by TyrP and CTC positively correlate with plasma levels of  $E_2$  and the expression of the estrogen-dependent trefoil factor 1 (*Tff1*) gene in testicular tissue. Therefore, our data implicate that *in vivo* exposure to  $E_2$  under specific conditions leads to the premature capacitation of mouse sperm in epididymis with a potential negative impact on the sperm reproductive fitness in the female reproductive tract.

*Reproduction* (2013) **145** 255–263

### **Introduction**

Estrogens play a key role during male reproduction including spermatogenesis (Carreau *et al.* 2011, 2012) and sperm maturation such as capacitation (Baldi *et al.* 2009). Estrogen response is mediated through both genomic and non-genomic actions, where the genomic one involves binding to estrogen receptors ERs and nuclear transcription factors that activate the expression of target genes. The non-genomic estrogen action happens through transmembrane receptors such as ERA, ERB and G-protein coupled receptors (GPR30), triggering rapid intracellular signaling pathways, including the activation of serine/threonine and tyrosine phosphorylation (TyrP), leading to sperm capacitation (Kalab *et al.* 1998, Filardo *et al.* 2002). As a consequence of phosphorylation on mainly tyrosine residues, which is the key marker of successfully ongoing capacitation (Visconti *et al.* 1995a,b), the cytoskeleton protein network changes its dynamics, and acrosome reaction (AR) can occur (Yanagimachi 1994). Interestingly, progesterone-induced AR is inhibited by the extra amount

of 17 $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) through interaction with a specific non-genomic estrogen receptor on the sperm plasma membrane, suggesting that  $E_2$ , present at micromolar levels in follicular fluid, may act as a physiological modulator of sperm progesterone response, ensuring the appropriate timing of activation in the fertilisation process (Luconi *et al.* 1999). In rat and mouse males, the concentration of  $E_2$  in blood plasma is 2–25 pg/ml, and it is lower than that in rete testis fluid (250 pg/ml; Free & Jaffe 1979). On the other hand, the concentration of estrogen in ovarian fluid is much higher when compared with the plasma (Free & Jaffe 1979, Hess *et al.* 1995) and it reaches multiple values depending on the time of the estrus fluctuating between 145 and 2100 pg/ml in rats and mice (Shaikh 1971). Most of our knowledge regarding these processes has been obtained from *in vitro* studies (Adeoya-Osiguwa *et al.* 2003, Ded *et al.* 2010, Sebkova *et al.* 2012), and for this reason it is really important to also do *in vivo* experiments.

Recent studies have shown that exposure to environmental estrogens may also influence male fertilising

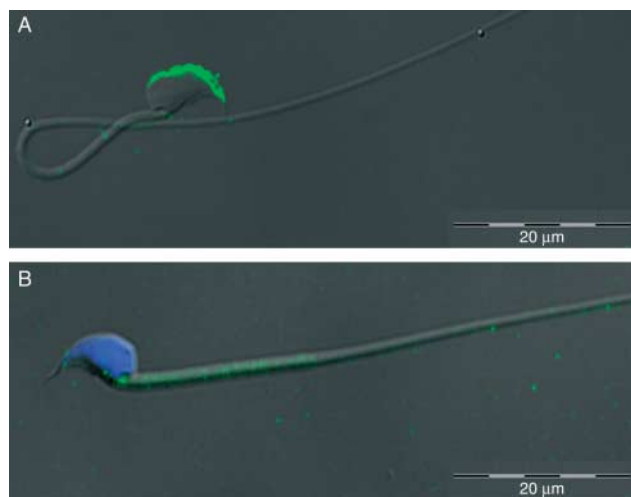
capability (Akingbemi 2005, Mathur & D’Cruz 2011). This includes chemicals that occur naturally in plants such as genistein and resveratrol (phytoestrogens) and also man-made chemicals such as bisphenol-A, diethylstilbestrol and vinclozolin (xenoestrogens), which can disrupt the endocrine function of animals and negatively influence spermatogenesis and sperm parameters (Peknicová *et al.* 2002, Kyselova *et al.* 2003, 2004, Elzeinova *et al.* 2008). These chemicals again mainly act by binding to estrogen receptors (Kuiper *et al.* 1998, Sohoni & Sumpter 1998, Akingbemi & Hardy 2001) and trigger a rapid non-genomic signaling response. The key estrogen receptor is ERA as its knock-out mice are infertile due to the disruption of the estrogen action within somatic cells of the reproductive system (Dupont *et al.* 2000). ERA activity has been demonstrated by expression of the trefoil factor 1 (*Tff1*) gene (Kim *et al.* 2000, Park *et al.* 2012), which is also a marker gene for the analysis of estrogenic activity (Dorosh *et al.* 2011).

The objective of this study was to test the *in vivo* effect of E<sub>2</sub> on the level of TyrP as a marker of ongoing mouse sperm capacitation and to monitor the *Tff1* gene expression as the marker for ERA activity.

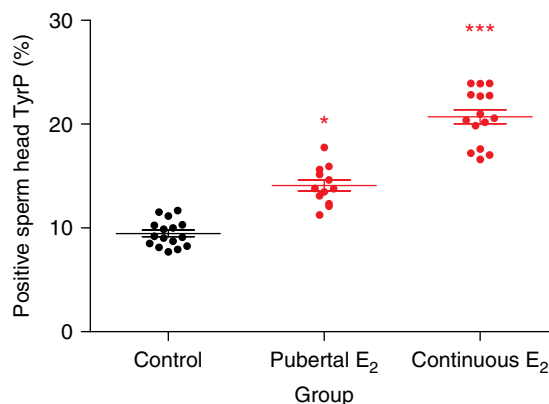
## Results

### *In vivo* exposure to E<sub>2</sub> increases the TyrP of epididymal sperm head proteins

The number of positively labelled sperm heads for TyrP (Fig. 1) at the start of capacitation (time 0) was significantly higher in both experimental groups with pubertal (A) and continuous exposure to E<sub>2</sub> (B) compared with the control (Fig. 2). The difference between the control and experimental pubertal E<sub>2</sub> group was on the border of significance ( $P \leq 0.05$ ). On the other hand, the difference between the control and experimental



**Figure 1** Immunofluorescent detection of tyrosine phosphorylation (TyrP) in mouse epididymal sperm. (A) TyrP-positive sperm head and (B) TyrP-negative sperm head. Scale bar 20 µm.

