

**Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta**

**Katedra zoologie**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: NZOO



**Bc. Petr Klempt**

**Olfaktorické receptory spermií sociálních a solitérních hlodavců**

Sperm Olfactory Receptors in Solitary and Social Rodents

**Diplomová práce**

Školitel: Mgr. Romana Stopková, Ph.D.

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

Praha, 2013

**Prohlášení:**

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

V Praze, 06. 05. 2013

Podpis

Na tomto místě bych rád poděkoval v první řadě svým rodičům za jejich podporu v průběhu studia. Nejvíce jsem jim vděčný za to, že mě opravdu naučili se rvát, nevzdávat se a bojovat.

Velké poděkování patří rovněž skvělému týmu v čele s Romanou Stopkovou, Pavlem Stopkou a Davidem Vinklerem. Všichni tři se podíleli na experimentech (či jejich zajištění), bez kterých by tato práce nemohla vzniknout. Romaně jsem obzvláště vděčný za pomoc s diplomovou prací i za celé vedení v průběhu magisterského studia, zejména pak v době jejího těhotenství a mateřské dovolené.

Děkuji také našim skvělým laborantkám, Heleně Uhlířové a Lence Bulvové, za jejich laskavost a pomoc v laboratoři (a ohleduplnost v době opileckého spaní na podlaze pracovny!). Martině Černé děkuji za zajištění všech vzorků z FACS.

## Obsah

Úvod do tématu diplomové práce .....	8
Cíle diplomové práce .....	11
Literární přehled .....	12
1 Odorantové receptory .....	12
1.1 Úvod do odorantových receptorů .....	12
1.2 Ligandy pro ORs a receptorový kód .....	15
1.3 Ektopická exprese .....	16
2 Vomeronasální receptory .....	21
2.1 Vomeronasální receptory typu 1 (V1R) .....	21
2.2 Vomeronasální receptory skupiny 2 (V2R) .....	22
2.3 Ligandy pro V1R a jevy spojené s jejich vazbou .....	24
2.4 Ligandy pro V2R a jevy spojené s jejich vazbou .....	25
2.5 Ektopická exprese vomeronasálních receptorů .....	27
3 TAARs, receptory asociované se stopovými aminy .....	29
3.1 Úvod do TAARs .....	29
3.2 TAARs a jejich ligandy .....	29
3.3 Tkáňová exprese TAARs .....	31
Materiály a metody .....	33
4 Příprava cDNA vzorku pro 454 sekvenaci .....	33
4.1 Biologický materiál .....	33
4.2 Odběr vzorku a homogenizace tkáně .....	33
4.3 Izolace RNA .....	34
4.4 Kontrola a měření kvality a koncentrace RNA .....	34
4.5 Reverzní transkripce .....	36
4.6 cDNA amplifikace .....	36
4.7 Normalizace cDNA .....	38
4.7.1 Testování aktivity DSN enzymu .....	38

4.7.2	Denaturace cDNA a hybridizace .....	39
4.7.3	Normalizace a následná amplifikace cDNA .....	39
4.8	Příprava cDNA knihovny .....	42
4.8.1	Nebulizace – fragmentace ds cDNA .....	42
4.8.2	Připojení adaptorů - označení tkáňového původu knihoven .....	42
4.8.3	Odstranění malých fragmentů.....	43
4.8.4	Kontrola kvality ds cDNA knihovny .....	43
4.8.5	Fluorimetrická kvantifikace ds cDNA knihovny .....	43
4.9	Emulzní titrace.....	44
4.9.1	Emulzní PCR.....	45
4.9.2	Obohacení DNA vazebných kuliček.....	46
4.9.3	Odstranění obohacujících kuliček a příprava ss cDNA .....	46
4.9.4	Příprava pro sekvenační reakci a výpočet podílu obohacených kuliček .....	46
4.10	Velkoobjemová emulzní PCR.....	47
5	Sekvenace pomocí GS FLX+ Titanium.....	49
6	Sekvenační data a jejich zpracování.....	50
6.1	Vyhledávání olfaktorických receptorů v transkriptomové databázi .....	51
7	Relativní kvantifikace exprese olfaktorických receptorů .....	51
7.1	Reakční směs a parametry qPCR .....	53
	Výsledky .....	55
8	Výsledky sekvenace transkriptomů tkání .....	55
9	Repertoáry olfaktorických receptorů v transkriptomech dvou druhů rodu <i>Apodemus</i> .....	56
9.1	Repertoár olfaktorických receptorů v testes obou druhů .....	56
9.2	Olfaktorické receptory v čichových tkáních .....	58
9.3	Statistické zhodnocení distribuce exprese olfaktorických receptorů.....	61
10	Výsledky relativní kvantifikace genové exprese.....	61
10.1	Expese receptorů v čichových a testikulárních tkáních dvou druhů .....	62
10.2	Expese receptorů v jednotlivých stádiích spermatogeneze .....	64

Diskuze .....	66
Závěr .....	69
Literatura.....	70

## Abstrakt

Olfaktorické receptory představují jednu z klíčových komponent nejstaršího smyslu senzorického vnímání světa – čichu. Tento způsob vnímání okolí je extrémně rozvinut zejména u hlodavců, u kterých participuje rovněž na spouštění sexuálního chování či agresivity. Exprese olfaktorických receptorů však není omezena pouze na olfaktorické orgány. Nacházíme je v celé řadě tkání. My jsme se zaměřili na jejich expresi v testes a v jednotlivých stádiích spermatogeneze. Míru exprese vybraných receptorů v testes a čichových tkáních jsme porovnávali u dvou druhů myšic, *Apodemus sylvaticus* a *Apodemus microps*, které se liší svým sociálním uspořádáním a mírou promiskuity. Toto jsme provedli za pomoci 454 transkriptomového sekvenování a kvantitativní PCR. V testes jsme detekovali expresi již popsanych tříd olfaktorických receptorů (odorantové receptory a vomeronasální receptory typu 1), nově přicházíme s detekcí exprese dalších typů (receptory asociované se stopovými aminy a vomeronasální receptory typu 2). Výsledky diskutujeme v kontextu rozdílného sociálního uspořádání obou druhů myšic a také v kontextu potenciální účasti na spermatogenezi a/nebo roli ve zralých spermích.

## Abstract

Olfactory receptors are the key component of the oldest sense of sensoric evaluation of surrounding environment – sense of smell. This sense is extremely highly developed in rodents, as it is involved in modulation of sexual behaviour and aggressivity. However, the expression of olfactory receptors is not limited only to olfactory organs. There is evidence of expression in various tissues. We focus on expression in testicular tissue and in stages of spermatogenesis. Also, we interspecifically compare the level of expression of several receptors in testes and olfactory tissues of two rodent species of the genus *Apodemus* (*A. sylvaticus* and *A. microps*). To analyze this, we utilized 454 transcriptomic sequencing as well as quantitative PCR. We have detected expression of already described olfactory receptors superfamilies (odorant receptors and vomeronasal receptors type1). For the first time we present detected expression of trace- amine associated receptors and second type of vomeronasal receptors. We discuss our results in context of different social context of two presented species. In the same way we discuss potential role in spermatogenesis and/or in spermatozoa.

## Úvod do tématu diplomové práce

Chemosenzorické receptory jsou naprosto zásadními články vnímání chemického světa obklopujícího živočichy, když představují samotné receptorové molekuly zapojené ve vazbě chemických látek přinášných na povrch sensorických epitelů ať už z potravy, vzduchu nebo vody. Takové chemické látky označujeme jako ligandy; molekuly schopné “zapadnout“ do vazebné kapsy receptoru a tak aktivovat signalizační kaskádu na membráně buněk či sensorických neuronů, která vede následně k rozpoznání původu a významu ligandu (Munger et al. 2009; Touhara & Vosshall 2009). V této práci jsem se zaměřil na savčí olfaktorické receptory, které jsme našli v testes dvou druhů myšic rodu *Apodemus*. Jedná se o odorantové receptory (také nazývané olfaktorické receptory; ORs), vomeronasální receptory dvou rodin (známé také jako feromonální receptory; VRs) a receptory asociované se stopovými aminy (TAARs). Všechny tři typy receptorů participují na vnímání chemického světa. Není proto překvapivé, že primárními místy exprese takových receptorů jsou čichové orgány, u savců reprezentované hlavním čichovým epitelem, vomeronasálním orgánem, septálním orgánem a Grünebergovým gangliem (znázorněno v BOX 1). Během několika málo let od objevení genové rodiny ORs identifikovaných rozbořením cDNA olfaktorického epitelu potkana (Buck & Axel 1991) přichází řada studií nalézajících expresi ORs v dalších tkáních. Takovou expresi autoři nazývají ektopickou, jelikož se nachází v tkáních, kde se exprese dané skupiny genů tradičně nepředpokládá. Jak však další práce (včetně této) později naznačí, nejedná se o přesné označení (De la Cruz et al. 2009). Jednou z prvních objevených tkání s ektopickou expresí jsou testes a různá stadia spermatogeneze savců (Parmentier et al. 1992; Vanderhaeghen et al. 1993; Walensky et al. 1995; Vanderhaeghen et al. 1997; viz kapitoly 1.1 a 1.3). Studie postupně ukazují, že repertoár ORs exprimovaný v testes je druhově specifický. S objevem exprese vomeronasálních receptorů skupiny 1 na myších spermii je jasné, že repertoár chemosenzorických receptorů exprimovaných v testes a spermii není omezen jen na jednu třídu (Tatsura et al. 2001). Počet nacházených tříd exprimovaných v testes i v samotných vývojových stádiích spermatogeneze tato diplomová práce rozšiřuje o další dvě třídy.

Dvě zásadní funkční studie chování lidských a myších spermii v gradientech odorantů (Spehr et al. 2003; Fukuda et al. 2004) ukazují na překvapující výsledky: a) ORs mohou představovat ty molekuly, které řídí navigaci spermii k jistému zdroji odorantu fungujícího jako chemický atraktant spermii; b) receptory pravděpodobně zodpovědné za vnímání gradientu odorantu spermii jsou druhově specifické, nejsou kódovány orthologními geny.



Fukuda et al. (2004) navíc ukazují, že odorant bougeonal, chemoatraktant lidských spermií, nefunguje jako chemoatraktant pro spermie myši. Na významu tak nabývá často diskutovaná možnost, že druhově specifické repertoáry olfaktorických receptorů mohou hrát roli jednak v rozpoznávání jedinců stejného druhu, indukci reprodukčního chování (na úrovni čichových orgánů), jednak v kompetici spermií a tedy i potenciálně při tvorbě mezidruhových bariér.

Ve stejném roce, kdy Buck a Axel popisují nové proteinové rodiny odorantových receptorů, přichází na jiném poli vědy další zásadní objev. Ralt et al. (1991) publikují studii vlivu folikulární kapaliny žen na chemotaxi a akumulaci mužských spermií. Jedná se o první studii ukazující na možný směr, kam se dívat při studiu navigace či obecně pohybu spermií savců. Práce navazuje na předchozí objev krátkých peptidů uvolňovaných z vaječného obalu ježovek *Arbacia punctulata* a *Lytechinus pictus*, které způsobují akumulaci spermií (Suzuki & Garbers 1984). Suzuki a Garbers uvádějí, že peptidy (Resact u *A. punctulata* a Speract *L. pictus*) uvolňované z vaječných obalů dvou druhů atrahují pouze spermie stejného druhu. Získáváme tak ukázkový příklad komunikace vajíček a spermií vedoucí ve vodním prostředí (ježovky mají vnější oplození) k úspěšnému oplození skrze potenciál spermií lokalizovat vajíčka (Suzuki & Garbers 1984). Přínos studie je o to naléhavější, že toto dokazuje u hojných druhů s překrývajícím se výskytem a tedy i potenciálním setkáváním druhově rozdílných gamet (Sharp & Gray 1962). Vraťme se k savcům, konkrétně ke studiím ukazujícím na původ chemoatraktantů. Ralt et al. (1991) používají k vyvolání chemotaxe spermií folikulární kapalinu. Z možných kandidátních molekul zodpovědných za chemotaxi vylučují progesteron a  $17\beta$ -estradiol; neukazují však na potenciální chemoatraktanty. Sun et al. (2004) ukazují, že chemotaxi spermií vyvolávají jednak kumulární buňky obalující vajíčko, jednak vajíčko samotné. Zmiňují několik zajímavých poznatků; mj. ukončení sekrece chemoatraktantů po vstupu spermie do vajíčka, nebo také koncentračně závislou inhibici chemotaxe (příliš nízké a vysoké koncentrace chemoatraktantů) (Sun et al. 2005). Jiné práce (za všechny jmenujme práci od Teves et al. (2006) ), ve stejném duchu „vrací do hry“ progesteron jako kandidátní molekulu pro chemotaxi spermií. Předpokladem pro vyvolání chemotaxe je však dostatečně nízká (pikomolární) koncentrace progesteronu (Teves et al. 2006). Ostatně, receptory pro progesteron byly na spermiích člověka nalezeny také (Kaupp et al. 2008). Chemotaxi spermií myši vyvolává také Allurin, peptid z vaječného obalu drápatky vodní (*Xenopus laevis*), který je homologický k savčí proteinové rodině CRISP („cysteine-rich secretory proteins“) (Kaupp et al. 2008). Kandidátním chemoatraktantem je také chemokinový protein Rantes, který způsobuje kromě chemotaxe T lymfocytů, eosinofilů a monocytů, také chemotaxi spermií

(Isobe et al. 2002). Chemokinové receptory (CCR3 a CCR5) byly rovněž nalezeny na lidských spermiích (Kaupp et al. 2008). Poměrně dlouho je známa také exprese chuťových receptorů na spermiích, u kterých se diskutuje mj. role v regulaci spontánní akrosomové reakce nebo v kapacitaci spermií (Li 2013). Z uvedeného je tedy zřejmé, že komplexita receptorů exprimovaných na spermiích je vysoká.

Výchozí poznatky této diplomové práce jsou tedy jasné: olfaktorické receptory by mohly participovat na navigaci spermií k vajíčku nebo hrát roli v průběhu spermatogeneze a například včasné aktivace kapacity spermií v průběhu jejich cesty z epididymis dovnitř těla samice. Toto lze předpokládat nejen na základě zmíněných studií vlivu odorantů na spermie člověka a myši, ale rovněž ze známých či pravděpodobných ligandů, které olfaktorické receptory váží v olfaktorických orgánech. Poukazují na vazbu peptidů, hormonů, stopových aminů, alifatických alkoholů, či dalších (viz příslušné kapitoly 1.2, 2.3, 2.4 a 3.2).

Možnou roli olfaktorických receptorů jsme se rozhodli ověřit na úrovni celých transkriptomů testes v mezidruhovém srovnání, legitimní a hojně užívané možnosti studia genů a vlivů, kterým jsou vystaveny. Pro porovnání jsme užili dva druhy myšic rodu *Apodemus*. Prvním zástupcem je myšice křovinná (*Apodemus sylvaticus*), druhým myšice malooká (*A. microps* nebo také *A. uralensis*). Oba druhy myšic se na pomyslném kontinuu sociálních (socialita – solitérnost) a párovacích systémů (monogamie – promiskuita) liší. Myšice malooká představuje spíše sociální a monogamní druh (s menším podílem mimopárových paternit), zatímco myšice křovinná je naopak spíše solitérní, agresivnější druh s vysokou mírou promiskuity (Bryja & Stopka 2005; Bryja et al. 2008). S využitím nové generace sekvenování (454 FLX+) jsme získali transkriptomové databáze testes (ale také čichových tkání a slinných žláz) obou zmíněných druhů. Porovnání databází ukázalo, že se repertoáry olfaktorických receptorů v testes obou druhů liší. V testes obou druhů myšic navíc nacházíme i skupinu vomeronasálních receptorů typu 2 a také TAARs. Tuto skutečnost popisujeme, alespoň dle mě známé literatury v čase psaní těchto řádků, jako první. Následně jsem analyzoval relativní expresi vybraných receptorů v testes a čichové tkáni u čtyř jedinců obou druhů. Pro potvrzení možné role receptorů na spermiích či během jejich vývoje jsem provedl stanovení relativní exprese ve vývojových stádiích spermatogeneze u čtyř jedinců myšice křovinné. Výsledky diskutuji v kontextu potenciální funkce daných receptorů jak na úrovni jednotlivých stádií spermatogeneze, tak v kontextu sociálního uspořádání obou druhů.

Průřez příslušnými pracemi, které představují myšlenkové pozadí a východiska práce se snažím zprostředkovat ve třech kapitolách (1, 2 a 3) literárního přehledu, které jsou dále členěny na tři části (Obecný úvod, Ligandy specifické pro danou rodinu receptorů a Ektopická exprese). Kapitoly jsou věnovány těm rodinám olfaktorických receptorů, které jsme našli alespoň v jednom transkriptomu testes (ORs, V1Rs a V2Rs, TAARs). V kapitolách lze nalézt tzv. BOXy, které rozšiřují probíraná témata a (snad) pomáhají k širšímu pochopení problému. Metodickou část představují kapitoly 4, 5 a 6. Výsledky prezentuji v kapitolách 8, 9 a 10. Zjištěné poznatky dále diskutuji v příslušné části práce.

## **Cíle diplomové práce**

- Pomocí transkriptomového sekvenování stanovit a porovnat repertoáry olfaktorických receptorů přítomných v testes dvou druhů myšic rodu *Apodemus*, myšice malooké (*A. microps* resp. *A. uralensis*) a myšice křovinné (*A. sylvaticus*).
- Porovnat míru relativní exprese těchto receptorů v testes a čichových tkáních (olfaktorický epitel a vomeronasální orgán) u více jedinců obou druhů.
- Ověřit, zda se olfaktorické receptory exprimují v jednotlivých stádiích spermatogeneze.

## Literární přehled

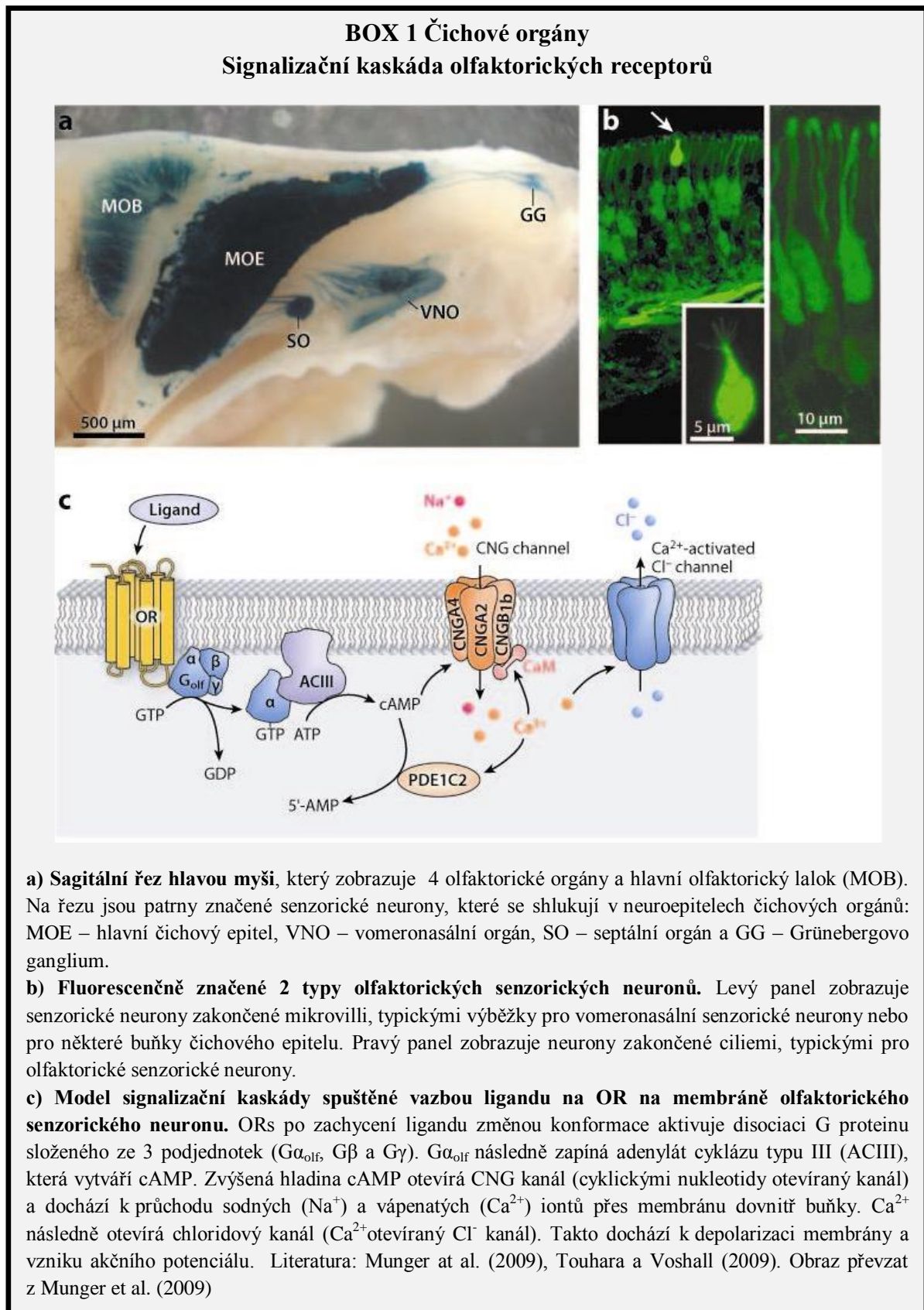
### 1 Odorantové receptory

#### 1.1 Úvod do odorantových receptorů

Za objevem největší genové rodiny savců – odorantových nebo také olfaktorických receptorů (OR *sg.*, ORs *pl.*) - stojí autoři, které budeme i nadále vídat při objevování dalších tříd chemosenzorických receptorů: Richard Axel a Linda Buck (1991). Ti sice nejprve popsali 18 potkaních ORs exprimovaných v olfaktorickém epitelu potkana (*Rattus norvegicus*), pozdější hledání potenciálních genů pro ORs v celogenomových sekvencích však ukazují na enormní repertoár receptorů přítomných zejména u savců, ale i dalších tříd obratlovců (Nei et al. 2008). První identifikace ORs proběhla pomocí RT-PCR při využití RNA z olfaktorického epitelu potkana (Buck & Axel 1991). ORs jsou exprimovány skutečně zejména v hlavním čichovém epitelu, nalézáme je ale také na sensorických neuronech septálního orgánu (Kaluza et al. 2004), vomeronasálního orgánu (Lévai et al. 2006) a také Grünebergova ganglia (Fleischer et al. 2006). Všechny 4 zmíněné orgány se účastní olfaktorického vnímání a tak je pravděpodobné, že ORs budou ve všech vykonávat funkci receptoru pro odoranty, který spouští signalizační kaskádu na membránách sensorických neuronů. Ektopické expresi ORs se věnuji níže.

ORs jsou membránové receptory spřažené s heterotrimerickými G proteiny (z *angl.* G-protein coupled receptor, GPCR *sg.*, GPCRs *pl.*) a v rámci GPCRs náleží do „rhodopsin-like“ rodiny, třídy A (Fleischer et al. 2009). ORs prochází membránou sedmi transmembránovými doménami tvořenými z 19-26 aminokyselin. Ty vytváří v rovině membrány buněk vazebnou kapsu, která ústí do extracelulárního prostoru ze kterého selektivně váže ligandy. Jednotlivé transmembránové domény (TM) jsou propojeny třemi extracelulárními a třemi intracelulárními smyčkami a protein končí dvěma koncovými doménami – extracelulární N-terminální doménu a intracelulární C-terminální doménou (Buck & Axel 1991). Kódující oblast ORs je představována jediným exonem o délce ~1000 bp a je translatována do proteinů o délce ~320 aminokyselin (Buck & Axel 1991; Fleischer et al. 2009). Srovnávací analýza aminokyselinových sekvencí ORs potkana a myši ukazuje poměrně dobře konzervované motivy typické pro danou skupinu receptorů. Nejvíce konzervovaným je motiv MAYDRYVAIC[KN]P na konci TM3 (typický až pro 90 % ORs) (Zhang, Zhang, et al. 2007), dále LHTPMY motiv v 1. intracelulární smyčce, SY motiv na konci TM5, FSTCSSH

na začátku TM6 a PMLNPF v TM7 (Fleischer et al. 2009). Geny pro ORs nacházíme v klastrech rozprostřené v celém genomu, což vypovídá o velkém významu tandemové



duplikace v evoluci ohromného repertoáru ORs. Klastry ORs tak nalézáme téměř na všech chromosomech člověka i myši (Glusman et al. 2001; Niimura & Nei 2003; Niimura & Nei 2005).

Zmíněné obří repertoáry genů pro ORs nacházíme napříč třídami, když nalézáme v genomech drápatky (*Xenopus tropicalis*) ~1638, u vačice (*Monodelphis domestica*) ~1200, u potkana ~1250 a myši ~1000 potenciálně funkčních (intaktních) genů (Nei et al. 2008; Niimura 2009). Na opačné straně v pomyslném srovnání počtů ORs stojí vodní živočichové, jejichž repertoár intaktních ORs se pohybují v rozmezí řádově desítek genů. Menší repertoár ORs genů má například mihule mořská (*Petromyzon marinus*, 27 intaktních genů). Jejich důležitost však ukazuje jejich exprese, vykazující rozdíly v závislosti na třech vývojových stádiích, kterými prochází (Libants et al. 2009). Přítomnost genů podobných ORs byla potvrzena v genomu kopinatce *Branchiostoma floridae* (Churcher & Taylor 2009) i na úrovni exprese v olfaktorických neuronech rostrálního epitelu kopinatce *B.belcheri* (Satoh 2005). Geny se společnými aminokyselinovými motivy ORs bezlebečných i obratlovců rovněž nalézáme v genomech korálnatců (*Nematostella vectensis*, Anthozoa) a ostnokožců (*Strongylocentrotus purpuratus*, Echinodermata) (Churcher & Taylor 2011).

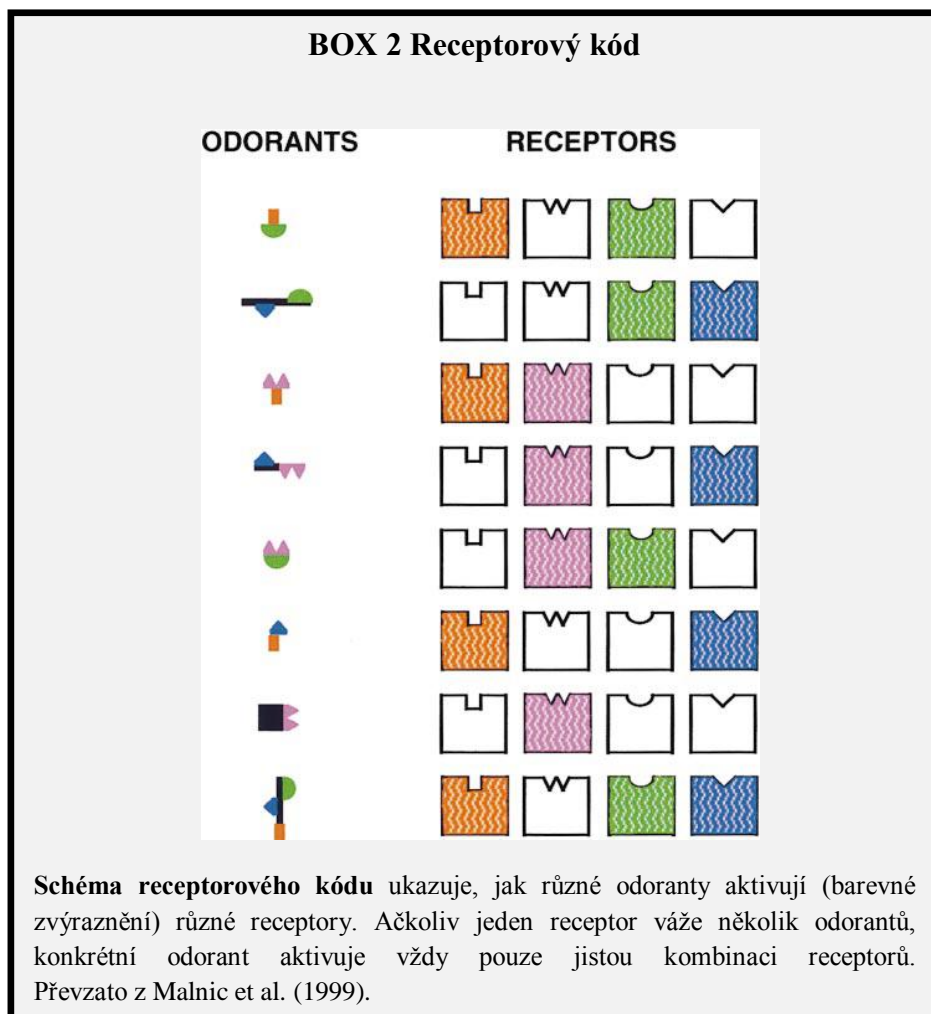
Na základě anatomického a funkčního rozdělení čichového epitelu drápatky bahenní (*Xenopus laevis*) pro vodní a terestrické prostředí a na tomto závislé exprese dvou skupin ORs navrhli Freitag et al. (1995) rozdělení odorantových receptorů na dvě třídy. Třída I by měla představovat receptory uzpůsobené na detekci odorantů z vodního prostředí, třída II z terestrického. Daný koncept rámcově platí, je však jasné že třída II se objevuje i u vodních živočichů a stejně tak třída I u terestrických. Kompletní zhodnocení vývoje konkrétních linií odorantových receptorů v závislosti na jejich schopnosti vázat odoranty rozpustné a nerozpustné ve vodě u vodních a terestrických živočichů přináší Niimura (2009).

