

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**  
Katedra fyziologie



## **Vliv střevního zánětu na lokální expresi 11 $\beta$ -HSD1**

Effect on inflammation on local expression of 11 $\beta$ -HSD1

**Mgr. Pavlína Kvapilová**

Rigorózní práce

Praha 2018

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Můj podíl na přípravě publikace zahrnoval péči o zvířata, odběr tkání, izolace a příprava buněk průtokovou cytometrií a následné stanovení genové exprese v izolovaných populacích imunitních buněk.

V Praze dne 2. 2. 2018

.....

Pavλίna Kvapilová

### **Poděkování**

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala svému vedoucímu prof. RNDR. Jiřímu Páchovi, DrSc. za jeho trpělivost, bez které by tato práce určitě nevznikla. Také bych chtěla poděkovat všem kolegyním a kolegům z oddělení Funkce epitelu ve Fyziologickém ústavu AV ČR, se kterými je vždy radost spolupracovat.

## **Abstrakt**

Zánět představuje první obrannou linii organismu, která má za cíl odstranit nežádoucí patogeny, opravit poškozenou tkáň a znovu nastolit rovnováhu. Glukokortikoidy patří mezi efektivní regulátory imunitní odpovědi. Jejich dostupnost v tkáni je daná několika faktory, mimo jiné lokálním metabolismem v buňce, který zajišťují enzymy 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenázy. Známe dvě isoformy 11HSD1 a 11HSD2, přičemž 11HSD1, která lokálně v buňce katalyzuje přeměnu neaktivní molekuly glukokortikoidu na aktivní, se zdá být významným hráčem při regulaci zánětlivé odpovědi. Cílem této práce bylo analyzovat genovou expresi 11HSD1 spolu s expresí cytokinů ve specifických mikrostrukturách imunitního systému, účastnících se imunitní odpovědi na experimentální DSS kolitidu.

## **Klíčová slova**

Metabolismus glukokortikoidů; Mikroprostředí cytokinů; Lymfatické orgány; Kolon; DSS (dextran-sodium-sulfátem indukovaná) kolitida

## **Abstract**

Inflammation is first-line host defense mechanism of organism that aims to remove unwanted pathogens, repair damaged tissue and restore homeostasis. Glucocorticoids belong to effective immune response regulators. Their availability in the tissue is due to several factors, including local metabolism in the cell that provide 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase enzymes. We know two isoforms 11HSD1 and 11HSD2. 11HSD1 locally in the cell catalyzes the conversion of the inactive glucocorticoid molecule to active, and thus appears to be a significant player in regulating the inflammatory response. The aim of this work was to analyze gene expression of 11HSD1 together with expression of cytokines in specific microanatomical compartments of the immune system involved in immune response to experimental DSS colitis.

## **Keywords**

Metabolism of glucocorticoids; Cytokine microenvironment; Lymphoid organs; Colon; Dextran-sodium-sulfate colitis

## Obsah

Abstrakt .....	4
Abstract .....	5
Seznam zkratk.....	7
Autorský komentář .....	8
1 Co je zánět a proč k němu dochází?.....	8
1.1 Imunitní odpověď střevního imunitního systému	9
2 Glukokortikoidy.....	11
2.1 Glukokortikoidní receptory	11
2.2 Pre-receptorový metabolismus GC	12
3 11HSD1 a zánět .....	13
4 Cíle.....	13
5 Výsledky .....	14
6 Diskuze a závěr .....	17
7 Literatura.....	18
8 Seznam obrázků.....	23
9 Příloha.....	24
Inflammation regulates 11b-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 differentially in specific compartments of the gut mucosal immune system	24

## Seznam zkratek

11-DHC	11-dehydrocorticosterone	11-dehydrokortikosteron
11HSD1	11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1	11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenáza 1
11HSD2	11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 2	11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenáza 2
6PG	6-phosphogluconate	6-fosfoglukonát
ACTH	adrenocorticotropine hormone	adrenokortikotropní hormon
CAM	cell adhesion molecules	molekuly buněčné adheze
CBG	corticosteroid-binding globulin	globulin vázající kortikosteroidy
CCE	colonic crypt epithelium	střevní epitel
DC	dendritic cells	dendritické buňky
DSS	dextran-sodium-sulfate	dextran sulfát sodný
ER	endoplasmic reticulum	endoplazmatické retikulum
GALT	gut-associated lymphoid tissue	střevní slizniční imunitní systém
GC	glucocorticoids	glukokortikoidy
GILZ	glucocorticoid-induced leucine zipper	GC indukovaný leucine zipper
GR	glucocorticoid receptor	glukokortikoidní receptor
GT	glucose-6-phosphate translocase	G6P translokáza
H6PDH	hexose-6-phosphate dehydrogenase	hexóza-6-fosfát dehydrogenáza
HPA	hypothalamic-pituitary-adrenal axis	osa hypothalamus-hypofýza-nadledviny
IFN $\gamma$	interferon gamma	interferon gamma
IL-10	interleukin 10	interleukin 10
IL-1 $\beta$	interleukin 1 beta	interleukin 1 beta
IL-21	interleukin 21	interleukin 21
IL-4	interleukin 4	interleukin 4
ILF	isolated lymphoid follicles	isolované lymfoidní folikuly
LMD	laser capture microdissection	laserová mikrodisekce
LP	lamina propria	lamina propria
MLN	mesenteric lymph nodes	mesenterická lymfatická uzliny
MR	mineralocorticoid receptor	mineralokortikoidní receptor
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	nicotinamidadenindinucleotidfosfát
NKT	natural killer t cell	natural killer t buňky
PP	peyers patches	peyerovy plaky
TGF $\beta$	transforming growth factor beta	transformující růstový faktor beta
Th	T helper cell	pomocná T buňka (lymfocyt)
Th1	Th1 immune response	imunitní odpověď typu Th1
Th2	Th2 immune response	imunitní odpověď typu Th2
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor alfa	faktor nádorové nekrózy alfa
T <sub>reg</sub>	regulatory T cell	regulační T buňka (lymfocyt)

## Autorský komentář

### 1 Co je zánět a proč k němu dochází?

Zánět je jeden z nejstarších obranných mechanismů imunitního systému. Je to první obranná linie schopná reagovat na bezprostřední ohrožení, pokud dojde k narušení fyzických bariér (kůže a sliznice) mezi vnějším a vnitřním prostředím organismu, a tím k proniknutí patogenů. Je to reakce tzv. přirozené, nespecifické imunity. Nicméně pokud by taková reakce nebyla regulována, mohlo by dojít k jejímu přestřelení, které by v důsledku znamenalo ještě větší ohrožení celého organismu (Munck et al., 1984).