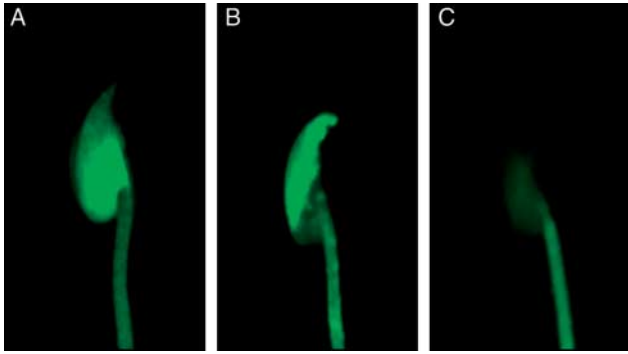


**Figure 2** Number of capacitated epididymal sperm detected by anti pY antibody (time 0). Control group, pubertal E<sub>2</sub> and continuous E<sub>2</sub>. Bars denote arithmetical means of capacitated cells (%), whiskers denote S.E.M. and points denote individual measurements. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

continuous E<sub>2</sub> group was highly significant ( $P \leq 0.001$ ) despite the fact that the variance in the continuous E<sub>2</sub> samples was higher compared with the control and pubertal E<sub>2</sub> samples. Moreover, the difference between pubertal E<sub>2</sub> and continuous E<sub>2</sub> was also significant ( $P \leq 0.01$ ), thus indicating that sperm cells from animals after continual exposure to E<sub>2</sub> (continuous E<sub>2</sub>) are highly different to those after pubertal exposure (pubertal E<sub>2</sub>) and the control.

### *In vivo* exposure to E<sub>2</sub> changes the distribution of chlortetracycline fluorescent patterns in epididymal sperm cells

In addition to the analysis of the sperm head TyrP, chlortetracycline (CTC) analysis was performed to evaluate changes in CTC fluorescent patterns relating to sperm capacitation (Fig. 3). Data from the CTC analysis correlate with the data from TyrP analysis. The control group had the lowest number of cells with CTC pattern B relating to the capacitated status of the sperm (Fig. 3). Similar to the data from TyrP analysis, the number of cells with CTC pattern B (Fig. 3) relating to the capacitated status was significantly higher in both experimental groups compared with the control (Fig. 4). The difference between the control and pubertal E<sub>2</sub> was the lowest ( $P \leq 0.05$ ), and the difference between the control and continuous E<sub>2</sub> was the highest ( $P \leq 0.001$ ). Also the difference between the two experimental groups, pubertal E<sub>2</sub> and continuous E<sub>2</sub>, was significant. This fact indicates the significant changes in the distribution of the CTC fluorescent patterns after the termination of E<sub>2</sub> exposure in the pubertal E<sub>2</sub> group. Together, with the data from TyrP labelling, western blot (WB; Fig. 5) and CTC analyses provide strong evidence for the procapacitation effect of E<sub>2</sub> based on the analysis of these two parameters. Also the correlation between the number of TyrP-positive sperm heads and the number of spermatozoa with the pattern B was high ( $r = 6.683$ ,  $P = 0.0358$ ).



**Figure 3** Patterns of fluorescence in CTC staining. (A) Bright fluorescence over the entire head with a brighter line of fluorescence across the equatorial segment (pattern F, non-capacitated spermatozoon). (B) Bright fluorescence in the anterior segment of the head with an absence of fluorescent labelling over the equatorial and post-equatorial segments (pattern B, capacitated spermatozoon). (C) Low or absent fluorescence over the entire head (pattern AR, acrosome-reacted spermatozoon).

### **The initial differences of the sperm head TyrP are propagated during in vitro capacitation**

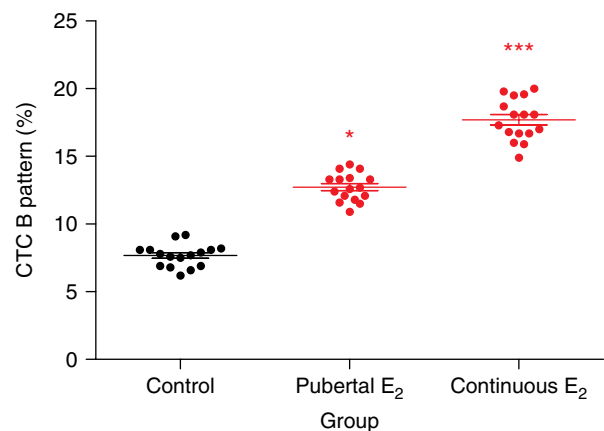
After analysis of the native epididymal sperm suspension, sperm were capacitated to assess the potential differences in the capacitation progress at individual capacitation times. At the start of the capacitation process, there exist significant differences between the control and experimental groups representing the differences in the phosphorylation of the sperm head proteins directly in the epididymis (Fig. 6). These differences were propagated into the subsequent capacitation times. After 30, 60, 90 and 120 min of capacitation, the differences between the control and experimental groups followed those from the time 'zero' representing a positive epididymal sperm head TyrP. The highest, but not statistically significant, difference between the capacitation progress was at 30 min of capacitation (time) for continuous E<sub>2</sub> (Fig. 7). This difference indicates the fact that some population of the spermatozoa from animals exposed to E<sub>2</sub> is on the border of the capacitation status and after the initial capacitation impulse, this population responds by increasing the total amount of capacitated spermatozoa in the first subsequent capacitation time (30 min; Fig. 7). The data from positive TyrP labelling were further supported by WB analysis of TyrP (Fig. 5). The difference between the control and pubertal E<sub>2</sub> is not visible at the time 0. On the other hand, there is a higher TyrP of proteins around 68 and 45 kDa for continuous E<sub>2</sub>. Therefore, the evidence from WB partially supports data from TyrP fluorescence, despite the fact that WB also included differences between TyrP of the tail-associated proteins, which were not considered during the TyrP fluorescence analysis.

