

Katedra parazitologie
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy

Hlavní močové proteiny v parazitologii

Bakalářská práce

Denisa Hladovcová

Školitel: Prof. RNDr. Jaroslav Flegr, CSc.

Praha 2008

Děkuji školiteli Jaroslavu Flegrovi za trpělivost, inspiraci a svobodu, Pavlovi Stopkovi, bez něhož by práce nikdy nevznikla, rodičům, bez kterých bych se zbláznila a všem, co mi pomohli a pomáhají.

Denisa Hladovcová

Obsah

Abstrakt	4
Úvod	5
Část I. MUPy (Hlavní močové proteiny)	
1. Obecná charakteristika	6
2. Zařazení a struktura MUPů	
a. Lipocaliny	8
b. Struktura MUPů	9
c. Ligandy přenášené MUPy	10
d. <i>MUP</i> geny a jejich uspořádání	13
3. Produkce MUPů a její regulace	
a. Vliv pohlaví a genetického pozadí na produkci MUPů	14
b. Vliv hormonů na produkci MUPů	16
c. Místa exprese MUPů	17
4. Signální molekula a přenos signálu	
a. Nositel informace	18
b. Vylučovací funkce MUPů	19
c. Přenos signálu	19
5. Funkce a sociální efekty MUPů	
a. Rozpoznání individua	20
b. Značení teritoria	21
c. Vliv MUPů na chování samic	21
d. Možné výhody parazita plynoucí z pozměněné produkce MUPů	23
e. Rozpoznání infikovaného zvířete	23
6. Závěr I	24
Část II. Produkce MUPů u myší nakažených prvokem <i>Toxoplasma gondii</i>	
a. Úvod: Prvok <i>Toxoplasma gondii</i>	25
b. Naše pokusy a interpretace výsledků	25
d. Závěr II	27
Přílohy	
Příloha 1: Graf výsledných hodnot třetího pokusu	28
Příloha 2: Metodika	29
Příloha 3: Virulentní versus avirulentní kmeny prvoka <i>Toxoplasma gondii</i>	30
Příloha 4: Citlivost myší kmene C57BL/6 k perorální infekci	30
Citovaná literatura	31

Abstrakt

Hlavní močové proteiny (MUP, Major Urinary Proteins) jsou feromonové přenašeče vylučované s močí myši (*Mus*). Mají důležitou úlohu jak v mezidruhové tak vnitrodruhové komunikaci. Zprostředkovávají informaci o druhu, pohlaví, věku, sociálním postavení a připravenosti k rozmnožování jedince. Jsou produkovány především játry, kde u samců mohou tvořit až 5% veškeré mRNA. Produkce je velmi náročná a ovlivněná pohlavním výběrem. Produkce MUPů zatím nebyla příliš studována u zdravotně nestandardních zvířat. Vzhledem k tomu, že MUPy jsou hlavním komunikačním prostředkem myši, je možné, že dochází k změně jejich produkce po infekci parazity. Může se jednat jak o změnu cílenou, způsobenou parazitem (manipulační hypotéza), tak o vedlejší vliv infekce. V této práci se zabývám teoretickými vlivy parazita na produkci MUPů a mechanismy, kterými by k těmto změnám mohlo docházet. Ve druhé části práce uvádím vlastní výsledky, neboť představa změněného fenotypu hlavních močových proteinů vlivem parazita není založena pouze na teorii. Z výsledků vyplývá změna v produkci MUPů u myši nakažených prvokem *Toxoplasma gondii*. Tato změna je pohlavně ovlivněná, její závislost na kmenu parazita v kombinaci s použitým kmenem myši je třeba dále studovat.

Abstract

Major Urinary Proteins (MUPs) are pheromone transporters exuded with mice urine. They are important both in interspecies and intraspecies communication. They convey information about species, sex, age, social status and readiness of an individual to mate. MUP production takes place especially in the liver; mRNA for MUPs in males represents 5% of total liver mRNA. MUP production is very exacting and is under sexual selection. So far nothing has been reported about MUP production of unhealthy animals. Considering that MUPs represent the main communication mode of mice, it is possible that their production is modified after infection with parasites. This modification can be either targeted, increasing the chance of a parasite to survive or reproduce (manipulation hypothesis) or result as side effect of infection. Here I deal with theoretical possibilities of effects of parasite infection potentially leading to changes in MUP production. My own findings are formulated in the second part of the thesis, supporting these theoretical considerations. Our results show that MUP production is modified in mice infected by protozoan *Toxoplasma gondii*. The change is sex-dependent, and it is necessary to further study its dependence on the parasite strain in combination with mouse strain.

Key words

Major Urinary Proteins, MUP, parasites, *Toxoplasma gondii*, infection, pheromon-bindings proteins

Úvod

Čich je jedním z nejstarších smyslů. Jeho prostřednictvím získávají živočichové informace jak o neživém prostředí tak o dalších organismech. V sociálním prostředí je čich nezbytným pro odlišení individuí, při výběru sexuálního partnera a identifikaci příbuzných jedinců či nepřítele.

Komunikace pomocí čichu je zprostředkována signalizačními molekulami a jejich receptory. Při signalizaci pomocí malých těkavých molekul je přenos informace zahájen transportem signální molekuly speciálním proteinem ven z těla, kde je signální molekula uvolněna. Ze vzduchu je zachycena dalším proteinovým transportérem. Po vazbě na chemoreceptory čichového epitelu a vomeronasálního orgánu je signál nesen receptorovými neurony a zpracován různými oblastmi mozku. Vnímání pachu tak může být jak vědomé tak nevědomé.

Má-li být pach využit ke komunikaci, musí být jím obsažená informace obměnitelná. Na úrovních receptorů je možnost modulace signálu vzhledem k omezenému počtu receptorů poměrně nízká, snazší cestou je pozměněná produkce signálních molekul či transportních proteinů.

Funkci transportních proteinů přenášejících látky feromonové povahy mají u hlodavců Major Urinary Proteins (MUPs, česky hlavní močové proteiny) (o feromonech více viz BOX 1: Definice feromonů). Jedná se o významnou složku moči a slin hlodavců. Produkce těchto proteinů ovlivňuje množství z těla vynesených feromonů. Proteiny samy uvolňují jimi nesené ligandy po různě dlouhých časových intervalech a tak umožňují modulaci signálu na další úrovni. Produkce MUPů je druhově, pohlavně a sociálně závislá. Souvisí také se zdravotním stavem zvířat, není ale zatím příliš známo, jak je produkce ovlivněna parazitací.

Modulace pachového signálu po nákaze parazity je známým fenoménem, který zatím nebyl s produkcí MUPů spojován. V této práci se pokusím shrnout dosavadní poznatky o těchto proteinech a zdůraznit možné styčné plochy s poznatky parazitologie. Na závěr bych ráda uvedla vlastní výsledky, neboť myšlenka změny produkce MUPů po interakci s parazitem již v současné době není založena pouze na teorii. Z našich dosavadních pokusů vyplývá, že produkce MUPů u myši je po infekci parazitem *Toxoplasma gondii* pozměněna.

Část I. MUPy

1. Obecná charakteristika

MUPy jsou komplexem polymorfních proteinů schopných vázat, přenášet a chránit látky feromonové povahy. Jsou produkovány především v játrech a přes ledviny uvolňovány do moči v poměrně vysoké koncentraci. Byly objeveny Parfentjevem roku 1932 u laboratorních myší (Rumke and Thung, 1964) a původně byla jejich produkce považována za patologický jev (proteinurie) vzniklý jako následek inbredu. K prokázání přirozenosti jevu přispělo jak objevení rozdílného fenotypu mezi pohlavími, tak odběr moči z myší odchycených ve volné přírodě. Od roku 1956 je také znám vliv hormonu testosteronu, kdy samice po jeho podání vykazují fenotyp močových proteinů podobný samčímu (Trunk, 1956; Finlayson et al., 1965).

Funkcí MUPů je transport a ochrana feromonů jak ve vnitřním, tak vnějším prostředí, kde také umožňují jejich postupné uvolňování (Hurst et al., 1997; 1998). Ligandy, těkavé látky, které se uvolňují z vysychajících MUPů, stimulují nejen hlavní čichový epitel, ale i vomeronasální orgán. MUPy hrají důležitou roli ve vnitrodruhové i mezidruhové komunikaci (Bowers and Alexander, 1967; Christophe and Baudoin, 1997). Díky vysokému polymorfismu a různým koncentracím tvoří fenotyp specifický jak pro druhy, tak i pro jedince a pohlaví (Arakawa, 2007). Fungují jako mezidruhová reprodukční bariéra, slouží při značení teritoria a snižují rizika přímého střetu mezi jedinci. Vypovídají o sociálním postavení a zdravotním stavu jedince, což je důležité při volbě partnera. Vyvolávají nástup estru a mění se v průběhu estrálního cyklu samic (Bowers and Alexander, 1967).

MUPy patří mezi lipocaliny, rodinu extracelulárních proteinů s charakteristickou terciální strukturou molekuly. Ta je tvořena osmi antiparalelními β -listy a α -helix v blízkosti C-terminálního konce molekuly, společně tvořícími β -barel vyplněný až na výjimky hydrofobními aminokyselinami. Jejich vzájemné působení udržuje tvar kapsy a umožňuje navázání malých hydrofobních molekul. Molekulární hmotnost MUPů je přibližně od 18 do 20 kDa, a jsou kódovány 35 geny na 4. chromozomu (Krauter, 1982). Dnes je známo nejméně 14 isoformů těchto proteinů (Robertson et al., 1996).

MUPům podobné lipocaliny můžeme najít také u dalších hlodavců. U hrabošů (*Microtus*) se nenacházejí v moči, ale ve slinách (Stopka et al., nepublikováno). To také vysvětluje sociální chování hrabošů, kteří se po setkání s jiným jedincem čistí a olizují si srst (Leopard et al, 2005,) Roztírání slin po velkém povrchu srsti umožní rychlé vyschnutí MUPů a následné uvolnění ligandů. Vyslaný pachový signál je tak intenzivní a krátkodobý (Ferkin and Leonard, 2008).

Obdobou MUPů jsou u krys (rod *Rattus*) alfa2u-globuliny (Bond, 1960; Hastie et al., 1979); podobné vlastnosti vykazují i další molekuly, například afrodisin u křečků (rod *Mesocricetus*) jeden z prvních objevených feromonů u savců vůbec (Vincent et al., 2001).

BOX 1: Charakteristika feromonů a kairomonů

Slovo feromon pochází z řeckých slov pherein (transportovat) a hormone (stimulovat, dráždit) a dobře vystihuje povahu těchto látek. Feromony přenášejí informaci, jsou schopné spouštět fyziologické reakce příjemce a ovlivňovat jeho chování (Karlson and Lüscher, 1959). Mají tedy dvojí funkci, za prvé informují příjemce (Releaser and Informatory pheromones), za druhé umožňují modulovat jeho chování jinými jedinci (Primer and Modulatory pheromones). Chemicky se jedná o široké spektrum látek a protože se většinou jedná o malé reaktivní molekuly, bývají závislé na svých proteinových přenašečích. První látky s vlastností feromonů byly prokázány u bource morušového v roce 1956 (Gräter et al., 2006), prvenství mezi savčími feromony získal náhodou objevený afrodisin (více viz BOX 2: Je afrodisin feromonem?) (Vincent et al., 2001). Dnes je známa chemická struktura minimálně 3982 feromonů.

Feromony jsou prostředkem vnitrodruhové komunikace, kairomony komunikace mezidruhové. Obecně známé jsou kairomony jako látky uvolňované predátorem, dle kterých je potenciální kořist schopná vytušit jeho přítomnost. V některých definicích má z uvolňování kairomonů zisk pouze příjemce (www.wikipedia.com, www.biology-online.org, www.top500.de/lexikon). Tyto definice jsou nevhodné pro kairomony, které jsou specificky produkovány rostlinou napadenou škůdci. Uvolněné látky mají přilákat predátory, kteří jsou přirozenými nepřáteli škůdců rostliny (de Moraes et al. 1998).

Další informace na: www.pherobase.com

BOX 2: Je afrodisin feromonem?

V odborné literatuře je afrodisin nazýván feromonem (Sex Feromon). Obecně bývají za feromony považovány malé těkavé molekuly interagující přímo s receptorem. Této definici feromonu afrodisin neodpovídá, neboť je proteinem tyto ligandy vázajícím. Nicméně v textu ho feromonem nazývám v souladu s konvencí.