Při zánětu dochází k nárůstu exprese cytokinů, chemokinů, receptorů či enzymů a dalších molekul důležitých pro cévní změny a infiltraci leukocytů do místa zánětu, přičemž tento proces je řízen mimo jiné také glukokortikoidní hormony (GC, z angl. *glucocorticoids*), velice efektivními regulátory. GC řídí imunitní reakci prostřednictvím modulace diferenciaci, transportu a distribuce imunitních buněk. Ovlivňují expresi pro- i proti-zánětlivých cytokinů. Působí na přirozenou imunitu, tak aby byla připravená rychle odpovědět na narušení integrity organismu (kdy GC působí prozánětlivě), ale také brzdí adaptivní imunitní systém (na který působí protizánětlivě), aby došlo k vyřešení zánětu a znovunastolení rovnováhy. (Busillo & Cidlowski, 2013; McEwen et al., 1997)

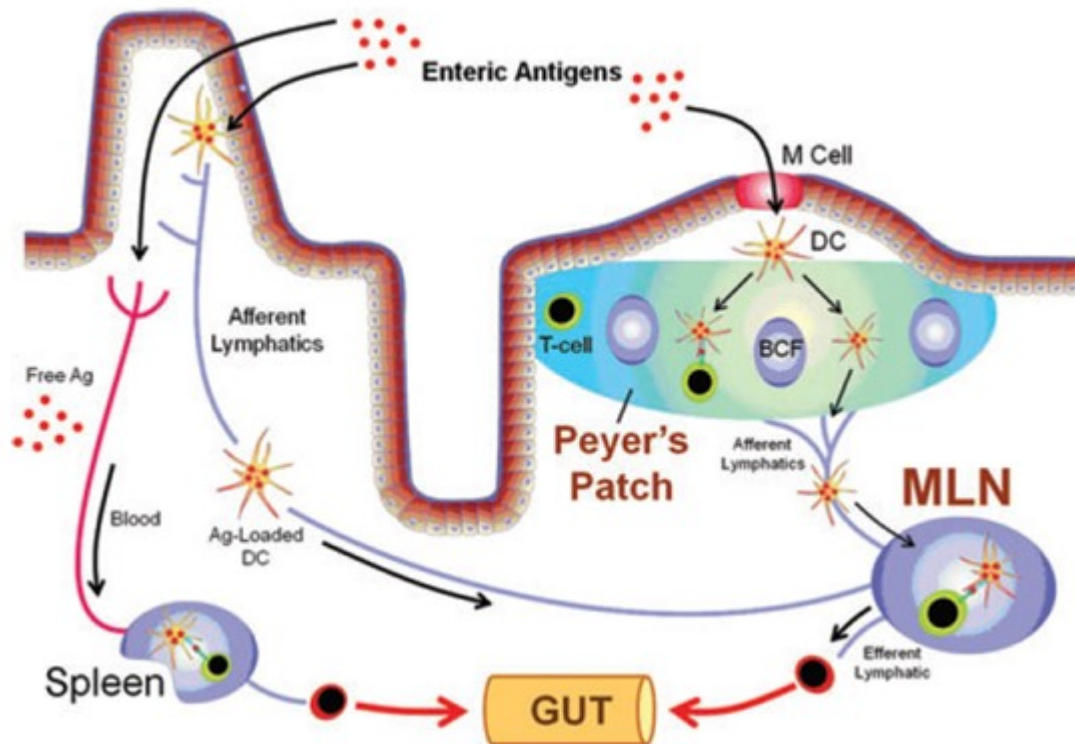
Glukokortikoidy v počáteční fázi potlačují expresi prozánětlivých molekul, kromě prozánětlivých cytokinů také CAM (z angl. *cell adhesion molecules*) a zároveň aktivují expresi protizánětlivých molekul (např. IL-10), čímž inhibují vasodilataci a snižují propustnost cév při zánětu a snižují tím migraci leukocytů (diapedézu) do místa zánětu.

Glukokortikoidy inhibují „Th1“ cytokiny, které zajišťují „buněčnou“ imunitu a směřují imunitní odpověď k „Th2“ regulační dráze zajišťující „protilátkovou“ odpověď, k čemuž pravděpodobně dochází, aby nedošlo k přehnané zánětlivé reakci (Zhang et al., 2005). V souladu s tím je zjištěno, že GC prostřednictvím zvýšené exprese proteinu GILZ (z angl. *glucocorticoid-induced leucine zipper*) v DC buňkách podporují produkci T<sub>reg</sub> lymfocytů, které pomáhají udržovat rovnováhu mezi odpověďmi na patogenní antigeny a tolerancí těch neškodných (Calmette et al., 2014).

## 1.1 Imunitní odpověď střevního imunitního systému

Střevo představuje největší část imunitního systému a obsahuje nejvíc imunitních buněk v porovnání s ostatními orgány celého těla. Dochází zde k neustálé interakci antigenů a jiných molekul pocházejících jak od komensálních bakterií, tak od patogenních mikroorganismů, tak z diety. Střevo je velice komplexní orgán trávicí soustavy obsahující mnoho anatomicky a fyziologicky odlišných částí, které se mohou při patologických podmínkách chovat odlišně v závislosti na tom, jaké imunitní buňky jsou v nich zastoupeny (Mowat & Agace, 2014).