### **The indicators of capacitation status positively correlate with the serum levels of E<sub>2</sub> and expression of Tff1 gene**

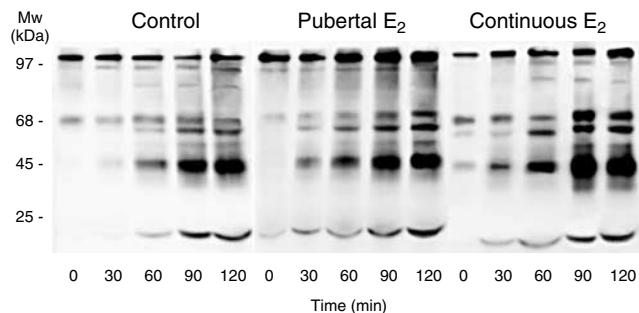
For the analysis of the connection between the indicators of sperm capacitation status and other relevant physiological parameters of estrogen action, the measurement of E<sub>2</sub> serum levels (Fig. 8A) and expression of the estrogen-dependent *Tff1* gene (Fig. 8B) were analysed and statistically correlated with the previous results from the sperm analysis. According to the obtained results, the percentage of the TyrP-positive sperm head cells in the epididymis positively correlates both with E<sub>2</sub> plasma levels and with the expression of the *Tff1* gene in the testicular tissue. The concentration of plasma E<sub>2</sub> in the control group and pubertal E<sub>2</sub> group was relatively similar with the arithmetical mean around 46 pg/ml and had a s.d. of 17. On the other hand, plasma E<sub>2</sub> levels in Continuous E<sub>2</sub> group were much higher and reached an average concentration of 3705 pg/ml with an s.d. of 205. The correlation coefficient *r* between the number of TyrP-positive sperm cells and plasma levels of E<sub>2</sub> was 0.549 ( $P \leq 0.05$ ), which indicates a high correlation between these two parameters (Fig. 8A). Also the correlation between the expression of the *Tff1* gene expressed as C<sub>q</sub> values and the number of TyrP-positive sperm were high ( $r = -0.881$ ,  $P \leq 0.001$ ) indicating a strong connection between these two parameters (Fig. 8B).

### **The TyrP of testicular epididymal sperm head proteins is not altered after in vivo exposure to E<sub>2</sub>**

To examine the potential effect of E<sub>2</sub> exposure on the capacitation status of testicular sperm, the TyrP of epididymal sperm head proteins was analysed (Fig. 9). In the control and both experimental groups, the percentage of TyrP-positive sperm heads was relatively low (about 1.5%) with no significant differences between



**Figure 4** Number of capacitated epididymal spermatozoa detected by CTC staining (time 0). Control group, pubertal E<sub>2</sub> and continuous E<sub>2</sub>. Bars denote arithmetical means of capacitated cells (%), whiskers denote S.E.M. and points denote individual measurements. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ .



**Figure 5** Western blot analysis of protein phosphorylation during *in vitro* capacitation detected by anti pY antibody. Control group (C), pubertal E<sub>2</sub> and continuous E<sub>2</sub>. The higher phosphorylation of proteins at the start of capacitation (bands around 68 and 45 kDa) in continuous E<sub>2</sub> is visible. The highest cumulative protein phosphorylation in subsequent capacitation intervals is visible.

control and experimental groups and also without any significant difference between the two experimental groups ( $P \geq 0.05$ ; Fig. 10). Owing to the fact that no significant differences among the groups were observed, the power analysis for the statistical test was performed and it was 0.227.

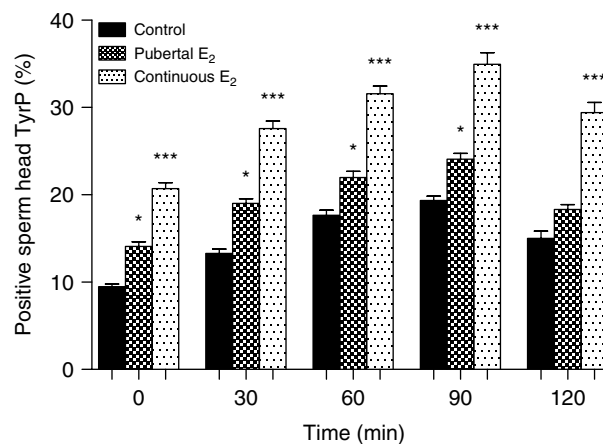
## Discussion

Estrogens play an important role in almost all sperm physiological processes from the production of sperm in the testes to fertilisation in the female oviduct. For the last decade, the effect of estrogens on specific physiological processes in sperm has largely been studied during *in vitro* experiments. In these experiments, natural and synthetic estrogens have shown a procapacitation concentration-dependent effect on epididymal (mouse; Sebkova *et al.* 2012) and ejaculated spermatozoa (boar; Ded *et al.* 2010). Exposure to estrogens during *in vitro* capacitation provides a good model for simulating the *in vivo* conditions in the female reproductive tract. On the other hand, sperm are exposed to estrogens and various compounds with estrogenic activity from the time of their production to their release into the testicular tubule. Owing to the fact that some of the sperm already express specific indicators of the capacitation status in the epididymis, it is important to know whether or not the sperm capacitation status can be altered during sperm storage in the cauda epididymis in response to the estrogen stimuli. This type of study required *in vivo* exposure to estrogens; therefore, the most common and well-studied E<sub>2</sub> was selected for this purpose. We have shown that molecular capacitation markers in sperm after *in vivo* exposure to E<sub>2</sub> are similar to those observed *in vitro*. Both TyrP and CTC pattern distribution were changed in a similar way after *in vitro* and *in vivo* exposure.

