

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Název katedry

Charles University in Prague, Faculty of Science
Name of department

Doktorský studijní program: Vývojová a buněčná biologie
Ph.D. study program: Developmental and cell biology



Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis

Vliv vybraných polutantů na savčí organismy *in vivo* a buňky *in vitro* a příprava specifických monoklonálních protilátek k jejich detekci

Effect of selected pollutants on mammalian organisms *in vivo* and cells *in vitro* and preparation of specific monoclonal antibodies for their detection

Mgr. Andriy Dorosh

Školitel/Supervisor:

Doc. RNDr. Jana Pěkníková, CSc.

Praha, 2015

Abstract

Environmental pollution and its effect on the living organisms has attracted lots of attention recently. There is a growing body of evidence that we are exposed to environmental pollutants at low concentrations in everyday life. The cells and organisms have tools to identify, neutralize and excrete the majority of the toxic compounds. The most dangerous are those that can escape this process or act at low trace concentrations. Endocrine disruptors (EDs) belong to the latter group.

Endocrine disruptors can be of natural and anthropogenic origin. EDs target corresponding hormonal receptors and can act at low concentrations. A wide family of nuclear receptors recognize steroid hormones. The majority of EDs can pass through the cytoplasmic membrane, use the hydrophobic nature of the receptor-ligand binding, trigger hormone response and change the expression of the sensitive genes. By interfering with estrogen and androgen signaling, EDs can have effect on the whole organism, but the reproductive system is influenced most. In the present work, our aim was to develop the methods for ED detection and monitoring, analyze the estrogenic potency of EDs, and evaluate the effects of natural estrogens and EDs on male reproductive functions, including sperm and testicular physiology and endocrine functions.

First, we prepared a panel of monoclonal antibodies recognizing environmental pollutants and natural estrogens. This allowed fast and reproducible detection of various EDs in environmental water samples. In part of our work we focused on preparation of monoclonal antibodies that recognize surface proteins of the sperm cells interacting with egg envelopes. This allowed us to study in detail the effect of EDs on sperm capacitation and hyperactivation.

Second, we determined the estrogenicity of environmental pollutants *in vitro* and studied the effect of these endocrine disruptors on male fertility and expression of testicular genes during spermatogenesis in a mouse model *in vivo*. We showed that the studied compounds induce changes in testicular gene expression patterns and have a negative effect on the male reproductive system. Our results provide the molecular basis for the underlying mechanisms of EDs action on male reproductive functions during the most susceptible periods of prenatal and pubertal development.

The submitted work has helped us to understand the impact of environmental pollutants on the male reproductive system and sperm maturation.

Souhrn

Znečištění životního prostředí a jeho negativní vliv na živé organismy představuje jeden z největších problémů současné lidské společnosti. Populace je den co den vystavována nízkým koncentracím environmentálních polutantů s potvrzeným či předpokládaným negativním efektem na lidské zdraví. Buňky a organismy si v průběhu evoluce osvojily různé způsoby detekce, neutralizace a exkrece většiny toxických látek vyskytujících se v prostředí. Největší riziko tak představují ty látky, které dokáží detoxikačním systémům organismu uniknout nebo působí i ve velmi nízkých koncentracích. Endokrinní disruptory (EDs) pak často představují právě takový typ látek.

Endokrinní disruptory mohou být přírodního či antropogenního původu, a mohou v nízkých koncentracích ovlivňovat odpovídající hormonálních receptory. Nejčastějším mechanismem jejich účinku je pak vazba na přirozené hormonální receptory. Jaderné steroidní receptory díky své evoluci, rozmanitosti a specifickým afinitním vlastnostem představují častý cíl endokrinních disruptorů, které jsou díky svým chemickým vlastnostem schopné projít přes buněčné membrány. Takovými endokrinními disruptory jsou například ty, které interferují s estrogenní a androgenní hormonální regulací. Po vazbě na příslušné receptory jsou tak tyto látky schopné negativně ovlivňovat všechny orgánové systémy ovlivňované příslušnými hormony, v tomto případě tedy především systém reprodukční.

Naším cílem v předkládané práci tedy bylo vyvinout metody detekce a monitorování přítomnosti a hladiny vybraných endokrinních disruptorů v organismu a v prostředí, analyzovat míru estrogenního účinku vybraných látek a posoudit jejich vliv na samčí reprodukční systém zahrnující funkce spermií, testikulární tkáň a hormonální regulace.