Aby mohlo dojít k protektivní odpovědi na patogeny přítomné ve střevě, musí se naivní T lymfocyt dostat do induktivních míst trávicího traktu GALT (z angl. *gut-associated lymphoid tissue*) – jedná se o Peyeroovy plaky (PP) a izolované lymfoidní folikuly (ILF) – a do mezenteriálních lymfatických uzlin (MLN – z angl. *mesenteric lymph nodes*), kde dochází ke stimulaci T lymfocytu antigen-prezentujícími buňkami (dendritické buňky DC a makrofágy) a následné diferenciaci T lymfocytu na Th1 nebo Th17 efektorové buňky. Ty se pak dostávají buď eferentními lymfatickými cévami, nebo krevním řečištěm zpět do střeva – do střevního epitelu a vrstvy *lamina propria*, které představují efektorová místa, kde pomáhají spustit zánětlivou reakci a eliminovat invazivní patogeny. Některé antigeny jsou pak transportovány do sleziny, kde dojde k pohlcení slezinnou DC a ke spuštění imunitní odpovědi ve slezině (viz. Obr. 1-1 (Koboziev et al., 2010))



**Obrázek 1-1** Odpověď střevního mukózního imunitního systému na střevní bakteriální antigeny

Střevní bakteriální antigeny mohou za 1) vstupovat prostřednictvím transportu M bučkami do Peyerových plaků (PP; do ILF v případě kolonu), kde jsou endocytovány dendritickými bučkami (DC) v subepiteliální zóně. DC s navázaným antigenem pak mohou v PP/ILF interagovat s T-lymfocyty a tím je stimulovat nebo mohou aferentními lymfatickými cévami migrovat do mezenteriálních lymfatických uzlin (MLN), kde dochází k interakci DC s naivními T-lymfocyty, jejímž výsledkem je stimulace T lymfocytů, jejich polarizace a diferenciaci na efektorové buňky. Tyto efektorové buňky opouštějí MLN, eferentními lymfatickými cévami se dostávají do oběhového systému a následně zpátky do střeva do vrstvy *lamina propria*. Za 2) mohou být střevní antigeny endocytovány DC v *lamina propria* a dopraveny aferentními lymfatickými cévami do MLN, kde dojde k interakci s T bučkami. A za 3) mohou být volné střevní antigeny vstřebány do krevního řečiště, které antigeny dopraví do sleziny, kde antigeny pohltí slezinné DC, které zde spustí příslušnou imunitní odpověď. Převzato z (Koboziev et al., 2010)

## 2 Glukokortikoidy

Glukokortikoidy (GC – z angl. *glucocorticoids*) jsou steroidní hormony produkované nadledvinami – konkrétně střední vrstvou kůry nadledvin *zonou fasciculata* – vykazující pleiotropní účinky na buňky celého organismu. Sekrece GC je řízena zpětnovazebně osou hypothalamus-hypofýza-nadledviny (HPA – z angl. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*) prostřednictvím hormonu ACTH (z angl. *adrenocorticotropine hormone*). Sekrece za normálních podmínek probíhá s cirkadiánní rytmitou. U člověka je vrchol sekrece v ranních hodinách, nejnižší plazmatická koncentrace GC je pak večer. Naopak u hlodavců (nočních živočichů) je tomu přesně naopak.

Glukokortikoidy jsou molekuly lipofilního charakteru, krví se dostanou do cílových tkání, kde mohou volně vstupovat do buněk a následně ovlivňovat genovou expresi. Nicméně právě jejich dostupnost je ovlivněna několika faktory. V krvi je většina aktivních molekul hormonu (u člověka kortisol, u myši a potkana kortikosteron) vázána specificky na CBG (z angl. *corticosteroid-binding globulin*), nespecificky pak na albumin. Jen asi 10 % je v krvi volně a je biologicky aktivní. Naproti tomu neaktivní molekula hormonu, jeho 11-oxo derivát (u člověka kortison, u hlodavců 11-dehydrokortikosteron) se v krvi vyskytuje volně, a když se dostane do buňky, může zde být aktivován v rámci pre-receptorového metabolismu enzymem 11HSD1 (11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenáza 1).

### 2.1 Glukokortikoidní receptory

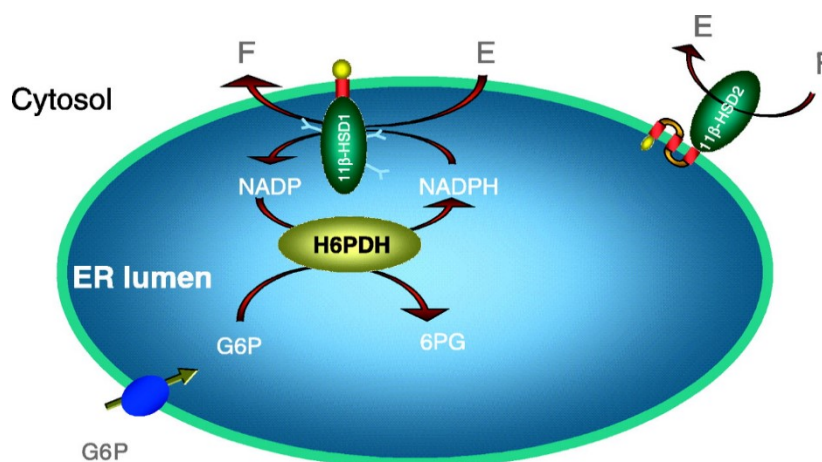
Glukokortikoidy v tkáních působí prostřednictvím vazby na své receptory. Známe 2 typy receptorů, a to mineralokortikoidní receptor (MR) a glukokortikoidní receptor (GR). Na MR se GC váží s daleko vyšší (6-10násobnou) afinitou než na GR (Reul & de Kloet, 1985), s téměř stejnou afinitou jako mineralokortikoidní hormon aldosteron (Arriza et al., 1988) a je tedy teoreticky obsazen glukokortikoidy i při nízké hladině hormonu v krvi. Naproti tomu GR je obsazen, pokud dojde ke zvýšení koncentrace GC v krvi, a to buď při vrcholu cirkadiánní sekrece, nebo při stresové zátěži, kdy dojde k narušení homeostázy a následné aktivaci HPA osy. Nicméně tyto představy byly upraveny objevením enzymů, které mohou upravovat koncentraci aktivních molekul hormonů přímo v buňce.

## 2.2 Pre-receptorový metabolismus GC

11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenázy (11HSD) jsou enzymy schopné upravovat koncentraci aktivních molekul GC lokálně přímo v buňce. Tato enzymová aktivita byla poprvé pozorována *in vitro* v 50. letech (Amelung et al., 1953). K purifikaci enzymu (11HSD1) z jaterních mikrosomů potkana došlo později (Lakshmi & Monder, 1988).