Contrary to previous *in vitro* experiments, during *in vivo* exposure, E<sub>2</sub> does not reach sperm cells directly,

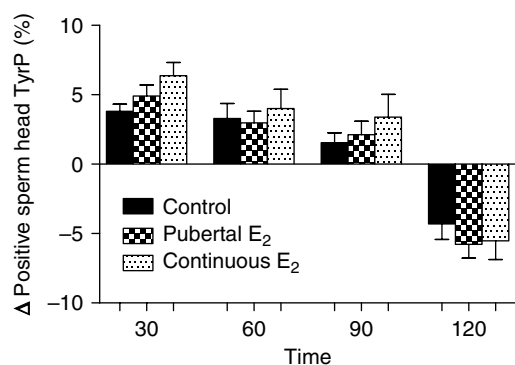
but it has to pass through multiple biological barriers before it is able to have a possible effect on epididymal sperm. The normal serum concentration of E<sub>2</sub> is at the range of 2–20 pg/ml (Snyder *et al.* 2009). There is also evidence that in the rete testis the concentration of estrogens is tenfold higher and related to the plasma levels (Free & Jaffe 1979). In our study, the extensiveness of the E<sub>2</sub> effect on the sperm physiological parameters positively correlates with the serum levels. We also measured the expression of the *Tff1* gene, the specific estrogen response gene in the testicular tissue. The correlation between the expression of this gene and physiological parameters of the spermatozoa was also positive and more significant compared with the plasma levels of E<sub>2</sub>. Therefore, the extensiveness of the molecular changes in epididymal sperm cells is largely dependent on the plasma and tissue levels of E<sub>2</sub>. After exposure the phosphorylation status and CTC patterns relating to calcium homeostasis then returned to levels more similar to the control ones, which may show that the effect can be reversible if the exposure is terminated. Despite this process, there are still differences between the control and experimental pubertal E<sub>2</sub> groups in the number of cells with capacitated patterns. This situation may be related to the fact that although there are no differences in the plasma concentration of estrogens the concentration in the reproductive tract could be still higher. The higher expression of *Tff1* gene in pubertal E<sub>2</sub> supports this hypothesis. On the other hand, the molecular changes initiated by estrogens on the level of spermatogenesis and propagated into the subsequent developmental changes of the sperm cannot be excluded, as the gene expression pattern is altered weeks after the exposure and could be propagated by epigenetic mechanisms to subsequent generations.

During *in vivo* exposure the estrogens can also influence the future sperm capacitation ability during



**Figure 6** Number of capacitated spermatozoa after 0, 30, 60, 90 and 120 min of *in vitro* capacitation. Capacitation progress was measured by anti pY antibody (Fig. 1). \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ .





**Figure 7** Differences ( $\Delta$ ) in the number of capacitated spermatozoa detected by anti pY antibody between two subsequent capacitation times (30–0, 60–30, 90–60, 120–90) in individual control and experimental groups.

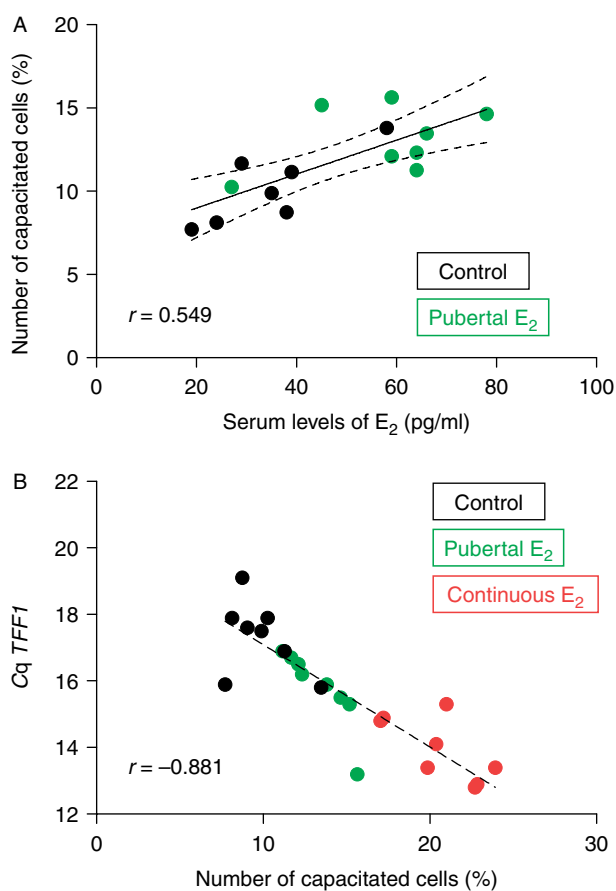
spermatogenesis and sperm storage. Therefore, the analysis of the capacitation status of testicular sperm has been performed in the current study. During this analysis, there were no significant differences in the number of TyrP-positive testicular spermatozoa among the control and experimental groups. Based on the results of a previous *in vitro* study (Sebkova *et al.* 2012), it can be assumed that with an elevated *in vivo* estrogen exposure, capacitation may start in the epididymal spermatozoa. On the other hand, it has been reported that estrogens trigger multiple phosphorylation pathways in the testicular tissue or can change their cell sensitivity (Miyaso *et al.* 2012). For this reason it is possible to consider that potential molecular changes in testicular sperm, and individual sperm developmental stages can lead to a higher number of capacitated sperm observed in the epididymis. As shown in this study the sensitivity (statistical power) of testicular sperm head TyrP analysis was lower compared with the epididymal one and therefore the potential differences in this parameter in testicular tissue cannot be fully excluded.