Afrodisin naznačen bíle, tmavá plocha vymezuje dutinu

Obrázek převzat z: Vincent et al., 2001

2. Zařazení a struktura MUPů

Lipocaliny

Lipocaliny, mezi něž MUPy patří, zahrnují velkou rodinu malých sekretovaných proteinů s obdobnou terciální strukturou a jí podmíněnou schopností přenášet jiné malé hydrofobní molekuly v tělních tekutinách. Jejich malá velikost je výhodná při průchodu přes membrány pomocí pasivní difuze. Lipocaliny se uplatňují při mnoha fyziologických pochodech, kde slouží především k transportu. Kromě MUPů do této velké proteinové rodiny patří např. výše zmiňovaný alfa_{2u}-globulin, vyskytující se v moči potkanů, afrodisin z vaginálního sekretu krečků (Vincent et al., 2001), FABPs (mastné kyseliny vázající protein), pyrazin vázající protein, jehož podobnost s MUPy byla studována již v roce 1986 (Cavaggioni et al., 1987). Některé lipocaliny jsou schopné vázat hormony (např. Apo D, který mimo jiné přenáší hormony progesteron a pregnenol (Balbin et al., 1990), nebo mohou být zapojené do imunitních pochodů - APPs (protein akutní fáze, předpokládají se u něj protizánětlivé účinky (Flower, 1996)), HNL (human neutrophil lipocalin) je specifickým ukazatelem aktivace neutrofilů (Mohammed et al., 2002). Komplexy proteinů a jimi přenášených molekul se vyskytují u bezobratlých (feromon vázající protein u bource morušového-BmorPBP) a dokonce i u bakterií (Flower, 1996; Gräter et al., 2006). Zastoupení v tak široké škále organismů (jak eukaryotických, tak prokaryotických) ukazuje na velmi starý původ.

Z oblasti lékařské entomologie je známo hned několik (minimálně 13) lipocalinů, souhrnně nazývaných antihemostatické lipocaliny. Vznikly vzájemně nezávisle u několika skupin krevsajících hmyzu (Montfort et al., 2000). Ze slin klíštěte *Rhiphicephalus appendiculatus* byl izolován lipocalin, jehož funkcí je vázat histamin a bránit tak vzniku zánětlivé reakce. Na rozdíl od typických lipocalinů má tento protein dvě vazebná místa (více viz následující kapitola). Podobný lipocalin, navíc schopný vázat serotonin, obsahují sliny klíštěte *Dermacentor reticulatus*. Schopnost vázat serotonin je podle autorů studie adaptací na sání krve hlodavců, u kterých je serotonin důležitý při vzniku imunitní reakce (Sangamnatdej et al. 2002). Krev sající diptera a ploštice sdílejí D7 proteiny vázající navíc norepinefrin (Calvo et al., 2005). Kromě předchozích proteinů obsahují sliny ploštice další lipocalin, nitrophorin (NP2) který váže koagulační faktory IX, IXa (Ribeiro et al, 1995; Gudderra et al., 2005). Všechny tyto molekuly jsou potenciálně využitelné v lékařství, experimentálně byl prokázán pozitivní vliv proteinu vázajícího histamin v prevenci astmatu u myší (Couillin et al., 2004).

Pro lipocaliny je transportní funkce typická, existují ovšem výjimky. Prostaglandin D syntetáza (PGDS, respektive její forma L-PGDS) katalyzuje tvorbu PGD₂ uvolňovaného mastocyty. PGD₂ je vasodilatátor, antikoagulant a mediátor účastnící se zánětlivých a alergických reakcí (Urade and Hayaishi, 2000).

Struktura MUPů

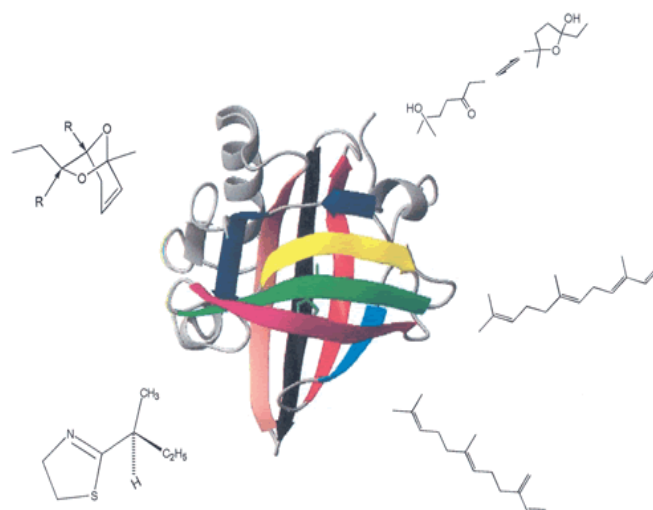
Na rozdíl od terciární struktury je primární struktura (tedy pořadí aminokyselin) jednotlivých MUPů poměrně odlišná; největší shodu vykazují tři krátké konzervativní sekvence v oblasti budoucí dutiny (kapsy) a tyto sekvence mohou být použity jako určující znak. Výjimkou jsou některé vzdálenější lipocaliny, které mají shodnou pouze jedinou sekvenci (Flower, 1996). Sekvenční rozdílnost nemusí být znakem odporujícím představě o evoluční příbuznosti proteinů - zdá se, že mnohem důležitějším měřítkem je podobnost výsledné struktury (terciální a vyšší struktury) zajišťující funkčnost. Podobným případem s obdobnou terciální a odlišnou primární strukturou mohou být heat-shock proteiny (Flaherty et al., 1990) či imunoglobuliny.

Sekundární struktura MUPů je charakteristická osmi antiparalelními β -listy, které tvoří tzv. β -souděk (β -barrel) eliptického tvaru, tedy strukturu s vnitřní dutinou. Jednotlivé β -listy jsou spojené β -vlásečkami (β -hairpinloops) a první (A) a poslední (H) β -list k sobě přiléhají. Šest vláseček je stejných (L2-L7), zatímco krajní smyčka (sigma loop) L1 na N konci proteinu (spojuje první dva listy A a B) je větší. Ta spolu s krátkou α -šroubovicí tvoří víčko (zátku) β -barelu. Tato část je důležitá s hlediska vazebné specifity a u různých proteinů se liší tvarem, velikostí i pozicí. Protější stranu soudku („dno“) pomáhá uzavírat krátká 3_{10} - α -šroubovice na C konci molekuly, která je napojená na H list. Sekundární struktura je konzervativní v β -listech, naopak smyčky podléhají změnám (Flower et al., 1993; Lucke et al., 1999).

Názvy a označení jednotlivých strukturních částí MUPů nejsou v publikacích jednotné, vyskytují se i odlišné názory na strukturu obou víček. Někdy bývá zmiňována třetí α -šroubovice v blízkosti N konce (Timm et al., 2001; Sharrow et al., 2002).

Vnitřek β -soudku je vyplněn převážně hydrofobními aminokyselinovými zbytky, které nemají pouze vazebnou funkci, ale zajišťují také stabilitu výsledné struktury. Jediným aminokyselinovým zbytkem nacházejícím se u všech lipocalinů je tryptofan 19 (Trp19), který

Obrázek 1: Struktura MUPu a některé ligandy



Mouse pheromones and their binding proteins.

Obrázek převzat z <http://novotny.chem.indiana.edu/>

má zřejmě u některých lipocalinů jak vazebnou, tak stabilizační funkci (Lucke et al., 1999). U MUPů se v hydrofobní kapse nacházejí také dvě molekuly H_2O , z nichž jedna je v blízkosti karbonylové skupiny a druhá u – OH skupiny (Kuser et al., 2001).

Ligandy přenášené MUPy

Umístění a orientace přenášených molekul je u různých lipocalinů odlišná. V případě MUPů je ligand umístěn hluboko v kapse, která je zcela zavřena „víčkem“. Většina ligandů je navázána v krevním řečišti a je tak chráněna před jeho hydrofobním prostředím. Mezi molekuly prokazatelně přenášené MUPy patří 2-sec-butyl-4,5-dihydrothiazol a dehydro-exobrevicomín, které se vyskytují nejčastěji (Cavaggioni and Mucigna-Caretta, 2000). Dalšími přenášenými ligandy jsou 4-(ethyl) fenol (Flower, 1996), E-alfa-farnesen, E-beta-farnesen, 6-hydroxy-6-methyl-3-heptanon a geraniol (Novotny et al., 1990). Všechny uvedené feromony (s výjimkou geraniolu) vyvolávají známou fyziologickou odpověď, např. thiazol a brevicomín navozují agresivní chování mezi kompetujícími samci (Novotny et al., 1985), zvyšují jejich atraktivnost z hlediska samic a jsou důležité při modulaci estrálního cyklu samic (více viz BOX 3: Ligandy přenášené MUPy)

Pro vytěsnění původních ligandů může být jako kompetitivní ligand použit menadion, který se v přirozeném stavu v MUPů nevyskytuje (Robertson et al., 1998).

BOX 3: Ligandy přenášené MUPy

FARNESEN



Zahrnuje šest podobných molekul, z nichž všechny jsou sesquiterpeny. Mohou se vyskytovat ve více isomerických formách, nejběžnější je (*E,E*)- α -Farnesen. Ten je obsažen v ovocných slupkách a je zodpovědný za typický pach jablek. Působí jako atraktant vábící škůdce jablek. Jiným hmyzem, termity, je používán jako poplašný signál.

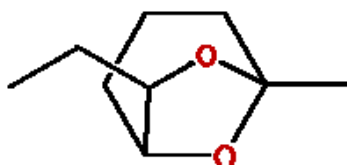
β -Farnesen naopak hmyz odpuzuje, je obsažen např. v míze lilkovitých.

Stimuluje agresivní chování u samic myši. Vyvolává a urychluje nástup puberty.

U samců je signálem dominance a zvyšuje jejich atraktivitu. U samic vyvolává synchronizaci estru.

(*E,E*)-3,7,11-Trimethyl-1,3,6,10-dodecatetraene

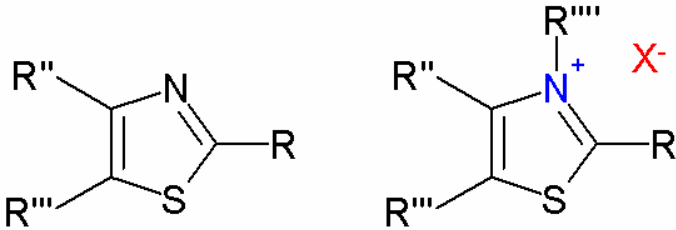
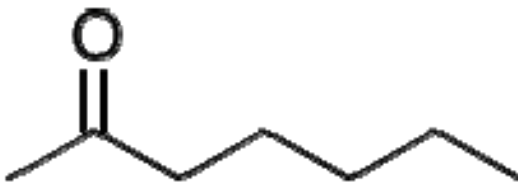
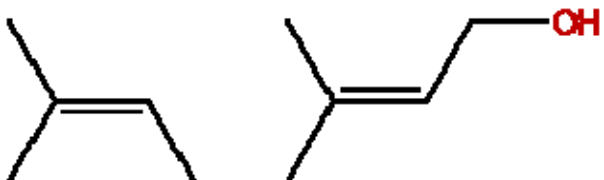
BREVICOMIN



exo-7-Ethyl-5-methyl-6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octane

Vyskytuje se ve dvou formách, exo-brevicommin a endo-brevicommin. Je atraktantem kůrovců.

U samic myši vyvolává synchronizaci estrů. Zvyšuje atraktivitu samců a vyvolává mezi nimi agresivní chování.

