

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

# **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

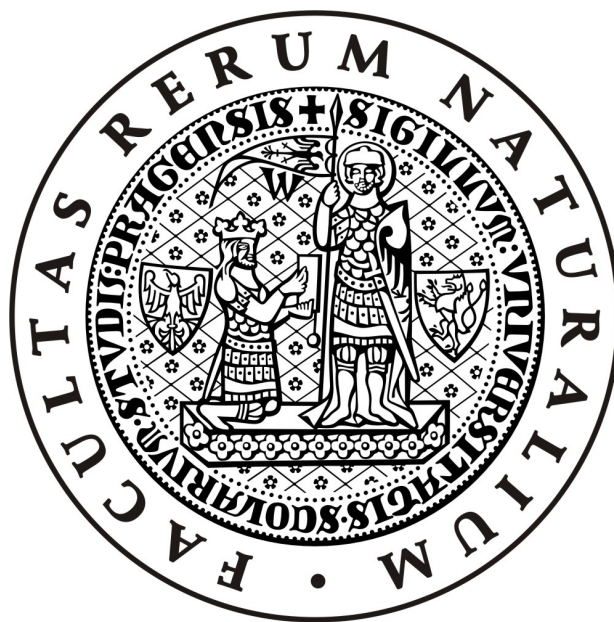
**2010**

**Denisa Hladovcová**

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie



**Vliv parazita *Toxoplasma gondii* na produkci hlavních močových proteinů u  
myši domácí**

**(The role of *Toxoplasma gondii* on the expression of Major Urinary Proteins  
in the house mouse)**

**Diplomová práce**

**Praha 2010**

**Vypracovala**

**Vedoucí diplomové práce**

**Denisa Hladcová**

**Doc. Mgr. Pavel Stopka, PhD.**

Prohlašuji, že jsem vypracovala diplomovou práci samostatně s použitím uvedené literatury.

V Praze, dne 25.8.2010

Denisa Hladcová

## **Poděkování:**

Děkuji Doc. Mgr.Pavlovi Stopkovi, PhD. za trpělivost, prostor a důvěru,  
prof. RNDr. Jaroslavu Flegrovi, CSc. a RNDr. Petru Kodymovi, CSc. za rady a podporu.  
Děkuji Romaně a Heleně za péči, Katce a Honzovi za inspirující milou společnost a Lídě  
za všestrannou pomoc.

Děkuji rodičům, nejen protože jsou výborní rodiče.

Děkuji všem, které by mrzelo, kdybych na ně zapomněla.

## Abstrakt

MUP (hlavní močové proteiny, angl. Major Urinary Proteins) jsou feromonové přenašeče zapojené do chemické komunikace u myši domácí (*Mus musculus*). Komplexy MUP s ligandy zprostředkují informace o genetickém pozadí jedince a spoluvytvářejí individuální pachový profil. Jsou významné při určování příbuznosti, zásadního faktoru při volbě reprodukčního partnera. Předpokládá se, že produkce MUP je vlivem tlaku pohlavního výběru energeticky náročná a vysílaný signál je upřímný (angl. honest). Tato teorie zatím nebyla experimentálně prokázána, stejně jako vliv dalšího silného selekčního tlaku - infekce parazity. Ve své práci jsem sledovala vliv infekce parazitem *Toxoplasma gondii* na produkci MUP. Z výsledků vyplývá, že dochází ke změně produkce u infikovaných zvířat obou pohlaví. U samců množství MUP klesá na úroveň kastrováných samců (respektive kontrolních samic). Z podrobnější analýzy průběhu infekce usuzujeme, že energetická náročnost tvorby MUP neumožňuje jejich produkci v první fázi infekce v běžné míře, protože energie je přednostně směřována do boje s infekcí. Částečný nárůst produkce v pozdější fázi si vysvětlujeme důležitostí pachové komunikace. Snížení hladiny MUP u nemocného zvířete by mohlo přispívat k jeho tolerování ve společnosti ostatních jedinců. Infekce měla negativní vliv nejen na produkci MUP, ale i na reprodukční potenciál samců, projevující se signifikantně nižší hmotností cauda epididymis, tedy parametru, který odráží produkci spermií. Z dalších, dílčích výsledků jsem potvrdila rozdíly v produkci MUP mezi samci a samicemi u inbredního kmene C57BL/6 a kříženců volně žijících myší (*Mus musculus*). V rozporu s dříve publikovanými daty byl rozdíl několikanásobně menší. Vzorky nasbírané během experimentu byly využity i pro stanovení změn v koncentraci MUP, které mohou být způsobeny degradačními procesy nastávajícími v průběhu zpracování a skladování vzorků či změnou koncentrace moči. Odstranění solí srážením před uskladněním vzorků ani odlišné skladovací teploty (-20 °C a -80 °C) neovlivnily kvantitu MUP ve vzorcích. Přes pozorovanou variabilitu v množství měřitelných MUP nebyla změna množství během skladování signifikantní.

**Klíčová slova:** hlavní močové proteiny, MUP, *Toxoplasma gondii*, paraziti, infekce, feromon, pachová signalizace

## Abstract

Major Urinary Proteins (MUP) are pheromonal transmitters involved in chemical communication in rodents. Complexes of MUPs and ligands mediate information about genetical background of an individual and co-create individual scent profile. They play a significant role in kinship determination, the crucial factor in the choice of a mating partner. It is assumed that the MUP production is energetically demanding due to the pressure of sexual selection, and the transmitted signal is thus supposed to be honest. This theory hasn't yet been experimentally tested, neither was proven the effect of another intense selection pressure- a parasitic infection. In my thesis, I describe the effect of an infection of a parasite *Toxoplasma gondii* on MUP production. The results suggest that the production is altered in both sexes, the production decreasing in males to the level of male castrates (or the female level). Considering the results of more detailed analysis of the infection we assume that the energetical demands of the MUP production doesn't allow the production of ordinary amounts of MUPs during the first phase of the infection as the energy is primarily devoted to the infection control. The increased production in latter phase can be attributed to the importance of scent communication. Decreased levels of MUP in a diseased animal might help it being tolerated in the society of other individuals. The infection influenced negatively not only the MUP production but also the reproductive potential in males, which was manifested by significantly lower weight of cauda epididymis, reflecting the sperm production. Furthermore, partial results also confirmed differences in MUP production between males and females in inbred strain C57BL/6 and in crossbred free-living mice. In contradiction to previously reported data, the difference was several folds lower. In the course of the experiment I have also observed possible shifts in measurable amounts of MUPs during the storage caused by degradation processes. Neither the effect of different storage temperatures (-20 °C and 80 °C) nor the effect of elimination of salts by coagulation was observed. Despite the observed variation between intervals the effect of time on the MUP volume was not found significant.

**Key words:** Major Urinary Proteins, MUP, *Toxoplasma gondii*, parasites, infection, pheromone, odor, scent marking

## Obsah:

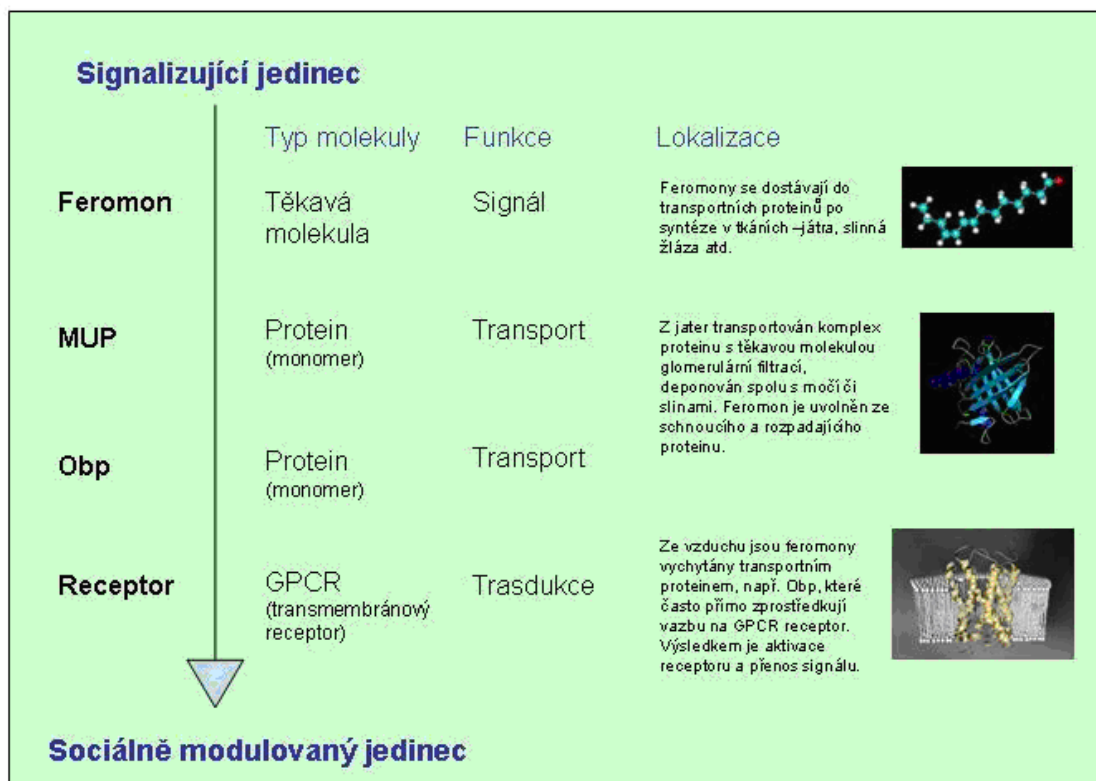
<b>1.</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2.</b>	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	<b>10</b>
<b>3.</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
3.1.	PARAZITI A PACHOVÁ PREFERENCE .....	11
3.2.	HLAVNÍ MOČOVÉ PROTEINY, MUP .....	15
3.3.	PARAZIT <i>TOXOPLASMA GONDII</i> .....	24
<b>4.</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>32</b>
4.1.	POKUSNÁ ZVÍŘATA A DESIGN POKUSŮ .....	32
4.2.	METODY A ODBĚR VZORKŮ .....	33
4.2.1.	<i>Infekce</i> .....	33
4.2.2.	<i>Odběr moči</i> .....	34
4.2.3.	<i>Odběr krve a příprava séra</i> .....	34
4.2.4.	<i>Měření hmotnosti pokusných zvířat</i> .....	35
4.2.5.	<i>Odběr a měření hmotnosti testes a cauda epididymis</i> .....	35
4.3.	PROTEOMICKÉ A IMUNOLOGICKÉ LABORATORNÍ TECHNIKY .....	35
4.3.1.	<i>Měření množství MUP ve vzorku - čipová kapilární elektroforéza</i> .....	35
4.3.2.	<i>Měření množství kreatininu ve vzorku</i> .....	36
4.3.3.	<i>Určení míry nákazy - komplement fixační reakce (KFR)</i> .....	37
4.3.4.	<i>Test vlivu manipulace se vzorky na kvantitu MUP - čipová kapilární elektroforéza</i> .....	38
4.4.	ANALÝZA DAT .....	38
4.4.1.	<i>Výpočet celkové produkce a exprese MUP u infikovaných a kontrolních zvířat</i> .....	38
4.4.2.	<i>Vliv pohlaví na produkci MUP</i> .....	39
4.4.3.	<i>Výpočet množství kreatininu v moči</i> .....	39
4.4.4.	<i>Výpočet normalizované produkce MUP - dynamika produkce MUP</i> .....	39
4.4.5.	<i>Výpočet normalizované exprese MUP - dynamika exprese MUP</i> .....	39
4.4.6.	<i>Vliv infekce na hmotnost testes a cauda epididymis</i> .....	40
4.4.7.	<i>Vliv infekce na hmotnost pokusných zvířat</i> .....	40
4.4.8.	<i>Test vlivu manipulace se vzorky na kvantitu MUP</i> .....	40
4.5.	VÝSLEDKY A GRAFY .....	41
4.5.1.	<i>Vliv pohlaví na produkci MUP</i> .....	41
4.5.2.	<i>Celková produkce a exprese MUP u infikovaných zvířat</i> .....	41
4.5.3.	<i>Dynamika produkce a exprese MUP v průběhu nákazy u samců</i> .....	41
4.5.4.	<i>Dynamika produkce a exprese MUP v průběhu nákazy u samic</i> .....	41
4.5.5.	<i>Změny hmotnosti testes a cauda epididymis</i> .....	42
4.5.6.	<i>Vliv infekce na hmotnost pokusných zvířat</i> .....	42
4.5.7.	<i>Vliv hmotnosti zvířat na produkci MUP</i> .....	42
4.5.8.	<i>Test vlivu manipulace se vzorky na kvantitu MUP</i> .....	42
Graf 1.	<i>Vliv pohlaví na produkci MUP</i> .....	43
Graf 2.	<i>Celková produkce MUP u kontrolních a infikovaných zvířat</i> .....	44
Graf 3.	<i>Celková exprese MUP u kontrolních a infikovaných zvířat</i> .....	45
Graf 4.	<i>Vliv infekce na hmotnost testes a cauda epididymis</i> .....	46
Graf 5.	<i>Dynamika produkce a exprese MUP v průběhu nákazy u samců</i> .....	47
Graf 6.	<i>Dynamika produkce a exprese MUP v průběhu nákazy u samic</i> .....	48
Graf 7.	<i>Vliv infekce na hmotnost pokusných zvířat</i> .....	49
Graf 8.	<i>Test vlivu manipulace se vzorky na kvantitu MUP</i> .....	50
4.6.	DISKUZE .....	51
<b>5.</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>57</b>
<b>6.</b>	<b>PŘEHLED LITERATURY</b> .....	<b>58</b>

## 1. Úvod

U myši domácí (*Mus musculus*) probíhá komunikace mezi jedinci především pomocí pachových značek. Čichem je detekována řada informací spojených s reprodukcí a udržováním teritoria (Ganem et al. 2005). Pachový profil myši je individuální a umožňuje odlišení jedinců (Ferkin, Li 2006). Silným tlakem k vytvoření tohoto systému je pohlavní výběr, neboť samice schopné odlišit nepříbuzné a zdravé jedince mají značnou reprodukční výhodu. Signální molekuly, produkované jedním zvířetem a přijímané dalšími jedinci, zde slouží k přenosu informace o vysílajícím jedinci. Předáním pachového signálu lze také modulovat chování a fyziologii přijímajícího zvířete. V obou případech mohou být signální molekuly označeny jako feromony. Ty jsou charakterizovány jako těkavé látky schopné působit na chování a fyziologii příjemce. Feromony tedy mohou jak přenášet informace a způsobit přímou změnu chování jedince (signální feromony, angl. releaser, Karlson and Butenand 1959), tak vyvolat dlouhodobější postupné změny fenotypu (spouštěcí feromony, angl. priming, Wilson and Bossert 1963, Novotny et al. 1991, Johnston 2003). Kromě klasických feromonů existují molekuly, které feromony transportují. Jedná se o dva funkční typy proteinů: proteiny přenášející feromony z vnitřního do vnějšího prostředí a proteiny, které feromony z volného prostředí vážou a mohou zprostředkovávat i jejich vazbu na receptory (Endler 1992). V případě těchto látek bývají receptorem transmembránové proteiny asociované s G-proteiny (Buck and Axel 1991).

Prvním objeveným savčím feromonem je afrodisin z vaginálního sekretu křečků (Singer et al. 1986). V současné době je u hlodavců prokázáno několik feromonů a jejich transportních proteinů. Komplexy feromonů, jejich přenašečů a receptorů fungují podle obecného schématu. Feromony, vytvořené například v játrech či slinných žlázách, se spojí s transportními proteiny a jako komplexy se glomerulární filtrací dostávají do moči či slin. Spolu s močí jsou vyloučeny do vnějšího prostředí, jako součást slin jsou nanášeny na srst během čištění. Ve vnějším prostředí transportní proteiny degradují, čímž uvolňují feromony, které se díky své těkavosti dostávají do vzduchu. Z něho mohou být vychytány transportními proteiny přijímajícího jedince a po kontaktu s čichovou sliznicí aktivovat receptory.





Obr. 1: Dogma feromonové komunikace

Z proteinů transportujících feromony jsou u myši hojně zastoupeny hlavní močové proteiny (Major Urinary Proteins, MUPs). Jak název napovídá, jsou produkovány především játry a uvolňovány do moči, ve které tvoří hlavní proteinovou složku (Rümke and Thung 1964, Finlayson et al. 1965, Flower 1996). Jsou obsaženy i ve slinách, do kterých se dostávají ze slinných žláz, a pravděpodobně i v dalších tělních sekretech (Shaw et al. 1983, Shahan et al. 1987, Utsumi et al. 1999). Transportují ven z těla malé signalizační molekuly, chrání je proti působení vnitřního i vnějšího prostředí (Finlayson et al. 1963, Jemiolo et al. 1985), prodlužují dobu jejich působení (Hurst et al. 1998) a podílejí se svou diverzitou na utváření výsledného signálu. MUP patří do široké proteinové rodiny nazývané lipokaliny (Bocskei et al. 1992). Ta je charakteristická terciární strukturou - soudečkovitým tvarem s dutinou, ve které jsou transportované malé molekuly (Flower 1996). Přenášenými ligandy je široké spektrum chemicky odlišných

látek (Flower 1996, Marie et al. 2001), ale u několika fylogeneticky starších lipokalinů se jedná o tělu nebezpečné či přebytečné molekuly. Je tedy možné, že původní úlohou těchto proteinů nebyl přenos signálních molekul, ale „scavenger role“, tedy odklízecí, čistící funkce (Grolli et al. 2006). Některé z lipokalinů se také zapojují se do transportu železa nezbytného pro mnohé mikroorganismy a mohou tak působit antimikrobiálně (Goetz et al. 2002; Fischbach et al., 2006; Smith 2007, shrnuto v Stopková et al. 2009).

Infekce parazity jsou, spolu s pohlavním výběrem, pravděpodobně dva nejsilnější faktory usměrňující evoluci komunikace. Paraziti jsou také, alespoň v některých případech, tlakem usměrňujícím pohlavní výběr (Freeland 1976). Během interakce parazita s hostitelem může být pozměněn pach hostitele a jeho schopnost pachové signály přijímat. Pozměněný pachový profil může vznikat jako následek obranné reakce hostitele, vedlejšího efektu infekce bez zjevných adaptivních rysů nebo se může jednat o manipulaci ze strany parazita. Manipulací mění parazit chování hostitele tak, aby zvýšil pravděpodobnost svého přenosu (Manipulační hypotéza, Barnard and Behnke 1990). Většinou jsou za manipulaci považovány specifické změny, jako je ztráta strachu z pachu kočky, je-li pro parazita kočka definitivním hostitelem. Hranice mezi manipulací a vedlejším efektem nákazy (následkem onemocnění), který vede ke změně chování, nemusí být vždy jasně vymežitelná. Změna pachu hostitele je jedním z faktorů, které mohou sociální interakce a chování ovlivňovat. Je známo několik případů infekce parazity, kdy se pach jejich hostitelů mění, a hostitelé jsou tak zdravými jedinci rozpoznáni (Scott 1990, Kavaliers and Colwell 1995a, Able 1996). O mechanismech, kterými tyto změny probíhají, je známo podstatně méně. Přestože na teoretické úrovni je změna MUP během infekce parazity diskutována, výsledky konkrétních experimentů zatím publikovány nebyly. Ve své práci se proto zaměřuji na vztah mezi produkcí MUP u laboratorních myší a infekcí parazitem *Toxoplasma gondii*. Sledovala jsem jak celkové množství MUP u infikovaných myší v porovnání s kontrolami, tak dynamiku produkce v průběhu infekce. Měření dynamiky MUP během infekce mělo zamezit situaci, kdy se nepodaří zachytit krátkodobou změnu, případně bude změna typická jen pro jednu z fází infekce. Aby se vyloučil vliv pohlaví hostitele, byli v pokusech použiti samci i samice. V průběhu pokusu byla měřena hmotnost, související se zdravotním stavem infikovaných myší, a v závěru pokusu byla samcům vypreparována a zvážena testes

a cauda epididymis prezentující reprodukční potenciál (Jones et al. 2007). Z výsledků experimentu vyplývá, že infekce má na tvorbu MUP vliv. Jedinci infikovaní *T. gondii* mají sníženou hladinu MUP. Samci snižují produkci na úroveň kontrolních samic, čehož bylo zatím docíleno pouze kastrací samců.

## 2. Cíl práce

Vzhledem k absenci publikovaných experimentálních dat týkajících se vlivu parazita na produkci MUP (respektive lipokalinů) jsem se rozhodla zaměřit primárně na potvrzení či vyvrácení jejich diskutované proměnlivosti. V širším měřítku bylo smyslem práce přinést další poznatky o látkách zapojených do pachové komunikace, a to prostřednictvím parazita jako nového faktoru. Produkce MUP pod vlivem parazita působícího na prostředí hostitelského organismu může přinést informace o náročnosti produkce a její nezbytnosti. Experiment se tak dotýká tématu evoluce komunikace a ekofyziologie. Zároveň jsme očekávali nové informace o interakci parazita s hostitelským organismem. *Toxoplasma gondii* je probádaným parazitem, vyvolávajícím v organismu hostitele mnohé změny včetně změn v chování. Teoretická změna pachu po infekci toxoplasmou by mohla vést ke změnám v sociálním začlenění hostitele a přinášet tak parazitovi výhody. *T. gondii* je pro tyto výzkumy vhodným kandidátem také proto, že myš domácí je jejím přirozeným hostitelem.

V teoretické části této práce nastiňuji problematiku pachové preference a její význam na poli parazitologie. Následuje stručný přehled týkající se MUP. V další části se zaměřuji na informace o použitém parazitovi *T. gondii*. V praktické části uvádím mnou prováděné pokusy a jejich výsledky. Diskuze se týká i pokusů, které sloužily jako pilotní a které nejsou v celém rozsahu v této práci uvedeny.

### 3. Teoretická část

#### 3.1. Paraziti a pachová preference

*Sociální život přináší přes řadu evolučních výhod také vyšší pravděpodobnost nákazy parazitem. Paraziti, zvláště ti s jednohostitelskými cykly, se zvyšující se hustotou jedinců na malém prostoru spíše naleznou dalšího hostitele. Zvířata, která jsou schopná nakažené jedince rozpoznat a vyhnout se jim, získávají značnou výhodu. Ta se projeví zejména během páření. Výběr správného partnera, se kterým bude jedinec plodit potomstvo, je pod silným evolučním tlakem (Hamilton 1980, Moller and Saito 1994). Samice, která se vyhne infikovanému samci a bude se pářit se zdravým jedincem, snižuje pravděpodobnost přímé nákazy (teorie přímé výhody, Able 1996) a/nebo zvyšuje kvalitu svých budoucích potomků (teorie dobrých genů Fisher 1958). Je totiž pravděpodobné, že rezistentní jedinec má „dobré geny“, které ho před infekcí chrání. To samé, s přihlédnutím k relativně nižší investici do potomstva, platí pro samce (Able 1996).*

Tyto teorie platí za několika předpokladů. Kromě samotné schopnosti rozpoznat infekci by mělo platit, že signály, dle kterých je hodnocen zdravotní stav zvířete jsou, alespoň do určité míry, upřímné (angl. honest signal). Toho může být docíleno nákladností prezentovaných znaků. Tyto znaky bývají často pohlavně druhotnými znaky. Z hlediska investované energie mohou být náročné na tvorbu i na udržování. Druhotné pohlavní znaky mohou svou fyziologickou nepraktičností nositele omezovat, jako například dlouhá ocasní pera bránící v letu (Balmford et al. 1993). Druhotné znaky, které samce zvýhodňují v pohlavním výběru a zároveň je nějakým způsobem omezují, jsou základem teorie handicapu (Zahavi 1975). Do této kategorie pravděpodobně patří i vysoká hladina samčího pohlavního hormonu testosteronu. Ten je znakem dominantních jedinců, se kterými se samice přednostně páří, a zároveň tento hormon působí negativně na imunitní systém. Vysokou hladinu testosteronu si tak může dovolit pouze samec, který je schopný tento handicap překonat (Folstad and Karter 1992, Wedekin and Foldstat 1994). To také znamená, že ne každý samec, který nemá parazity, je upřednostňován v pohlavním výběru. Submisivní samec, který se nevystavuje riziku střetu s jinými samci a má nízkou hladinu testosteronu (a tudíž neznevýhodněnou imunitu), může mít méně

parazitů (Getty 2002). V přirozených situacích tak samice pravděpodobně vybírají mezi zdravotním stavem, mírou příbuznosti, dominantním postavením a s ním spojenou prezentací druhotných pohlavních znaků jedince. Všechny tyto teorie jsou opodstatněné pouze v případě, že v přírodě a u sledované skupiny pohlavní výběr samic funguje a samice nejsou spíše znásilňovány agresivními samci.