The premature molecular changes related to the capacitation process may lead to many consequences after ejaculation and physiological capacitation in the female reproductive tract. The precise timing of individual molecular processes during the capacitation is an absolute prerequisite for successful fertilisation. From the population of millions of sperm there are only tens or hundreds reaching the egg and only one can successfully fertilise it. Already at the start of capacitation, sperm cells are unequal concerning their morphology and ability to reach, penetrate and fertilise the egg. It has been recently shown that higher TyrP can lead to a decreased ability of sperm to undergo AR in the presence of calcium-ionophore (Sebkova *et al.* 2012). The hyperphosphorylation of sperm proteins may therefore lead to the inability of sperm to undergo AR.

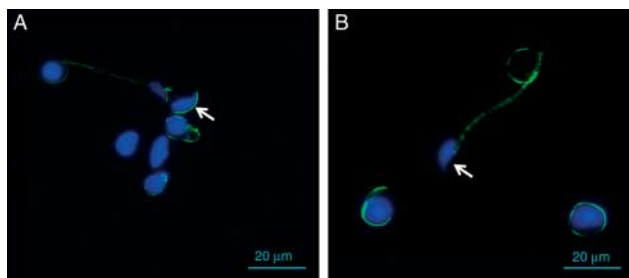
On the other hand, calcium changes detected by the CTC method are prerequisite for physiological AR and egg fertilisation. In general, considering a wide range of

mammalian species, including humans, the premature calcium influx induced by estrogens may lead to premature AR without the presence of zona pellucida factors. Together, with the hyperphosphorylation of sperm proteins the percentage of spermatozoa with an ideal physiological status relating to their ability to reach and fertilise the egg strongly decreases.

The population of epididymal spermatozoa is different concerning its maturation and ‘capacitation’ status. This diversity seems to be a good criterion for successful fertilisation, due to the high number of spermatozoa, as it is usual in each sperm population that there is a subpopulation of spermatozoa with ideal molecular characteristics to fertilise the egg. Estrogens and other



**Figure 8** (A) The correlation between the number of capacitated epididymal sperm (time 0 of the capacitation) detected by anti pY antibody and E<sub>2</sub> plasma levels detected by RIA in pubertal E<sub>2</sub> and control groups. Each data point represents the measurement of both parameters from one animal. Individual groups are labelled with different colours. The highly different continuous E<sub>2</sub> group was excluded from this analysis. The straight line indicates the Pearson coefficient ( $r$ ), the dotted lines indicate (95%) confidence intervals. (B) The correlation between the number of capacitated epididymal spermatozoa (time 0 of the capacitation) detected by anti pY antibody and the expression of the estrogen-dependent *Tff1* gene. The expression of the *Tff1* gene is expressed as the normalised C<sub>q</sub> values. Each data point represents the measurement of both parameters from one animal. Individual groups are labelled with different colours. The dotted line indicates the Pearson coefficient ( $r$ ).



**Figure 9** Immunofluorescent detection of TyrP in testicular sperm head. (A) Positive testicular sperm head (indicated by an arrow), (B) negative testicular sperm head. Scale bar 20 µm.

compounds with estrogenic activity can affect the balance of the capacitation status directly in the epididymis and through this activity they may decrease the fertilising potential of spermatozoa. After terminating the E<sub>2</sub> exposure, the situation more or less went back to normal, which was close to the status of the control group; therefore, this effect seems to be reversible. Based on our data, it is also clear that *in vivo* E<sub>2</sub> exposure influences the proportion of spermatozoa with the specific molecular characteristics relating to only the beginning of the capacitation. During the subsequent *in vitro* capacitation, the differences between the control and experimental groups remained the same as observed at the beginning. It implies that the sperm population, of the exposed animals reaching the egg could have a significantly altered capacitation status and a lower fertilising potential compared with the control ones.

The premature sperm capacitation in the cauda epididymis may be one of the factors bringing a negative effect of the endocrine-disrupting chemicals on the male reproductive functions. It has been recently shown that not only natural but also artificial estrogens significantly affect the sperm capacitation process (Sebkova *et al.* 2012). Although 17 $\alpha$ -ethynylestradiol only seems to act at higher concentrations ( $\geq 2$  ng/ml), the combination of all substances with potential or confirmed estrogenic activity can further misbalance the physiology of epididymal spermatozoa. Furthermore some artificial compounds with estrogenic activity have a significant effect on sperm physiology at lower doses compared with the strongest natural estrogen such as E<sub>2</sub> (Fraser *et al.* 2006, Sebkova *et al.* 2012).

In conclusion, our data imply that *in vivo* exposure to E<sub>2</sub> leads to premature 'capacitation' of mouse sperm in the cauda epididymis with a further potential negative impact on sperm reproductive fitness in the female reproductive tract. This effect is caused mainly by the hyperphosphorylation of sperm proteins and a/the premature calcium influx. These processes lead to a decreased ability of sperm to undergo an AR. Based on this evidence, *in vivo* exposure to E<sub>2</sub> can lead to a decrease of the fertilising potential in male mice with significant relevance to endocrine-disrupting compounds with estrogenic activity.

## Materials and Methods

### Animals and E<sub>2</sub> exposure protocol

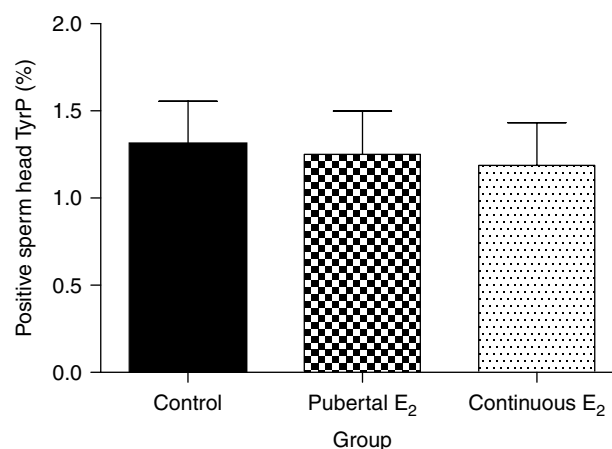
Inbred mice (Anlab, Prague, Czech Republic) were housed in an animal facility (Institute of Molecular Genetics, ASCR, v. v. i.). Estrogen-free food and water were supplied *ad libitum*. The total number of animals in the experiment was 24 in each group, sperm from both epididymides ( $n=16$ ) of eight animals were analysed ( $n=8$ ). Male mice were exposed to E<sub>2</sub> (Sigma) at a 20 ng/ml concentration either during puberty from age (Pubertal E<sub>2</sub>) or continuously from birth to 12 weeks of age (Continuous E<sub>2</sub>). The control group of mice was not exposed to E<sub>2</sub>. At the age of 12 weeks, the animals from all groups were killed by cervical dislocation. All animal procedures were carried out in strict accordance with the Animal Scientific Procedure, Art 2010, and approved by the Local Ethics Committee (approval number 151/2009).