Prostředí jistě determinuje repertoár ORs, podobný vliv však má také rozvoj dalšího smyslu. Dobře prozkoumaným příkladem jsme my, lidé, stejně jako celá linie úzkonosých opic (Catarrhini). Srovnání podílu pseudogenů ze 100 náhodně vybraných genů pro ORs mezi opicemi úzkonosými a ploskonosými (Platyrrhini) provedli Gilad et al (2004). Ukázalo se, že starosvětská skupina úzkonosých opic má výrazně vyšší podíl pseudogenů, než jak je tomu u novosvětské skupiny. Jedinou výjimkou v rámci ploskonosých opic by vřešťan černý (*Alouatta caraya*), který se podílem pseudogenů blíží úzkonosým opicím. Spojovacím článkem mezi vřešťanem černým a opicemi starého světa, který vysvětluje vysokou míru

pseudogenizace, je trichromatické vidění. Fenomén ztráty funkčních genů pro čich v důsledku rozvoje trichromatického vidění je znám pod názvem „Colour vision priority hypothesis“ (Gilad et al. 2004).

## 1.2 Ligandy pro ORs a receptorový kód

Ligandem pro tyto receptory jsou jednoduše odoranty (proto primárně nazvány odorantové receptory). Touhara a Vosshall (2009) je definují jako chemické látky, které aktivují olfaktorické sensorické neurony a jejichž molekulární hmotnost se pohybuje obvykle do 300. Odoranty jsou jednoduše jakékoliv molekuly produkované všemi živými organismy, ale také anorganické molekuly nikoliv nutně biologického původu ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{SO}_2$ , kovy atd.), které jsou živočichové schopni vnímat a využívat k orientaci (Touhara & Vosshall 2009). Odoranty mohou být aldehydy, ketony, alifatické alkoholy ale i další látky, navíc vázané dalšími typy receptorů (Peterlin et al. 2008; Grosmaître et al. 2009; Yoshikawa et al. 2013).



Jednotlivé odoranty mohou být z chemického hlediska velmi podobné, přesto je vnímáme odlišně (Malnic et al. 1999, Figure 7). Potenciální množství odorantů tvořících svět pachů přesně neznáme, je však pravděpodobné, že řádově převyšuje i ten největší repertoár olfaktorických receptorů.

Pokusy s měřením přechodných změn intracelulární koncentrace  $Ca^{2+}$  v olfaktorických sensorických neuronech po stimulaci ligandy ukázaly na unikátní možnost, jak pomocí řádově nižšího množství ORs detekovat mnohem vyšší množství odorantů (Malnic et al. 1999; Kajjya et al. 2001). Jedná se „receptorový kód“ (schematické znázornění v BOX 2), kombinatorní možnost identifikace ligandu pomocí aktivace několika – pro daný ligand specifických-receptorů a následně i sensorických neuronů. Konkrétní kombinace aktivovaných neuronů je následně zpracována mozkiem a ústí v konkrétní představu – růži, maso atd. Bylo ukázáno, že jeden odorant aktivuje signalizaci na několika sensorických neuronech, které se však odlišují v exprimovaném OR. Zároveň, jeden konkrétní OR je schopen odpovídat na vazbu většího množství odorantů, má jistý vazebný rozsah. A konečně, jednotlivé odoranty aktivují pro ně specifickou množinu sensorických neuronů (Malnic et al. 1999; Kajjya et al. 2001). Komplexitu receptorového kódu dále zvyšují tzv. antagonisté – molekuly, které se váží do vazebné kapsy receptoru, ale nevyvolávají konformační odpověď (Oka et al. 2004).

### 1.3 Ektopická exprese

Odorantové receptory byly poměrně záhy po objevení Richardem Axelem a Lindou Buck (1991) detekovány také v testes lidí a psů (Parmentier et al. 1992; Vanderhaeghen et al. 1993). Obě citované práce nalézají transkripty odorantových receptorů v pozdních stádiích spermatogeneze (kulaté a elongované spermatidy) a dochází k závěru, že by ORs mohly hrát roli v detekci chemických signálů buď během stádií spermatogeneze, nebo v samotných zralých spermích jako regulátory chemotaxe spermie. Tomu by ostatně napovídala také lokalizace na hlavním respiračním centru spermíí - krčku („midpiece“) (Vanderhaeghen et al. 1993). Zvýšená respirační aktivita v krčku a zvýšená motilita bičíku byla totiž pozorována u spermíí ježovek (*Arbacia punctuata* a *Lytechinus pictus*, Echinodermata) po stimulaci druhově specifickými peptidy (resact a speract) (Suzuki & Garbers 1984). Přítomnost ORs na elongovaných spermatidách a rovněž na krčku spermíí byla následně prokázána také u potkana (Walensky et al. 1995). Zde byla navíc pozorována jejich kolokalizace s možnými proteiny zapojenými v desensitizaci olfaktorických receptorů - G protein receptorovou kinázou 3 (GRK3) a  $\beta$ -arrestinem2, což dále ukázalo na možnou důležitost konceptu olfaktorických receptorů jako regulátorů chemotaxe (Walensky et al. 1995). Množství

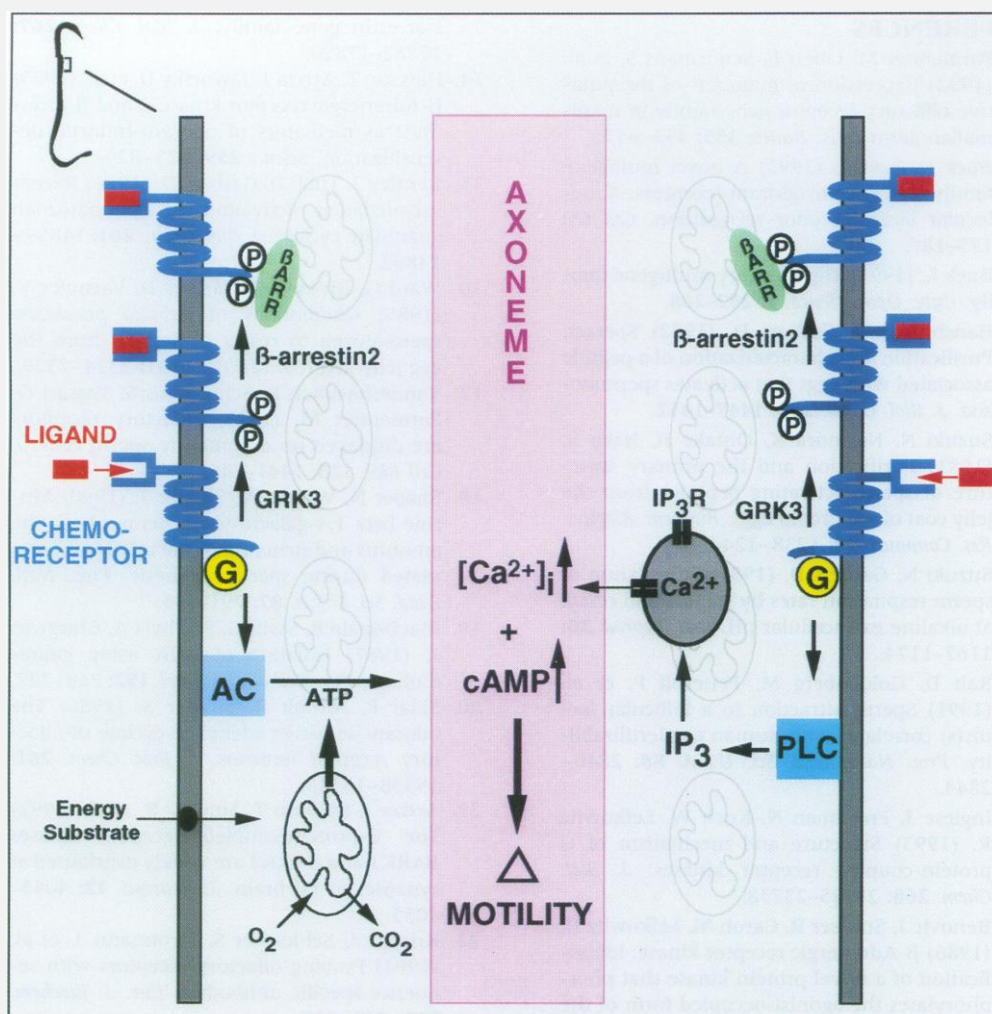


exprimovaných ORs v testes 4 druhů savců (pes 12 ORs, potkan 25 ORs, myš 22 a člověk 18 ORs) ukázalo na druhovou specificitu v repertoáru exprimovaných ORs v testes (Vanderhaeghen et al. 1997). Následná analýza těchto sekvencí ORs exprimovaných v testes ukázala na vysokou homologii receptorů v mezidruhovém srovnání (Vanderhaeghen et al. 1997). Naopak, v porovnání se všemi ORs daného druhu nevykazují ORs exprimované v testes žádné společné motivy, náležitost do stejné podrodiny a ani nepochází ze stejných genomických lokací (Vanderhaeghen et al. 1993; Vanderhaeghen et al. 1997). Analýza substitučních poměrů (synonymní vs. nesynonymní záměny) receptorů exprimovaných v testes myši a potkana v porovnání s olfaktorickými receptory čichového epitelu ukázala, že testikulární ORs podléhají pomalejší evoluci, jelikož vykazují větší množství konzervovaných pozic a to zejména v určitých doménách (Branscomb et al. 2000). První interpretací takového výsledku je podle autorů možnost zapojení těchto receptorů např. ve fyziologických procesech a vývoji spermií. Druhou možnost ukazují některé ORs exprimované v olfaktorickém epitelu, které rovněž vykazují vyšší míru konzervovaných pozic – možná pro vazbu specifického ligandu. To by mohlo rovněž vysvětlovat pomalejší evoluci testikulárních ORs, které by -v případě platnosti role v chemotaxi spermií- jistě měly fungovat jako specializované receptory pro velice úzký okruh tkání či buněk při navigaci spermií k vajíčku samičími pohlavními cestami (Branscomb et al. 2000). I s ohledem na výsledky prezentované v této diplomové práci nutno dodat, že obě interpretace se vzájemně nevylučují. Podporou pro takové tvrzení uvádím do kontextu práce zabývající se ektopickou expresí ORs v i mimo testes člověka a myši níže. Exprese ORs však byla detekována rovněž v testes kura domácího (*Gallus gallus*) (Steiger et al. 2008).

MOR23 (myší OR 23), je zřejmě jedním z nejznámějších a nejlépe prostudovaných odorantových receptorů, jelikož jde o gen pravděpodobně se účastnící hned několika zásadních procesů. První zájem si získal pro jeho současnou expresi jak v olfaktorickém epitelu myši, tak v testes (Asai et al. 1996). Tehdy se totiž autorům podařilo identifikovat 2 odlišné, tkáňově specifické regiony iniciace transkripce. Ukázalo se, že daný gen využívá svého exonu v 5' netranslatované oblasti pro iniciace transkripce v olfaktorickém epitelu, zatímco v testes ke stejnému účelu využívá intronu před samotnou kódující sekvencí (Asai et al. 1996). Poměrně záhy se ukazuje, že stejný receptor exprimovaný na myších olfaktorických senzorních neuronech odpovídá na vazbu lyralu (BOX 4) zvýšením intracelulární hladiny  $Ca^{2+}$  (důsledek aktivace signální kaskády) (Touhara et al. 1999). Takové zjištění je již jen krok od studie stopující pohyb myších spermií v gradientu lyralu či

studie akumulace spermií poblíž zdroje tohoto odorantu. Ty provádí autorský tým právě

### BOX 3 Předpokládaná signalizační kaskáda na membráně spermie



**Model signalizační kaskády spuštěné vazbou ligandu na ORs na membráně spermií.** Převzato z Walensky et al. 1995. V levém horním rohu je zobrazena pravděpodobná lokalizace proteinů signální kaskády ORs na membráně krčku spermie. Po vazbě ligandu na chemoreceptor (OR) dochází přes  $G_{\alpha_{olf}}$  k aktivaci adenylát cyklázy III (AC), která následně zvedá hladinu cytosolického cAMP. To způsobí otevření CNG kanálu, který propouští  $Ca^{2+}$  do intracelulárního prostoru spermie. Zvýšená hladina  $Ca^{2+}$  je spojena se změnou pohybu ( $\Delta$  motility) a konformace bičíku. Alternativní cestou je aktivace fosfolipázy C (PLC), která následně generuje  $IP_3$ . Tuto molekula aktivuje uvolňování  $Ca^{2+}$  z intracelulárních zásobníků a to spouští již zmiňované děje na membráně či chování spermie.  $\beta$ -arrestin 2 spolu s GRK3 participují na desenzitizaci (inaktivaci) receptoru v komplexu s ligandem. Literatura: Touhara a Voshall (2009), literatura a model: Walensky et al. 1995.

kolem Kazushigeho Touhary a jedná se o první funkční studii dokazujících účast odorantového receptoru v chemotaxi spermií myši (Fukuda et al. 2004). Ukazují, že MOR23 je exprimován asi v 30 % oválných spermatid, a že stejné množství spermií odpovídá zvýšením nitrobuňkové hladiny  $Ca^{2+}$  právě po stimulaci lyralem. Dokazují, že právě lokální zvýšení cytosolické hladiny  $Ca^{2+}$  je nezbytné pro indukci akumulace spermií kolem zdroje

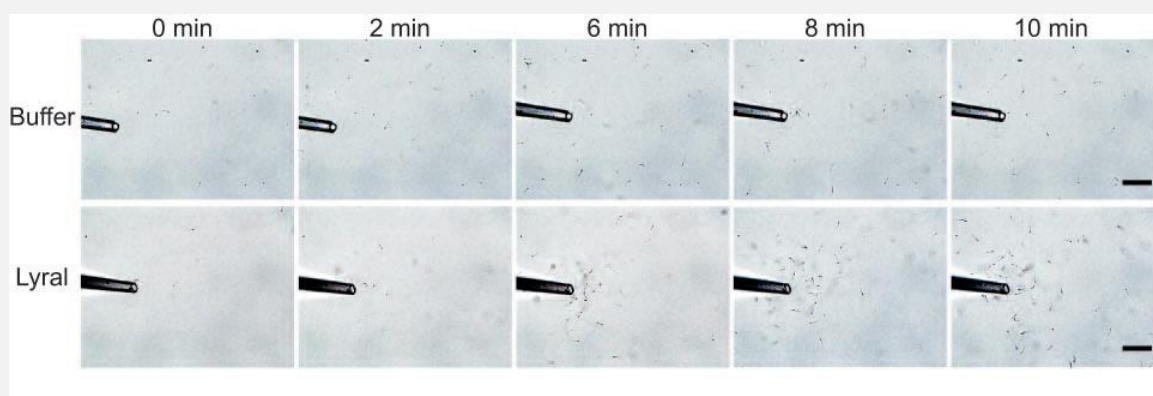
lyralu a případně změně konformace bičíku spermie (Fukuda et al. 2004). Studie dále uvádí, že 22 ze 49 spermií vykazuje chemotaxi směrem ke zdroji lyralu a že u 18 (36 %) z nich byly pozorovány prokazatelné změny směru v pohybu v narůstajícím gradientu lyralu. Na základě těchto výsledků autoři diskutují možnou roli receptorů ve fenoménu intergametické selekce, nebo roli ORs v kapacitaci spermií (Fukuda et al. 2004). Jisté poznatky podporující navrhované role přináší následně ve studii z roku 2006, kdy se zajímají o expresní vzorce řady ORs exprimovaných v testes a v jednotlivých stádiích spermatogeneze myši (Fukuda & Touhara 2006). V té ukazují pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace, že v jedné spermatogenní buňce je exprimováno více ORs a že se repertoár ORs v jednotlivých spermatidách může lišit, stejně jako se může lišit exprese jednotlivých ORs v průběhu spermatogeneze (Fukuda & Touhara 2006). Zajímavé je, že přítomnost exprese ORs pouze v jisté proporcii spermatid a spermií ukazovaly také starší, již zmiňované práce a jedná se tedy, alespoň v rámci savců (pes, potkan, myš, člověk), o široce rozšířený jev (Vanderhaeghen et al. 1993; Walensky et al. 1995; Vanderhaeghen et al. 1997).

MOR23 hraje poměrně výraznou roli také v reparaci svalové tkáně myši. V případě jeho absence dochází ke zvýšené tvorbě rozvětvených svalových vláken, která jsou náchylná k poškození (Griffin et al. 2009; Pavlath 2010). Vysoká exprese tohoto genu (ale i jeho tradičních komponent signální transdukce, jako  $G\alpha_{olf}$  a adenylát cykláza III) byla zaznamenána právě v průběhu migrace myoblastů k poškozenému místu svalové tkáně (Griffin et al. 2009; Pavlath 2010). Obě studie poukazují na současné zapojení dalších odorantových receptorů v kompletním průběhu reparace svalové tkáně – od proliferace myoblastů až k jejich fúzování a tvorbě svalových vláken. Nedávno byly publikovány práce ukazující možné zapojení ORs v léčbě rakoviny prostaty (Neuhaus et al. 2009), karcinomu tenkého střeva (Cui et al. 2013) či léčbě obezity (Primeaux et al. 2013).

Další z prací evidujících důležitou roli ORs u člověka se zabývá diferenciallyně exprimovanými geny v gonádách potracených 10týdeních plodů (Goto et al. 2001). Ukazuje se, že gen pro OR (OR7E24) je specificky exprimován nezávisle na pohlaví a to konkrétně v buňkách primordiální zárodečné linie, které jsou v daném stádiu vývoje (10týdení plod) v migratorní fázi (Goto et al. 2001). Migrace a odorantové receptory představují zřejmě účinné funkční propojení, jak také ukazuje studie pohybu lidských spermií v gradientu bourgeonalu. Tento odorant je vázán lidským receptorem hOR17-4 a vyvolává aktivaci signální transdukce na spermiích, která vede ke zvýšení rychlosti pohybu spermie (chemokineze), k chemotaxi spermií a jejich akumulaci u místa zdroje odorantu (Spehr et al.

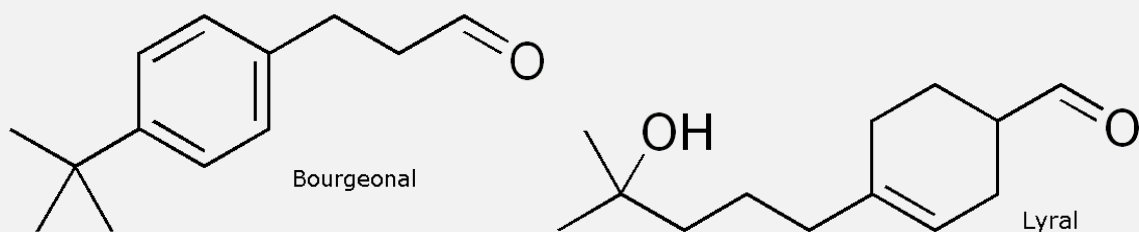
2003). Zmíněné výsledky samozřejmě staví odorantové receptory do kategorie genů potenciálně velkého biomedicínského dopadu, ať již se jedná o léčbu poraněných svalů či svalových nemocí, léčbu rakoviny, obesity nebo možné využití při léčbě neplodnosti. Jak ukazují studie velkého množství ORs pomocí metody microarrays, transkripty ORs jsou detekovatelné v mnoha tkáních různých druhů (Zhang et al. 2004; Zhang, Cruz, et al. 2007; De la Cruz et al. 2009) a často převyšují svou hladinou exprese zmiňované testikulární a olfaktorické tkáň (Feldmesser et al. 2006). Mezidruhové srovnání exprese ORs v tkáních člověka a šimpanze ukazuje na nenáhodnou expresi orthologních genů ve stejných tkáních a ve shodě s Branscomb et al. (2000) ukazuje na pomalejší evoluci takových ektopicky exprimovaných ORs v porovnání s ORs exprimovanými jen v čichovém epitelu (De la Cruz et al. 2009). Největší množství ektopicky exprimovaných ORs se nachází v srdci a plicích (Zhang, Cruz, et al. 2007), což dále implikuje zapojení ORs ve fyziologických procesech savčích těl.

#### BOX 4 Chemotaxe a akumulace spermií



**Srovnání akumulace myších spermií u zdroje lyralu a kontrolního zdroje (Buffer).** Převzato z Fukuda et al. (2004). Na snímcích je patrná postupná akumulace spermií snímaná po 2 minutách od aplikace roztoků (čas 0 min).

**Chemická struktura** 2 odorantů, po kterých se spermie mohou „utlouct“. Jako chemoatraktant působí bourgeonal na lidské spermie exprimující hOR17-4, stejným způsobem působí lyral na spermie myši s exprimovaným MOR23. Literatura: Spehr et al. (2003), Fukuda et al. (2004)



Obrázky chemických molekul: wikipedia.org

## 2 Vomeronasální receptory

Pod pojmy vomeronasální či feromonální receptory se skrývají dvě skupiny transmembránových receptorů spřažených s G proteiny - V1Rs a V2Rs. Název získaly jednak dle vomeronasálního (Jacobsonova) orgánu, kde byly nalezeny a kde jsou dominantně exprimovány ve vomeronasálních sensorických neuronech, jednak dle schopnosti odpovídat aktivací signální kaskády na feromony (Dulac & Axel 1995; Herrada & Dulac 1997; Fleischer et al. 2009). Vomeronasální receptory typu 1 (V1Rs) byly identifikovány s využitím metody klonování cDNA knihoven získaných z jednotlivých vomeronasálních sensorických neuronů potkana (Dulac & Axel 1995). Poměrně záhy byly nalezeny V2Rs a spolu s nimi také dvě subpopulace vomeronasálních sensorických neuronů, které odlišuje umístění jejich neuronových těl buď v apikální, nebo v bazální vrstvě (Herrada & Dulac 1997). Ukázalo se, že zatímco V1Rs jsou exprimovány v sensorických neuronech apikální vrstvy vomeronasálního neuroepitelu, v sensorických neuronech bazální vrstvy jsou exprimovány V2Rs (Herrada & Dulac 1997). Jelikož jde evolučně o dvě zcela nezávislé receptorové linie, bude každé věnována samostatná část.

### 2.1 Vomeronasální receptory typu 1 (V1R)

V1Rs náleží v rámci GPCRs do třídy A, stejně jako odorantové receptory nebo receptory asociované se stopovými aminy (TAARs). Podobně jako u ORs, jde o membránové proteiny se 7 transmembránovými doménami, extracelulárním N koncem a intracelulárním C koncem a se specifickou expresí pouze jediného typu receptoru na sensorickém neuronu (Pierce et al. 2002). Obdobně jako zmíněné typy chemosenzorických receptorů, také vomeronasální receptory jsou kódovány jedním exonem (o délce ~900 bp) (Dulac & Axel 1995). Na aminokyselinové úrovni sdílí potkan a myš několik motivů společných 90 % těchto receptorů (Zhang et al. 2007). Obecné motivy platné univerzálně pro danou rodinu receptorů neznáme, což může být způsobeno například pro V1Rs typickými, druhově specifickými evolucioní duplikovanými geny, jejichž důsledkem je až 70% sekvenční identita v rámci jednoho druhu a pouze 15% identita mezi dvěma druhy (Fleischer et al. 2009). V1Rs geny se nachází (až na výjimky) v klastrech; u myši nalzáme geny pro V1R v 9 klastrech na chromosomech 1,4 a 7, zatímco chromosomey 14 a 17 obsahují pouze jediný V1R gen (Zhang et al. 2007).

Catherine Dulac a Richard Axel (1995), autoři první práce o V1Rs, odhadují na základě hybridizace cDNA s genomickou DNA repertoár v genomu potkana (*Rattus norvegicus*) na

30 až 40 V1R genů. Pozdější práce pracující s osekvenovanými genomy savců ukázaly přesnější a nutno dodat, zásadně vyšší počty V1R genů (Nei et al. 2008). Repertoár potkaních V1Rs se tak ukázal několikanásobně vyšší, když vykazuje 102 funkčních V1R genů. Myš (*Mus musculus*) ve svém genomu nosí až 240, vačice (*Monodelphis domestica*) 98 funkčních V1R genů (Nei et al. 2008; Young et al. 2010). Absolutním rekordmanem, nejen mezi savci *sensu lato*, je s 280 funkčními V1Rs geny ptakopysk podivný (*Ornithorhynchus anatinus*) (Grus et al. 2007), který tak ukazuje na možné bohaté využívání těchto receptorů ve svém semiakvatickém způsobu života. Oproti tomu, u delfína nenacházíme žádný funkční gen pro V1Rs a stejný stav odhalují také genomy netopýrů (Young et al. 2010). Lidé, ačkoliv v dospělosti postrádají vomeronasální orgán, si zachovávají až 5 funkčních V1R genů a podobné množství vykazují také genomy našich blízkých příbuzných (šimpanz, gorila, orangutan apod.) (Young et al. 2010). Menší počty V1Rs (~2-6) byly ale také detekovány v genomových a cDNA sekvencích ryb (Dukes et al. 2006; Nei et al. 2008) a plazů (Brykczynska et al. 2013). Ptáci, resp. genom kura domácího (*Gallus gallus*) nevykazuje funkční ani pseudogenizované geny V1R vůbec (Shi & Zhang 2007). Genom drápatky tropické (*Xenopus tropicalis*) obsahuje 21 V1Rs genů. Počty genů pro V1Rs částečně ukazují na vhodnost daného typu receptorů spíše pro terestrické prostředí, jelikož váží volatilní, těkavé látky (volatilní feromony) (Shi & Zhang 2007). Nicméně univerzálně platné pravidlo toto není. Ukazuje to například malý repertoár 1 až 2 genů V1Rs u plazů, kteří by podle zmíněné hypotézy i vzhledem k zásadní funkci Jacobsonova orgánu plazů, měli mít receptorů více (Brykczynska et al. 2013). Poměrně malý repertoár vomeronasálních receptorů u člověka a úzkonosích opic je připisován (většinově) ztrátě jejich funkce s rozvojem trichromatického vidění a s ním spojeným visuálním hodnocením okolí, včetně sociálního a sexuálního statutu jedinců stejného druhu (Zhang & Webb 2003).

## 2.2 Vomeronasální receptory skupiny 2 (V2R)

Vomeronasální receptory skupiny 2 (V2Rs) jsou další nezávisle vzniklou skupinou chemosenzorických receptorů. Byly popsány jako druhá skupina feromonálních receptorů vomeronasálního orgánu, kde jsou - na rozdíl od V1Rs - exprimovány v basální vrstvě sensorického neuroepitelu (Herrada & Dulac 1997). V2Rs se také od V1Rs liší podjednotkou G proteinu  $G\alpha_o$ , se kterou se spřahují (Herrada & Dulac 1997). V klasifikaci GPCRs náleží do relativně malé třídy C, která je specifická velmi dlouhými extracelulárními N-koncovými smyčkami, které se pravděpodobně účastní vazby ligandu, ale také dimerizace membránových proteinů (Pierce et al. 2002). Zatímco ORs, TAARs a V1Rs jsou kódovány jedním exonem,

V2Rs jsou kódovány několika exony. Stejně jako ostatní chemosenzorické receptory, i V2Rs jsou přítomny v klastrech na několika chromosomech (Fleischer et al. 2009).