Naším prvním významným výsledkem bylo vytvoření panelu monoklonálních protilátek schopných detekovat látky znečišťující životní prostředí. Pro tento panel byly vybrány hybridomové linie s nejvyšší produkcí specifických protilátek s minimální zkříženou reaktivitou k jednotlivým látkám. Tento panel tak umožňuje rychlou a spolehlivou detekci endokrinních disruptorů ve vzorcích kontaminované vody. V rámci naší práce jsme se také zaměřili na přípravu monoklonálních protilátek, které rozpoznávají povrchové proteiny spermií a reagují s povrchovými proteiny vajíčka. Tento přístup nám umožnil podrobně studovat vliv EDs na kapacitaci a hyperaktivaci spermií.

Druhým významným výsledkem bylo zhodnocení estrogenní aktivity vybraných endokrinních disruptorů *in vitro* a také zhodnocení jejich vlivu na samčí reprodukční orgány a expresi vybraných genů hrajících roli v procesu spermatogeneze *in vivo* na myším modelu. Zde jsme pozorovali signifikantní změny v expresi jednotlivých genů a negativní vliv na některé samčí reprodukční parametry. Naše výsledky poskytují molekulární základ pro pochopení základních mechanismů působení EDs na samčí reprodukční funkce během citlivého období prenatálního a pubertálního vývoje.

Předložená práce přispěla k pochopení vlivu environmentálních polutantů na samčí reprodukční systém a maturaci spermií.

Úvod

Znečištění životního prostředí a jeho negativní vliv na živé organismy představuje jeden z největších problémů současné lidské společnosti. Populace je den co den vystavována nízkým koncentracím environmentálních polutantů s potvrzeným či předpokládaným negativním efektem na lidské zdraví. Buňky a organismy si v průběhu evoluce osvojily různé způsoby detekce, neutralizace a exkrece většiny toxických látek vyskytujících se v prostředí. Největší riziko tak představují ty látky, které dokáží detoxikačním systémům organismu uniknout nebo působí i ve velmi nízkých koncentracích. Endokrinní disruptory (ED) pak často představují právě takový typ látek.

Endokrinní disruptory jsou jak přírodní tak syntetické látky, které interferují s přirozenými hormony a negativně tak ovlivňují činnost endokrinního systému. Agentura pro ochranu životního prostředí Spojených států amerických (EPA) odhaduje, že až 87 000 chemických látek zahrnujících průmyslové chemikálie, látky v kosmetických přípravcích, potravinová aditiva a další chemické směsi může působit jako endokrinní disruptory. Tyto látky pak mohou působit negativně i na samčí reprodukční funkce. V případě bromovaných zpomalovačů hoření tetrabrombisfenolu A (TBBPA) (Lee et al., 2012), hexabromcyklododekanu (HBCD) (van der Ven et al., 2009) a mykotoxinu zearalenonu (Filipiak et al., 2009) byl v uvedených publikacích prokázán jejich vliv na endokrinní systém, tetracyklinová antibiotika pak měla inhibiční vliv na pohyblivost spermií (Farombi et al., 2008).

Mechanismus účinku jednotlivých ED často není do detailu prostudován, je však známo, že během ontogenetického vývoje endokrinního a reprodukčního organismu existují tzv. kritické periody, kdy je příslušný vyvíjející se orgánový systém více citlivý k zevním zásahům. Expozice ED v kritické periodě pak může vést k nesprávnému vývoji tkání a orgánů, přičemž organismus si následky takového škodlivého zásahu nese až do dospělosti. Některé současné studie navíc potvrzují, že škodlivý účinek ED se nemusí omezovat jen na exponovaného jedince, ale může být epigenetickými mechanismy přenesen i na jeho potomstvo (Anway et al., 2005; Guerrero-Bosagna et al., 2010; Fullston et al., 2012; Brieno-Enriquez et al., 2015; Carone et al., 2015).

Cíle práce

Naším cílem v předkládané práci bylo:

- ✓ vyvinout metody detekce a monitorování přítomnosti a hladiny vybraných endokrinních disruptorů v organismu i v prostředí
- ✓ analyzovat míru estrogenního účinku vybraných látek
- ✓ posoudit jejich vliv na samčí reprodukční systém zahrnující funkce spermií, testikulární tkáň a hormonální regulace.