### Sperm preparation and capacitation

Mouse sperm cells were released from the distal regions of cauda epididymis into M2 fertilising medium (Sigma) under paraffin oil at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Sperm viability and motility were checked (under a light microscope). Sperm stock was diluted to the required concentration ( $5 \times 10^6$ /ml) into M2 medium under paraffin oil. Sperm samples were collected at 0, 30, 60, 90 and 120 min of capacitation *in vitro*. The time marked as 0 was the minimum time required for sperm to be added to the capacitated medium, removed from the medium and washed. This manipulation did not exceed 1 min. These samples served as a negative control. Sperm motility and viability were controlled at every experimental time point.

### Immunofluorescent detection of TyrP

Samples of sperm cells were spread on microscope slides. After air-drying, sperm were fixed with 3.7% formaldehyde in PBS (pH 7.34) at room temperature for 10 min, followed by washing in PBS, incubated with 15 mM ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl)



**Figure 10** Number of TyrP-positive testicular sperm heads (%) among individual groups. Bars denote the arithmetical mean, whiskers denote S.E.M.

for 5 min, and with 0.1% Triton X-100 for 3 min. Slides were washed with PBS which was followed by immunofluorescent staining. Sperm were blocked with 10% BSA in PBS for 1 h and incubated with primary MAB anti-phosphotyrosine P-Tyr-01 (Exbio, Prague, Czech Republic) diluted 1:500 in 1% BSA in PBS over night at 4 °C, followed by Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG (Molecular Probes, Prague, Czech Republic) secondary antibody 1:1000 in PBS for 1 h. Slides were mounted in Vectashield mounting medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Slides were examined with an epifluorescent microscope. For every experiment, we collected sperm data from eight mice. The positive or negative signal was evaluated from a total of 200 spermatozoa on every slide. In each group, at least two samples were analysed. Data were analysed statistically.

### CTC fluorescent assay

Spermatozoa were resuspended in PBS and mixed with an equal volume (45/45 µl) of CTC solution (750 mmol/l CTC in 130 mmol/l NaCl, 5 mmol/l cysteine, 20 mmol/l Tris-HCl, pH 7.8) and incubated for 30 min. Cells were then fixed with 8 µl of 12.5% paraformaldehyde in 0.5 mol/l Tris-HCl (pH 7.4). After incubation, sperm suspension was smeared onto a glass slide and covered with a cover slip. To avoid evaporation and CTC fading, slides were kept in a wet chamber until evaluation. Samples were examined with a Nikon Labothot-2 fluorescent microscope equipped with a 40× Nikon Plan 40/0.65 and photographed with a COHU 4910 CCD camera (COHU Inc. Electronics Division, San Diego, USA) with LUCIA imaging software (Laboratory Imaging Ltd., Prague, Czech Republic).

### SDS-PAGE with immunoblotting

SDS electrophoresis and immunoblotting technique was used for the TyrP assessment and was carried out using protocols based on standard methods (Laemmli 1970, Zigo *et al.* 2011). Suspension of non-capacitated sperm from a sperm stock released from cauda epididymis was used. Sperm samples were collected at 0, 30, 60, 90 and 120 min of capacitation *in vitro*, diluted with PBS and a final concentration of 10<sup>6</sup> sperm cells was ascertained using a Bürker chamber. Sperm pellets were resuspended in an equal volume of SDS-PAGE non-reduced sample buffer and heated at 97 °C for 3 min. Samples containing protein equivalent to 10<sup>6</sup> capacitated sperm cells were run on a 5% stacking and 10% running SDS polyacrylamide gel using Precision Plus Protein All Blue standards (Bio-Rad) as molecular weight markers. After transferring proteins onto a nitrocellulose membrane, non-specific sites were blocked with PBS blocking solution (5% skimmed milk and 0.05% Tween 20). Proteins phosphorylated on tyrosine residues were identified by the primary MAB anti-phosphotyrosine P-Tyr-01 (Exbio) diluted 1:500, followed by a peroxidase goat anti-mouse IgG secondary antibody (Sigma-Aldrich) diluted 1:20 000. Protein staining was visualised by chemiluminescence Super Signal West Dura (Thermo Scientific, Prague, Czech Republic). These experiments were performed at least three times with similar results. Representative results are shown.

Gel densitometry was performed with an Aida image analyser 4.18 (Raytest GmbH, Sprockhövel, Germany) and the relative intensity of individual signals was determined.