<p>THIAZOL</p>  <p>4,5-Dimethylthiazol</p>	<p>Aromatická sloučenina používaná při výrobě biocidů, léčiv a barev.</p> <p>U samic myši vyvolává synchronizaci estrů. Zvyšuje atraktivitu samců a vyvolává mezi nimi agresivní chování.</p>
<p>HEPTANON</p>  <p>5-hydroxy-4-methyl-3-heptanone</p>	<p>Keton vůní připomínající ovoce. Přidává se do potravin.</p> <p>Urychluje nástup puberty samic myši.</p>
<p>GERANIOL</p>  <p>(E)-3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol</p>	<p>Terpenoid, součást esenciálních olejů. Používá se při přípravě mnoha aromat. Některými rostlinami je využíván jako repelent proti hmyzu. Je produkován žlázami včel, hraje roli při lokalizaci úlu. Využíván jako atraktant. Je zapojen do syntézy jiných terpenoidů.</p> <p>Jako jediný z výše představených ligandů nevyvolává nástup estru u samic myši. Fyziologická odpověď na tento feromon není známá.</p>

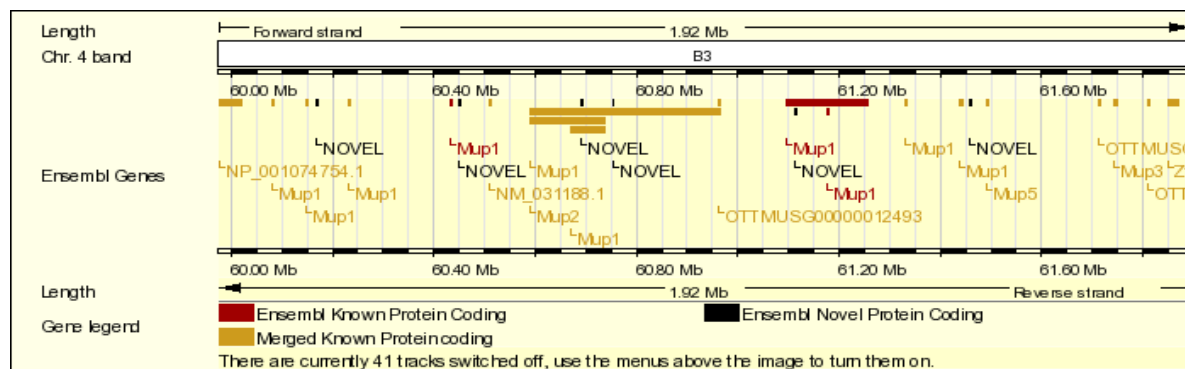
	Zdroje: www.pherobase.com www.wikipedia.com http://nikkajiweb.jst.go.jp/nikkaji_web/pages/top_e.html Novotný et al., 1990, 1999 Jemiolo et al.1986
--	--

Geny MUPů a jejich uspořádání

MUPy jsou kódovány nejméně 35 geny, které leží na čtvrtém chromozomu myši (Kauter et al 1982; Bennett et al. 1982; Bishop et al., 1982). Přítomnost několika kopií *MUP* genů je nejspíše způsobena tlakem na zvýšenou produkci MUPů. Ty jsou produkovány pod vlivem hormonů a jejich zvýšená hladina by mohla narušit rovnováhu endokrinního systému a ovlivnit mnohé další fyziologické pochody. Řešením tak může být zvýšení počtu kopií pro MUPy (o tomto principu více: Ohno, 1975).

Geny lze dle jejich sekvenční podobnosti rozdělit do dvou hlavních skupin (G1 a G2) a třetí menší skupiny (Bishop et al., 1982; Kuhn et al., 1984). Geny prvních dvou skupin tvoří 45kb dlouhou jednotku; každá jednotka obsahuje jeden gen z první a jeden gen z druhé skupiny orientované v opačném směru (head-to-head organisation). Samotný gen je 19kb, méně často až 25kb dlouhý (Clark et al., 1985; 1984). Z *Mup* genů vznikají alternativním setřihem dvě odlišně dlouhé mRNA, kratší se šesti exony o délce 750 nukleotidů a delší forma, která je hojnější, se sedmi exony o délce 882 nukleotidů. Geny ze skupiny G2 jsou transkribovány v mnohem menší míře než geny ze skupiny G1, vyskytují se zde pseudogeny s předčasnými terminační oblastmi a v exonu 3 došlo k posunu čtecího rámce a k dalším mutacím (Clark et al., 1985). K nejběžnějším mutacím patří substituce Lysin-Glycin, objevené při porovnávání produkce MUPů mezi inbredními kmeny (Robertson et al., 1996).

Obrázek 2: Část oblasti chromozomu 4 kódující některé *Mup* geny



Zdroj: www.ensembl.org

3. Produkce MUPů a její regulace

Vliv pohlaví a genetického pozadí na produkci MUPů

Fenotyp MUPů je závislý na kmeni a pohlaví zvířete (Finlayson et al., 1965;). U samců je produkce 10krát až 200krát vyšší než u samic a příslušná mRNA může tvořit až 5% veškeré jaterní mRNA (Hastie and Held, 1978). MUPy mohou tvořit až 90% všech proteinů přítomných v moči (vlastní výsledky, platí pro samce imberdního kmenu C57BL).

Do experimentů s parazitovanými zvířaty je proto vhodné zařadit obě pohlaví. U samců, jejichž exprese MUPů je značně vysoká a energeticky náročná (Beynon and Hurst, 2003), může dojít k jejímu snížení pouze z důvodů energetických. Snížení produkce může být vyvoláno snahou nakaženého jedince investovat více do imunitní obrany, nebo je energie využita v zájmu parazita (manipulace hostitelem).

U samic je v některých případech produkce natolik nízká, že změna nemusí být zaznamenána. Přesto mohou existovat paraziti, kteří modulují pouze pach samic. V tom případě by se mohlo jednat pravděpodobněji než v případě změny u samců o manipulační chování, neboť produkce MUPů u samic není tak energeticky náročná a její změna tedy nejspíše nebude souviset s energetickou náročností jejich syntézy.

Rozdíly v produkci u různých kmenů jsou dány odlišnými typy MUPů, jejich různým množstvím a poměrným zastoupením. Tvoří se tak typický fenotyp. V rámci inbredních linií *Mus domesticus* se vyštěpují dvě skupiny, vykazující vyšší podobnost fenotypu, danou společným předkem jedné ze skupin (Bennett et al., 1982; Robertson et al., 1996). U zástupců těchto dvou skupin BALB/c a C57BL/6 se sledovalo procentuální zastoupení tří z majoritních

proteinů, MUP1, MUP2 a MUP3. U kmene BALB/c převažuje produkce MUP1 (80% sledovaných MUPů) nad MUP2 (detekovatelné množství) a MUP3 (30%), u kmene C57BL/6 je MUP1 minoritní (20% sledovaných MUPů) a MUP2 je produkován ve stejném množství jako MUP3 (40% sledovaných MUPů). Skupina mající obdobné zastoupení těchto tři proteinů jako vykazuje kmen BALB/c bývá označována jako Mup-a1, skupina typově bližší C57BL/6 jako Mup-a2 (Kauter, 1982). Mup-a je označení pro lokus na chromozomu 4, způsobující výše zmiňovaný polymorfismus (Bennett et al, 1982). Další pokusy na těchto dvou kmenech potvrdily produkci různých MUPů s odlišným procentuálním zastoupením. Většina sledovaných MUPů se lišila pouze v několika sekvenčních pozicích s malým vlivem na proteinovou hmotnost (Robertson et al., 1996). Celková produkce aktuálně či potenciálně exprimovaných MUPů u těchto dvou kmenů se odhaduje až na 14 isoform (Beynon et al., 2002).

Genetické pozadí parazitovaného jedince může hrát v přírodě velkou roli. Obdobně důležité je vhodně zvolit inbrední kmen myši v experimentech. S odlišnými imunitními reakcemi známými z interakcí parazita s různými kmeny myši lze očekávat i různou produkci MUPů u nakažených zvířat.

V populaci divokých myši, neomezených inbreedingem, lze očekávat mnohem vyšší polymorfismus. Dva fylogeneticky blíže příbuzné poddruhy (BOX 4: druh versus podruh) *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* mají fenotyp močových proteinů odlišný, a to jak co do množství, tak do zastoupení jednotlivých isoform. Produkce je odlišná jak u samců a samic stejného druhu (pohlavní dimorfismus, jak bylo zmiňováno výše), tak mezi jedinci stejného pohlaví u odlišných druhů (tedy např. samice obou poddruhů mají odlišný fenotyp). Nejvíce MUPů nalezneme v moči u samců *M. m. musculus*, méně pak v moči samců *M. m. domesticus*. Samice *M. m. musculus* produkují MUPů nejméně, tedy méně než samice *M. m. domesticus*. Intervaly naměřených hodnot u samců obou druhů se nepřekrývají, tedy samec *M. m. musculus* s nejnižší produkcí v má více MUPů než samec *M. m. domesticus* s produkcí nejvyšší. To může sloužit k odlišení samců, tedy určení jejich poddruhu. Z předchozího textu vyplývá, že existuje pohlavní dimorfismus MUPů, který je druhově (tedy v našem případě poddruhově) specifický. MUPy tak mohou sloužit jako mezidruhová reprodukční bariéra. (Stopková et al., 2007). Chování jedinců těchto druhů je v souladu s představou, kterou máme ze znalostí produkce MUPů. Samice *M. m. musculus* jsou vybíravější než samice *M. m. domesticus* při volbě partnera a páří se výhradně se samci svého poddruhu (Christophe and Baudoin, 1998). Tomu odpovídá produkce MUPů jejich samců, která je vyšší než produkce samců *M. m. domesticus*. Naopak samice *M. m. domesticus* nemají tak silně vyhraněnou preferenci pro pach svého poddruhu (Muclinger and Frynta, 1997).

Kříženci F1 generace mezi těmito dvěma poddruhy, kde v prvním případě byla matka *M. m. musculus* a otec *M. m. domesticus*, preferovali pach *M. m. musculus* u obou pohlaví, v případě druhém, tedy byla-li matka *M. m. musculus* a otec *M. m. musculus*, volily samice F1

generace pach *M. m. musculus*, zatímco samci neměli vyhraněné preference. Byl-li tedy nějaký rozdíl v upřednostňování určitého pachu, jednalo se vždy o preferenci pachu *M. m. musculus*. Tento mechanismus by mohl vysvětlit přítomnost některých alel *M. m. domesticus* v genomu *M. m. musculus* u myši v hybridní zóně. (Christophe and Baudoin, 1998).

Vnitrodruhovou variabilitu v produkci MUPů ovlivňují události, kterými druh v minulosti prošel a současné ekologické faktory. Zajímavé výsledky přinesla analýza provedená na vzorcích moči myši dovezených z ostrova Isle of May u Skotska. Šlo o prostorově omezenou populaci, kde se navíc v důsledku nízkého přežívání zimy projevoval efekt hrdla láhve (bottleneck). Mezi samci byla nízká úroveň agresivity a kompetice, teritoria se značně překrývala. V porovnání s jedinci odchycenými na kontinentě měli ostrovní jedinci vzájemně podobnější fenotyp MUPů, tedy nižší individuální variabilitu. V celkové komplexitě přesahovali někteří jedinci zástupce z inbredních kmenů (BALB/c, C57BL/6) (Beynon et al., 2002).

BOX 4: druh versus poddruh

Druh *Mus musculus* tvoří dva poddruhy, *M. m. musculus* a *M. m. domesticus* (Boursot et al. 1993). Důvodů, proč se nejedná o samostatné druhy je několik. Jedinci vzniklí křížením mohou být fertilní, nedochází vždy k jejich sterilitě jak tomu bývá u křížení jedinců různých druhů (Britton-Davidian et al., 2004), jsou ovšem náchylnější k nákaze parazity (Derothe et al, 2000). Oddělení poddruhů je podpořeno metodami molekulární fylogenetiky (Christophe and Baudoin, 1997).

Na pomezí areálů rozšíření obou druhů dochází k vytvoření hybridní linie, kde se oba poddruhy mísí (Boursot et al. 1993). Alely genů *M. m. domesticus* najdeme spíše genomu *M. m. musculus* než naopak, je to způsobeno menší vybíravostí samic *M. m. musculus* při volbě partnera (Christophe and Baudoin, 1997).

Vliv hormonů na produkci MUPů

Vliv hormonů na produkci MUPů byl prokázán na samicích a kastrovaných samcích, kterým se po podání testosteronu zvýšila exprese až na běžnou úroveň nekastrovaných samců (Hastie et al., 1979). Možným mechanismem působení testosteronu by mohly být strukturní a funkční změny v mitochondriích jaterních buněk, neboť játra jsou hlavním místem syntézy MUPů. Testosteron zároveň zvyšuje aktivitu lysozomálních vakuol některých jaterních buněk, což by také mohlo mít na produkci MUPů vliv (Koenig et al., 1980). Nutným předpokladem podmiňujícím vliv testosteronu na produkci jaterních MUPů je přítomnost funkční štítné žlázy (Knoph et al. 1983).

Mezi další hormony ovlivňující produkci MUPů patří glukokortikoidní hormon, tyroxin a růstový hormon, které po podání v různých kombinacích spolu s testosteronem tvoří odlišné proteinové fenotypy (Knoph et al. 1983). Růstovému hormonu je někdy připisována zásadnější funkce - tento hormon má být namísto testosteronu zodpovědný za zvýšení produkce na samčí úrovni. Samice s nedostatkem růstového hormonu totiž po podání testosteronu produkci nezvýší, ta se vyrovná až po podání růstového hormonu (al-Shawi, 1992). Růstový hormon je tedy nezbytným předpokladem zvýšení produkce MUPů po podání testosteronu.

Vliv hormonů na produkci MUPů je tkáňově specifický (Kuhn et al., 1984), například testosteron nemá vliv na produkci MUPů v podčelistní žláze (Knoph et al., 1983).