Materiál a metodika

Pro imunizaci myši, produkci protilátek hybridomovou technologií a jejich následné testování byly použity standardní protokoly (Ed Harlow, 1988). K analýze estrogenní aktivity testovaných látek *in vitro* byl použit proliferační test na MCF-7 buněčné linii a qPCR analýza s primery pro estrogen-responzivní gen *TFF1*. Biochemické a molekulárně biologické metody použité při analýze jednotlivých reprodukčních parametrů jsou pak detailně popsány v příslušných publikacích, které jsou součástí předkládané práce.

Výsledky a diskuse

Naším prvním významným výsledkem bylo vytvoření panelu monoklonálních protilátek schopných detekovat látky ve vysokých koncentracích znečišťující životní prostředí. Připravili jsme protilátky proti přirozeným estrogenům estradiolu, estriolu, estronu a také proti ethinylestradiolu, který je součástí nejběžnější kombinace hormonální antikoncepce. Další sada protilátek je schopná detekovat TBBPA, HBCD a bisfenol A, který je součástí produktů z plastu. Konečně posledním cílem bylo vytvoření protilátek proti tetracyklinu. Senzitivita a specifita připravených protilátek pak byly dále testovány pomocí přímého, nepřímého a sendvičového ELISA testu.

Druhým významným výsledkem bylo zhodnocení estrogenní aktivity vybraných endokrinních disruptorů TBBPA a HBCD v experimentech *in vitro*. Naše studie prokázala estrogenní aktivitu HBCD, která byla pozorována při testech na MCF-7 buněčné linii. Naproti tomu TBBPA žádnou aktivitu zprostředkovanou ER α v našem experimentu nevykazoval. Konečně látka s anti-estrogenním účinkem ICI 182,780 byla v našem

experimentálním modelu schopná inhibovat zvýšení exprese genu *TFF1* pozorované po přidání HBCD.

V jiné sérii studií jsme se zaměřili na vliv vybraných látek znečišťujících životní prostředí na reprodukční parametry ovlivněných zvířat. Pro tyto *in vivo* studie jsme vybrali takové látky, které jsou celosvětově produkovány a uvolňovány do životního prostředí ve velkém množství. V první takové studii jsme nepozorovali žádný vliv TBBPA na samčí reprodukční parametry jako je kvalita spermií atd. Naproti tomu histometrická analýza testikulární tkáně odhalila snížení výšky semenotvorného epitelu, TUNEL analýza vyšší incidenci somatických a germinálních buněk v terminální fázi apoptotického procesu a byla též pozorována nižší koncentrace epididymálních spermií u exponovaných myších jedinců oproti jedincům kontrolním. V další studii byli experimentální myši samci vystaveni účinkům tetracyklinových antibiotik během vysoce senzitivní pubertální periody. Detailní analýza reprodukčních parametrů potvrdila že proces spermatogeneze byl u exponovaných jedinců významným způsobem porušen, přičemž tyto negativní změny přetrvaly až do období dospělosti, ve které již k expozici nedocházelo. Konečně zearalenon měl především v nižší dávce, se kterou se člověk i živočichové běžně setkávají (25 ng/kg/den), negativní vliv na některé parametry spermií a indukoval změny v expresi genů v testikulární tkáni exponovaných samců z CD1 myší linie.

Naše další studie byla zaměřena na analýzu genové exprese ve vzorcích testikulárních biopsií pacientů trpících azoospermií. Jednotlivé vzorky pacientů trpících touto poruchou byly dále rozděleny do několika podskupin s ohledem na histologickou analýzu určenou pro diferenciální diagnózu obstrukční azoospermie. Těmito skupinami byly hypospermatogeneze (HS), maturační arest (MA) a stav, kdy jsou v semenotvorných kanálcích přítomny pouze somatické Sertoliho buňky – Sertoli cell-only syndrome - (SCO). qPCR analýza genů hrajících roli v procesu spermatogeneze odhalila jejich specifickou expresi v jednotlivých podskupinách azoospermických vzorků a naše výsledky tak otevírají možnost rychlé diferenciální diagnózy poruch spermatogeneze na základě analýzy exprese testovaných genů.