11HSD1 se v intaktních buňkách (Rajan et al., 1996) chová jako reduktáza, inaktivní molekuly GC (kortisonu a 11-dehydrokortikosteronu) konvertuje na aktivní (kortisol a kortikosteron). Naproti tomu 11HSD2 konvertuje aktivní GC na inaktivní, díky čemuž zajišťuje v cílových tkáních aldosteronu (mineralokortikoidu udržujícím iontovou rovnováhu organismu), že nebude MR obsazen kortisolem nebo kortikosteronem (Edwards et al., 1988; Funder et al., 1988).

11HSD1 je 287 aminokyselin dlouhý a 34 kDa těžký (Agarwal et al., 1989) transmembránový protein s kotvící N-koncovou transmembránovou doménou a katalytickou doménou v lumen endoplasmatického retikula (Odermatt et al., 1999; Ozols, 1995). Pro reduktázovou aktivitu vyžaduje kofaktor NADPH (Rajan et al., 1996), který dodává enzym hexóza-6-fosfátdehydrogenáza (H6PDH) (Atanasov et al., 2004). Exprese H6PDH byla pozorována ve většině tkání, kde byla exprimována 11HSD1 (Gomez-Sanchez et al., 2008). Mezi těmito enzymy dochází k přímé proteinové interakci (Atanasov et al., 2008; Zhang et al., 2009), která ve spíše oxidativním prostředí ER umožňuje reduktázovou aktivitu 11HSD1 (Atanasov et al., 2008), viz obr. 2-1.



**Obrázek 2-1 Kooperace H6PDH s 11HSD1 v endoplasmatickém retikulu**

H6PDH vytváří NADPH přeměnou glukóza-6-fosfátu (G6P), který je transportován G6P translokázou (GT), na 6-fosfoglukonát (6PG) v lumen endoplasmatického retikula (ER). 11HSD1 využívá NADPH jako kofaktor při konverzi kortisonu/11-DHC na kortisol/kortikosteron. Převzato z (Draper & Stewart, 2005)

### 3 11HSD1 a zánět

Jak už bylo ukázáno v předchozí kapitole, 11HSD1 je enzym schopný aktivovat GC lokálně přímo v buňce. Studie Hennebold et al., 1996 prokázala výskyt 11HSD1 nejen v thymu, ale i v sekundárních lymfatických tkáních, ve slezině, MLN a Peyerových placích. Další studie pak sledovaly 11HSD1 v různých typech imunitních buněk, v dendritických buňkách (Freeman, 2005; Soulier et al., 2013), v monocytech (Thieringer et al., 2001), makrofázích (Gilmour et al., 2006) a lymfocytech (Zhang et al., 2005).

Při zánětlivé reakci a vystavení buňky prozánětlivým cytokinům pak dochází k upregulaci 11HSD1 a downregulaci 11HSD2, která GC inaktivuje (Escher et al., 1997; Thieringer et al., 2001; Zhang et al., 2005), což by mohlo napomáhat zpětnovazebné regulaci zánětlivé reakce, která je závislá na 11HSD1 (Escher et al., 1997; Thieringer et al., 2001), ale ne na 11HSD2 (Coutinho et al., 2012).

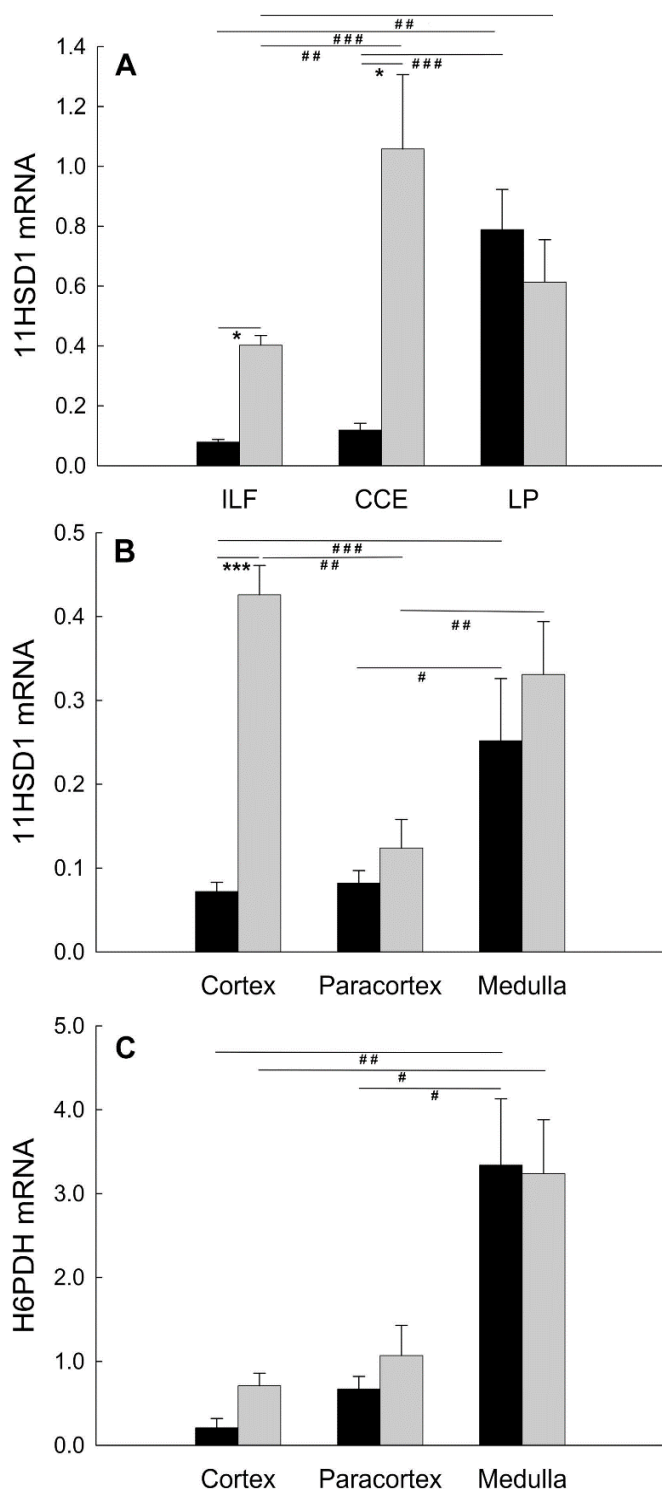
Co se týče regulace 11HSD1 při střevním zánětu, předchozí studie naší laboratoře prokázaly, že experimentální kolitida upreguluje 11HSD1 ve střevu, mezenteriálních lymfatických uzlinách a slezině (Bryndová et al., 2004; Ergang et al., 2011; Vagnerová et al., 2006) a že tuto upregulaci lze indukovat *in vitro* na střevních explantátech inkubací s prozánětlivými cytokiny (Ergang et al., 2011), upregulaci ve střevu pozorovali také autoři Stegk et al. (2009), nicméně všechny tyto studie byly prováděny na celých tkáních bez rozlišení, o jaké typy buněk se jedná, a proto cílem této práce bylo zjistit, jaká bude exprese 11HSD1 a cytokinů, které mohou 11HSD1 regulovat, v jednotlivých mikrostrukturách střeva.