Existuje mnoho parazitů, po jejichž nákaze se změní hladiny některého z výše jmenovaných hormonů (*Toxoplasma*, *Leishmania*). Posuny v hladinách hormonů bývají způsobené blízkou provázaností se složkami imunity (Liesenfeld, 2001; Roberts, 2001), v některých případech může jít přímo o cílené hormonální změny např. při feminizaci hostitele. Bylo by zajímavé zjistit, jaký fenotyp MUPů mají jedinci, u kterých dochází následkem parazitace k feminizaci. Produkce MUPů by se mohla blížit hodnotám samic, parazit by si tak zajistil například snížené agresivní chování vůči jeho hostiteli (více viz funkce a efekty MUPů). Vhodným kandidátem by mohla být *Taenia solium*, neboť myš je jejím přirozeným hostitelem. Samci napadení touto tasemnicí mají 200krát vyšší hladinu estradiolu a sníženou hladinu testosteronu na pouhých 10% v porovnání s normálními samci (Larralde et al, 1995). U zvířat s takovým posunem v produkci hormonů bych také očekávala změnu fenotypu produkovaných MUPů.

Místa exprese MUPů

MUPy jsou syntetizovány v šesti odlišných tkáních, hlavním místem syntézy jsou játra, žláza slzná, podčelistní, příušní, podjazyková a žlázy mléčné (Kun et al., 1984; Shanan et al., 1987). Syntéza v játrech začíná okolo puberty, tedy ve stáří 4-5 týdnů (Shanan et al., 1987; Arakawa, 2007). Procentuální zastoupení produkce jednotlivých typů MUPů v různých tkáních se je

závislé na kmeni, věku a pohlaví zvířete (Knoph et al., 1983; Shanan et al., 1987). V boxu č.5 je jako příklad vybrána produkce u myši kmene BALB/c, kde jednotlivé typy MUPů jsou označeny římskými číslicemi. Jak již bylo zmíněno, jedná se o odlišné isoformy.

Zasažení určité tkáně parazitem by mohlo mít specifický vliv na fenotyp MUPů. Zdá se, že případ snížené produkce v důsledku postižení jater se nám podařilo poodhalit u myši nakažené prvokem *Toxoplasma gondii* (více viz druhá část práce). Není znám parazit, který by byl specificky lokalizován v některé ze jmenovaných žláz, naopak játra (už z důvodů své velikosti) bývají zasažena často. U zvířat s poškozenými játry je změna produkce MUPů velmi pravděpodobná.

BOX 5: Orgánově specifická produkce MUPů u myši kmene BALB/c

V mléčné žláze je syntetizována mRNA pro MUP II, tvoří zde 0,02% celkové mRNA. Jedná se o MUP identický s MUPem syntetizovaným v játrech. V příušní žláze probíhá syntéza mRNA pro MUP IV u mladých jedinců a mRNA pro MUP VI u jedinců dospělých, kde tvoří 0,02% celkové produkce mRNA. MUP IV má v genomu pouze jednu kopii, syntéza jeho mRNA probíhá také v slzné žláze. V obou těchto žlázách je produkce ovlivněna pohlavím myši, u samců je vyšší. S přibývajícím věkem myši se syntéza tohoto MUPu snižuje. V podjazykové žláze je syntetizována mRNA v závislosti na věku zvířete obdobně jako u žlázy příušní. V podjazykové žláze se jedná o mRNA pro MUP V u mladých jedinců a mRNA MUPu IV u jedinců dospělých, u kterých tvoří 1% celkově syntetizované mRNA.

U MUPu IV se neliší produkce mezi pohlavími, jak je tomu u stejného MUPu produkovaného v příušní a slzné žláze. V podčelistní žláze je syntetizována mRNA pro MUP V, její produkce není závislá na stáří a ani na pohlaví myši. V slzné žláze je syntetizována hlavně mRNA pro MUP IV, ve 100krát menším množství také mRNA pro MUP V. V játrech se syntetizuje mRNA pro MUPy I, II, III, syntéza je pohlavně regulována. (Knoph et al., 1983)

4. Signální molekula a přenos signálu

Nositel informace

O signální úloze přenášených feromonů není pochyb (viz BOX 1: Charakteristika feromonů a kairomonů), otázkou však zůstává samotná role MUPů. Model, ve kterém MUPy přímo interagují s receptory a jsou tak samotnými nositeli informace, se nazývá přímý. Jako nepřímý model je označována alternativa, kde s receptory interagují pouze feromony. Přes poměrně

velký zájem vědců zatím neexistuje k otázce signální molekuly jednoznačné stanovisko, i když aktuální názory se kloní spíše k nepřímému modelu (Marchlewska-Koj et al., 2000; Beynon et al. 2002; Nevison et al., 2003) Přesto byl roce 2007 publikován v časopise Nature článek snažící se doložit přímý vliv MUPů (bez jejich ligandů) na modulaci agresivního chování mezi samci. Tradičně je považován za molekulu stimulující agresivní chování samců farnesen, který dle autorů publikace přítomen nebyl.

Výsledky některých prací ukazují, že na epitelu vomeronasálního orgánu existují proteinové přenašeče (Sharrow et al, 2007) či receptory strukturně velmi podobné lipocalinům, které dále přebírají uvolněné ligandy (Miyawaki et al., 1994). Jejich přítomnost by mohla být matoucí, neboť by mohly být považovány za interagující MUPy. Při pokusech mohlo také dojít k použití nedostatečně vyčištěných MUPů a následné pozorování aktivity zbylých ligandů.

Rozpory ve výsledcích jednotlivých studií mohou být také způsobeny sledováním odlišných fyziologických reakcí, ve kterých mohou mít MUPy rozdílné funkce. Přímý model aktivace receptorů by mohl platit například při vyvolání nástupu estru samic, naopak agresivní chování samců by mohlo být aktivováno přenesenými ligandy.

Vylučovací funkce MUPů ?

Je možné, že MUPy původně sloužily jako molekuly transportující z těla škodlivé látky. Mezi lipocaliny by se nejednalo o výjimku, mnohé z nich jsou do vylučování škodlivin zapojeny. V této souvislosti jsou zajímavé výsledky z pokusů s myšmi nemocnými heterochromatosou. Jedná se o dědičné onemocnění způsobené mutací v genu *HFE* (Feder, 1996). U lidí se projevuje vysokou absorpcí železa v trávicím traktu (Fleming and Sly, 2002) a spolu s dalšími okolnostmi se podílí na vzniku závažných onemocnění (diabetes, srdeční poruchy, cirhóza jater). Vypnutí genu *HFE* u myši způsobilo nadprodukcí železa a došlo ke změně v expresi proteinů v játrech. Množství produkovaných MUPů se zvýšilo 9krát (MUP1, MUP2 a MUP 6), dalšími pozitivně ovlivněnými proteiny byly glutathion-S-transferáza a protein vázající selen (Petrač, 2007). Zvýšení hladiny MUPů by tak mohlo být způsobeno snahou organismu zbavit se přebytečného železa, další výzkum je zde ovšem nutný.

Předpokládaná schopnost MUPů vázat železo by mezi lipocaliny také nebyla novinkou, je známá u jiného proteinu této rodiny (24p3). Ten v lidském těle přináší železo (či jeho sloučeniny) rozličným buňkám a navíc se zdá být zodpovědný za jeho vylučování z organismu (Yang et al., 2002).

Přenos signálu

Poté, co se feromony v krevním řečišti spojí s MUPy, odchází komplex do moči a s ní ven z těla, kde po jejím vyschnutí MUPy praskají a těkavé látky jsou uvolněny. Odlišné isoformy mají různou dobu vysychání zakončenou prasknutím molekuly, feromony se tak mohou

dostávat do vzduchu v odlišných časových intervalech (Hurts et al., 1998). Rozdílná je i afinita, s jakou isoformy vážou své ligandy (Sharro et al., 2002)

Feromony stimulují jak hlavní čichový epitel tak senzorické buňky vomeronasální orgánu (VMO) (Moss et al., 1997). Tato struktura trubicovitého tvaru vyplněná mukusem (který je stabilnějším prostředím pro těkavé molekuly, čímž zesiluje jejich působení) se nachází v oblasti nasálního septa a je spojena s vnějším prostředím vomeronasální duktum. Někteří živočichové mají navíc propojen vomeronasální orgán s ústní dutinou. K epitelu se látky dostávají aktivním pumpování vzduchu živočichem (Meredith and O`Connell, 1979). Na vomeronasálním orgánu můžeme u některých živočichů (myš) odlišit dva typy receptorů s rozdílným prostorovým uspořádáním (apikální a bazální část VMO). Přes bipolární neurony jde informace do přídatných čichových laloků (AOB – accessory olfactory bulb), pokračuje přes specifickou oblast amygdaly do hypothalamu, který reguluje hormonální a endokrinní stav zvířete. Každý neuron produkuje jen jeden typ receptoru (V1R/V2R- vomeronasal receptor), který je asociován s jiným typem G-proteinu (Galfai2/Galfa0), molekulou zajišťující přenos signálu. Ten jde specificky z odlišných částí VMO do anteriorní či posteriorní oblasti přídatných čichových laloků (Dulac and Axel, 1995; Brennan and Keverne, 2004). Míjí vyšší mozková centra, takže tato informace je přejímána nevědomě. Analýza genomu myši odhalila společný rozvoj MUPů a V2R receptorů, což podporuje představu o jejich společné evoluci (Chamero et al., 2007).

V čichovém laloku a v amygdale najdeme například u zvířat s toxoplasmosou nejvyšší koncentraci cyst v mozku. Přes amygdalu vedou dráhy spojené s učením, emocemi, tedy i strachem. Snížený strach z kočičího pachu je jedním z výsledků manipulace, kterou na svém hostiteli parazit provádí (Vyas et al., 2007). Nejedná se tedy o změnu vysílaného signálu, ale o odlišné přijetí či zpracování informace. Není známo, že by u parazitovaných zvířat docházelo ke změně spojené s přijímáním signálu zprostředkovaného MUPy, vyloučit to ovšem nelze.

5. Funkce a sociální efekty MUPů

Rozpoznání individua

Základním předpokladem existence vlivu pachových značek na modulaci sociálního chování je rozpoznání individua a odlišení vlastního pachu a pachu příbuzných. Schopnost odlišit vlastní pach dokládají např. pokusy Jane L. Hurst (Hurst et al., 2001), kdy samci nejevili zvýšený zájem o vzorky s vlastní močí, ani se nesnažili tyto vzorky přeznačkovat. Naopak věnovali zvýšenou pozornost vzorkům cizí moči, a to tak, že odlišovali příbuzné jedince (bratry). Zajímavé je, že v případě, kdy měli sourozenci stejný fenotyp MUPů a lišili se pouze v MHC antigenech, byli rozpoznáni jako příbuzní jedinci; pokud ovšem měli fenotyp MUPů odlišný, jevíli jejich sourozenci o pachovou značku zvýšený zájem. MUPy zde tedy fungují

jako důležitý faktor při rozpoznávání příbuzenských vztahů (Hurst et al., 2001). Nutné je ovšem zdůraznit, že „bratrům“ byla pachová značka pozměněna pomocí MUPů, jejichž přesná funkce nebyla známa. Zvýšený zájem čichajícího samce tak mohl být způsoben konkrétní informací, kterou nesly MUPy ve vzorku moči.

Signalizující molekulou v moči samozřejmě nemusí být pouze MUPy, důležité pro rozpoznání příbuzných jedinců i zdravotního stavu jsou MHC-antigeny. Jedna s teorií, vysvětlující souhru MHC-antigenů a dalších možných signálních molekul je založena na odlišných mikroflórách jedinců. Specifická kombinace MHC-antigenů umožňuje přežívání mikroflóry typické pro každého jedince. Mikroflóra silně ovlivňuje pach jedince, který tak nepřímo nese informaci o MHC-antigenech (Wedekind and Furi, 1997).

Moč obsahuje i další látky, jejichž produkce je ovlivněna androgenními hormony a mohou vypovídat o zdravotním stavu (Lin et al., 2005).

Značení teritoria

Moč je samci využívána ke značení vlastního teritoria. Dominantní samci rozmísťují značky odlišným způsobem než samci submisivní (Drickamer, 2001), kteří se nesnaží označkovat rovnoměrně celý prostor teritoria, naopak moč zadržují a umísťují ji na jedno nebo dvě místa (Lacey and Hurst, 2004). Pachové značky umožňují předání informace bez přímého kontaktu zvířat, což přináší výhody oběma hierarchicky odlišně postaveným jedincům. U submisivního samce se snižuje riziko napadení a poranění (často raději opustí území než by se vystavil konfliktu; Drickamer, 2001), samec dominantní podniká méně útoků a šetří tak energii (Hurst et al., 1993). Dle Drickamera jde pouze podle způsobu ukládání moči odlišit hierarchické postavení samce ve skupině.