V posledních dvou experimentálních studiích jsme využili námi připravené monoklonální protilátky ke studiu proteinů hrajících specifickou úlohu v savčí reprodukci, především pak v procesu maturace a kapacitace spermií a interakce mezi spermií a vajíčkem. V první z těchto studií se nám podařilo charakterizovat protein, který je rozeznáván naší protilátkou

Hs-8, která byla vybrána z panelu protilátek připravených imunizací myši celkovým proteinovým extraktem spermií. Během imunofluorescenční analýzy tato protilátka značí oblast akrosomu a významnou část bičíku (principal piece). Izolace a následná sekvenace identifikovala protein značený Hs-8 protilátkou jako GAPDHS, tedy jako testikulární formu jednoho z deseti enzymů účastnících se procesu glykolýzy. Nepřímý vazebný test na prasečích oocytech prokázal sníženou vazbu spermií na oocyt po inkubaci s protilátkou Hs-8. Naše výsledky tak ukazují na možnou pleiotropní roli GAPDHS proteinu v savčí spermii. V druhé studii jsme se pak zaměřili na charakterizaci proteinů, u nichž jsme díky koncepci naší studie předpokládali jejich možnou roli v procesu interakce spermie a vajíčka. Nejprve jsme připravili panel monoklonálních protilátek proti proteinům izolovaným z apikálního povrchu kapacitovaných kančích spermií. Tři z těchto proteinů, které navíc v biochemických analýzách vykazovaly interakci s glykoproteiny zona pellucida, byly podrobeny analýze na hmotnostním spektrometru. První z těchto proteinů rozeznávaný protilátkou 4C7 byl identifikován jako akrosinový prekurzor (45 kDa), druhý rozeznávaný protilátkou 5C5 byl identifikován jako RAB-2A protein (24 a 27 kDa) a konečně protilátka 1H9 rozpoznávala protein P47 (kDa). S ohledem na zmíněné výsledky plánujeme získané protilátky využít v dalších studiích jako hodnotný nástroj pro studium efektu ED na procesy maturace, kapacitace a vazby spermií na vajíčko.

5. Závěry

V předkládané práci jsme se za použití komplexní metodiky pokusili charakterizovat vliv látek znečišťujících životní prostředí na samčí reprodukční systém. Prvním krokem v tomto našem snažení bylo vytvoření panelu monoklonálních protilátek proti ED s takovou mírou senzitivity a specifity, která umožňuje jejich využití pro monitorování koncentrace ED v životním prostředí.

Dalším krokem byla analýza estrogenní aktivity vybraných látek TBBPA a HBCD pomocí jednoduchého in vitro testu na MCF-7 buněčné linii. Zde jsme pozorovali signifikantní vliv HBCD, ale nikoli TBBPA, jak na zvýšenou proliferaci buněk, tak na zvýšení exprese *TFF1* genu, který ve svém promotoru obsahuje ERE, a je tak vysoce senzitivní k estrogennímu stimulu. V několika in vivo reprodukčně-toxikologických studiích jsme pak prokázali různorodý vliv látek TBBPA, ZEA a tetracyklinových antibiotik nejen na některé

významné reprodukční parametry, ale také na expresi genů v testikulární tkáni a přítomnost a distribuci vybraných proteinů ve spermii.

Dále jsme sledovali expresi vybraných genů hrajících roli v různých fázích procesu spermatogeneze ve vzorcích testikulární tkáně pacientů podstupujících léčbu na klinice asistované reprodukce. Výsledky z této studie mohou v budoucnu přispět k lepší diferenciální diagnostice poruch spermatogeneze u lidských pacientů.

Jelikož estrogény hrají důležitou úlohu i v procesech maturace a kapacitace spermie a ED s estrogení aktivitou mohou narušovat a narušují i tyto fyziologické procesy, připravili jsme panel monoklonálních protilátek proti povrchovým proteinům spermie, který představuje důležitý předpoklad pro detailnější studium mechanismu vlivu ED na tyto zásadní fyziologické procesy probíhající ve spermii.

Doufáme, že jednotlivé součásti předkládané disertační práce přinesly alespoň některé zásadní informace o vlivu znečištění životního prostředí na reprodukci savců včetně člověka a že jednotlivé analytické nástroje, především ve formě monoklonálních protilátek, umožní lepší pochopení mechanismu vlivu ED na savčí reprodukci také v našich probíhajících a budoucích experimentech.

6. Použitá literatura

- Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. 2005. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308:1466-1469.
- Brieno-Enriquez MA, Garcia-Lopez J, Cardenas DB, Guibert S, Cleroux E, Ded L, Hourcade Jde D, Peknicova J, Weber M, Del Mazo J. 2015. Exposure to Endocrine Disruptor Induces Transgenerational Epigenetic Deregulation of MicroRNAs in Primordial Germ Cells. *PloS one* 10:e0124296.
- Carone BR, Fauquier L, Habib N, Shea JM, Hart CE, Li R, Bock C, Li C, Gu H, Zamore PD, Meissner A, Weng Z, Hofmann HA, Friedman N, Rando OJ. 2015. Paternally Induced Transgenerational Environmental Reprogramming of Metabolic Gene Expression in Mammals. *Cell* 143:1084-1096.
- Ed Harlow DL. 1988. *Antibodies: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. .