### Quantitative RT-PCR (RTqPCR) of *Tff1* gene

The analysis was performed according to the protocol from our previous study (Zatecka *et al.* 2013). The total RNA from one testis per animal was extracted by a Tri-Reagent Kit (Sigma) according to the manufacturer's instructions. Isolated RNA was stored at -70 °C. The RNA quality and purity was measured on a spectrophotometer Helios A (Thermo Electron Corporation, Marietta, OH, USA). For the synthesis of cDNA, 5 µg purified RNA was used. Each sample was treated with 1 µl DNase I (Invitrogen), 1 µl DNase I reaction buffer (Fermentas, Burlington, ON, Canada) and H<sub>2</sub>O to reach a volume of 10 µl. This mixture was incubated for 30 min at 37 °C in a Touchgene Gradient Thermal Cycler (Techne, Burlington, NJ, USA). After incubation 1 µl EDTA (Fermentas) was added and followed by incubation at 65 °C for 10 min. Then 30 µl reaction mixture (8 µl reaction buffer for M-MuLV reverse transcriptase (Fermentas), 5 µl 10 mM 4dNTP (Fermentas), 0.3 µl RiboLock inhibitor (Fermentas), 1 µl oligo (dT)+ random primers (Promega) and 15.2 µl H<sub>2</sub>O) were added to the samples. The mixture was incubated for 60 min at 42 °C followed by 10 min at 70 °C and at the end was maintained at 4 °C. Obtained cDNA was stored at -20 °C. For RT-qPCR - 5× diluted cDNA was used. The qPCR primer pair 5'-TGTCCGGGATTCCCGTGGT-3' (forward) and 5'-CCAGTGCCCAGGTGGAGGGT-3' (reverse) specific for the mouse *Tff1* gene was used for RT-qPCR. The product length was 131 bp. For each reaction, 2 µl 5× diluted cDNA, 10 µl SYBR Green Master Mix (Fermentas), 0.5 µl primer and 7 µl H<sub>2</sub>O were used. All reactions were performed in duplicates in a PCR cycler (Eppendorf, Prague, Czech Republic). The relative amount of mRNA in each sample was calculated from the measured quantification cycle (C<sub>q</sub>) values. The expression of the reference gene for ribosomal 18S was used to normalise the measured values. The qPCR primer pair 5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3' (forward) and 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3' (reverse) with the product length 151 bp was used.

### Measurement of the E<sub>2</sub> serum levels

Whole blood from mice was left for 60 min at room temperature. After incubation, the blood samples were centrifuged at 1200 g for 15 min. Serum levels of E<sub>2</sub> were analyzed using a RIA kit (Immunorad Beckman, Prague, Czech Republic). The detection limit was <2 pg/ml and the cross reactivity of antiserum with other serum estrogens was lower than 1%.

### Preparation and analysis of testicular suspensions

Testes were placed into a glass homogeniser with 2 ml PBS and homogenised manually to obtain single-cell testicular suspension. After the homogenisation procedure the suspension was filtrated by a Cell Strainer 70 µm (BD Bioscience, Prague, Czech Republic) to remove residues of tough tissue. After



filtration, single-cell testicular suspension was centrifuged (300 g), resuspended in 1 ml 4% formaldehyde in PBS (pH 7.0) and the cells were fixed at RT for 60 min. After fixation, the suspension was centrifuged at 300 g for 5 min, resuspended in 96% ethanol and refrigerated at  $-20^{\circ}\text{C}$  until the time of analysis. Samples of testicular suspensions were resuspended and washed  $2\times$  in PBS and spread on microscope slides. After this procedure, the protocol was the same as for the immunofluorescent detection of TyrP on epididymal sperm, but only 100 cells per slide were counted.

### Statistical analysis

Experimental data were analysed using STATISTICA 6.0 (Statsoft, Prague, Czech Republic) and GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). The differences between the control and experimental groups in the number of the capacitated cells (TyrP positive sperm heads and CTC pattern B, Figs 2, 4, 6 and 7) were analysed by KW-ANOVA, and *post hoc* analysis was performed by Dunn's comparisons: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . The calculated Pearson coefficients ( $r$ ) were tested for their significance ( $P \leq 0.05$ , Figs 8 and 9). The statistical power of the testicular sperm analysis was performed by STATISTICA 6.0 power module and was calculated for the ANOVA test.

### Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

### Funding

This study was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (grant numbers 523/09/1793 and P 503/12/1834), Grant Agency of Charles University (grant number 151-43-253149) and partly by the Institutional Research Support No. SVV-2013-267 201 and AVOZ 50520701.

### Acknowledgements

The authors thank Timothy Paul Hort for English corrections.