U mnoha savců se v rozpoznání jedince a získávání podrobnějších informací o něm účastní čich jako jeden z nejdůležitějších smyslů. Jeho výhodou je působení na poměrně velkou vzdálenost a také určitá „výpovědní hodnota“. Čich totiž poskytuje informace, které nemusí být vysílající jedinec schopen ovlivnit, například stav mikroflóry. Schopnost odlišit infikované jedince byla testována na laboratorních myších, většinou s použitím dvojramenného bludiště. V jednom z ramen byl prezentován pach infikovaného, v druhém pach zdravého jedince, popřípadě pach jiného druhu zvířete či jiný, neutrální pach (mandlová esence) sloužící jako kontrola (Egid and Brown 1989, Wagner 1998). Sledovala se jak preference pachu, tak doba, po kterou jedince pach zaujal. Vybere-li si jedinec pach jednoho ze dvou testovaných zvířat, preferuje pach zdravého jedince, a tedy diskriminuje nemocné zvíře. Nemůžeme ovšem z tohoto pokusu vyvozovat, že se nemocnému zvířeti vyhýbá. To dokazuje až pokus, kdy testující zvíře preferuje neutrální pach či kontrolu před pachem spojeným s infikovaným jedincem. Bylo potvrzeno, že samice se v přirozených (či semi-přirozených) podmínkách s vybranými samci také více pářily (Wagner 1998, Drickamer et al. 2000). To potvrzuje, že výběr pachu zdravého jedince je motivován pohlavním výběrem (ne například jen zajímavostí podnětu). Otázkou je, do jaké míry jsme v laboratorních podmínkách schopni testovat hypotézu dobrých genů. To, že samice v pokusu preferují kontrolní samce, neznamená, že si vybírají samce s lepšími geny, kteří jsou vůči nákaze rezistentní, ale samce, kteří s původcem infekce do styku nepřišli.

Z důvodu příliš širokého rozpětí této problematiky se v dalším textu zabývám jen vlivem infekce na pachový profil jedince a reakcí na něj, neboť zde může mít produkce MUP roli. Stranou nechávám schopnost nakažených jedinců signály přijímat, dále zpracovat a také odlišnosti v pachové preferenci těchto jedinců. Schopnost odlišit infikované jedince podle pachu byla experimentálně prokázána jak u nálezů

jednohostitelskými, tak vícehostitelskými parazity (mající zpravidla mezihostitele a definitivního hostitele, nezbytného pro ukončení reprodukčního cyklu).

Řada z výše zmíněných teorií byla testována na myších infikovaných parazitem *Heligmosomoides polygyrus* (Scott 1990, Kavaliers and Colwell 1995b, Kavaliers et al. 2003a). Jedná se o běžnou gastrointestinální trichostrongyloidní hlístici, pro kterou je myš přirozeným hostitelem. Spolu s trusem hostitele odcházejí vajíčka parazita, která jsou po krátké periodě infekční pro dalšího hostitele (parazit je geohelmit). Jako modelový parazit je *Heligmosomoides polygyrus* zajímavý také tím, že v těle infikovaných myší bývá přítomen malý počet parazitů a neprojevují se žádné výrazné známky nemoci. Aktivita a reprodukční chování zůstávají také stejné (Hart 1990). Odolnost proti parazitovi je zde dědičná (Keymer et al. 1990), může tedy být testována teorie dobrých genů (Fisher 1958, ex. Edwards 2000, Kavaliers et al. 2004). Potvrzeno bylo jak odlišení pachu infikovaných samců, tak i přímé vyhýbání se tomuto pachu (Wagner 1998, Kavaliers et al. 2003b). V experimentech s tímto parazitem byla také prokázána spojitost mezi výběrem pachu samce a vyšší ochotou k páření s tímto samcem (Ehman and Scott 2002). Dále se sledoval vliv změn testosteronu u samců na výběr samic. *H. polygyrus* má negativní vliv na hladinu testosteronu při velkém počtu parazitů v těle myši (Barnard et al. 1998). Samice se vyhýbaly pachu infikovaných samců jak v receptivní fázi estrálního cyklu, tak mimo ni (Kavaliers et al. 2004). Vzhledem k tomu, že samice v nereceptivní fázi estrálního cyklu dávají přednost kastrovaným samcům (Mossman and Drickamer, 1996), usoudili autoři článků, že samice nereagovaly na hladinu testosteronu infikovaných samců, ale přímo na jejich zdravotní stav (Kavaliers et al. 2004). Samci se chovali podobně jako samice, vyhýbali se pachu infikovaného jedince. Samci s většími sexuálními zkušenostmi byli vybíravější a projevovala se u nich větší neochota pářit se s nakaženou samicí (Kavaliers et al. 2001).

Podobné výsledky jako u pokusů se zvířaty infikovanými *H. polygyrus*, byly získány s parazitem *Eimeria vermiformis*. *E. vermiformis* je protozoální parazit patřící mezi Apicomplexa, tedy organismus velmi vzdálený hlísticím, ke kterým patří výše zmíněný parazit. Odolná stadia jsou vyloučena spolu se stolicí hostitele a po krátké periodě, během které dochází k vysporulování, se oocysty stávají infekčními. Nákaza probíhá orálně, parazit osidluje trávicí trakt. Stejně jako v předchozím případě samice

myši rozpoznávaly infikované samce a aktivně se vyhýbaly jejich pachu (Kavaliers and Colwell 1995a, Kavaliers and Colwell 2005). Na pach infikovaných samců, kteří byli ve fázi, kdy se v jejich těle ještě netvoří infekční stadia, reagovaly samice stejně jako na samce v pozdější fázi infekce. Byl tak potvrzen předpoklad, že samice nereagují na uvolňovaná reprodukční stadia parazita (Kavaliers et al. 1997). Dalšími parazity, u kterých byl potvrzen vliv na pach hostitele jsou tasemince *Taenia crassiceps* (Gourbal and Gabrion, 2004), *Hymenolepis diminuta* (Willis and Poulin, 2002), hlístice *Trichinella spiralis* (Klein et al. 1999) a protozoální parazit *Babesia microti* (Smith et al. 1996). *T. crassiceps* a *T. spiralis* jsou známy tím, že vyvolávají celou řadu dalších fyziologických změn u svých hostitelů (Larralde et al. 1995, Wilson 1993) a tak změna pachu není příliš překvapivá. Hypotéza, týkající se nebezpečí přímé nákazy od infikovaných samců, byla testována na myších hostících ektoparazity. Samice se vyhýbaly pachu samců infikovaných vší *Polyplax serrata* (Kavaliers et al. 2003b) a snižovaly tak riziko vlastní nákazy.

Samice jsou schopné odlišovat nejen jedince nakažené eukaryotními organismy, ale i virem chřipky, pro který není myš přirozeným hostitelským druhem. Infikování samci ztráceli pro samice atraktivitu, neboť samice dávali přednost pachu zdravých samců a zároveň reagovaly stejně na pach infikovaných samců a vzorky s vodou. Vyhýbavé chování potvrzeno nebylo (Penn et al. 1998). Dalšími viry působícími na pach samců jsou myší nádorový virus (mouse mammary tumor virus, MMTV, Yamazaki et al. 2002) a virus klíšťové encefalitidy (tick-born encephalitis virus, TBEV). Poslední zmiňovaný patogen zvyšoval, jako jediný ze sledovaných, atraktivitu infikovaných samců, a to prostřednictvím zvýšené hladiny testosteronu. Vzhledem k tomu, že se virus nemůže přenášet přímo z jednoho hostitele na druhého bez přítomnosti vektoru, je manipulace ze strany parazita nepravděpodobná (Moshkin et al. 2002).

Vyhýbání se pachu nakaženého jedince souvisí se sexuální zkušeností a „známostí“ pachu. Samice, které byly krátce vystaveny pachu infikovaného samce, se v následujícím pokusu méně vyhýbaly tomuto pachu (Kavaliers et al. 2003b). U samic, které jsou v kontaktu s pachem samce infikovaného *Heligmosomoides polygyrus* nebo *Eimeria vermiformis*, dochází k zajímavému fyziologickému jevu, vyvolání analgezie (inhibice bolesti). Jsou-li samice vystaveny pachu kastrovaného samce či samce s nízkou hladinou

testosteronu, k signifikantnímu vyvolání analgezie nedojde. U samic, kterým byla předložena moč fyzicky stresovaného samce, k vyvolání analgezie došlo, ale v signifikantně nižší míře než během reakce na pach infikovaného jedince. Autoři studie vyvozují, že samice v případě reakce na pach infikovaného jedince reagují na specifické pachové značky asociované s infekcí, nikoliv na změny spojené s nízkou hladinou testosteronu či pachem stresovaného zvířete (Kavaliers and Colwell 1992, Kavaliers et al. 1998).

Z předchozího shrnutí vyplývá, že samice jsou schopné odlišovat samce infikované jak mnohobuněčnými a protozoálními parazity, tak viry. Ve všech případech stačil pach moči či podestýlky. Mechanismy, jakými ke změně pachu dochází, budou pravděpodobně různé. Může docházet k odlišné exkreci látek ovlivněných hladinou testosteronu a dalších hormonů, produktů imunitních drah, metabolitů nebo přímo látek uvolňovaných parazitem a v neposlední řadě i ke změnám jak feromonů, tak jejich transportérů, především MUP.

### **3.2. Hlavní močové proteiny, MUP**

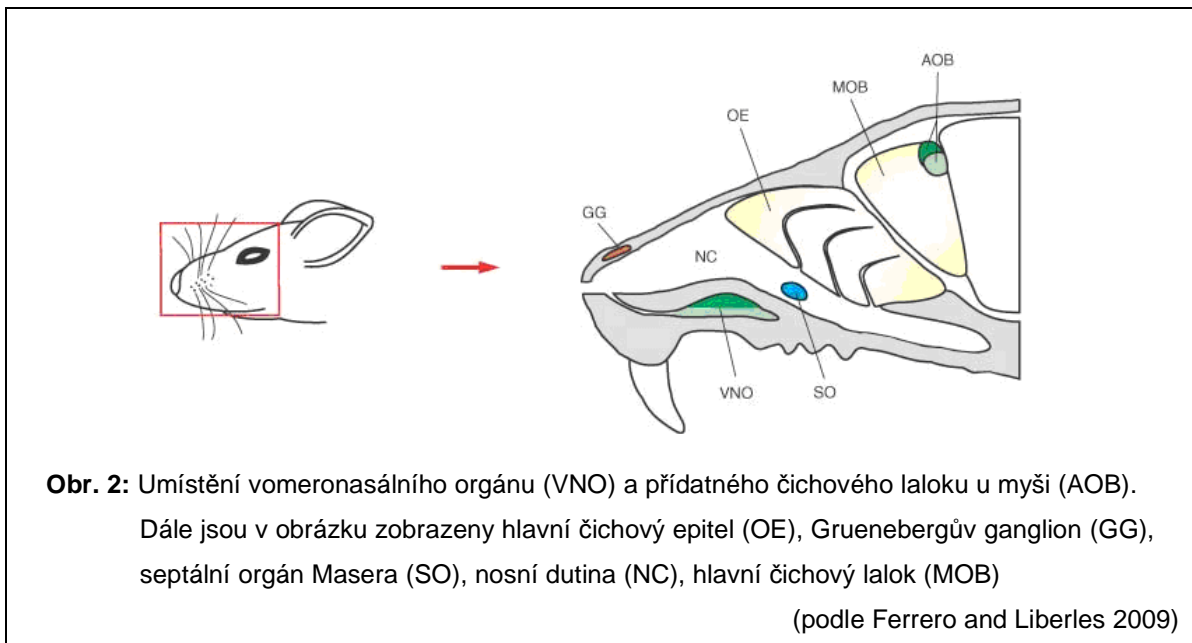
*MUP (Major Urinary Proteins), hlavní močové proteiny jsou proteiny přenášející různé nepolární ligandy, z nichž některé jsou feromony. Pomáhají vytvářet pachový profil myši (Cheetham et al. 2007, Arakawa 2007) a dalších hlodavců (Daniszova et al. 2009) a postupným uvolňováním prodlužují působení feromonů (Hurst et al. 1998). Jsou využívány jak na vnitrodruhové, tak mezidruhové úrovni a podílejí se na tvorbě reprodukční bariéry (Bowers and Alexnader 1967, Christophe and Baudoin 1997). Na vnitrodruhové úrovni jsou využívány ke komunikaci mezi jedinci, prezentují příbuzenské vztahy a sociální postavení, spolu s MHC antigeny vytvářejí individuální pach (Hurst et al. 2001). Nejen přenášené ligand, ale přímo i MUP se mohou vázat na receptory a působit tak jako feromony (Moor 2006). MUP a jejich ligandy fungují jako oba typy feromonů, tedy informují a zároveň ovlivňují fenotyp jedince. Z novějších prací vyplývá i další funkce MUP, spojená s regulací metabolismu glukózy, lipidů a přímo související s některými typy diabetu u myši (Zhou et al. 2009, Hui et al. 2009).*



Ligandy přenášené MUP jsou těkavé hydrofobní molekuly. Patří mezi ně řada feromonů využívaných živočichy i rostlinami. Mezi ligandy přenášenými MUP se nejčastěji vyskytují thiazol (2-sec-butyl-4,5-dihydrothiazol) a brevicomin ((R,R)-3,4-dehydro-exo-brevicomin) (Cabaggiony 2000), dále farnesen (E,E-alfa-farnesen, E-beta-farnesen), heptanon (6-hydroxy-6-methyl-3-heptanon) a geraniol (3,7-dimethyl-3,6-octadien-1-ol). Thiazol a brevicomin vyvolávají agresivní chování u samců (Novotny et al. 1985), u samic indukci či synchronizaci estrálních cyklů (Jemiolo et al. 1986) (samice myši domácí jsou polyestrické, estrus se u nich objevuje v pravidelných intervalech 4-6 dní). Farnesen je obecně užívaným odorantem, který je například zodpovědný za typickou vůni jablek. U myši stimuluje agresivní samčí chování. Heptanon urychluje nástup puberty u samic (Jemiolo et al. 1989). Fyziologická reakce na geraniol je zatím neznámá (Novotny et al. 1985, Novotny et al. 1990, Novotny et al. 1999a, Novotny et al. 1999b).

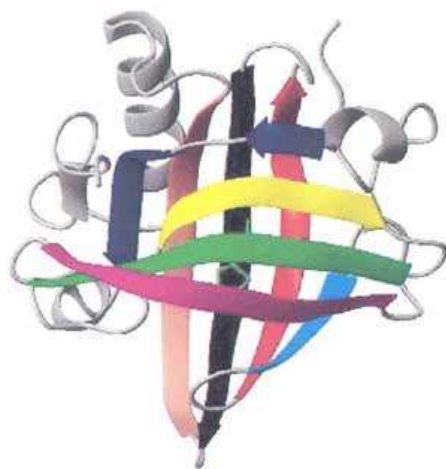
MUP chrání ligandy jak ve vnitřním prostředí těla, tak ve vnějším prostředí po odchodu s močí nebo slinami (Ferkin and Leonard 2008). Mimo tělo MUP degraduje a uvolňuje ligandy. Ty jsou ze vzduchu nasáty příjemcem, u kterého aktivují receptory hlavního čichového epitelu a vomeronasálního orgánu (VNO) (Moss et al. 1997, Chamero et al. 2007). Hlavní čichový epitel byl dlouho považován za orgán přijímající jiné než feromonové podněty a příjem feromonů byl dlouho diskutován. Dnes se přikláníme k názoru, že oba systémy, jak hlavní čichový epitel, tak vomeronasální orgán jsou důležité pro kompletní detekci feromonálních signálů (Xu et al. 2005). Signál, vyvolaný aktivací receptorů feromony, je veden do hlavních čichových laloků a dále do čichových oblastí kůry mozku. Působení feromonů, detekovaných přes hlavní čichový orgán, na endokrinní systém je zprostředkováno aktivací neuronů v přední části hypotalamu, kde dochází k následné produkci GnRH (Gonadotropin release hormone) (Boehm et al. 2005). Kromě hlavního čichového epitelu jsou feromony detekovány i vomeronasálním orgánem. Ten se nachází u většiny savců a je specializován na příjem feromonů, přinášovaných aktivně nasávaným vzduchem (Halper a Martinez-Marcos 2003). U myši se nachází v oblasti nasálního septa, má trubicovitý tvar a je vyplněn mukusem, který je stabilnějším prostředím pro těkavé molekuly (Meredith and Oconnell 1979). Na VNO se nacházejí dva typy odlišně prostorově uspořádaných receptorů - v apikální

a v bazální části VNO (Dulac and Axel 1995). Tyto receptory mají stejnou terciární strukturu jako receptory hlavního čichového orgánu. Jsou to proteiny se sedmi transmembránovými doménami na vnitřní straně interagující s G-proteiny. Navázaný feromon změní konformaci transmembránových domén a uvolní tak  $\alpha$ -podjednotku G-proteinu. Přes adenylát cyklázu produkující cAMP dochází k depolarizaci a vzniku akčního potenciálu (Buck and Axel 1991). Každý receptor je asociovaný s jedním typem G-proteinu (Del Punta et al. 2002). Z fylogenetických analýz je zřejmé, že se MUP vyvíjely společně s těmito receptory (Chamero et al. 2007). Signál z odlišných částí VNO je předáván do anteriorní či posteriorní části přídatných čichových laloků (Brennan and Keverne 2004), dále putuje přes specifickou oblast amygdaly do hypotalamu, centra regulujícího endokrinní stav zvířete a hladinu produkovaných hormonů. V hypotalamu jsou produkovány liberiny, peptidické hormony, ovlivňující dále hypofýzu. V předním laloku hypofýzy (adenohypofýza) se tvoří glykoproteinové hormony - folikuly stimulující hormon, luteinizační hormon a prolaktin. Ty působí jak na reprodukční systém samic, tak na spermatogenezi a produkci testosteronu u samců. Přenášený signál mívá hlavní mozková centra a je tak přijímán nevědomě. Změny v hypotalamu jsou zodpovědné jak za krátkodobé změny v chování, tak dlouhotrvající endokrinní posuny (Meredith 1998). V roce 2004 obdrželi Richard Axel a Linda Buck za výzkum v oblasti receptorů aktivovaných odoranty a čichu obecně Nobelovu cenu.



V případě ligandů vázajících se na receptory nelze hovořit o přenosu signálu způsobeném MUP. Existují ale studie dokládající fyziologickou změnu příjemce po aktivaci receptorů prostřednictvím MUP, u kterých byly vytěsněny přirozené ligandy. Pro vytěsnění přirozených ligandů se využívá kompetitivní ligand, menadion, který nezpůsobuje u myši žádnou fyziologickou reakci (Robertson et al. 1998). S přímým působením MUP je spojena řada otázek, například jak se netěkavé proteiny dostávají k epitelu a jakým způsobem jsou zde přijímány.

Klastr genů pro MUP leží na čtvrtém chromozomu myši (Kauter et al. 1982, Bennett et al. 1982, Bishop et al. 1982) a je nejpočetnějším a nejvíce kompaktním klastrem mezi myšími lipokaliny. Klastr obsahuje 40 genů a pravděpodobně další nejméně čtyři geny se mohou nacházet v dosud nejasných oblastech (tzv. sequence gaps), 21 genů kóduje proteiny a 19 genů jsou pseudogeny (Stopková et al. 2009). V klastru myši kmene C57BL/6 lze odlišit dvě skupiny genů, centrální skupinu typickou pro C57BL/6 s četnými pseudoreplikacemi, která je vzájemně sekvenčně a pravděpodobně i funkčně podobnější než druhá, starší skupina (Logan et al. 2008, Stopková et al. 2009). Funguje zde alternativní sestřih, posuny čtecích rámců a další mutace (nejběžnější jsou substituce lysin-glycin, Robertson et al. 1996). Geny pro MUP jsou duplikované, což je pravděpodobně důsledek tlaku pohlavního výběru na zvýšení produkce MUP (o tomto principu více Ohno 1975). Primární struktura MUP není příliš konzervovaná, typická je terciární struktura, kterou sdílí celá proteinová rodina lipokalinů. Je tvořena osmi antiparalelními  $\beta$ -listy, tvořícími  $\beta$ -barel eliptického tvaru s dutinou (Flower 1993). Ta je vyplněna převážně hydrofobními aminokyselinovými zbytky, které váží hydrofobní ligandy a zároveň celou strukturu stabilizují (Lucke et al. 1999). Syntéza MUP probíhá především v jaterní tkáni a spouští se s nástupem puberty. Dále jsou MUP tvořeny v žláze slzné, podčelistní, podjazykové, průšňní a mléčné. Zásadní vliv jater na množství produkovaných MUP je dán především jejich velikostí. Dnes je známo nejméně 35 izoform těchto proteinů (shrnuto v Stopková et al. 2009) není ovšem jasné, jak velký je funkční rozdíl mezi jednotlivými izoformami. Molekulová hmotnost MUP je 18-20 kDa (Krauter 1982, Duncan et al. 1988).



**Obr.3:** Terciární struktura MUP (Institute for Pheromone Research, Indiana University, : [www.indiana.edu/~iphero/research.html](http://www.indiana.edu/~iphero/research.html))

Množství produkovaných MUP ovlivňují pohlavní hormony (Thung 1956, Stopka et al. 2007), produkce je vyšší u samců. Testosteron má zásadní vliv a lze jeho podáním zvýšit produkci u samic až na hodnoty obvyklé u samců téhož kmene, naopak kastrací samic lze snížit hladinu jejich MUP na úroveň samic (Hastie et al. 1979). Mechanismus působení testosteronu není přesně znám. Ovlivňovány mohou být například jaterní buňky, které jsou hlavním místem syntézy MUP a zároveň podléhají vlivu testosteronu. K efektivnímu působení testosteronu na produkci MUP je nezbytná funkční štítná žláza produkující tyroxin. Potvrzen byl také vliv kortizolu a růstového hormonu. V kombinaci s testosteronem bylo dosaženo výraznějších změn v produkci MUP než při užití každého hormonu zvlášť (Koenig et al. 1980, Knopf et al. 1983).

Na produkci MUP má zásadní vliv pohlaví a genetické pozadí jedince, a to jak u volně žijících myší, tak u inbredních kmenů (Finlayson et al. 1965, Mudge et al. 2008). Zastoupením jednotlivých izoform i celkovým množstvím MUP se tvoří pattern typický pro kmen a pohlaví. V literatuře lze najít u samců až 5-20krát vyšší produkci než u samic (Hastie and Held 1978). V mých pokusech byl rozdíl v produkci MUP mezi pohlavími výrazně nižší, a to jak u inbredního kmene, tak u kříženců divokých myší. Individuální variabilita MUP u jedinců inbredních kmenů je v porovnání s divoce žijícími jedinci *Mus m. domesticus* minimální (Robertson et al. 1997, Payne et al. 2001). Rozdíly jsou mezi

jednotlivými laboratorními kmeny, a to v celkovém množství MUP a v zastoupení jednotlivých izoform. V rámci inbredních linií se vyčleňují dvě skupiny s podobným fenotypem MUP, daným společným předkem těchto linií (Robertson et al. 1996, Cheetham et al. 2009). Běžně používané kmeny reprezentující tyto skupiny jsou C57BL/6 (skupina označovaná Mup-a2) a BALB/c (skupina Mup-a1) (Krauter et al. 1982, Cheetham et al. 2009). Přes rozdílné množství produkovaných MUP využívají v pachové komunikaci tyto proteiny jak samci, tak samice. Obě pohlaví navíc pomocí MUP ovlivňují fenotyp opačného i stejného pohlaví. U divokých myší poddruhů *M. m. domesticus* a *M. m. musculus* spoluvytvářejí MUP reprodukční bariéru bránící křížení těchto dvou poddruhů (Boursot et al. 1993, Stopková et al. 2007). Dále se MUP podílejí na vytváření individuálního pachu jedince (Hurst et al. 2001). Ten odráží příbuzenské vztahy, sociální status zvířete, jeho fyziologický stav (Chamero et al. 2007, Stopka et al. 2007) a pomáhá samicím ve výběru reprodukčního partnera (Sherborne et al. 2007, Thom et al. 2008).