- Farombi EO, Ugwuezunmba MC, Ezenwadu TT, Oyeyemi MO, Ekor M. 2008. Tetracycline-induced reproductive toxicity in male rats: Effects of vitamin C and N-acetylcysteine. *Experimental and Toxicologic Pathology* 60:77-85.
- Filipiak E, Walczak-Jedrzejska R, Oszukowska E, Guminska A, Marchlewska K, Kula K, Slowikowska-Hilczer J. 2009. Xenoestrogens diethylstilbestrol and zearalenone negatively influence pubertal rat's testis. *Folia Histochem Cytobiol* 47:S113-120.
- Fullston T, Palmer NO, Owens JA, Mitchell M, Bakos HW, Lane M. 2012. Diet-induced paternal obesity in the absence of diabetes diminishes the reproductive health of two subsequent generations of mice. *Hum Reprod* 27:1391-1400.
- Guerrero-Bosagna C, Settles M, Lucker B, Skinner MK. 2010. Epigenetic Transgenerational Actions of Vinclozolin on Promoter Regions of the Sperm Epigenome. *PloS one* 5:e13100.
- Lee HK, Kim TS, Kim CY, Kang IH, Kim MG, Jung KK, Kim HS, Han SY, Yoon HJ, Rhee GS. 2012. Evaluation of in vitro screening system for estrogenicity: comparison of stably transfected human estrogen receptor-alpha transcriptional activation (OECD TG455) assay and estrogen receptor (ER) binding assay. *J Toxicol Sci* 37:431-437.
- Pflieger-Bruss S, Schuppe HC, Schill WB. 2004. The male reproductive system and its susceptibility to endocrine disrupting chemicals. *Andrologia* 36:337-345.
- van der Ven LT, van de Kuil T, Leonards PE, Slob W, Lilienthal H, Litens S, Herlin M, Hakansson H, Canton RF, van den Berg M, Visser TJ, van Loveren H, Vos JG, Piersma AH. 2009. Endocrine effects of hexabromocyclododecane (HBCD) in a one-generation reproduction study in Wistar rats. *Toxicol Lett* 185:51-62.
- Vogel JM. 2005. Perils of paradigm: complexity, policy design, and the Endocrine Disruptor Screening Program. *Environ Health* 4:2.

Introduction

We are exposed to environmental pollutants at low concentrations in everyday living. During risk assessment of specific environmental pollutant on human health, several factors are taken into account. ED exposure in adulthood is generally compensated by regulation and excretion mechanisms and usually does not result in significant effect. On the other hand, while the exposure occurs chronically or during most sensitive windows of reproductive and endocrine system development and establishment, permanent changes can occur to the exposed individual and its progeny. The cells and organism have tools to identify, neutralize and excrete majority of the toxic compounds and the most dangerous are those that can escape this process or act at concentrations, which are not able to activate detoxification mechanisms. Endocrine disruptors (EDs) often belong to this group.

The endocrine disruptors can be of natural or anthropogenic origin. The United States Environmental Protection Agency (EPA) estimates that 87,000 chemicals might act as potential EDs, including pesticide chemicals, some commercial chemicals, cosmetic ingredients, food additives, nutritional supplements, mixtures, and environmental contaminants (Vogel, 2005). Brominated flame retardants Tetrabromobisphenol A (TBBPA) (Lee et al., 2012) and Hexabromocyclododecane (HBCD) (van der Ven et al., 2009), mycotoxin zearalenone (Filipiak et al., 2009) belong to the EDs, while tetracycline antibiotics have inhibitory effect on sperm motility (Farombi et al., 2008).

The exact mechanisms how EDs can affect male reproductive system are still poorly understood. But there is growing body of evidence that environmental exposures at critical developmental windows of endocrine and reproductive systems promote more pronounced adverse effects that last to adulthood (Pflieger-Bruss et al., 2004). In addition, a number of studies showed transgenerational transfer of the adverse effects induced by environmental pollutants to the next generations (Anway et al., 2005; Guerrero-Bosagna et al., 2010; Fullston et al., 2012; Brieno-Enriquez et al., 2015; Carone et al., 2015).

