

**Karlova Univerzita
Charles University**

**Přírodovědecká fakulta
Faculty of Science**

Vývojová a buněčná biologie
Developmental and cell biology



Mgr. Martina Černá

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

**Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. thesis**

Školitel/Supervisor: Doc. Mgr. Pavel Stopka, Ph.D.
Konzultant/Supervisor-consultant: Mgr. Romana Stopková, Ph.D.

Praha 2017

Doktorské studijní programy v biomedicíně

*Univerzita Karlova
a Akademie věd České republiky*

Program: Vývojová a buněčná biologie

Předseda oborové rady: Doc. RNDr. Folk Petr, CSc.

Školící pracoviště: BIOCEV, Biotechnologické a biomedicínské centrum
Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci

Autor: Mgr. Martina Černá

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

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

Obsah

1. Úvod.....	5
1.1 Chemické signály	5
1.2 Procesy spojené s reprodukcí	7
2. Přílohy	9
1. Introduction	25
1.1 Chemical signals.....	25
1.2 Reproductive processes	27
Methods	39
List of publications	40
Curriculum vitae.....	41

ABSTRAKT

Cílem mé disertační práce bylo identifikovat proteiny účastnící se chemické komunikace, a především pak ty, které jsou důležité pro sexuální signalizaci. Těnkavé 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 lipokalinu, 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 kapacitace.

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.

1. Úvod

1.1 Chemické signály

Chemická komunikace je zprostředkována především chemickými signály, jež jsou přítomny v tělních tekutinách jako je moč, slzy, sliny a vaginální tekutina. Nositelé chemických informací mohou být látky s různou chemickou strukturou, jednoduché i složitější. 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 a následně vedou ke změnám hormonálních hladin, imunologickým či behaviorálním projevům příjemce a často mají pohlavně specifický efekt. Chemické signály jsou často těžké hydrofobní molekuly a jejich přenášení, ať už směrem z těla ven, či směrem k olfaktorickým receptorům, je usnadňováno specifickými bílkovinami z rodiny lipokalinů.

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 konformaci těchto proteinů – kalich/barel (odtud název lipokalinů - „lipos“ = tuk a „calyx“ = kalich). Lipokaliny se účastní celé škály biologických procesů, kromě přenášení chemických signálů při chemické komunikaci, se účastní také syntézy prostaglandinů (Fujitani et al. 2002), regenerace a vývoji tkání (Kim et al. 2005; Ganfornina et al. 2010; Petta et al. 2011; Spreyer et al. 1990; Playford et al. 2006), imunitních reakcí organismu (Fujitani et al. 2002; Urade et al. 2013) či procesů spojených s reprodukcí (Stewart et al. 2000). Nejčastější cestou, kudy se dostávají chemické signály z těla jedince, jsou různé tělní tekutiny, např. vaginální sekret (Singer & Macrides 1993), moč (Stopková et al. 2007), slzy (Stopkova et al. 2017) nebo sliny (Stopka et al. 2016).

U savců je známo asi 15 skupin lipokalinů, z nichž některé obsahují větší množství paralogů. U myší 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).

Odorant vázající proteiny (OBP)

Exprese *Obp* u myší 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* (*Obp1*, *Obp5*, *Obp6*, *Obp7*) v osmi různých tkáních (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 myší (*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 tohoto genu 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 vycytávání přebytečných ligandů či odstraňování toxických substancí (Grolli et al. 2006; Boudjelal et al. 1996; Pelosi 1994), které by mohly poškodit sliznici. To by vysvětlovalo přítomnost těchto proteinů i v dalších sekretech jako jsou slzy a sliny, kde není potřeba aktivovat receptory, ale spíše udržovat povrch sliznice a odnášet případné nadbytečné látky.

Fylogeneticky jsou OBP nejbližší spojeny s další skupinou lipokalinů, a to s MUP, u kterých je známo, že mohou vázat a vynášet z těla různé chemické signály účastníci se pohlavního výběru u myši. Vzhledem k tomu, že terciární struktura a velikost barelu je u OBP a MUP velmi podobná, je pravděpodobné, že by se mohla i tato méně probádaná skupina lipokalinů (OBP) účastnit chemické komunikace.

Hlavní močové proteiny (MUP)

MUP tvoří u myši rozsáhlou skupinu genů na chromosomu 4 skládající se z 21 funkčních genů a stejného počtu pseudogenů. MUP lze rozdělit do dvou skupin, tzv. A skupinu (ancestrální), kterou tvoří 6 genů, zbylých 15 genů pak tvoří skupinu B, která je charakteristická vysokou sekvenční podobností (až 99%). Větší množství MUP nacházíme už jen u potkana (asi 8 genů - u potkana jsou pod názvem α -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.

Další funkce lipokalinů

Některé písemné práce předpokládají, že primární funkcí lipokalinů je vázat a transportovat různé těkavé organické sloučeniny (angl. volatile organic compounds, VOCs) vzniklé během metabolických dějů, které 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 jsou vynášena močí z těla ven právě ve spojení s MUP (Larsen et al. 1990; Robertson et al. 1998; Hakk et al. 2009; Staskal et al. 2005).

U jednoho ze zástupců lipokalinů bylo potvrzeno, že plní dokonce funkci antibakteriální ochrany. Jedná se o Lipocalin 2 (LCN2, NGAL, 24P3), známý také jako siderocalin. Ten má schopnost vázat bakteriální siderofory s navázaným železem, čímž znemožňuje bakteriím železo využívat a inhibuje tak jejich růst (Goetz

et al. 2002; Fischbach et al. 2006; Smith 2009; Hentze et al. 2005; Sutak et al. 2008). Uvažuje se, že i některé ostatní lipokaliny by mohly mít tuto schopnost, např. LCN1 a LCN12 (Strong et al. 2005), nicméně nebylo to zatím potvrzeno. V práci z roku 2007 (Petraček et al.) byla prokázána zvýšená exprese *Mup* u myší, které byly předávkovány železem. Je možné, že i tyto lipokaliny mohou mít podobnou schopnost vázat ionty kovů (Fe, Cu) a do určité míry mít antibakteriální a detoxifikační funkci v organismu.

1.2 Procesy spojené s reprodukcí

Estrální cyklus

Estrální cyklus označuje periodické a fyziologické změny v těle samic placentálních savců. Tyto změny jsou navozeny působením pohlavních hormonů a slouží k zajištění reprodukce. Dle zkušeností je možné vlivem různých pachů (feromonů) průběh estrálního cyklu ovlivňovat a to zejména délku estru, kdy je samice receptivní (Stopka & Macdonald 1998).

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

Jelikož je většina prací týkajících se chemické komunikace u myší je zaměřena především na chemické signální látky v moči, bylo cílem této práce určit přítomnost a přiblížit možnou funkci lipokalinů ve spojitosti s imunitním systémem ve slinách a vaginálním sekretu divoké myši domácí (*Mus musculus musculus*).

Molekulární změny uvnitř spermie a vliv estrogenních hormonů

Ejakulované spermie nejsou schopny okamžitého oplození, jelikož musí projít procesem kapacitace a posléze akrosomální reakcí. Oba tyto děje probíhají uvnitř samičího reprodukčního traktu, kde na ně působí estrogenní hormony a uvedené procesy ovlivňují. Tyto pochody jsou regulovány zejména postranlačnými úpravami proteinů na tyrosinu. Spermie jakožto terminálně diferencovaná buňka postrádá transkripční a translační aktivitu a tyrosinová fosforylace (TyrP) proteinů pro ni tak představuje důležitý způsob regulace probíhajících molekulárních změn během kapacitace, hyperaktivní motility či akrosomální reakce (Visconti et al. 1995a). K TyrP dochází jak v cytosolu, na povrchu hlavičky spermie, tak v bičíku. Tyrosinkinázy jsou lokalizované volně v cytosolu, jádře či vázané k cytosolové straně plasmatické membrány (Fisher et al. 1998). Proces kapacitace a AR spermie je regulován několika vzájemně propojenými signálními drahami. Byla dokázána souvislost mezi TyrP a schopností spermie oplodnit vajíčko (Ecroyd et al. 2003; Asquith et al. 2004).

Estrogeny jsou klíčové během reprodukčních procesů samců jako je spermatogeneze (Carreau & Hess 2010) či maturace spermií při které probíhá kapacitace (Baldi et al. 2009).

Koncentrace estrogenů se mezi samcem a samicí kvantitativně liší a je druhově specifická. Estrogeny regulují buněčnou funkci pomocí estrogenních receptorů, ER α a

ER β (Lubahn et al. 1993). Estrogenní hormony mohou aktivovat odlišné signální dráhy a některé z nich nemusí být přímo závislé na estrogenních receptorech. Některé odpovědi na estrogény mohou iniciovat mnoho rychlých negenomových signalizačních aktivit. Modely rychlé odpovědi jsou zprostředkovány klasickými ER vázanými v plazmatické membráně nebo také estrogen vázajícími receptory spojenými s G proteiny (GPR30), které také spouští rychlou intracelulární odezvu.