Samci využívají moč ke značení teritoria, odlišně ji distribuují submisivní a dominantní samci (Desjardins et al. 1973, Rich and Hurst 1999). Výše postavení samci se snaží pachovou stopu ostatních samců přeznačkovat, pach jiného samce u nich vyvolává agresivní chování. Pachové značky umožňují komunikaci bez přímého kontaktu, což je výhodné jak pro submisivní samce, kteří raději opustí území dominantního samce a neriskují tak napadení (Drickamer 2001, Novotny 2003), tak pro samce dominantní, kteří snížením množství útoků šetří energii a také snižují pravděpodobnost zranění (Hurts et al. 1993). Pro samice jsou ligandy samčích MUP atraktivní. Přednostně se páří s dominantními samci, jejichž pachové značky jsou četnější a čerstvější. Také jsou schopné odlišit cizí, nové samce a příbuzné jedince (Hurts, Rich 1999). Ligandy, které zvyšují atraktivitu samců, jsou brevicomin a thiazol, které zároveň mezi samci vyvolávají agresivní chování. Farnesen je signálem dominance a podílí se také na vyvolání agresivního chování (Novotny 2003). Inbrední kmeny myší mají výrazně sníženou variabilitu MUP (Cheetham 2009) a pravděpodobně i schopnost odlišovat podle pachu moči individua, což může vést k nižší míře agrese, než je běžné u volně žijících myší.

Reakce samic na MUP produkované oběma pohlavími zahrnuje několik všeobecně známých fenoménů, souvisejících s nástupem estrálního cyklu a reprodukci. Ve většině

případů byla nejdříve pozorovaná reakce na přítomnost jedince, později byla potvrzena dostatečnost pachu z moči či podestýlky k vyvolání jevu. U mladých samic, vystavených pachu dospělého samce, dochází k časnějšímu nástupu puberty (Vandenbergh 1969), a to jak po kontaktu se samcem, tak pouze s jeho močí (Drickamer and Murphy 1978). Efekt je závislý na produkci samčích pohlavních hormonů, neboť pach juvenilních či kastrovaných samců předčasný nástup puberty nevyvolá (Lombardi et al. 1976, Drickamer and Murphy 1978). Samice žijící ve skupinách bez samce mají nástup puberty naopak opožděný. U izolovaných samic k opoždění nedochází (Vandenbergh et al. 1972). Pach samic tedy zpomaluje nástup puberty u ostatních samic. Dále přítomnost dospělého samce zkracuje estrální cyklus a negativně působí na jeho pravidelnost (Whitten effect, Whitten 1959, Jemiolo et al. 1986). Efekt je spouštěn přes VNO, samice s odstraněným VNO na pach v tomto směru nereagují (Marchlewska - Koj et al. 2000). Estrální cyklus může být také prodloužen či úplně potlačen pachem dospělých samic, za tento efekt (Lee-Boot efekt) je zodpovědná stejná látka, která u mladých samic vyvolává pozdější nástup puberty (Novotny et al. 1999). Délka oestru samic, žijících společně, je dána velikostí skupiny (Jemiolo et al. 1986). V případě tohoto efektu není VNO nutný, i po jeho odstranění dochází k prodlužování cyklu a snižování jeho pravidelnosti. Je tedy možné, že je informace předávána i prostřednictvím jiného signálu nebo je feromon způsobující tento efekt (2,5-dimethylpyrazin) přijímán receptory hlavního čichového epitelu (Marchlewska - Koj et al., 2000). Pach samce má vliv nejen na estrální cyklus ale i průběh březosti samic. U samice, která se v rané fázi březosti setká se samcem, se kterým se nepáří, může dojít k přerušení březosti a nástupu nového estru. Tento efekt jako první popsala v roce 1959 Hilda Bruce a po této badatelce bývá také označován. Jako v ostatních případech i zde stačí moč či podestýlka samce, není nezbytná jeho přítomnost (Vandenbergh 1969, Marchlewska - Koj and Bialy 1978). K vyvolání efektu je nutná identifikace samce jako cizího. Pravděpodobnost potratu u laboratorní myši je vyšší, je-li cizí samec z jiného inbredního kmene (Parkes et al. 1961). Výčet efektů není kompletní a nezabíhá do podrobností, ale pro ilustraci významnosti pachu v reprodukci je dostačující. Tyto fyziologické změny jsou reakcí na celkovou pachovou značku, význam MUP je ale pravděpodobně značný. Samotné MUP působí v některých fyziologických změnách spojených s ovulací samic (More 2006). Pomocí komplexů feromonů s MUP komunikují

obě pohlaví, samci reagují na MUP produkované samicemi. Samice modulací produkce vlastních MUP prezentují nastupující receptivní fázi estrálního cyklu (Stopka et al. 2007) a stávají se tak pro samce atraktivnější (Hayashi and Kimura 1974).

Za primární úlohu lipokalinů bývá považován transport funkčních ligandů k cílové tkáni, či naopak do vnějšího prostředí. Je ovšem možné, že lipokaliny původně sloužily k odstraňování potenciálně škodlivých molekul či podobnou cestou chránily organismus před škodlivými zásahy („scavenger role“, odklízecí role) (Stopková et al. 2009). Schopnost eliminovat z organismu nebezpečné či cizorodé látky si zachovaly některé lipokaliny podnes. V případě siderocalinu (syn. NGAL., Lcn2) se jedná o vazbu bakteriálních transportérů železa (Goetz et al. 2002, Mori et al. 2005), lipokalin YodA váže kovy na svém povrchu (David et al. 2003). Nedostatek železa v prostředí organismu může působit jako antimikrobiální agens, a tyto lipokaliny tak mohou mít protektivní roli (Fischbach et al. 2006, Smith 2007). Některé lipokaliny jsou schopné chránit organismus před následky působení volných radikálů. Specificita této interakce není zatím přesně známá, obecně se exprese těchto lipokalinů zvyšuje, je-li organismus vystaven stresujícím podmínkám – např. kyslíkové radikály, peroxid vodíku, rentgenovému záření (Charron et al. 2008, Ganfornina et al. 2008). Z tohoto hlediska jsou lipokaliny velmi zajímavou skupinou proteinů, potenciálně využitelnou pro studium evoluce komunikace obecně (Stopková et al. 2009).

MUP nejsou jedinými lipokaliny zapojenými do chemické komunikace u myší. Dalšími hojně exprimovanými transportními proteiny jsou Obp (Odorant binding protein) (Bignetti et al. 1985). Zajímavostí je lokalizace myších Obp, vázaných na X pohlavní chromozom. Umístění na X chromozomu, který je u samic přítomen ve dvou kopiích a u samců v jedné, s sebou nese některé specifické důsledky. Aby se pohlaví nelišila v míře exprese genů, dochází ke kompenzaci dávky genů. U savců inhibicí jednoho z X chromozomů samic, tzv. lyonizace. Dále geny umístěné na X chromozomu podléhají rychlejší evoluci (Fast-X hypotéza, Charlesworth 1968, zpochybněna Thornton 2006, potvrzena Counterman et al. 2004 ). Umístění genů na pohlavních chromozomech není pravděpodobně náhodné, narozdíl od genů na autozomech, které spolu kromě umístění nemají většinou nic společného. V případě X chromozomu se často jedná o geny spojené s pohlavním výběrem a rozmnožováním. Protože se chromozom X vyskytuje u samců

v jedné kopii, geny, umístěné na tomto chromozomu, se ve fenotypu samce vždy projeví (hemizygotní expozice). Díky tomuto tlaku dochází na X chromozomu k hromadění genů, pro samce výhodných, respektive k eliminaci genů s negativním vlivem (Rice 1984). Můžeme tedy předpokládat, že Obp mají význam v reprodukci. Obp jsou také jedny ze zástupců lipokalinů, o kterých se domníváme, že podporují představu o „scavenger” roli (Grolli et al. 2006).

Obp se nacházejí nejen u hlodavců (krys, křečků) a dalších savců, ale i u hmyzu (shrnuto v Vosshall and Stensmyr 2005). U myší mají schopnost vázat nejen odoranty, nýbrž širokou škálu látek (Steinbrecht 1998, Pevsner et al. 1990). U těchto lipokalinů je také předpokládaná odklízecí role, odstraňování přebytečných ligandů po jejich interakci s receptorem. Obp by tak pomáhal receptory deaktivovat (Lazar et al. 2002). Prvním objeveným Obp byl protein z nosní sliznice krav vážící pyrazin (2-isobutyl-3-metoxypyrazin), od něhož byl odvozen původní název - Pyrazine binding protein (Bignetti et al. 1985). Odorant v názvu Obp je poněkud zavádějící, protože ligandy mohou být i feromony. Naopak není vyloučeno, že MUP nejsou schopné vázat odoranty. Celá situace se navíc komplikuje nejasnou definicí odorantů/feromonů. Oba dva typy látek jsou zapojené do chemické komunikace. Tento příklad dokumentuje obecný problém při objevování nových lipokalinů a definování jejich funkcí. Stejně jako je jasné, že Obp, popisovaný jako nazální protein, není exprimován pouze v nosní sliznici, tak MUP jako protein z moči je současně složkou slin. První objevený savčí feromon, křeččí afrodisin (Vincent et al. 2001), protein s obdobnou funkcí, jako mají MUP u myší, není podle definice feromon, ale transportní protein vážící feromony. Nejasné hranice mezi feromony a odoranty, nepřesnosti v nomenklatuře a fylogenezi jednotlivých lipokalinů, stejně jako funkční zástupnost některých lipokalinů přispívá k povrchním znalostem těchto proteinů, a donedávna tak byla role lipokalinů poněkud přehlížena. Dnes víme, že lipokaliny jsou zapojeny nejen do modulace pachové komunikace, transportu ligandů ven z těla, ale i v jejich opětovném příjmu a zpracování signálu, v čistící a ochranné funkci, včetně antimikrobiálních aktivit. Stoupá jejich význam v medicíně, neboť jsou zapojeny do řady imunitních reakcí (Flower 1994). V neposlední řadě jsou významnou složkou slin krevsajících členovců, která usnadňuje sání krve (Ribeiro et al. 1995, Montfort et al. 2000, Sangamnatdej et al. 2002, Calvo et al. 2005, Mans and Ribeiro 2008).



### 3.3. Parazit *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, stadia z nich uvolněná se množí pohlavně a vytváří oocysty, které odcházejí s trusem hostitele ven (Fayer 1980). V případě meziphostitele může přenos parazita proběhnout také kongenitálně, tedy z matky na její plod pomocí invazivních stadií - tachyzoitů (Frenkel 1988). *T. gondii* byla objevena dvěma francouzskými badateli roku 1908 u hlodavce gundiho saharského (*Ctenodactylus gundii*), podle něhož dostala druhové jméno. Patogenní projevy u lidí s jejich původcem jako první prokázal český vědec Janků v Praze roku 1923 (Janků 1923). Aby zvýšila šanci přenosu do definitivního hostitele, který je nezbytný k ukončení vývoje, ovlivňuje toxoplasma chování meziphostitele (Webster et al. 1994). I na lidské hostitele má v tomto směru vliv a může modulovat jejich chování (Flegr and Hrdy 1994, Flegr et al. 1996).

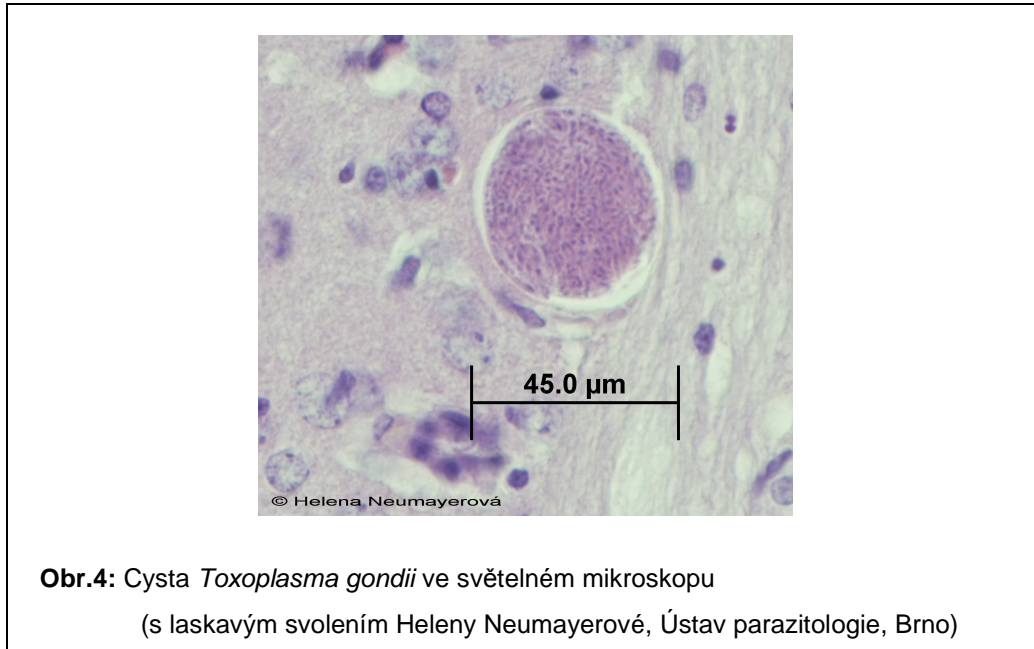
*Toxoplasma gondii* se řadí mezi Alveolata, jedné ze skupin nadříše („grupy“) Excavata. Dále je řazena do třídy Coccidea a spolu s třídami Gregarinidae a Hematozoa tvoří skupinu Apicomplexa (Hausmann and Hulsmann 2003). Tato skupina je typická svým apikálním komplexem využívaným při vstupu parazita do buňky a při tvorbě parazitoformní vakuoly. Všechna apicomplexa jsou obligátními intracelulárními parazity. V rámci apicomplex se vymezují následující skupiny: piroplasmida, zahrnující například babesie, haemosporidie s nejznámějším zástupcem Plasmodium, gregariny a cryptosporidie. Poslední skupinou jsou kokcidie, které je možné rozdělit na střevní kokcidie (enteric coccidia), kde nalezneme mimo jiné eimerie, a kokcidie tvořící tkáňové cysty. Tato skupina zahrnuje i rod *Toxoplasma* a jeho nejbližší příbuzné. Těmi jsou podle výzkumu z roku 2003 za použití sekvencí SSU rRNA *Hammondia hammondi* a *Neospora caninum*, jejichž společný předek se oddělil přibližně před 12 miliony lety (Sibley 2003). V rámci příbuzných skupin je toxoplasma charakteristická širokou škálou meziphostitelů, zahrnující v podstatě všechny teplokrevné obratlovce. V článku z roku 1980 je zmiňováno 350 druhů zvířat s prokázanou nákazou (Fayer 1980).

V roce 1953 došlo k odlišení dvou skupin dle virulence a tvorby cyst u myši (Frenkel 1953), dnes odlišujeme tři hlavní linie kmenů označované římskými číslicemi

I, II, III a malou skupinu kmenů, pro kterou se používá označení kmeny exotické. Kmeny jednotlivých linií vyvolávají různé imunitní odpovědi, s čímž souvisí míra jejich virulence a patologické projevy (Howe, Sibley 1995, Kodým et al. 2002). Rozdíly najdeme i v genomu a v geografickém rozšíření (Lehmann et al. 2006, Bontell et al. 2009). Obecně je průběh infekce kmeny toxoplasmy závislý na kmenu parazita, infekční dávce, způsobu infekce, genetickém pozadí hostitele a jeho aktuálním zdravotním stavu (Sibley 2003).

Cyklus je primárně dvouhostitelský, jak ale bylo zmíněno výše, může docházet k přenosu mezi mezihostiteli pozřením hostitele s tkáňovými cystami či kongenitálním transferem. Ve vývoji parazita existují tři stadia, všechna schopná infekce – tachyzoity (dělicí se v pseudocystách), bradyzoity (tvořící tkáňové cysty) a sporozoity (v oocystách). Tachyzoity bývají ve starších pracích označovány jako trofozoity nebo endozoity a jsou zodpovědné za stavy při akutní fázi toxoplasmózy. Do těla se dostávají přeměnou bradyzoitů či sporozoitů z cyst. V této fázi dochází k diseminaci parazitů (Dubey 1998). Rychlost, způsob šíření a cílová místa se výrazně liší u jednotlivých kmenů a souvisí s virulencí jak v akutní, tak v pozdějších fázích onemocnění (Barragan, Sibley 2002, Saeij 2005). Tachyzoity je možné nalézt v krvi, tělních tekutinách, slzách, nazálních sekretech, slinách, spermatu, vaginálním sekretu, moči a mléku (Saari and Räisänen 1977). Pod tlakem imunitního systému dochází k přeměně tachyzoitů na bradyzoity (cystozoity, Frenkel 1988). Ty jsou obecně odolnější proti proteolytickým enzymům, jsou méně pohyblivé a exprimují jiné proteiny. Strukturně jsou podobné tachyzoitům, jen o něco štíhlejší a jejich jádro je více posunuté k posteriornímu konci buňky. Vytváří tkáňové cysty, ve kterých se skrývají před imunitním systémem a mohou se dále množit endodygonií (rozdělení mateřského organismu na dva dceřinné). Velikost cyst je proměnlivá, od mladých útvarů do velikosti 5  $\mu\text{m}$  obsahujících pouze dva bradyzoity po cysty obsahující stovky organismů s průměrem až 100  $\mu\text{m}$ . Bradyzoity uvnitř cyst jsou průměrně 7  $\mu\text{m}$  dlouhé. Tvoří se brzy po infekci v mnoha tkáních těla, v plicích, které bývají zasaženy nejvíce, v játrech, ledvinách, ve svalech, mozku a očích. Lokalizace a počet cyst jsou závislé na kmenu parazita a druhu hostitele, poměrně nejvíce cyst v mozku v porovnání s jinými tělními orgány nalézáme u myši a krysy. Stěna cyst je tenká a pružná, neobsahuje glykogen ani jiné polysacharidy (což je důvod, proč se cysty špatně

barví stříbrem). Je složená jak z parazitálních, tak hostitelských komponent (Frenkel 1988, shrnuto v Dubey et al. 1998). Ve světelném mikroskopu (už při zvětšení 40krát) je cysta dobře patrná jako šedá kulovitá struktura s dvojitou stěnou.



Mezihostitelé se mohou nakazit několika způsoby. Nejčastěji pozřením infekčních oocyst, pozřením tkáňových cyst, dále transplacentálně, méně často transplantací infikovaného orgánu. Transplacentální neboli kongenitální infekce plodu je způsobena tachyzoity přecházejícími skrze placentu (Dubey et al. 1998). Reinfekce způsobená prasknutím tkáňových cyst byla prokázána na myším modelu, kde měla na pravděpodobnost reinfekce pozitivní vliv nižší hladina interferonu- $\gamma$  (Thompson et al. 2008). U lidí je považována za velmi vzácnou a podmíněnou imunosupresí pacientů (Luft and Remington 1992). Přenos přes mléko nebyl zatím potvrzen, přestože existují nálezy převážně tachyzoitů v mléce experimentálně nakažených koček (Powell et al. 2001).

Definitivní hostitel, kočkovitá šelma, se nakazí pozřením tkáňových cyst i oocyst. Možné je uvažovat také o orální nákaze volnými bradyzoity či tachyzoity, nejedná se ale o typický způsob infekce. Při infekci oocystami je úspěšnost nákazy koček závislá na dávce cyst, na rozdíl od infekce myši, kde není dávka rozhodující (Dubey 1998).

Obecně se používají při infekci laboratorních zvířat tři postupy - orální cestou (nejčastěji se jedná o homogenát mozkové tkáně nakažené myši s definovaným počtem

tkáňových cyst s bradyzoity), intraperitoneálně (používá se při infekci tkáňovými cystami a volnými stadii) a subkutánně (tkáňové cysty a volná stadia). Virulence bradyzoitů u laboratorních kmenů je závislá na způsobu podání parazita. Jsou-li bradyzoity podány myším orálně, jejich infekčnost je tisíckrát nižší než při subkutánní infekci, která je pro myši často letální. Silná reakce po subkutánní infekci může být dána nepřírozeným postupem, při kterém se parazit vyhne styku s agresivními trávicími šťávami hostitele. Výsledky výše zmíněných experimentů podporují představu o průběhu přirozeného cyklu. Oocysty, určené k nakažení meziphostitele, jsou velmi infekční pro myši a není zde rozhodující jejich dávka. Pro kočku jsou oocysty méně infekční a patogenní, naopak kočky produkují oocysty po pozření i několika málo bradyzoitů. Malá infekčnost oocyst pro definitivního hostitele není pro kokcidie typická (Dubey 1998, Dubey 2006)

U experimentálně nakažených myší bývají odlišitelné dvě fáze infekce. Akutní fáze probíhá první dva až tři týdny od infekce, chronická nastupuje nejdříve třicet dní od infekce. V akutní fázi se pomnožují tachyzoity a napadají další buňky a orgány, u myší se mohou vyskytovat známky nemoci, nahrbenost, pohublost, třes. Spíše než latentní fáze (bezpríznaková, typická pro lidské pacienty) je pro myši typická fáze chronická, kdy se zlepšuje stav zvířete, ale jsou patrné známky nemoci. Za latentní fázi u myší bych považovala dobu nejméně dva měsíce po nákaze, kdy na zvířeti nejsou znatelné známky nemoci a jeho váha se vyrovná zvířatům kontrolním. Lepší snášenlivost jedné z fází infekce neznamena nutně lepší šance na přežití fáze druhé, fungují zde odlišné mechanismy obrany (Suzuki et al. 1993).

Úhyn nemusí být doprovázen vysokým počtem cyst v mozku či rozvojem encefalidity. U citlivých myší dochází k zvýšené zánětlivosti a nekróze plic a jater (Suzuki 1993, Brown and McLeod 1994). Je poměrně obtížné identifikovat buňky, které se aktivně zapojují do pohlcování a destrukce parazita od těch, které byly parazitem aktivně napadeny. V obou případech se vytváří parazitoformní vakuola, ale buňky reagují odlišně. Například dendritické buňky, které byly aktivně penetrované, mají sníženou produkci MHC-II (související s jejich rolí antigen prezentujících buněk) a LPS indukovanou maturaci - sníženou schopnost odpovídat na bakteriální lipopolysacharid (LPS), který vyvolává dozrávání dendritických buněk (shrnutí v Dzierszinski and Hunter 2008). Zdá se, že dendritické buňky budou hrát zásadní roli při diseminaci, umožňující

některým kmenům parazita dostat se i do imunologicky privilegovaných orgánů (Lambert et al. 2009, Lambert and Barragan 2010). Zajímavostí je schopnost toxoplasmy vytvářet parazitoformní vakuoly a následně cysty i v bezjaderných buňkách (Romano et al. 2008).