Aims of the study

In the present work, our aims were:

- ✓ To develop methods for the monitoring of ED in environment
- ✓ To analyze the estrogenic potency of ED
- ✓ To evaluate the effects of natural estrogens and ED on male reproductive functions including sperm and testicular physiology and endocrine functions.
- ✓

Material and methods

Mouse immunization antibody generation and analysis was performed according to general protocols (Ed Harlow, 1988). We used the proliferation test (E-screen assay) in MCF-7 breast cancer cells and qPCR analysis of *TFF1* gene expression to analyze estrogenicity of the studied compounds. Biochemical and molecular biology methods used to analyze the reproductive endpoints in reproductive toxicology studies are described in corresponding manuscripts.

Results and discussion

First, we prepared a panel of monoclonal antibodies that can specifically and with high affinity recognize chemicals that are present in the environment at relatively high concentration. We have generated antibodies against natural estrogens estradiol, estrone and estriol, active compound of the hormonal contraception pills ethinylestradiol, brominated flame retardants HBCD and TBBPA, component of plastics bisphenol A and antibiotic tetracycline. Generated antibodies were further analyzed with direct, indirect and sandwich ELISA for specificity and cross-reactivity.

Second, we assesses the estrogenic potency of brominated flame retardants TBBPA and HBCD in vitro on MCF-7 cells in comparison to natural estrogens. We have shown that HBCD displays estrogen-like effects on MCF-7 cells. TBBPA, on the other hand, had no estrogenic effect mediated by the ER α in the present model. Anti-estrogen ICI 182,780 reversed the upregulation of *TFF1* gene by HBCD.

Third, we evaluated the effect of the environmental pollutants on the reproductive parameters of the exposed animals. For *in vivo* set of studies we selected the substances with high level of worldwide production. The sperm quality and reproductive endpoints were not affected by TBBPA. Further analysis revealed that the exposed animals had thinner seminiferous epithelium, increased numbers of apoptotic somatic and germ cells in the testes, and decreased amount of epididymal sperm cells. The study on the effect of the tetracycline family of antibiotics was designed so that animals were exposed to the chemicals at the very sensitive pubertal period. Sperm quality analysis, histological examination and TUNEL analysis showed that spermatogenesis in mice is not fully restored even in adulthood after antibiotic exposure during puberty. Zearalenone, especially at the lower, environmentally relevant concentration of 25 ng/kg b.w. /day negatively influenced the sperm parameters and induced changes in testicular gene expression in exposed CD1 male mice.

In another study, human testicular biopsy specimens were used to analyse expression of spermatogenesis genes in testicular biopsies from azoospermic patients. The samples were subdivided into three groups according to histological classification of obstructive azoospermia state: hypospermatogenesis (HS); maturation arrest (MA); and Sertoli cell-only syndrome (SCO). Analysis of the expression of spermatogenic genes in human testes with abnormal spermatogenesis revealed different expression patterns in patients from different groups. Our results suggest that analysis of the expression of genes involved in spermatogenesis can be a fast additional test for the determination of the spermatogenesis progress in testicular samples.

In next series of experiments we prepared monoclonal antibodies against sperm proteins involved in sperm maturation and gamete interaction. First, we characterized the sperm protein recognized by a monoclonal antibody Hs-8. In the immunofluorescence test, Hs-8 antibody recognized the protein localized in the acrosome of the sperm head and in the principal piece of the sperm flagellum. Hs-8 labelled the 45 kDa protein in the extract of human sperm it was identified as GAPDHS, one of the ten enzymes of the glycolytic pathway. We confirmed GAPDHS localization in the apical part of the sperm head in addition to the principal piece of the flagellum. In an indirect binding assay, we showed that anti-GAPDHS antibodies interfere with the secondary sperm/oocyte binding

In second study, we characterized the candidate proteins that are involved in sperm – zona pellucida binding in boar model. First, we have raised the panel of monoclonal antibodies

against the purified protein pool from the apical part of the boar capacitated sperm surface. Three proteins with molecular masses that were shown to interact with ZP glycoproteins in a Far Western Blot were determined with MALDI analysis. The first protein recognized by 4C7 antibody was identified to be an acrosin precursor (45 kDa), 5C5 antibody recognized RAB-2A (24 and 27 kDa), and 1H9 antibody recognized P47 protein. Antibodies recognizing sperm proteins involved in the gamete interacting will be useful tools in the future studies on the effect of the EDs on the sperm maturation, capacitation process and sperm-oocyte crosstalk.

Conclusions

In present work we used complex approach to study the effect of environmental pollutants on male reproductive system. First, a panel of MoAbs recognizing EDs was generated as a tools to monitor their concentration in environment with reasonable sensitivity and no cross-reaction.