### 4 Cíle

Důkazy naznačují, že v regulaci zánětlivé reakce glukokortikoidy se uplatňuje enzym 11HSD1, a to jak ve střevu, tak i v lymfatických tkáních (Ergang et al., 2011; Taves et al., 2016). Vzhledem k tomu, že dosud známé studie byly prováděny na celých tkáních, naším cílem bylo stanovit hladinu exprese 11HSD1 a cytokinů v izolovaných mikrostrukturách střeva (stř. epitel CCE, *lamina propria* a izolované lymfoidní folikuly ILF) a sekundárních lymfatických tkáních (slezina, MLN). Dalším cílem pak bylo stanovit expresi v purifikovaných populacích imunitních buněk sleziny a MLN.

## 5 Výsledky

Proteinová analýza metodou Western Blot ukázala zvýšenou expresi 11HSD1, jak v kolonu, tak v MLN v myších s kolitidou indukovanou dextran sulfátem sodným (DSS).

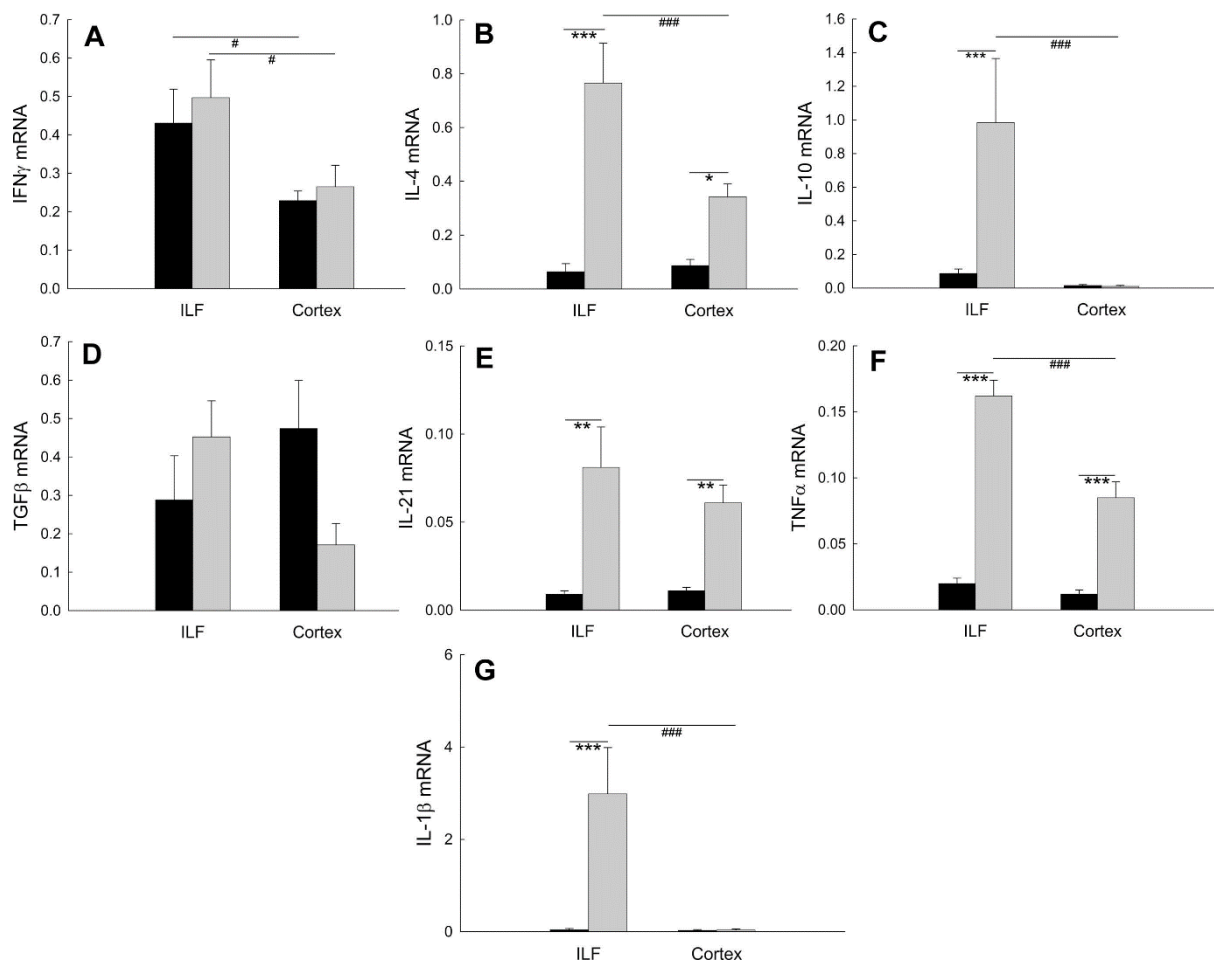


**Obrázek 5-1** Efekt kolitidy na expresi 11HSD1 a H6PDH v anatomicky odlišných částech kolonu a MLN

Analýza genové exprese jednotlivých mikrostruktur střeva vyřezaných pomocí laserové mikrodisekce (LMD) pak ukázala zvýšenou expresi 11HSD1 jak v místech indukce imunitní odpovědi střevního imunitního systému – kortex MLN ( $P < 0,05$ ), ILF ( $P < 0,05$ ), tak v efektorových strukturách – CCE (z angl. *colonic crypt epithelium*;  $P < 0,001$ ), které kromě enterocytů obsahují také mnoho imunitních buněk, např. intraepiteliální lymfocyty. Naproti tomu exprese H6PDH byla ve střevních mikrostrukturách pod detekčním limitem. V MLN byla exprese zvýšená v medule v porovnání s kortexem ( $P < 0,01$  a  $P < 0,05$ ) a parakortexem ( $P < 0,01$ ), nebyla však ovlivněna kolitidou.