V přírodním prostředí dochází neustále ke zvyšování množství látek, které vykazují estrogenní účinky a mají tak negativní dopad na samčí i samičí reprodukční parametry (Ded et al. 2010; Gray et al. 1999). Mezi tyto látky patří jak přirozeně se vyskytující (genistein, zearalenon, 17 β -estradiol), tak některé synteticky vyrobené (bisfenol A, diethylstilbestrol). Svou estrogenní aktivitou pak ovlivňují fyziologické pochody jedince a zejména jeho reprodukční schopnosti (Colborn et al. 1993; Akingbemi 2005).

Změny probíhající ve spermii vedoucí k přípravě na oplození nejsou dosud zcela známy. Současně není jasné do jaké míry a v jakých koncentracích mohou estrogenní hormony ovlivnit fertilizační schopnosti spermií. A proto bylo cílem této práce objasnit působení vybraných estrogenních hormonů na molekulární procesy uvnitř spermií, které předchází úspěšnému oplození.

2. Přílohy

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)

Cíle práce

1. Identifikace slinného proteomu u divoké myši domácí (*Mus musculus musculus*) se zaměřením na proteiny účastníci se chemické komunikace pomocí metody nLC-MS².
2. Zhodnocení celkové míry pohlavního dimorfismu slinného proteomu.

Výsledky

1. Celkově jsme u 11 zvířat identifikovali ve slinách 633 proteinů. Mezi nejvíce exprimované geny ve slinách myši 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 132 (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. Exprese 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. Všichni zástupci sekretoglobulinů, které jsme identifikovali jako pohlavně dimorfní (7 ze 13 identifikovaných: SCGB1B20, SCGB1B3, SCGB2A2, SCGB2B20, SCGB2B24, SCGB2B3, SCGB2B7), byli vždy exprimováni více samci. 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.

Diskuze

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; Roberts et al. 2012). MUP20 může být i indikátorem zdravotního stavu zvířete (Hurst 2009; Hoffmann et al. 2012). 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 samicí 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 nálezu MUP8 je zapotřebí blíže specifikovat místo translace a transkripce tohoto proteinu.

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

Cíle práce

1. Charakterizovat proteiny obsažené ve vaginálním sekretu divokých myši *Mus musculus musculus* během estrálního cyklu pomocí metody nLC-MS².
2. Detekovat potenciální signální transportéry ve vaginálním sekretu.

Výsledky práce

1. V celkovém vaginálním proteomu, devíti samic ve třech stádiích estrálního cyklu, 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 sedmáct více exprimováno v estru než v proestu 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, HrnR), 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 člen 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 epiteliálních 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 epiteliálních 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, jejichž hladiny se významně zvýšily ve fázi metestru a mohou tak být považovány za markery tohoto stádia (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 zástupce 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. Přestože jsme neidentifikovali KLK5 a 7, jejich inhibitor SPINK5, byl přítomen. Exprese SPINK5 klesala v estrální fázi.

2. Dalším cílem bylo určit, zda se ve vaginálním sekretu vyskytují proteiny, které by mohly sloužit jako transportéry pro těkavé organické látky (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 varianty – 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.

Mimo OBP a MUP jsme našli další členy lipokalinů a to Lipocalin 11 (LCN11) a Siderocalin (LCN2). Celkově byla exprese LCN11 nižší než u MUP, ale průběh nárůstu hladin byl stejný, tj. 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 (Retinol-binding protein 1, RBP1), který jsme detekovali a jeho exprese byla v kontrastu s ostatními lipokaliny, dosahovala nejnižších hodnot během estru a zvýšení v metestru a proestru.

Diskuze

Vaginální tekutina představuje důležitý zdroj informací, o tom v jakém stádiu se samice zrovna nachází. Tuto tekutinu jsme odebírali pomocí neinvazivní metody a s pomocí nejmodernějších proteomických technik analyzovali. 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.

LCN2 neboli NGAL (angl. neutrophil gelatinase-associated lipocalin) 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.

Expresе 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.

Závěry příloh I. a II.

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

Příloha III.

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

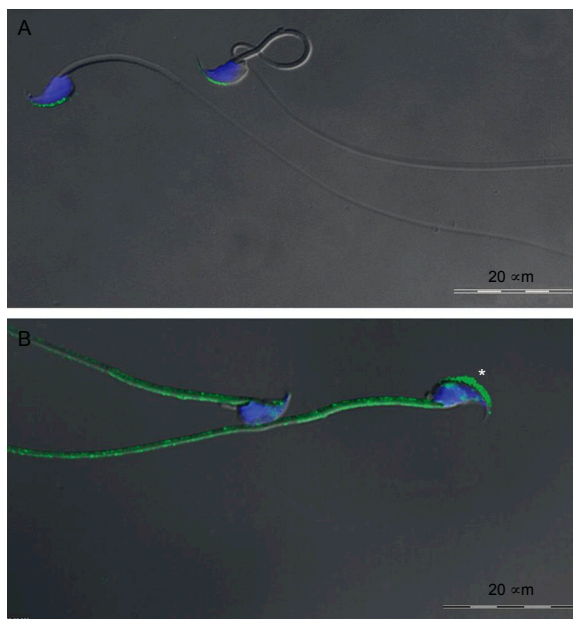
Sebkova N., Cerna M., Ded L., Peknicova J., Dvorakova-Hortova K. (2011), *Reproduction*, **143**: 1-11. doi: 10.1530/REP-11-0326 (IF = 3,1; 2016)

Cíle práce

1. Určit lokalizaci ER β na spermích izolovaných z *cauda epididymis* myši BALB/c za pomoci imunofluorescenčního značení.
2. Kvantitativně zhodnotit vliv přírodních estrogenů (estron, 17 β -estradiol, estriol) a syntetického estrogenu (17 α -ethinylestradiol) na míru tyrosinové fosforylace hlavičky během in vitro kapacitace.
3. Určit vliv estrogenních hormonů na schopnost spermií projít akrosomální reakcí po indukci kalcium ionoforem.

Výsledky

1. ER β jsme detekovali na apikální straně akrosomálního regionu hlavičky spermie obrázek viz. níže.



Imunofluorescenční značení ER β a tyrosinové fosforylace proteinů na myších spermích

(A) Imunofluorescenční značení ER β (zeleně), je na apikální straně akrosomálního regionu hlavičky spermie.

(B) Tyrosinová fosforylace (zeleně), je na apikální straně akrosomálního regionu hlavičky spermie a ve střední a hlavní části bičíku. Pozitivní značení hlavičky spermie je označeno hvězdičkou. Jádra jsou značena DAPI (modrá). Měřítka představuje 20 μ m.

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 β -estradiolu, estriolu a syntetického estrogenu- 17 α -ethinylestradiolu 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 60min., tak i v pozdější době měření, 90 a 120min. Rozdíl působení vybraných estrogenů je také dán jejich odlišným vlivem koncentrací. Vysokou míru TyrP

jsme pozorovali u spermií, na které působily hormony s vyšší koncentrací 200, 20 ng/ml (estron, 17 β -estradiol a 17 α -ethinylestradiol). 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 β -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 200ng/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 α -ethinylestradiolu výrazně ovlivnily dráhy vedoucí ke kapacitaci v časech od 30 minut až do 120 minut kapacitace.

3. Celkově výsledky tohoto pokusu ukázaly, že estrogены použité v našem pokusu výrazně snížily procento spermií, které byly schopné projít procházejí CaI indukovanou AR. Všechny přírodní estrogény estriol, estron a 17 β -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 5minut. 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 β -estradiolu a estronu ovlivňovaly AR, u estriolu tři nižší koncentrace 0,02; 0,2 a 2 ng/ml. Tři největší koncentrace 17 α -ethinylestradiolu snižovaly indukovanou AR zejména v časech 30 a 60 minut kapacitace po následné indukci AR 60 minut.

Diskuze

Estrogenní hormony modulují reprodukční procesy samic i samců (Free et al. 1979). Jejich výskyt v prostředí stále roste a prostřednictvím vody se dostávají do organismu, kde tyto procesy ovlivňují. Cílem této práce, bylo popsat, do jaké míry vybrané estrogenní hormony ovlivňují fertilizační schopnost myších spermií.