Nezbytným předpokladem pro úspěšné zvládnutí infekce a vznik protektivní imunity je vytvoření efektivní buněčné odpovědi. Využity jsou jak CD8, tak CD4, produkující IFN- $\gamma$  (Araujo 1991). CD8 buňky a MHC I antigeny brání formaci cyst v mozku (Suzuki et al. 1993), CD4 se účastní procesu kontrolujícího jejich tvorbu (Araujo 1991). Zcela zásadní roli ve vytvoření rezistence má IFN- $\gamma$  a další prozánětlivé cytokiny (Silva et al. 2000). Pro potlačení infekce je ovšem nutné udržet rovnováhu mezi prozánětlivými a protizánětlivými složkami imunity (Suzuki et al. 1993, Dzierszinski and Hunter 2008). V průběhu akutní fáze působí IFN- $\gamma$  společně s TNF- $\alpha$  aktivaci makrofágů. Přesto se neobjevil rozdíl v množství IFN- $\gamma$  u citlivé a rezistentní myši v akutní fázi (Suzuki et al. 1993). Do složitých imunitních procesů jsou zapojené cytokiny IL-2, IL-6, IL-10, IL-15, IL-12 a IL-4. Jen u posledně zmiňovaného dochází k poklesu (Deckert-Schlüter et al. 1995). Produkce cytokinů je ovlivněna genotypem parazita (Robben et al. 2004).

IL-10 je produkován makrofágy a mikroglie v parenchymu mozku zdravých myší, při mozkové encefalitidě je jeho produkce zvýšená (Deckert-Schlüter et al. 1995). K tomuto stavu přispívá i aktivita CD4 a CD8. Působení interleukinů může mít specifický vliv na odlišné tkáně či stádium parazita. Neutralizací IL-10 asociovanou s nárůstem IFN-g a TNF-a došlo k poklesu počtu parazitů, zdá se tedy, že tento cytokin ovlivňuje perzistenci parazita v mozku (Deckert-Schlüter et al. 1997). Při toxoplasmose může docházet k poškození očí, i zde má IL-10 regulační roli, jeho tvorba omezuje vznikající poškození (Lu et al. 2003). U HIV pozitivních pacientů může porušení rovnováhy mezi IL-10 a ostatními cytokiny vyvolat reaktivaci (Deckert-Schlüter 1997). IL-12 je cytokin, u kterého se předpokládaná ochranná funkce nepotvrdila. I bez jeho tvorby byly myši schopné vytvořit si protektivní imunitu (Lieberman et al. 2004). Je pravděpodobné, že vliv IL-12 je závislý na genotypu parazita, myš reagovala rozdílně na jeho produkci při nákaze virulentním a avirulentním kmenem (Robben 2004).

Vliv na průběh infekce mají pohlavní hormony (Liesenfeld et al. 2001). Samice snášejí infekci hůře, mají vyšší úmrtnost spojenou s vyšším počtem tachyzoitů

(či parazitoformních vakuol) během fáze akutní i vyšším počtem tkáňových cyst v mozku během fáze chronické (Roberts et al. 1995). Jejich citlivost je vyvolaná nižší hladinou testosteronu, který má dokonce ochranný vliv, je-li samicím po infekci uměle podáván. Testosteron nepůsobí na parazity přímo, potlačuje Th1 (bunčnou) imunitní odpověď (Liesenfeld et al. 2001).

Aby zvýšila pravděpodobnost přenosu na definitivního hostitele, manipuluje toxoplasma svým mezihostitelem. Manipulace je specifická, změněno je chování, které přenos ovlivňuje (Webster et al. 1994, Webster 2001). Důležité je, že se nejedná pouze o změny v průběhu akutní fáze, kdy se dají očekávat změny v chování vzhledem k špatnému zdravotnímu stavu zvířete, ale i ve fázi latentní, tedy bezpříznakové. U infikovaných myší se projevuje snížená neofobie (strach z nových podnětů), hyperaktivita (Webster al.1994) a zhoršená schopnost odlišit mezi starými a novými stimuly (Hutchinson et al. 1980, Hay et al. 1984). Nákaza toxoplasmosou zvyšuje explorační aktivitu myší (Hay et al. 1985 ), snižuje čas strávený čištěním a péčí o srst (Webster 2007), nemění chuťové preference (Vyas et al. 2007).

Zmiňované chování lze vyložit jako pro toxoplasmu výhodné. Jeden z nejdůležitějších objevů této oblasti potvrzující manipulaci s hostitelem je snížení strachu z pachu kočky, v některých pokusech přecházející až v jeho vyhledávání. Tento jev byl popsán u myší jak v akutní, tak latentní fázi infekce. Vyhýbání se oblastem s pachem psa dokládá, že změna je specifická a netýká se obecného strachu před možnými predátory (Berdoy et al. 2000, Webster 2007, Vyas et al. 2007b). V pokusech zabývajících se čichem bývá často jako odorant použita moč predátora, která, jak upozornil Vyas v článku z roku 2007, nemusí být nejvhodnější. Pach kočičí deky vyvolal v kontrolních myších větší strach než pach kočičí moči. Je logické, že v přirozené situaci hraje roli celkový pach kočky. Reakce hlodavců na kočičí pach je závislá na množství a intenzitě stimulu. V grafickém znázornění autorů článku tvoří reakce myší na intenzitu pachu křivku ve tvaru obráceného písmena U. Nevarující, případně lákavé jsou tedy pro infikované zvíře hodnoty přibližně uprostřed křivky (1 $\mu$ l moči), při této dávce byly v chování infikovaných a zdravých jedinců pozorovány největší rozdíly. Bylo by vysvětlitelné, že v případě, kdy je signál velmi slabý, je malá šance, že bude myš ulovena

kočkou, a parazit by tak výhodu nezískal. Naopak je-li signál příliš silný, nedokáže parazit překonat vrozený strach zvířete z tohoto pachu (Vyjas 2007a).

Na otázku, zda se po nákaze mění sociální postavení jedince, zatím neznáme jasnou odpověď. Studie, ve které se sledovalo chování hlodavců v akutní fázi nic podobného nepotvrdila (Berdoy et al. 1994). U krys nakažených kongenitálně k žádné diskriminaci nedocházelo (Berdoy et al. 1994) stejně jako u krys v chronické fázi infikovaných intraperitoneálně (Vyas et al. 2007). K jinému výsledku dospěl González a jeho spolupracovníci v pokusech s krysami testovanými tři dny po infekci (jednalo se o intraperitoneální infekci tachyzoity, chování nebylo závislé na velikosti infekční dávky), nakažená zvířata projevovala o ostatní jedince větší zájem (Gonzalez et al. 2006). Celkově situace hovoří spíše v neprospěch teorie změněného sociálního chování, alespoň u myši. Další ucelený výzkum na toto téma by byl přínosný.

Mechanismus vedoucí ke změně čichové preference není zatím znám. Vzhledem k specifickému posunu v chování je jako příčina odmítán vznik zánětu a encefalitidy, což by také nevysvětlovalo změny chování v chronické fázi (Skallová et al. 2006). Zajímavé je rozmístění cyst u chronicky infikovaných myši. Mozek je sice zasažen v podstatě celý, dvojnásobný počet cyst však můžeme nalézt v amygdale. Přes tu vedou dráhy spojené s učením, emocemi, tedy i strachem. Není jasné, jak přesně probíhá reakce na podnět v podobě pachu kočky, tím těžší je definovat, kde může docházet k narušení dráhy (Vyas 2007b). Možným vodičkem je hladina neurotransmiterů (dopaminu, serotoninu), jejich metabolitů či receptorů. Po podání antagonisty receptoru N-methyl D-asparatu (NMDA) nebo antagonisty serotoninu dochází u infikovaných zvířat k obdobné ztrátě strachu z predátora (Berdoy et al. 2000). Blízký vztah mezi dopaminem a zvýšeným vyhledáváním nových podnětů (novelty seeking) byl prokázán jak na krysách (Dellu et al. 1996), tak na myších (Skallová et al. 2006, Hodková 2006). O souvislosti dopaminu s psychickými poruchami a působením toxoplasmy se na různých úrovních spekuluje již delší dobu (Flegr et al. 2003, shrnuto v Yolken et al. 2009). V roce 2009 vyšla publikace, jejíž autoři objevili v genomu toxoplasmy geny pro tyrosin hydroxylázu, enzym, který se, přes L-DOPA, účastní tvorby dopaminu. Výrazný nárůst exprese genů pro jeden z těchto enzymů je zaznamenán během přeměny tachyzoitů na bradyzoity a zdá se, že je pro bradyzoity a tvorbu tkáňových cyst specifický. Tyrosin hydroxyláza se běžně vyskytuje

u živočichů, u prvoků se jedná o enzym naprosto ojedinělý. K čemu je toxoplasmou využíván není jasné. Autoři studie navrhují několik hypotéz. L-DOPA, která je enzymem konvertován z tyrosinu, je prekurzorem dopaminu, jehož hladina je vyšší u infikovaných zvířat a je spojena s tvorbou cyst, tedy přechodem do pozdějších fází infekce a umožňuje parazitu ovlivňovat chování hostitele. Cílem by tedy byla manipulace hostitelem. L-DOPA bývá také spojována s oxidativním stresem, parazit může poškozovat hostitelskou buňku pomocí kyslíkových radikálů (ROS). Otázkou ovšem je, jak by parazit produkci ROS usměrňoval tak, aby zároveň nepoškozoval vlastní buňky. Alternativně je L-DOPA zabudována do stěn tkáňových cyst během jejich tvorby. U parazita *Eimeria tenella* je DOPA součástí glykoproteinů tvořících stěnu oocysty, ovšem zde se jedná o stadia určená k přežití ve vnějším prostředí, která s hostitelem příliš neinteragují (Gaskell 2009). U blízce příbuzného parazita *Neospora caninum* byly objeveny signální peptidové motivy obdobné, jako má tyrosin hydroxyláza u toxoplasmy. Samotný enzym zatím potvrzen nebyl. Kromě dopaminu se po infekci parazitem mění i hladina serotoninu, dalšího neurotransmiteru. U infikovaných myší v latentní fázi dosahuje 114 % obvyklé hodnoty u zdravých myší (Stibbs 1985).

K objasnění mechanismu vlivu dopaminu nám může pomoci spojitost mezi schizofrenií a účinky léčiv, používaných při schizofrenii. Nakažené krysy, kterým byla podána léčiva, běžně se používající na podpůrnou léčbu schizofrenie (haloperidol), projevovaly větší strach z pachu kočky, tedy se přiblížily chování zdravých zvířat (Webster et al. 2006). O haloperidolu se předpokládá, že je antagonistou dopaminu, který by mohl být spojníkem mezi schizofrenií a toxoplasmou. Z neurologických studií víme, že jak v případě onemocnění schizofrenií, tak infekcí toxoplasmou bývají v mozku často zasaženy gliové buňky, speciálně astrocyty (Cotter et al. 2001, Webster et al. 2006). Léčiva také negativně působila na replikaci *T. gondii* in vitro (Jones-Brando et al. 2003). Někteří autoři se domnívají, že toxoplasma může být přímo faktorem vyvolávajícím některé typy schizofrenie ( shrnuto v Yolken et al. 2009).



## 4. Praktická část

### 4.1. Pokusná zvířata a design pokusů

Pokusná zvířata v experimentech s parazitem *Toxoplasma gondii* byla chována v bariérových chovech Státního zdravotního ústavu (SZÚ Praha). Byly použity dva soubory zvířat laboratorního kmene myší C57/Black obou pohlaví. V prvním souboru byla zvířata umístěna po třech jedincích v chovné nádobě, samci a samice v oddělených místnostech. Ve druhém souboru byla zvířata umístěna jednotlivě ve společné místnosti. Po celou dobu měla zvířata volný přístup k vodě a potravě. Ve všech pokusech byli použiti kontrolní jedinci, se kterými se manipulovalo obdobně jako s jedinci infikovanými, kromě infekce samotné. Zvířata byla po odběru moči vážena, neboť se předpokládá, že z úbytku váhy lze sledovat zdravotní stav zvířete. Po skončení pokusů byla zvířata utracena.

První soubor obsahoval 30 myší, 15 samců a 15 samic. Vždy 9 bylo infikováno a 6 sloužilo jako kontrolní jedinci. Infekce proběhla po týdnu habituace, zvířata v té době vážila průměrně 20 g. K infekci byl použit kmen HIF, 15 cyst. Všechna zvířata, kterým bylo podáno infekční inokulum, byla infikovaná. Infekční dávka se ukázala jako příliš vysoká a většina zvířat posla do tří týdnů od infekce. Ostatní myši byly utraceny.

V druhém souboru bylo 22 samců a 22 samic. 12 jedincům bylo podáno infekční inokulum, 10 jedinců sloužilo jako kontroly. Infekce proběhla po týdnu habituace, zvířata v té době vážila průměrně 20 g. K infekci byl použit kmen HIF *T. gondii*, infekční inokulum obsahovalo 8 cyst. Úspěšnost infekce byla zjištěna z krve na konci pokusu. Jeden samec, kterému bylo podáno infekční inokulum, se nenakazil a byl ze souboru vyřazen. Celkem byla moč odebrána osmkrát, před infekcí, týden po infekci, čtrnáct dní po infekci a dále v intervalu 14 dnů, poslední odběr byl proveden 98 dní po infekci. Vždy při odběru moči byla zvířata vážena. Po utracení byla zvířatům odebrána testes, mozek, slinivka, levá a pravá cauda epididymis a končetiny, některé vzorky byly použity v jiných studiích. Množství proteinů ve vzorku bylo měřeno pomocí čipové kapilární elektroforézy (Experion Automated Electrophoresis Station, Bio-Rad, USA), přednostně vždy z jednoho odběru, a to kombinací nakažený-kontrolní vzorek.

Koncentrace proteinů v moči závisí na množství produkované moči. Měření množství kreatinu, který je produkován v konstantním množství, mi umožnilo určit koncentraci moči a pomocí těchto hodnot sledovat míru exprese proteinů. Během krátkodobého skladování v mrazu (- 20 °C) by nemělo docházet k degradaci kreatininu (Schultz et al. 2000).

V pokusech byl použit kmen HIF *T. gondii*, avirulentní kmen II. linie. Jedná se o český izolát získaný z HIV pozitivního pacienta. Byl získán od dr. Kodyma, v jehož laboratoři je kmen udržován pasážováním přes myšního hostitele. K infekci těchto myší bylo použito tkáňových cyst z mozku infikované myši.

Pro sledování vlivu pohlaví na produkci MUP byla použita data, získaná jak z výše zmíněného, druhého souboru (pouze kontrolní zvířata), tak data z dalšího experimentu prováděného týmem doc. Stopky. Jednalo se o vzorky moči získané ze v zajetí narozených kříženců myší *Mus musculus* odchycených ve volné přírodě v okolí Vídně. Zvířata byla ve společné místnosti, po celou dobu měla volný přístup k vodě a potravě.

Vzorky pro sledování vlivu manipulace na kvantitu MUP byly získány z moči odebrané pěti samicím. Moč byla smíchána a rozdělena do čtyř skupin: A, B, C, D. V každé skupině bylo minimálně šest vzorků obsahujících 5 µl moči. Vzorky skupiny A a B byly vysráženy, C a D ponechány v původním stavu. Vzorky ze skupiny A a C byly zamrazeny při teplotě -80 °C, B a D při -20 °C. Ve vzorcích bylo pomocí čipové kapilární elektroforézy změřeno množství MUP. První vzorek byl testován ihned po odebrání, další v následujících intervalech: po 24 hodinách, 7 dnech, 14 dnech, 30 dnech, 60 dnech a po 200 dnech.

## **4.2. Metody a odběr vzorků**

### **4.2.1. Infekce**

Před infekcí byly vytvořeny páry zvířat se stejnou hmotností, z nichž vždy jedno bylo infikováno a druhé ponecháno jako kontrolní. Infekce probíhala ve věku 70 dnů, váha zvířat v době infekce byla v rozpětí 17-25 g v závislosti na pohlaví zvířat. Infekčním agens byly tkáňové cysty získané z mozku laboratorně infikovaných inbredních myší. K přípravě infekčního inokula byly použity vždy minimálně dvě, maximálně tři infikované myši. Ty byly usmrceny a byly jim vyjmuty mozky, které byly zhomogenizovány

v jemnou suspenzi a smíchány s fyziologickým roztokem. Několik kapek suspenze bylo použito ke spočítání průměrného počtu cyst pod světelným mikroskopem. Cysty byly viditelné při 40násobném zvětšení. V případě potřeby bylo inokulum dále naředěno fyziologickým roztokem. Za infekceschopné byly považovány pouze celé, nepoškozené cysty s dobře viditelnou stěnou. Poškozené nebo nepravidelně tvarované cysty a volná stadia nebyly zohledněny při výpočtu infekční dávky. Inokulum bylo podáno orálně pipetou. V případě, že se špička ucpávala, byla použita nová. Po orálním podání byla zvířata sledována a v případě potřeby donucena se olízat. Kontrolním jedincům bylo obdobným způsobem podáno stejné množství fyziologického roztoku.

Myším prvního souboru byla podána infekční dávka 15 cyst, ta se ukázala jako příliš vysoká a proto byla zvířata z druhého souboru infikována dávkou 8 cyst. Úspěšnost infekce byla zjišťována až po skončení experimentu. Zvířata, u kterých nebyla infekce prokázána, byla ze souboru vyřazena.

#### **4.2.2. Odběr moči**

Moč byla odebírána v ranních hodinách. Někteří jedinci močili přímo po uchopení, u některých bylo močení vyvoláno jemnou masáží podbřišku. V případě, že se nepovedlo moč odebrat, byla odebrána přibližně za hodinu. Moč byla uskladněna v -20 °C a do půl roku od odběru zpracována.

#### **4.2.3. Odběr krve a příprava séra**

Úspěšnost nákazy byla potvrzena vyšetřením séra z krve odebrané na konci pokusu. Krev byla odebírána i kontrolním jedincům z důvodu dodržení stejných podmínek pro obě skupiny i možného dalšího využití sér. K získání krve byly jednotlivé myši nahřáty pod IR lampou (hlava byla kryta proti přímému dopadu světla) a poté umístěny do speciálně upraveného držáku. Ocas myši byl v natažené poloze zespona u kořene ocasu naříznut žiletkou, krev byla odebrána do čisté ependorfky a po samovolném zastavení krvácení myš vrácena do klece. Na každou myš byla použita čistá žiletka. Tímto způsobem se podařilo z každé myši odebrat maximálně 3 ml krve. V případě druhého souboru byla krev odebrána i během usmrcování myší. Myši byly nejprve usmrceny, poté jim bylo jehlou nabodnuto srdce a odsátá krev byla dále zpracována.

Z odstáté a stočené krve (1000 otáček po dobu 10 minut) bylo získáno sérum, které bylo zmrazeno na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , transportováno do Referenční laboratoře pro toxoplasmosu (SZÚ Praha) a zde vyšetřeno metodou KFR (Komplement fixační reakce). Zbylé sérum bylo uskladněno při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2.4. Měření hmotnosti pokusných zvířat**

Po každém odběru moči byla experimentální zvířata vážena. Na laboratorní váhy byl položen trychtýř z alobalu, do kterého byla umístěna myš. Myši z druhého souboru experimentu byly váženy pomocí závěsných vah i po smrti.

#### **4.2.5. Odběr a měření hmotnosti testes a cauda epididymis**

Po usmrcení byly myším odebrány obě testes, vypreparovány obě cauda epididymis a zváženy.

### **4.3. Proteomické a imunologické laboratorní techniky**

#### **4.3.1. Měření množství MUP ve vzorku - Čipová kapilární elektroforéza**

Na čipovou kapilární elektroforézu jsem použila  $1\text{ }\mu\text{l}$  rozmražené moči. Před vlastní elektroforézou jsem vzorky vysrážela, aby se odstranily přebytečné soli. Ke vzorku ( $1\text{ }\mu\text{l}$ ) jsem přidala desetinásobné množství ledového acetonu. Směs jsem 30 minut stáčela při 10 000 otáčkách. Po stočení jsem ependorfky otevřela, opatrně odsála přebytečný aceton a vzorek v otevřených ependorfkách nechala 20 minut sušit v Dyna-Wapu. Po vysušení zůstal vzorek ve formě pelet. Ty jsem rozpustila ve  $4\text{ }\mu\text{l}$  destilované vody, což je dle manuálu požadovaný objem vzorku pro čipovou elektroforézu.

Reagencie pro kapilární elektroforézu (Experion Pro260 Reagente and Supplies, Bio-Rad) jsem nechala před vlastním použitím 15 minut při pokojové teplotě. Během rozpouštění pelet jsem si připravila redukující a neredukující pufr. Redukující pufr se připraví smícháním pufru s merkaptoethanolem (2-Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich) v poměru 30:1, k neredukujícímu se namísto merkaptoethanolu přidá stejné množství destilované vody. Pufry jsem stočila a následně promísila. K vzorkům jsem přidala  $2\text{ }\mu\text{l}$  neredukujícího pufru a stočila je. K markeru, kterého jsem měla stejné množství jako vzorku, tedy  $4\text{ }\mu\text{l}$ , jsem přidala  $2\text{ }\mu\text{l}$  redukujícího pufru a stočila. Vzorky a marker jsem vložila do termomixeru (Thermomixer comfort, Eppendorf) a nechala 4 minuty při  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$

za mírného míchání reagovat. Po 4 minutách jsem vyndala vzorky a marker z termostatu a po zchladnutí je stočila a naředila 84  $\mu$ l destilované vody. Připravila jsem si dva gely, čirý a obsahující barvu (gel byl s barvou smíchán v poměru 520  $\mu$ l gelu : 20  $\mu$ l barvy), která se váže na proteiny a umožňuje tak jejich vizualizaci. Před použitím gelů je nutné je přefiltrovat za použití filtrovacích nádobek a centrifugace (15 minut při 10 000 otáčkách). Do čipu (Experion Pro260 chips) jsem nanášela 12  $\mu$ l gelu obsahujícího barvu do příslušné jamky označené GS (gel-stain). Poté jsem čip vložila do přístroje určeného k plnění čipu (Experion Priming Station, Bio-Rad), nastavila požadované parametry tlaku a doby (B2) a nechala gel nasát do celého čipu. Po nasátí jsem přebytečný gel odstranila. Do jamek označených GS jsem opět nanasla 12  $\mu$ l gelu obsahujícího barvu a do jamek označených G (gel) 12  $\mu$ l čirého gelu. Připravené naředěné vzorky a marker jsem centrifugovala, promíchala a do čipu nanasla 6  $\mu$ l, vzorky do jamek označených 1-10 a marker do poslední volné jamky. Při nanášení jak gelů tak vzorků jsem se snažila nevytvářet bublinky, pokud se bublinka vytvořila, bylo nutné vzorek či gel vysát a znovu nanést. Vyplněný čip jsem vložila do přístroje (Experion Automated Electrophoresis Station, Bio-Rad) a spustila program. Po cca 30 minutách byl proces ukončen, vzorky jsem vyjmula a do přístroje jsem vložila čip pro promývání s naneseným promývacím roztokem a nechala 2 minuty promýt. Připravené vzorky a marker uložené v chladu jsou stabilní přibližně 24 hodin, namíchané a přefiltrované gely 3 měsíce.

#### **4.3.2. Měření množství kreatininu ve vzorku**

Kreatinin jsem měřila v co nejbližší době od měření proteinů, ve druhém souboru se nejednalo o rozptyl delší než dva dny.

K 1  $\mu$ l vzorku moči jsem přidala destilovanou vodu tak, aby výsledný objem byl 45  $\mu$ l. Připravila jsem si reagenční roztok smícháním hydroxidu sodného a kyseliny pikrové (Kreatinin, BioVendor) v poměru 1:4 a nechala ho 20 minut při pokojové teplotě reagovat. Spektrometr (SmartSpect 3000, Bio-Rad) jsem nastavila na vlnovou délku 492 nm a před vzorky jsem změřila absorbanci destilované vody (pro odečtení pozadí) a standardu. Standard i destilovanou vodu jsem smíchala s reagenčním roztokem v poměru 50  $\mu$ l: 500  $\mu$ l reagenčního roztoku. Standard (Biocal, BioVendor) je dodáván ve formě prášku a před použitím je nutné ho naředit na požadovaný objem. Poměrně rychle degraduje, proto pokud je to možné, připravíme standard vždy čerstvý. V mých pokusech

jsem standard používala, dokud jeho absorpance neklesla pod 500 nm. Naředěný vzorek moči jsem smíchala s 200  $\mu\text{l}$  reagenčního roztoku, několikrát protáhla špičkou, aby se vzorek s roztokem dobře promíchal, přenesla ho do čisté kyvety a na spektrometru změřila absorpaci. První hodnotu jsem odečítala po 30 sekundách od smíchání vzorku s reagenčním roztokem, druhou hodnotu po dalších 60 sekundách. Po každém třetím vzorku jsem znovu změřila standard a destilovanou vodu. Kreatinin je v moči stabilní po dobu šesti měsíců.