V2Rs jsou jedinou skupinou chemosenzorických receptorů, jejíž zástupci jsou v genomech primátů (*Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Macaca mulatta*), psa (*Canis lupus familiaris*) a krávy (*Bos taurus*) pouze v nefunkčním, pseudogenizovaném stavu (Young & Trask 2007). Stejně jako skupinu V1Rs, ani V2Rs nenalzáme v genomu kura domácí ani v pseudogenizovaném stavu (Shi & Zhang 2007). Tradičně vysoký počet této skupiny receptorů nalzáme v genomech hlodavců, kteří vykazují 121 (*M. musculus*) a 79 (*R. norvegicus*) intaktních genů pro V2Rs. Vysoký počet 86 funkčních V2R genů si uchovává vačice krysí (*Monodelphis domestica*) (Young & Trask 2007). Funkční geny pro V2Rs nalzáme také u ryb, kde nalzáme: 44 genů u *Danio rerio*, 18 genů u *Takifugu rubripes* a 4 geny u *Tetraodon nigroviridis* (Shi & Zhang 2007). Nejvyšší známý počet potenciálně funkčních genů známe v genomu drápatky tropické (*Xenopus tropicalis*), která by mohla ve svých chemosenzorických orgánech přizpůsobených na vodní i na terestrické prostředí exprimovat až 249 V2Rs genů (Shi & Zhang 2007). Mohutná expanze V2Rs genů byla detekována u užovky červené (*Pantherophis guttatus*), u které s využitím transkriptomového sekvenování vomeronasálního orgánu, bylo nalezeno minimálně 116 V2Rs genů (Brykczynska et al. 2013). Stejná studie uvádí 37 V2R genů u anolise rudokrkého (*Anolis carolinensis*).

Zvláštní monofyletická podrodina C vomeronasálních receptorů skupiny 2, označovaná také jako V2R2 (nebo V2R<sub>2</sub>), je přítomna v genomech napříč třídami obratlovců (vyjma ptáků), byť často jen v pseudogenizovaném stavu (Young & Trask 2007; Brykczynska et al. 2013). Stejně jako v sensorických neuronech hlodavců, také u hadů byl pozorován specifický vzorec koexprese jediného V2Rs genu spolu s jedním genem podrodiny V2R2 (Silvotti et al. 2007; Brykczynska et al. 2013). Navíc, V2Rs často kolokalizují na dendritech sensorických neuronů také s proteiny skupiny MHC Ib, tzv M1 a M10, které jsou exprimovány pouze v basální vrstvě vomeronasálního orgánu. Je možné, že rodina M10 spolu s  $\beta$ -2 microglobulinem a vždy jedním z genů V2Rs tvoří na membráně sensorických neuronů basální vrstvy VNO proteinové komplexy (Loconto et al. 2003). Zda tyto komplexy přispívají nějakým způsobem k vazbě ligandu, nebo zda v případě některých V2Rs hraje roli potřeba molekuly M10 k transportu na membránu, či zda platí obě možnosti, nevíme (Dulac & Torello 2003; Silvotti et al. 2005; Fleischer et al. 2009).

### 2.3 Ligandy pro V1R a jevy spojené s jejich vazbou

Vomeronasální receptory obou typů byly nalezeny jako jeden z posledních článků řetězce feromonální komunikace. Autoři studie popisující tehdy novou rodinu předpokládaných feromonálních receptorů V1R již měli díky řadě studií, které také ve své práci citují, poměrně jasnou představu o funkci vomeronasálního orgánu (Dulac & Axel 1995 a reference tam uváděné). Věděli, že je zapojen zejména v instinktivních odpovědích na příjem feromonu, jakými je vyvolání stereotypního chování u příjemce (agrese nebo chování spojené s rozmnožováním), neuroendokrinních změn (indukce puberty a estru samic v přítomnosti samce), a že je spojen se senzoričkou evaluací fenotypu druhého jedince a může také hrát zásadní roli při speciaci a tvorbě mezidruhových bariér (Keverne 2002; Chamero et al. 2012).

Jakou chemickou povahu však mají ligandy pro V1Rs? Jedná se většinou o malé, volatilní organické molekuly obsažené v moči hlodavců (2,5-dimetylpyrazin, 2-heptanon, 6-hydroxy-6-metyl-3-heptanon a nebo 2,3-dehydro-exo-brevicomín) nebo ve výměšcích prepuciálních slinných žláz ( $\alpha$ - a  $\beta$ -farnesen) (Leinders-Zufall et al. 2000). Jako možné ligandy pro V1Rs jsou rovněž diskutovány sulfatované steroidy, které by mohly přispívat k rozpoznání fyziologického statusu jedinců stejného druhu, jejich hormonálního vyladění a například hladiny stresu (Chamero et al. 2012). Jelikož jde o látky špatně rozpustné ve vodě, jsou často přenášeny uvnitř proteinů. To je i případ 2-*sec*-butyl-4,5-dihydrothiazolu, který spouští samčí agresivitu (více v kapitole 2.4).

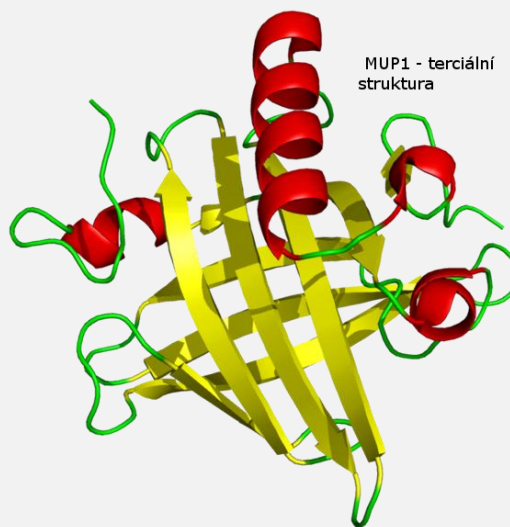
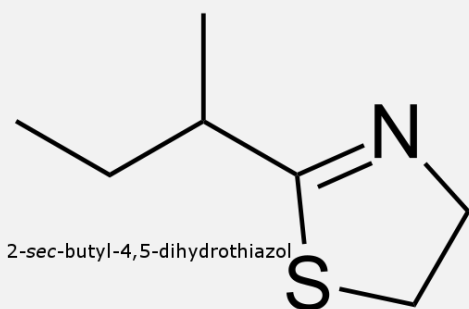
Měření akčních potenciálů na membráně vomeronasálních senzoričkových neuronů (VSNs) vyvolaných aktivací receptoru po vazbě ligandu ukazují, že oproti olfaktorickým receptorům jsou V1Rs vysoce selektivní a také, co do koncentrace ligandů, vysoce sensitivní (jedny z nejsensitivnějších chemoreceptorů vůbec) (Leinders-Zufall et al. 2000). Autoři studie tak na základě těchto poznatků předpovídají, že nedochází k překryvu vazebných specifit jednotlivých receptorů, jaký nalzáme u ORs, a že na daný ligand odpovídají pouze vomeronasální senzoričkové neurony s konkrétním V1Rs (Leinders-Zufall et al. 2000). Opačný závěr ale ukazuje exprese 5 funkčních lidských V1Rs receptorů na HeLa buňkách, kde jednotlivé receptory váží 19-140 ligandů (C9 a C10 alifatické alkoholy a aldehydy). V1Rs lidí tak vykazují značný překryv ve vazebné specifitě a tedy i pravděpodobné kombinatorní kódování daného ligandu (Shirokova et al. 2008). Vzhledem k tomuto závěru a k expresi V1Rs pouze v neuronech hlavního čichového epitelu (absence VNO u lidí) (Rodriguez et al. 2000), lze předpokládat, že lidské V1Rs fungují spíše jako odorantové receptory, než jako



receptory feromonální (Shirokova et al. 2008). Tomu odpovídá i spřažení lidských V1Rs s podjednotkou heterotrimerického G proteinu  $G\alpha_{olf}$ , kterou hojně využívají právě ORs (Shirokova et al. 2008). Oproti tomu, V1Rs hlodavců jsou spřaženy pravděpodobně s  $G\alpha_2$  a dalšími (Dulac & Axel 1995; Fleischer et al. 2009). Rovněž kanál *TRPC2*, specifický pro V1R signalizaci, je v genomu člověka v nefunkčním stavu (Young & Trask 2007) a podporuje tak výše uvedenou hypotézu.

### BOX 5 Feromony

Téměř stejně dlouho, jako existuje fenomén feromonální komunikace se diskutuje nad tím, co vlastně jsou „feromony“ a co už jsou odoranty. Často citovanou definici feromonu navrhli Karlson & Lüscher (1959), kdy pod pojmem „feromon“ označují „substanci vypouštěnou jedincem daného druhu, která vyvolává určité stereotypní chování a/nebo endokrinnologickou odpověď v dalších jedincích stejného druhu“. Touhara & Voshall (2009) navrhuje rozšíření této definice na substance, které jsou užívané pro vnitrodruhovou komunikaci, ať vyvolávají behaviorální či fyziologické změny, nebo ne. Další autoři (více Brechbühl et al 2009) však užívají termín „alarm pheromones“, což mohou být látky produkované jedinci stejného, ale i jiného druhu (typicky predátorem, viz box Stopové aminy) a vyvolávají změny v chování (např. disperze) i fyziologii příjemce (vyšší hladina adrenalinu apod.).



Obrázky chemických molekul: wikipedia.org

## 2.4 Ligandy pro V2R a jevy spojené s jejich vazbou

V předchozí kapitole věnované ligandům receptorů V1Rs jsem uvedl, že V1Rs detekují zejména volatilní látky, často obsažené v moči hlodavců. Takové látky jsou často přenášeny v tělních kapalinách a vynášeny z těla pomocí lipokalinů, proteinové rodiny s typickou terciální strukturou (8vláknový beta barel) (Stopkova et al. 2009). Primární funkcí takových proteinů byla a je internalizace různých látek a následný export do lysozomu nebo ven z těla a jedná se tak o funkci výrazně spojenou s imunitními a fyziologickými mechanismy (nejen)

živočichů. Zaměřme se na lipokaliny hojně obsažené v moči (MUP, z *angl.* Major Urinary Proteins), slinách (OBP, z *angl.* Odorant Binding Proteins) nebo slzách (ESP z *angl.* Exocrine Secretary Proteins) zvířete, tedy víceméně v sekretech dostupných dalším jedincům stejného i cizího druhu. Je nasnadě, že takové molekuly mohou podlehnout dalšímu kolu evoluce a představovat např. jednak pasivní nástroj pro udržení teritoria (postupné praskání MUP a uvolňování volatilních informačních molekul), ideální nástroj pro přenos a ochranu snadno degradovatelných molekul s feromonální funkcí (Stopkova et al. 2009) nebo se konečně mohou samotné stát feromony či indikátory sociálního nebo zdravotního stavu (Chamero et al. 2007).

Je znám příklad 2-*sec*-butyl-4,5-dihydrothiazolu, který je přenášen hlavními močovými proteiny (MUP) a u samců myši (*M. musculus*) spouští agresivní chování. Při separaci této volatilní látky bylo ukázáno, že interaguje pouze se subpopulací apikálních sensorických neuronů exprimujících V1Rs a že samotná volatilní látka vyvolává silnou behaviorální odpověď. Překvapením však bylo, že stejně silnou behaviorální odpověď vyvolávají samotné purifikované proteiny MUP a to jedině přes populaci basálních sensorických neuronů exprimujících V2R (Chamero et al. 2007). Dnes již notoricky známým příkladem feromonu spouštějícího sexuální chování u samců křečka je afrodisin, odorant vazebný protein (OBP) přítomný ve vaginálním sekretu samic křečka (Singer et al. 1986).

Dalšími ligandy V2Rs jsou zřejmě peptidy, často přítomné mj. v sekretech různých žláz faciální oblasti. Známým případem je ESP1 (zkratka z *angl.* „Exocrine gland secretory peptide“), který je obsažen v sekretech slzných žláz samců myši (Kimoto et al. 2005). Jedná se o peptid o velikosti ~7 kDa, který je deponován do faciální oblasti myšního samce, odkud se dostává do vomeronasálního orgánu samic a tam aktivuje signalizaci sensorických neuronů exprimujících V2Rs (V2Rp5) (Kimoto et al. 2005; Haga et al. 2010). Tyto neurony následně spouští neurální dráhy zahrnující amygdaloidní a hypothalamická jádra a vedou k výslednému zvýšení sexuální receptivity samic (Haga et al. 2010). Faciální oblast je častým místem zájmu při sociálních interakcích jedinců stejného druhu a je proto pravděpodobné, že právě při těchto interakcích dochází poměrně snadno k čichové evaluaci druhého jedince. V takovém kontextu nepřekvapí přítomnost dalších 23 peptidů rodiny ESP v sekretech extraorbitální lakrimální žlázy, Harderianovy žlázy či podčelistní mandibulární slinné žlázy (Kimoto et al. 2005). Sexuálně specifická exprese těchto peptidů u myši byla popsána i v dalších studiích a zde také byla pozorována i specifická exprese u jednotlivých myších kmenů (Kimoto et al. 2007). Že peptidy fungují jako feromony ovlivňující receptivitu samic nejen savců ukazují

např. studie mločků (*Plethodon jordani* a *P. shermani*) (Rollmann et al. 1999; Houck et al. 2007).

V předchozích případech jsem ukázal peptidové či proteinové feromony, tedy látky ovlivňující chování a fyziologii jedinců stejného druhu (Více v BOX 5). Existují však látky umožňující individuální rozpoznávání jedinců? Podle některých studií ano, lákavými adepty na takovou funkci jsou krátké peptidy (8-9 aminokyselin) vázané molekulami hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) 1. třídy (Leinders-Zufall et al. 2004). Molekuly MHC 1 třídy jsou známé molekuly, které na povrch buněk vystavují krátké peptidy vznikající proteolytickou degradací uvnitř buněk. Vazebné žlábký MHC molekul 1 třídy se liší, jelikož jsou „obrazem“ alelických variant daného genu, a tedy i váží odlišné peptidy. Peptidy, které daná MHC molekula váže, tak vlastně představují zrcadlový obraz strukturního uspořádání vazebného žlábký a tedy i genetického polymorfismu (Leinders-Zufall et al. 2004; Boehm & Frank Zufall 2006; Kelliher 2007). Objev byl popsán díky působení peptidů jako ligandů pro myši vomeronasální senzorké neurony s exprimovanými V2Rs (Leinders-Zufall et al. 2004). Ukázalo se, že právě tyto peptidy obsažené v moči způsobují potraty u gravidních samic myši (efekt Bruceové), pokud pochází ze samici neznámých samců. Stejný efekt vyvolá i moč familiárního samce, do které jsou přidány purifikované peptidové ligandy pro MHC 1. třídy ze samce neznámého (Leinders-Zufall et al. 2004). Peptidové ligandy pro MHC molekuly 1. třídy zřejmě hrají roli také v individuálním rozpoznávání ryb (*Gasterosteus aculeatus*) (Boehm & Zufall 2006; Kelliher 2007). Také samice ještěrky obecné (*Lacerta agilis*) vykazuje preferenční páření se samci s odlišným MHC genotypem (Houck 2009), což jen dále ukazuje, že individuální rozpoznávání pomocí MHC peptidů může být široce rozšířeným jevem.

## **2.5 Ektopická exprese vomeronasálních receptorů**

Vomeronasální receptory nalézáme pouze v chemosenzorkých tkáních, v naprosté většině pouze ve vomeronasálním orgánu. U skupiny V1Rs tvoří výjimku receptory lidí (a tedy asi i primátů), které jsou exprimovány v hlavním čichovém epitelu (Rodriguez et al. 2000). Jediný zástupce V2Rs (V2r83), byl detekován v Grüenebergovu gangliu myši (Fleischer et al. 2006). Vomeronasální receptory nalézáme také v olfaktorickém epitelu kozy (Wakabayashi et al. 2002). Ve všech těchto případech se však jedná pouze o alternativní expresi v dalším olfaktorickém orgánu.

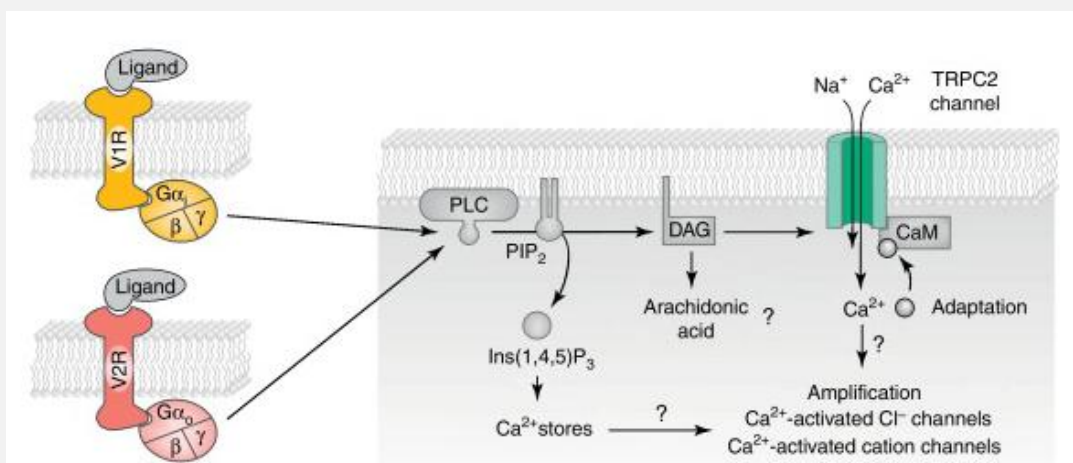
Feromonální receptory V1Rs však byly také nalezeny v testes myši (Tatsura et al. 2001), následně také v testes kozy (Wakabayashi et al. 2002). Tatsura et al. identifikovali 9 odlišných V1R genů v testes a následně provedli *in situ* hybridizaci s mRNA na koronálním řezu semenotvornými kanálky. Tímto způsobem lokalizovali transkripty dvou vomeronasálních receptorů (označovaných TVR2 a TVR7) pouze v kulatých a elongovaných spermatidách. Při užití stejných riboprób ukázali, že dané receptory jsou exprimovány také v apikální vrstvě vomeronasálního orgánu.

Ektopická exprese V2Rs v testes zatím zřejmě nebyla popsána, alespoň mně není taková studie známa. Je možné, že přicházíme s objevem exprese V2Rs v testes a v jednotlivých stádiích spermatogeneze jako první.

### BOX 6 Signální transdukcce vomeronasálních receptorů

**V1Rs** jsou exprimovány ve vomeronasálních **senzorických neuronech apikální vrstvy**. V těchto neuronech se obvykle spřahují s  $G\alpha_{i2}$  podjednotkou heterotrimerického G proteinu. **V sensorických neuronech basální vrstvy** jsou exprimovány **V2Rs**, které se spřahují s  $G\alpha_o$ . Po navázání feromonu dochází ke konformační změně receptoru. Tato konformační změna aktivuje G podjednotky heterotrimerických G proteinů a dochází tak k aktivaci signalizační kaskády a následnému vzniku akčního potenciálu, díky kterému se na membráně neuronů nese informace o navázání ligandu (feromonu) ve vomeronasálním orgánu až do **přídavných olfaktorických bulbů** (dále AOB). Informace **z neuronů apikální vrstvy** se dostává **do anteriorní poloviny AOB**, zatímco **neurony basální vrstvy** vedou informaci do **posteriorní poloviny AOB**. Z obou polovin jsou informace nadále oddělené vedeny do distinktních regionů **amygdaly**.

Signalizační kaskáda obou typů vomeronasálních receptorů vedoucí ke vzniku akčního potenciálu není podrobně známa. Pravděpodobné složky ukazuje obrázek. Konformační změnou receptorů (V1Rs a V2R) dochází k aktivaci heterotrimerických G proteinových podjednotek (disociace na  $G\alpha_i$  a  $G\beta\gamma$ ), které aktivují fosfolipázu C (PLC). **Fosfolipáza C** štěpí membránové lipidy za vzniku **inositol-1,4,5-trifosfátu (Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>)** a **diacylglycerolu (DAG)**. DAG dále aktivuje **iontový kanál TRPC2** („Transient receptor potential canonical ion-channel 2“), který se otevře a vpouští extracelulární  $Ca^{2+}$  do cytosolu buňky. Na **zvýšení intracelulární koncentrace  $Ca^{2+}$**  participuje také vzniklý IP<sub>3</sub> (uvolnění  $Ca^{2+}$  nitrobuněčných zásob do cytosolu). Dochází k otevření  $Cl^-$  kanálů a **vzniká a šíří se akční potenciál**. (Literatura: Munger 2009, Chamero et al. 2012; obrázek: Chamero et al. 2012).



### 3 TAARs, receptory asociované se stopovými aminy

#### 3.1 Úvod do TAARs

Receptory asociované se stopovými aminy (TAAR, z *angl.* Trace Amine-Associated Receptors) jsou poměrně nedávno objevenou rodinou transmembránových GPCRs (Lindemann et al. 2005). Jedná se o proteiny se sedmi transmembránovými úseky, extracelulárním N koncem a intracelulárním C koncem. TAARs představují koherentní linii spadající (stejně jako ORs a VNRs) do „superrodiny“ rhodopsinových receptorů. Všechny savčí TAARs sdílí peptidový motiv (NSXXNPXX[YH]XXX[ZF]XWF) přítomný na 7 TM doméně a (vyjma TAAR2) jsou kódovány 1 exonem o délce ~1000 bp (Lindemann et al. 2005). Rodina TAARs byla utvářena liniově specifickými duplikacemi jednotlivých genů, což se odráží i na přítomnosti těchto genů v klastrech. Zatímco u savčích druhů TAARs tvoří jediný klastr na jednom z chromosomů (Gloriam et al. 2005; Lindemann et al. 2005), u paprskoploutvých ryb jsou přítomny geny pro TAARs minimálně na dvou chromosomech, což je způsobeno zřejmě celogenomovou duplikací (Gloriam et al. 2005; Hashiguchi & Nishida 2007). Rybí genomy vykazují také vyšší počet funkčních genů pro TAARs (*Danio rerio* 109, *Gasterosteus aculeatus* 49, *Oryzias latipes* 25) ve srovnání se savci (*Monodelphis domestica* 22, *Mus musculus* 15, *Homo sapiens* 5) nebo s ptáky a žábami (*Gallus gallus* 3, *Xenopus tropicalis* 6) (Gloriam et al. 2005; Hashiguchi & Nishida 2007; Mueller et al. 2008).

#### 3.2 TAARs a jejich ligandy

První zástupci (TAAR1 a TAAR2) byli identifikováni jako receptory vázající stopové aminy, což jim také dalo název (Borowsky et al. 2001; Buzow et al. 2001; Lindemann et al. 2005). Stopové aminy (p-tyramin,  $\beta$ - fenyletylamin, tryptamin atd.) jsou endogenní látky centrální nervové soustavy savců, které jsou příbuzné biogenním aminům (adrenalin, noradrenalin, dopamin, serotonin atd.), kolokalizují s nimi v neuronech a jejich syntetické i degradační dráhy se překrývají. Název získaly podle stopového množství (0,1-10 nM), ve kterém se v nervové soustavě vyskytují (Zucchi et al. 2006). Jelikož jsou tyto látky spojovány s neurologickými problémy jako je deprese a schizofrenie, objev prvních zástupců TAARs (potenciálních farmakologických cílů), které výrazně odpovídají na vazbu stopových aminů, přivola velkou pozornost (Buzow et al. 2001; Borowsky et al. 2001; Zucchi et al. 2006). Druhou vlnu zájmu na rodinu TAARs strhla Linda Buck spolu se Stephenem Liberlesem (2006), kteří TAARs označují jako druhou třídu chemosenzorických receptorů exprimovaných v hlavním čichovém epitelu myši domácí (*Mus musculus*). Stejní autoři

ukazují, že všechny myší *Taar* geny (vyjma *Taar1*) jsou exprimovány v olfaktorických sensorických neuronech a to v podobné míře jako ORs a podle stejného pravidla „jeden neuron - jeden receptor“ (Liberles & Buck 2006). TAARs mohou zřejmě využívat  $G_{\alpha_{olf}}$  nebo  $G_i$  a předávat signál stejnou cestou, jakou využívají ORs a VNRs (Liberles & Buck 2006; Fleischer et al. 2007). Jak shrnuje Liberles (2009), většina TAARs váže některé z aminů, ať už biogenních či stopových, a to napříč třídami obratlovců. Na základě exprese v olfaktorických orgánech, znalosti ligandů pro TAARs či na základě poznatků o přítomnosti biogenních a stopových aminů v moči můžeme usuzovat, že TAARs mohou hrát důležitou roli v sociální a/nebo sexuální komunikaci obratlovců (Liberles & Buck 2006; Fleischer et al. 2007; Hashiguchi & Nishida 2007; Mueller et al. 2008; Wallrabenstein et al. 2013). Jako podporu takové hypotézy uvádím příklad receptorů TAAR5 a TAAR4. Myší receptor TAAR5 je silně aktivován močí myších samců, kteří však musí dosáhnout alespoň věku puberty (Liberles & Buck 2006). Puberta a adultní věk samců myši jsou doprovázeny vyšší hladinou trimetylaminu v moči (oproti samicím) a právě trimetylamin je zřejmě agonistou receptoru TAAR5 (Liberles & Buck 2006). Toto potvrzuje ostatně i nová studie prováděná na lidském orthologu TAAR5, který rovněž nejsilněji odpovídá na vazbu trimetylaminu a stejně jako v případě myši či potkana je exprimován v MOE (Wallrabenstein et al. 2013). Hledání *Taar* genů v genomu kura domácího (*Gallus gallus*) ukazuje na možnou paralelu napříč dvěma třídami (savci a ptáci). U kura byly nalezeny sice pouze 3 funkční geny pro TAARs, mezi nimi je však právě ptačí ortholog myšího genu *Taar5* (Mueller et al. 2008). Autoři zároveň připomínají studii (Robacker et al. 2000) odhalující přítomnost trimetylaminu ve výkalech husičky podzimní *Dendrocygna autumnalis*.

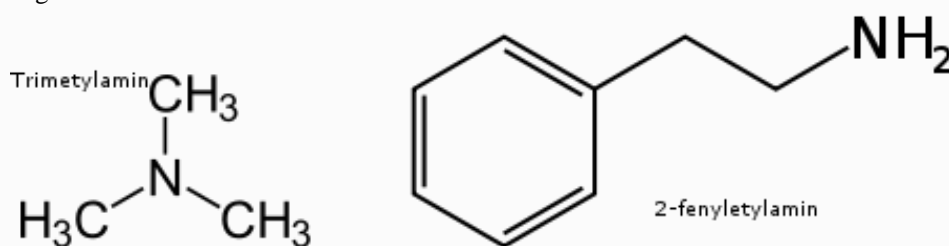
Druhým příkladem je stopový amin  $\beta$ -fenyletylamin, který spouští signalizační kaskádu TAAR4. Jedná se o významnou látku, která je obsažena ve výkalech šelem v podstatně zvýšené míře ve srovnání s jejich kořistí (hlodavci, herbivoři atd.) (Ferrero et al. 2011).  $\beta$ -fenyletylamin je rovněž ve zvýšené míře obsažen v moči stresovaných zvířat a lidí a u lidí je také spojen s depresemi nebo nedostatkem pozornosti způsobené hyperaktivitou (Zucchi et al. 2006; Wallrabenstein et al. 2013). V uvedeném kontextu není překvapením, že oba zmíněné receptory (TAAR4 a TAAR5) jsou exprimovány kromě MOE také v olfaktorických sensorických neuronech Grünebergova ganglia (Fleischer et al. 2007), orgánu s potenciální funkcí detekce tzv. „Alarm“ feromonů a kairomonů (Brechtbühl et al. 2008). Role TAARs se tedy zřejmě neomezuje jen na vnitrodruhovou komunikaci, ale může hrát zásadní roli při detekci jiných druhů.

Zásadní roli mohou představovat TAARs exprimované v Grüenebergovu gangliu myši (*M. musculus*) a potkanů (*Rattus norvegicus*). Bylo ukázáno, že u myši a potkana je počet olfaktorických sensorických neuronů (OSNs) exprimujících právě TAARs nejvyšší před nebo těsně po narození, a že v průběhu života se počet takovýchto OSN exprimujících TAARs dramaticky (o ~63 %) zmenší (Fleischer et al. 2007). Autoři stejné studie předpokládají, že by určité “vyladění“ zmíněného orgánu, typické pro daný věk, mohlo souviset s interakcí mláděte s matkou a indukovat u mláďat například sání nebo filiální imprinting (Fleischer et al. 2007). V souladu s tím uvádějí, že počet OSNs obecně v Grüenebergovu gangliu také klesne, ale jen o 12%. To může ukazovat na jinou funkci daného orgánu v dospělosti.