A: Kolon - ILF (izolované lymfoidní folikuly), CCE (stř. epitel); LP (*lamina propria*); B, C: MLN; sloupce představují kontrolní zdravé myši (černá) a myši s kolitidou indukovanou DSS (šedá); porovnání identických struktur u kontrolních zvířat a zvířat s indukovaným zánětem. Výsledky jsou vyneseny jako průměr  $\pm$  SEM ( $n=7-9$ ). \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$ ; porovnání mezi mikrostrukturami # $P < 0,05$ , ## $P < 0,01$ , ### $P < 0,001$ .

Další analýza genové exprese tentokrát už jen v ILF a kortexu MLN, ukázala změny v mikroprostředí cytokinů indukované kolitidou.



**Obrázek 5-2** Efekt kolitidy na expresi cytokinů v ILF a v kortexu MLN

Sloupce představují hladinu exprese u kontrolních zdravých myší (černá) a u myší s kolitidou indukovanou DSS (šedá); porovnání identických struktur u kontrolních zvířat a zvířat s indukovaným zánětem. Výsledky jsou vyneseny jako průměr  $\pm$  SEM (n=7-9). \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001; porovnání mezi jednotlivými mikrostrukturami #P<0,05, ###P<0,001.

Kolitida signifikantně ovlivnila expresi genů pro IL-1 $\beta$  (P < 0,01), IL-4 (P < 0,001), IL-10 (P < 0,05), IL-21 (P < 0,001) a TNF $\alpha$  (P < 0,001), ne pro IFN $\gamma$  a TGF $\beta$ . Tento efekt byl patrnější v ILF než v MLN. V případě IL-1 $\beta$  (P < 0,01), IL-4 (P < 0,05), IL-10 (P < 0,01), TNF $\alpha$  (P < 0,001) a IFN $\gamma$  (P < 0,01) byly pozorovány kvantitativní rozdíly v expresi v ILF oproti v MLN.

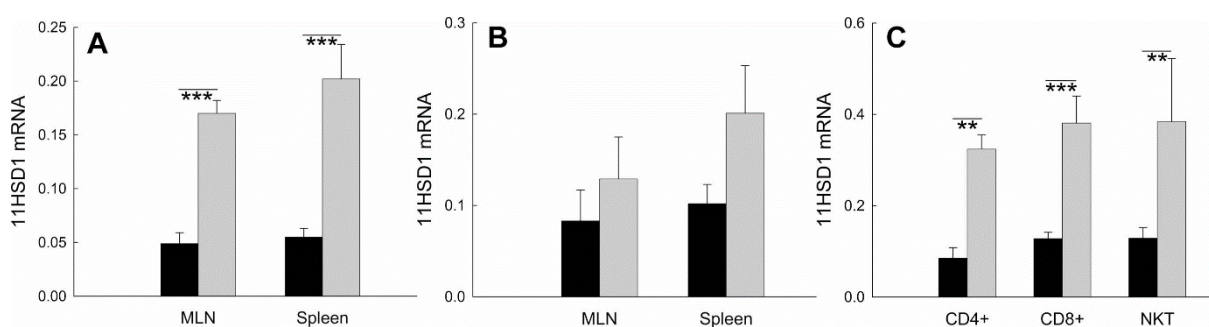
Pro zjištění, který z cytokinů by mohl nejvíce přispívat k upregulaci 11HSD1, byla provedena regresní analýza exprese 11HSD1 a cytokinů v ILF a kortexu MLN, která ukázala, že zvýšená exprese 11HSD1 při kolitidě koreluje se zvýšenou expresí TNF $\alpha$ .

**Obrázek 5-3 Regresní analýza exprese 11HSD1 a cytokinů v ILF a kortexu MLN**

	Beta	P	R <sup>2</sup>
IFN $\gamma$	0.293	ns	0.010
IL-1 $\beta$	0.622	< 0.05	0.340
IL-4	0.440	< 0.05	0.157
IL-10	0.295	ns	0.022
IL-21	0.588	< 0.01	0.318
TGF $\beta$	0.282	ns	0.047
TNF $\alpha$	0.751	< 0.0001	0.562

Beta, regresní koeficient; P, hladina významnosti; R<sup>2</sup>, determinační koeficient; ns, nesignifikantní

Posledním cílem bylo zjistit, zda dochází při zánětu k upregulaci 11HSD1 také v purifikovaných buňkách sleziny a MLN. Pomocí průtokové cytometrie bylo izolováno několik fenotypů lymfocytů: CD19 (B lymfocyty), CD3<sup>+</sup> (T lymfocyty) a jejich subpopulace CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> a NKT (*natural killer* T lymfocyty). U T lymfocytů byla 11HSD1 jak ve slezině, tak v MLN silně upregulována **\*\*\*P<0,001**, zatímco v B lymfocytech byl pouze náznak upregulace (P=0,074). Analýza T lymfocytů ze sleziny ukázala, že 11HSD1 je silně upregulována ve všech třech subpopulacích.



**Obrázek 5-4 Efekt kolitidy na izolované subpopulace lymfocytů sleziny a MLN**

(A) T buňky; (B) B buňky; (C) subpopulace T lymfocytů ze sleziny (CD4<sup>+</sup>; CD8<sup>+</sup>; NKT, natural killer T lymfocyty). Černé sloupce představují hladinu exprese u kontrolních zdravých myší a šedé u myší s kolitidou indukovanou DSS. Výsledky jsou vyneseny jako průměr  $\pm$  SEM, získány z 6 kontrolních, 6 DSS myší, subpopulace lymfocytů byly vždy připraveny z jednoho zvířete. Signifikance rozdílů mezi kontrolou a DSS kolitidou: **\*\*P<0,01**, **\*\*\*P<0,001**

## 6 Diskuze a závěr

Při analýze exprese v jednotlivých mikrostrukturách patřících mezi induktivní (ILF, MLN) i efektorová (CCE, *lamina propria*) místa imunitní odpovědi jsme zjistili, že 11HSD1 byla upregulována v obou typech tkání, a to v CCE a pak v ILF a kortexu MLN.