#### **4.3.3. Určení míry nákazy - Komplement fixační reakce (KFR)**

Metoda založená na reakci protilátek s antigenem a aktivaci komplementu. Tuto metodu jsem rozdělila na dvě části a měření prováděla ve dvou dnech. Séra jsem deaktivovala ve vodní lázni o teplotě 56 °C po dobu 30 minut. Poté jsem je naředila dvojkovou řadou. Do všech jamek jsem nakapala vychlazený veronalový pufr (VP) o objemu 0,025  $\mu\text{l}$ . Do první jamky jsem přidala 0,025  $\mu\text{l}$  séra a přenášela stejný objem do všech jamek v řadě, dosáhla jsem tak požadovaného ředění. První jamka sloužila jako pomocné ředění, z druhé jamky (1:4) jsem udělala ředění 1:8 a to tak, že jsem přidala 0,025 VP, promísila a 0,025  $\mu\text{l}$  opět odebrala. Jamka sloužila jako kontrola antikomplementarity séra, proto jsem do ní místo antigenu přidala 0,025  $\mu\text{l}$  VP. Do všech dalších jamek od ředění 1:8 (kontrola) jsem přidala 0,025  $\mu\text{l}$  antigenu (ředíme podle výrobce). Do všech jamek, včetně kontroly, jsem přidala 0,05  $\mu\text{l}$  komplementu. Destičku jsem nechala protřepat na třepačce 30 sekund a dala ji na noc do lednice do vlhké komůrky. Kromě kontroly antikomplementarity jsem použila ještě pozitivní a negativní kontrolu, kontrolu antigenu, kontrolu komplementu a kontrolu hemolytického systému. Pro tuto metodu jsem potřebovala krvinky. Použila jsem beraní krvinky naložené čtyři dny v Alseverově roztoku. Před použitím jsem krvinky třikrát proprala v VP, 10 minut je stáčela. Z krvinek a VP jsem si připravila 3% suspenzi (například 0,3  $\mu\text{l}$  krvinek a 9,7  $\mu\text{l}$  VP). Použila 0,5  $\mu\text{l}$  suspenze a 4,5  $\mu\text{l}$  destilované vody a směs změřila na spektrometru při vlnové délce 541 nm. Zjištěnou optickou denzitu jsem dělila 0,5. Ve výsledku čísla za desetinou čárkou udávají, jakým množstvím VP doředíme každý  $\mu\text{l}$  suspenze na požadovanou optickou denzitu. Dále jsem ředila hemolyzin. Lyofilizovaný hemolyzin o objemu 1  $\mu\text{l}$  jsem rozpustila ve 100  $\mu\text{l}$  VP a uchovávala ho dále v mrazáku. Do reakce jsem použila hemolyzin naředěný VP v poměru 1:200. Druhý den jsem si připravila

hemolytický systém (HS). Smíchala jsem 2,8 % suspenzi krvinek a naředěný hemolyzin v poměru 1:1. Nechala jsem roztok senzibilizovat ve vodní lázni o teplotě 37 °C a 30 minut. Každých 10 minut jsem roztok promíchala tak, aby krvinky nezlyzovaly. Do všech jamek (včetně kontrol) jsem nakapala 0,025 µl HS a nechala 1 minutu protřepat na třepačce. Vložila jsem destičku do vlhké komůrky a vzorky inkubovala při teplotě 37 °C po dobu 30 minut. Poté jsem destičku znovu na třepačce protřebala a vrátila ji do vlhké komůrky na 30 minut. Reakci jsem zastavila přendáním destičky do chladu. Za dvě hodiny jsem odečítala výsledek.

Kontroly antigenu, komplementu a negativní sérum musí zůstat negativní, kontrolní pozitivní sérum nesmí být antikomplementární a musí dosahovat titru stanoveného výrobcem (v rozmezí jednoho ředění lze tolerovat odchylku).

Za infekční byla považována zvířata s titrem protilátek rovným a vyšším než 256. V prvním souboru došlo k úhynu většiny jedinců, po snížení infekční dávky na minimální možnou hodnotu se většina zvířat nakazila a přežila. Nenakažená zvířata, kterým bylo podáno infekční inokulum, byla z pokusů vyloučena. Všechna vyšetření byla prováděna jak na vzorcích z infikovaných, tak ze zdravých zvířat pro ověření správnosti postupu.

#### **4.3.4. Test vlivu manipulace se vzorky na kvantitu MUP – čipová kapilární elektroforéza**

Vzorky byly skladovány ve standardním objemu 5 µl a množství MUP jsem měřila v triplikátech. Před vlastním měřením množství proteinů pomocí čipové kapilární elektroforézy jsem vzorky, uskladněné nevysrážené, vysrážela desetinásobným množstvím acetonu, pelety rozpustila v 20 µl destilované vody. Z tohoto množství bylo třikrát odebráno 5 µl a získány tak tři vzorky pro triplikát. Vzorky, které byly skladované již vysrážené jsem přímo rozředila nejprve 5 µl a po té 20 µl destilované vody. Samotná elektroforéza probíhala obdobně jako je popsáno v odstavci II.3.a.

### **4.4. Analýza dat**

#### **4.4.1. Výpočet celkové produkce a exprese MUP u infikovaných a kontrolních zvířat**

Porovnávala jsem průměrné hodnoty produkce a exprese MUP u samců a samic za celý experiment, zvláště pro infikovaná a kontrolní zvířata. Hodnotu exprese MUP u jedince jsem spočítala dosazením do vzorečku  $Exp = P / ((1/C) * C_{ref})$ , kde P je hodnota

produkce, C je hodnota kreatininu pro daný vzorek a Cref je maximální nabytá hodnota kreatininu.

#### **4.4.2. Vliv pohlaví na produkci MUP**

V případě kmene C57BL/6 jsem porovnávala průměrné hodnoty produkce MUP u kontrolních zvířat získané během celého experimentu, tj. průměru z osmi odběrů. V případě kříženců divokých myší *Mus musculus* se jednalo o data z jednoho odběru.

#### **4.4.3. Výpočet množství kreatininu v moči**

Z měření kreatininu jsem získala dvě hodnoty pro každý měřený vzorek, množství kreatininu reagujícího s komplexem kyseliny pikrové po 30 sekundách a 60 sekundách od smíchání reagentů. Odečetla jsem první hodnotu měření vzorku od druhé (A), stejný postup jsem použila pro hodnoty naměřené pro pozadí (B, blanc, destilovanou vodu) a standard (C). Získané hodnoty jsem dosadila do vzorce  $\Sigma_{cst} \Sigma^3 * (\Sigma A - \Sigma B) / (\Sigma C - \Sigma B)$ , kde cst je 337  $\mu\text{mol/l}$ . Získala jsem množství kreatininu ve vzorku ( $\mu\text{mol/l}$ ).

#### **4.4.4. Výpočet normalizované produkce MUP - dynamika produkce MUP**

Hodnotu produkce MUP, tedy koncentraci MUP ve vzorku, jsem získala pomocí čipové kapilární elektroforézy. Normalizovaná data jsem získala dosazením do vzorečku  $P_n = P_j / P_{ak}$ , kde  $P_j$  je hodnota produkce MUP u jedince pro daný odběr,  $P_{ak}$  je hodnota mediánu hodnot exprese u kontrolních jedinců pro daný odběr. Tímto postupem byla data normalizována. Ve statistickém výpočtu a grafu byly použity pouze normalizované hodnoty infikovaných myší. Dále jsem soubor zpracovala v programu Statistika. Data byla před samotnou statistickou analýzou zlogaritmována pro dosažení normálního rozložení.

#### **4.4.5. Výpočet normalizované exprese MUP - dynamika exprese MUP**

Hodnotu exprese MUP u jedince jsem spočítala dosazením do vzorečku  $Exp = P / ((1/C) * C_{ref})$ , kde P je hodnota produkce, C je hodnota kreatininu pro daný vzorek a Cref je maximální nabytá hodnota kreatininu. Normalizovanou expresi jsem získala dosazením do vzorečku  $E_n = E_j / E_{mk}$ , kde  $E_j$  je hodnota exprese MUP jedince pro daný odběr,  $E_{mk}$  je hodnota mediánu exprese MUP kontrolních jedinců pro daný odběr. Tímto postupem byla data normalizována a ve statistickém výpočtu a grafu byly použity pouze



normalizované hodnoty infikovaných myší. Dále jsem soubor zpracovala v programu Statistika. Data byla před samotnou statistickou analýzou zlogaritmována pro dosažení normálního rozložení.

Normalizací dat jsem získala poměr, nikoliv absolutní hodnotu. Tato metoda mi pomohla odfiltrout rušivé faktory (např. změnu kvality krmiva, která by u obou skupin vyvolala odezvu) a přehlednit data. Zobrazována je tak změna u nakažených jedinců oproti kontrolám, u kterých jsem předpokládala stabilní hodnoty. Normalizací se také odfiltroval vliv pohlaví na množství produkovaných MUP.

#### ***4.4.6. Vliv infekce na hmotnost testes a cauda epididymis***

Vhledem k malým rozdílům v hmotnosti mezi oběma testes a oběma caudami jedince byl v analýze použit jejich průměr. Dále jsem soubor zpracovala v programu Statistika. Data byla před samotnou statistickou analýzou zlogaritmována pro dosažení normálního rozložení.

#### ***4.4.7. Vliv infekce na hmotnost pokusných zvířat***

Infikovaná zvířata během infekce snižují svoji tělesnou hmotnost, respektive nedochází k jejímu navýšení. Hmotnost zvířat tak může být markerem zdravotního stavu zvířat. Normalizovanou hmotnost jsem získala dosazením do vzorečku  $M_n = M_j / M_{mk}$ , kde  $M_j$  je hmotnost jedince pro daný odběr,  $M_{mk}$  je hodnota mediánu hmotností kontrolních jedinců pro daný odběr. Tímto postupem byla data normalizována a následně logaritmována. Dále jsem soubor zpracovala v programu Statistika. Použit byl obecný lineární model, analýza kovariance.

#### ***4.4.8. Test vlivu manipulace se vzorky na kvantitu MUP***

Množství MUP ve vzorcích bylo měřeno v triplikátech, ve statistické analýze byl použit jejich průměr.

## **4.5. Výsledky a grafy**

### **4.5.1. Vliv pohlaví na produkci MUP (Graf 1.)**

Potvrdila jsem vyšší produkci a expresi u kontrolních samců v porovnání s kontrolními samicemi a to přibližně 1,5krát u kmene C57BL/6, 4 krát u F1 generace kříženců kmenů C57BL/6 a u F1 generace myši odchycených ve volné přírodě.

### **4.5.2. Celková produkce a exprese MUP u infikovaných zvířat (Graf 2., Graf 3.)**

Jak v případě samců tak samic dochází u infikovaných zvířat k poklesu produkce a exprese MUP. U infikovaných samců jsou průměrné hodnoty za celý experiment srovnatelné s průměrnými hodnotami kontrolních samic (resp. kastrovaných samců). Efekt je signifikantní, což dokládají nepřekrývající se konfindeční intervaly.

### **4.5.3. Dynamika produkce a exprese MUP v průběhu nákazy u samců (Graf 5.)**

V průběhu nákazy se hladina MUP signifikantně mění na úrovni produkce i exprese ( $F(14, 158) = 9,82, p > 0,0001$ ).

V počáteční fázi nákazy je exprese MUP signifikantně nižší než u kontrolních jedinců 7 dní od infekce (p.i.) (odběr 1-2,  $p = 0,02$ , Fisher LSD test) a 14 dní p.i. (odběr 1.-3,  $p = 0,0000015$ , Fisher LSD test). V další fázi dochází k postupnému nárůstu produkce MUP u infikovaných zvířat. Hodnoty nedosahují, s výjimkou odběru 52 dní p.i. (odběr 7), hodnot kontrolních jedinců.

Na úrovni produkce MUP dochází k signifikantnímu snížení 28 dní p.i. (odběr 1-4,  $p = 0,01$ , Fisher LSD test) a 42 dní p.i. (odběr 1-5,  $p = 0,04$ , Fisher LSD test). V následující fázi k pozvolnému nárůstu. Hodnoty exprese nedosahují, s výjimkou odběru 38 dní p.i. (odběr 6), hodnot kontrolních jedinců. U infikovaných jedinců dochází nejprve ke snížení exprese, a následně i produkce MUP.

### **4.5.4. Dynamika produkce a exprese MUP v průběhu nákazy u samic (Graf 6.)**

V průběhu nákazy dochází k obdobným změnám hladiny MUP jako u samců. V další fázi dochází k postupnému nárůstu produkce MUP u infikovaných zvířat. Hodnoty nedosahují, s výjimkou odběru 52 dní p.i. (odběr 7), hodnot kontrolních jedinců. Hladina MUP se mění na úrovni produkce i exprese, efekt není signifikantní, jedná se pouze o trend ( $F = 1, 69, p = 0,064$ ).

V počáteční fázi nákazy je exprese MUP signifikantně nižší než u kontrolních jedinců 7 dní od infekce (p.i.) (odběr 1-2,  $p=0,005$ , Fisher LSD test) a 14 dní p.i. (odběr 1-3,  $p=0,008$ , Fisher LSD test). V další fázi dochází k postupnému zvyšování exprese MUP infikovaných zvířat, hodnoty nedosahují hodnot kontrolních jedinců.

Na úrovni produkce MUP dochází k signifikantnímu snížení 42 dní p.i. (odběr 1-5,  $p=0,01$ , Fisher LSD test). V další fázi dochází k postupnému nárůstu produkce MUP infikovaných zvířat. Hodnoty infikovaných jedinců nedosahují hodnot kontrolních jedinců. U infikovaných jedinců dochází nejprve ke snížení exprese a následně produkce MUP.

#### **4.5.5. Změny hmotnosti testes a cauda epididymis (Graf 4.)**

U infikovaných myší nedochází ke změně hmotnosti testes v porovnání s kontrolními jedinci ( $F=0,04$ ,  $p=0,85$ , ANOVA). Hmotnost cauda epididymis u infikovaných myší je signifikantně nižší v porovnání s kontrolními jedinci ( $F=6,6$ ,  $p=0,02$ , ANOVA).

#### **4.5.6. Vliv infekce na hmotnost pokusných zvířat (Graf 7.)**

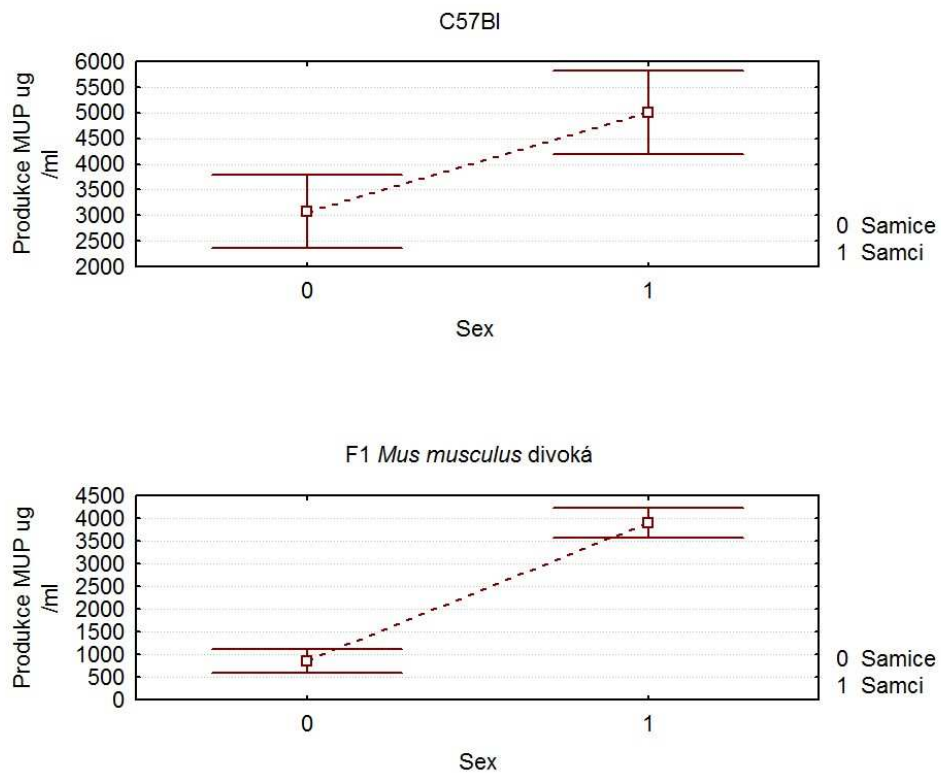
V akutní fázi infekce dochází k poklesu hmotnosti u obou pohlaví a v pozdějších fázích infekce k opětovnému vzestupu. K vyrovnání hmotnosti infikovaných jedinců s kontrolami během experimentu nedošlo. Změna hmotnosti během infekce je statisticky signifikantní ( $H(7, N=177) = 79,5$ ,  $p=0,0000$ , Kruskal-Wallisova ANOVA)

#### **4.5.7. Vliv hmotnosti zvířat na produkci MUP**

Hmotnost nemá signifikantní vliv na produkci MUP ( $F=1,6$ ,  $p=0,19$ , Čas \* LogHmotnost  $F=1,19$ ,  $p=0,3$ , GLM (smíšený model)).

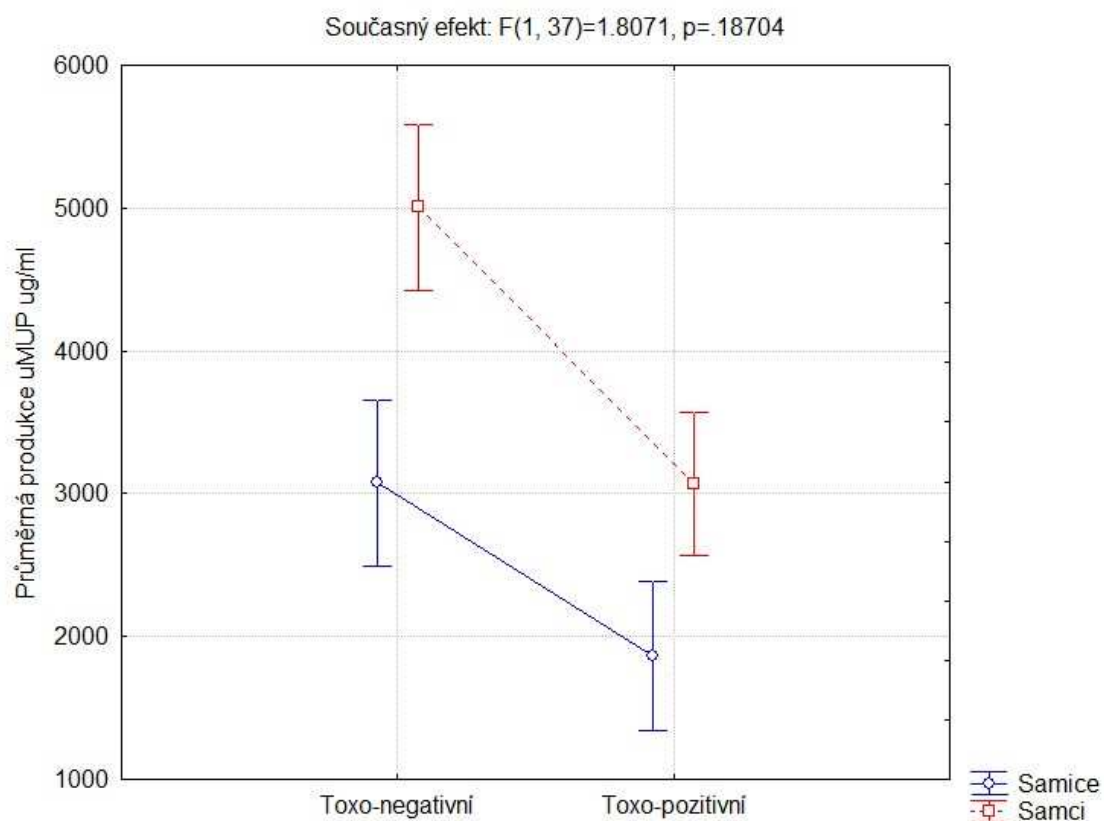
#### **4.5.8. Test vlivu manipulace se vzorky na kvantitu MUP (Graf 8.)**

Na množství měřitelných MUP ve vzorku neměla vliv skladovací teplota ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-^{\circ}\text{C}$ ) ani odstranění solí ze vzorku. Změna množství měřitelných MUP ve vzorcích není statisticky signifikantní ( $p=0,76$ , Friedmanova ANOVA).



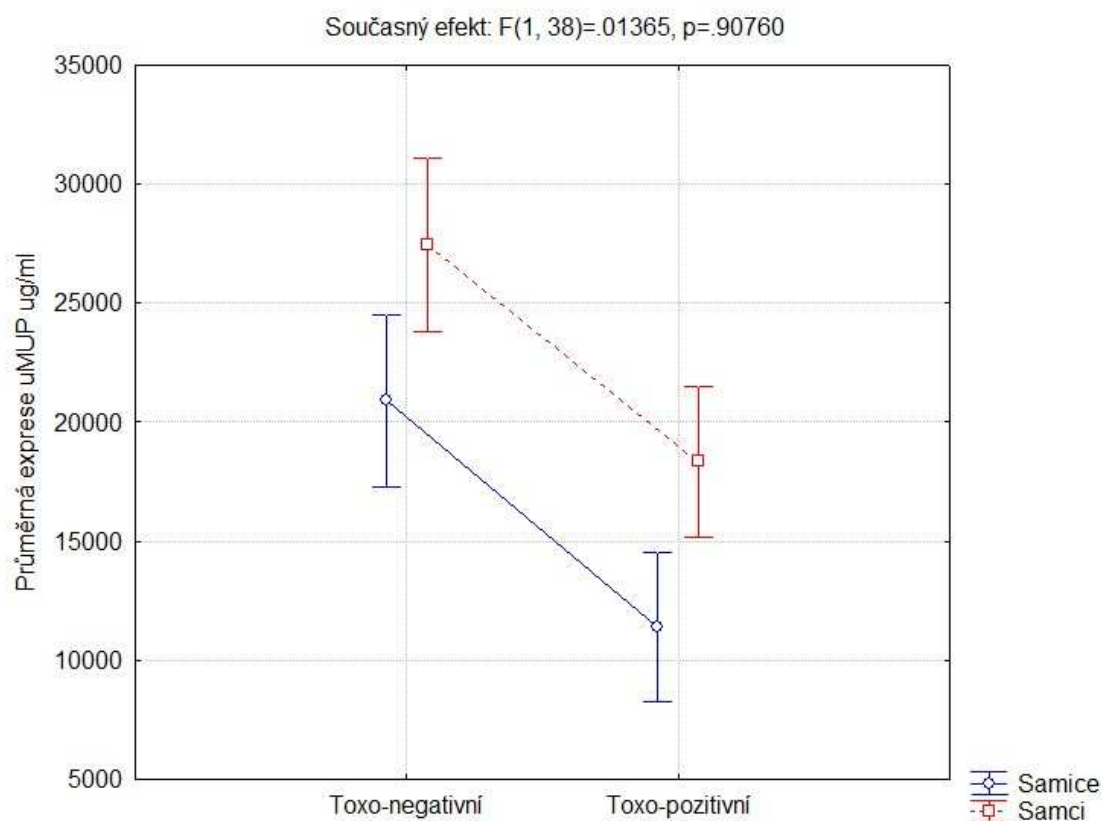
**Graf 1.: Vliv pohlaví na produkci MUP**

V grafu je zobrazena průměrná produkce, u kmene C57BL/6 produkují samci přibližně 1,5krát více MUP než samice, u F1 generace myší odchycených v přírodě produkují samci přibližně 4krát více MUP než samice. Přerušovaná spojnice přispívá k přehlednosti grafů, nejedná se o znázornění kontinuální veličiny.