Uvedené výsledky ukazují, že estrogény zvyšují TyrP spermií, nicméně každý estrogen může vyvolat reakci různé síly s ohledem na jeho koncentraci a také času kapacitace. Rozdílná estrogenní odpověď může být způsobena tím, že estrogény aktivují různé typy nebo části signálních drah či mohou vázat a aktivovat různé receptory, které spouští dráhy vedoucí k proteinové TyrP spermií během procesu kapacitace. Nicméně z pohledu přirozeně se vyskytujících estrogenů uvnitř samičího pohlavního traktu, může jejich vyšší koncentrace sloužit jako specifická selekční bariéra spermií. Inhibičním vlivem je rozdílný způsob působení estrogenů na akrosomální reakci což může mít fyziologický význam (Vigil et al. 2008). Estrogény tak mohou u samic představovat další mechanismus pro specifický výběr nejlepších spermií pro oplození.

Příloha IV.

***In vivo* exposure to 17 β -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)

Cíle práce

1. Stanovit míru působení 17 β -estradiolu *in vivo* na míru tyrosinové fosforylace ve hlavičce spermie myši BALB/c 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 β -estradiolu.
3. Pozorování vztahu mezi tyrosinovou fosforylací proteinů (mírou kapacity) a množstvím 17 β -estradiolu v séru a exprese genu *Tff1*.

Výsledky

1. Tato práce se zabývá *in vivo* efektem 17 β -estradiolu na průběh kapacity, zejména sledováním vlivu tohoto estrogenu na stimulaci TyrP, na změny v *Tff1* genové expresi a změny v intracelulární koncentraci Ca²⁺ iontů. V průběhu pokusu byla jedna skupina samců vystavena koncentraci 20 ng/ml 17 β -estradiolu v období během puberty od 4. do 7. týdne věku (pubertální skupina) a druhá skupina byla vystavena kontinuálnímu ovlivnění stejným hormonem od narození do 12. týdne věku (kontinuální skupina). Současně byla připravena kontrolní skupina samců, kteří nebyli vystaveni žádnému vlivu estrogenu.

Spermie, používané pro detekci TyrP byly odebírány v průběhu kapacity v časech 0; 30; 60; 90 a 120 minut. Počet spermií pozitivních na TyrP byl vyšší oproti kontrolní skupině u obou experimentálních skupin. Největší rozdíl v míře TyrP oproti kontrolní skupině samců vykazovala kontinuální skupina, u které byl naměřen statisticky největší rozdíl v hodnotách v porovnání s dalšími skupinami. Pubertální skupina vykazovala také vyšší míru TyrP oproti kontrolní skupině, nižší však oproti skupině kontinuální. Nejvyšších hodnot TyrP vykazovaly skupiny v čase 90 minut kapacity. Rozdíl mezi experimentálními skupinami byl patrný již v minimálním čase inkubace spermií, v dalších časech inkubace se tento rozdíl nepatrně zvyšoval, trend nárůstu TyrP zůstal. V proteinové detekci TyrP ukazují výsledky rozdíly mezi kontrolní skupinou a experimentálními skupinami. Největší rozdíly vykazovala opět skupina kontinuální s největším množstvím proteinů pozitivních na TyrP, a to zejména ve skupině proteinů molekulové hmotnosti od 45 kDa do 68 kDa. Kontrolní skupina vykazovala nejnižší množství detekovaných proteinů na TyrP. Detekce dosahovala nejvyšších hodnot v čase 90 a 120 minut, kdy kapacita těchto spermií dosáhla maxima a byla ukončena.

2. Pro studium ovlivnění signálních drah spermie byla detekována s kapacitací související intracelulární koncentrace Ca²⁺ pomocí chlortetracyklinového (CTC) stanovení množství Ca²⁺. 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 ne jen 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. Dalším stanovením, které indikuje změny stavu kapacity a také vliv estrogenu na kapacitaci, byla detekce na estrogenu závislé exprese *Tff1* genu. Zároveň byla stanovena míra koncentrace 17 β -estradiolu v myším séru. Výsledky ukazují, že míra TyrP, hodnoty koncentrace 17 β -estradiolu v séru i míra exprese *Tff1* genu vzájemně korelují. Rozdíl koncentrací estrogenu mezi kontrolní skupinou a pubertální skupinou nebyl výrazně odlišný. Statisticky rozdílné byly hodnoty koncentrací kontinuální skupiny oproti ostatním skupinám. Míra exprese *Tff1* genu vykazovala mezi skupinami rozdíly a korelovala také s množstvím spermií pozitivních na TyrP. Na druhou stranu nebyl zjištěn rozdíl v TyrP v hlavičkách spermií v *testis* a *epididymis*.

Diskuze

Tato publikace navazuje na předchozí práci a rozšiřuje tak znalosti o působení steroidních hormonů. Pro studie stavu kapacity je často vybírán přírodní estrogen 17 β -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 β -estradiol byl podáván v pitné vodě experimentálním myším a jeho působení tedy probíhalo *in vivo*. Během pokusu jsme pozorovali míru tyrosinové fosforylace proteinů na dvou rozdílných vzorcích populací spermií. První vzorek byl připraven z jedinců, kteří byli vystaveni 17 β -estradiolu pouze v době puberty (pubertální), tudíž omezenou dobu a druhý pak ze samců, kteří byli vystaveni působení tohoto hormonu od narození až do doby pokusu (kontinuální).

Mezi jednotlivými skupinami a kontrolou vykazovala prokazatelně největší rozdíly v míře tyrosinové fosforylace proteinů kontinuální skupina. Tyto rozdíly pak byly prokázány pomocí imunofluorescenčního značení, SDS-PAGE elektroforézy, CTC stanovení i za pomoci míry exprese *Tff1* genu.

Výsledky ukazují, že působení 17 β -estradiolu na spermie z *cauda epididymis in vivo* vede k jejich předčasné kapacitaci, což má potenciálně negativní dopad na reprodukční schopnost spermií uvnitř samčího reprodukčního traktu.

Rychlejší průběh kapacity je zapříčiněn především hyperfosforylací proteinů spermií a předčasným přílivem vápníku. Tyto procesy pak vedou ke snížené schopnosti spermií podstoupit AR. Na základě těchto důkazů se může snížit fertilizační schopnost samců myší po *in vivo* účincích 17 β -estradiolem. Což představuje důkaz možného působení endokrinních disruptorů s estrogenní aktivitou právě na reprodukční schopnost.

Závěry 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.

Použitá literatura

- Akingbemi, B.T., 2005. Estrogen regulation of testicular function. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3(1), s.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.
- Baldi, E. et al., 2009. Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: facts and fictions. *Molecular and cellular endocrinology*, 308(1), s.39–46.
- Böcskei, Z. et al., 1992. Pheromone binding to two rodent urinary proteins revealed by X-ray crystallography. *Nature*, 360, s.186–188.
- Boudjelal, M., Sivaprasadarao, A. & Findlay, J.B., 1996. Membrane receptor for odour-binding proteins. *Biochem J*, 317 (Pt 1, s.23–27.
- Carreau, S. & Hess, R.A., 2010. Oestrogens and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 365(1546), s.1517–1535.
- Cerna, M. et al., 2017. The vagina monologues: differential regulation of lipocalin expression (OBP, MUP) throughout the mouse estrous cycle. *Scientific reports*, In revisio.
- Colborn, T., vom Saal, F.S. & Soto, A.M., 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect*, 101.
- 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-.
- Ded, L. et al., 2010. Effect of estrogens on boar sperm capacitation in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(1), s.87.
- Ecroyd, H., Jones, R.C. & Aitken, R.J., 2003. Tyrosine Phosphorylation of HSP-90 During Mammalian Sperm Capacitation I. *Biology of reproduction*, 69(6), s.1801–1807.
- 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.
- 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.
- 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.
- Free, M.J. et al., 1979. Collection of rete testis fluid from rats without previous efferent duct ligation. *Biology of reproduction*, 20(2), s.269–278.
- 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.
- 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.
- 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.
- Gray, L.E. et al., 1999. Environmental antiandrogens: low doses of the fungicide vinclozolin alter sexual differentiation of the male rat. *Toxicology and Industrial Health*, 15(1), s.48–64.
- 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.
- 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.
- 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.
- Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U. & Andrews, N.C., 2005. Contents, Ed. Board + Forthc. articles. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(3), s.i.
- Hoffmann, F., Musolf, K. & Penn, D.J., 2012. Spectrographic analyses reveal signals of individuality and kinship in the ultrasonic courtship vocalizations of wild house mice. *Physiology & Behavior*, 105(3), s.766–771.
- Hurst, J.L., 2009. Female recognition and assessment of males through scent. *Behavioural Brain Research*, 200(2), s.295–303.
- 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.
- 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.
- 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.
- Logan, D.W., Marton, T.F. & Stowers, L., 2008. Species specificity in major urinary proteins by parallel evolution. *PLoS one*, 3(9), s.e3280.
- 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.
- 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.
- 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.
- Noguchi, K., Tsukumi, K. & Urano, T., 2003. .2003_Noguchi_Qualitative and Quantitative Differences in Normal Vaginal Flora of Conventionally Reared Mice, Rats, Hamsters, Rabbits, and Dogs. , 53(4), s.404–412.
- Pelosi, P., 1994. Odorant-Binding Proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 29(3), s.199–228.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Sharrow, S.D. et al., 2002. Pheromone binding by polymorphic mouse major urinary proteins. , s.2247–2256.
- 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.
- 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.
- 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, 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., 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., 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.
- Strong, R., Akerstrom, B. & Borregaard, N., 2005. Siderocalins. *Lipocalins. Austin: Landes ...*, (Lipocalin 2), s.1–17.
- 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.
- 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.
- Urade, Y., Eguchi, N. & Hayaishi, O., 2013. Lipocalin-type prostaglandin D synthase as an enzymic lipocalin.
- 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. et al., 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. *Development*, 121, s.1129–1137.
- Yip, K.S. et al., 2013. Changes in mouse uterine transcriptome in estrus and proestrus. *Biology of reproduction*, 89(1), s.13.
- 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.