### BOX 7 Stopové aminy

Stopové aminy jsou molekuly tvořené z aromatických aminokyselin. Svou strukturou se podobají biogenním aminům, jako jsou adrenalin a noradrenalin (vznikající z tyrosinu), serotonin (vznikající z tryptofanu) nebo histamin (vznikající z histidinu). Zatímco u bezobratlých představují stopové aminy hlavní neurotransmitery, v centrální nervové soustavě savců představují ~1 % koncentrace biogenních aminů. Produkovány jsou také v bakteriích, houbách a rostlinách a přítomny jsou i v jídle (čokoláda, sýr) nebo v červeném víně. Podání jídla bohatého na stopové aminy a na inhibitor monoaminoxidázy (enzym degradující stopové aminy) u lidí vede k řadě etologických jevů jako je zvýšená ostražitost, podrážděnost, nespavost, snížený apetit nebo na druhou stranu euforie. Řada jevů byla pozorována rovněž na fyziologické úrovni (zvýšení neurálních odpovědí na dopamin a noradrenalin, a další).

V textu zmíněný  $\beta$ -fenyletylamin u potkanů např. snižuje sekreci prolaktinu. Potkan a myš v behaviorálních experimentech vykazují aktivní snahu vyhnout se místům s vysokou koncentrací tohoto kairomonu, např. moči šelem. Pro šelmy, zejména kočkovité, daná látka může naopak představovat sexuální či sociální informační molekulu. Podobně, trimethylamin je diskutován jako sexuální feromon hlodavců, zatímco lidé mají jeho pach spojen s chorobami (např. vaginální choroby) a hnilobou rybiho masa. Nicméně je také ve vyšší míře nalézán v moči např. menstrujících žen a jeho hladina v moči je zřejmě ovlivňována sexuálními hormony. Užitá literatura: Zucchi et al. 2006, Ferrero et al. 2011, Wallrabenstein et al. 2013; obrázky: wikipedia.org



### 3.3 Tkáňová exprese TAARs

TAARs vykazují expresi také v jiných, než jen ve výše uvedených chemosenzorických tkáních savců a ryb (OE, GG, u ryb také ret) (Hashiguchi & Nishida 2007). U savců byly detekovány v mnoha tkáních (mozek, žaludek, amygdala, ledviny, plíce, tenké střevo, játra, žlučník). TAAR1 nebyl nikdy lokalizován v MOE ani v Grüenebergovu gangliu a patrně hraje roli v mozku savců (Zucchi et al. 2006).

V této práci ukazují, že TAARs jsou exprimované ve varlatech a v jednotlivých stádiích spermatogeneze myšic (*Apodemus microps* a *A. sylvaticus*). Dle dostupné literatury, v čase tvorby této diplomové práce na tuto skutečnost upozorňujeme jako první.



## Materiály a metody

### 4 Příprava cDNA vzorku pro 454 sekvenaci

Během všech následujících kroků jsme pečlivě dbali na sterilitu práce, používali jsme pouze špičky s dvojitým filtrem (Eppendorf) a plastové sterilní mikroskopické kumavky (Eppendorf). Pracovali jsme na místě určeném pro práci s RNA a vždy nosili a vhodně měnili latexové rukavice.

#### 4.1 Biologický materiál

Tkáně pro RNA jsme odebrali dvěma dospělým samcům druhů *Apodemus sylvaticus* a *Apodemus microps*, kteří byli F1 generací jedinců odchycených z lokality Drnholec a Ječmeniště (Jihomoravský kraj, okres Břeclav). Oba samci byli chováni ve stejných podmínkách se světelným režimem 12-12 a s přístupem k potravě *ad libitum*.

#### 4.2 Odběr vzorku a homogenizace tkáně

Před samotným odběrem tkání (testes, vomeronasální orgán a hlavní čichový epitel) jsme připravili a sterilizovali pomocí RNaseZAP (Sigma-Aldrich) pracovní prostor a nástroje. Do 2ml homogenizačních mikroskopických kumavek s MagNA Lyser Green Beads (Roche) jsme přidali 600µl směsi RLT pufru (RNeasy Mini Kit, Qiagen) a β-mercaptoetanolu (Sigma-Aldrich) v poměru 10µl β-ME na 1ml RLT.

Práci s tkáněmi jsme prováděli na skleněné podložce obalené aluminiovou fólií očištěnou RNaseZAP (Sigma-Aldrich), která byla navíc umístěna na ledu. Toto opatření zabraňovalo degradaci RNA ribonukleázami z okolí (např. lidská kůže je silný zdroj ribonukleáz) a zpomalilo degradaci RNA v tkáních během práce s nimi. Jako výhodné se ukázalo pracovat v týmu alespoň 3 lidí, což při vhodném rozdělení rolí umožnilo odebrat a zhomogenizovat všechny tkáně (vyjma zde uváděných jsme odebrali všechny typy slinných žláz, vzorek jaterní tkáně a sleziny) do cca 5 minut od usmrcení zvířete. Kombinace rychlého odběru tkání a stabilizace jejich RNA (nejlépe v homogenizované tkáni) se ukázala při práci s druhem *Apodemus sylvaticus* jako naprosto zásadní.

Ihned po usmrcení samce cervikální dislokací jsme odebrali obě testes (bez epididymis). Nůžkami jsme nastříhli testikulární obaly a vymačkali parenchymatickou část. Protože jde o tkáň velkého objemu a hmotnosti, bylo nutné parenchymatickou část rozdělit na díly o

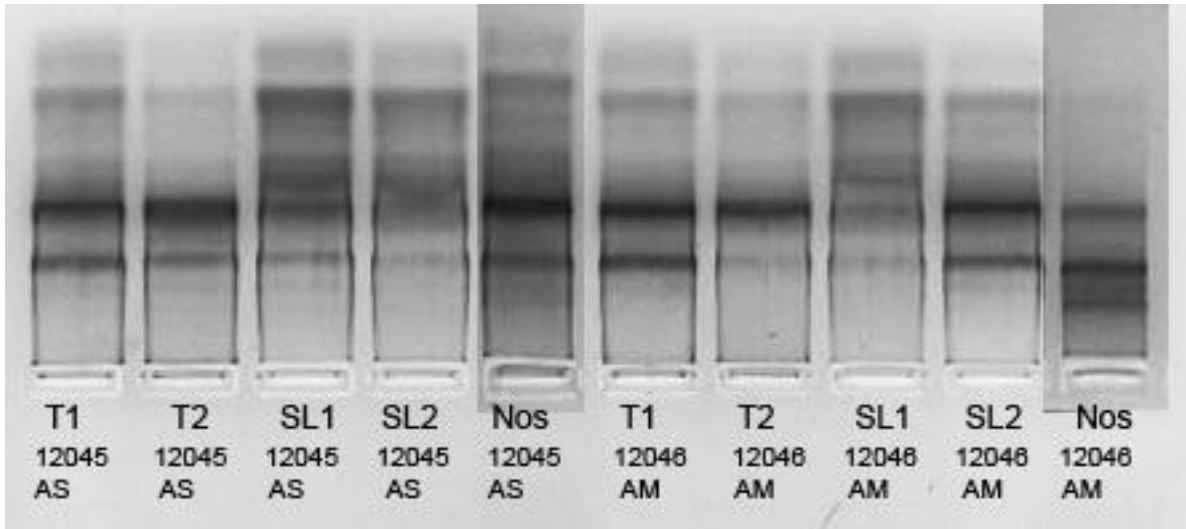
maximální váze 25 mg. Díly jsme ihned vložili do homogenizačních mikrokumavek a nechali 40 s homogenizovat v MagNA Lyser (Roche) homogenizátoru při rychlosti 7000 ot · min<sup>-1</sup>. V čase práce s testes jsme odebrali vomeronasální orgán a hlavní čichový epitel a zmrazili tekutým dusíkem. Do připravené homogenizační mikrokumavky jsme vložili vomeronasální orgán spolu s čichovým epitelem. Následně jsme homogenizační mikrokumavky vložili do MagNA Lyser homogenizátoru a při rychlosti 7000 ot · min<sup>-1</sup> homogenizovali po dobu 40 s.

### **4.3 Izolace RNA**

RNA z homogenizačních mikrokumavek byla izolována pomocí RNeasy Mini Kit (Qiagen) a bylo postupováno podle standardního protokolu pro živočišné tkáně. Metoda využívá selektivní vazby RNA všech typů o délce >200 bp na silikátovou membránu. Můžeme takto izolovat až 100 µg RNA, která je navíc zbavena RNA kratších 200 bazí (včetně tRNA, 5,8S a 5S rRNA). Poslední krok, eluci RNA z membrány do 1,5ml sběrné mikrokumavky jsem provedl v případě testes pomocí 50 µl NF-H<sub>2</sub>O („nuclease-free“ voda, Ambion), v případě směsného vzorku z olfaktorického a vomeronasálního orgánu pomocí 30µl NF-H<sub>2</sub>O.

### **4.4 Kontrola a měření kvality a koncentrace RNA**

Kvalitu (integritu) a koncentraci RNA jsme ověřili dvěma způsoby. Prvním byla klasická gelová elektroforéza (AGE) a změření koncentrací a čistoty roztoku RNA pomocí NanoDrop ND-1000; druhým způsobem bylo měření integrity (RIN) pomocí přístroje Agilent 2100 Bioanalyzer a kitu Agilent RNA 6000 Nano (dle standardního protokolu). Na základě těchto měření jsme vybrali pro další kroky vedoucí k sekvenaci transkriptomu vzorky AS 12045 T2, AS 12045 NOS a AM 12046 T2 a AM 12046 NOS (AS – *Apodemus sylvaticus*, AM – *Apodemus microps*, 12045 a 12046 číselné označení jedince, T2 – jedna z páru testes, NOS – směsný vzorek hlavního olfaktorického epitelu a vomeronasálního orgánu). Kvalita i čistota našich vzorků RNA se ukázala jako velmi dobrá nezávisle na užití metodě (viz Obrázek 1, 2 a Tabulka 1), což je důležitý předpoklad k úspěšné sekvenaci transkriptomu.



**Obrázek 1** Gelová elektroforéza RNA

AS - *Apodemus sylvaticus*, AM - *Apodemus microps*; 12045, 12046 – individuální značení jedinců; Nos-směsný vzorek hlavního čichového epitelu a vomeronasálního orgánu; T-testes, SL-slinné žlázy. Testes a slinné žlázy jsou párové a byly odebírány a RNA z nich izolována jednotlivě, proto značeny T1/T2 či SL1/SL2.

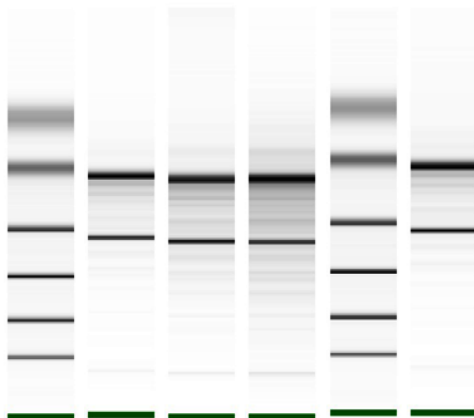
Pro další práci s RNA (RT-PCR a normalizace cDNA) a následnou sekvenací jsme vybrali vzorky tkání (T2, NOS) jedinců AS 12045 a AM 12046.

Druh	Individuum	Tkáň	A260/280	A260/230	Koncentrace (ng/μl)	RIN
<i>Apodemus sylvaticus</i>	12045	Testes T2	2,16	2,04	1358	9,50
		Nos	2,15	2,10	810	8,80
<i>Apodemus microps</i>	12046	Testes T2	2,18	2,24	1116	9,60
		Nos	2,12	2,16	189	8,00

**Tabulka 1** Vlastnosti RNA

Poměry A260/230 a A260/280 získány pomocí měření přístrojem NanoDrop ND-1000; v případě čistoty RNA by měla být hodnota A260/280 v rozmezí 1,8-2,2 a hodnota A260/230 vyšší než 1,8.

Hodnoty RIN (RNA integrity number) získány pomocí měření na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer. RIN by se mělo co možná nejvíce blížit hodnotě 10, která značí absolutně intaktní (nedegradovanou) RNA. Hodnota RIN = 5 indikuje částečně degradovanou RNA, RIN = 1 degradovanou RNA.



**Obrázek 2** Virtuální gelová elektroforéza RNA testes a NOS obou druhů, vzniklý pomocí Agilent Bioanalyzer a programu 2100 Expert. Obrázek obsahuje také 2 sloupce žebříků, které odpovídají užití 2 mikročipů (1. pro AS T2, AS NOS a AM NOS, 2. pro AM T2). Legenda k názvům: viz Obrázek 1. Všechny vzorky obsahují 2 výrazné pruhy, které odpovídají malé (18S) a velké (28S) ribozomální jednotce.

## 4.5 Reverzní transkripce

Přepis mRNA do cDNA a její amplifikaci jsme provedli pomocí SMARTer PCR cDNA Synthesis Kit a Advantage 2 Polymerase Kit (Clontech). Metoda využívá CDS primeru, který je komplementární k polyA koncům mRNA a dochází tak ke specifickému přepisu mRNA při užití celkové RNA buňky. Po syntéze prvního cDNA vlákna přidá terminální transferázová aktivita reverzní transkriptázy ke 3'konci syntetizovaného cDNA vlákna navíc určitý oligonukleotidový úsek. Transkriptáza provádí daný krok preferenčně po přepisu celé sekvence mRNA do cDNA a "označí" tak taková cDNA vlákna. V následné amplifikaci cDNA pomocí „nested“ PCR díky tomu nebude docházet k exponenciální amplifikaci krátkých cDNA vláken, která vznikají předčasnou terminací transkripce. Tento jev je častým problémem reverzních transkriptáz a vede k menšímu zastoupení sekvencí blízkých 5' konci transkriptů. „Nested“ PCR, využívá známých sekvencí na obou koncích vláken cDNA, které jsou dány užitím CDS primeru a oligonukleotidového konce přidávaného reverzní transkriptázou. Díky tomu dochází k exponenciální amplifikaci pouze těch vláken, která obsahují oba konce.

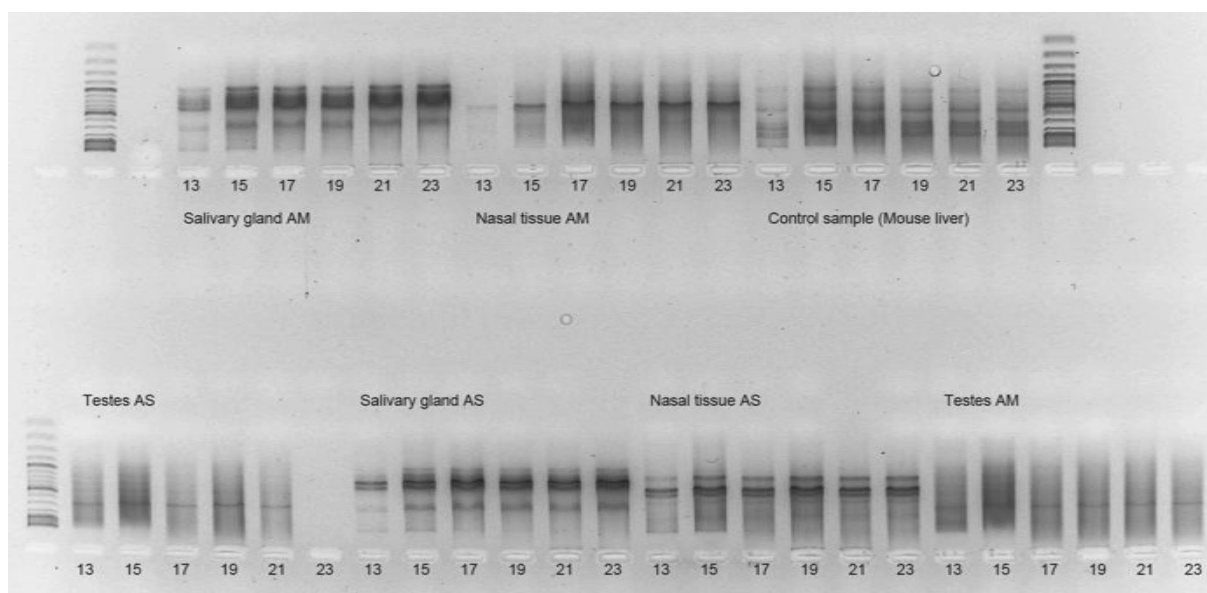
Výhodou SMARTer kitu je také jeho kompatibilita s normalizačním kitem Trimmer-2 cDNA Normalization Kit (Evrogen). Právě kvůli optimálnímu průběhu normalizace bylo nutné postupovat dle protokolu normalizačního kitu (Appendix A), navíc s užitím modifikovaného CDS primeru (5'-AGCAGTGGTATCAACGCAGAGTTTTGTGTTTTTCTTTTTTTTTVN-3') a amplifikačního kitu Advantage 2 Polymerase Kit (Clontech). Získali jsme první vlákno cDNA a ihned přistoupili k dalšímu kroku.

## 4.6 cDNA amplifikace

Amplifikaci cDNA jsme provedli podle protokolu Trimmer-2 Normalization kitu (Appendix A), nicméně místo uváděného Encyclo PCR kitu (Evrogen) jsme užili Advantage 2 PCR kit (Clontech). Tento kit je jednak vhodný k přípravě cDNA k normalizaci, jednak obsahuje vhodnou polymerázu pro přesnou amplifikaci kompletních cDNA sekvencí při long-distance PCR (LD PCR).

Součástí protokolu je **optimalizace počtu PCR cyklů pro amplifikaci cDNA**. Tato poměrně pracná metoda přispívá k přesnosti amplifikace celých úseků cDNA tím, že umožní zvolit optimální počet PCR cyklů pro konkrétní tkáň tak, aby cDNA byla v ideální koncentraci při minimálním množství chyb. Odebírali jsme postupně 5 µl PCR produktů v 13., 15., 17., 19., 21. a 24. cyklu PCR a následnou elektroforetickou analýzou na 1.5% gelu jsme

určili optimální počet cyklů (Obrázek 3). Optimální počet cyklů PCR se na gelu jeví jako stav, kdy abundantní transkripty tvoří středně silné pruhy (relativně k pruhům 1kb žebříku), které by měly být co možná nejostřejší. Pokud se pruhy abundantních transkriptů jeví jako rozmazané, jde pravděpodobně o příliš velké množství PCR cyklů. Pokud nejsou pruhy jasně viditelné, jde pravděpodobně o příliš malý počet PCR cyklů. My jsme optimální počet určili jako takový, kdy pruhy byly nejjasnější a přesto stále ostré a pruhy stejných vzorků odebraných o 2 cykly později se již jevíly rozmazané (viz Obrázek 3). Pro vzorky AS T, AS NOS a AM T jsme stanovili optimální počet cyklů na 14, pro vzorek AM NOS na 16 cyklů. Původní vzorky odebrané po 13. cyklu jsme následně podrobili dodatečnému počtu PCR cyklů tak, aby se jejich počet shodoval s počtem optimálních cyklů určených pro každý vzorek.

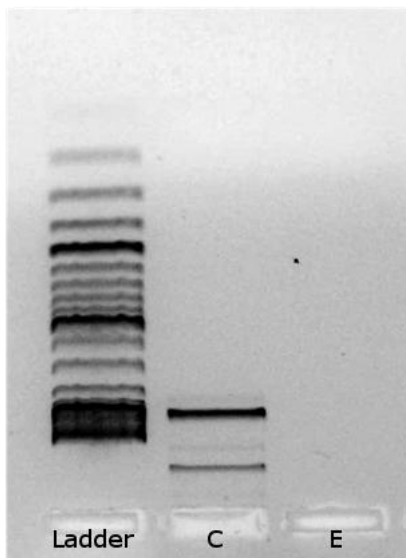


**Obrázek 3** Gelová elektroforéza vzorků amplifikované cDNA ukazuje, jak se mění zastoupení jednotlivých transkriptů po 13., 15., 17., 19., 21. a 23. cyklu.

PCR produkty jsme následně vyčistili pomocí MiniElute PCR Purification Kit (Qiagen) dle postupu uvedeného v manuálu Trimmer-2 Normalization kit. V souladu s protokolem pro normalizaci cDNA jsme se rozhodli ještě s částí získané ds cDNA provést její precipitaci. Takto připravenou ds cDNA jsme poté zkontrolovali pomocí elektroforézy na 1,5% agarosovém gelu.

## 4.7 Normalizace cDNA

Normalizace cDNA je metoda úpravy cDNA užívaná pro zvýšení pravděpodobnosti čtení všech exprimovaných sekvencí během transkriptomového sekvenování. mRNA eukaryotických buněk totiž z přibližně 20 - 40 % tvoří pouze několik málo (~5-10) silně exprimovaných genů (Carninci et al. 2000). Tyto sekvence by bez užití normalizace byly během sekvenace čteny řádově vícekrát, než geny zbývající, kterých je však několik tisíc či desítek tisíc (Carninci et al. 2000) a *de facto* by zbytečně „zabraly“ místo ostatním, vzácnějším transkriptům. Tato diplomová práce se například zabývá jednou skupinou receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR). Exprese této skupiny receptorů obecně je v buňkách poměrně silně regulována a pohybuje se v rozpětí 0,001-0,01% celkové exprese (Fredriksson & Schiöth 2005) a i proto bylo vhodné využít normalizační protokol. Trimmer – 2 normalizační kit (Evrogen) využívá specifickou nukleázu izolovanou z kraba kamčatského (*Paralithodes camtschaticus*). Jedná se o enzym (duplex-specific nuclease, DSN) preferenčně štěpící dvouvláknové molekuly nukleových kyselin (ds DNA, RNA-DNA vlákna). V případě, že denaturovanou cDNA necháme renaturovat, se v roztoku cDNA budou s nejvyšší pravděpodobností primárně tvořit ds cDNA molekuly právě těch genů, které byly v tkáni nejvíce exprimované a tudíž se jejich vlákna v roztoku cDNA nejspíše nalezou.



**Obrázek 4** Gelová elektroforéza - Test aktivity duplex-specifické nukleázy (DSN). Zleva doprava: žebřík (1kb), kontrola „C“, experiment „E“. U vzorku „E“ je patrná aktivita DSN, kdy nejsou patrné pruhy kontrolní cDNA viditelné u vzorku „C“ (kde nebyl užit DSN).

Pokud necháme renaturovat cDNA po optimální dobu, naprostá většina ds cDNA bude tvořena abundantními a středně abundantními transkripty, naopak vzácné transkripty budou stále ve formě jediného vlákna. V takovéto situaci lze s výhodou použít DSN a nepoměr v zastoupení transkriptů v roztoku cDNA snížit (Zhulidov et al. 2004).

### 4.7.1 Testování aktivity DSN enzymu

Prvním krokem bylo nutné otestování aktivity DSN enzymu. Rozpuštěný DSN enzym lze uchovávat v  $-20^{\circ}\text{C}$  (dle výrobce po dobu 3 měsíců, vlastní zkušenosti ukazují výrazně delší dobu), avšak je zásadní při každém užití enzymu otestovat jeho aktivitu. Kontrolní cDNA (Trimmer-2 Normalization Kit) jsme proto inkubovali v jedné reakci s DSN enzymem, v druhé bez něj. Analýza obou reakcí na 1,5% gelu (Obrázek 4) ukázala zásadní rozdíl způsobený štěpením DNA nukleázou, kdy u

vzorku „C“ (bez enzymu DSN) jsou 2 jasné pruhy, zatímco u vzorku „E“ (přítomen DSN enzym) jsme viděli pouze špatně spatřitelný, nekoncentrovaný pruh o minimální velikosti (<100bp). Mohli jsme tedy pokračovat, aktivita enzymu byla ideální.

#### 4.7.2 Denaturace cDNA a hybridizace

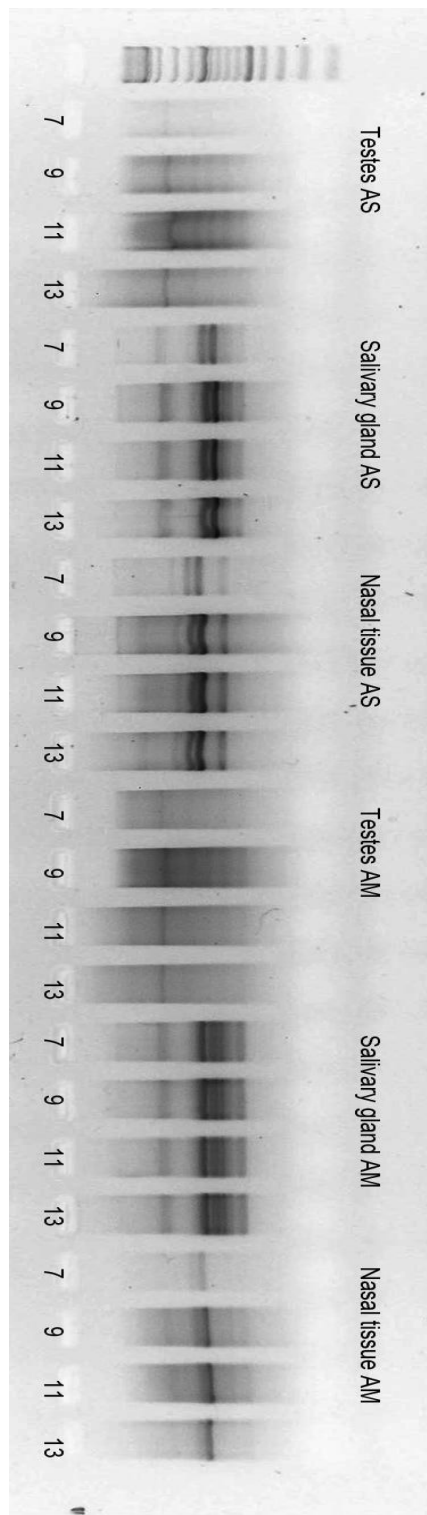
Doba hybridizace rozhoduje o míře renaturace cDNA vláken a neměla by dle protokolu být menší než 4 hodiny či naopak větší než 7 hodin. V případě nedostatečné doby ponechané hybridizaci hrozí, že normalizace nebude dostatečně účinná. V případě překročení 7 hodin hybridizace naopak hrozí štěpení enzymem DSN i méně častých transkriptů v důsledku ponechání přílišné doby k reasociaci jejich vláken. My jsme se rozhodli pro 6 hodin renaturace.

#### 4.7.3 Normalizace a následná amplifikace cDNA

Také v případě normalizace se jedná o vzorkově specifickou záležitost, kterou je nutné optimalizovat pomocí vystavení každého vzorku cDNA třem koncentracím DNS enzymu (1, ½, ¼) a navíc opět užít kontrolu (bez DSN) pro optimalizaci počtu amplifikačních cyklů. Po skončení normalizace jsme pomocí kontrolních vzorků určili pro každý vzorek počet potřebných cyklů. Na 1,5% agarosovém gelu jsme porovnali 5 µl odebraných z kontrolních vzorků po 7., 9., 11. a 13. cyklu amplifikačního programu. Určili jsme pro každý vzorek (AS T, AS NOS, AM T a AM NOS) optimální počet cyklů dle kritérií popsanych u Obrázku 5. Optimální počet cyklů pro kontrolní vzorky byl v případě AS T a AM NOS 9 cyklů, pro AS NOS a AM T 8. Uvedené počty cyklů představují optimální počet cyklů pro kontrolní, **nenormalizované vzorky**. **Normalizované vzorky** byly navíc podrobeny dalším 9 cyklům normalizace. Celkový počet PCR cyklů pro normalizované vzorky AS T a AM NOS tak byl 18, zatímco pro AS NOS a AM T byl 17.