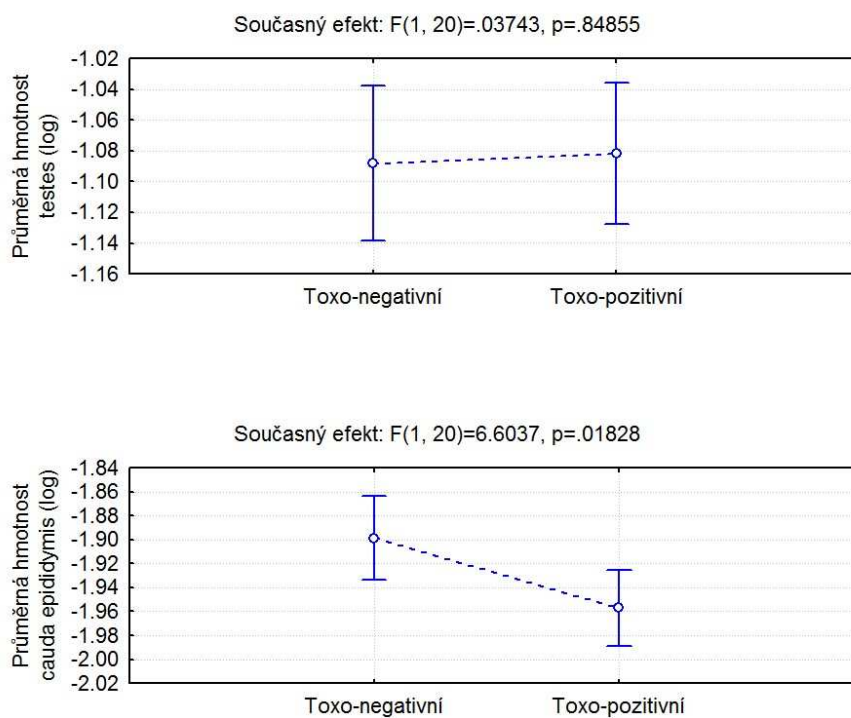
**Graf 2.: Celková produkce MUP u kontrolních a infikovaných zvířat**

V grafu jsou zobrazeny průměrné hodnoty infikovaných a kontrolních zvířat za celý průběh experimentu. U obou pohlaví dochází během infekce ke snížení produkce, u samců hodnoty klesají na úroveň nemanipulovaných samic. Efekt je signifikantní, což dokládají nepřekrývající se konfidenční intervaly. Spojnice mezi body přispívá k přehlednosti grafů, nejedná se o znázornění kontinuální veličiny.



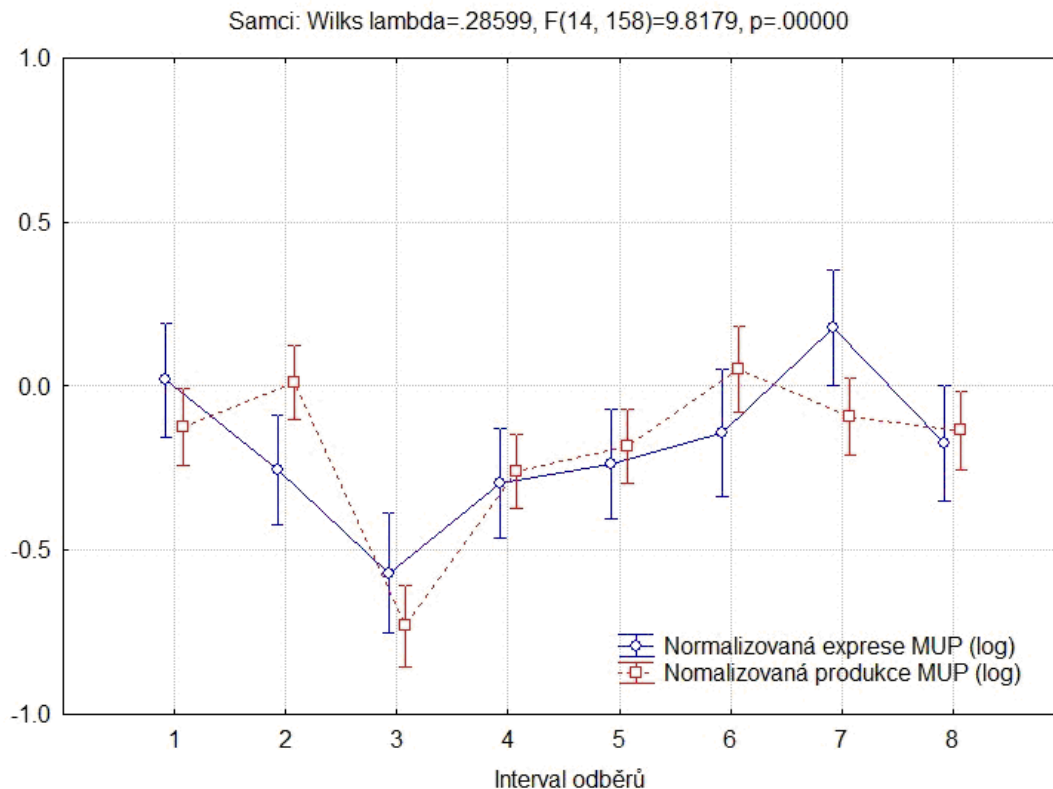
**Graf 3.:** Celková exprese MUP u kontrolních a infikovaných zvířat

V grafu jsou zobrazeny průměrné hodnoty infikovaných a kontrolních zvířat za celý průběh experimentu. U obou pohlaví dochází během infekce ke snížení produkce, u samců hodnoty klesají na úroveň nemanipulovaných samic. Efekt je signifikantní, což dokládají nepřekrývající se konfidenční intervaly. Spojnice mezi body přispívá k přehlednosti grafů, nejedná se o znázornění kontinuální veličiny.



#### **Graf 4.: Vliv infekce na hmotnost testes a cauda epididymis**

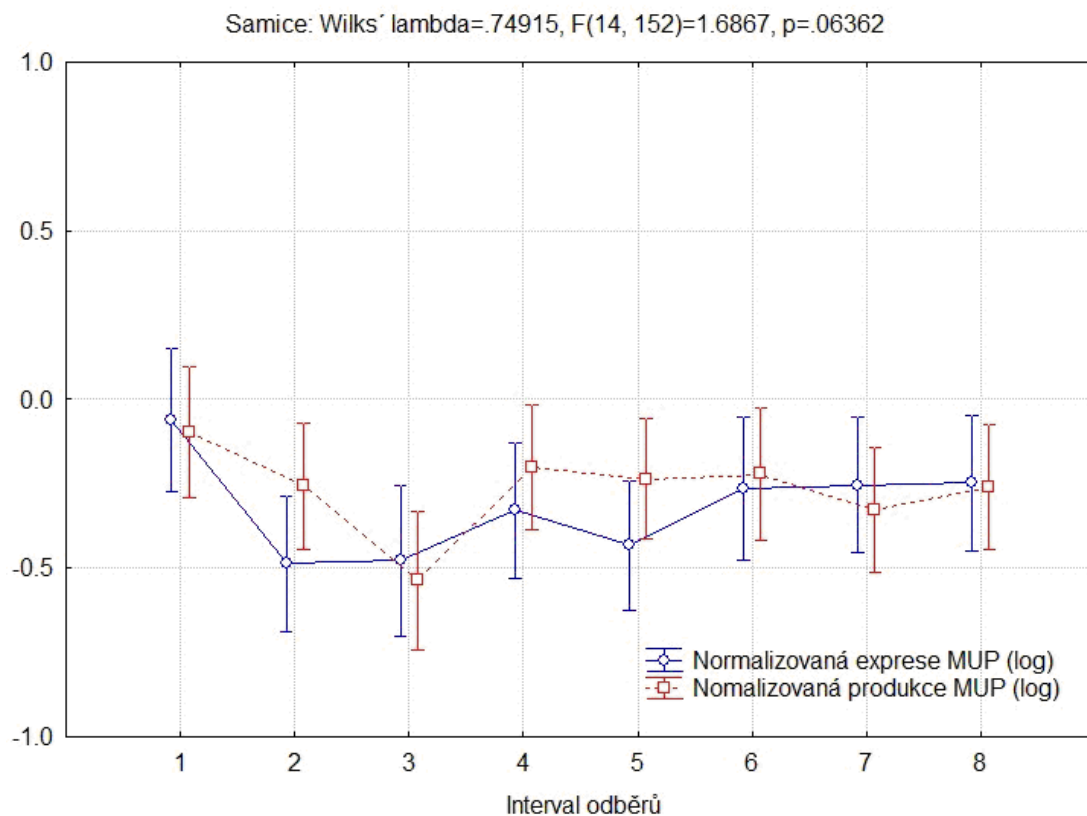
V prvním grafu je zobrazena průměrná hmotnost testes u kontrolních a infikovaných zvířat, ve druhém průměrná hmotnost cauda epididymis. Během infekce nedochází ke změně průměrné hmotnosti testes u infikovaných zvířat. Průměrná hmotnost cauda epididymis u infikovaných myší je signifikantně nižší. Přerušovaná spojnice přispívá k přehlednosti grafů, nejedná se o znázornění kontinuální veličiny.



**Graf 5.:** *Dynamika produkce a exprese MUP v průběhu nákazy u samců*

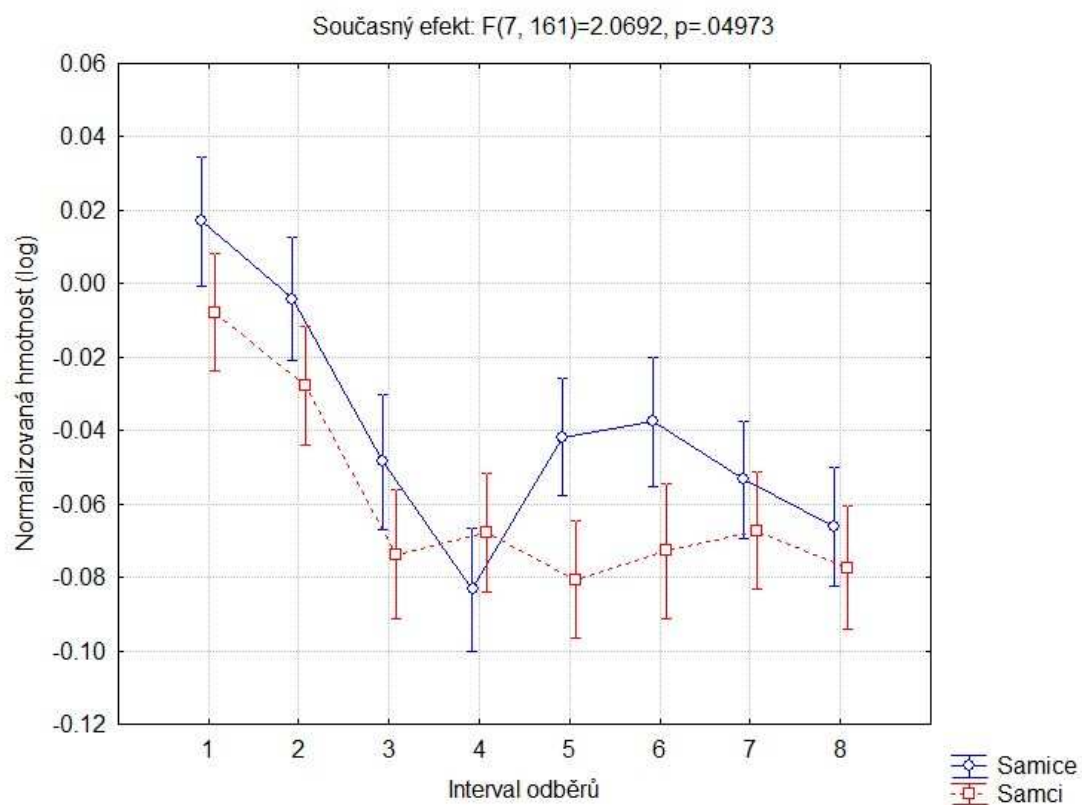
V grafu je zobrazena logaritmovaná normalizovaná produkce a normalizovaná exprese MUP u infikovaných samců v porovnání s kontrolními samci v intervalech před infekcí, týden po infekci, čtrnáct dní po infekci a dále v intervalu 14 dnů. Přímka procházející 0 představuje hodnoty kontrolních zvířat. Dynamika produkce a exprese je obdobná, k časnějšímu snížení dochází na úrovni exprese. Po dobu experimentu nedošlo až na výjimky (bod 6 u produkce a 7 u exprese) k vyrovnání hodnot infikovaných a kontrolních zvířat jak u produkce, tak exprese. Vliv infekce na produkci a expresi MUP u samců je statisticky signifikantní. Spojnice mezi body přispívá k přehlednosti grafů, nejedná se o znázornění kontinuální veličiny.





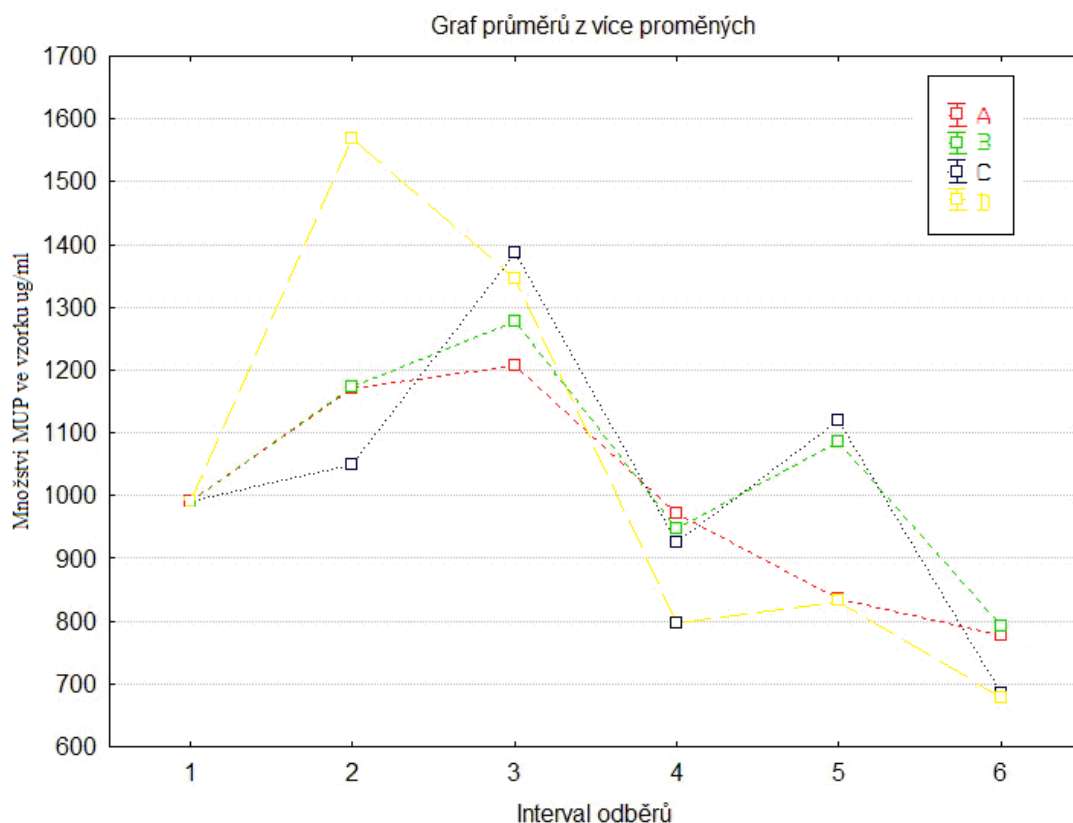
**Graf 6.:** *Dynamika produkce a exprese MUP v průběhu nákazy u samic*

V grafu je zobrazena logaritmovaná normalizovaná produkce a normalizovaná exprese MUP u infikovaných samic v porovnání s kontrolními samicemi v intervalech před infekcí, týden po infekci, čtrnáct dní po infekci a dále v intervalu 14 dnů. Přímka procházející 0 představuje hodnoty kontrolních zvířat. Dynamika produkce a exprese je obdobná, k časnějšímu snížení dochází na úrovni exprese. Po dobu trvání experimentu nedošlo k vyrovnání hodnot infikovaných a kontrolních zvířat jak v případě produkce, tak exprese. Vliv infekce na produkci a expresi MUP u samic je nesignifikantní, jedná se o trend. Spojnice mezi body přispívá k přehlednosti grafů, nejedná se o znázornění kontinuální veličiny.



**Graf 7.: Vliv infekce na hmotnost pokusných zvířat**

V grafu je zobrazen úbytek hmotnosti infikovaných myší během infekce v intervalech před infekcí, týden po infekci, čtrnáct dní po infekci a dále v intervalu 14 dnů. Přímka procházející 0 představuje hodnoty kontrolních zvířat. V akutní fázi infekce dochází k poklesu u obou pohlaví, tři týdny po infekci k opětovnému nárůstu hmotnosti u samců. K vyrovnání hmotnosti infikovaných a kontrolních jedinců nedošlo. Vliv infekce na hmotnost zvířat je statisticky signifikantní. Spojnice mezi body přispívá k přehlednosti grafů, nejedná se o znázornění kontinuální veličiny.



**Graf 8.: Test vlivu manipulace se vzorky na kvantitu MUP**

V grafu je zobrazeno měřitelné množství MUP během skladování (po odebrání, po 24 hodinách, 7 dnech, 14 dnech, 30 dnech, 60 dnech a po 200 dnech). Vzorky skupiny A a B byly vysráženy, C a D ponechány v původním stavu. Vzorky ze skupiny A a C byly uskladněny při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , B a D při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po 7 dnech skladování nabývá množství MUP ve všech vzorcích maxima a dále klesá. Změna měřitelných MUP během skladování není statisticky signifikantní, vliv teploty a odstranění solí ze vzorku také není statisticky signifikantní. Spojnice mezi body přispívá k přehlednosti grafů, nejedná se o znázornění kontinuální veličiny.

## 4.6. Diskuze

Rozdíl v množství MUP produkovaných samci a samicemi byl výrazně menší než bývá udáváno v literatuře. U zvířat kmene C57BL/6 byla produkce MUP u samic přibližně 1,5krát menší než samců, u vzorků kříženců F1 generace divokých myší *Mus musculus* 4krát menší produkce u samic (Graf 1.). V průběhu inbredizace se mohly zafixovat nejen různé alely MUP, ale i různé způsoby regulace jejich produkce, což může mít za následek i odlišnou míru pohlavního dimorfismu. Malým rozdílem v produkci MUP mezi pohlavími se kmen C57BL/6 přibližuje situaci u divokých myší a je proto vhodným modelem. Další výhodou myší kmene C57BL/6 a jedním z důvodů, proč byly použity v mých pokusech, je typizace jednotlivých MUP myší tohoto kmene pomocí hmotnostní spektrometrie v předchozích pokusech (Z. Zdráhal nepublikovaná data).

Během infekce došlo u myší k výraznému snížení MUP a to u samců na hodnoty srovnatelné se zdravými samicemi (Graf 2., Graf 3.). Podobného efektu bylo u samců dosaženo pouze jejich kastrací. Jedná se zatím o dva nejsilnější působící faktory. Překvapivé také byly změny hmotnosti primárních pohlavních znaků samců odebraných na konci pokusu (100 dnů po infekci). V případě testes se hmotnost orgánu infikovaných a kontrolních samců nelišila, naopak hmotnost cauda epididymis byla u infikovaných samců signifikantně nižší (Graf 4.). V caudě epididymis dochází k závěrečné proteinové maturaci spermií spojené se změnou složení buněčné membrány a spermie jsou zde skladovány před ejakulací (shrnuto v Cooper 2007). Snížená hmotnost cauda epididymis tak odpovídá snížené produkci spermií (Cooper, Yeung 2003), tedy nižšímu reprodukčnímu potenciálu infikovaných jedinců. Důvodem, proč dochází ke snížení hmotnosti cauda epididymis při zachování hmotnosti testes, může být větší konzervativnost testes, doložená například větší konzervativností exprimovaných genů, a pomalejší reakce na stimuly vnitřního prostředí. Také může docházet k zbytnění testes vlivem hormonů, hmotnost by v tomto případě namísto produkovaných spermií zvyšovala tvořící se tkáň. Stejná hmotnost testes tak nemusí odporovat nižší produkci spermií infikovaných zvířat. Podobné snížení hmotnosti cauda epididymis při zachování hmotnosti testes bylo pozorováno u potkanů infikovaných *T. gondii* (Terpsidis et al. 2009). MUP mohou na spermatogenezi působit prostřednictvím endokrinních faktorů,

případně přes interakci se selenocystein lyázou (Tobe et al. 2009). Selen je pravděpodobně nezbytným prvkem při spermatogenezi (Shalini and Bansal 2005).

Vztah infekce, produkce MUP, hmotnosti a reprodukčního potenciálu infikovaných zvířat je poměrně komplikovaný. U produkce MUP infikovaných myší dojde k navýšení hodnot v pozdější fázi infekce (Graf 5., Graf 6.), na rozdíl od hmotnosti infikovaných zvířat, která po infekci klesne a do konce experimentu nedojde k výraznějšímu nárůstu (Graf 7.). Ve statistickém zpracování se opětovné navýšení produkce a setrvalé nízká hmotnost infikovaných zvířat projeví signifikantním vlivem infekce na produkci MUP, signifikantním vlivem infekce na hmotnost a zároveň nesignifikantním efektem v případě vlivu hmotnosti na produkci MUP. Tradičně oddělovanou akutní fází, trvající přibližně dva týdny, charakteristickou množením invazivních stadií parazita, tak spíše než hmotnost dokládá produkce MUP. V této fázi byl špatný zdravotní stav také subjektivně vnímán jako nahrbenost, naježenost a neochota k pohybu.

Celkové snížení MUP během infekce dokládá náročnost produkce těchto proteinů, respektive jejich cenu. Ta byla doposud odvozována pouze z teoretických znalostí, především z vysokého procenta MUP ze všech produkovaných jaterních MUP a také z předpokládaného silného tlaku pohlavního výběru. V pokusu dokládá vysokou energetickou náročnost také dynamika produkce MUP během infekce. Oddělíme-li dvě fáze infekce, překrývá se doba tradičně udávaná pro akutní fázi infekce s rapidním poklesem produkce MUP zakončeným dosažením minimálních hodnot. Produkce MUP je tedy nejnížší v době, kdy organismus myši pravděpodobně investuje nejvíce do boje s parazitem. Po překonání akutní fáze dochází k zvýšení produkce MUP. Toto pozorování lze interpretovat jako přednostní investici do obnovy pachové komunikace, poukazující na její význam. Přes zvýšení produkce MUP v pozdější fázi není dosaženo stejných hodnot jako u kontrolních zvířat a ještě 42 dní po infekci je u samců rozdíl signifikantní. Je tedy otázkou, fungují-li MUP jako upřímný signál (angl. honest signal). Během akutní fáze je hladina MUP nejnížší, tedy odpovídá počátku boje s infekcí. V dalších fázích však dochází k mírnému zlepšení zdravotního stavu, pozorovatelného spíše na fyziologii zvířat než nárůstem váhy, a poměrně rychlému vzrůstu hladin MUP. Nepoměr zlepšení zdravotního stavu a hladin MUP tak pravděpodobně ukazuje snahu infikovaných samců přiblížit se prezentací svého pachu zdravým jedincům, a to přes to, že infikovaní samci

mají minimálně v závěru infekce nižší reprodukční potenciál. Množství MUP, produkované během akutní fáze, by tak vypovídalo spíše pro teorii představující MUP jako upřímný signál, spojený s náročností produkce. Kdybychom nevěděli o nárůstu produkce MUP po akutní fázi, byla by nižší produkce u infikovaných myší v chronické fázi v kombinaci s nižší produkcí spermií u těchto zvířat také dobrou podporou upřímného signálu MUP. Jak je však patrné, snaží se infikovaní samci obnovit tvorbu MUP tak, aby se přiblížili samcům kontrolním, přestože jejich reprodukční potenciál je nižší. K rozvíjení další diskuze nám chybí znalost stavu tvorby spermií během akutní fáze, další markery zdravotního stavu myší, případně tvorby invazivních stadií spojených s patologickými efekty po celou dobu infekce.