Metody

Nekroskopie u myši

Kapacitace spermií (myši)

Cytologické techniky (příprava buněčných preparátů, cytologické barvení)

Indukce akrosomální reakce

Imunofluorescenční detekce

SDS-PAGE elektroforéza a imunoblotting

Chlortetracyklin-fluorescenční test (CTC test)

Reverzní transkripce kvantitativní real-time PCR (RT- qPCR) *Tff1* genu

Měření hladiny 17 β -estradiol v séru

nLC-MS² (analýza kapalinovým chromatografem spojeným s tandemovým hmotnostním spektrometrem)

Sekvence transkriptomu pomocí GS Junioru (Roche)

Bioinformatická analýza

Ontologická analýza genů (PANTHER)

Proteinové struktury (RCSB Protein Data Bank)

Fylogenetická analýza (MEGA)

Statistické metody (PLGEM)

Seznam publikací vztahujících se k disertační práci

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)

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

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)

In vivo exposure to 17 β -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)

Další publikace

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)

Životopis

Osobní údaje:

Martina Černá
narozena 31.1.1984 v Praze (ČR)

Adresa pracoviště:

BIOCEV
Biotechnologické a biomedicínské centrum
Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci
Průmyslová 595
252 42 Vestec
Česká republika

Adresa:

Hlivická 417, Praha 8, 181 00
martina.biology@gmail.com
tel: +420 607 517 233

Vzdělání:

- 5/2010 - současnost Karlova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Vývojová a buněčná biologie, BIOCEV, Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci, Průmyslová 595, Vestec, 252 42, Česká republika, doktorské studium (téma: Chemické signály a reprodukční procesy u myši domácí (*Mus musculus*), školitel: Doc. Mgr. Pavel Stopka, Ph.D.)
- 10/2009 - 4/2010 Karlova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Vývojová a buněčná biologie, Laboratoř kontroly buněčného dělení, Ústav živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR, v.v.i., Rumburská 89, 277 21 Liběchov, Česká republika, doktorské studium (téma: Aneuploidie v savčích oocytech, školitel: MVDr. Martin Anger, Ph.D.)
- 2007 - 2009 Karlova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Vývojová a buněčná biologie, Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Přátelství 815, Praha-Úhřetěves, 104 00, Česká republika, magisterské studium (téma: Chemická enukleace v savčích oocytech, školitel: Doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph.D.)
- 2004 - 2007 Karlova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Vývojová a buněčná biologie, bakalářské studium (téma: Prasečí endogenní retroviry z pohledu xenotransplantací, školitel: Doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph.D.)

Kurzy:

- 9/2014 Pedagogické minimum pro výuku na základních a středních školách (Karlova Univerzita)
- 11/2014 Kurz odborné přípravy k získání kvalifikace a odborné způsobilosti na úseku pokusných zvířat dle §15d odstavce 2 písmeno

a) zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, v platném znění

Konference:

15. -17.10.2015 Development & Cell Biology, PhD Conference in Svatý Jan pod Skalou (6 roč.)
19. - 24.7.2015 Gordon Research Conference on Fertilization & Activation of Development, Holderness School in Holderness, NH, USA
- 30.10.-1.11.2014 The central European meeting on genes, gene expression and behaviour (6 roč.)Nové Hrady, Czech Republic
- 13.10.-15.10.2013 The central European meeting on genes, gene expression and behaviour (5 roč.)Nové Hrady, Czech Republic
- 17.-19.10.2013 Development & Cell Biology, PhD Conference in Svatý Jan pod Skalou (5 roč.)
- 14.7.-19.7. 2013 Gordon Research Conference on Fertilization & Activation of Development, Holderness School in Holderness, NH, USA
- 26.-29.5. 2011 XVII Symposium of the Czech Reproductive Immunologists

Grant:

- 2013 Cestovní grant Hlávkovy nadace

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. Introduction

1.1 Chemical signals

Chemical communication is mediated by sex-biased signals abundantly present in body fluids such as urine, saliva, tears and vaginal fluid. These fluids contain a wide array of small volatile chemical substances (pheromones) produced by the individual by males and females and used for social communication. Pheromones affect hormonal levels and influence physiological, immunological processes and mediate social bonding and sexual behaviour. The binding and effective transport of pheromones in the body fluids and between individuals is facilitated by an extended family of small (150-250 amino acid) secreted proteins called **lipocalins**. Their name is derived from “lipos” = fat and barrel/calyx = “calyx”.

The family demonstrates a high diversity in primary sequence, however despite this dissimilarity the crystal structures of highly divergent lipocalins are surprisingly very conserved and comprise a single eight-stranded continuously hydrogen-bonded antiparallel beta-barrel, which encloses an internal ligand-binding site. Lipocalins are involved in a wide range of biological processes and besides their indispensable role in extracellular chemical communication during reproduction (Stewart et al. 2000), they also participate in prostaglandin synthesis (Fujitani et al. 2002), tissue regeneration and development (Kim et al. 2005; Ganfornina et al. 2010; Petta et al. 2011; Spreyer et al. 1990; Playford et al. 2006). The most abundant source lipocalins and their ligands are vaginal secretion (Singer & Macrides 1993), urine (Stopková et al. 2007), tears (Stopkova et al. 2017) and saliva (Stopka et al. 2016).

The approximately 50 murine lipocalins belong to 15 main groups, some of which contain several highly similar paralogues. The most studied in relation with chemical communication are **major urinary proteins (MUPs)** and **odorant binding proteins (OBPs)**.

Odorant binding proteins (OBPs)

OBPs have a highly variable expression pattern in different tissues and may vary greatly between individuals of the same sex. Our laboratory (Stopková et al. 2016) show that OBPs are most expressed in nasal epithelium and lacrimal glands. We analyze the expression patterns of four *Obps* (*Obp1*, *Obp5*, *Obp6*, *Obp7*) in eight distinct tissues such as olfactory epithelium, vomeronasal organ, lymphoid tissue associated with nasal mucosa, lacrimal gland, harderian gland, salivary gland, preputial gland and liver; in both sexes of two murine subspecies (*Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus*). We have found that some *Obp* genes are expressed specifically only in single tissue, such as *Obp6* in the lacrimal gland, whereas others *Obp* are expressed in both lacrimal and in the salivary gland. Sexual dimorphism was detected in the case of *Obp7*, which is expressed only in female lacrimal gland. The presence of *Obp* at the protein level was also confirmed in saliva (Stopka et al. 2016) tears (Stopková et al., 2017, submitted) and vaginal fluid (Cerna et al., 2017).

The exact function of OBPs in these tissues is not yet fully understood. It has been suggested, that OBPs expressed in nasal tissue, especially the olfactory epithelium and vomeronasal organ (VNO) might facilitate the transport of hydrophobic molecules onto olfactory receptors. There are differing opinions regarding to either OBPs non-specifically easing the movement of hydrophobic ligands towards receptors in the olfactory epithelium (Pevsner et al. 1988; Pevsner & Snyder 1990), or directly participates in the activation of these receptors (Taylor et al. 2008; Vidic et al. 2008). It is also possible that the role of OBPs is to reduce

redundant ligands or to remove toxic substances which could damage the mucosal epithelium (Grolli et al. 2006; Boudjelal et al. 1996; Pelosi 1994). This would explain the presence of these proteins in other body fluids such as tears and saliva where there is no need to activate the receptors, but rather to maintain the epithelial surface of the mucosa and to remove any excess substances.