Je důležité si uvědomit, že chování myši tak, jak je známe mezi jedinci inbredních kmenů, je velmi odlišné od chování v přírodních podmínkách. Jedinci inbredních kmenů stejného pohlaví mají často shodný fenotyp MUPů, nemají individuální značku a nejsou schopni odlišit příbuzné a nepříbuzné jedince, což mimo jiné vede ke snížení agrese.

Vliv MUPů na chování samic

Značka submisivního samce je dominantním samcem ihned přeznačkována, což je energeticky náročné. Pachová značka tak nabývá vypovídací hodnoty i pro samici. Ta dá přednost samci, jehož pachové značky byly nejčerstvější a překrývaly staré (Hurst and Rich, 1999). Samice hodnotí dle pachových značek postavení jedinců, vybírají samce, se kterým se páří, a jsou schopné odlišit pach samce cizího. To se projevuje při přerušení březosti, které může nastat při kontaktu s cizím samcem i pouze s jeho pachem. Po předčasně ukončené březosti dojde k nástupu nového estru. Tento efekt poprvé popsala Hilda Bruce v roce 1959 a po této badatelce bývá nazýván (tedy **efekt Bruceové**). S nejvyšší pravděpodobností dochází k potratu, pokud samice přijde do kontaktu se samcem z jiného kmene. Obdobná situace je

známa z přírody, kde samice takto reagují na cizí samce. Inbrední jedinci jsou geneticky velmi podobní, proto k potratům dochází spíše při setkání se samcem z jiného než vlastního kmene. Čím je tedy geneticky samec bližší, tím více klesá riziko potratu. Samice odlišuje samce jak podle MHC antigenů, tak podle ligandů přenášených MUPy. Přišla-li samice do kontaktu s MUPy samce, se kterým se pářila, které ovšem neobsahovaly původní ligandy ale ligandy samce cizího, došlo k výše zmíněnému efektu. MUPy cizího samce, vyplněné ligandy vlastního samce, byly mnohem méně efektivní (k potratům docházelo s nižší frekvencí). Z těchto pozorování vyplývá, že pro tento efekt jsou zásadní ligandy, ne MUPy které je přenáší (indirect model, Brennan and Peele, 2003, Peele et al., 2003).

Ve skupinkách samic, kde není přítomen samec či jeho pach a je přítomen pouze pach ostatních (nebrežích) samic, může dojít k opožděnému nástupu puberty (Drickamer, 1983). Jsou-li samice chovány samostatně, k efektu nedojde a samice vstoupí do estru. Estrus izolovaně žijících samic je krátký (4-5dnů), u samic chovaných ve skupinách dochází k prodloužení estru (**Lee-Boot effect**). Délka estru společně žijících samic je závislá na velikosti skupiny (Jemiolo, 1986). U těchto samic dochází k synchronizaci cyklu. To se projeví po kontaktu se samčím pachem, kdy u většiny samic dochází k receptivní fázi estru ve stejné době (tzv. **Whitten effect, 1956**).

Vystavení samic samčímu pachu má pozitivní vliv na nástup a urychlení puberty (**Vanderbergh effect, 1969**) (Novotny et al., 1999). U samic, u nichž byl estrus potlačen chovem v klecích s mnoha jinými samicemi, stačila k jeho vyvolání 50% koncentrace MUPů dospělého samce. Dle autorů nejsou za vyvolání estru odpovědné samotné MUPy a je třeba i jejich ligandů (indirect model) (Marchlewska-Koj, 2000). Feromony zodpovědnými za tento efekt jsou thiazol, brevicomin, heptanon a farnesen, z nichž všechny jsou androgenně závislé a přenášené MUPy (Novotný et al., 1999). Ty se tvoří až během puberty, prepubertální samčí moč žádný efekt nevykazuje (Drickamer and Murphy, 1978). U samic, které byly vystaveny MUPům dospělého samce, byla také pozorována zvýšená váha dělohy, což je pokládáno za znak nastupující puberty (Mucignat-Caretta et al. 1995; Novotný 1997). Pokud samice přišly do kontaktu pouze s ligandy původně nesenými MUPy, k žádnému efektu nedošlo. Je ovšem možné, že k aktivaci ligandů dojde až po jejich spojení s MUPy. Naopak samotné MUPy bez ligandů byly funkční a jejich spojení s ligandy nebylo pro vyvolání puberty nutné. K vyvolání efektu stačila pouze koncová peptidová sekvence MUPů (Mucignat-Caretta, 1995). Při použití obdobné peptidové sekvence v jiném pokusu došlo u stimulovaných samic k zvýšení ovulace, aktivován byl jako v předchozím případě vomeronasální orgán (More, 2006). V těchto případech se nejspíše jedná o přímý vliv MUPů (direct model), nevyjasněným faktem zůstává přenos MUPů jakožto proteinů na čichový epitel. Vysvětlením může být aktivní nasávání vzduchu, který s sebou nese MUPy a ty se tak dostávají do přímého kontaktu se sliznicí vomeronasálního orgánu.

Samice v průběhu estrálního cyklu mění hladinu MUPů v moči, nástupu estru vždy předchází zvýšená exprese MUPů, maximální produkce je jeden den před nástupem estru. Tímto způsobem mohou samice inzerovat svůj reprodukční stav, připravenost k páření. Fáze reprodukčního cyklu jsou ovlivňovány hormony, které mají pravděpodobně vliv také na hladinu MUPů (Stopka, 2007). Na pach receptivní samice, případně pouhé ligandy, produkované touto samicí, reagují stejně jak zkušení samci, tak samci bez předchozí zkušenosti (Mucignat-Cartha, 1999). Schopnost reagovat na tento podnět je tak nejspíše vrozená.

Možné výhody parazita plynoucí z pozměněné produkce MUPů

Změna produkce MUPů by mohla být pro parazita výhodná z několika důvodů. Pro pohlavně přenosného parazita by bylo přínosné zvýšit atraktivitu jedince, čehož by se dalo s použitím MUPů dosáhnout. Naopak snížením obsahu MUPů v moči by se samec prezentoval jako submisivní, byl by tak méně vystaven agresí. Může být vyhnán ze svého teritoria a v cizím prostředí by se zvýšila šance, že bude uloven. To by bylo výhodné pro parazita, který využívá hlodavce jako mezihostitele.

Feromonové (v tomto případě by se jednalo spíše o kairomonové) receptory má samozřejmě i hmyz. V případě, že by byl krevsající hmyz atrahován ligandy pocházejícími z moče, bylo by pro krev přenosného parazita výhodné produkci MUPů zvýšit. Obzvláště u samic (s nízkou produkcí MUPů) by takovéto zvýšení produkce mohlo významně zvětšit pravděpodobnost přenosu parazita na dalšího hostitele.

Rozpoznání infikovaného zvířete

K infikovaným jedincům se ostatní zvířata chovají často odlišně (Kavaliers et al., 2005). Za důkaz odlišení nakažených zvířat bývá považována různě dlouhá doba, po kterou zvířata jeví o nakaženého jedince zájem (nebo častěji pouze o vzorek jeho moči) v porovnání se zájmem o kontrolní jedince. Záleží na druhu parazita, je-li nakažené zvíře preferováno či diskriminováno, tedy jakým směrem se reakce na čichový podnět posune. Reakce jedince na pach nakaženého jedince může být závislá na jeho pohlaví a stavu (např. na stádiu estrálního cyklu) (Ehmen and Scott, 2001; Smith et al., 1996; Kavaliers nad Colwell, 1995).

Není známo, mají-li MUPy v těchto interakcích nějaký vliv. Nejjednodušším modelem by byla snížená produkce MUPů a jimi způsobená nižší atraktivita nakažených samců. S těmi by samice byly méně ochotné se pářit. Takovým případem by mohla být situace u samců nakažených parazitem *Eimeria vermiformis*. Zde docházelo k diskriminaci nakažených samců ze strany samic. Nejsilnější efekt byl pozorován u samic v receptivní fázi estru. To dokazuje, že chování samic lze interpretovat jako výběr sexuálního partnera (Kavaliers and Colwell 1995).

Obecně existuje více interpretací takovýchto změn chování. Nakažení samci mají v důsledku nemoci změněný pach, neboť nemohou produkovat energeticky nákladné atraktanty nebo mají v moči látky přímo související s nemocí. Jde tedy o přímý signál nemoci a pářit se s nemocným samcem není pro samici výhodné, i kdyby bylo vyloučeno riziko infekce (Hamilton and Zuk, 1982). Toto chování by bylo pro samce značně nevýhodné, pravděpodobně evolučně výhodnější strategií by naopak byla snaha se co nejrychleji spářit a zvýšit si tak fitness než dojde k úhynu nebo ještě dalšímu zhoršení zdravotního stavu. Přesto k tomuto jevu nejspíše dochází, a to v případech, kdy samec není schopen nemoc maskovat. Je také možné, že je pach změněn „záměrně“ vlivem parazita. Pro toho může být výhodné, aby hostitel investoval ušetřenou energii jinam, přínosná může být i změna v chování méně atraktivních zvířat. To však není příliš pravděpodobné u uvedeného příkladu, jednohostitelského parazita typu *Eimeria*. Přenos je zde naopak založen na individuálních kontaktech, parazit by tak zvýšil svou fitness spíše zvýšením atraktivnosti hostitele (Kavaliers and Colwell, 1995). Zvýšení atraktivnosti hostitele by bylo také přínosné pro pohlavně přenosné parazity a parazity schopné kongenitálního přenosu (z infikované matky na plod vstupem přes placentu). Vyloučit samozřejmě nelze ani možnost, že pozměněná atraktivita pachu infikovaných jedinců je pouze vedlejším efektem infekce a nemá žádný biologický význam pro parazita, infikované zvíře ani jeho okolí.

Závěr I

Produkce MUPů je zajímavým a z pohledů parazitologie skoro nedotčeným tématem. Možností, na co se v nejbližší budoucnosti zaměřit, je více. Rozhodně by bylo dobré rozšířit naši práci o další parazity, např. ty s odlišnými životními cykly, parazity zasahující určité tkáně či manipulující svým myším hostitelem. Studie sledující produkci MUPů by měli být komplexní, zohledňující míru parazitace a podrobněji popisující stav infikovaných zvířat. K poznání mechanismů, kterými parazit ovlivňuje produkci MUPů hostitele, by nám pomohli znalosti týkající se změn hladin hormonů a dalších faktorů spojených s produkcí MUPů a infekcí parazitem.

V nejbližší době se chystáme na podrobnější analýzu pozměněného fenotypu myší infikovaných prvokem *Toxoplasma gondii*. Cílem je zjistit, mění-li se pouze celkové množství proteinů či jde o specifický pokles určité isoformy. Tyto poznatky by nám mohli pomoci podhalit mechanismus, jakým ke změně dochází i vliv, který pozměněný fenotyp MUPů může mít na sociální postavení infikovaného jedince. Etologické pokusy s nakaženými zvířaty vzhledem k jejich náročnosti na počty zvířat a nesnadné interpretaci zatím neplánujeme a rádi je přenecháme jiným týmům. Dalším již započatým projektem je pilotní studie zaměřující se na produkci MUPů u myší infikovaných prvokem *Leishmania* sl. sledující širší aspekty nákazy.

Část II. Produkce MUPů u myši nakažených prvokem *Toxoplasma gondii*

Úvod: Prvok *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii je dvouhostitelský protozoální parazit patřící mezi Apicomplexa, jehož definitivním hostitelem jsou kočkovité šelmy. Ke svému přenosu využívá teplokrevné obratlovce, ve kterých se nepohlavně množí a tvoří tkáňové cysty. Definitivní hostitel se nakazí požitím těchto cyst, stádia z nich uvolněná se množí pohlavně a vytváří oocysty, které odcházejí s trusem zvířete ven. V případě mezihostitele může přenos parazita proběhnout také kongenitálně, tedy z matky na její plod pomocí pohyblivých stádií (Fayer, 1981).