Ačkoliv ILF a folikuly v MLN obsahují hlavně B lymfocyty a stromální buňky, jsou zde přítomné i jiné typy buněk (DC, T lymfocyty, folikulární epiteliální b.) a v porovnání výsledků kortexu MLN s výsledky parakortexu a meduly můžeme usuzovat, že k upregulaci 11HSD1 nedošlo ve stromálních buňkách. Navíc v DC buňkách je v klidovém stavu lokální amplifikace GC stálá, probíhá v maximální míře a není ovlivněna další imunitní stimulací (Soulier et al., 2013). Naproti tomu *in vitro* aktivace T lymfocytů sleziny a lymfatických uzlin je doprovázena upregulací 11HSD1 (Zhang et al., 2005).

Zánět ovlivnil expresi ale také v epitelu ve střevních kryptách, které tvoří komplexní síť nejen epiteliálních buněk, ale také intraepiteliálních lymfocytů (převážně CD8<sup>+</sup> cytotoxické T lymfocyty), ve kterých mohla být 11HSD1 upregulována, jelikož enzymatická aktivita 11HSD1 nebyla v kolonocytech detekována (Ergang et al., 2011). Exprese 11HSD1 beze změny v *lamina propria* pak ukazuje, že zánět pravděpodobně nezvýšil expresi 11HSD1 v makrofázích, které se vyskytují převážně právě v *lamina propria* (Bain & Mowat, 2014).

To, jaký bude průběh zánětlivé odpovědi, je závislý na expresi cytokinů. Kolidita zvýšila expresi TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  (mají pleiotropní účinky), IL-4, IL-10 (charakteristické pro Th2 regulační dráhu) a IL-21 (zesilující Th17 diferenciaci) v ILF, částečně pak v kortexu MLN. U IFN $\gamma$  a TGF $\beta$  (Th1) nebyl pozorován žádný rozdíl, stejně jako v buněčných kulturách sliznice nosních dutin (Jun et al., 2014). Statisticky nejsilnější pozitivní korelace mezi expresí 11HSD1 a cytokinů byla pozorována u TNF $\alpha$ , a i když vliv ostatních cytokinů nemůžeme plně vyloučit, tato korelace z něj dělá klíčový faktor upregulace 11HSD1

O důležitosti lokálního metabolismu glukokortikoidů v buňce není pochyb. V této studii jsme identifikovali změny regulace 11HSD1, enzymu lokálního metabolismu GC, ve specifických strukturách kolonu a MLN při zánětu. Tyto změny mohou ovlivňovat imunomodulační efekt GC v imunitních reakcích vyvolaných aktivací střevního imunitního systému, přičemž upregulace 11HSD1 v induktivních místech je spojena s aktivací Th2 ale ne s Th1 dráhou.

## 7 Literatura

- Agarwal, A. K., Monder, C., Eckstein, B., & White, P. C. (1989). Cloning and expression of rat cDNA encoding corticosteroid 11 beta-dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(32), 18939–18943. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2808402>
- Amelung, D., Hübener, H. J., Roka, L., & Meyerheim, G. (1953). Conversion of cortisone to compound F. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 13(9), 1125–1126. <https://doi.org/10.1210/jcem-13-9-1125>
- Arriza, J. L., Simerly, R. B., Swanson, L. W., & Evans, R. M. (1988). The neuronal mineralocorticoid receptor as a mediator of glucocorticoid response. *Neuron*, 1(9), 887–900. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(88\)90136-5](https://doi.org/10.1016/0896-6273(88)90136-5)
- Atanasov, A. G., Nashev, L. G., Gelman, L., Legeza, B., Sack, R., Portmann, R., & Odermatt, A. (2008). Direct protein-protein interaction of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase in the endoplasmic reticulum lumen. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783(8), 1536–1543. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.03.001>
- Atanasov, A. G., Nashev, L. G., Schweizer, R. A. S., Frick, C., & Odermatt, A. (2004). Hexose-6-phosphate dehydrogenase determines the reaction direction of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as an oxoreductase. *FEBS Letters*, 571, 129–133. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.06.065>
- Bain, C. C., & Mowat, A. M. (2014). Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunological Reviews*, 260(1), 102–117. <https://doi.org/10.1111/imr.12192>
- Bryndová, J., Žbáňková, Š., Kment, M., & Pácha, J. (2004). Colitis up-regulates local glucocorticoid activation and down-regulates inactivation in colonic tissue. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 39(6), 549–553. <https://doi.org/10.1080/00365520410004659>
- Busillo, J. M., & Cidlowski, J. A. (2013). The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: Ready, reinforce, repress, resolve, and restore. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 24(3), 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.11.005>
- Calmette, J., Ellouze, M., Tran, T., Karaki, S., Ronin, E., Capel, F., ... Godot, V. (2014). Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Enhanced Expression in Dendritic Cells Is

- Sufficient To Drive Regulatory T Cells Expansion In Vivo. *The Journal of Immunology*, 193(12), 5863–5872. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400758>
- Coutinho, A. E., Gray, M., Brownstein, D. G., Salter, D. M., Sawatzky, D. A., Clay, S., ... Chapman, K. E. (2012). 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1, But Not Type 2, Deficiency Worsens Acute Inflammation and Experimental Arthritis in Mice. *Endocrinology*, 153(1), 234–240. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1398>
- Draper, N., & Stewart, P. M. (2005). 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. *The Journal of Endocrinology*, 186(2), 251–271. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06019>
- Edwards, C. R. W., Stewart, P. M., Burt, D., Brett, L., McIntyre, M. A., Sutanto, W. S., ... Monder, C. (1988). Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet (London, England)*, 2(8618), 986–989. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(88\)90742-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(88)90742-8)
- Ergang, P., Vytáčková, K., Švec, J., Bryndová, J., Mikšík, I., & Pácha, J. (2011). Upregulation of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1 in lymphoid organs during inflammation in the rat. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 126(1–2), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.04.002>
- Escher, G., Galli, I., Vishwanath, B. S., Frey, B. M., & Frey, F. J. (1997). Tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 1 $\beta$  enhance the cortisone/cortisol shuttle. *Journal of Experimental Medicine*, 186(2). <https://doi.org/10.1084/jem.186.2.189>
- Freeman, L. (2005). Expression of 11 -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 permits regulation of glucocorticoid bioavailability by human dendritic cells. *Blood*, 106(6), 2042–2049. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-01-0186>
- Funder, J., Pearce, P., Smith, R., & Smith, A. (1988). Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science*, 242(4878), 583–585. <https://doi.org/10.1126/science.2845584>
- Gilmour, J. S., Coutinho, A. E., Cailhier, J.-F., Man, T. Y., Clay, M., Thomas, G., ... Chapman, K. E. (2006). Local amplification of glucocorticoids by 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 promotes macrophage phagocytosis of apoptotic leukocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(12), 7605–7611. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.12.7605>
- Gomez-Sanchez, E. P., Romero, D. G., de Rodriguez, A. F., Warden, M. P., Krozowski, Z., &