OBPs are phylogenetically related to another group of lipocalins – MUPs, which are known to bind and excrete various chemical signals involved in sexual selection in mice. OBP and MUP have a similar tertiary structure and barrel size, so it is likely that they are involved in chemical communication.

Major urinary proteins (MUPs)

Murine MUPs comprise a large gene cluster on the mouse chromosome 4 consisting of 21 functional genes and the same number of pseudogenes. MUPs can be divided into two groups, the so-called A group (ancestral) which consisting of 6 genes; and the B group (remaining 15 genes) characterized by a high degree of sequence similarity (up to 99%). The representation of MUPs in other species is more modest. We can find about 8 genes (also called α 2-microglobulins - A2UG) in rats (Saito et al. 2000; Böcskei et al. 1992) while other species often have only one or just a handful of MUP genes (Zhou et al. 2009).

MUPs are synthesized primarily in the liver (Hastie et al. 1979) and through glomerular filtration are getting into the urine, which serves as a source of chemical information about the individual. MUP have an important role, especially demarcation of territory, mainly through sustained release of volatile ligands from MUPs, extending odor tag information. However, Mup expression has also been detected in other tissues, such as salivary glands, lacrimal glands and mammary glands. (Shahan et al. 1987; Sharrow et al. 2002; Mudge et al. 2008). Similarly, other odorous information from other body fluids, such as vaginal fluid, tears or saliva that stick to the fur by self-grooming (cleansing oneself's fur), also dry up and release chemical signals to surrounding (Ferkin et al. 1996). MUP expression is sexually dimorphic in mice; where MUPs are highly abundant in the male urine. This dimorphism was documented in two mouse subspecies *Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus* (Stopková et al. 2007), reporting that the difference in the production of MUPs between male and female is more pronounced in *M. m. musculus* than in *M. m. domesticus*. The chemical signals that MUP mediates are therefore sexually specific and mostly related to reproductive behaviour and aggression.

Other functions of lipocalins

Some publications suggest that the primary function of lipocalin is to bind and transport toxic volatile organic compounds (VOCs) produced during metabolic processes (Stopková et al. 2009; Kwak et al. 2011; Kwak et al. 2016). Some laboratories have observed that a large number of xenobiotics are excreted in the urine in conjunction with the MUP (Larsen et al. 1990; Robertson et al. 1998; Hakk et al. 2009; Staskal et al. 2005).

One lipocalin has been confirmed to even perform antibacterial protection. Lipocalin 2 (Lcn2, NGAL, 24P3), also known as siderocalin, has the ability to bind iron-bound bacterial siderophores, thereby preventing the use of iron bacteria and inhibiting their growth (Goetz et al. 2002; Fischbach et al. 2006; Smith 2009; Hentze et al. 2005; Sutak et al. 2008). Strong and colleagues (Strong et al. 2005) suggest that some other lipocalins, such as Lcn1 and Lcn12, might also have this ability, but these finding has not been confirmed so far elsewhere. Increased Mup expression was demonstrated in iron-overdosed mice (Pettrak et al. 2007). It is thus plausible that

these lipocalins may have a similar ability to bind metal ions (Fe, Cu) and to some extent have an antibacterial and detoxification function in the body.

1.2 Reproductive processes

Estrous cycle

The estrous cycle is characterized by periodical and physiological changes in the mammalian placental female. These changes are induced by the reproductive hormones. It is known, that is possible to influence estrous cycle by various odours (pheromones), especially the length of estrus when the female is receptive (Stopka & Macdonald 1998).

Each phase is characterized by different ratio of cells types. Proestrus is the phase where nuclear epithelial cells are present in higher number than keratinocytes. Later, the number of keratinocytes starts to increase, which is typical for estrus where keratinocytes predominate (Cora et al. 2015). In these two phases the amount of bacteria is rising. They adhere to peeling keratinocytes and are visible on cytological specimens (Noguchi et al. 2003). Metestrus is characterized by high number of neutrophilic granulocytes, which stabilize vaginal microbiome and their volume rises towards diestrus. The vaginal surface changes regularly during the four s of the estrous cycle and is accompanied by increased the desquamation of the epithelial cells during the estrus phase. Therefore, it is imperative to protect the mucosal epithelium from possible pathogen penetration.

We aimed to examine the presence and possible function of lipocalins in the saliva and vaginal secretion of the house mouse and their possible relation to the regulation of the immune system (*Mus musculus musculus*) in contrast to previous studies, which mainly focused on the chemical signalling in the urine.

Molecular changes within the sperm and effects of estrogens

In order for sperm cells to become ready for fertilization they have to undergo capacitation and acrosomal reaction. Both of these events take place within the female reproductive tract under the influence of estrogen hormones. Spermatozoa, as a terminally differentiated cell, lack transcriptional and translational activity, and thus protein tyrosine phosphorylation (TyrP) represents an important way of controlling on-going molecular changes during capacitation, hyperactive motility or acrosomal reaction (Visconti et al. 1995a). TyrP occurs in the cytosol, the surface of the sperm head and the tail. Tyrosine kinases are localized in the cytosol, nucleus or bound to the cytosolic side of the plasma membrane (Fisher et al. 1998). The process of sperm capacitation and AR is regulated by a number of interconnected signalling pathways. The link between TyrP and the ability of sperm to fertilize an egg has already been established (Ecroyd et al. 2003; Asquith et al. 2004).

Estrogens regulate a large number of physiological processes in mammals, including the male and female reproductive system (Free & Jaffe 1979), play a key role during male reproduction including spermatogenesis (Carreau et al. 2011, 2012) and sperm maturation such as capacitation (Baldi et al.2009). The estrogen concentration differs significantly between males and females and is species-specific. Estrogens regulate cellular function via estrogen receptors ER α and ER β (Lubahn et al. 1993), however they may activate alternative signalling pathways independently of estrogen receptor-signalling. Some of responses to estrogens can initiate many fast nongenomic signalling activities. Models of rapid responses are mediated by classical ER bound in the plasma membrane, or estrogen-binding receptors linked to G proteins (GPR30), which also triggers rapid intracellular response.

There is an increasing amount of compounds in the environment that may interfere with reproduction (Ded et al. 2010; Gray et al. 1999). Natural (genistein, zearalenon, 17 β -estradiol), synthetic estrogens (bisphenol A, diethylstilbestrol) and numerous nonestrogenic compounds are few examples of endogenous disruptors present in the polluted environment which alter physiological function of estrogenic hormones and disrupt the reproductive development and fitness of affected organisms (Colborn et al. 1993; Akingbemi 2005).

Changes in sperm that lead to preparation for fertilization are not yet fully understood. It is unclear to what extent and at which concentrations estrogen hormones affect sperm's ability to fertilize. Therefore, the aim of this work was to elucidate the effects of selected estrogen hormones on the molecular processes occurring within spermatozoa prior successful fertilization.

Supplement 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)

Aims of the study

1. Identification of the saliva proteome of house mouse (*Mus musculus musculus*) with focus on proteins involved in chemical communication by using nLC-MS².
2. Evaluation of the sexual dimorphism of the salivary proteome.

Results

1. We have generated the saliva proteome a total of 633 proteins in 11 animals. The most abundant proteins in saliva include some members of lipocalins, especially MUP6, OBP5, OBP7, MUP5, OBP1, LCN11, LCN13, OBP2 (i.e. in descending order). In addition of lipocalins, the most abundant proteins in saliva were these secretoglobins (SCGB2B2, SCGB1B2, SCGB1B27), antimicrobial proteins (BPIFB9B) and one member of kallikrein family (KLK1B9). We have detected 20 (out of 55) mouse lipocalins, that have potential roles in chemical communication as transporters of salivary VOCs. We have found members from LCNs (LCN2, LCN3, LCN4, LCN11, LCN12, LCN13), OBPs (OBP1, OBP2, OBP5, OBP6, OBP7) and MUPs (MUP4, MUP5, MUP6, MUP8, MUP14, MUP17, MUP20, MUP21). Some of those lipocalins in saliva was significantly sexually dimorphic as similar to lipocalins in urine.
2. We identified 633 proteins with 134 (21%) of them being sexually dimorphic. From them 92 (14,5%) proteins being male-biased, while only 40 (6,3%) of the proteins were female biased. Thus, the male-biased proteins were more common than the female-biased proteins in the saliva. A total of 10 were significantly sexually dimorphic were male-biased (OBP1, OBP2, LCN3, LCN4, LCN13, LCN14, MUP4, MUP14 a MUP20). Only MUP8 was female biased. We have detected 13 secretoglobins members with 7 of them were sexually dimorphic (i.e. male-biased: SCGB1B20, SCGB1B3, SCGB2A2, SCGB2B20, SCGB2B24, SCGB2B3, SCGB2B7). Antimicrobial proteins with detected sexual dimorphic were male-biased as well. Most of the female-biased proteins belong into kallikrein family (13 members of kallikrein 1-related peptidases).