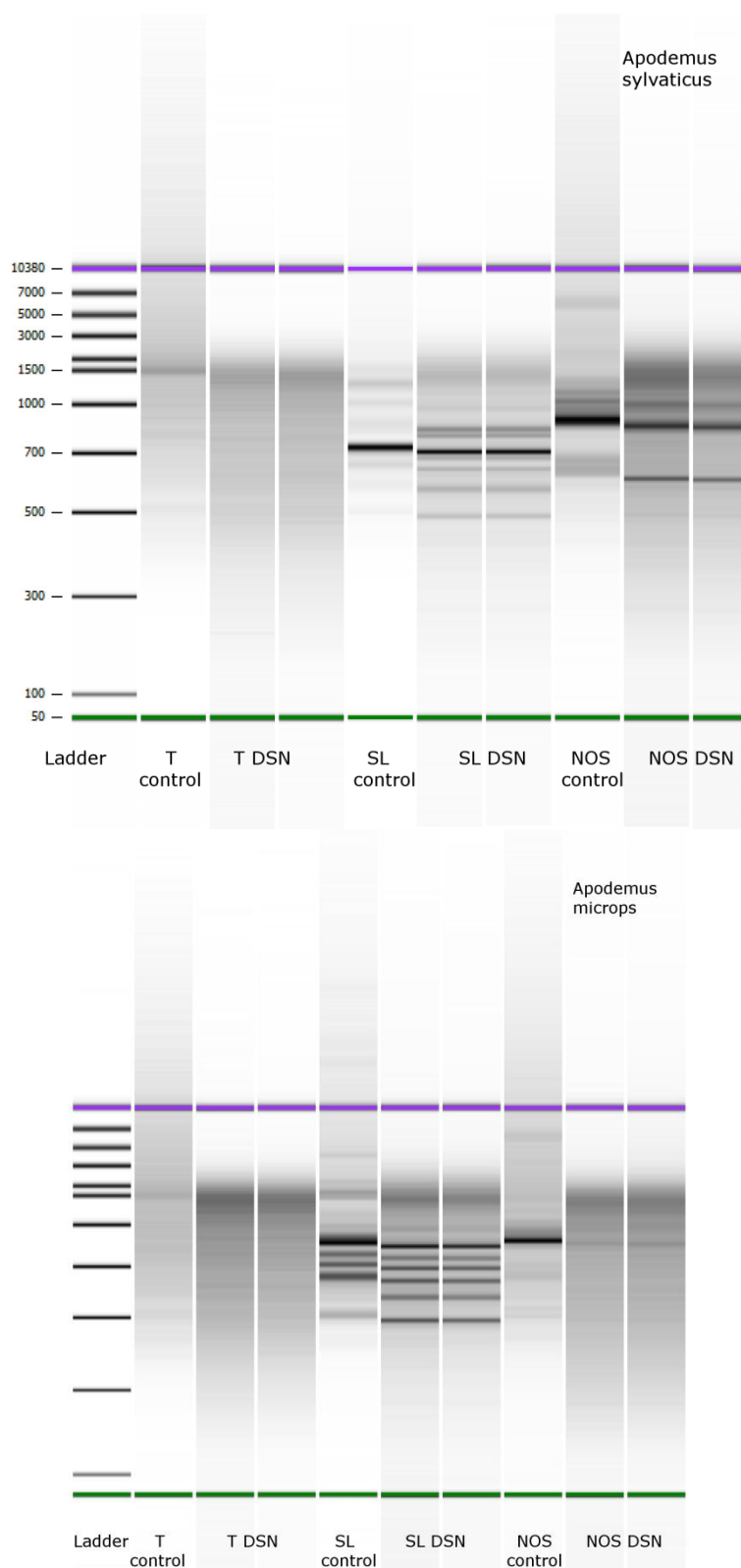
Amplifikované normalizované vzorky jsme porovnali na gelu s kontrolním vzorkem a rozhodli jsme se užít vzorky normalizované za užití nejvyšší koncentrace DSN, které se nám zdály ideální. Vybrané vzorky, spolu se vzorky kontrolními, jsme poté zkontrolovali pomocí Agilent Bioanalyzer (Obrázek 6).

Vybrané vzorky jsme poté přečistili pomocí MiniElute PCR Purification Kit (Qiagen) dle standardního protoklu. Všechny produkty normalizace jsme uchovávali do dalšího použití v -20°C.



**Obrázek 5** Gelová elektroforéza optimalizačních, nenormalizovaných vzorků (bez DNS). Čísla představují stav cDNA při amplifikaci v 7., 9., 11. a 13. cyklu. Názvy popisují tkáň, AS – *Apodemus sylvaticus*, AM – *Apodemus microps*. Optimální počet cyklů amplifikace by měl být o 1 PCR cyklus před tzv. fází plató, která je patrná výrazným zesílením signálu oproti stavu o 2 cykly zpět. Optimální počet cyklů by měl být reprezentován pruhy abundantních transkriptů o přibližně poloviční síle (jasu) vůči odpovídajícím pruhům žebříku. Cykly následující po fázi plató rozpoznáme tak, že jejich „smear“ (skvrna) subjektivně „roste“ směrem ke katodě i anodě, některé slabší pruhy viditelné ve fázi plató či v předchozích cyklech se mohou „rozmývat“. Jelikož jsme odebírali vzorky z amplifikační reakce vždy po 2 cyklech, museli jsme počítat také s tím, že právě fázi plató na gelu nevidíme a uvidíme až vzorky o 1 cyklus po fázi plató. Pro vzorky AS T a AM NOS jsme jako fázi plató určili 10. cyklus, tedy 9 PCR cyklů jako optimální počet cyklů amplifikace. Pro vzorky AS NOS a AM T jsme fázi plató viděli v 9. cyklu, proto jsme určili jako optimální 8 cyklů amplifikace.





**Obrázek 4** Virtuální gelová elektroforéza vytvořená na základě výsledků cDNA měření přístroje Agilent Bioanalyzer. Normalizované vzorky (označené DSN) obou druhů jsou přítomny na gelu v duplikátech (2 sloupce). Ze srovnání normalizovaných a kontrolních („control“) vzorků jsou patrné účinky duplex-specifické nukleázy,

## 4.8 Příprava cDNA knihovny

Přípravu knihovny pro sekvenaci jsme provedli podle protokolu Rapid Library Preparation Method Manual (454.com). Všechny použité enzymy, reagensie a nebulizační nádoby jsou součástí GS Rapid Library Preparation Kit (Roche), pouze RL MID adaptory jsou součástí GS FLX Titanium Rapid Library MID Adaptors Kit (Roche).

### 4.8.1 Nebulizace - fragmentace ds cDNA

Příprava cDNA knihovny musí být samozřejmě poplatná jednak aplikacím připravujícím vzorky k sekvenaci (vazba na DNA vazebné kuličky), jednak schopnostem sekvenačního systému. Sekvenační systém GS FLX+ je schopen detekce až ~1000 bp dlouhých čtení (průměrně však okolo 500 bp). Přestože jde co do velikosti jednotlivých čtení současně o nejlepší sekvenační systém, velká část sekvencí transkriptů je jednoduše delší. Prvním krokem tak musí být nebulizace ds cDNA. Jedná se o náhodné, mechanické štěpení ds cDNA molekul díky tlaku plynného dusíku. Vzniknou tak fragmenty o délce 300-800 bp (Knierim et al. 2011). Toto opatření zaručí, že se fragmenty budou v následných aplikacích lépe vázat na DNA vazebné kuličky, ale také se zvýší pravděpodobnost sekvenace celých sekvencí právě díky fragmentaci cDNA. Jednotlivé kontigy (čtené sekvence fragmentů) se poté pomocí systémového software složí a takto získáme v ideálním případě celou sekvenci transkriptů i několik kb dlouhých.

Nebulizaci jsme provedli podle zmíněného protokolu, s odlišným nastavením tlaku plynného dusíku na 35  $\Psi$  (2,413 bar). Vzniklý roztok nebulizované ds cDNA jsme poté přečistili pomocí MiniElute PCR Purification kitu (Qiagen) dle postupu uváděného v protokolu (Rapid Library Preparation Method Manual).

### 4.8.2 Připojení adaptorů - označení tkáňového původu knihoven

Sekvenační systém FLX+ umožňuje pomocí RL MID adaptoru označit každou jednu sekvenci daného vzorku. RL MID adaptor může být připojen pouze na slepě zakončené konce cDNA molekul. Nebulizace však generuje jak slepé konce, tak tzv. 3' a 5' lepidivé konce. Díky PCR metodě „Fragment End Repair“ dochází pomocí T4 polymerázy k odstranění lepidivých konců a vznikají tak konce slepé. Zároveň dochází k fosforylaci 5' konců ds cDNA vláken pomocí polynukleotidové kinasy (PNK). Na slepé konce se poté pomocí ligázy připojí RL MID adaptory. Jedná se o ds DNA vlákna s jedním koncem slepým a na druhé straně s přesahujícím 5' koncem. Slepé konce zaručují, že právě tyto budou ligovány k cDNA vláknům vzorku. Přidáním RL MID adaptoru do směsi přidáváme ekvimolární množství

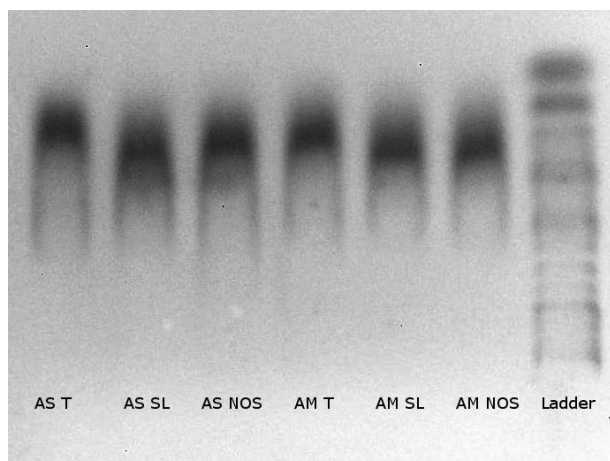
Adaptoru A a Adaptoru B. Oba typy adaptorů obsahují místa pro amplifikační primery (20 bp), klíč pro „base calling“ (4 bp) i sekvenci MID. MIDy – Multiplexové identifikátory - jsou sekvence o délce 11 bází, pomocí kterých lze na příklad – jako v našem případě- označit tkáňový původ každé sekvence a následně tak sekvenovat i několik desítek knihoven najednou. Sekvenační software tyto MID sekvence rozpoznává a určí, v jakém vzorku (tkáni) byl transkript nesoucí daný MID přítomen. Jde také o vhodnou ochranu vůči kontaminaci.

#### 4.8.3 Odstranění malých fragmentů

Produkty předchozí reakce jsme přečistili pomocí magnetických kuliček (Agencourt AMPure XP, Beckman-Coulter), které v kombinaci se Sizing Solution (GS Rapid Library Preparation Kit, Roche) tvoří účinný systém schopný odstranit malé DNA fragmenty (<300 bp), enzymy a nukleotidy či další reagenty použité v předchozích aplikacích. Metoda využívá známé purifikační techniky založené na reversibilní imobilizaci DNA na karboxylovaném povrchu magnetických kuliček (DeAngelis et al. 1995).

#### 4.8.4 Kontrola kvality ds cDNA knihovny

Kvalita knihovny byla kontrolována s využitím systému FlashGel (Lonza). Výhodou tohoto systému je vyšší detekční schopnost ve srovnání s elektroforézou na EtBr/agarosovému gelu, vyšší rychlost (6 min oproti ~30 min) a pohodlí. U všech vzorků jsme viděli nejasný kontinuální pruh v rozmezí cca 400 bp až 1500 bp, což značí vcelku dobrou kvalitu knihovny.



**Obrázek 5** Kontrola produktů ds cDNA knihovny. Nejasný kontinuální pruh u všech vzorků byl v rozmezí 400 – 1500 bp.

#### 4.8.5 Fluorimetrická kvantifikace ds cDNA knihovny

Kvantifikaci knihoven jsme provedli pomocí fluorimetru Hoefer DQ 300. Minicell adaptor jsme vložili do přístroje v poloze „Blue“. Nastavili jsme parametry měření UV/B na „Blue“ (modrý kanál) a STD VAL (standartní hodnotu) na 250 (návod k nastavení přístroje na stránkách výrobce: <http://www.hoeferinc.com/>). Změřili jsme hodnoty relativních

fluorescenčních jednotek (RFU) všech knihoven a jejich hodnoty zadali do webové aplikace „Rapid Library Quantitation Calculator“ (my454.com). Po zadání hodnot RFU vzorků aplikace zobrazí, jak naředit knihovnu daného vzorku s TE pufrém do celkového objemu 500  $\mu$ l o koncentraci  $10^7$  molekul/ $\mu$ l.

#### 4.9 Emulzní titrace

Jedná se o způsob, jakým určit potřebné množství konkrétní cDNA knihovny pro úspěšné provedení tzv. „velkoobjemové“ emulzní PCR tak, abychom optimální množství obohacených kuliček pro sekvenční reakci. Jde o proceduru, kterou musíme udělat pro každý vzorek zvlášť a *de facto* jde o simulaci finální, „velkoobjemové“ emulzní PCR pomocí „maloobjemové“ emulzní PCR. Ta ukáže, jaký procentuální podíl obohacených kuliček získáme při různých vstupních objemech cDNA knihovny a následně jsme schopni zvolit vhodné množství cDNA knihovny (v počtech molekul na kuličku) pro velkoobjemovou emulzní PCR. My jsme se oproti standardnímu protokolu (emPCR Amplification Method Manual – Lib L SV) rozhodli provést tuto simulaci se 4 vstupními objemy (2, 8, 24 a 112 molekul cDNA na kuličku, viz Tabulka 2).

Jako optimální množství výtěžku obohacených kuliček po provedení emPCR se udává 10 %. Dle protokolu právě takový podíl při následné sekvenaci poskytuje nejlepší výsledky.

Označení mikrozkušavky	Počet molekul/kuličku	Objem knihovny
<b>AS/AM 2</b>	2	0,5 $\mu$ l
<b>AS/AM 8</b>	8	2 $\mu$ l
<b>AS/AM 24</b>	24	6 $\mu$ l
<b>AS/AM 112</b>	112	28 $\mu$ l

**Tabulka 2** ukazuje, jaký objem knihovny ( $\mu$ l) jsme přidali do mikrozkušavek obsahujících stejné množství DNA vazebných kuliček. Hodnoty prostředního sloupce odpovídají počtu cDNA molekul na 1 DNA vazebnou kuličku při zvoleném objemu knihovny. Koncentrace obou knihoven je  $9,6 \times 10^6$  mlk/ $\mu$ l.

Sekvenační systém, který jsme využili (GS FLX+ Titanium, Roche), nabízí sekvenování na pikotitrační destičce (PTP) rozdělené nejméně na 2 oddíly. Jelikož každým rozdělením PTP zmenšíme plochu určenou pro sekvenaci (a tedy i výsledné pokrytí transkriptomu) a jelikož jsme každý vzorek označili pomocí multiplexních identifikátorů (umožňujících určení původu transkriptů pomocí sekvenačního software), rozhodli jsme se

pro základní možnost dělení na dva oddíly. Proto jsme z připravených cDNA knihoven ( $10^7$  mlk/ $\mu$ l) tkání vytvořili dvě druhově specifické knihovny AM a AS.

#### 4.9.1 Emulzní PCR

Podstatou emulzní PCR je, že se pomocí homogenizátoru (v našem případě kolem cDNA vazebných kuliček) vytvoří na rozhraní vody a oleje kapénky, tzv. „mikroreaktory“ obsahující složky amplifikačního mixu (amplifikační primery, polymeráza, nukleotidy atd). V mikroreaktoru v zásadě probíhá klasická PCR, avšak díky uzavření pouze jedné molekuly cDNA v kapénce nedochází k preferenční amplifikaci kratších cDNA molekul. Emulzní PCR je tak ideální variantou komplexní amplifikace celých knihoven i při jejich nižších vstupních koncentracích (Williams et al. 2006). Výstupem emulzní PCR jsou DNA vazebné kuličky obalené amplifikovanými molekulami cDNA. Protokol nabádá k výpočtu podílu získaných kuliček, který by se měl pohybovat okolo 65%. Tato informace je zajímavá hlavně kvůli zlepšení vlastní manuální práce při odsávání a další manipulaci s produkty emulzní PCR. Výsledky ukazuje Tabulka 3.

Označení mikrozkušavky	Objem (ml) $V_{suspence}$	Počet kuliček na 1 ml ( $n_{kuliček \cdot ml^{-1}}$ )	Podíl získaných kuliček po emPCR $x(\%)$ , zaokrouhleno
AS 2	0,251	$8,498 \times 10^6$	89 %
AS 8	0,246	$8,434 \times 10^6$	86 %
AS 24	0,247	$8,246 \times 10^6$	85 %
AS 112	0,221	$6,908 \times 10^6$	64 %
AM 2	0,239	$7,623 \times 10^6$	76 %
AM 8	0,235	$6,903 \times 10^6$	68 %
AM 24	0,239	$6,743 \times 10^6$	67 %
AM 112	0,243	$7,942 \times 10^6$	80 %

**Tabulka 3** ukazuje podíl získaných DNA vazebných kuliček po emulzní PCR a všech následných procedurách.

Názvy mikrozkušavek v prvním sloupci odpovídají druhovému původu knihoven (AS-*Apodemus sylvaticus*, AM-*Apodemus microps*) a vloženému objemu knihovny, přepočítaného na množství molekul cDNA na 1 kuličku (2/8/24/112). Změřili jsme objem suspenze v mikrozkušavkách ( $V_{suspence}$ ). Pomocí přístroje CASY (Innovatis, Roche) jsme změřili koncentraci

( $n_{kuliček \cdot ml^{-1}}$ ) 3  $\mu$ l každé suspenze. Dle vzorce:  $x(\%) = \frac{n_{kuliček \cdot ml^{-1}} \times V_{suspence}}{n_{vložených \ kuliček}} \times 100$ , kde počáteční množství vložených

kuliček ( $n_{vložených \ kuliček}$ ) je rovno  $2,4 \times 10^6$ , jsme byli schopni spočítat podíl získaných DNA vazebných kuliček.

#### **4.9.2 Obohacení DNA vazebných kuliček**

Z předchozích kroků jsme získali suspenzi DNA vazebných kuliček. Je však nezbytné oddělit ty DNA vazebné kuličky, které opravdu váží na svém povrchu molekuly cDNA (obohacené) a kuličky, které neváží žádné molekuly cDNA. Oddělíme tak poměrně značnou část kuliček (výsledný podíl ukazuje tabulka 4), které by jinak pouze zabíraly množství sekvenačních jamek a potenciál sekvenátoru by zůstal nevyužit. Toto provádíme pomocí paramagnetických obohacujících kuliček („Enrichment Beads“), které mají na svém povrchu streptavidin. Streptavidin váže biotin na B adaptorech cDNA molekul. Pokud mikrozkušavky se suspenzí DNA vazebných kuliček a obohacujících kuliček vložíme na magnetický stojánek (Invitrogen), ke stěně mikrozkušavky blízké magnetu budou magneticky vázány pouze DNA vazebné kuličky s amplifikovanými molekulami cDNA. Nežádoucích kuliček se můžeme odmytím zbavit.

#### **4.9.3 Odstranění obohacujících kuliček a příprava ss cDNA**

V předešlém postupu jsme se zbavili kuliček, které neváží molekuly cDNA. Dalším krokem bylo odstranění paramagnetických obohacujících kuliček navázaných na molekuly cDNA. Zbavením se těchto obohacujících kuliček odstraňujeme problém, kterým je ds cDNA templát, jež vznikl při emPCR. Sekvenátor totiž pracuje na principu fluorescenčního signálu emitovaného při syntéze vlákna dle ss cDNA templátu. V roztoku NaOH se ds cDNA vlákna denaturují a zatímco jeden řetězec je uchycen na DNA vazebné kuličce, druhý řetězec (s biotinylovaným obohacujícím primerem či B adaptorem) je vázán přes vazbu streptavidin-biotin stále na obohacující kuličce. Jelikož odstraňujeme obohacující kuličky, odstraníme spolu s nimi i vlákna na ně navázaná. Získáme DNA vazebnou kuličky s mnoha ss cDNA řetězci, které jsou identické.

#### **4.9.4 Příprava pro sekvenační reakci a výpočet podílu obohacených kuliček**

Emulzní titrace je primárně prováděna pro determinaci takového vstupního množství cDNA knihovny, ze kterého při následné velkoobjemové emulzní PCR získáme ideální množství obohacených DNA vazebných kuliček. Nicméně produkty emulzní titrace (maloobjemové emulzní PCR) se nijak neliší od těch z velkoobjemové emulzní PCR a samozřejmě se do sekvenační reakce mohou vložit také. Proto jsme přidali ke kuličkám vázajícím ss cDNA vlákna sekvenační primer. Na konci postupu jsme také určili, jaký je procentuální zisk DNA vázajících kuliček a určili jsme, jaké množství cDNA knihovny přidat do tvorby velkoobjemové emPCR. Z výsledků v tabulce 4 je patrné, že v případě knihovny AM je vhodné vložit do velkoobjemové emulzní PCR objem knihovny odpovídající 2

molekulám cDNA na kuličku, zatímco v případě knihovny AS 1,7 molekulám cDNA na kuličku.

Označení mikrozkuřavky	Objem (ml) $V_{2_{suspence}}$	Počet kuliček na 1 ml $n_{obohacených\ kuliček \cdot ml^{-1}}$	Podíl získaných kuliček po emPCR $x_{BR}(\%)$ , zaokrouhleno
AS 2	0,1036	$2,997 \times 10^6$	13 %
AS 8	0,1098	$8,446 \times 10^6$	39 %
AS 24	0,1122	$11,58 \times 10^6$	54 %
AS 112	0,106	$14,27 \times 10^6$	63 %
AM 2	0,1026	$2,25 \times 10^6$	10 %
AM 8	0,1069	$6,839 \times 10^6$	30 %
AM 24	0,118	$10,83 \times 10^6$	53 %
AM 112	0,1204	$11,02 \times 10^6$	55 %

**Tabulka 4** ukazuje podíl získaných obohacených DNA vazebných kuliček na konci emulzní titrace. Názvy mikrozkuřavek v prvním sloupci odpovídají druhovému původu knihoven (AS-*Apodemus sylvaticus*, AM-*Apodemus microps*) a vloženému objemu knihovny, přepočteného na množství molekul cDNA na 1 kuličku (2/8/24/112). Změřili jsme objem suspenze ( $V_{2_{suspence}}$ ) v mikrozkuřavkách (1. sloupec). Pomocí přístroje CASY (Innovatis, Roche) jsme změřili koncentraci 3  $\mu$ l suspenzí z každé mikrozkuřavky ( $n_{obohacených\ kuliček \cdot ml^{-1}}$ ). Dle vzorce  $x_{BR}(\%) = \frac{n_{obohacených\ kuliček \cdot ml^{-1}} \times V_{2_{suspence}}}{n_{vložených\ kuliček}} \times 100$  jsme vypočetli procentuelní zisk DNA vázajících kuliček ( $x_{BR}$ ), kde počáteční množství vložených kuliček ( $n_{vložených\ kuliček}$ ) je rovno  $2,4 \times 10^6$ .

#### 4.10 Velkoobjemová emulzní PCR

Velkoobjemová emPCR je poslední fází před samotnou sekvenační reakcí. V zásadě se jedná o stejnou reakci, jakou jsem popsal v předešlé kapitole Emulzní titrace, výsledkem je však větší, dostatečný objem obohacených DNA vazebných kuliček, které jsou následně sekvenovány. Postupovali jsme dle standardního protokolu (emPCR Amplification Method Manual – Lib L LV) s využitím reagentů GS Titanium LV emPCR Kit (Lib-L). Emulzní titrace ukázala, že pro knihovnu AS je potřeba vložit množství knihovny odpovídající 1,7 molekul cDNA na kuličku, pro knihovnu AM 2 molekuly cDNA na kuličku

( $\frac{n_{molekul}}{kulička}$ ). Dle vzorce  $V_{knihovny} = \frac{\frac{n_{molekul}}{kulička} \times 35 \times 10^6}{9 \times 10^6}$  jsme vypočetli, jaký objem dané knihovny potřebujeme pro přípravu emulzní PCR. V případě **AM knihovny** se jednalo o **7,3  $\mu$ l**, v případě **knihovny AS** o **6,2  $\mu$ l**.

Podíl získaných DNA vazebných kuliček po provedení emulzní PCR ukazuje tabulka 5. Tabulka 6 ukazuje podíl obohacených DNA vazebných kuliček.

Získali jsme amplifikované knihovny AM a AS, připravené pro sekvenaci. Podíl obohacených kuliček obou knihoven se blížil 10 % a jednalo se tedy o dobrý výsledek (protokol takto označuje rozmezí 5–20 %), slibující kvalitní sekvenaci. Ihned jsme postoupili dále.

Označení mikrozkumavky	Objem (ml) $V_{suspence}$	Počet kuliček na 1 ml $(n_{kuliček \cdot ml^{-1}})$	Podíl získaných kuliček $x(\%)$	
			1 suspenze	Součet na knihovnu
AS 1	1,204	$10,11 \times 10^6$	36,88	<b>74,063</b>
AS 2	1,214	$10,72 \times 10^6$	37,183	
AM 1	1,104	$11,04 \times 10^6$	34,823	<b>73,9</b>
AM 2	1,174	$11,65 \times 10^6$	39,077	

**Tabulka 5** ukazuje podíl získaných DNA vazebných kuliček po emulzní PCR. Názvy mikrozkumavek v prvním sloupci odpovídají druhovému původu knihoven (AS-*Apodemus sylvaticus*, AM-*Apodemus microps*), číselné označení 1 a 2 je identifikační. Změřili jsme objem suspenze ( $V_{suspence}$ ) v mikrozkumavkách (1. sloupec) a pomocí přístroje CASY (Innovatis, Roche) jsme změřili koncentraci 3  $\mu$ l suspenzí z každé mikrozkumavky ( $n_{(kuliček \cdot ml^{-1})}$ ). Dle vzorce  $x(\%) = \frac{n_{kuliček \cdot ml^{-1}} \times V_{suspence}}{n_{vložených kuliček}} \times 100$  jsme vypočetli procentuelní zisk DNA vázajících kuliček ( $x(\%)$ ), kde počáteční množství vložených kuliček ( $n_{vložených kuliček}$ ) je rovno  $35 \times 10^6$ .

knihovna	Objem (ml) $V_{2suspence}$	Počet kuliček na 1 ml $(n_{kuliček \cdot ml^{-1}})$	Podíl získaných kuliček $x(\%)$ zaokrouhleno
AM	1,034	$4,644 \times 10^6$	14
AM	1,0	$3,000 \times 10^6$	8,5

**Tabulka 6** ukazuje podíl získaných obohacených DNA vazebných kuliček. Názvy knihoven odpovídají druhovému původu knihoven (AM – *Apodemus microps*, AS – *Apodemus sylvaticus*). Změřili jsme objem suspenze ( $V_{2suspence}$ ) knihoven a pomocí přístroje CASY (Innovatis, Roche) jsme změřili koncentraci 3  $\mu$ l z obou suspenzí ( $n_{(kuliček \cdot ml^{-1})}$ ). Dle vzorce  $x_{BR}(\%) = \frac{n_{kuliček \cdot ml^{-1}} \times V_{2suspence}}{n_{vložených kuliček}} \times 100$  jsme vypočetli procentuelní zisk obohacených DNA vazebných kuliček ( $x_{BR}(\%)$ ), kde počáteční množství vložených kuliček ( $n_{vložených kuliček}$ ) je rovno  $35 \times 10^6$ .



## 5 Sekvence pomocí GS FLX+ Titanium

Porovnávání transkriptomu tkání nemodelových druhů je bez vytvoření transkriptomových databází nesnadný a zdouhavý úkol. Jednou z relativně stále nových a velmi rychlých cest tvorby takových databází je masivní paralelní pyrosekvenování. My jsme se rozhodli pro užití sekvenačního systému „Genome Sequencer FLX+ Titanium“, který je v současnosti pro daný účel co do počtu (~1 000 000 čtení\*) a délky čtených sekvencí (~ 700 bp\*), přesnosti (99,997 % při 15násobném čtení báze\*) ceny a konečně i uživatelské náročnosti asi nejlepším řešením (\*zdroj: <http://454.com/products/gs-flx-system/index.asp>).