Z etologických pokusů je zřejmé, že i výrazně nižší změny v hladině MUP, než jsme sledovali v našem experimentu, mají na chování vliv. Příkladem mohou být cyklické změny během estrálního cyklu samic (Stopka et al. 2007). Množství MUP, produkované kastrovánými samci, dosahuje obdobných hodnot jako u samic, tedy jako u infikovaných samců v mém pokusu. S kastrovánými samci se samice nechtěly pářit. Z těchto znalostí přisuzujeme změnám MUP u infikovaných myší význam v sociálních interakcích. V etologických pokusech se zvířaty v latentní fázi toxoplasmózy (myši F1 generace kříženců BALB/c a C57BL/6, kmen parazita HIF) byla pozorována odlišná reakce na pach nakažených samců i samic. Jednoznačná diskriminace infikovaných samců však pozorována nebyla. Výsledky nebyly jednotné a lišily se v závislosti na kmenu experimentálních myší (Hodková 2006). Kombinace námi použitého kmenu myši a kmenu parazita v těchto pokusech testována nebyla, a jak vyplývá z mých pilotních pokusů, má na produkci MUP vliv. Chování, které bylo pozorované u jiných kmenů infikovaných myší, tak nemusí odpovídat našemu modelu.

MUP fungují nejen jako zdroj informací, ale mohou také stimulovat příjemce a modulovat jeho fenotyp. Změnu fenotypu může vyvolat nejen produkce těchto látek, ale také její pozastavení. Například byla-li u samice pachem samce vyvolána receptivní fáze estrálního cyklu, může zastavení či snížení produkce stimulujících látek estrus opět oddálit. Z tohoto pohledu je možné, že snížená produkce MUP během akutní fáze infekce, kdy jsou zvířata nejvíce zasažena nemocí, je cíleně snižována samcem. Kdyby samec samici stimuloval v době, kdy je snížena jeho schopnost se pářit, pouze

by zvyšoval šanci, že se samice úspěšně spáří s jiným samcem. V pozdějších fázích infekce, kdy se zdravotní stav zvířete lepší, dochází k obnově tvorby MUP. Podobný efekt může platit i pro samici, která hladinou MUP signalizuje nástup estru.

Snížení produkce MUP může mít pro signalizujícího samce ochranný efekt. Samci, kteří mají vysokou hladinu MUP, se prezentují jako dominantní a vystavují se vyššímu riziku agresivity ze strany dalších dominantně postavených samců. Snížením hladiny MUP by se mohl infikovaný samec útokům vyhnout. Podobně by snížení hladiny MUP mohly využívat i samice. Prezentování submisivity, vedoucí k tolerování nemocného zvířete ostatními jedinci, může být jedním ze socialitu podporujících mechanismů (angl. pro-social behaviour). Těmito mechanismy se vysvětluje tolerování nemocných jedinců ve společnosti, přestože nepřinášejí žádný užitek.

V pokusu bylo sledováno složení moči, ne její distribuce. Je známo, že na způsob značkování má vliv sociální postavení jedince (Desjardins et al. 1973, Rich and Hurst 1999) a je možné, že infikovaní samci distribuují moč odlišným způsobem, jak s ohledem na četnost značek, tak na objem uvolňované moči. Z vlastních odběrů moči nebyli infikovaní samci subjektivně vnímáni jako méně ochotní močit, rozdíl v objemu odebrané moči pozorován nebyl. Z odebraného množství či ochoty zvířat močit však nelze o zacházení s močí usuzovat, neboť není jasné, zda například infikovaní samci neznačkují a moč zadržují, a proto je množství odebrané moči vyšší než u kontrolních samců značkujících často.

Vzorky moči, používané k měření množství proteinů, stejně jako k etologickým pokusům, bývají z časových důvodů skladované v mrazu. Existuje několik prací, upozorňujících na degradaci proteinů během zmrazení důležitých například z diagnostického hlediska (Bhatnagar et al. 2007, Schultz et al. 2000) a články poukazujících na rozdílnou reakci myši na čerstvou a skladovanou moč (Franke and Hoffman, 1994). Autoři posledně zmiňovaného článku se domnívají, že dochází k degradaci MUP a předčasnému uvolnění navázaných ligandů, na studium změn samotných MUP se nezaměřují. V mém experimentu nebyla změna v množství MUP v moči během skladování signifikantní, přestože se projevovala obdobná dynamika u všech sledovaných vzorků (v různých teplotách a s obsahem solí). Týden po skladování množství měřitelných MUP nabývalo maxima, do 14 dnů docházelo k návratu k původní

hodnotě a po 200 dnech skladování pokleslo množství MUP ve vzorku na minimální hodnoty a předpokládám, že v případě dalšího měření by nadále klesalo. Dále je zřejmé, že nezáleží na teplotě, při které byla moč skladována, a vzorky mohou být uskladněny v běžných mrazácích. Odsolení vzorku také nemělo na množství MUP vliv (Graf 8.). Ve výsledném grafu čípkové kapilární elektroforézy nebyl viditelný proužek, který by mohl odpovídat potenciálně degradovaným MUP. Přestože změna množství MUP během skladování není signifikantní, ke změnám dochází a předpokládám, že množství MUP nadále klesá. Změna množství MUP ve vzorku může být způsobena dvěma efekty: degradací MUP nebo změnou koncentrace moči. V mém měření, kdy docházelo k poklesu množství MUP, nebude mít koncentrace moči pravděpodobně vliv, neboť množství MUP se snižuje, tudíž je pravděpodobné, že nedochází ke zhuštění moči (kdy by se množství MUP jevílo jako vyšší). V případě, že by ke zhušťování moči docházelo, byl by efekt snižování množství MUP ještě výraznější. Změnu koncentrace moči během skladování by tak bylo v budoucnu vhodné sledovat. Také není zřejmé, jak k degradaci MUP dochází. Zda se jedná o úplný rozpad struktury která dále není detekovatelná jako původní protein, nebo dochází pouze k uvolnění ligandu a pomocí elektroforézy měříme množství prázdných MUP. Uvolnění ligandů neovlivňuje výsledky naší práce, je však podstatné pro etologické pokusy. Obecně by potenciální degradace MUP či změna koncentrace moči neměla výsledky mé práce ovlivnit, neboť v experimentech se vždy jedná o relativní poměr, tedy množství produktu u nakaženého zvířete v porovnání s kontrolním. Tato úvaha je správná v případě, že u obou stavů dochází k obdobně rychlé degradaci proteinů a vlivem infekce není pozměněna propustnost ledvin.

Vznik zánětu je jedním z faktorů, který se také může na změně produkovaného množství MUP podílet. Z výsledků pokusu s parazitem *Leishmania* sp. je však zřejmé, že hladina MUP se může měnit během infekce parazitem, aniž by se měnila hladina zánětlivých proteinů, v našem pokusu CRP (C-reaktivní protein, protein akutní fáze). Možnost, že se hladiny MUP u infekcí parazitem *Toxoplasma gondii* mění, především v akutní fázi, kvůli zánětu ovšem vyloučit nelze.

K teoreticky možnému zvýšení tvorby MUP u infikovaných myší nedošlo. V případě parazita, který by manipulací zvyšoval atraktivitu svého hostitele (např. pohlavně přenosný parazit) či parazita, který by se přenášel jiným způsobem mezi mezihostiteli,



by se zvýšená tvorba MUP dala očekávat. K pochopení změn v produkci MUP a jejich významu má zásadní vliv nakládání jedinců příslušného druhu s látkami zapojenými v reprodukci (hormony, feromony, proteinové přenašeče, imunologicky aktivní látky a další). Existují-li dva druhy, z nichž u jednoho dochází k páření pravidelně po delším časovém úseku a u druhého se jedinci páří často a nepravidelně, tvorba látek zapojených do reprodukce bude odlišná. Pro první typ je výhodnější udržovat hladinu těchto látek na minimu a v období rozmnožování produkci navýšit. Jedinci druhého typu budou mít produkci stále vysokou, neboť k páření může dojít kdykoliv (Keverne 2005). Budeme-li pak sledovat tyto dva druhy v experimentu, sledujícím například vliv infekce parazity na množství transportních proteinů, reakce může být jiná a interpretace zavádějící. U jedinců druhu, který udržoval nízkou hladinu těchto proteinů, neboť neprobíhalo období páření, nemusí ke snížení dojít. Naopak druh, u kterého probíhala energeticky náročná tvorba transportních proteinů stále, během infekce tvorbu sníží. V obou experimentech bychom došli k odlišným závěrům, týkajícím se jak důležitosti, tak upřímnosti vysílaného signálu.

## 5. Závěr

Ve své diplomové práci předkládám první experimentální důkaz vlivu infekce parazitem na produkci a expresi MUP myši domácí. Obdobný vliv infekce parazitem *Toxoplasma gondii* byl pozorován jak u produkce, tak exprese MUP. U infikovaných myší je celková produkce a exprese nižší než u kontrolních zvířat, a to u obou pohlaví. U infikovaných samců dochází ke snížení produkce a exprese na úroveň nemanipulovaných samic, respektive kastrovaných samců, tedy proti tlaku pohlavního výběru, který naopak tvorbu samčích MUP zvyšuje. V průběhu infekce má produkce a exprese srovnatelnou dynamiku, po odfiltrování přirozeně vyššího množství MUP u samců obdobnou pro obě pohlaví. Snížení MUP v průběhu akutní fáze (trvající prvních čtrnáct dnů od infekce) dokládá energetickou náročnost produkce. Změna produkce a exprese MUP není trvalá a dochází k jejímu částečnému obnovení v pozdějších fázích infekce. Předpokládám, že zvířata investují přednostně do stabilizování tvorby MUP a obnovení pachového signálu, což dokládá významnost MUP v pachové komunikaci. Parazit pravděpodobně nebude ovlivňovat změnu MUP prostřednictvím pohlavních hormonů, neboť pozorované efekty byly obdobné u obou pohlaví. Funkce MUP jako zprostředkovatele pachového signálu přímo souvisí s reprodukcí, a jak ukazují ve své práci, produkce MUP odráží produkci spermií. Infikovaní samci mají spolu se sníženou produkcí MUP také sníženou hmotnost cauda epididymis, ve které jsou spermie skladovány. Z tohoto pohledu lze MUP považovat za upřímný (angl. honest) signál prezentující aktuální reprodukční potenciál jedince.

Z výsledků pilotních pokusů je zřejmé, že vliv infekce je závislý na kmenu parazita a kmenu myši. Experimenty s jiným parazitem naznačují, že ovlivnění produkce MUP můžeme očekávat i u dalších parazitů leč v odlišné síle a směru. Z těchto pokusů také vyplývá nezávislost změny produkce MUP na tvorbě zánětu. Vliv na produkci lipokalinů spojených s pachovou komunikací, zejména MUP, lze očekávat i u dalších parazitů. Mechanismy a dopad na hostitele se budou pravděpodobně lišit.

## 6. Přehled literatury

- Able, D.J. 1996: The contagion indicator hypothesis for parasite-mediated sexual selection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:2229-2233
- Arakawa H., Arakawa K., Harrison S., Jones C., Johnson D. and Bishop J.O. 1992: Sexual dimorphism and growth hormone regulation of hybrid gene in transgenic mice. *Mol Endocrinol*. 6:181-190
- Araujo F.G. 1991: Depletion of L3T4+ (CD4+) T lymphocytes prevents development of resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. *Infect Immun*. 59:1614-1619
- Balmford A., Thomas A.L.R. and Jones I.L. 1993: Aerodynamics and the evolution of long tails in birds. *Nature* 361: 628- 631
- Barnard C. J., Behnke J. M., Gage A.R., Brown H., Smithurst P.R. 1998: The role of parasite-induced immunodepression, rank and social environment in the modulation of behaviour and hormone concentration in male laboratory mice (*Mus musculus*). *Proc R Soc Lond. B* 265: 693-701
- Barnard C.J. and Behnke J.M. 1990: Parasitism and Host Behaviour. Taylor and Francis, New York
- 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 U. S. A*. 79:1220-1224
- Berdoy M., Webster J.P., Macdonald D.W. 1994: Parasite-altered behaviour: is the effect of *Toxoplasma gondii* on *Rattus norvegicus* specific? *Parasitology* 111:403-409
- Berdoy M., Webster J.P., MacDonald D.W. 2000: Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. *Proc Biol Sci*. 267:1591-1594
- Bhatnagar B.S., Bogner R.H., Pikal M.J. 2007: Protein stability during freezing: separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. *Pharm Dev Technol*. 12:505-23
- Bignetti E., Cavaggioni A., Pelosi P., Persaud K.C., Sorbi R.T. and Tirindelli R. 1985: Purification and characterization of an odorant-binding protein from cow nasal tissue. *Eur J Biochem*. 149:227-231
- Bishop J.O., Clark A.J., Clissold P.M., Hainey S., Francke U. 1982: Two main groups of mouse major urinary protein genes, both largely located on chromosome 4. *EMBO J*. 1:615-620
- Bocskei Z., Groom C.R., Flower D.R., Wright C.E., Phillips S.E.V., Cavaggioni A., Findlay J.B.C., North, A.C.T. 1992: Pheromone binding to two rodent urinary proteins revealed by X-ray crystallography. *Nature* 360:186-188
- Boehm U., Zou Z. and Buck L.B. 2005: Feedback loops link odor and pheromone signaling with reproduction. *Cell* 123:683-659

- Bontell I.L., Hall N., Ashelford K.E., Dubey J.P., Boyle J.P., Lindh J., Smith J.E. 2009: Whole genome sequencing of a natural recombinant *Toxoplasma gondii* strain reveals chromosome sorting and local allelic variants. *Genome Biol.* 10:R53
- 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 Insight into Mammalian Pheromones. *Curr Biol.* 14: R81-R89
- Brennan P.A., Peele P. 2003: Towards an understanding of the pregnancy-blocking urinary chemosignals in mice. *Biochem Soc Trans.* 31:152-155
- Brown C., McLeod R. 1994: Mechanisms of Survival of Mice During Acute and Chronic *Toxoplasma gondii* Infection. *Parasitol Today.* 10:290-292
- Buck L.B, Axel R. 1991: A novell multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell* 65:175-187
- 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.* 281:1935-1942
- Cavaggioni A., Mucignat-Caretta C. 2000: Major Urinary Proteins, alpha(2U)-globulins and aphrodisin. *Biochim Biophys Acta* 1482:218-28
- Chamero P., Marton T.F., Logan D.W., Flanagan K., Cruzl J.R., Saghatelian A., Cravatt B.F. and Stowers L. 2007: Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. *Nature* 450:899-903
- Charlesworth B., Coyne J.A., Barton N.H. 1987: The relative rates of evolution of sex chromosomes and autosomes. *Amer Natur.* 130:113-146
- Charron J.-B.F., Ouellet F., Houde M. and Sarhan F. 2008: The plant Apolipoprotein D ortholog protects *Arabidopsis* against oxidative stress. *BMC Plant Biol.* 31:82-86
- Cheetham S.A., Smith A.L., Armstrong S.D., Beynon R.J., Hurst J.L. 2009. Limited variation in the Major Urinary Proteins of laboratory mice. *Physiol Behav.* 96:253-261
- Cheetham S.A., Thom M.D., Jury F., Ollier W.E.R., Beynon R.J. and Hurst J.L. 2007: The genetic basis of individual-recognition signals in the mouse. *Curr Biol.* 17:1771-1777
- Christophe N. and Baudoin C. 1997: Olfactory preference in two strains of wild mice *Mus musculus* and *Mus domesticus*, and their hybrids. *Animal Behav.* 56:365-369
- Cooper T.G. 2007: Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. *Asian J Androl.* 9:533-9
- Cooper T.G., Yeung C.H. 2003: Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microsc Res Tech.* 61:28-38
- Cotter D.R., Pariante C.M., Everall I.P. 2001: Glial cell abnormalities in major psychiatric disorders: the evidence and implications. *Brain Res Bull.* 55:585-95
- Counterman B.A., Ortiz-Barrientos D., Noor M.A. 2004: Using comparative genomic data to test for fast-X evolution. *Evolution Int J Org Evolution.* 58:656-660

- D.H.L., Hurst J.L., Bolgar M.S., Gaskell S.J., Beynon R.J. 1997: Molecular heterogeneity of urinary proteins in wild house mouse populations. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 11:786-790
- Daniszová K., Janotová K., Jedelský P.L. and Stopka P. 2009: Urinary proteins in *Mastomys coucha*. *Folia Zool.* 58:56-64
- David G., Blondeau K., Schlitz M., Penel S. and Lewit-Bentley A. 2003: YodA from *Escheria coli* is a metal - binding lipocalin-I protein. *J Biol Chem.* 44: 43728-43738
- Deckert-Schlüter M., Albrecht S., Hof H., Wiestler O.D. and Schlüter D. 1995: Dynamics of the intracerebral and splenic cytokine mRNA production in *Toxoplasma gondii*-resistant and susceptible congenic strains of mice. *Immunology* 85:408-418
- Deckert-Schuter M., Buck Ch., Weiner D., Kaefer N., Rang A., Hof H., Weistler O.D., Schluter D. 1997: Interleukin-10 downregulates the intracerebral immune response in chronic *Toxoplasma* encephalitis. *J Neuroimmunol.* 76:167-176
- Dellu F., Piazza P.V., Mayo W., Le Moal M., Simon H. 1996: Novelty-seeking in rats-biobehavioral characteristics and possible relationship with the sensation-seeking trait in man. *Neuropsychobiology.* 34:136-145
- Del Punta K., Leinders-Zufall T., Rodriguez I., Jukam D., Wysocki C.J., Ogawa S., Zufall F., Mombaerts P. 2002: Deficient pheromone responses in mice lacking a cluster of vomeronasal receptor genes. *Nature.* 419:70-74
- Desjardins C., Maruniak J.A., and Bronson F.H. 1973: Social rank in house mice: Differentiation revealed by ultraviolet visualization of urinary marking patterns. *Science* 182:939-941
- Drickamer L.C. 2001: Urine marking and social dominance in male house mice (*Mus musculus domesticus*). *Behav Process.* 13:113-120
- 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., Gowaty P.A., Holmes C.M. 2000: Free female mate choice in house mice affects reproductive success and offspring viability and performance. *Anim Behav.* 23:371-378
- Dubey J.P. 2006: Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. *Vet parasitol.* 140:69-75
- Dubey J.P: 1998. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 28:1019-1024
- Dulac C, Axel R. 1995: A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell* 83:195-206
- Duncan R., Matthai R., Huppi K., Roderick T., Potter M. 1988: Genes that modify expression of major urinary proteins in mice. *Moll Cell Biol.* 8:2705-2712
- Dzierszinski F.S., Hunter C.A. 2008: Advances in the use of genetically engineered parasites to study immunity to *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 30:235-344
- Egid K., Brown J.L. 1989: The major histocompatibility complex and female mating preference in mice. *Anim Behav.* 38: 448-450

- Ehman K.D. and Scott M.E. 2002: Female mice mate preferentially with non-parasitized males. *Parasitology*. 125:461-466
- Endler J.A. 1992: Signals, signal conditions, and the direction of evolution. *Am. Nat.* 139:S125-S153
- Fangli L., Shiguang H., Lloyd H. K. 2003: Interleukin-10 and Pathogenesis of Murine Ocular Toxoplasmosis. *Infect Immun.* 71:7159-7163
- Fayer R. 1980: Toxoplasmosis Update and Public health Implications. *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 Odors of Opposite-sex Conspecifics. *Chemical Signal in Vertebrates* 11:281-289
- Ferkin M.H., Li H.Z. 2005: A battery of olfactory-based screens for phenotyping the social and sexual behaviors of mice. *Physiol Behav.* 85:489-499
- Ferrero D.M. and Liberles S.D 2009: The secret codes of mammalian scents. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2:23-33
- Finlayson J.S., Asofsky R., Potter M. and Runner C.C. 1965: Major urinary protein complex of normal mice: *Origin Science* 149:981-982
- Finlayson J.S., Potter M., Runner C.C. 1963: Electrophoretic variation and sex dimorphism of the major urinary protein complex in inbred mice: a new genetic marker. *J Natl Cancer Inst.* 31:91-107
- Fischbach M.A., Lin H., Zhou L., Yu Y., Abergel R.J., Liu D.R., Raymond K.N., Wanner B.L., Strong R.K., Walsh C.T., Aderem A., Smith K.D., 2006: The pathogen-associated *iroA* gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. *PNAS* 103:16502-16507
- Fisher R.A. 1958: The genetical theory of natural selection. *Dover publications*. Ex. Edwards A.W.R. 2000: The genetical theory of natural selection. *Genetics* 154:1419-1426
- Flegr J. and Hrdy I. 1994: Influence of chronic toxoplasmosis on some human personality factors. *Folia Parasitol.* 41:122-126
- Flegr J., Preiss M., Klose J., Havlíček J., Vitáková M., Kodym P. 2003: Decreased level of psychobiological factor novelty seeking and lower intelligence in men latently infected with the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* Dopamine, a missing link between schizophrenia and toxoplasmosis? *Biol Psychol.* 63:253-268
- Flegr J., Zitková S., Kodym P., Frynta D. 1996. Induction of changes in human behaviour by the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 113: 49-54
- Flower D.R. 1994. The lipocalin protein family: a role in cell regulation. *FEBS Letters* 354:7-11
- Flower D.R., North A. and Attwood A. 1993: Structure and sequence relationships in the lipocalins and related proteins. *Protein Sci.* 2:753-761
- Flower D.R. 1996: The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.* 318:1-14

- Folstad I. and Karter A.J. 1992: Parasites, bright males and the immunocompetence handicap. *Am Nat.* 139:603-622
- Freeland W.J. 1976: Pathogens and the evolution of primate sociality. *Biotropica* 8:12-24
- Frenkel J.K. 1953: Host, strain and treatment variation as factors in the pathogenesis of toxoplasmosis. *Am J Trop Med Hyg.* 2:390-415
- Frenkel J.K. 1988: Pathophysiology of toxoplasmosis. *Parasitol Today.* 4:273-278
- Ganem G., Ginane C., Ostrowski M.F., Orth A. 2005: Assessment of mate preference in the house mouse with reference to investigations on assortative mating. *Biol J Lin Soc.* 84:461-471
- Ganfornina M.D., Do Carmo S., Lora J.M., Torres-Schumann S., Vogel M., Allhorn M., Gonz ales C., Bastiani M.J., Rassart E. and Sanchez D. 2008: Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress. *Aging Cell* 7: 506-515
- Gaskell E.A., Smith J.E., Pinney J.W., Westhead D.R., McConkey G.A. 2009: A unique dual activity amino acid hydroxylase in *Toxoplasma gondii*. *PLoS One.* 4:e4801
- Getty T. 2002: Signaling health versus parasites. *Am Nat.* 1999:363-371
- Goetz D.H., Holmes M.A., Borregaard N., Bluhm M.E., Raymond K.N. and Strong R.K. 2002: The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* 10:1033-1043
- Gonzalez L.E., Rojnik B., Urrea F., Urdaneta H., Petrosino P., Colasante C., Pina S., Hernandez L. 2006: *Toxoplasma gondii* infection lower anxiety as measured in the plus-maze and social interaction tests in rats A behavioral analysis. *Behav Brain Res.*177:70-79
- Gourbal B.E. and Gabrion C. 2004: A study of mate choice in mice with experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis: can males choose? *Can J Zool.* 82:635-643
- Grolli S., Merli E., Conti V., Scaltriti E. and Ramoni R. 2006: Odorant binding protein has the biochemical properties of a scavenger for 4-hydroxy-2-nonenal in mammalian nasal mucosa. *FEBS Journal* 273:5131-5142
- Hamilton W.D. 1980: Sex versus non-sex versus parasites. *Oikos* 35:282-290
- Hart B.L., 1990: Behavioral adaptations to pathogens and parasites: five strategies. *Neurosci Biobehav Rev.* 14:273-294
- 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: 217-1221
- 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* 17:449-457
- Hausmann K. and Hulsmann F. 2003: Protozoologie. *Academia, Praha*
- Hay J., Aitken P.P., Arnott M.A. 1985 The influence of congenital *Toxoplasma infection* on the spontaneous running activity of mice. *Z Parasitenkd.* 71:459-462

- Hay J., Aitken P.P., Graham D.I. 1984: *Toxoplasma infection* and response to novelty in mice. *Z Parasitenkd.* 70:575-588
- Hayashi S., Kimura T. 1974: Sex-attractant emitted by female mice. *Physiol Behav.* 13:563-567
- Hodková Hana 2006: Behaviorální a neurofyziické projevy latentní toxoplasmózy u myší, Praha
- Hoffmann F., Musolf K., Penn D.J. 2009: Freezing urine reduces its efficacy for eliciting ultrasonic vocalizations from male mice. *Physiol Behav.* 96:602-605
- Howe D.K., Sibley L.D. 1995: *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis.* 172:1561-1566
- Hui X., Zhu W., Wang Y., Lam K.S.L., Zhang J., Wu D., Kraegen E.W., Li Y., Xu A. 2009: Major urinary protein-1 increases energy expenditure and improves glucose intolerance through enhancing mitochondrial function in skeletal muscle of diabetic mice. *J Biol Chem.* 284:14050-14057
- Hurst J.L., Payne C.E., Nevison C.M., Marie A.D., Humphries R.E., Robertson D.H. L., Cavaggioni A. and Beynon R.J. 2001: Individual recognition in mice mediated by Major Urinary Proteins. *Nature* 414:631-634
- Hurst, J.L., Robertson D.H.L., Tolladay U. and Beynon R.J. 1998: Proteins in urine scent marks of male house mice extend the longevity of olfactory signals. *Anim Behav.* 55:1289-1297
- Janků J. 1923: Pathogenese a patologická anatomie takzvaného vrozeného kolombu žluté skvrny v oku normálně velikém a mikrophthalmickém s nálezem parazitů v sítnici. *Časopis lékařů českých* 62:1021-1027
- Jemiolo B, Andreolini F, Xie T-M, Wiesler D, Novotny M. 1989. Puberty-affecting synthetic analogs of urinary chemosignals in the house mouse, *Mus domesticus*. *Physiol Behav.* 46:293-298
- Jemiolo B, Harvey S, Novotny M. 1986. Promotion of the Whitten effect in female mice by synthetic analogs of male urinary constituents. *PNAS* 83:4576-4579
- Jemiolo B., Alberts J., Sochinski-Wiggins S., Harvey S. and Novotny M.V. 1985: Behavioural and endocrine responses of female mice to synthetic analogs of volatile compounds in male urine. *Anim Behav.* 33:1114-1118
- Johnston R.E. 2003: Chemical communication in rodents: from pheromones to individual recognition. *J Mammal.* 84:1141-1162
- Jones R.C., Dacheux J.L., Nixon B., Ecroyd H.W. 2007: Role of the epididymis in sperm competition. *Asian J Androl.* 9:493-499
- Jones-Brando L., Torrey E.F., Yolken R. 2003: Drugs used in the treatment of schizophrenia and bipolar disorder inhibit the replication of *Toxoplasma gondii*. *Schizophr Res.* 62:237-244
- Karlson P. and Butenanda A. 1959: Pheromones (ectohormones) in insects. *Ann Rev Ent.* 4:39-58
- Karlson P., Lüscher M. 1959: Pheromones: a new term for a class of biologically active substances. *Nature* 183:55-56.