Discussion

In the saliva, we surprisingly found members of major urinary proteins (MUP), which have been described as transporters of chemical signals from urine. Major urinary proteins (MUPs) are known to carry volatile substances and protect them during their passage from the liver, through the kidneys into the urine. MUPs are produced by males at higher concentrations than by females (Stopková et al. 2007). The presence of MUPs in the saliva thus may indicate the possibility that saliva can play an important role in the chemical communication. Novelty of our findings includes the detection of MUP20 in saliva of both sexes in *M. m. musculus*, that were previously detected only in the urine of males of western house mouse subspecies (*Mus musculus domesticus*) and laboratory mouse C57BL/6 (Nelson et al. 2015). MUP20 called „Darcin“ has been described as a male pheromone that stimulates female memory and sexual attraction to an individual male's odour (Roberts et al. 2010; Roberts et al. 2012). Besides functioning as a way to assess genetic quality and compatibility of a male (Hurst 2009; Hoffmann et al. 2012) these types of signals could reflect a male's current condition; for example his disease status. Our identification of MUP20 in the saliva proteome is consistent with other authors who also confirmed the presence of this protein in mice saliva (Logan et al., 2008). Although the amount of this protein in the saliva is higher in males than in females, it is difficult to imagine that this protein would serve as a male-specific pheromone when it is also produced by a female submandibular gland and secreted into female saliva. Therefore, it is likely that MUP20 is not after all an exclusive male protein, only found in the urine. Also the pheromone function is not attributed to the protein itself but rather to ligands it transfers.

For some lipocalins we have identified sexual dimorphism in their expression e.g in OBP1, OBP2 and MUP8. Herein, OBP1 and OBP2 are male-biased and MUP8 female-biased. It is possible that sexually different expression of OBP proteins reflects the possible differences in male and female olfactory capabilities. In the case of MUP8, it is necessary to specify the translation and transcription site of this protein.

Supplement 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

Aims of the study

1. To identify proteome of vaginal fluid in wild house mouse (*Mus musculus musculus*) during estrous cycle, using nLC-MS² method.
2. To detect potential signal transporters in vaginal fluid.

Results

1. For the purpose of our study we have isolated the vaginal secretion from nine females, each in three phases and detected a total of 2507 proteins. However, some proteins were detected only in one or two instances per individual. Therefore, we have reduced our dataset into 986 proteins. Only 17 proteins were

significantly up-regulated during estrus and concurrently down-regulated in metestrus. Thus identifying these proteins as a significant markers of estrus. These are: SPA9, LYG1, PHLD, HGFA, ASAH1, HORN, DAG1, CPO89, AOC1, CTL4, PPBT, CATC, MA2B2, PPGB, DPP2, FUCO, TGM3. The most differentially expressed protein during estrus (i.e. proestrus - estrus, up-regulated, estrus-metestrus - down-regulated) was serpin A9 (SPA9). SPA9 is member of the serpin family of serine protease inhibitors. Another possible marker of estrus is e.g. hornerin (HORN, Hrn), which is a component of the epidermal cornified cell envelopes. Hornerin is involved in the process of the cell differentiation and together with mucin/episialin (MUC1) forms an anti-inflammatory epidermal barriers during estrus. Another example of antimicrobial protein is MUC9/OVGP1 (oviduct specific glykoprotein) whose expression grows during estrus and metestrus. uromodulin (UROM) is involved in formation of a viscous barrier on the surface of epithelial cells during the estrus phase. An additional two proteins, ovostatin (OVOS) and Lysozyme g-like protein 1 (LYG1), indirectly involved in antimicrobial protection, are expressed during estrus but decreased in metestrus. The single representative of the BPI family of proteins found in vaginal fluid, LBP/BPIFD2, was upregulated during the estrus and metestrus. The unique tertiary structure allows LBP to increase the permeability of bacterial membrane. During estrus phase, the amount of bacteria is increasing, thus more bacterial cells appears on the epithelia, resulting in the increase of the number of neutrophils during metestrus and subsequent stabilization of the vaginal microbiome. We found a total of 10 proteins that were significantly up-regulated during metestrus phase thus could be considered as markers for this phase (MMP8, S10A9, UBP5, HCLS1, NGP, LASP, PSME2, LAP2B, CAMP, LSP1). S10A9, NGP, CAMP have known antimicrobial activity.

We have also identified members of kallikrein family KLK1, 10, 11, 12, 13 and 14 in estrous cycle and their expression levels were constant during all three estrous phases. The only the expression of KLK8 was changing during estrous cycle, with its expression peaking in proestrus and estrus and declining during metestrus. Even though, KLK5 and KLK7 have not been found in vaginal secretion, we identified their inhibitor SPINK5. However, the expression of SPINK5 was down-regulated in estrus phase.

2. Another goal was to determine whether vaginal secretion contained proteins that could serve as transporters for volatile organic compounds (VOCs). Our results show the presence of MUPs in vaginal secretion and their increased expression during estrus and remain steady even during metestrus. We identified members of MUPs e.g.: MUP20 (Darcin), MUP3, MUP5 and two MUPs without the unique sequence belonging to the MUP B group, which we have called the most likely variant - sMUP17 ("MUP17 similar to MUP13" and/or MUP17) and sMUP9 ("similar to" MUP9, whose identification peptide is the same for 13 MUPs of the B group, namely MUP1, 2, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 18, 19). The most up-regulated MUPs from proestrus were MUP20, sMUP9 and sMUP17. We have detected four members of the recently described family of odorant binding proteins OBP1, OBP2, OBP5 and OBP7 in vaginal fluid of the house mouse as highly abundant proteins.

The course of their expression during estrous cycle was similar to that of MUP proteins; a significant increase of OBP expression was recorded during estrus and persisted until the metestrus, however the difference in the levels between proestrus and estrus was not as high as in the case of MUPs. Besides

OBPs and MUPs, we found other members of lipocalins such as Lipocalin 11 (LCN11) and Siderocalin (LCN2). Overall, the expression of LCN11 was lower than that of MUP, but the increase in levels was the same – most in estrus and metestrus. LCN2, on the other hand, had constant levels throughout all three stages and, moreover, it belonged overall to the most expressed genes in the vaginal secretion. Lipocalin family also comprises retinol binding protein 1 (RBP1), whose expression was in contrast to other lipocalins – reached the lowest values during estrous and increase in metestrus and proestrus.

Discussion

Vaginal secretion is an important source of information about female's wellbeing. We collected this fluid using a noninvasive method and analyzed using most advanced proteomics techniques. The vaginal secretion content is a mixture of secreted proteins from various tissues of the female reproductive tract such as ovaries, uterine wall, uterine neck, uterine corners, fallopian tubes and other internal vaginal glands. We used this secretion for estrous phase detection and for further protein analysis.

LCN2 or NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) was one of the most abundant proteins expressed throughout the estrous cycle. It is well established that this protein is capable of binding so-called siderophores. Siderophores are proteins produced by bacteria that serve as chelating agents for ferrous ions. LCN2 sequesters siderophores and prevents bacteria from obtaining the necessary iron ions and thus inhibits their growth (Goetz et al. 2002). We would expect its highest expression during proestrus and estrus phases when the bacterial populations grow, nevertheless its levels are constant throughout the estrous cycle, with a slight increase in metestrus. It can be concluded that LCN2 expression is copying the increasing trend of iron ion-dependent bacteria towards the metaestrus.

The expression of other detected lipocalins such as MUP3, 4, 5, 6, 9 and 20 grows slightly from the estrus towards the meters. The increasing amount of Mup proteins between proestrus and estrus was also detected by RNA microarray from uterine tissue in laboratory mice (Yip et al. 2013). A similar dynamics of expression as in MUP was determined also for OBP proteins found in vaginal secretion, namely OBP1, 2, 5, 7.

Conclusions of supplement I. and II.

The expression of some MUP proteins exhibits sexual dimorphism even in other secretions than in urine, and therefore here they can play a role in sexual signaling. Some OBP proteins could also play this role in some tissues, but this hypothesis still needs to be confirmed by other results. However, our results may suggest a more general function of these lipocalins, such as detoxification of mucous membranes and their protection against toxic metabolites resulting from degradation processes. We expected that if the main function of MUP and OBP were the sign of estrous females, then their level would be highest in proestrus or estrus. Our results, however, show the highest levels of these lipocalins not only in estrus, but also persist in the metestrus, when the female fecundity is zero, and thus the male would receive a false signal for coupling. It is possible that rather than the protein itself is an important ligand that is bound in the individual phases and determines the nature of the signal. The source of these ligands may be metabolites that reflect the health of the individual.