- Gomez-Sanchez, C. E. (2008). Hexose-6-phosphate dehydrogenase and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 tissue distribution in the rat. *Endocrinology*, *149*(2), 525–533. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0328>
- Hennebold, J. D., Ryu, S. Y., Mu, H. H., Galbraith, A., & Daynes, R. A. (1996). 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase modulation of glucocorticoid activities in lymphoid organs. *The American Journal of Physiology*, *270*(6 Pt 2), R1296-306. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1996.270.6.R1296>
- Jun, Y. J., Park, S. J., Kim, T. H., Lee, S. H., Lee, K. J., Hwang, S. M., & Lee, S. H. (2014). Expression of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 in patients with chronic rhinosinusitis and their possible contribution to local glucocorticoid activation in sinus mucosa. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *134*(4), 926–934.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.03.033>
- Koboziev, I., Karlsson, F., & Grisham, M. B. (2010). Gut-associated lymphoid tissue, T cell trafficking, and chronic intestinal inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1207* Suppl(SUPPL.1), E86-93. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05711.x>
- Lakshmi, V., & Monder, C. (1988). Purification and characterization of the corticosteroid 11 beta-dehydrogenase component of the rat liver 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase complex. *Endocrinology*, *123*(5), 2390–2398. <https://doi.org/10.1210/endo-123-5-2390>
- McEwen, B. S., Biron, C. A., Brunson, K. W., Bulloch, K., Chambers, W. H., Dhabhar, F. S., ... Weiss, J. M. (1997, February). The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: Neural, endocrine and immune interactions. *Brain Research Reviews*. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(96\)00012-4](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(96)00012-4)
- Mowat, A. M., & Agace, W. W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology*, *14*(10), 667–685. <https://doi.org/10.1038/nri3738>
- Munck, A., Guyre, P. M., & Holbrook, N. J. (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine Reviews*, *5*(1), 25–44. <https://doi.org/10.1210/edrv-5-1-25>
- Odermatt, A., Arnold, P., Stauffer, A., Frey, B. M., & Frey, F. J. (1999). The N-terminal anchor sequences of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases determine their orientation in the endoplasmic reticulum membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(40), 28762–28770. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.40.28762>

- Ozols, J. (1995). Luminal orientation and post-translational modifications of the liver microsomal 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(17), 10360. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.5.2305>
- Rajan, V., Edwards, C. R., & Seckl, J. R. (1996). 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in cultured hippocampal cells reactivates inert 11-dehydrocorticosterone, potentiating neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(1), 65–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8613810>
- Reul, J. M., & de Kloet, E. R. (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, 117(6), 2505–2511. <https://doi.org/10.1210/endo-117-6-2505>
- Soulier, A., Blois, S. M., Sivakumaran, S., Fallah-Arani, F., Henderson, S., Flutter, B., ... Chakraverty, R. (2013). Cell-intrinsic regulation of murine dendritic cell function and survival by prereceptor amplification of glucocorticoid. *Blood*, 122(19), 3288–3297. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-489138>
- Stegk, J. P., Ebert, B., Martin, H.-J., & Maser, E. (2009). Expression profiles of human 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases type 1 and type 2 in inflammatory bowel diseases. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 301(1–2), 104–108. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.10.030>
- Taves, M. D., Plumb, A. W., Korol, A. M., Van Der Gugten, J. G., Holmes, D. T., Abraham, N., & Soma, K. K. (2016). Lymphoid organs of neonatal and adult mice preferentially produce active glucocorticoids from metabolites, not precursors. *Brain, Behavior, and Immunity*, 57, 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.05.003>
- Thieringer, R., Le Grand, C. B., Carbin, L., Cai, T.-Q., Wong, B., Wright, S. D., & Hermanowski-Vosatka, A. (2001). 11 -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Is Induced in Human Monocytes upon Differentiation to Macrophages. *The Journal of Immunology*, 167(1), 30–35. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.1.30>
- Vagnerová, K., Kverka, M., Klusonová, P., Ergang, P., Miksík, I., Tlaskalová-Hogenová, H., & Pácha, J. (2006). Intestinal inflammation modulates expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in murine gut. *The Journal of Endocrinology*, 191(2), 497–503. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06732>
- Zhang, T., Ding, X., & Daynes, R. (2005). The expression of 11 beta-hydroxysteroid

dehydrogenase type I by lymphocytes provides a novel means for intracrine regulation of glucocorticoid activities. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174(2), 879–889. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.2.879>

Zhang, Y., Zhong, X., Gjoka, Z., Li, Y., Stochaj, W., Stahl, M., ... Suri, V. (2009). H6PDH interacts directly with 11beta-HSD1: implications for determining the directionality of glucocorticoid catalysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483(1), 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.12.004>

## 8 Seznam obrázků

Obrázek 1-1 Odpověď střevního mukózního imunitního systému na střevní bakteriální antigeny .....	10
Obrázek 2-1 Kooperace H6PDH s 11HSD1 v endoplasmatickém retikulu .....	12
Obrázek 5-1 Efekt kolitidy na expresi 11HSD1 a H6PDH v anatomicky odlišných částech kolonu a MLN .....	14
Obrázek 5-2 Efekt kolitidy na expresi cytokinů v ILF a v kortexu MLN .....	15
Obrázek 5-3 Regresní analýza exprese 11HSD1 a cytokinů v ILF a kortexu MLN .....	16
Obrázek 5-4 Efekt kolitidy na izolované subpopulace lymfocytů sleziny a MLN .....	16

## **9 Příloha**

**Inflammation regulates 11b-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 differentially in specific compartments of the gut mucosal immune system**