### References

- Adeoya-Osiguwa SA, Markoulaki S, Pocock V, Milligan SR & Fraser LR 2003  $17\beta$ -Estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function. *Human Reproduction* **18** 100–107. (doi:10.1093/humrep/deg037)
- Akingbemi BT 2005 Estrogen regulation of testicular function. *Reproductive Biology and Endocrinology* **3** 51. (doi:10.1186/1477-7827-3-51)
- Akingbemi BT & Hardy MP 2001 Oestrogenic and antiandrogenic chemicals in the environment: effects on male reproductive health. *Annals of Medicine* **33** 391–403. (doi:10.3109/07853890108995952)
- Baldi E, Luconi M, Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L & Forti G 2009 Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: facts and fictions. *Molecular and Cellular Endocrinology* **308** 39–46. (doi:10.1016/j.mce.2009.02.006)
- Carreau S, Bouraima-Lelong H & Delalande C 2011 Estrogens – new players in spermatogenesis. *Reproductive Biology* **11** 174–193. (doi:10.1016/S1642-431X(12)60065-5)
- Carreau S, Bouraima-Lelong H & Delalande C 2012 Estrogen, a female hormone involved in spermatogenesis. *Advances in Medical Sciences* **57** 31–36. (doi:10.2478/v10039-012-0005-y)
- Ded L, Dostalova P, Dorosh A, Dvorakova-Hortova K & Peknicova J 2010 Effect of estrogens on boar sperm capacitation *in vitro*. *Reproductive Biology and Endocrinology* **8** 87. (doi:10.1186/1477-7827-8-87)
- Dorosh A, Ded L, Elzeinova F & Peknicova J 2011 Assessing oestrogenic effects of brominated flame retardants hexabromocyclododecane and tetrabromobisphenol A on MCF-7 cells. *Folia Biologica* **57** 35–39.
- Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P & Mark M 2000 Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and  $\beta$  (ER $\beta$ ) on mouse reproductive phenotypes. *Development* **127** 4277–4291.
- Elzeinova F, Novakova V, Buckiova D, Kubatova A & Peknicova J 2008 Effect of low dose of vinclozolin on reproductive tract development and sperm parameters in CD1 outbred mice. *Reproductive Toxicology* **26** 231–238. (doi:10.1016/j.reprotox.2008.09.007)
- Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR Jr & Bland KI 2002 Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Molecular Endocrinology* **16** 70–84. (doi:10.1210/me.16.1.70)
- Fraser LR, Beyret E, Milligan SR & Adeoya-Osiguwa SA 2006 Effects of estrogenic xenobiotics on human and mouse spermatozoa. *Human Reproduction* **21** 1184–1193. (doi:10.1093/humrep/dei486)
- Free MJ & Jaffe RA 1979 Collection of rete testis fluid from rats without previous efferent duct ligation. *Biology of Reproduction* **20** 269–278. (doi:10.1095/biolreprod20.2.269)
- Hess RA, Bunick D & Bahr JM 1995 Sperm, a source of estrogen. *Environmental Health Perspectives* **103** 59–62.
- Kalab P, Peknicova J, Geussova G & Moos J 1998 Regulation of protein tyrosine phosphorylation in boar sperm through a cAMP-dependent pathway. *Molecular Reproduction and Development* **51** 304–314. (doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199811)51:3 <304::AID-MRD10 >3.0.CO;2-2)
- Kim J, Petz LN, Ziegler YS, Wood JR, Potthoff SJ & Nardulli AM 2000 Regulation of the estrogen-responsive p52 gene in MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **74** 157–168. (doi:10.1016/S0960-0760(00)00119-9)
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B & Gustafsson JA 1998 Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor B. *Endocrinology* **139** 4252–4263. (doi:10.1210/en.139.10.4252)
- Kyselova V, Peknicova J, Buckiova D & Boubelik M 2003 Effect of *p*-nonylphenol and resveratrol on *in vivo* fertility and different body parameters in outbred mice CD1. *Reproductive Biology and Endocrinology* **1** 30. (doi:10.1186/1477-7827-1-30)
- Kyselova V, Peknicova J, Boubelik M & Buckiova D 2004 Body and organ weight, sperm acrosomal status and reproduction after genistein and diethylstilbestrol treatment of CD1 mice in a multigenerational study. *Theriogenology* **61** 1307–1325. (doi:10.1016/j.theriogenology.2003.07.017)
- Laemmli UK 1970 Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** 680–685. (doi:10.1038/227680a0)
- Luconi M, Muratori M, Forti G & Baldi E 1999 Identification and characterization of a novel functional estrogen receptor on human sperm membrane that interferes with progesterone effects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **84** 1670–1678. (doi:10.1210/jc.84.5.1670)
- Mathur PP & D'Cruz SC 2011 The effect of environmental contaminants on testicular function. *Asian Journal of Andrology* **13** 585–591. (doi:10.1038/aja.2011.40)
- Miyaso H, Nakamura N, Matsuno Y, Kawashiro Y, Komiyama M & Mori C 2012 Postnatal exposure to low-dose decabromodiphenyl ether adversely affects mouse testes by increasing tyrosine phosphorylation level of cortactin. *Journal of Toxicological Sciences* **37** 987–999. (doi:10.2131/jts.37.987)



- Park JW, Lee JC, Ha SW, Bang SY, Park EK, Yi SA, Lee MG, Kim DS, Nam KH, Yoo JH *et al.* 2012 Requirement of protein L-isoaspartyl O-methyltransferase for transcriptional activation of trefoil factor 1 (TFF1) gene by estrogen receptor  $\alpha$ . *Biochemical and Biophysical Research Communications* **420** 223–229. (doi:10.1016/j.bbrc.2012.02.072)
- Peknicová J, Kyselova V, Buckiova D & Boubelik M 2002 Effect of endocrine disruptor on mammalian fertility. Application of monoclonal antibodies against sperm proteins as markers for testing sperm damage. *American Journal of Reproductive Immunology* **47** 311–318. (doi:10.1034/j.1600-0897.2002.01112.x)
- Sebkova N, Cerna M, Ded L, Peknicova J & Dvorakova-Hortova K 2012 The slower the better: how sperm capacitation and acrosome reaction is modified in the presence of estrogens. *Reproduction* **143** 297–307. (doi:10.1530/REP-11-0326)
- Shaikh AA 1971 Estron and estradiol levels in the ovarian venous blood from rats during the estrous cycle and pregnancy. *Biology of Reproduction* **5** 297–307.
- Snyder EM, Small CL, Li Y & Griswold MD 2009 Regulation of gene expression by estrogen and testosterone in the proximal mouse reproductive tract. *Biology of Reproduction* **81** 707–716. (doi:10.1095/biolreprod.109.079053)
- Sohoni P & Sumpter JP 1998 Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *Journal of Endocrinology* **158** 327–339. (doi:10.1677/joe.0.1580327)
- Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P & Kopf GS 1995a Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* **121** 1129–1137.
- Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, Olds-Clarke P & Kopf GS 1995b Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* **121** 1139–1150.
- Yanagimachi R 1994 Mammalian fertilization. In *The Physiology of Reproduction*, 1st edn, pp 189–317. Eds E Knobil & JD Neill. New York: Raven Press.
- Zatecka E, Ded L, Elzeinova F, Kubatova A, Dorosh A, Margaryan H, Dostalova P & Peknicova J 2013 Effect of tetrabromobisphenol A on induction of apoptosis in the testes and changes in expression of selected testicular genes in CD1 mice. *Reproductive Toxicology* **35** 32–39. (doi:10.1016/j.reprotox.2012.05.095)
- Zigo M, Jonáková V & Maňásková-Postlerová P 2011 Electrophoretic and zymographic characterization of proteins isolated by various extraction methods from ejaculated and capacitated boar sperms. *Electrophoresis* **32** 1309–1318. (doi:10.1002/elps.201000558)

---

Received 22 November 2012

First decision 19 December 2012

Accepted 14 January 2013