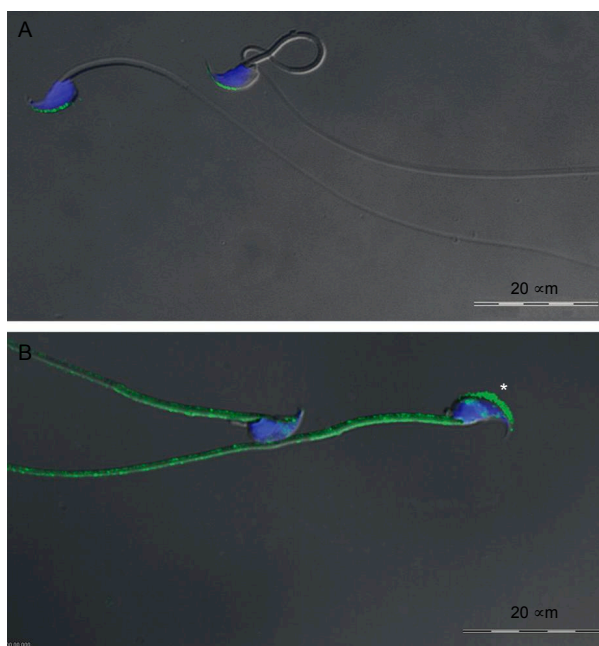
Supplement III.

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; 2017)

Aims of the study

2. To determine the spatial localization of ER β in sperm cells isolated from *cauda epididymis* of BALB/c mice strain by immunolabeling.
 2. To quantify the effect of natural estrogens (estrone, 17 β -estradiol, estriol) and synthetic estrogen (17 α -ethynylestradiol) on the level of tyrosine phosphorylation in the sperm head during *in vitro* capacitation.
 2. To investigate the effect of estrogen hormones on the calcium ionophore-induced acrosomal reaction.
1. ER β localization was observed over the apical acrosomal region and apical hook of the sperm head, see figure below.



Immunofluorescent detection of ER β of tyrosine phosphorylation in mouse spermatozoa.

(A) Immunostaining for ER β (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 showed by asterisk.

Nuclei are counter-stained with DAPI (blue). Scale bar represents 20 μ m.

2. Sperm cells collected from cauda epididymis were allowed to capacitate in the presence of different (0.02; 0.2; 2; 20; 200 ng/ml) estrogen concentrations. The sperm cells were labelled by monoclonal antibody for the presence of TyrP and the data statistically evaluated.

The results indicate that all the above-mentioned estrogens increase the number of sperm positive for TyrP in the sperm head during the capacitation. An increased TyrP appears at 30 and 60 minute, as well as at a later time of 90 and 120 minute time points of capacitation. A high level of TyrP was observed only at higher dosages (20, 200 ng/ml) estrogens - estrone, 17 β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol. In comparison, estriol exhibits increased TyrP already at low concentrations (0.02; 0.2 and 2 ng/ml) and increases with concentration.

17 β -estradiol induces TyrP at 0.2 and 2 ng / ml already after 30 minutes of capacitation. At higher dosages (20 and 200 ng / ml) the TyrP is significantly increased, especially around the period of 30 minutes to 90 minutes. Estrone shows a similar effect. In particular, the two highest 20 and 200 ng / ml concentrations of 17 α -ethinylestradiol significantly affected the capacitation signalling pathways from 30 minutes to 120 minutes.

3. The results of this experiment showed that the estrogens used in our trial significantly reduced the percentage of sperm cells that were able to pass through AR-induced CaI. All of the studied natural estrogens showed a very similar effect on AR. Sperm which undergone capacitation for 30 minutes with further incubation with CaI for 5 minutes demonstrated significant decrease in AR. These effects were generally concentration dependent. In particular, the three highest concentrations (2; 20 and 200 ng / ml) of 17 β -estradiol and estrone affected the AR, while estradiol lowered the AR already at much lower concentrations (0.02, 0.2 and 2 ng/ml). The three highest concentrations of 17 α -ethinylestradiol decreased AR especially at 30 and 60 minutes of capacitation following AR induction for 60 minutes.

Discussion

Estrogens modulate the reproductive processes of females and males (Free et al. 1979). Their increasing availability in the environment poses a challenge for reproduction through disruption of natural estrogen signalling. The aim of this study was to assess the effect selected estrogen hormones on the fertilization ability of mouse sperm cells. These results demonstrate that estrogens increase TyrP in sperm, however each estrogen may induce the TyrP concentration dependent manner and time of sperm capacitation. Different responses may be elicited by estrogens activating different types or portions of the signaling pathways or by binding and activating the various receptors that trigger the pathways leading to TyrP protein sperm during the capacitation. However, from the point of view of naturally occurring estrogens within the female reproductive system, high concentrations of estrogens may serve as a specific sperm selection barrier, where the inhibitory effect of estrogens to induced AR may have a physiological relevance (Vigil et al. 2008). In the females, estrogens can be another specific mechanism to select the best sperm to fertilize.

Supplement IV.

***In vivo* exposure to 17 β -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; 2017)

Aims of the study

1. Determine 17 β -estradiol action on the tyrosine phosphorylation rate in BALB/c mouse sperm head by immunofluorescence labeling and quantitatively assess the amount of proteins after tyrosine phosphorylation in whole sperm lysate samples prepared from all three groups (using SDS-PAGE electrophoresis).
2. Evaluation of changes in sperm calcium homeostasis following 17 β -estradiol administration.
3. Determine of the relationship between protein tyrosine phosphorylation (sperm capacitation rate) and serum 17 β -estradiol concentration and *Tff1* expression.

Results

1. This work investigate the *in vivo* effect of 17 β -estradiol on the course of sperm capacitation, especially by monitoring the effect of this estrogen on TyrP stimulation, changes in *Tff1* expression and changes in intracellular concentration of Ca²⁺ ions. During the experiment, one group of males was exposed to 20ng/ml of 17 β -estradiol during puberty (4 to 7 weeks of age, puberty group). Second male group was exposed to the same hormone concentration continuously from birth until 12 weeks of age (continuous group). The control group of males unexposed to estrogen was also prepared.

The sperms used for TyrP detection were collected during capacitation at 0; 30; 60; 90 and 120 minutes time points. The number of sperms positive for TyrP compared to the controls was highest in continuous group. The puberty group also had a higher TyrP than the control group, but lower than the continuous group. TyrP in all groups peaked at time point of 90 minutes of capacitation. The difference between the experimental groups was apparent already after short time of sperm incubation, and with further incubation time this difference increased slightly. Increasing TyrP kinetics remained steady.

Regarding the TyrP protein detection, the results again corroborate the differences between the control and experimental groups. The highest rate of TyrP was again observed in the continuous group, especially in proteins ranging 45 kDa to 68 kDa. The control group showed the lowest amount of detected TyrP proteins. TyrP reached the highest values at 90 and 120 minutes, when the sperm capacitation reached the maximum and was terminated.

2. The modality/strength of sperm signal transduction pathway was measured through the chlortetracycline (CTC) determination of intracellular Ca²⁺ levels. The results show pro-capacitation effect of Ca²⁺ which correlates with TyrP levels. The number of CTC labeled sperm was highest in the continuous group, followed by pubertal group.

3. Another assay, indicating changes in capacitation as well as estrogen effects on capacitation, was estrogen-dependent expression of murine *Tff1* gene. Concomitantly, the serum 17 β -estradiol concentration was determined. The results show that TyrP, serum 17 β -estradiol levels and *Tff1* expression correlate. The difference in estrogen concentrations between the control group and the pubertal group was not significant. Statistically different were the serum 17 β -estradiol concentrations in continuous group compared to the other groups. The *Tff1* expression levels showed differences between the groups and correlated with TyrP positive sperm count. On the other hand, there was no difference in TyrP in sperm heads of sperms from *testis* and *epididymis*.

Discussion

This work builds upon and expands the scope of the previous publication. In order to study the rate of sperm capacitation often natural estrogen 17 β -estradiol is employed, which was also the case of this study.

The stimulation pro-capacitative effect of this estrogen was measured in *in vitro* conditions also in other instances (Ded et al. 2010; Sebkova et al. 2012). The results of *in vitro* experiments may not entirely reflect the situation *in vivo* and exhibit the same results. For these reasons, an alternative approach to the previous experiment was devised, except that 17 β -estradiol was administered through drinking water and thus its action was *in vivo*. During the experiment, we measured the extent of protein tyrosine phosphorylation in two different sperm counts. The first sample was prepared from individuals who were exposed to 17 β -estradiol only at the time of puberty (pubertal), thus limited time, and the second of the males who had been exposed to this hormone starting at birth (continuous). Between experimental groups and controls, the most pronounced differences in protein tyrosine phosphorylation rate were detected in a continuous group. These differences were then further corroborated by immunofluorescence labeling, SDS-PAGE electrophoresis, CTC assay and using the *Tff1* gene expression rate.