In an in vitro study, we showed that brominated flame retardant HBCD, but not TBBPA displayed estrogenic effect on MCF-7 cell model using both proliferation assay and reporter gene *TFF1* that contains ERE in its promoter and is highly sensitive to estrogen signal. In a series of reproductive toxicology studies, adverse effects of environmental pollutants TBBPA, ZEA, doxycycline and TET on male reproductive parameters were followed. In addition to basic reproductive endpoints, changes in gene expression and protein distribution on sperm cells were analyzed.

We studied the expression of genes involved in different stages of spermatogenesis in testicular samples from patients undergoing treatment in the assisted reproduction laboratory. This can help to identify the level of spermatogenesis in testicular tissues.

As estrogen signaling participates in sperm maturation and capacitation, we generated monoclonal antibodies against sperm surface proteins as the necessary tools to study the effect of EDs not only on male reproductive organs and germ cell development, but also on sperm capacitation and gamete interaction.

To sum up, the findings presented in this PhD thesis bring important information to the growing body of evidence that environmental pollutants can influence mammalian organisms and especially their reproductive parameters via different mechanisms.

References

- Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. 2005. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308:1466-1469.
- Brieno-Enriquez MA, Garcia-Lopez J, Cardenas DB, Guibert S, Cleroux E, Ded L, Hourcade Jde D, Peknicova J, Weber M, Del Mazo J. 2015. Exposure to Endocrine Disruptor Induces Transgenerational Epigenetic Deregulation of MicroRNAs in Primordial Germ Cells. *PloS one* 10:e0124296.
- Carone BR, Fauquier L, Habib N, Shea JM, Hart CE, Li R, Bock C, Li C, Gu H, Zamore PD, Meissner A, Weng Z, Hofmann HA, Friedman N, Rando OJ. 2015. Paternally Induced Transgenerational Environmental Reprogramming of Metabolic Gene Expression in Mammals. *Cell* 143:1084-1096.
- Ed Harlow DL. 1988. *Antibodies: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. .
- Farombi EO, Ugwuezunmba MC, Ezenwadu TT, Oyeyemi MO, Ekor M. 2008. Tetracycline-induced reproductive toxicity in male rats: Effects of vitamin C and N-acetylcysteine. *Experimental and Toxicologic Pathology* 60:77-85.
- Filipiak E, Walczak-Jedrzejska R, Oszukowska E, Guminska A, Marchlewska K, Kula K, Slowikowska-Hilczer J. 2009. Xenoestrogens diethylstilbestrol and zearalenone negatively influence pubertal rat's testis. *Folia Histochem Cytobiol* 47:S113-120.
- Fullston T, Palmer NO, Owens JA, Mitchell M, Bakos HW, Lane M. 2012. Diet-induced paternal obesity in the absence of diabetes diminishes the reproductive health of two subsequent generations of mice. *Hum Reprod* 27:1391-1400.
- Guerrero-Bosagna C, Settles M, Lucker B, Skinner MK. 2010. Epigenetic Transgenerational Actions of Vinclozolin on Promoter Regions of the Sperm Epigenome. *PloS one* 5:e13100.
- Lee HK, Kim TS, Kim CY, Kang IH, Kim MG, Jung KK, Kim HS, Han SY, Yoon HJ, Rhee GS. 2012. Evaluation of in vitro screening system for estrogenicity: comparison of stably transfected human estrogen receptor-alpha transcriptional

- activation (OECD TG455) assay and estrogen receptor (ER) binding assay. *J Toxicol Sci* 37:431-437.
- Pflieger-Bruss S, Schuppe HC, Schill WB. 2004. The male reproductive system and its susceptibility to endocrine disrupting chemicals. *Andrologia* 36:337-345.
- van der Ven LT, van de Kuil T, Leonards PE, Slob W, Lilienthal H, Litens S, Herlin M, Hakansson H, Canton RF, van den Berg M, Visser TJ, van Loveren H, Vos JG, Piersma AH. 2009. Endocrine effects of hexabromocyclododecane (HBCD) in a one-generation reproduction study in Wistar rats. *Toxicol Lett* 185:51-62.
- Vogel JM. 2005. Perils of paradigm: complexity, policy design, and the Endocrine Disruptor Screening Program. *Environ Health* 4:2.

Curriculum vitae

Andriy Dorosh

Laboratory of Reproductive Biology

Institute of Biotechnology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i.