- Kavaliers M. and Colwell D.D. 1995b: Odours of parasitized males induce aversive response in female mice. *Anim Behav.* 50:1161-1169
- Kavaliers M. and Colwell D.D. 1995a: Discrimination by female mice between the odours of parasitized and non-parasitized males. *Proc R Soc Lond. B* 261:31-35
- Kavaliers M., Choleris E., Agmo A. and Pfaff D.W. 2004: Olfactory-mediated parasite recognition and avoidance: linking genes to behavior. *Horm Behav.* 46:272-283
- Kavaliers M., Choleris E., Colwell D.D. 2001: Brief exposure to Female Odours „Embodens“ Male Mice by Reducing Predator-Induced Behavioral and Hormonal Response. *Horm Behav.* 40:497-509
- Kavaliers M., Colwell D.D. 1992: Exposure to scent of male mice infected with the protozoan parasite, *Eimeria vermiformis*, induces opioid- and nonopioid-mediated analgesia in female mice. *Physiol Behav.* 52:373-377
- Kavaliers M., Colwell D.D., Braun W.J. and Choleris E. 2003a: Brief exposure to the odour of a parasitized male alters the subsequent mate odour responses of female mice. *Animal Behaviour.* 65:59-68
- Kavaliers M., Colwell D.D., Choleris E. 1998: Parasitized female mice display reduced aversive response to the odours of infected males. *Proc R Soc Lond. B* 265: 1111-1118
- Kavaliers M., Colwell D.D., Ossenkopp K.P., Perrot-Sinal T.S. 1997: Altered responses to female odors in parasitized male mice: neuromodulatory mechanisms and relations to female choice. *Behav Ecol Sociobiol.* 40:373-384
- Kavaliers M., Fudge M.A., Colwell D.D., Choleris E. 2003b: Aversive and avoidance response of female mice to odors of males infected with an ectoparasites and the effects of prior familiarity. *Behav Ecol Sociobiol.* 54:423-430
- Keverne E.B. 2005: Odor here, odor there: chemosensation and reproductive function. *Nat Neurosci.* 8:1637-1638
- Keymer A.E., Tarlton A.B., Hiorns R.W., Lawrence C.E., Pritchard D.I. 1990: Immunogenetic correlates of susceptibility to infection with *Heligmosomoides polygyrus* in outbred mice. *Parasitology* 101:69-73
- Klein S.L., Gamble H.R., Nelson R.J. 1999: *Trichinella spiralis* alters female odor preferences, but not mate preferences, in voles. *Behav Ecol Sociobiol.* 45:323-329
- Knopf J.L., Gallagher J.F., Held W.A. 1983: Differential, multihormonal regulation of the mouse major urinary protein gene family in the liver. *Mol Cell Biol.* 3:2232-2240
- Kodym P., Blažek K., Malý M., Hrdá Š. 2002: Pathogenesis of experimental toxoplasmosis in mice with strains differing in virulence. *Acta Parasit.* 47:239-248
- Koenig H., Goldstone A., Blume G., and Lu C. 1980. Testosterone-mediated sexual dimorphism of mitochondria and lysosomes in mouse kidney proximal tubules. *Science* 209:1023-1026

- Krauter K., Leinwand L., Deustachio P., Ruddle F. and Darnell F. 1982: Structural genes of the mouse Major Urinary Protein are on chromosome 4. *J Cell Biol.* 94:414-417
- Lambert H. and Barragan A. 2010: Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol.* 12:292-300
- Lambert H., Vutova P.P., Adams W.C., Loré K. and Barragan A. 2009: The *Toxoplasma gondii*-shuttling function of dendritic cells is linked to the parasite genotype. *Infect Immun.* 77:1679-1688
- 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.* 52:575-580
- Lazar J., Greenwood D.R., Rasmussen L.E.L. and Prestwich G.D. 2002: Molecular and Functional Characterization of an Odorant Binding Protein of the Asian Elephant, *Elephas maximus*: Implications for the Role of Lipocalins in Mammalian Olfaction. *Biochemistry* 41:11786-11794
- Lehmann T., Marcet P.L., Graham D.H., Dahl E.R., Dubey J.P 2006: Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:11423-11428.
- Lieberman L.A., Villegas E.N. and Hunter Ch.A. 2004: Interleukin-15-Deficient Mice Develop Protective Immunity to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* 72:6729-6732
- Liesenfeld O., Nguyen T.A., Pharke Ch., 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.* 87:1491-1496
- Logan D. W., Marton T. F. and Stowers L. 2008: Species specificity in Major Urinary Proteins by parallel evolution. *PloS ONE* 3:e3280
- Lombardi J.R., Vandenberg J.G. and Whitsett J.M. 1976: Androgen control of the sexual maturation pheromone in house mouse urine. *Biol Reprod.* 15:179-186
- Lu F., Huang S., Kasper L.H. 2003: Interleukin-10 and pathogenesis of murine ocular toxoplasmosis. *Infect Immun.* 71:7159-7163
- Lücke C., Franzoni L., Abbate F., Löhr F., Ferrari E., Sorbi R.T., Rüterjans H., Spisni A. 1999: Solution structure of a recombinant mouse major urinary protein. *Eur J Biochem.* 266:1210-1218
- Luft B.J., Remington J.S. 1992: Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis.* 15:211-222
- Lyon M.F. 1961: Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190:372-373
- Marchlewska-Koj A. and Bialy A. 1978: Modification of the oestrus cycle by urinary proteins of male mice. *Folia Biol.* 26:301-306
- 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

- Marie A. D., Veggerby C., Robertson D. H. L., Gaskell S. J., Hubbard S. J., Martinsen L., Hurst J. L., and Beynon R. J. 2001: Effect of polymorphisms on ligand binding by mouse Major Urinary Proteins. *Protein Sci.* 10:411-417
- Matshall P.A., Hughes R.H., Williams R.H., Smith J.E., Murphy R.G., Hide G. 2003: Detection of high levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in natural urban populations of *Mus domesticus*. *Parasitology* 127:39-42
- Moller A.P. and Saino N. 1994: Parasites, immunology of hosts, and host sexual selection. *J Parasitol.* 80: 850-858
- Montford W.R., Weichsel A. and Andersen J.F. 2002: Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods. *Biochim Biophys Acta* 1482:110-118
- More L. 2006: Mouse Major Urinary Proteins trigger ovulation via the vomeronasal organ. *Chem Senses.* 31:393-401
- Mori K., Lee H.T., Rapoport D., Drexler I.R., Foster K., Yang J., Schmittdott K.M., Chen X., Li J.Y., Weiss S., Mishra J., Cheema F.H., Markowitz G., Suganami T., Sawai K., Mukoyama M., Kunis C., Dagati V., Devarajan P. and Parasch J. 2005: Endocytic delivery of lipocalin-siderophore iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest.* 115:610-621
- Moshkin M., 2002: Behaviour, chemosignals and endocrine functions in male mice infected with thick-born encephalitis virus. *Psychoneuroendocrinology* 27:603-608
- Moss R.L., Flynn R.E., Shen X.-M., Dudley C., Shi J., Novotny M. 1997: Urine-Derived Compound Evokes Membrane Responses in Mouse Vomeronasal Receptor Neurons. *J Neuropsychol.* 77:2856-2862
- Mossman C.A., Drickamer L.C. 1996: Odor preferences of female house mice (*Mus domesticus*) in seminatural enclosures. *J Comp Psychol.* 10:131-138
- Mucignat-Caretta C., Caretta A., Cavaggoni A., 1995: Acceleration of puberty onset in female mice by male urinary proteins. *J Physiol.* 486:517-522
- Mudge J.M., Armstrong S.D., McLaren K., Beynon R.J., Hurst J.L., Nicholson C., Robertson D.H., Wilming L.G., Harrow J.L. 2008: Dynamic instability of the major urinary protein gene family revealed by genomic and phenotypic comparisons between C57 and 129 strain mice. *Genome Biol.* 9:R91
- Novotny M.V. 2003: Pheromones, binding proteins and receptor responses in rodents. *Biochem Society Trans.* 31:117-122
- Novotny M.V., Harvey S., Jemiolo B. 1990: Chemistry of male dominance. *Experientia* 46:109-113
- Novotny M.V., Harvey S., Jemiolo B. and Alberts J. 1985: Synthetic pheromones that promote inter-male aggression in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:2059-2061
- Novotny M.V., Ma W, Zidek L., Daev E. 1999b: Recent biochemical insights into puberty acceleration, estrus induction, and puberty delay in the house mouse. Ex. Johnston R.E., Muller-Schwarze D., Sorensen P. (eds.) *Advances in chemical communication in vertebrates. Plenum Press, New York:* 99-116

- Novotny M.V., Ma W., Wiesler D., Zidek L. 1999a: Positive identification of the puberty-accelerating pheromone of the house mouse: the volatile ligands associating with the major urinary protein. *Proc R Soc Lond B*. 266: 2017–2022.
- Ohno S. 1973: *Evoluce genovou duplikací*. Academia, Praha
- Parkers A.S and Bruce H.M 1961: Olfactory stimuli in mammalian reproduction. *Science* 134:1049-1054
- Payne C.E., Malone N., Humphries R.E., Bradbrook C., Veggerby C., Beynon R.J., Hurst J.L. 2001: Heterogeneity of major urinary proteins in house mice: Population and sex differences. Ex. Marchlewska-Koj A., Lepri J.J., Muller-Schwarze D. (eds.) *Chemical signals in vertebrates 9. Kluwer Academic – Plenum Publishers, New York*:.233–240
- Penn D., Schneider G., White K., Slev P. and Potts W. 1998: Influenza Infection Neutralized the Attractiveness of Male Odour to Female Mice (*Mus musculus*). *Ethology* 104: 689-694
- Petrak J., Myslivcova D., Halada P., Cmejla R., Cmejlova J., Vyoral D. and Vulpe Ch. D. 2007: Iron-independent specific protein expression pattern in the liver of HFE-deficient mice. *Int J Biochem Cell Biol*. 39:1006-1015
- Powell C.C., Brewer M., Lappin M.R. 2001: Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected lactating cats. *Vet Parasitol*. 102:29-33
- Pevsner J., Hou. V, Snowman A.M. and Snyder S.H. 1990: Odorant-binding Protein. Characterization of ligand binding. *J Biol Chem*. 265: 6118-6125
- 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*. 308:243-249
- Rice V.R. 1984: Sex-chromosomes and the evolution of sexual dimorphism. *Evolution* 38:735-742
- Rich T. J., Hurst J. L. 1999: The competing countermarks hypothesis: reliable assessment of competitive ability by potential mates. *Anim Behav*. 58:1027-1037
- Robben P.M., Mordue D.G., Truscott S.M., Takeda K., Akira S., Sibley L.D. 2004: Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. *J Immunol*.172:3686-3694
- *Toxoplasma gondii* is associated with temporal differences in cytokine production. *Infect Immun*. 63:2549-2555
- Robertson D.H.J, Cox K.A., Gaskell S.J, Evershed R.P. and Beynon R.J. 1996: Molecular heterogeneity in the Major Urinary Proteins of the house mouse *Mus musculus*. *Biochem J*. 316:265-272
- Robertson D.H.L., Hurst J., Hubbard S., Gaskell S.J. and Beynon R. 1998: Ligands of urinary lipocalins from mouse: uptake of environmentally derived chemicals. *J Chem Ecol*. 24:1127-1140
- Romano J.D., Bano N., Coppens I. 2008: New host nuclear functions are not required for the modifications of the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma*. *Cell Microbiol*. 10:465-676

- Rümke P. and Thung P. 1964: Immunological studies on the sex-dependent prealbumin in mouse urine and on its occurrence in the serum. *Acta endocrinol.* 47: 156-164
- Saari K.M and Räisänen S.A. 1977: Transmission of toxoplasmosis by trophozoites. *Lancet.* 2:1077
- Saeij J.P.J., Boyle J.P., Grigg M.E., Arrizabalaga G., Boothroyd J.C. 2005: Bioluminescence Imaging of *Toxoplasma gondii* Infection in Living Mice Reveals Dramatic Differences between Strains. *Infect Immun.* 73:695-702
- Sangamnatdej S., Paesen G.C., Slovak M. and Nuttall P.A. 2002: A high affinity serotonin and histamine-binding lipocalin from tick saliva. *Insect Mol Biol.* 11:79-86
- Schultz C.J., Dalton R.N., Turner C., Neil H.A., Dunger D.B. 2000: Freezing method affects the concentration and variability of urine proteins and the interpretation of data on microalbuminuria. The Oxford Regional Prospective Study Group. *Diabet Med.* 17:17-14
- Scott M.E. 1990: An experimental and theoretical study of the dynamics of a mouse-nematode (*Heligmosomoides polygyrus*) interaction. *Parasitology* 101:75-92
- Shahan K., Denaro M., Gilmartin M., Shi Y., Derman E. 1987: Expression of six mouse major urinary protein genes in the mammary, parotid, sublingual, submaxillary, and lachrymal glands and in the liver. *Mol Cell Biol.* 7:1947-1954
- Shalini S., Bansal M.P. 2005: Role of selenium in regulation of spermatogenesis: Involvement of activator protein 1. *BioFactors* 23:151-162
- Shaw P.H., Held W.A, Hastie N.D. 1983: The gene family for Major Urinary Proteins: expression in several secretory tissues of the mouse. *Cell* 32: 755-761
- Sherborne A., Thom M. D., Paterson S., Jury F., Ollier W. E. R., Stockley P., Beynon R. J. and Hurst J. L. 2007: The genetic basis of inbreeding avoidance in house mice. *Curr Biol.* 17: 619-623
- Sibley L.D. 2003: Recent origin among ancient parasites. *Vet parasitol.* 115:185-198
- Silva N.M., Vieira J.C., Carneiro C.M., Tafuri W.L. 2009: *Toxoplasma gondii*: the role of IFN-gamma, TNFRp55 and iNOS in inflammatory changes during infection. *Exp Parasitol.* 123:65-72
- Singer A., Mecrides F., Clancy A.N, Agosta W.C. 1986. Purification and Analysis of a Proteinaceous Aphrodisiac Pheromone from Hamster Vaginal Discharge. *J Biol Chem.* 261:13323-13326
- Skallová A., Kodym P., Frynta D., Flegr J. 2006: The role of dopamine in *Toxoplasma*-induced behavioural alterations in mice: an ethological and ethopharmacological study. *Parasitology* 133:525-535
- 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*. *Animal Behav.* 52: 141-157
- Smith K.D. 2007: Iron metabolism at the host pathogen interface: Lipocalin 2 and the pathogen-associated *iroA* gene cluster. *Int J Biochem Cell Biol.* 39:1776-1780

- Steinbrecht R.A. 1998. Odorant binding proteins: expression and function. *Ann N Y Acad Sci.* 855: 323-332
- Stibbs H.H. 1985: Changes in brain concentrations of catecholamines and indoleamines in *Toxoplasma gondii* infected mice. *Ann Trop Med Parasitol.* 79:153-157
- Stopka P., Janotova K. and Heyrovsky D. 2007: The advertisement role of Major Urinary Proteins in mice. *Physiol Behav.* 91:667-670
- Stopková R., Hladovcová D., Kokavec J. and Stopka P. 2009: Multiple roles of secretory lipocalins (MUP, OBP) in the mouse. *Folia Zool.* 58:29-40.
- Stopková R., Stopka P., Janotová K. and Jedelský P. L. 2007: Species-specific expression of Major Urinary Proteins in the house mice (*Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus*) *J Chem Ecol.* 33:861-869.
- Suzuki Y., Orellana M.A., Wong S.-Y., Conley F.K., Remington J.S. 1993: Susceptibility to Chronic Infection with *Toxoplasma gondii* Does Not Correlate with Susceptibility to Acute Infection in Mice. *Infect Immun.* 61:2284-2288
- Terpsidis K.I., Papazahariadou M.G., Taitzoglou I.A., Papaioannou N.G., Georgiadis M.p., Theodoridis I.Th. 2009: *Toxoplasma gondii*: Reproductive parameters in experimentally infected male rats. *Exp Paras.* 121:238-341
- Thom M.D., Hurst J.L. 2004: Individual recognition by scent. *Ann Zool Fennici* 41:765-787
- Thompson E.G., Aviles H.O., Monroy F.P. 2008 Antibodies in cold stressed mice recognize a surface protein in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *J Parasitol.* 94:114-118
- Thornton K., Bachtrog D., Andolfato P. 2006: X chromosomes and autosomes evolve at similar rates in *Drosophila*: no evidence for faster-X protein evolution. *Genome Res.* 16: 498-504
- Thung P.J. 1956: Proteinuria in mice and its relevance to comparative gerontology. *Experientia* (Suppl. 4):195-199
- Tobe R., Mihara H., Kurihara T. and Esaki N. 2009: Identification of Proteins Interaction with Selenocysteine Lyase. *Biosci Biotechnol Biochem.* 73:1230-1232
- Utsumi, M., Ohno, K., Kawasaki Y., Tamura M., Kubo T., Tohyama M. 1999: Expression of major urinary protein genes in the nasal glands associated with general olfaction. *Inc J Neurobiol.* 39:227-236
- Vandenbergh J. G. 1969: Male odor accelerates female sexual maturation in mice. *Endocrinology* 84: 658-660
- Vandenbergh J.G., Drickamer L.C., Colby D.R. 1972: Social and dietary factors in the sexual maturation of female mice. *J Reprod Fertil.* 28:397-405
- Vincent F., Lobel D., Brown K., Spinelli S., Grote P., Breer H., Cambillau Ch., Tegoni M. 2001: Crystal Structure of Aprodisin, Sex pheromone from Female Hamster. *J Mol Biol.* 305:459-469
- Vosshall L.B., Stensmyr V.C. 2005: Wake up and smell the pheromones. *Neuron.* 45:179-181

- Vyas A., Kim S.-K., Giacomini N., Boothroyd J.C., Sapolsky R.M. 2007b: Behavioral changes induced by toxoplasma infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. *PNAS* 104:6442-6447
- Vyas A., Kim S.-K., Sapolsky R.M. 2007a: The effects of *Toxoplasma* infection on rodent behavior are dependent on dose of the stimulus. *Neuroscience* 148:342-348
- Wagner W.E. Jr. 1998: Measuring female mating preferences. *Anim. Behav.* 55:1029-1042
- Webster J.P. 2001: Rats, cats, people and parasites: the impact of latent toxoplasmosis on behaviour. *Microbes and Infect* 3:1-9
- Webster J.P. 2007: The effect of *Toxoplasma gondii* on animal behaviour: Playing cat and mouse. *Schizophr Bull.* 33:752-756
- Webster J.P., Brunton C.F.A. and Macdonald D.W. 1994: Effect of *Toxoplasma gondii* upon neophobic behavior in wild brown rats, *Rattus norvegicus*. *Parasitology* 109:37-43
- Webster J.P., Lamberton P.H., Donnelly C.A., Torrey E.F. 2006: Parasites as causative agents of human affective disorders? The impact of anti-psychotic, mood-stabilizer and anti-parasite medication on *Toxoplasma gondii*'s ability to alter host behaviour. *Proc Biol Sci.* 273:1023-1030
- Wedekin C. and Folstad I. 1994: Adaptive or nonadaptive immunosuppression by sex hormones? *Am Nat.* 143:936-938
- Whitten W.K. 1959: Occurrence of anoestrus in mice caged in groups. *J. Endocrinol.* 18:102-107
- Willis C., Poulin R. 2000: Preference of female rats for the odours of non-parasitized males: the smell of good genes? *Folia Parasitol.* 47:6-10
- Wilson E.O., Bossert W.H. 1963: Chemical communication among animals. *Recent Prog Horm Res.* 19:673-710
- Wilson R.A. 1993: Immunity and immunoregulation in helminth infection. *Curr Opin Immunol.* 5:538-547
- Xu F., Schaefer M., Kida I., Schaefer J., Liu N., Rothman D.L., Hyder F., Restrepo D., Shepherd G.M. 2005: Simultaneous activation of mouse main and accessory olfactory bulbs by odors or pheromones. *J Compar Neurol.* 489:491-500
- Yamazaki K., Boyes E.A., Bard J., Curran M., Kim D., Ross S.R. and Beauchamp G.K. 2002: Presence of mouse mammary tumor virus specifically alters the body odor of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 5612- 5615
- Yolken R.H., Dickerson F.B., Fuller Torrey E. 2009: *Toxoplasma* and schizophrenia. *Parasite Immunol.* 31:706-15
- Zahavi A. 1975: Mate selection-a selection for a handicap. *J Theor Biol.* 53:205-214
- Zhou Y., Jiang L., Rui L. 2009: Identification of MUP 1 as regulator for glucose and lipid metabolism in mice. *J Biol Chem.* 284:11152-11159