In summary, our data imply that *in vivo* exposure to 17 β -estradiol 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 premature calcium influx. These processes lead to a decreased ability of sperm to undergo an AR. Based on this evidence, *in vivo* exposure to 17 β -estradiol can lead to a decrease of the fertilising potential in male mice with significant relevance to endocrine-disrupting compounds with estrogenic activity.

Conclusions of supplements III. and IV.

The environmental concentrations of estrogenic disruptors gradually increase and pose a considerable hazard for reproductive capability in immediate future. Even though, environmental concentrations of individual substances appeared to be low and had negligible effect on development, these endogenous disruptors have generally a considerable cumulative effect resulting in a markedly reduced fertility of the individual.

References

- Akingbemi, B.T., 2005. Estrogen regulation of testicular function. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3(1), s.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.
- Baldi, E. et al., 2009. Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: facts and fictions. *Molecular and cellular endocrinology*, 308(1), s.39–46.
- Böcskei, Z. et al., 1992. Pheromone binding to two rodent urinary proteins revealed by X-ray crystallography. *Nature*, 360, s.186–188.
- Boudjelal, M., Sivaprasadarao, A. & Findlay, J.B., 1996. Membrane receptor for odour-binding proteins. *Biochem J*, 317 (Pt 1, s.23–27.
- Carreau, S. & Hess, R.A., 2010. Oestrogens and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 365(1546), s.1517–1535.
- Cerna, M. et al., 2017. The vagina monologues: differential regulation of lipocalin expression (OBP, MUP) throughout the mouse estrous cycle. *Scientific reports*, In revisio.
- Colborn, T., vom Saal, F.S. & Soto, A.M., 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect*, 101.
- 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-.
- Ded, L. et al., 2010. Effect of estrogens on boar sperm capacitation in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(1), s.87.
- Ecroyd, H., Jones, R.C. & Aitken, R.J., 2003. Tyrosine Phosphorylation of HSP-90 During Mammalian Sperm Capacitation I. *Biology of reproduction*, 69(6), s.1801–1807.
- 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.
- 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.
- 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.
- Free, M.J. et al., 1979. Collection of rete testis fluid from rats without previous efferent duct ligation. *Biology of reproduction*, 20(2), s.269–278.
- 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.
- Ganforina, 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.
- 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.
- Gray, L.E. et al., 1999. Environmental antiandrogens: low doses of the fungicide vinclozolin alter sexual differentiation of the male rat. *Toxicology and Industrial Health*, 15(1), s.48–64.
- 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.
- 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.
- 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.
- Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U. & Andrews, N.C., 2005. Contents, Ed. Board + Forthc. articles. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(3), s.i.
- Hoffmann, F., Musolf, K. & Penn, D.J., 2012. Spectrographic analyses reveal signals of individuality and kinship in the ultrasonic courtship vocalizations of wild house mice. *Physiology & Behavior*, 105(3), s.766–771.
- Hurst, J.L., 2009. Female recognition and assessment of males through scent. *Behavioural Brain Research*, 200(2), s.295–303.
- 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.
- 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.
- 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.
- Logan, D.W., Marton, T.F. & Stowers, L., 2008. Species specificity in major urinary proteins by parallel evolution. *PLoS one*, 3(9), s.e3280.
- 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.
- 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.
- 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.
- Noguchi, K., Tsukumi, K. & Urano, T., 2003. .2003_Noguchi_Qualitative and Quantitative Differences in Normal Vaginal Flora of Conventionally Reared Mice, Rats, Hamsters, Rabbits, and Dogs. , 53(4), s.404–412.
- Pelosi, P., 1994. Odorant-Binding Proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 29(3), s.199–228.
- 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.
- 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.
- 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.
- Saito, K. et al., 2000. Molecular evidence of complex tissue- and sex-specific mRNA expression of the rat $\alpha_2\mu$ -globulin multigene family. *Biochemical and biophysical research communications*, 272(2), s.337–344.
- 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.
- 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.
- Sharrow, S.D. et al., 2002. Pheromone binding by polymorphic mouse major urinary proteins. , s.2247–2256.
- 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.
- 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.
- 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, 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., 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., 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.
- Strong, R., Akerstrom, B. & Borregaard, N., 2005. Siderocalins. *Lipocalins. Austin: Landes ...*, (Lipocalin 2), s.1–17.
- 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.
- 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.
- Urade, Y., Eguchi, N. & Hayaishi, O., 2013. Lipocalin-type prostaglandin D synthase as an enzymic lipocalin.
- 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. et al., 1995. Capacitation of mouse spermatozoa. *Development*, 121, s.1129–1137.
- Yip, K.S. et al., 2013. Changes in mouse uterine transcriptome in estrus and proestrus. *Biology of reproduction*, 89(1), s.13.
- 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.

Methods

Necroscopy in mice

Sperm capacitation (mice)

Cytological techniques (preparing of cell slides, cytological staining)

Induction of acrosome reaction

Indirect immunofluorescence (sperm cells)

SDS–PAGE electrophoresis and immunoblotting

Chlortetracycline fluorescent assay (CTC assay)

Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) of *Tff1* gene

Measurement of the E2 (17 β -estradiol) serum levels

Nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis (nLS/MS²)

Transcriptom sequencing GS Junior (Roche)

Statistical methods (PLGEM)

Bioinformatics analysis:

Gene ontology analysis (PANTHER)

Protein structures (RCSB Protein Data Bank)

Phylogenetic analysis (MEGA)

Statistical methods (PLGEM)

List of publications

Publications related to the thesis

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)

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; 2017)

In vivo exposure to 17 β -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; 2017)

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

Other publication

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)

Curriculum vitae

Personal data:

Martina Černá

born on 31st January 1984 in Prague (Czech Republic)

Work address:

BIOCEV

Biotechnology and Biomedicine Center of the Academy of Sciences
and Charles University in Vestec

Průmyslová 595

252 42 Vestec

Personal address:

Hlivická 417, Praha 8, 181 00

martina.biology@gmail.com

tel: +420 607 517 233

Education:

- 5/2010 - present Charles University, Faculty of Science, Department of Developmental and cell biology, BIOCEV, Biotechnology and Biomedicine Center of the Academy of Sciences and Charles University in Vestec, Prumyslova 595, Vestec, 252 42, Czech Republic, doctoral degree (thesis: Chemical signals and reproductive processes of the house mouse (*Mus musculus*), supervisor: Doc. Mgr. Pavel Stopka, Ph.D.)
- 10/2009 - 4/2010 Charles University, Faculty of Science, Department of Developmental and cell biology, Laboratory of Cell Division Control, Institute of Animal Physiology and Genetics, v.v.i., Academy of Sciences of the Czech Republic, Rumburska 89, 277 21 Libechov, Czech Republic, doctoral degree (thesis: Aneuploidy in mammalian oocytes, supervisor: MVDr. Martin Anger, Ph.D.)
- 2007 - 2009 Charles University, Faculty of Science, Department of Developmental and cell biology, Institute of Animal Science, Pratelstvi 815, Praha-Uhrineves, 104 00, Czech Republic, master degree (thesis: Chemical enucleation in mammalian oocytes, supervisor: Doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph.D.)
- 2004 - 2007 Charles University, Faculty of Science, Department of Developmental and cell biology, bachelor degree (thesis: Porcine endogenous retroviruses with regard to xenotransplantations, supervisor: Doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph.D.)

Courses:

- 9/2014 Pedagogical minimum for teaching at primary and high school (Charles University)
- 11/2014 Training course to obtain a certificate of professional competence pursuant to § 17 paragraph 1 Act No. 246/1992 Coll., the protection of animals against cruelty, as amended. In Czech Republic

Conference:

15. -17.10.2015 Development & Cell Biology, PhD Conference in Svaty Jan pod Skalou (6th)
19. - 24.7.2015 Gordon Research Conference on Fertilization & Activation of Development Holderness School in Holderness, NH, USA
- 30.10.-1.11.2014 The central European meeting on genes, gene expression and behaviour (6th), Nove Hradky, Czech Republic
- 13.10.-15.10.2013 The central European meeting on genes, gene expression and behaviour (5th), Nove Hradky, Czech Republic
- 17.-19.10.2013 Development & Cell Biology, PhD Conference in Svaty Jan pod Skalou (5th)
- 14.7.-19.7. 2013 Gordon Research Conference on Fertilization & Activation of Development, Holderness School in Holderness, NH, USA
- 26.-29.5. 2011 XVII Symposium of the Czech Reproductive Immunologists

Grant:

- 2013 Travel grant from Hlavkova nadace