Aby zvýšila pravděpodobnost svého přenosu, manipuluje toxoplasma chování mezihostitele. Manipulace je velmi specifická, změněno je chování, které má pozitivní vliv na přenos toxoplasmy (Webster et al, 1994). Důležité je, že se nejedná pouze o změny chování v průběhu akutní fáze, které by mohly být způsobeny špatným zdravotním stavem zvířete, ale vliv toxoplasmy je znatelný i v latentní fázi. Snížení strachu z kočičího pachu, v některých pokusech přecházející až v jeho vyhledávání a to jak v akutní, tak i v latentní fázi, je v této oblasti jedním z nejdůležitějších objevů, které potvrzují manipulaci s hostitelem (Berdoy et al., 1994; Webster, 2007; Vyas et al., 2007). Vyhýbání se oblastem s pachem psa dokládá, že změna je specifická a netýká se obecného strachu z možných predátorů (Vyas et al., 2007).

Pro sledování možné změny produkce proteinů vlivem parazita u myši je tento parazit vhodný nejen kvůli svému přirozenému myšímú mezihostiteli a detailně známému životnímu cyklu, ale i díky poměrně jednoduché kultivaci.

Naše pokusy a interpretace výsledků

Cílem našich pokusů bylo zodpovědět následující otázky: Mění se produkce MUPů u zvířat nakažených prvokem *Toxoplasma gondii*? Dochází ke změnám v jejich produkci v časných fázích infekce? Dochází ke změnám v jejich produkci v pozdních fázích infekce, tedy jde o dlouhodobou změnu?

První pokus byl proveden jako pilotní experiment přidružený k jiným pokusům. V souboru byly myši F1 generace, kříženci BALB/c a C57BL/6, infikované virulentním kmenem (více o virulenci kmenů viz příloha 3: Virulentní versus avirulentní kmene prvoka *Toxoplasma gondii*). Moč byla myším odebrána v latentní fázi infekce tři měsíce po nákaze. Detekovali jsme pokles v produkci MUPů, a to pouze u samců, zatímco u samic k žádné změně v produkci nedošlo. Vzhledem ke skutečnosti, že zvířata v latentní fázi nejevila známky nemoci, přímý vliv špatného zdravotního stavu zvířete není příliš pravděpodobný. Protože se efekt vyskytl pouze u samců, je možné uvažovat o vlivu pohlavních hormonů.

Další soubor tvořily pouze samice kmene BALB/c infikované avirulentním kmenem. Výsledky potvrdily, že nedochází ke změně v produkci MUPů ani u samic tohoto kmene.

Ve třetím pokusu byla sledována produkce MUPů u myši kmene C57BL/6, k infekci byl použit virulentní kmen parazita. Moč byla odebírána v průběhu infekce. Signifikantní rozdíl v koncentraci MUPů byl zaznamenán tři týdny po infekci, v dalších čtrnácti dnech došlo k rychlému návratu k původním hodnotám. V pozdních dnech infekce (3měsíce od nákazy) nebyl rozdíl signifikantní. Změna koncentrace MUPů pouze v akutní fázi může být způsobena zasažením jater pohyblivými stádii parazita, vliv zde může mít také tvorba cyst. V každém případě rychlé vystoupení hladiny MUPů na běžnou úroveň poukazuje na jejich významnost. Pro nemocné zvíře je důležitější signalizovat pomocí MUPů než vložit energii do podpory imunitního systému a zlepšení zdravotního stavu.

Důvod, proč ve třetím pokuse nedošlo, na rozdíl od pokusu prvního, k poklesu MUPů v latentní fázi, není přesně znám. Možností je několik. Jednou z nich je odlišný průběh nákazy - zdravotní stav myši nebyl obdobný. Přestože byl v prvním pokusu použit virulentní kmen, infekce probíhala mírně a s nízkou patogenitou. Ta mohla být způsobena větší odolností F1 generace myší, které byly pro tento pokus použity. U myši z třetího pokusu, tedy u kmene C57BL/6 nakaženého virulentním, „mírným“ kmenem, naopak probíhala infekce velmi bouřlivě. Patogenita parazita zde byla nejspíše způsobena nevhodně zvolenou metodou infekce (vlastní výsledky, Liensensfeld et al., 1960; více viz příloha 4: Citlivost myši kmene C57BL/6 k perorální infekci). Dále byly u takto nakažených myší zaznamenány dvě vlny úhynů (mající možnou spojitost s vývojovými stádii parazita), které nejsou při infekci avirulentním kmenem typické. Není také vyloučeno, že u myši došlo k reinfekci (opětovná infekce způsobená prasknutím uložených tkáňových cyst; Dubey, 1998). V případě tohoto pokusu tedy nelze hovořit o dosažení latentní fáze (při té se nemoc neprojevuje, váha myši je obdobná jako váha kontrolních jedinců) a porovnání získaných výsledků s výsledky prvního pokusu je tak obtížné.

K posunu v produkci MUPů docházelo v obou případech pouze u samců. Nejjednodušším vysvětlením se zdá být velmi rozdílná produkce MUPů mezi pohlavími. Je možné, že změna byla u samců zaregistrována z důvodů jejich relativně příliš vysokého množství exprimovaných MUPů. Samci jsou k vysoké produkci tlačeni pohlavním výběrem, neboť vysoká produkce je znakem dominance a je pro samice atraktivní. Jako jiné znaky ovlivněné pohlavním výběrem může být i vysoká produkce MUPů u samců v jistém směru nevýhodná.

Jiným možným důvodem je ovlivnění produkce MUPů změnou hladin hormonů, například testosteronu. Došlo-li by u infikovaných myší k jeho snížení, dá se předpokládat nižší produkce MUPů (tedy stav bližší produkci samic). Přesto, že existuje několik prací dokládajících vliv nemoci na hladiny pohlavních hormonů, existují také publikace, ve kterých nebyl rozdíl v hladinách hormonů zaznamenán (Roberts et al. 1995; Liesensfeld, 2001; Roberts et al., 2001; Berdoy et al., 1994; vlastní výsledky). V dalších experimentech se bude třeba pokusit určit hladinu hormonů, není ovšem jasné jakou metodou. Klasickým způsobem se

hladina hormonů určuje z krevního séra, bohužel takto nemůžeme zjišťovat aktuální stav při každém odběru moči (dvakrát týdně). Zajímavostí je, že změna produkce hormonů - jmenovitě testosteronu - je známá u lidských pacientů. U mužů je hladina oproti kontrolním jedincům zvýšená, u žen je trend opačný. O významné výsledky jde obzvláště proto, že se jedná o latentní nákazu, která bývá považována za bezpříznakovou. Autoři studie se domnívají, že tento opačný posun mezi pohlavími by mohl vysvětlovat jejich rozdílné změny v chování (Flegr et al., 2007).

Možná manipulace ze strany parazita nicméně není v tomto případě vyloučena. K řešení této otázky nám chybí znalosti týkající se potenciálních změn v sociálním postavení nakaženého jedince. Studie byly prováděny převážně na krysách v různých fázích infekce a přinesly rozporuplné výsledky (Vyjas et al., 2007; Berdoy et al., 1994). Podle výsledků Hany Hodkové, která pro své experimenty použila myši kmene BALB/c a parazita kmene HIF, ke změně dochází, a to i v latentní fázi. Samice zde preferovaly nakažené samce. To z našich výsledků neplyne, neboť v experimentech byl zaznamenán pouze pokles produkce MUPů u nakažených samců. Má-li tento pokles vliv, což u tak silného efektu předpokládáme, mělo by docházet spíše ke snížení atraktivity nakažených samců.

Závěr II

Produkce MUPů je zajímavým a z pohledu parazitologie skoro nedotčeným tématem. Možností, na které se v nejbližší budoucnosti zaměřit, je více. Rozhodně by bylo dobré rozšířit naši práci o další parazity, např. ty s odlišnými životními cykly, parazity zasahující určité tkáně či manipulující svým myším hostitelem. Studie sledující produkci MUPů by měly být komplexní, zohledňující míru parazitace a podrobněji popisující stav infikovaných zvířat. K poznání mechanismů, kterými parazit ovlivňuje produkci MUPů hostitele, by nám pomohly znalosti týkající se změn hladin hormonů a dalších faktorů spojených s produkcí MUPů a infekcí parazitem.

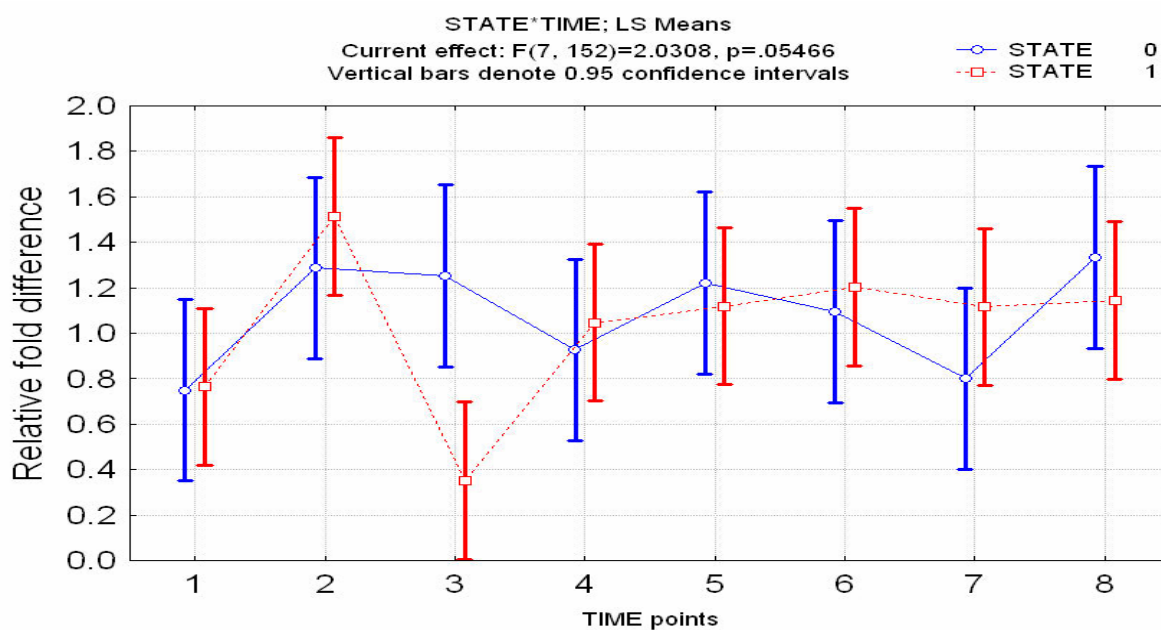
V nejbližší době se chystáme na podrobnější analýzu pozměněného fenotypu myší infikovaných prvokem *Toxoplasma gondii*. Cílem je zjistit, mění-li se pouze celkové množství proteinů, či jde-li o specifický pokles určité isoformy. Tyto poznatky by nám mohly pomoci poodhalit mechanismus, jakým ke změně dochází, i vliv, který pozměněný fenotyp MUPů může mít na sociální postavení infikovaného jedince. Etologické pokusy s nakaženými zvířaty vzhledem k jejich náročnosti na počty zvířat a nesnadnou interpretací zatím neplánujeme a rádi je přenecháme jiným týmům. Dalším již započatým projektem, na kterém se podílíme, je pilotní studie zaměřující se na produkci MUPů u myší infikovaných prvokem *Leishmania* sl., sledující jak reakci na tuto protozoální infekci tak možnou reakci na sání komáry.

Přílohy

Příloha 1: Graf výsledných hodnot třetího pokusu

Produkce MUPů u samců kmene C57BL/6 v průběhu nákazy. První bod zobrazuje průměrnou produkci MUPů před infekcí. Interval mezi body 1 až 5 je týden, 5 až 8 dva týdny. Na svislé ose je zobrazena poměrná koncentrace MUPů v moči, modrou barvou označeny výsledné hodnoty u kontrol, červeně výsledné hodnoty infikovaných zvířat.

S použitím analýzy variance (ANOVA) jsem prokázala signifikantní rozdíl mezi produkcí MUP u nakažených jedinců a u kontrol ($p=0.017$, d.f.=7). Post hoc Tukey test dále jednoznačně prokázal, že nakažení jedinci se nejvíce lišili od kontrol 14 dní od infekce ($p=0.011$). Třetí týden po infekci (bod 4) dojde u nakažených myší k rychlému návratu k hodnotám srovnatelným s hodnotami kontrol.