Detailnější nástin principu fungování sekvenace umožní logické navázání na předchozí přípravu amplifikované knihovny. Během emulzní PCR jsme získali na každé obohacené DNA vazebné kuličce asi 10 milionů jednovláknových identických kopií původně jediné vložené molekuly cDNA (Droege & Hill 2008). Každá kopie obsahuje na jednom konci adaptor A, na druhém adaptor B. Zatímco na adaptory A je navázán sekvenační primer, adaptory B váží oligonukleotidy DNA vazebných kuliček a imobilizují tak kopie na kuličce. Průměr DNA vazebné kuličky obalené miliony kopií je ~ 30  $\mu$ m. Sekvence probíhá na pevném podkladu, kterým je pikotitrační destička (PTP, rozměry 70 mm x 75 mm). PTP obsahuje 1,6 milionu jamek o průměru ~44  $\mu$ m. Díky tomu se do jamky vejde vždy pouze jediná DNA vazebná kulička obalená právě a jen klony jedné určité sekvence. DNA vazebná kulička je dále překryta dalšími 2 vrstvami kuliček (enzymovými a PPIasovými kuličkami) a spolu s nimi imobilizována v jamce 4. vrstvou, tzv. těsnících kuliček („Packing Beads“). PTP je po vložení do sekvenátoru postupně cyklicky omývána jedním ze 4 deoxynukleotidů ve fixním pořadí (TACG). Nukleotidy se dostávají do jednotlivých jamek a v případě, že jsou komplementární k templátovému vlákně v místě první nepárové báze, jsou pomocí DNA polymerázy inkorporovány do řetězce. Inkorporaci nukleotidu doprovází uvolnění anorganického pyrofosfátu (PPi), který je následně pomocí enzymu sulfurylasy v přítomnosti adenosin 5' fosfosulfátu konvertován na ATP. ATP pohání enzym luciferázu, který následně oxiduje pigment luciferin na oxyluciferin, což doprovází emitace fotonu. Návaznosti reakcí zmíněných dvou enzymů bioluminiscence (sulfurylasy a luciferázy) jistě dopomáhá jejich imobilizace na enzymových kuličkách. Světelný signál z každé jamky je zaznamenáván pomocí CCD kamery a dále zpracován pomocí systémového software. Intenzita signálu (do jisté míry) odpovídá počtu inkorporovaných nukleotidů (Droege & Hill 2008; Margulies et al. 2005). Pro sekvenaci se tedy namísto ATP užívá ATP $\alpha$ S (deoxyadenosin 5'  $\alpha$ -thiotrifosfát), který není substrátem pro luciferázu (Gharizadeh et al. 2002; Ahmadian et al. 2006). Mezi

jednotlivými fázemi omývání PTP nukleotidy je vždy zařazeno promytí enzymem apyrásou, který z nukleotidů odstraňuje  $\beta$ - a  $\gamma$ - fosfát. Zamezuje tak inkorporaci více druhů nukleotidů v momentě, kdy přístroj snímá signál spojený s inkorporací právě a pouze jediného typu nukleotidu. Podobný účel plní i vrstva PPiasových kuliček, která zabraňuje kontaminaci anorganickým pyrofosfátem z/do okolních jamek.

Příprava a nanesení 4 vrstev kuliček na PTP je prakticky posledním manuálním úkonem, jelikož od vložení připravené PTP do sekvenátoru a jeho spuštění je vše plně automatizováno. Přípravu PTP i sekvenaci samotnou provádíme dle postupu uvedeného v sekvenačním manuálu pro GS FLX+ / XL+ (454.com). Sekvence proběhla se 400 cykly, kdy je během jediného cyklu každá jamka PTP vystavena postupně roztokům všech 4 nukleotidů.

## 6 Sekvenační data a jejich zpracování

Program GS Sequencer automaticky ukládal jak jednotlivé snímky PTP během sekvenace, tak všechna data následně automaticky zpracoval a vygeneroval soubory sekvencí, které byly čtené v průběhu sekvenace (dále tyto sekvence označuji jako „čtené sekvence“). Pomocí programu jsme roztřídili jednotlivé sekvence dle jejich tkáňového původu využívaje identifikátorů MID čtených spolu se zbytkem každé molekuly cDNA. Dále jsme odstranili uměle připojené úseky na koncích jednotlivých čtených sekvencí (primery užitá během reverzní transkripce, RL MID adaptory). Získali jsme šest databází ze šesti užitých knihoven (AS T, AS NOS, AM T, AM NOS a dále 2 knihovny slinných žláz obou druhů). Data jsme dále zpracovali pomocí programů GS Reference Mapper a GS *De Novo* Assembler. Oba programy se snaží čtené sekvence poskládat do jednotlivých kontigů a získat tak kontinuální sekvenci transkriptů či jejich části. Provádí to na základě identických úseků jednotlivých čtených sekvencí, které vhodně poskládaný tvoří sety překrývajících se úseků jednotlivých transkriptů. Kontigy jsou konsensuální sekvence těchto překrývajících se sekvencí a implicitně jsou tedy delší než jednotlivé čtené sekvence a je jich méně. Program GS *De Novo* Assembler skládání sekvencí do kontigů provádí autonomně, naopak GS Reference Mapper se snaží poskládat jednotlivé čtené sekvence za pomoci mapování dat na vstupní soubor genů či celých genomů. Takový postup samozřejmě snižuje variabilitu v možnostech skládání překrývajících se sekvencí na sebe. Data jsme zpracovali užitím obou programů a získali jsme takto překvapivě odlišné druhově specifické transkriptomové databáze (více v kapitole 9).

Program GS Reference Mapper, s využitím mapování na známé genomy druhů *Mus musculus* a *Rattus norvegicus*, poskytl lepší výsledky. Proto jsem dále pokračoval s daty (fasta sekvencemi) generovanými tímto programem.

## 6.1 Vyhledávání olfaktorických receptorů v transkriptomové databázi

Fasta sekvence získané programem GS Reference Mapper reálně představují tkáňově specifické, transkriptomové databáze. Aby bylo možné se v takovýchto velkých datových souborech orientovat a vyhledat geny našeho zájmu, je vhodné pojmenovat jednotlivé kontigy podle nejlepšího výsledku, ortologu získaného pomocí vyhledávacího algoritmu BlastX. Využili jsme proto volně dostupný program Blast2GO (<http://www.blast2go.com>), který byl schopen samočinně, po nahrání transkriptomové databáze, postupně vyhledávat v nonredundantní databázi NCBI ortologické sekvence a přiřazovat jména nejlepších výsledků našim sekvencím. Sekvence olfaktorických receptorů nalezené pomocí Blast2Go jsme poté navíc manuálně ověřili v databázi Ensembl (<http://www.ensembl.org/Multi/blastview>), za použití přednastavených kritérií programu BlastX a vyhledávání pouze vůči *Mus musculus*.

## 7 Relativní kvantifikace exprese olfaktorických receptorů

Pomocí sekvenace cDNA knihoven jsme získali představu o tom, které geny jsou exprimovány v konkrétních tkáních. Nicméně data získaná tímto způsobem o míře exprese genů vypovídají jen zčásti a spíše orientačně. Výsledná data samozřejmě mj. velmi závisí na rozsahu normalizace, které jsme všechny vzorky vystavili. Navíc u genů s nízkou hladinou exprese, jakými právě receptory spřažené s G proteiny obecně jsou, nemusí nutně ani fakt absence sekvence daného receptoru ve výsledné databázi znamenat, že daný gen není v dané tkáni exprimován.

Cílem této části práce je porovnat a) počet a míru exprese olfaktorických receptorů exprimovaných v testes a nosní tkáni dvou druhů rodu *Apodemus* (*A. microps* a *A. sylvaticus*) a b) porovnat expresi vybraných receptorů v jednotlivých vývojových stádiích spermatogeneze. Měření exprese jsem prováděl pomocí systému LightCycler 480 Real-Time PCR (Roche), který zahrnuje kompletní výbavu (hardware, software, chemie) potřebnou pro dané účely (složky reakční směsi a nastavení parametrů kapitola 7.1). Systém spoléhá na specifickou amplifikaci cíleného produktu pomocí kombinace primerů a sond. Metoda měření množství amplifikovaných úseků cDNA v reálném času pracuje prakticky na stejném

principu, jako klasická polymerázová řetězcová reakce (PCR), nicméně zde je množství amplifikované cDNA měřeno v každém cyklu pomocí fluorescenčního signálu odpovídajícího počtu amplifikovaných vláken. Fluorescenční signál z každé jamky a cyklu amplifikace je programově zpracován do křivky sledující průběh amplifikace. První fáze křivky není odlišitelná od křivky generované prázdnými jamkami destičky nebo od negativní kontroly, program nedokáže v daný moment fluorescenci produktu odečíst od fluorescence pozadí. Následný vzestup křivky (resp. fluorescence) představuje „exponenciální“ fázi a kopíruje exponenciální amplifikaci produktu. Tato fáze je nejdůležitější pro výpočet bodu označovaného jako „Crossing point“ (dále Cp). Jeho hodnotu pro každou křivku je vypočtena standardní metodou maxima druhé derivace. Získané hodnoty Cp slouží pro výpočet hodnot relativní exprese analyzovaných vzorků. Třetí fáze fluorescenční křivky představuje fázi plato, ve které fluorescence dále neroste.

Vysoká citlivost metody real-time PCR je jistě vysoce žádoucí vlastností, zejména při limitovaném množství cDNA. Vysoká sensitivita ale představuje také potenciální nebezpečí snadného zkreslení výsledků (např. díky nepřesnosti pipetování či náhodným efektům). Proto měříme expresi daného genu v dané tkáni vždy třikrát. Následně pracujeme s průměrným Cp těchto tří měření. Pokud standardní odchylka průměrného Cp je  $>0,5$ , vylučujeme takový vzorek z další analýzy. Pro různorodost porovnávaných tkání jsme se rozhodli pracovat s relativní kvantifikací genové exprese. Naměřené hodnoty Cp genů našeho zájmu ( $Cp_{Cil}$ ) vztahujeme k expresi vybraného referenčního ( $Cp_{Ref}$ ) genu podle vzorce:

Relativní exprese genu =  $(E_{ref})^{Cp_{Ref}} / (E_{cil})^{Cp_{Cil}}$ , kde E představuje efektivitu nasedání primerů referenčního genu ( $E_{ref}$ ) a genu našeho zájmu ( $E_{cil}$ ). Efektivitu nasedání primerů jsem experimentálně změřil. Všechny geny měly efektivitu nasedání primerů  $\sim 2$ , což je hodnota odpovídající 100% efektivitě reakce. Výjimkou byly geny Olf1750 s  $E_{cil} = 1,8$  a Olf161 s  $E_{cil} = 1,9$ .

K výpočtu relativní kvantifikace jsme využili referenčního genu RPLP1 (ribosomální velká proteinová podjednotka 60S). Jako vhodný referenční gen se rovněž ukázal ATP5b ( $\beta$  podjednotka mitochondriální ATPázy), jehož průměrná exprese sledovala expresi RPLP1 (viz Graf 1 a 2). Výpočet relativní kvantifikace jsme provedli pro čichové a testikulární tkáně čtyř jedinců daného druhu.

## 7.1 Reakční směs a parametry qPCR

Objem reakční směsi na 1 jamku byl 10  $\mu$ l.

Složení: 5  $\mu$ l PCR mix (LC480 Probes Master, Roche),

0,1  $\mu$ l sondy (UPL probe, Roche),

0,2  $\mu$ l forward primer,

0,2  $\mu$ l reverse primer (sekvence primerů viz tabulka 7),

3,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O (LC480 PCR grade, Roche),

1  $\mu$ l cDNA (postup získání cDNA níže).

Pro měření genové exprese jsme využili bílých, 384jamkových destiček (Roche). Expresi jsme měřili pomocí přístroje LightCycler480 (Roche). Nastavení systémového software (detekční formát atd.) zobrazuje Obrázek 8.

Gen	Forward primer	Reverse primer	UPL sonda
<b>Taar9</b>	TGCACACACCGACGAAC	CACTGTCACGCCTACCAAGA	#49
<b>Taar6</b>	TGGTCAGGTCCATCGAGAG	AACAAAACGCCACATCACAG	#7
<b>VR1r11</b>	TGCATCATTTGTCTCCTGAGTT	AATAAAGATGTATTGGGACTGATGG	#64
<b>VR2r18</b>	AGCTGTGGTCCAGGGTTCT	TTTTGGTTGGAAATGTGCTTC	#112
<b>VR2r85</b>	GCAGACTGCTGCTTTGATTG	CCAGATCTGCTGTCTCATTGG	#104
<b>Olf15</b>	ATGGAGGCTGTGTCACCTCAA	CACCACGAGCAGTATGCA	#5
<b>Olf128</b>	GCTTTGCTCTTCTTGGTGACA	GGTCCAGTGTGTGATGGTG	#62
<b>Olf161</b>	TCCTCCTGGGTCTCTCCA	TGGCCAGGTAAATGATGAGG	#3
<b>Olf750</b>	GAGCGCCATTTTCCTCTATG	CACGGTTACTGACCAGTTCG	#21
<b>RPLP1</b>	TCAGTGAGCTGAACGGAAAA	CAGCAGAAACAGCCACAGC	#40
<b>ATP5b</b>	CATTGCCAAGTGCATTGAAG	GTTCACATGACCGGCTGAG	#142

**Tabulka 7** Vybrané geny a jejich primery použité pro analýzu genové exprese v čichových tkáních a testes. Zápis obou primerů je v pořadí od 5' konce k 3' konci.

### Postup izolace RNA a následný přepis do cDNA

RNA čichových tkání a testes ze dvou jedinců obou druhů (myšice křovinné i myšice malooké) jsem izoloval metodou kolonkové izolace (kapitola 4.2 a 4.3). RNA zbylých vzorků (opět 2 sady čichových tkání a testes od obou druhů) jsem izoloval ze zamražených (-80°C) vzorků. Vzorky byly homogenizovány a zamraženy v RNazol RT (MRCgene). Při izolaci mRNA jsem postupoval dle standardního protokolu, postup „I.-1. Isolation of mRNA and micro RNA Fraction“ (<http://www.mrcgene.com/rnazol.htm>). Případnou kontaminaci DNA v získané RNA jsem ošetřil inkubací s DNAsou I (Fermentas) a následně přepsal RNA do

cDNA s využitím kitu RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). Oba kroky přípravy cDNA (ošetření RNA DNasou I i následný prepis do cDNA) jsem provedl dle dodávaného standardního protokolu (<http://www.thermoscientific.com>).

RNA ze vzorků z FACS jsem izoloval pomocí RNeasy Micro kitu (Qiagen) a postupoval jsem dle standardního návodu, včetně ošetření proti kontaminaci DNA. Získané vzorky jsem přepsal stejným způsobem, jako ostatní vzorky (viz výše).

Run Protocol	Data	Run Notes						
<b>Setup</b> Detection Format <span>Mono Color Hydr</span> <span>Customize</span> Block Size <span>384</span> Plate ID <span>C1131879</span> Reaction Volume <span>10</span> Color Comp ID <span></span> Lot No <span></span> Test ID <span></span>								
<b>Programs</b>								
	<b>Program Name</b>	<b>Cycles</b>	<b>Analysis Mode</b>					
	preincubation	1	None					
	amplification	45	Quantification					
	cooling	1	None					
<b>amplification Temperature Targets</b>								
	<b>Target (°C)</b>	<b>Acquisition Mode</b>	<b>Hold (hh:mm:ss)</b>	<b>Ramp Rate (°C/s)</b>	<b>Acquisitions (per °C)</b>	<b>Sec Target (°C)</b>	<b>Step Size (°C)</b>	<b>Step Delay (cycles)</b>
	95	None	00:00:10	4,8		0	0	0
	60	Single	00:00:30	2,5		0	0	0
	72	None	00:00:01	4,8		0	0	0

**Obrázek 6** Obrázek zobrazuje výřez systémového prostředí software LightCycler480 SW 1.5 (Roche). Zároveň zobrazuje jednotlivé parametry měření (detekční formát, jednotlivé kroky inkubačního programu atd.).

## Výsledky

### 8 Výsledky sekvenace transkriptomů tkání

Pomocí sekvenování nové generace (GS FLX+) jsme získali transkriptomové databáze tří tkání (testes, slinné žlázy a čichové tkáně) dvou druhů myšic. Statistiky sekvenačního běhu ukazuje tabulka 8. Ačkoliv se průměrné délky čtení výrazně liší od hodnot, kterých je dosahováno při užití modelových organismů, stále se jedná o velký soubor poměrně dobře využitelných dat. Žlutě zvýrazněné řádky tabulky 8 ukazují na podobné průměrné délky čtení u obou druhů. Region 2 s tkáněmi myšice křovinné převyšuje počtem čtených sekvencí o ~100 000 počet regionu 1 s tkáněmi myšice malooké. Výsledný soubor čtených sekvencí jsme skládali do kontigů s využitím 2 systémových programů – GS *De Novo* Assembler a GS Reference Mapper (viz kapitola 6). Výstupy obou programů jsme analyzovali pomocí programu Blast2Go. Po skončení vyhledávacího algoritmu (BLASTX) jsme porovnali oba soubory. Překvapily nás zásadně odlišné výsledky výstupů těchto 2 programů. S ohledem na zadání práce uvádím konkrétní příklad právě na olfaktorických receptorech. Zatímco při použití programu GS Reference Mapper jsme našli v testes a čichových tkáních >300 olfaktorických receptorů, při užití GS *De Novo* Assembler jsme našli pouze jediný olfaktorický receptor (pouze v jediné tkáni – nosních tkáních *A. microps*). Vzhledem k tomu, že čichové sliznice jsou primárním místem exprese olfaktorických receptorů a nelze očekávat expresi jediného OR, rozhodli jsme se dále pracovat s výsledky programu GS Reference Mapper. Tabulka 9 ukazuje počet kontigů získaných v dané tkáni pomocí tohoto programu.

	Region1 <i>A. microps</i>	Region 2 <i>A. sylvaticus</i>	Celkové zhodnocení
<b>Celkový počet jamek</b>	1,116,227	1,173,659	2,289,886
<b>Jamky se sekvencí adaptoru</b>	1,080,340	1,133,853	2,214,193
<b>Jamky prošlé filtry</b>	578,570	678,272	1,256,842
<b>Celkový počet bazí</b>	233,174,452	274,757,156	507,931,608
<b>Průměrná délka</b>	403.02	405.08	404.13
<b>Standardní odchylka v délce</b>	154.04	163.57	
<b>Nejdelší čtená sekvence</b>	928	1,590	1,509
<b>Nejkratší čtená sekvence</b>	40	40	40
<b>Median délky čtených sekvencí</b>	440.0	450.0	445.0

**Tabulka 8** (nad popisem) Statistické zhodnocení sekvenačního běhu na GS FLX+ ukazuje tabulka 8 (nad tímto popisem). Regiony 1 a 2 odpovídají polovině PTP destičky. Je patrný rozdíl v hodnotách obou regionů způsobený zřejmě kvalitou RNA nebo knihoven mezi dvěma druhy. Žlutě zvýrazněné řádky představují zásadní hodnoty.

**Tabulka 9** (pod popisem) ukazuje počet kontigů (složených jednotlivých čtení) získaných programem Reference Mapper.

Tkáň	Region 1 <i>A. microps</i>			Region 2 <i>A. sylvaticus</i>		
	Testes	Slinné žlázy	Čichové sliznice	Testes	Slinné žlázy	Čichové sliznice
<b>Počet kontigů</b>	18905	14871	22840	17907	9372	23128

## 9 Repertoáry olfaktorických receptorů v transkriptomech dvou druhů rodu *Apodemus*

### 9.1 Repertoár olfaktorických receptorů v testes obou druhů

Jak již bylo výše uvedeno, získané sekvence (kontigy) jsme analyzovali pomocí algoritmu BLASTX s využitím volně dostupného programu Blast2Go (při základním nastavení vyhledávání). Tento program přiřazuje za název kontigu jméno proteinu s nejvyšší identitou. Program vyhledává pouze v předdefinovaných databázích, ze kterých jsme vybrali jako nejvhodnější (resp. jedinou vhodnou) databázi NCBI. Proto nese řada genů, kterým program Blast2Go přiřadí jméno nejlepšího výsledku vyhledávání, název predikovaného proteinu atd. To, jak jsme zjistili, může být problém při následném srovnání počtu genů exprimovaných ve dvou a více tkáních. Stane se tedy, že dvěma zřejmě identickým parciálním sekvencím, které se liší pouze délkou, program přiřadí dva odlišné názvy. Dalším problémem je značná nejednotnost názvů olfaktorických (hlavně odorantových) receptorů napříč druhy. Jednotlivé geny u více druhů nesou často stejný název, ač se nejedná o ortologní geny. Problémem je i opačný případ, kdy existují dva a více názvů pro identický gen (např. zmiňovaný MOR23, MOR267-13 či Olfr16 jsou identické geny, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/18313>). Oba případy zobrazuje první a druhý sloupec tabulky 10. Bylo tedy nutné ověřit sekvence olfaktorických receptorů a to vůči jedné, druhově specifické databázi. Všechny sekvence olfaktorických receptorů z testes obou druhů jsme tedy ověřili pomocí BLASTX na stránkách [http://www.ensembl.org/Mus\\_musculus/blastview](http://www.ensembl.org/Mus_musculus/blastview), kdy jsme vyhledávali nejlepší shodu vůči myši proteinové databázi. Výsledky vyhledávání zobrazuje tabulka 10.

Zjistili jsme, že repertoáry olfaktorických receptorů exprimovaných v testes obou druhů se dle sekvenačních výsledků podstatně liší. Nejbohatší část repertoáru olfaktorických receptorů u obou druhů tvoří odorantové receptory. Porovnání sekvenačních výsledků ukazuje 11 ORs exprimovaných v testes obou druhů. Porovnání dále ukazuje na 12 ORs exprimovaných pouze v testes myšice malooké a jiných 16 ORs exprimovaných v testes myšice křovinné. Celkový počet ORs exprimovaných v testes myšice křovinné a myšice malooké (27, resp. 23 ORs) se nijak zásadně neodlišuje od udávaného repertoáru ORs exprimovaných v testes u dalších hlodavců - potkana (25 ORs) či myši (22 ORs) (Vanderhaeghen et al. 1997). Takový výsledek ukazuje na jistou konzervativnost počtu exprimovaných receptorů mezi jednotlivými druhy hlodavců. Ve srovnání s detekcí 66 ORs



v testes pomocí mikročipů navržených na kompletní repertoár ORs myši (Zhang et al. 2004), je metoda 454 sekvence jistě méně senzitivní. Na druhou stranu lze očekávat, že tato námi užitá metoda zachytí pravděpodobně spíše ty transkripty, které jsou exprimovány nenáhodně a v dané tkáni jsou exprimovány účelně.

Testes obou druhů	Testes <i>A. sylvaticus</i>	Testes <i>A. microps</i>
<b>ODORANTOVÉ RECEPTORY</b>		
<b>Olfr161</b> (OR1361-like)	<i>A. sylvaticus</i>	<i>A. microps</i>
<b>Olfr734</b> (OR4m1-like)	<b>Olfr212</b> (OR212)	<b>Olfr378</b> (OR1)
<b>Olfr179/317</b> (OR317/OR2w3-like)	<b>Olfr711</b> (OR6-like)	<b>Olfr862</b> (OR58)
<b>Olfr128</b> (OR14j1-like)	<b>Olfr223</b> (OR15)	<b>Olfr201</b> (OR5ac1-like)
<b>Olfr312</b> (OR312)	<b>Olfr510</b> (OR484)	<b>Olfr976</b> (OR976)
<b>Olfr821</b> (OR821/OR6c74-like)	<b>Olfr204</b> (OR5ac1-like)	<b>Olfr767</b> (OR-likeProteini9)
<b>Olfr398</b> (OR398)	<b>Olfr126</b> (OR14j1-like)	<b>Olfr20</b> (OF5M2-like)
<b>Olfr285</b> (OR285/OR8s1-like)	<b>Olfr761</b> (OR14j1-like)	<b>Olfr156</b> (ORensp00000348552)
<b>Olfr1535</b> (OR2g6-like)	<b>Olfr543</b> (OR52k1-like)	<b>Olfr15</b> (OR2c1-like)
<b>Olfr706</b> (OR2ag1-like/OR2ag2-like)	<b>Olfr860</b> (OR58)	<b>Olfr116</b> (OR127)
<b>Olfr750</b> (OR6s1-like)	<b>Olfr1136</b> (OR1136)	<b>Olfr295</b> (OR292)
<b>CELKEM: 11 ORs</b>	<b>Olfr1137</b> (OR1136)	<b>Olfr31</b> (OR2t1-like)
	<b>Olfr213</b> (OR6c75-like)	<b>Olfr315</b> (OR2t33-like)
	<b>Olfr1351</b> (OF5M17-like)	<b>CELKEM: 12 ORs</b>
	<b>Olfr1352</b> (ORfamily7)	
	<b>Olfr157</b> (ORensp00000348552-like)	
	<b>Olfr594</b> (OR52e2-like)	
	<b>CELKEM: 16 ORs</b>	
<b>VOMERONASÁLNÍ RECEPTORY</b>		
<b>Vmn1r11-001</b>	<b>Vmn1r84-001</b>	<b>Vmn1r65-001</b>
	<b>Vmn1r9-001</b>	<b>Vmn2r10-001</b>
	<b>Vmn2r118-001</b>	
	<b>Vmn2r18-201</b>	
	<b>Vmn2r60-001</b>	
	<b>Vmn2r83-001</b>	
	<b>Vmn2r85-001</b>	
<b>TAARs</b>		
<b>Taar6-001</b>	<b>Taar9</b>	

**Tabulka 10** Porovnání jednotlivých detekovaných receptorů v testes mezi druhy myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*) a myšice malooké (*A. microps*). Ve sloupci „Testes obou druhů“ jsou zobrazeny ty receptory, které jsou exprimovány v testes obou druhů. Druhově specifické receptory jsou v odpovídajících dvou sloupcích. Za názvy odorantových receptorů jsou v závorkách uvedeny názvy získané pomocí programu Blast2Go, který vyhledává shody z databáze všech organismů. Blast2Go pojmenoval např. receptory Olfr126, 128 a 761 stejným názvem, ačkoliv jde dle výsledků BlastX vůči proteinové databázi myši o odlišné geny.

V testes jsme detekovali také další tři třídy olfaktorických receptorů: receptory asociované se stopovými aminy (TAARs), vomeronasální receptory typu 1 a 2 (V1R a V2R). Expresi VR1 v testes a na spermatidách již detekovali jiní autoři před námi (Tatsura et al. 2001; Wakabayashi et al. 2002; kapitola 2.5). Detekce exprese V2Rs a TAARs v testes zatím

zřejmě není popsána. Opět, u obou druhů myšic nacházíme jak receptory přítomné v testes obou druhů, tak receptory s potenciálně druhově specifickou expresí. Zájem poutá rovněž exprese Vmnr2r18 v testes, jelikož jde o receptor popsáný jako jediný vomeronasální receptor přítomný v sensorických neuronech Grünebergova ganglia (Fleischer et al. 2006). Sensorické neurony Grünebergova ganglia exprimují kromě zmíněného vomeronasálního receptoru zejména TAARs. Jedním z nich je rovněž Taar6 (Fleischer et al. 2007). Druhý receptor asociovaný se stopovými aminy, Taar9, je znám svojí expresí v epifyze člověka nebo také kosterním svalstvu, ale i dalších tkáních (nejen člověka) (Liberles & Buck 2006).

## 9.2 Olfaktorické receptory v čichových tkáních

Součástí sekvenačního běhu byla rovněž sekvenace smíšeného vzorku čichových tkání, tedy hlavního čichového epitelu a vomeronasálního orgánu. Pro takové řešení jsme se rozhodli zejména pro ne zcela jasné rozdělení exprese jednotlivých receptorových tříd mezi těmito tkáněmi. U obou druhů myšic repertoáry odorantových i vomeronasálních receptorů exprimovaných v čichových epitelech převyšují repertoáry přítomné v testes, což není žádným překvapením. Zmiňovaná studie detekce olfaktorických receptorů v tkáních myši pomocí mikročipů uvádí 817 ORs s výraznou expresí v hlavním čichovém epitelu (Zhang et al. 2004). Takové senzitivity nemůže použitá metoda 454 sekvenace přirozeně dosahovat. Přesto se domnívám, že poměrně vysoké hodnoty detekovaných transkriptů jsou v zásadě velmi dobrým výsledkem i s ohledem na obecně nízkou expresi GPCRs (Fredriksson & Schiöth 2005). Typický OR je exprimován pouze v jediném ze 100 000 olfaktorických sensorických neuronů (Vassar et al. 1993). Je tedy jasné, že abundance konkrétních transkriptů v čichovém epitelu bude zřejmě spíše nízká.

Naše výsledky zobrazují tabulky 11 a 12. Tabulka 11 ukazuje dramatický rozdíl v počtu osekvenovaných vomeronasálních receptorů přítomných v čichových epitelech mezi srovnávanými druhy. Výsledky sekvenace ukazují, že myšice křovinná exprimuje v čichové tkáni čtyřnásobný počet vomeronasálních receptorů, než myšice malooká (28 u *A. sylvaticus* vs. 7 *A. microps*). V zásadě stejně dramatickou situaci ilustruje rovněž tabulka 12, která se zabývá pouze detekcí odorantových receptorů v tkáních obou druhů. Zde naopak myšice malooká vykazuje výrazně vyšší počet osekvenovaných odorantových receptorů v čichových tkáních, než myšice křovinná (165 u *A. m.* vs. 63 u *A. s.*). Je samozřejmě otázkou, co tyto výsledky reálně znamenají pro oba druhy myšic.