Videnska 1083

14220 Prague 4

Czech Republic

E-mail: andriy.dorosh@ibt.cas.cz

Tel: (+420) 241 062 26 41

Date of birth: 10.09.1978

Gender: Male

Marital status: Married

Nationality: Ukrainian

EDUCATION

2007 -2015 PhD student at the Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Developmental Biology Supervisor: Dr. J. Peknicova.

2000-2001 The Long-term Postgraduate Training Course UNESCO-ROSTE on Modern Problems in Biology and Microbial Technology at the Laboratory of Cell Reproduction Institute of Microbiology

1995-2000 Graduate student at the I. Franko State University, Department of Biology, specialization- Microbiology.

EMPLOYMENT

Since 2008 Research Associate at the Laboratory of Diagnostics for Reproductive Medicine Institute of Biotechnology Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i.

2005-2007 Research Associate at the Laboratory of Biochemistry of reproduction Institute of Molecular Genetics Academy of Sciences of the Czech Republic

2001 – 2005 Research Associate at the Laboratory of Cell Reproduction Institute of Microbiology Academy of Sciences of the Czech Republic

1999- 2001 Research Associate at the Division of Regulatory Cell Systems, A.V.Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine

LANGUAGES

English (FCE certificate), Czech, Ukrainian

OTHER SKILLS

Embryonal germinal ridge isolation and germ stem cell isolation (short-term visit of Jesus del Mazo Laboratory, Madrid, Spain)

Epididymal protein analysis (short-term visit of Dr. Gatti lab, Tour, France)

Seznam publikací

(Selected publications)

1. **Margaryan H***, **Dorosh A***, **Capkova J**, **Manaskova-Postlerova P**; **Philimonenko A**, **Hozak P**, **Peknicova J**. Characterization and possible function of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-spermatogenic protein GAPDHS in mammalian sperm. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015 Mar 8;13:15

* Authors contributed equally to the publication

IF = 2.409

2. **Zigo M**, **Dorosh A**, **Pohlová A**, **Jonáková V**, **Šulc M**, **Maňásková-Postlerová P**. Panel of monoclonal antibodies to sperm surface proteins as a tool for monitoring localization and identification of sperm-zona pellucida receptors. *Cell Tissue Res*. 2015 Mar;359(3):895-908

IF = 3.333

3. **Zatecka E**, **Ded L**, **Elzeinova F**, **Kubatova A**, **Dorosh A**, **Margaryan H**, **Dostalova P**, **Korenkova V**, **Hoskova K**, **Peknicova J**. Effect of zearalenone on reproductive parameters and expression of selected testicular genes in mice. *Reprod Toxicol*. 2014 Jun;45:20-30

IF = 2.771

4. **Dorosh A**, **Tepla O**, **Zatecka E**, **Ded L**, **Koci K**, **Peknicova J**. Expression analysis of MND1/GAJ, SPATA22, GAPDHS and ACR genes in testicular biopsies from non-obstructive azoospermia (NOA) patients. *Reprod Biol Endocrinol*. 2013 May 15;11:42

IF = 2.409

5. **Elzeinová F**, **Pěkniová J**, **Děd L**, **Kubátová A**, **Margaryan H**, **Dorosh A**, **Makovický P**, **Rajmon R**. Adverse effect of tetracycline and doxycycline on testicular tissue and sperm parameters in CD1 outbred mice. *Exp Toxicol Pathol*. 2013 Sep;65(6):911-7

IF = 2.005

6. **Zatecka E**, **Ded L**, **Elzeinova F**, **Kubatova A**, **Dorosh A**, **Margaryan H**, **Dostalova P**, **Peknicova J**. Effect of tetrabromobisphenol A on induction of apoptosis in the testes and changes in expression of selected testicular genes in CD1 mice. *Reprod Toxicol*. 2013 Jan;35:32-9

IF = 2.771

7. **Dorosh A**, **Děd L**, **Elzeinová F**, **Pěkniová J**. Assessing oestrogenic effects of brominated flame retardants hexabromocyclododecane and tetrabromobisphenol A on MCF-7 cells. *Folia Biol (Praha)*. 2011;57(1):35-9

IF = 1.167

Other publications

1. **Dorosh A**. Monoclonal antibody 6E4 against human GAPDHS protein, Hybridoma. June 2011, Vol. 30, No. 3: 321

- 2. Ded L, Dostalova P, Dorosh A, Dvorakova-Hortova K, Peknicova J.** Effect of estrogens on boar sperm capacitation in vitro. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010 Jul 13; 8:87