Příloha 2: Metodika

Pokusná zvířata

Ve všech pokusech byla zvířata rozdělena do dvou váhově vyrovnaných skupin, jedna skupina zvířat byla infikována a druhá sloužila jako kontrolní soubor. V prvním experimentu byly infikovány myši F1 generace, kříženci BALB/c a C57BL/6, prvokem *Toxoplasma gondii* kmene T38. Moč byla odebrána v latentní fázi, kdy myši nejevily žádné známky infekce. Ve druhém pokusu byly infikovány samice kmene BALB/c prvokem *Toxoplasma gondii*, použit byl avirulentní cystotvorný kmen HIF. Produkce MUPů byla sledována před infekcí, po dvou, čtyřech a šesti týdnech od infekce a po dvou měsících od infekce. Ve třetím pokusu byly nakaženy myši kmene C57BL/6, k infekci byl použit kmen HIF. Z důvodů použití příliš vysoké infekční dávky a nevhodně zvolené metody podání bylo nutné pokus zopakovat. Produkce MUPů byla sledována před infekcí, v průběhu akutní fáze po týdnů a v pozdějších fázích infekce po dvou týdnech. Snahou bylo sledovat pokud možno kontinuální produkci během nákazy. Moč byla skladována -20°C.

Použité kmeny parazita a způsob infekce

V prvním experimentu byl použit virulentní kmen parazita C38 (infekční dávka 20 cyst na jedince), ve druhém pokusu virulentní cystotvorný kmen HIF (infekční dávka 20 cyst na jedince) a ve třetím pokusu také kmen HIF (infekční dávka 8 cyst (více viz Příloha 3: Virulentní versus avirulentní kmeny prvoka *Toxoplasma gondii*)). Infekční inokulum připravené z mozku infikovaných myši bylo podáno perorálně, kontrolním jedincům byl perorálně podán fyziologický roztok.

Měření produkce MUPů

V prvních dvou pokusech byly k zjištění množství proteinů použity SDS (dodecylsírany sodný, slouží jako detergent) Page gely barvené pomocí Coomasi simply blue. Gely byly vyhodnocovány v programu Quantity One Biorad.

Koncentrace moči byla měřena pomocí obsahu kreatininu (protein produkovaný v konstantním množství a z jehož obsahu v moči je možné určit její koncentraci). Díky známé koncentraci moči můžeme zjistit produkci MUPů, nikoli pouze jejich množství v moči (v hustější moči bychom našli vyšší koncentraci MUPů, pokud hustotu moči změříme, můžeme sledovat přímo produkci MUPů). Ve třetím pokusu byla k detekci MUPů použita moderní metoda čipové elektroforézy.

Příloha 3: Virulentní versus avirulentní kmeny prvoka *Toxoplasma gondii*

V roce 1953 došlo k odlišení dvou skupin kmenů parazita dle virulence a tvorby cyst u myši (Frenkel, 1953). Dnes odlišujeme tři hlavní linie kmenů označovaných římskými číslicemi a malou skupinu kmenů, pro kterou se používá označení kmeny exotické. Odlišují se svojí virulencí a patologickými projevy (při použití experimentálních myši), množstvím tkáňových cyst, geografickým rozmístěním a malými rozdíly v genomu. Míra virulence je definována letální dávkou (LD, Lethal Dose). Kmeny II a III jsou považovány za avirulentní a velmi cystotvorné (Howe and Sibley, 1995). Tyto kmeny jsou schopné navodit u pokusných myši latentní fázi. Kmeny II. linie jsou nejběžněji se vyskytujícími kmeny u volně žijících zvířat i člověka. Je pro ně typická chronická fáze infekce. Kmeny III. skupiny jsou zaznamenávány hlavně u zvířat. Mezi českými izoláty patří do této skupiny kmen HIF (izolovaný z HIV pozitivního pacienta) (Kodym et al., 2002), ze zahraničních kmenů často používaný Me49. Kmeny I. skupiny netvoří cysty (nebo pouze v malém množství) a jsou velmi virulentní. Pohyblivá stádia mohou přetrvávat po celou dobu infekce. Typická je schopnost vyvolat obdobný průběh infekce nezávisle na genetickém pozadí myši (Howe et al. 1996), minimální infekční dávka je často rovná minimální letální dávce (Sibley, 2003). Při použití některého z velmi virulentních kmenů stačí k infekci jediný životaschopný parazit (Barragan and Sibley, 2002). Kmeny této linie bývají detekovány u pacientů s očními poruchami a u imunodeficientních pacientů.

Nejběžněji používaným kmenem této skupiny je kmen RH izolovaný roku 1941, obdobně virulentní kmeny jsou někdy označovány jako RH-like strains (Sibley and Boothroyd, 1995).

Příloha 4: Citlivost myši kmene C57BL/6 k perorální infekci

Přestože se kmeny II. skupiny projevují v akutní fázi většinou mírně, výjimkou zůstává silná reakce u myši kmene C57BL/6. Po perorální nákaze se v trávicím traktu těchto myši tvoří léze, na jejichž následky myši při vyšší infekční dávce umírají. Zároveň dochází i k většímu poškození centrální nervové soustavy (Liensensfeld et al., 1960). Z vlastních pozorování se zdá, že myši takto infikované myši nelze přivést do latentní fáze ani při použití sebemenší infekční dávky.

Citovaná literatura

- AL-SHAWI R., WALLACE H., HARRISON S., JONES C., JOHNSON D. and BISHOP J.O. 1992.** Sexual dimorphism and growth hormone regulation of a hybrid gene in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.* 6(2): 181-190
- ARAKAWA H., ARAKAWA K., BLANCHARD D.C. and BLANCHARD R.J. 2007.** Scent marking behavior in male C57BL/6J mice: sexual and developmental determination. *Behav. Brain. Res.* 182(1): 73-79
- BALBIN M., FREIJE J.M.P., FUEYO A., SANCHEZ L.M. and LOPEZ-OTIN C. 1990.** Apolipoprotein D is the major protein component in cyst fluid from women with human breast gross cystic disease. *Biochem.* 271(3): 803-807
- BENNETT K.L., LALLEY P.A., BARTH R.K. and HASTIE N.D. 1982.** Mapping the structural genes coding for the Major Urinary Proteins in the mouse: combined use of recombinant inbred strains and somatic cell hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79(4): 1220-1224
- BERDOY M., WEBSTER J.P. and MACDONALD D.W. 1994.** Parasite-altered behaviour: is the effect of *Toxoplasma gondii* on *Rattus norvegicus* specific? *Parasitology* 111(Pt 4): 403-409
- BERDOY M., WEBSTER J.P. and MACDONALD D.W. 2000.** Fattal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. *Proc. Biol. Sci.* 267(1452): 1591–1594
- BEYNON R.J. and HURST J.L. 2003.** Multiple roles of Major Urinary Proteins in the house mouse, *Mus musculus*. *Bioch. Soc. Trans.* 31: 142-146
- BEYNON R.J., VEGGERBY CH., PAYNE C.E., DUNCENH L., BERTSON S.J., GASKELL J., HUMPHRIES R.E. and HURST J.L. 2002.** Polymorphism in Major Urinary Proteins: molecular heterogeneity in a wild mouse population. *J. Chem. Ecol.* 28(7): 1429-1446
- BISHOP J.O., CLARK A.J., CLISSOLD P.M., HAINEY S. and FRNCKE U. 1982.** Two main groups of mouse Major Urinary Protein genes, both largely located on chromosome 4. *EMBO J.* 1(5): 615-620
- BOND H.E. 1960.** A sex-associated protein in liver tissue of the male rat. *Biochemical and Biophysical research Communications* 3: 53-55
- BOWERS J.M. and ALEXANDER B.K. 1967.** Mice: Individual recognition by olfactory cues. *Science* 158: 1208-1210
- BRENNAN P.A. and KEVERNE E.B. 2004.** Something in the air? New insights into mammalian pheromones. *Curr. Biol.* 14(2): R81-89
- BRENNAN P.A. and PEELE P. 2003.** Towards an understanding of the pregnancy-blocking urinary chemosignals of mice. *Bioch. Soc. Trans.* 31(Pt 1): 152-155

- BRITTON-DAVIDIAN J., FEL-CLAIR F., LOPEZ J., ALIBERT P. and BOURSOT P. 2005.** Postzygotic isolation between two European subspecies of the house mouse: estimates for fertility patterns in wild and laboratory-bred hybrids. *Biological Journal of the Linnean Society* 84: 379-393
- CALVO E., MANS B.J., ANDERSEN J.F. and RIBEIRO J.M. 2006.** Function and evolution of a mosquito salivary protein family. *J. Biol. Chem.* 281(4): 1935-1942
- CAVAGGIONI A. and MUCIGNA-CARETTA C. 2000.** Major Urinary Proteins, alpha(2U)-globulins and aphrodisin. *Biochim. Biophys. Acta* 1482(1-2): 218-28
- CAVAGGIONI A., SORBI R.T., KEEN J.N., PAPPIN D.J.C. and FINDLAY J.B.C. 1987.** Homology between the pyrazine-binding protein from nasal mucosa and Major Urinary Proteins. *FEBS Lett.* 212(2): 225-228
- COUILLIN I., MAILLET I., VARGAFTIG B.B., JACOBS M., PAESEN G.C., NUTTALL P.A., LEFORT J., MOSER R., WESTON-DAVIES W. and RYFFEL B. 2004.** Arthropod-derived histamine-binding protein prevents murine allergic asthma. *J. Immunol.* 173(5): 3281-3286
- DE MORAES C.M., LEWIS W.L., PARÉ P.W., ALBORN H.T. and TUMLINSON J.H. 1998.** Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature* 158(805): 1208-1210
- DEROTHE J.-M., LE BRUN N., LOUBES C., PERRIAT-SANQUINET M. and MOULIA C. 2001.** Susceptibility of natural hybrids between house mouse subspecies to *Sarcocystis muris*. *International Journal of Parasitology* 31: 15-19.
- DRICKAMER L.C. 1983.** Effect of period of grouping of donors and duration of stimulus exposure on delay of puberty in female mice by a urinary chemosignal from grouped females. *J. Reprod. Fertil.* 69: 123-727
- DRICKAMER L.C. and MURPHY R.X. 1978.** Female mouse maturation: Effects of excreted bladder urine from juvenile and adult males. *Dev. Psychobiol.* 11: 63-72
- DRICKAMER L.C. 2001.** Urine marking and social dominance in male house mice (*Mus musculus domesticus*). *Behavioural Processes* 53(1-2): 113-120
- DUBEY J.P. 1998.** Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology* 28(7): 1019-1024
- DULAC C. and AXEL R. 1995.** A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 83(2): 195-206
- EHMAN K.D. and SCOTT M.E. 2001.** Urinary odour preference of MHC congenic female mice, *Mus domesticus*: implication for kin recognition and detection of parasitized males. *Animal Behaviour* 62: 781-789
- FAYER R. 1981.** Toxoplasmosis update and public health implication. *Can. Vet. J.* 22: 344-352

- FERKIN M.H. and LEONARD S.T. 2008.** Age of the subject and scent donor affects the amount of time that voles self-groom when they are exposed to odore of opposite-sex conspecifics. *Chemical Signal in Veretebrates* 11: 281-289
- FEDER J.N., GNIRKE A., THOMAS W., TSUCHIHASHI Z., RUDDY D.A., BASAVA A. et al. 1996.** A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat. Genet.* 13(4): 399-408
- FINLAYSON J.S., ASOFSKY R., POTTER M. and RUNNER C.C. 1965.** Major Urinary Protein complex of normal mice: origin. *Science* 149(687): 981-982
- FLEGR J., LINDOVA J. and KODYM P. 2007.** Sex-dependent toxoplasmosis-associated differences in testosterone concentration in humans. *Parasitology* 135(4): 427-431
- FLEMING R.E. and SLY W.S. 2002.** Mechanism of iron accumulation in hereditary hemochromatosis. *Annu. Rev. Physiol.* 64: 663-680
- FLOWER D.R. 1996.** The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.* 318 (Pt 1): 1-14
- FLOWER D.R., NORTH A. and ATTWOOD A. 1993.** Structure and sequence relationships in the lipocalins and related proteins. *Protein. Sci.* 2(5): 753-761
- FRENKEL J.K. 1953.** Host, strain and treatment variation as factors in the pathogenesis of toxoplasmosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2(3): 390-415
- GRÄTER F., XU W., LEAL W. and GRUBMÜLLER H. 2006.** Pheromone discrimination by the pheromone-binding protein of *Bombyx mori*. *Structure* 14(10): 1577-1586
- GUDDERRA N.P., RIBEIRO J.M.C. and ANDERSEN J.F. 2005.** Structural determinants of factor IX(a) binding in nitrophorin 2, a lipocalin inhibitor of the instrinsic coagulation pathway. *J. Biol. Chem.* 280(26): 25022-25028
- HAMILTON W.D. and ZUK M. 1982.** Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science* 218(4570): 384-387
- HASTIE N.D. and HELD W.A. 1978.** Analysis of mRNA populations by cDNA mRNA hybrid-mediated inhibition of cell-free protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1217-1221
- HASTIE N.D., HELD W.A. and TOOLT J.J. 1979.** Multiple genes coding for the androgen-regulated Major Urinary Proteins of the mouse. *Cell* 17(2): 449-457
- HURST J.L., DUNCAN H., ROBERTSON L., TOLLADAY U. and BEYNON R.J. 1998.** Proteins in urinary scent marks of female house mice extend the longevity of olfactory signal. *Anim. Behav.* 55(5): 1289-1297
- HURST J.L., PAYNE C.E., NEVISON CH.M., MARLE A.D., HUMPHRLES R.E., ROBERTSON D.H.L., CAVAGGLONI A. and BEYNON R.J. 2001.** Individual recognition in mice mediated by Major Urinary Proteins. *Nature* 414(6864): 631-634
- HURST J.L. and RICH T.L. 1999.** Scent marks as competitive signals of mate quality. In: *Advances in chemical communication in vertebrates*. New York: Plenum Press, p.209-226