Z tradičního pohledu na rozdělení rolí odorantových (detekce odorantů spojená s vědomými reakcemi) a vomeronasálních receptorů (detekce feromonů spojená s procesy nevědomé modulace fyziologie a chování) lze usuzovat na jeden zásadní rozdíl. Ten navíc koreluje s mírou sociality obou druhů a s mírou mimopárových paternit. Možná interpretace výsledků ukazuje na koincidenci většího repertoáru vomeronasálních receptorů, tedy receptorů spojovaných se spouštěním agresivity a sexuálního chování (Dulac & Torello 2003), a vysoké míry promiskuity a agresivity u myšice křovinné (Bryja et al. 2008). V této interpretaci koincidence míry promiskuity, míry sociality (Bryja & Stopka 2005) a počtu vomeronasálních receptorů lze rovněž interpretovat významně nižší počet vomeronasálních receptorů spíše monogamní myšice malooké. Jednodušeji: Výsledky ukazují na vyšší rozvoj (a tedy i vyšší význam) modulace chování u promiskuitnějšího druhu (myšice křovinné), ve srovnání s druhem spíše monogamním (myšice malooká). Více se tomuto věnuji v diskuzi.

Apodemus sylvaticus		Apodemus microps	
VOMERONASÁLNÍ RECEPTORY			
Testes (8)	Čichové tkáně (28)	Testes (3)	Čichové tkáně (7)
Vmn1r11	Vmnr1c3	Vmn1r11	Vmnr1Rd7
Vmn1r84	Vmnr1d16	Vmn1r65	Vmnr1Rj2
Vmn1r9	Vmnr1g7	Vmn2r10	Vmn2r77
Vmn2r118	Vmnr1r185		Vmn2r79
Vmn2r18	Vmnr1Ra9		Vmnr26
Vmn2r60	Vmnr1Ra16		Vmnr82
Vmn2r83	Vmnr1Rb2		VmnrRc28
Vmn2r85	Vmnr1Rb8		
	Vmnr1Rc21		
	Vmnr1Rc6		
	Vmnr1Re2		
	Vmnr1Re4		
	Vmnr1Re8		
	Vmnr1Rf1		
	Vmnr1Rf3		
	Vmnr1Rf4		
	Vmnr1Rh4		
	Vmnr1Ri1		
	Vmnr1Ri6		
	Vmnr1Ri7		
	Vmnr1Rj2		
	Vmnr26		
	Vmnr2R1		
	Vmnr2R26		
	Vmnr2r53		
	VmnrRc28		
	Vmn2r87		
	Vmn2r90		
TAARs			
Testes (2)	Čichové tkáně (0)	Testes (1)	Čichové tkáně (1)
Taar6		Taar6	Taar8c
Taar9			

**Tabulka 11** Srovnání repertoáru vomeronasálních receptorů a TAARs v čichových tkáních (hlavní olfaktorický epitel a vomeronasální orgán) mezi myšicí křovinnou (*Apodemus sylvaticus*) a myšicí malookou (*A. microps*).

**Tabulka 12** (další strana) Srovnání repertoáru odorantových receptorů v čichových (hlavního olfaktorického epitelu a vomeronasálního orgánu) a testikulárních tkáních mezi myšicí křovinnou (*A. sylvaticus*) a myšicí malookou (*A. microps*).

Apodemus sylvaticus			Apodemus microps				
Testes (27)	Čichové tkáně (63)		Testes (23)	Čichové tkáně (165)			
Olfr 126	Olfr 6	Olfr 711	Olfr 15	Olfr 1	Olfr 450	Olfr 885	Olfr 1307
Olfr 128	Olfr 15	Olfr 786	Olfr 20	Olfr 33	Olfr 453	Olfr 894	Olfr 1314
Olfr 157	Olfr 33	Olfr 802	Olfr 31	Olfr 44	Olfr 458	Olfr 906	Olfr 1337
Olfr 161	Olfr 50	Olfr 810	Olfr 116	Olfr 51	Olfr 464	Olfr 907	Olfr 1353
Olfr 179	Olfr 101	Olfr 834	Olfr 128	Olfr 52	Olfr 491	Olfr 908	Olfr 1360
Olfr 204	Olfr 107	Olfr 846	Olfr 156	Olfr 53	Olfr 497	Olfr 909	Olfr 1366
Olfr 212	Olfr 109	Olfr 851	Olfr 161	Olfr 60	Olfr 507	Olfr 910	Olfr 1368
Olfr 213	Olfr 111	Olfr 862	Olfr 179	Olfr 61	Olfr 508	Olfr 914	Olfr 1377
Olfr 223	Olfr 112	Olfr 888	Olfr 201	Olfr 93	Olfr 527	Olfr 922	Olfr 1378
Olfr 285	Olfr 113	Olfr 889	Olfr 285	Olfr 97	Olfr 530	Olfr 938	Olfr 1389
Olfr 312	Olfr 116	Olfr 909	Olfr 295	Olfr 98	Olfr 555	Olfr 955	Olfr 1392
Olfr 398	Olfr 120	Olfr 912	Olfr 312	Olfr 124	Olfr 564	Olfr 960	Olfr 1428
Olfr 510	Olfr 121	Olfr 983	Olfr 315	Olfr 130	Olfr 568	Olfr 963	Olfr 1437
Olfr 543	Olfr 122	Olfr 10C1 like	Olfr 378	Olfr 134	Olfr 570	Olfr 965	Olfr 1450
Olfr 594	Olfr 124		Olfr 398	Olfr 136	Olfr 578	Olfr 970	Olfr 1454
Olfr 706	Olfr 126		Olfr 706	Olfr 139	Olfr 592	Olfr 975	Olfr 1474
Olfr 711	Olfr 127		Olfr 734	Olfr 154	Olfr 605	Olfr 976	Olfr 1511
Olfr 734	Olfr 128		Olfr 750	Olfr 161	Olfr 609	Olfr 981	Olfr 1513
Olfr 750	Olfr 130		Olfr 767	Olfr 174	Olfr 610	Olfr 985	
Olfr 761	Olfr 131		Olfr 821	Olfr 177	Olfr 615	Olfr 993	
Olfr 821	Olfr 135		Olfr 862	Olfr 179	Olfr 640	Olfr 995	
Olfr 860	Olfr 136		Olfr 976	Olfr 181	Olfr 644	Olfr 1009	
Olfr 1136	Olfr 140		Olfr 1535	Olfr 187	Olfr 646	Olfr 1010	
Olfr 1137	Olfr 142			Olfr 195	Olfr 651	Olfr 1015	
Olfr 1351	Olfr 144			Olfr 196	Olfr 666	Olfr 1018	
Olfr 1352	Olfr 161			Olfr 197	Olfr 677	Olfr 1019	
Olfr 1535	Olfr 201			Olfr 201	Olfr 683	Olfr 1023	
	Olfr 211			Olfr 202	Olfr 684	Olfr 1030	
	Olfr 212			Olfr 211	Olfr 685	Olfr 1032	
	Olfr 273			Olfr 213	Olfr 689	Olfr 1038	
	Olfr 298			Olfr 220	Olfr 710	Olfr 1042	
	Olfr 319			Olfr 221	Olfr 716	Olfr 1043	
	Olfr 324			Olfr 229	Olfr 730	Olfr 1044	
	Olfr 348			Olfr 231	Olfr 734	Olfr 1057	
	Olfr 414			Olfr 318	Olfr 745	Olfr 1079	
	Olfr 449			Olfr 319	Olfr 746	Olfr 1095	
	Olfr 452			Olfr 323	Olfr 748	Olfr 1123	
	Olfr 457			Olfr 329	Olfr 749	Olfr 1124	
	Olfr 476			Olfr 332	Olfr 777	Olfr 1141	
	Olfr 479			Olfr 365	Olfr 784	Olfr 1170	
	Olfr 484			Olfr 368	Olfr 788	Olfr 1183	
	Olfr 488			Olfr 381	Olfr 834	Olfr 1189	
	Olfr 518			Olfr 382	Olfr 837	Olfr 1223	
	Olfr 533			Olfr 390	Olfr 847	Olfr 1226	
	Olfr 539			Olfr 403	Olfr 854	Olfr 1241	
	Olfr 552			Olfr 419	Olfr 857	Olfr 1252	
	Olfr 574			Olfr 432	Olfr 866	Olfr 1259	
	Olfr 671			Olfr 446	Olfr 869	Olfr 1274	
	Olfr 672			Olfr 449	Olfr 876	Olfr 1299	

Rodina receptorů asociovaných se stopovými aminy byla popsána jako druhá třída receptorů olfaktorického epitelu (Liberles & Buck 2006). Tomu naše výsledky prakticky vůbec neodpovídají, když podle výsledků sekvenace nacházíme pouze jediný receptor této rodiny Taar8c exprimovaný pouze ve směsném vzorku čichových epitelů myšice malooké. Zajímavé je, že jde o receptor zapojený v detekci stopových aminů v moči potkana (Ferrero et al. 2011).

### **9.3 Statistické zhodnocení distribuce exprese olfaktorických receptorů**

V předchozí kapitole jsem komentoval nápadnou koincidence vyššího množství vomeronasálních receptorů u druhu s vyšší mírou promiskuity. Naše výsledky (tabulky 10, 11 a 12) dále ukazují na vyšší repertoáry všech rodin olfaktorických receptorů v testes myšice křovinné a na výrazně vyšší počet odorantových receptorů v čichových tkáních myšice malooké. Rozhodli jsme se dále statisticky zhodnotit významnost proporční distribuce v testes a čichových tkáních v mezidruhovém srovnání pomocí Fischerova testu. Ten ukázal na nenáhodnost takové distribuce celkového množství olfaktorických receptorů ve dvou tkáních myšic ( $p < 0,00042$ ). Tento výsledek tedy ukazuje na (potenciálně funkčně) významný vyšší podíl olfaktorických receptorů v testes myšice křovinné ve srovnání s myšicí malookou. U té může naopak znamenat potenciálně vyšší důležitost exprese většího množství receptorů v čichových epitelech. Stejný test jsme provedli pro všechny tři skupiny receptorů nezávisle. Hodnoty testu ukázaly na nenáhodnou distribuci exprese odorantových receptorů v tkáních ( $p < 6,36 \times 10^9$ ). U zbylých tříd receptorů možný význam exprese receptorů ve dvou tkáních daný test statisticky nepodporuje (VRs:  $p > 0,27$ ; TAARs:  $p = 0,5$ ).

## **10 Výsledky relativní kvantifikace genové exprese**

Statistické testy nemusí vypovídat o funkčním významu exprese konkrétních receptorů prakticky nic. Rozhodli jsme se proto ověřit a porovnat míru relativní exprese vybraných receptorů pomocí metody real-time PCR. K návrhu primerů pro real-time PCR jsme použili sekvenace získané pomocí transkriptomového sekvenování (kapitola 7.1). Pomocí relativní kvantifikace genové exprese jsme se rozhodli analyzovat:

- 1) Relativní míru exprese v testes a čichových tkáních obou druhů myšic. Zajímalo nás, zda exprese vybraných receptorů ukáže v mezidruhovém srovnání nějaký rozdíl. Abychom získali statisticky podložené výsledky, provedli jsme

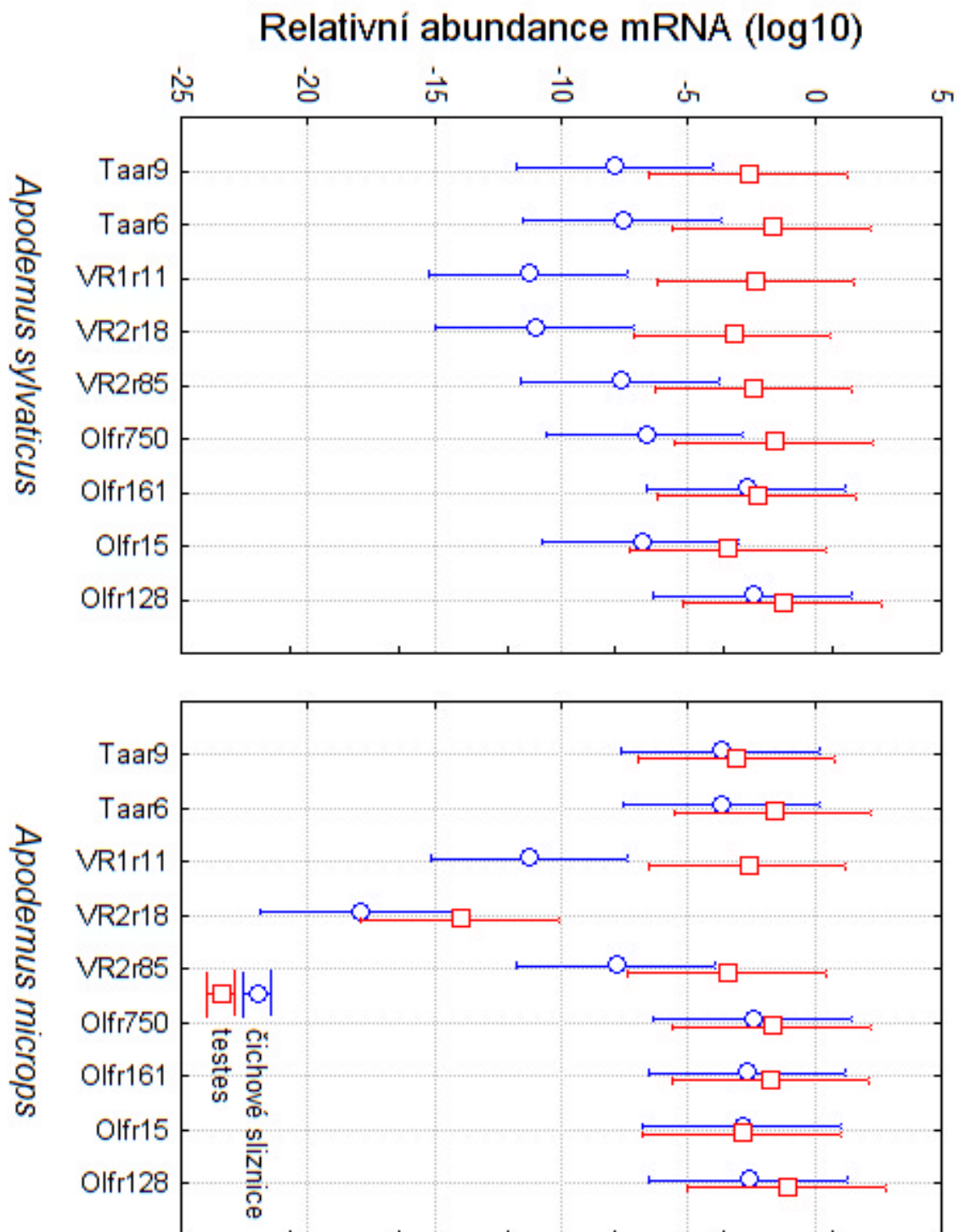
stanovení relativní exprese u 4 jedinců obou druhů. Výsledky uvádím v kapitole 10.1.

2) Druhým cílem bylo zjistit, zda jsou olfaktorické receptory identifikované v testikulární tkáni exprimovány rovněž v jednotlivých stádiích spermatogeneze. Jelikož pracujeme s volně žijícími, nemodelovými organismy, byli jsme značně limitováni dostupnými tkáněmi (např. následek dlouhé zimy počátku tohoto roku). Tato limitace je důvodem absence tkání myšice malooké v následující analýze exprese olfaktorických receptorů v jednotlivých stádiích spermatogeneze. Předpokládáme však, že se receptory detekované v testes obou druhů myšic, potvrzené ve spermatogenních stádiích jednoho druhu, budou s velkou pravděpodobností exprimovat u druhého druhu tamtéž. Výsledky uvádím v kapitole 10.2.

### **10.1 Expresse receptorů v čichových a testikulárních tkáních dvou druhů**

Naměřené a vypočtené hodnoty relativních expresí (postup získání a výpočtu dat v kapitole 7) devíti olfaktorických receptorů jsme dále analyzovali pomocí programu STATISTICA (StarSoft). Pro analýzu rozdílů exprese vybraných receptorů ve dvou tkáních u dat ze čtyř jedinců obou druhů jsme zvolili metodu ANOVA. Výsledky analýzy zobrazuje graf 1. Srovnání variance expresí receptorů ve dvou tkáních ukazuje, že hodnoty expresí receptorů v čichové tkáni nikdy nepřevyšují hodnoty exprese v testes ani u jednoho z druhů. Analýza interakce druh-gen-tkáň neodhalila žádný signifikantní rozdíl mezi dvěma druhy myšic a expresním vzorcem ve studovaných tkáních ( $F(8,108)=0,29436$ ;  $p=0,96651$ ). Následný Fischerův Post-hoc test ukazuje na několik potenciálně významných odlišností v expresi receptorů v mezidruhovém srovnání. Expresse Taar6 v testes myšice křovinné ukazuje na signifikantně vyšší míru exprese než v nosní tkáni ( $p=0,035$ ). Rovněž v případě Taar9 nacházíme vyšší míru exprese v testes myšice křovinné, nicméně ta leží těsně za hranicí signifikace ( $P=0,06$ ). Naproti tomu expresse stejných genů v testes a čichových tkáních u myšice malooké nevykazují žádný signifikantní rozdíl. V případě vomeronasálního receptoru Vmnr1r11 (dále VR1r11) nacházíme u obou druhů signifikantně vyšší expresi v testes ( $p=0,002$  u *A. sylvaticus*;  $p=0,003$  u *A. microps*). Velký rozdíl v mezidruhovém srovnání vykazuje expresse vomeronasálního receptoru typu 2, Vmnr2r18 (dále VR2r18), jehož expresse v tkáních myšice malooké je o 15 řádů nižší, než expresse daného genu v testes myšice křovinné. U té je tento receptor opět výrazně více exprimován v testes než v čichových tkáních ( $p = 0,006$ ). Podobný trend u stejného druhu vykazuje rovněž další receptor skupiny

V2R, Vmnr2r85 (dále VR2r85), u kterého však rozdíl leží na hranici významnosti ( $p=0,06$ ). Žádný ze studovaných odorantových receptorů nevykazuje statisticky významné diference v expresi mezi čichovými tkáněmi a testes. Určitý trend vyšší exprese v testes ve srovnání s čichovými tkáněmi vykazuje pouze Olf750 ( $p=0,07$ ).



**Graf 1** Zobrazení průměrných hodnot relativní exprese (relativní abundance mRNA) 9 genů pro olfaktorické receptory. Variabilitu v hodnotách relativní exprese zobrazují konfidenční intervaly. Exprese byla měřena ve dvou tkáních (testes a

čichové tkáně) u 4 jedinců obou druhů myšic (*A. microps* a *A. sylvaticus*). Expresí těchto genů byla vztažena k expresi RPLP1. Vytvořeno v programu STATISTICA.

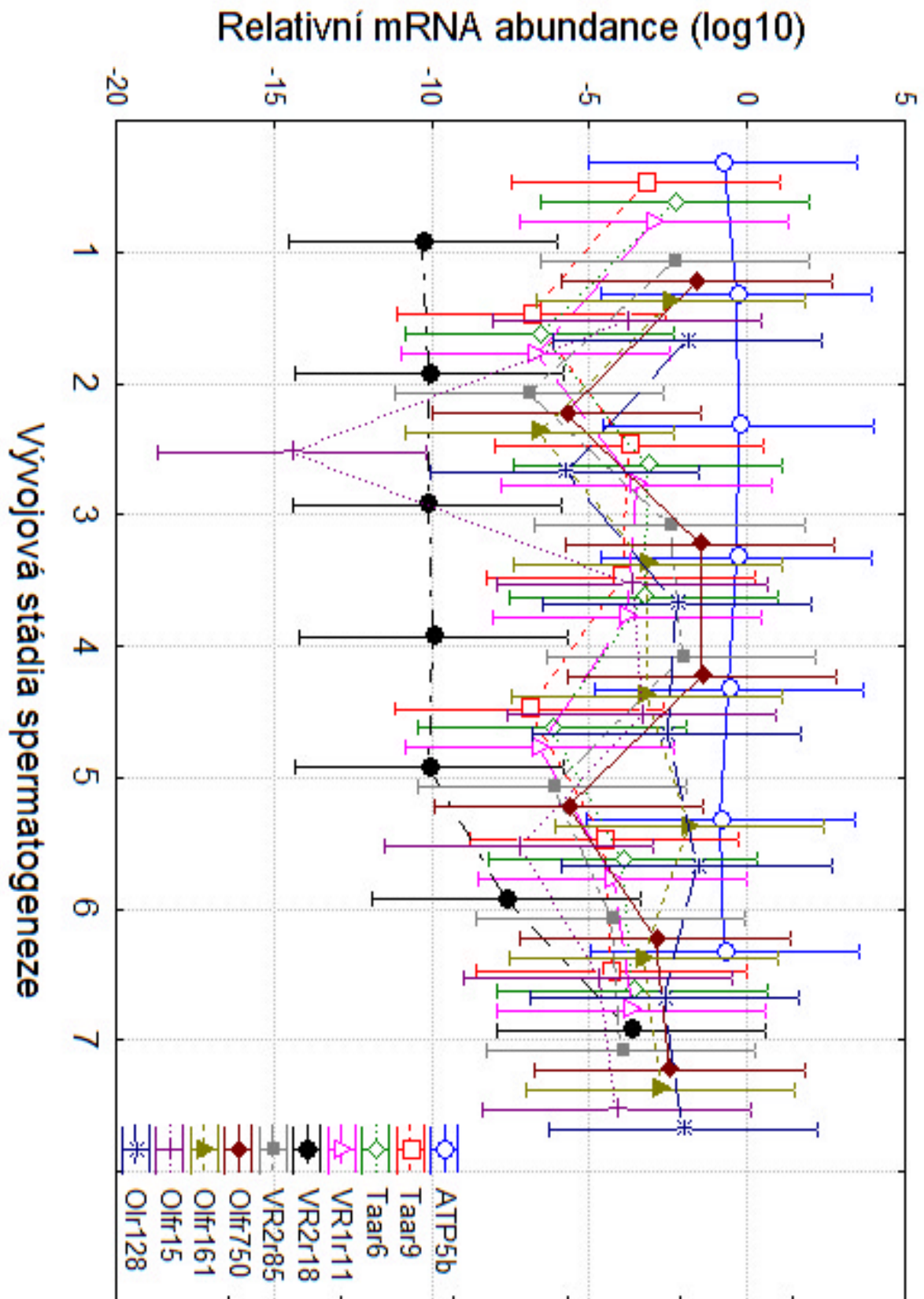
## 10.2 Expresí receptorů v jednotlivých stádiích spermatogeneze

Jednotlivá stádia spermatogeneze byla získána z testes 4 jedinců myšice křovinné pomocí metody FACS. Jedná se o spermatogonie (S1), primární spermatocyty ve třech fázích: leptotene (S2), zygotene (S3) a pachytene (S4); dále sekundární spermatocyty (S5), dozrávající spermie přítomné v hlavě (S6) a ocasu (S7) nadvarlete. Pro relativní kvantifikace exprese jsme opět užili referenčního genu RPLP1. Jak ukazuje graf 2, expresi tohoto referenčního genu velmi dobře sleduje expresí dalšího potenciálního referenčního genu – ATP5b. Hodnoty relativní exprese jsme analyzovali v programu STATISTICA (StarSoft) s využitím metody ANOVA při opakovaných měřeních. Jak je patné z grafu 2, mezi expresí genů v daných stádiích S1-S7 nenalézáme signifikantní rozdíly (ANOVA testování genu proti fázi,  $p=0,999$ ). Výjimku představuje VR2r18, jehož expresí se liší od ostatních genů (Fischer Post-hoc test). Ve fázích S1-S5 je expresí tohoto genu signifikantně nižší vůči referenčnímu genu RPLP1 ( $p<0,0001$ ). Poté strmě narůstá až na úroveň míry exprese ostatních olfaktorických genů. Rovněž porovnání míry exprese genu VR2r18 ve fázi S7 vůči fázím S1 až S5 vykazuje signifikantní rozdíl (S7 vs. S1:  $p=0,031$ ; S7 vs. S2:  $p=0,037$ ; S7 vs. S3:  $p=0,036$ ; S7 vs. S4:  $p=0,042$ ; S7 vs. S5:  $p=0,037$ ). Výrazný nástup tohoto genu v závěrečných fázích spermatogeneze (resp. zrání spermií) v nadvarleti ukazuje na jeho možnou důležitost ve zralých spermiích (např. kapacitace spermií nebo účast v chemotaxi). Výsledek v zásadě potvrzuje detekci vomeronasálních receptorů typu 1 (TVR2 a TVR7) pomocí *in situ* hybridizace v oválných a elongovaných spermatidách (Tatsura et al. 2001).

Ostatní geny vykazují vzájemně podobné expresní vzorce napříč stádii. S ATP5b a RPLP1 (nultá hodnota, jde o referenční gen) vykazují podobnou expresi ve stádiích S6 a S7, která je charakterizována závěrečným horizontálním narovnáním křivky procházející průměry relativních expresí. Tuto část expresních křivek lze pravděpodobně vysvětlit postupným vypínáním exprese a postupnou degradací RNA ve stádiích dozrávání spermií (S6 až S7). Podobný průběh exprese většiny sledovaných receptorů napříč jednotlivými stádii nevylučuje možné zapojení genů ve spermatogenezi. K tomuto ostatně dochází i Fukuda & Touhara (2006), kteří detekují s využitím metody *in situ* hybridizace, expresi několika odorantových receptorů v pachytene spermatocytů a následujících stádiích.



**Graf 2** Graf zobrazuje průměrné hodnoty relativní exprese 9 genů pro olfaktorické receptory. Variabilitu naměřených hodnot zobrazují konfidenční intervaly. Číselné označení vývojových stádií: 1 - spermatogonie, další tři odpovídají stádiím primárních spermatocytů (2 – leptotene, 3 - zygotene, 4 - pachytene), 5 – sekundární spermatocyty, dále dozrávající spermie v hlavě (6) a ocasu (7) nadvarlete.



## Diskuze

Expresie olfaktorických receptorů v testes a dalších tkáních je centrem zájmu řady studií prakticky již od objevení rodiny odorantových receptorů (Buck & Axel 1991). Již od prvních studií (Parmentier et al. 1992; Vanderhaeghen et al. 1993) se tato exprese mimo čichové tkáň označuje jako „ektopická“ a tento termín se dále užívá (De la Cruz et al. 2009). Ostatně, tato práce není výjimkou. S aplikací nových technik na tuto oblast „ektopické exprese“ olfaktorických receptorů se stále více ukazuje, že zejména odorantové receptory často mají v dalších tkáních (srdce, plíce atd.) vyšší expresi než v samotném olfaktorickém epitelu (Feldmesser et al. 2006; Zhang, Cruz, et al. 2007). Nové poznatky ukazují rovněž na funkční zapojení olfaktorických receptorů v potenciálně biomedicínsky významných procesech jako je reparace svalové tkáň (Griffin et al. 2009; Pavlath 2010). Zjištěny byly rovněž v migratorní fázi primordiálních buněk lidských embryí (Goto et al. 2001) a zřejmě mohou představovat klíčové molekuly zodpovědné za chemotaxi spermií (Spehr et al. 2003; Fukuda et al. 2004). Vystává tak otázka, co je vlastně primárním místem exprese olfaktorických receptorů a co je jejich primární rolí. Výsledky prezentované v této práci by mohly přispět k pochopení tohoto problému.