- HURST J.L. 1993.** The priming effects of urine substrate marks on interaction between male house mice, *Mus musculus musculus* Schwarz and Schwarz. *Anim. Behav.* 45: 55-81
- CHAMERO P., MARTON T.F., LOGAN D.W., FLANAGAN K., CRUZ J.R., SAGHATELIAN A., CRAVATT B.F. and STOWERS L. 2007.** Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. *Nature* 450(7171): 899-902
- CHRISTOPHE N. and BAUDOIN C. 1997.** Olfactory preferences in two strains of wild mice, *Mus musculus* and *Mus domesticus*, and their hybrids. *Animal. Behav.* 56(2): 365-369
- JEMIOLO B., HARVEY S., NOVOTNY M. 1986.** Promotion of the Whitten effect in female mice by synthetic analogs of male urinary constituents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83(12):4576-4579
- KARLSON P. and LUSCHER M. 1959.** Pheromones: a new term for a class of biologically active substances. *Nature* 183(4653): 55-56
- KAVALIERS M. and COLWELL D. 1995.** Discrimination by female mice between the odours of parasitized and non-parasitized males. *Proc. Biol. Sci.* 261(1360): 31-35
- KAVALIERS M., CHOLERIS E., AGMO A. and PFAFF D.W. 2005.** Olfactory-mediated parasite recognition and avoidance: linking genes to behavior. *Horm. Behav.* 46(3): 272-83
- KAVALIERS M., CHOLERIS E. and PFAFF D.W. 2005.** Genes, odours and the recognition of parasitized individuals by rodents. *Trends in Parasitology* 21(9): 423-429
- KNOPF J.L., GALLAGHER J.F. and HELD W.A. 1983.** Differential multihormonal regulation of the mouse Major Urinary Protein gene family in the liver. *Molecular and Cellular Biology* 3(12): 2232-2240
- KODYM P., BLAŽEK K., MALÝ M. and HRDÁ Š. 2002.** Pathogenesis of experimental toxoplasmosis in mice strains differing in virulence. *Acta Parasitologica* 47 (3): 239-248
- KOENIG H., GOLDSTONE A., BLUME G., and LU C. 1980.** Testosterone-mediated sexual dimorphism of mitochondria and lysosomes in mouse kidney produmal tubules. *Science* 209(4460): 1023-6
- KRAUTER K., LEINWAND L., DEUSTACHIO P., RUDDLE F. and DARNELL F. 1982.** Structural genes of the mouse Major Urinary Protein are on chromosome 4. *Journal of Cell Biology* 94(2): 414-417
- KUHN N.J., WOOD-WORTH M., GROSS K.V. and HELD W.A. 1984.** Subfamilies of the mouse Major Urinary Protein (MUP) multi-gene family: sequence analysis of cDNA clone and differential regulation in the liver. *Nucleic Acid Research* 12(15): 6073-90
- KUSER P.R., FRANZONI L., FERRARI E., SPISNI A. and POLIKARPOV I. 2001.** The X-ray structure of a recombinant Major Urinary Protein at 1.75 Å resolution. A comparative study of X-ray and NMR-derived structures. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 57(Pt 12): 1863-9

- LACEY J.C. and HURTS J.L. 2004.** The role of scent in inter-male aggression in house mice and laboratory mice. *Chemical Signals in Vertebrates* 10: 209-215
- LARRALDE C., MORALES J., TERRAZAS I., GOVEZENSKY T. and ROMANO M.C. 1995.** Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 52(6): 575-580
- LEONARD S.T., ALIZADEH-NADERI R., STOKES K. and FERKIN M.H. 2005.** The role of prolactin and testosterone in mediating seasonal differences in the self-grooming behavior of male meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*. *Physiol. behav.* 85(4): 461-468
- LIESENFELD O., ANH NGUYEN T., PHARKE CH. and SUZUKI Y. 2001.** Importance of gender and sex hormones in regulation of susceptibility of the small intestine to peroral infection with *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *J. Parasitol.* 87(6): 1491-1493
- LIN D.Y., ZHANG S., BLOCK E. and KATZ L.C. 2005.** Encoding social signals in the mouse main olfactory bulb. *Nature* 434(7032): 470-477
- LÜCKE C., FRANZONI L., ABBATE F., LÖHR F., FERRARI E., SORBI R.T., RÜTERJANS H. and SPISNI A. 1999.** Solution structure of a recombinant mouse Major Urinary Protein. *Eur. J. Biochem.* 266(3): 1210-1218
- MARCHLEWSKA-KOJ A., CAVAGGIONI A., MUCIGNAT-CARETTA C. and OLEKNICZAK P. 2000.** Stimulation of estrus in female mice by male urinary proteins. *J. Chem. Ecol.* 26: 2355-2366
- MEREDITH M. and O'CONNELL 1979.** Efferents controls of stimulus access to the hamster vomeronasal organ. *Physiol. Behav.* 36: 737-743
- MIYAWAKI A., MATSUSHITA F., RIO V. and MIKOSHIBA K. 1994.** Possible pheromone-carrier function of two lipocalin proteins in vomeronasal organ. *EMBO J.* 13 (24): 5835-5842
- MOHAMMED A.O., ELGHAZALI G., MOHAMMED H.B., ELBASHIR M.I., XU S., BERZINS K. and VENGE P. 2003.** Human neutrophil lipocalin: a specific marker for neutrophil activation in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Acta Tropica* 87(2): 279-285
- MONTFORT W.R., WEICHSEL A. and ANDERSEN J.F. 2000.** Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods. *Biochimica et Biophysica Acta* 1482(1-2): 110-118
- MORE L. 2006.** Mouse Major Urinary Proteins trigger ovulation via the vomeronasal organ. *Chem. Senses* 31(5): 393-401
- MOSS R.L., FLYNN R.E., XIN-MING S., DUDLEY C., SHI J. and NOVOTNY M. 1997.** Urine-derived compound evokes membrane responses in mouse vomeronasal receptor neurons. *J. Neurophysiol.* 77(5): 2856-2862
- MUCLINGER P. and FRYNTA D. 1997.** Relations between distant populations of *Mus musculus* sensu lato: Is there any odour-based discrimination? *Folia Zoologica* 46 (3): 193-199

- MUCIGNA-CARETTA C. and CARETTA A. 1999.** Chemical signals in male house mice urine: Protein-bound molecules modulate interactions between sexes. *Behaviour* 136: 331-343
- MUCIGNA-CARETTA C., CARETTA A. and CAVAGGIONI A. 1995.** Acceleration of puberty onset in female mice by male urinary proteins. *Journal of Physiology* 486(Pt 2): 517-522
- NEVISON C.M., ARMSTRONG S., BEYNON R.J., HUMPHRIES R.E. and HURST J.L. 2003.** The ownership signature in mouse scent marks is involatile. *Proc. Biol. Sci.* 270(1527): 1957-63
- NOVOTNY M.V., HARVEY S. and JEMIOLO B. 1990.** Chemistry of male dominance in the house mouse, *Mus domesticus*. *Experientia* 46(1): 109-113
- OHNO S. 1973.** Evoluce genovou duplikací. Academia, Praha
- PEELE P., SALAZAR I., MIMMACK M., KEVERNE E.B. and BRENNAN P.A. 2003.** Low molecular weight constituents of male mouse urine mediate the pregnancy block effect and convey information about the identity of the mating male. *European Journal of Neuroscience* 18(3): 622-628
- PETRAK J., MYSLIVCOVA D., HALADA P., CMEJLA R., CMEJLOVA J., VYORAL D. and VULPE C.D. 2007.** Iron-independent specific protein expression pattern in the liver of HFE-deficient mice. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39(5): 1006-1015
- RIBEIRO J.M.C., SCHNEIDER M. and GUIMARAES J.A. 1995.** Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Biochem. J.* 308(Pt 1): 243-249
- ROBERTS C.W., WALKER W. and ALEXANDER J. 2001.** Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clinical Mikrobiology Reviews* 14(3): 476-488
- ROBERTS C.V., CRUICKSHANK S.M. and ALEXANDER J. 1995.** Sex-determined resistance to *Toxoplasma gondii* is associated with temporal difference in cytokine production. *Infect. Immun.* 63(7): 2549-2555
- ROBERTSON D.H.J., COX K.A., GASKELL S.J., EVERSLED R.P. and BEYNON R.J. 1996.** Molecular heterogeneity in the Major Urinary Proteins of the house mouse *Mus musculus*. *Biochem. J.* 316(Pt 1): 265-272
- ROBERTSON D.H.L., HURST J., HUBBARD S., GASKELL S.J. and BEYNON R. 1998.** Ligands of urinary lipocalins from the mouse: uptake of environmentally derived chemicals. *J. Chem. Ecol.* 24: 1127-1140
- SANGAMNATDEJ S., PAESEN G.C., SLOVAK M. and NUTTALL P.A. 2002.** A high affinity serotonin and histamine-binding lipocalin from tick saliva. *Insect Molecular Biology* 11(1): 79-86

- SHAHAN K., DENARO M., GILMARTIN M., SHI Y. and DERMAN E. 1987.** Expression of six mouse Major Urinary Protein genes in the mammary, parotid, sublingual, submaxillary, and lachrymal glands and in the liver. *Molecular and Cellular Biology* 7(5): 1947-1954
- SHARROW S.D., JEFFREY L., VAUGHT J.L., ZIDEK L., NOVOTNY M.V. and STONE M. 2002.** Pheromone binding by polymorphic mouse Major Urinary Proteins. *Protein. Sci.* 11: 2247-2256
- SHARROW S.D., VAUGHT J.L., ZIDEK L., NOVOTNY M.V. and STONE M. 2007.** Pheromone binding by polymorphic mouse Major Urinary Proteins. *Protein. Sci.* 11(9): 2247-2256
- SIBLEY D. and BOOTHOROYD J.C. 1992.** Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 359: 82-85.
- SMITH F.V., BARNARD C.J. and BEHNKE J.M. 1996.** Social odours, hormone modulation and resistance to disease in male laboratory mice, *Mus musculus*. *Anim. Behav.* 52: 141-153
- STOPKA P., JANOTOVA K. and HEYROVSKY D. 2007.** The advertisement role of Major Urinary Proteins in mice. *Physiol. Behav.* 91(5): 667-670
- STOPKOVÁ R., STOPKA P., JANOTOVÁ K. and JEDELSKY P.L. 2007.** Species-specific expression of Major Urinary Proteins in the house mice (*Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus*). *J. Chem. Ecol.* 33(4): 861-869
- URADE Y. and HAYAISHI O. 2000.** Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1482(1-2): 259-271
- VINCENT F., LÖBEL D., BROWN K., SPINELLI S., GROTE P., BREER H., CABBILLAU C. and TEGONI M. 2001.** Crystal structure of afrodisin, sex pheromone from female hamster. *J. Mol. Biol.* 19;305(3): 459-469
- VYAS A., KIM S. K. and SAPOLSKY R.M. 2007.** The effects of toxoplasma infection on rodent behavior are dependent on dose of the stimulus. *Neuroscience* 148(2): 342-348
- WEBSTER J. P. 2007.** The effect of *Toxoplasma gondii* on animal behavior: playing cat and mouse. *Schizophr. Bull.* 33(3): 752-756
- WEBSTER J.P., BRUNTON C.F.A. and MACDONALD D.W. 1994.** Effect of *Toxoplasma gondii* upon neophobic behaviour in wild brown rats, *Rattus norvegicus*. *Parasitology* 109(Pt 1): 37-43
- WEDEKIND C. and FURI S. 1997.** Body odour preferences in men and women: do they aim for specific MHC combinations or simply heterozygosity? *Proc. Biol. Sci.* 264(1387): 1471-1479
- YANG X.Y., GOETZ D., LI J.Y., WANG W., MORI K., SETLIK D. et al. 2002.** An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol. Cell* 10(5): 1045-1056