Výsledky srovnání relativní exprese osmi studovaných genů v jednotlivých stádiích spermatogeneze ukazují na podobnou diferenciální genovou expresi napříč stádii. To ukazuje jednak na nenáhodné zapínání a vypínání genové exprese, které je společné studovaným genům, jednak na možné zapojení studovaných genů ve spermatogenezi. K podobnému závěru v otázce exprese odorantových receptorů dochází i Fukuda & Touhara (2006). Výrazně odlišným případem se zdá být exprese vomeronasálního receptoru *Vmnr2r18*, jehož množství strmě narůstá v posledních zkoumaných stádiích (dozrávající spermie hlavy a ocasu nadvarlete). Tento receptor by mohl představovat potenciálně dalšího kandidáta na funkci ve zralých spermiích, třeba právě v chemotaxi spermií nebo dalších zásadních procesech (kapacitace). Obáváme se však, že použitý způsob analýzy abundance mRNA pomocí relativní kvantifikace vůči referenčnímu genu může být problematickým v případě studia exprese v posledních stádiích dozrávání spermií. Zde lze očekávat vypínání genové exprese (Hecht 1998) a je tedy otázkou, zda strmé stoupání exprese genu *Vmnr2r18* není nějak ovlivněno právě efekty spojenými s degradací mRNA a vypínáním exprese. Oba procesy by zřejmě mnohem více postihly abundanci mRNA vysoce exprimovaných genů, jakými jsou právě referenční *RPLP1* či jeho expresi sledující *ATP5b*, což by zapříčinilo zkreslení v trendu relativní exprese zbylých genů. Bude tedy nanejvýš vhodné ověřit vzorec exprese

referenčních genů, nejlépe asi pomocí absolutní kvantifikace. Na druhou stranu, naše výsledky nejsou v rozporu s metodicky odlišnou studií, která rovněž detekuje expresi vomeronasálního receptoru až právě ve vývojových stádiích oválných a elongovaných spermatid (Tatsura et al. 2001). Tato stadia v naší analýze chybí. Posledním stádiem získaným pomocí metody FACS z testes jsou sekundární spermatocyty, které vykazují velmi nízkou relativní expresi *Vmnr2r18*. Dohromady s výsledky zmiňované práce (Tatsura et al. 2001) však můžeme spekulovat o spuštění transkripce VR genů ihned poté, co sekundární spermatocyty podstoupí druhé meiotické dělení a vstoupí do dalšího stádia spermatogeneze a stanou se z nich spermatidy. V takovém případě by šlo jistě o velmi zajímavý proces, neboť exprese daného genu *Vmnr2r18* by – v případě správnosti našich dat – mohla souviset s migrací nezralých spermií z testes do nadvarlete. Podle našich dat nemůžeme vyloučit ani případnou funkci dalších analyzovaných receptorů ve zralých spermiích. To bude předmětem dalšího bádání. Široký repertoár receptorů, včetně těch detekujících biogenní či stopové aminy (TAARs) a krátké peptidy (V2Rs), by v případě funkce ve zralých spermiích mohl vytvářet ze spermatických vláčků „detekční monstra“ par excellence, ne nepodobná čichovým orgánům hlodavců.

V této práci jsem se věnoval rovněž mezidruhovému porovnání repertoáru olfaktorických receptorů mezi čichovými tkáněmi a testes. Velikost a rozdíl repertoárů olfaktorických receptorů přítomných v testes a čichových tkáních obou druhů ukazují na statistickou nenáhodnost takového druhově specifického rozložení (Fischerův exaktní test,  $p < 0,00042$ ). Jak už jsem diskutoval v kapitole 9.2, rozdílné podíly exprimovaných receptorů v testes u obou druhů myšic mohou být mj. důsledkem odlišného sociálního uspořádání těchto dvou druhů. Tomu by ostatně nasvědčovaly i výsledky srovnání míry relativních expresí mezi čichovou tkání a testes. U myšice křovinné jsme pozorovali vyšší expresi v testes hned u několika receptorů (ať již těsně za hranicí či v rámci signifikance), zatímco u myšice malooké jen u jediného. Je samozřejmě otázkou, co by udělalo rozšíření analýzy o další receptory, neboť porovnáváme pouze  $\sim 1/3$  genů pro olfaktorické receptory, které jsme zachytili pomocí sekvenace transkriptomu testes. Zde prezentované výsledky však vcelku jednotně ukazují na vyšší expresi olfaktorických receptorů v čichových tkáních myšice malooké ve srovnání s myšicí křovinnou. Možných vysvětlení tohoto jevu je jistě mnoho. Mezidruhové srovnání ukazuje na rozdílné sociální chování a rozdílnou míru mimopárových paternit. V pomyslném kontinuu monogamie-promiskuita stojí myšice malooká s nižším podílem mimopárových paternit blíže monogamii, zatímco myšice křovinná je promiskuitní druh (Bryja & Stopka

2005; Bryja et al. 2008). Je možné, že tento zásadní rozdíl, který se mj. projevuje v odlišné strategii výběru partnera, může stát za vyšší expresí olfaktorických receptorů v čichových neuroepitелеch myšice malooké. Ta je totiž spíše monogamním druhem a jako takový musí investovat do výběru partnera více, než promiskuitní myšice křovinná (Stopka & Graciasová 2001). U té lze naopak předpokládat větší investici do proteinů účastnících se kompetice spermií (Immler et al. 2007), kterými právě olfaktorické receptory potenciálně participující na chemotaxi spermií mohou jistě být (Spehr et al. 2003; Fukuda et al. 2004).

Jak ukazují studie genetického polymorfismu v lokusu pro arginin-vasopresinový receptor (V1aR) u rodu *Microtus* (Nair & Young 2006) a člověka (Walum et al. 2008), geny či jejich varianty mohou ovlivňovat chování i na takové úrovni, jakým je samčí preference tvorby párů (tedy i preference monogamie). V podobném duchu bychom mohli vysvětlit mnohem vyšší přítomnost vomeronasálních receptorů, konkrétně V1Rs, u myšice křovinné či naopak, menší repertoár těchto genů u myšice malooké (viz tabulka 11). Tyto proteiny jsou totiž zapojeny ve vazbě feromonů, látek ovlivňujících chování a fyziologii, mimo jiné jsou spojovány se spouštěním agresivity nebo také sexuálního chování (Dulac & Torello 2003). Lze tedy diskutovat o tom, že například výrazně agresivnější chování myšice křovinné, stejně jako její promiskuita, je spojena právě s vyšším repertoárem vomeronasálních receptorů, které spouští po aktivaci feromonem příslušné neurální centra vedoucí ke změně chování a fyziologie. Opakem by mohl být případ myšice malooké, která by v takovém případě více spoléhala na olfaktorické receptory a také na neurální okruhy, se kterými jsou spojeny. Olfaktorické receptory sice nejsou tradičně spojovány s ovlivňováním sexuálního chování, nicméně rostoucí evidence toho, že tomu tak může být, tento pohled mění (Touhara & Vosshall 2009). Názorným příkladem je (opět spíše monogamní) člověk, který vykazuje expresi odorantového receptoru potenciálně zodpovědného za chemotaxi lidských spermií zároveň v testes a čichovém epitelu (Spehr et al. 2004). Látkou vyvolávající chemotaxi spermií je bourgeonal (Spehr et al. 2003) – látka hojně využívaná v parfémtech. A právě muži jsou ti, kteří vykazují výrazně vyšší senzitivitu k tomuto odorantu ve srovnání s ženami (Olsson & Laska 2010). Leslie Vosshall (2004) vtipně komentuje tuto koincidenci duální exprese odorantového receptoru v kontextu fenoménu „lásky na první pohled“. Až další studium ukáže, zda takovou „lásku na první počich“ můžeme očekávat třeba i u myšic.

## Závěr

- Pomocí transkriptomového sekvenování jsme získali repertoáry olfaktorických receptorů přítomných v testes dvou druhů myšic. Výsledky sekvenace ukazují na odlišné repertoáry genů pro olfaktorické receptory exprimované v jednotlivých tkáních. Statistické zhodnocení podílu exprimovaných receptorů v testes a čichových tkáních dvou druhů rodu *Apodemus* ukazuje na nenáhodnost takového rozložení (Fischerův exaktní test,  $p < 0,00042$ ).
- Porovnání míry relativní exprese vybraných olfaktorických receptorů v testes a čichových tkáních u čtyř jedinců obou druhů ukázalo na vyšší expresi vybraných receptorů v testes. Myšice křovinná vykazuje několik receptorů se signifikantně vyšší relativní expresí v testes, myšice malooká vykazuje takový receptor jen jeden. Výsledky prvních dvou cílů diskutuji v kontextu rozdílného sociálního a párovacího systému těchto dvou druhů myšic.
- Ověřili jsme expresi genů vybraných olfaktorických receptorů v jednotlivých stádiích spermatogenese myšice křovinné. Ukázali jsme na jejich potenciální roli v tomto procesu tvorby a zrání spermií.

## Literatura

- Ahmadian, A., Ehn, M. & Hober, S., 2006. Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta*, 363(1-2), s.83–94.
- Asai, H. et al., 1996. Genomic Structure and Transcription of a Murine Odorant Receptor Gene: Differential Initiation of Transcription in the Olfactory and Testicular Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 221(2), s.240–247.
- Boehm, T. & Zufall, F., 2006. MHC peptides and the sensory evaluation of genotype. *Trends in Neurosciences*, 29(2), s.100–107.
- Borowsky, B. et al., 2001. Trace amines: Identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(16), s.8966–8971.
- Branscomb, A., Seger, J. & White, R.L., 2000. Evolution of Odorant Receptors Expressed in Mammalian Testes. *Genetics*, 156(2), s.785–797.
- Brechbühl, J., Klaey, M. & Broillet, M.-C., 2008. Grueneberg Ganglion Cells Mediate Alarm Pheromone Detection in Mice. *Science*, 321(5892), s.1092–1095.
- Bryja, J. et al., 2008. Varying levels of female promiscuity in four Apodemus mice species. *Behavioral Ecology & Sociobiology*, 63(2), s.251–260.
- Bryja, J. & Stopka, P., 2005. Facultative promiscuity in a presumably monogamous mouse Apodemus microps. *Acta Theriologica*, 50(2), s.189–196.
- Brykczynska, U. et al., 2013. Contrasted evolution of the vomeronasal receptor repertoires in mammals and squamate reptiles. *Genome biology and evolution*, 5(2), s.389–401.
- Buck, L. & Axel, R., 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65(1), s.175–187.
- Bunzow, J.R. et al., 2001. Amphetamine, 3,4-Methylenedioxymethamphetamine, Lysergic Acid Diethylamide, and Metabolites of the Catecholamine Neurotransmitters Are Agonists of a Rat Trace Amine Receptor. *Molecular Pharmacology*, 60(6), s.1181–1188.
- Carninci, P. et al., 2000. Normalization and Subtraction of Cap-Trapper-Selected cDNAs to Prepare Full-Length cDNA Libraries for Rapid Discovery of New Genes. *Genome Research*, 10(10), s.1617–1630.
- De la Cruz, O. et al., 2009. A signature of evolutionary constraint on a subset of ectopically expressed olfactory receptor genes. *Molecular Biology and Evolution*, 26(3), s.491–494.
- Cui, T. et al., 2013. Olfactory receptor 51E1 protein as a potential novel tissue biomarker for small intestine neuroendocrine carcinomas. *European Journal of Endocrinology*, 168(2), s.253–261.
- DeAngelis, M.M., Wang, D.G. & Hawkins, T.L., 1995. Solid-phase reversible immobilization for the isolation of PCR products. *Nucleic Acids Research*, 23(22), s.4742–4743.
- Droege, M. & Hill, B., 2008. The Genome Sequencer FLX™ System—Longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets. *Journal of Biotechnology*, 136(1–2), s.3–10.
- Dukes, J.P. et al., 2006. Isolation and characterisation of main olfactory and vomeronasal receptor gene families from the Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Gene*, 371(2), s.257–267.

- Dulac, C. & Axel, R., 1995. A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell*, 83(2), s.195–206.
- Dulac, C. & Torello, A.T., 2003. Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. *Nature Reviews. Neuroscience*, 4(7), s.551–562.
- Feldmesser, E. et al., 2006. Widespread ectopic expression of olfactory receptor genes. *BMC Genomics*, 7, s.121.
- Ferrero, D.M. et al., 2011. Detection and avoidance of a carnivore odor by prey. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(27), s.11235–11240.
- Fleischer, J. et al., 2006. Olfactory receptors and signalling elements in the Grueneberg ganglion. *Journal of Neurochemistry*, 98(2), s.543–554.
- Fleischer, J., Breer, H. & Strotmann, J., 2009. Mammalian olfactory receptors. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 3, s.9.
- Fleischer, J., Schwarzenbacher, K. & Breer, H., 2007. Expression of Trace Amine–Associated Receptors in the Grueneberg Ganglion. *Chemical Senses*, 32(6), s.623–631.
- Fredriksson, R. & Schiöth, H.B., 2005. The Repertoire of G-Protein–Coupled Receptors in Fully Sequenced Genomes. *Molecular Pharmacology*, 67(5), s.1414–1425.
- Freitag, J. et al., 1995. Two classes of olfactory receptors in *xenopus laevis*. *Neuron*, 15(6), s.1383–1392.
- Fukuda, N. et al., 2004. Functional characterization of a mouse testicular olfactory receptor and its role in chemosensing and in regulation of sperm motility. *Journal of Cell Science*, 117(24), s.5835–5845.
- Fukuda, N. & Touhara, K., 2006. Developmental expression patterns of testicular olfactory receptor genes during mouse spermatogenesis. *Genes to Cells*, 11(1), s.71–81.
- Gharizadeh, B. et al., 2002. Long-Read Pyrosequencing Using Pure 2'-Deoxyadenosine-5'-O'-(1-thiotriphosphate) Sp-Isomer. *Analytical Biochemistry*, 301(1), s.82–90.
- Gilad, Y. et al., 2004. Loss of Olfactory Receptor Genes Coincides with the Acquisition of Full Trichromatic Vision in Primates. *PLoS Biol*, 2(1), s.e5.
- Gloriam, D.E.I. et al., 2005. The repertoire of trace amine G-protein-coupled receptors: large expansion in zebrafish. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 35(2), s.470–482.
- Glusman, G. et al., 2001. The Complete Human Olfactory Subgenome. *Genome Research*, 11(5), s.685–702.
- Goto, T., Salpekar, A. & Monk, M., 2001. Expression of a testis-specific member of the olfactory receptor gene family in human primordial germ cells. *Molecular Human Reproduction*, 7(6), s.553–558.
- Griffin, C.A., Kafadar, K.A. & Pavlath, G.K., 2009. MOR23 promotes muscle regeneration and regulates cell adhesion and migration. *Developmental Cell*, 17(5), s.649–661.
- Grosmaître, X. et al., 2009. SR1, a Mouse Odorant Receptor with an Unusually Broad Response Profile. *The Journal of Neuroscience*, 29(46), s.14545–14552.

- Grus, W.E., Shi, P. & Zhang, J., 2007. Largest Vertebrate Vomeronasal Type 1 Receptor Gene Repertoire in the Semiaquatic Platypus. *Molecular Biology and Evolution*, 24(10), s.2153–2157.
- Haga, S. et al., 2010. The male mouse pheromone ESP1 enhances female sexual receptive behaviour through a specific vomeronasal receptor. *Nature*, 466(7302), s.118–122.
- Hashiguchi, Y. & Nishida, M., 2007. Evolution of Trace Amine–Associated Receptor (TAAR) Gene Family in Vertebrates: Lineage-Specific Expansions and Degradations of a Second Class of Vertebrate Chemosensory Receptors Expressed in the Olfactory Epithelium. *Molecular Biology and Evolution*, 24(9), s.2099–2107.
- Hecht, N.B., 1998. Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. *BioEssays*, 20(7), s.555–561.
- Herrada, G. & Dulac, C., 1997. A Novel Family of Putative Pheromone Receptors in Mammals with a Topographically Organized and Sexually Dimorphic Distribution. *Cell*, 90(4), s.763–773.
- Houck, L.D. et al., 2007. A new vertebrate courtship pheromone, PMF, affects female receptivity in a terrestrial salamander. *Animal Behaviour*, 73(2), s.315–320.
- Houck, L.D., 2009. Pheromone Communication in Amphibians and Reptiles. *Annual Review of Physiology*, 71(1), s.161–176.
- Chamero, P. et al., 2007. Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. *Nature*, 450(7171), s.899–902.
- Chamero, P., Leinders-Zufall, T. & Zufall, F., 2012. From genes to social communication: molecular sensing by the vomeronasal organ. *Trends in Neurosciences*, 35(10), s.597–606.
- Churcher, A.M. & Taylor, J.S., 2009. Amphioxus (*Branchiostoma floridae*) has orthologs of vertebrate odorant receptors. *BMC Evolutionary Biology*, 9, s.242–242.
- Churcher, A.M. & Taylor, J.S., 2011. The Antiquity of Chordate Odorant Receptors Is Revealed by the Discovery of Orthologs in the Cnidarian *Nematostella vectensis*. *Genome Biology and Evolution*, 3, s.36–43.
- Immler, S. et al., 2007. By Hook or by Crook? Morphometry, Competition and Cooperation in Rodent Sperm. *PLoS ONE*, 2(1), s.e170.
- Isobe, T. et al., 2002. The effect of RANTES on human sperm chemotaxis. *Human Reproduction*, 17(6), s.1441–1446.
- Kajiya, K. et al., 2001. Molecular bases of odor discrimination: Reconstitution of olfactory receptors that recognize overlapping sets of odorants. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(16), s.6018–6025.
- Kaluza, J.F. et al., 2004. Olfactory receptors in the mouse septal organ. *Journal of Neuroscience Research*, 76(4), s.442–452.
- Kaupp, U.B., Kashikar, N.D. & Weyand, I., 2008. Mechanisms of Sperm Chemotaxis. *Annual Review of Physiology*, 70, s.93–117.
- Kelliher, K.R., 2007. The combined role of the main olfactory and vomeronasal systems in social communication in mammals. *Hormones and Behavior*, 52(5), s.561–570.



- Keverne, E.B., 2002. Mammalian Pheromones: From Genes to Behaviour. *Current Biology*, 12(23), s.R807–R809.
- Kimoto, H. et al., 2007. Sex- and Strain-Specific Expression and Vomeronasal Activity of Mouse ESP Family Peptides. *Current Biology*, 17(21), s.1879–1884.
- Kimoto, H. et al., 2005. Sex-specific peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons. *Nature*, 437(7060), s.898–901.
- Knierim, E. et al., 2011. Systematic Comparison of Three Methods for Fragmentation of Long-Range PCR Products for Next Generation Sequencing. *PLoS ONE*, 6(11), s.e28240.
- Krautwurst, D., Yau, K.-W. & Reed, R.R., 1998. Identification of Ligands for Olfactory Receptors by Functional Expression of a Receptor Library. *Cell*, 95(7), s.917–926.
- Leinders-Zufall, T. et al., 2004. MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5698), s.1033–1037.
- Leinders-Zufall, T. et al., 2000. Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. *Nature*, 405(6788), s.792–796.
- Lévai, O. et al., 2006. Cells in the vomeronasal organ express odorant receptors but project to the accessory olfactory bulb. *The Journal of Comparative Neurology*, 498(4), s.476–490.
- Li, F., 2013. Taste perception: from the tongue to the testis. *Molecular Human Reproduction*.
- Libants, S. et al., 2009. The sea lamprey *Petromyzon marinus* genome reveals the early origin of several chemosensory receptor families in the vertebrate lineage. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), s.180.
- Liberles, S.D., 2009. Trace Amine-associated Receptors Are Olfactory Receptors in Vertebrates. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1170(1), s.168–172.
- Liberles, S.D. & Buck, L.B., 2006. A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. *Nature*, 442(7103), s.645–650.
- Lindemann, L. et al., 2005. Trace amine-associated receptors form structurally and functionally distinct subfamilies of novel G protein-coupled receptors. *Genomics*, 85(3), s.372–385.
- Loconto, J. et al., 2003. Functional Expression of Murine V2R Pheromone Receptors Involves Selective Association with the M10 and M1 Families of MHC Class Ib Molecules. *Cell*, 112(5), s.607–618.
- Malnic, B. et al., 1999. Combinatorial Receptor Codes for Odors. *Cell*, 96(5), s.713–723.
- Margulies, M. et al., 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057), s.376–380.
- Mueller, J.C. et al., 2008. Biogenic Trace Amine-Associated Receptors (TAARs) Are Encoded in Avian Genomes: Evidence and Possible Implications. *Journal of Heredity*, 99(2), s.174–176.
- Munger, S.D., Leinders-Zufall, T. & Zufall, F., 2009. Subsystem Organization of the Mammalian Sense of Smell. *Annual Review of Physiology*, 71(1), s.115–140.
- Nair, H.P. & Young, L.J., 2006. Vasopressin and Pair-Bond Formation: Genes to Brain to Behavior. *Physiology*, 21(2), s.146–152.

- Nei, M., Niimura, Y. & Nozawa, M., 2008. The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: roles of chance and necessity. *Nature Reviews. Genetics*, 9(12), s.951–963.
- Neuhaus, E.M. et al., 2009. Activation of an Olfactory Receptor Inhibits Proliferation of Prostate Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 284(24), s.16218–16225.
- Niimura, Y., 2009. On the Origin and Evolution of Vertebrate Olfactory Receptor Genes: Comparative Genome Analysis Among 23 Chordate Species. *Genome Biology and Evolution*, 1, s.34–44.
- Niimura, Y. & Nei, M., 2005. Comparative evolutionary analysis of olfactory receptor gene clusters between humans and mice. *Gene*, 346, s.13–21.
- Niimura, Y. & Nei, M., 2003. Evolution of olfactory receptor genes in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(21), s.12235–12240.
- Oka, Y. et al., 2004. Olfactory receptor antagonism between odorants. *EMBO J*, 23(1), s.120–126.
- Olsson, P. & Laska, M., 2010. Human Male Superiority in Olfactory Sensitivity to the Sperm Attractant Odorant Bourgeonal. *Chemical Senses*, 35(5), s.427–432.
- Parmentier, M. et al., 1992. Expression of members of the putative olfactory receptor gene family in mammalian germ cells. *Nature*, 355(6359), s.453–455.
- Pavlat, G.K., 2010. A new function for odorant receptors: MOR23 is necessary for normal tissue repair in skeletal muscle. *Cell Adhesion & Migration*, 4(4), s.502–506.
- Peterlin, Z. et al., 2008. The Importance of Odorant Conformation to the Binding and Activation of a Representative Olfactory Receptor. *Chemistry & Biology*, 15(12), s.1317–1327.
- Pierce, K.L., Premont, R.T. & Lefkowitz, R.J., 2002. Signalling: Seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(9), s.639–650.
- Primeaux, S.D., Braymer, H.D. & Bray, G.A., 2013. High Fat Diet Differentially Regulates the Expression of Olfactory Receptors in the Duodenum of Obesity-Prone and Obesity-Resistant Rats. *Digestive Diseases and Sciences*, 58(1), s.72–76.
- Robacker, D.C., Garcia, J.A. & Bartelt, R.J., 2000. Volatiles from Duck Feces Attractive to Mexican Fruit Fly. *Journal of Chemical Ecology*, 26(8), s.1849–1867.
- Rodriguez, I. et al., 2000. A putative pheromone receptor gene expressed in human olfactory mucosa. *Nature Genetics*, 26(1), s.18–19.
- Rollmann, S.M., Houck, L.D. & Feldhoff, R.C., 1999. Proteinaceous Pheromone Affecting Female Receptivity in a Terrestrial Salamander. *Science*, 285(5435), s.1907–1909.
- Satoh, G., 2005. Characterization of novel GPCR gene coding locus in amphioxus genome: Gene structure, expression, and phylogenetic analysis with implications for its involvement in chemoreception. *genesis*, 41(2), s.47–57.
- Sharp, D.T. & Gray, I.E., 1962. Studies on Factors Affecting the Local Distribution of Two Sea Urchins, *Arbacia Punctulata* and *Lytechinus Variegatus*. *Ecology*, 43(2), s.309.
- Shi, P. & Zhang, J., 2007. Comparative genomic analysis identifies an evolutionary shift of vomeronasal receptor gene repertoires in the vertebrate transition from water to land. *Genome Research*, 17(2), s.166–174.

- Shirokova, E. et al., 2008. The human vomeronasal type-1 receptor family— detection of volatiles and cAMP signaling in HeLa/Olf cells. *The FASEB Journal*, 22(5), s.1416–1425.
- Silvotti, L. et al., 2007. Combinatorial co-expression of pheromone receptors, V2Rs. *Journal of Neurochemistry*, 103(5), s.1753–1763.
- Silvotti, L., Giannini, G. & Tirindelli, R., 2005. The Vomeronasal Receptor V2R2 Does Not Require Escort Molecules for Expression in Heterologous Systems. *Chemical Senses*, 30(1), s.1–8.
- Singer, A.G. et al., 1986. Purification and analysis of a proteinaceous aphrodisiac pheromone from hamster vaginal discharge. *Journal of Biological Chemistry*, 261(28), s.13323–13326.
- Spehr, M. et al., 2004. Dual capacity of a human olfactory receptor. *Current Biology*, 14(19), s.R832–R833.
- Spehr, M. et al., 2003. Identification of a Testicular Odorant Receptor Mediating Human Sperm Chemotaxis. *Science*, 299(5615), s.2054 –2058.
- Steiger, S.S., Fidler, A.E. & Kempnaers, B., 2008. Detection of Olfactory Receptor Transcripts in Bird Testes. *Journal of Heredity*, 99(6), s.624 –628.
- Stopka, P. & Graciasová, R., 2001. Conditional allogrooming in the herb-field mouse. *Behavioral Ecology*, 12(5), s.584–589.
- Stopkova, R., Hladovcova, D. & Stopka, P., 2009. Multiple roles of secretory lipocalins (MUP, OBP) in mice. *Folia Zoologica*, 58 (S), s. 29-40.
- Sun, F. et al., 2005. Human sperm chemotaxis: both the oocyte and its surrounding cumulus cells secrete sperm chemoattractants. *Human Reproduction*, 20(3), s.761–767.
- Suzuki, N. & Garbers, D.L., 1984. Stimulation of sperm respiration rates by speract and resact at alkaline extracellular pH. *Biology of Reproduction*, 30(5), s.1167 –1174.
- Tatsura, H. et al., 2001. Developing germ cells in mouse testis express pheromone receptors. *FEBS Letters*, 488(3), s.139–144.
- Teves, M.E. et al., 2006. Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 86(3), s.745–749.
- Touhara, K. et al., 1999. Functional identification and reconstitution of an odorant receptor in single olfactory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7), s.4040–4045.
- Touhara, K. & Vosshall, L.B., 2009. Sensing Odorants and Pheromones with Chemosensory Receptors. *Annual Review of Physiology*, 71(1), s.307–332.
- Vanderhaeghen, P. et al., 1993. Olfactory receptors are displayed on dog mature sperm cells. *The Journal of Cell Biology*, 123(6 Pt 1), s.1441–1452.
- Vanderhaeghen, P. et al., 1997. Specific Repertoire of Olfactory Receptor Genes in the Male Germ Cells of Several Mammalian Species. *Genomics*, 39(3), s.239–246.
- Vassar, R., Ngai, J. & Axel, R., 1993. Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell*, 74(2), s.309–318.
- Wakabayashi, Y. et al., 2002. A Putative Pheromone Receptor Gene Is Expressed in Two Distinct Olfactory Organs in Goats. *Chemical Senses*, 27(3), s.207–213.

- Walensky, L.D. et al., 1995. Odorant receptors and desensitization proteins colocalize in mammalian sperm. *Molecular Medicine*, 1(2), s.130–141.
- Wallrabenstein, I. et al., 2013. Human trace amine-associated receptor TAAR5 can be activated by trimethylamine. *PloS one*, 8(2), s.e54950.
- Walum, H. et al., 2008. Genetic variation in the vasopressin receptor 1a gene (AVPR1A) associates with pair-bonding behavior in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(37), s.14153–14156.
- Williams, R. et al., 2006. Amplification of complex gene libraries by emulsion PCR. *Nature Methods*, 3(7), s.545–550.
- Yoshikawa, K. et al., 2013. An unsaturated aliphatic alcohol as a natural ligand for a mouse odorant receptor. *Nature Chemical Biology*, 9(3), s.160–162.
- Young, J.M. et al., 2010. Extreme variability among mammalian V1R gene families. *Genome Research*, 20(1), s.10–18.
- Young, J.M. & Trask, B.J., 2007. V2R gene families degenerated in primates, dog and cow, but expanded in opossum. *Trends in Genetics*, 23(5), s.212–215.
- Zhang, J. & Webb, D.M., 2003. Evolutionary deterioration of the vomeronasal pheromone transduction pathway in catarrhine primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14), s.8337–8341.
- Zhang, X., Cruz, O.D. la, et al., 2007. Characterizing the expression of the human olfactory receptor gene family using a novel DNA microarray. *Genome Biology*, 8(5), s.1–10.
- Zhang, Xiaohong, Zhang, Xinmin & Firestein, S., 2007. Comparative genomics of odorant and pheromone receptor genes in rodents. *Genomics*, 89(4), s.441–450.
- Zhang, Xinmin et al., 2004. High-throughput microarray detection of olfactory receptor gene expression in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(39), s.14168–14173.
- Zhulidov, P.A. et al., 2004. Simple cDNA normalization using kamchatka crab duplex-specific nuclease. *Nucleic Acids Research*, 32(3), s.e37–e37.
- Zucchi, R. et al., 2006. Trace amine-associated receptors and their ligands. *British Journal of Pharmacology*, 149(8), s.967–978.