

Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, v. v. i.

Oddělení funkce epitelu

Institute of Physiology, The Czech Academy of Sciences

Laboratory of Epithelial Physiology

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie živočichů

Charles University in Prague, Faculty of Science

Department of Physiology



Mgr. Martin Vodička

Autoreferát disertační práce

**Vliv stresu na regulaci a regeneraci glukokortikoidů u zvířecích modelů lišících se odpovědí
osy hypothalamus-hypofýza-nadledviny**

Ph.D. Thesis summary

**The effect of stress on regulation and regeneration of glucocorticoids in animal models
differing in response of hypothalamo-pituitary-adrenal axis**

Praha/Prague 2021

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Doctoral Study programs in Biomedicine

Univerzita Karlova a Akademie věd ČR

Charles University and the Czech Academy of Sciences

Studijní program / Study program:

Fyziologie živočichů / Animal Physiology

Předseda oborové rady / Chairman of the Sector Board:

doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Školící pracoviště / Training institution:

Fyziologický ústav Akademie věd České republiky, v. v. i., Oddělení funkce epitelu

Institute of Physiology CAS, Laboratory of Epithelial Physiology

Autor / Author: Mgr. Martin Vodička

Školitel / Supervisor: Prof. RNDr. Jiří Pácha, DrSc.

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

The Ph.D. Thesis is available in the library of the Faculty of Science, Charles University, Prague.

Abstrakt

Mozek aktivuje stresovou odpověď v situacích, kdy je nebo se zdá být ohrožena homeostáza. Informace o stresu jsou vedeny z mozku dvěma hlavními větvemi; sympatoadrenálním systémem a osou hypothalamus-hypofýza-nadledviny (HPA), které aktivují neurální, humorální a imunitní dráhy, určené pro zvládnání stresových situací. Protože se jedná o velmi účinný mechanismus, musí být stresová odpověď přesně řízena. HPA osa je regulována zpětnovazebným systémem, kdy její konečný produkt, kortikosteron u laboratorních potkanů a myši, tlumí její aktivitu. Efekt kortikosteronu nezávisí pouze na jeho koncentraci, ale také na lokálním metabolismu glukokortikoidů katalyzovaném enzymem 11 β -hydroxysteroiddehydrogenázou 1 (kódovanou genem *Hsd11b1*), který obnovuje kortikosteron z 11-dehydrokortikosteronu uvnitř buňky; nebo *de novo* syntézou glukokortikoidů. V naší práci jsme se zaměřili na zkoumání stresové odpovědi u pokusných zvířat lišících se reaktivitou HPA osy ((potkani kmene Fischer 344 (F344) proti potkanům kmene Lewis (LEW) a bezmikrobní (GF) myši proti myším bez specifického patogenu (SPF)), se zaměřením na regulaci stresové odpovědi, regeneraci glukokortikoidů a vliv mikrobioty. Zjistili jsme, že stres moduluje lokální regeneraci glukokortikoidů v limbických oblastech zapojených do řízení HPA osy, ale nemá vliv v jednotlivých složkách samotné HPA osy. Kmeny potkanů F344 a LEW vykazovaly různé stresem indukované změny genů podílejících se na regulaci HPA osy v limbických oblastech. Obdobně, stres zvýšil regeneraci glukokortikoidů v lymfatických orgánech a toto zvýšení bylo více zřetelné u kmene LEW než u kmene F344. Regenerace glukokortikoidů byla také zvýšena zánětem ve specifických mikroanatomických kompartmentech myšního střevního imunitního systému a exprese *Hsd11b1* korelovala s expresí *Tnfa* a některých dalších cytokinů. Mikrobiota modulovala chování v sociálním konfliktu a odpověď HPA osy, tlustého střeva a mezenteriálních lymfatických uzlin při vystavení chronickému psychosociálnímu stresu. Mikrobiota rovněž ovlivňovala odpověď hypofýzy, nadledvin a střev na akutní stres znehybněním. Celkově lze uzavřít, že lokální regenerace glukokortikoidů hraje důležitou roli v centrální zpětnovazebné regulaci odpovědi HPA osy na stres a v lokální regulaci imunitního systému. Mikrobiota se účastní nejenom na modulaci odpovědi HPA osy při stresu, ale také chování a lokální extra-adrenální regenerace glukokortikoidů a jejich syntézy *de novo*.

Abstract

Stress reaction is usually activated by the brain, when homeostasis is or perceived to be threatened. The stress signals are transmitted from the brain by two main branches; the sympathoadrenomedullary and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axes and employ neural, humoral and immune pathways to cope with the stressor. Because of its potency, the stress reaction has to be precisely regulated. The HPA axis is regulated by feedback loops where its end product, corticosterone in laboratory rat and mouse, inhibits its activity. The effect of corticosterone does not depend only on the concentration of corticosterone but also on local metabolism of glucocorticoids via oxo-reduction catalyzed by the enzyme 11β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 (encoded by the *Hsd11b1* gene), which intracellularly regenerates active corticosterone from inactive 11-dehydrocorticosterone, or by extra-adrenal de novo steroidogenesis of glucocorticoids. We focused on analysis of stress response in experimental animals differing in HPA axis responsivity ((Fischer 344 rats (F344) vs. Lewis rats (LEW) and germ-free (GF) vs. specific pathogen free mice (SPF)) with special emphasis on regulation of stress response, glucocorticoid regeneration and influence of gut microbiota. We found that psychosocial stress modulated local regeneration of glucocorticoids in the limbic structures involved in HPA axis regulation but not in the canonical structures of HPA axis. F344 and LEW rats showed differences in stress-dependent changes of expression of genes involved in HPA axis regulation in limbic areas. Similarly, psychosocial stress upregulated regeneration of corticosterone in lymphoid organs and this effect was more pronounced in LEW than F344 rats. Similarly, inflammatory stress elevated glucocorticoid regeneration in specific microanatomical compartments of the murine immune system and expression of *11hsdb1* correlated with the expression of *Tnfa* as well as other cytokines. Microbiota modulated behavior in social conflicts and the response of the HPA axis, colon and mesentery lymph nodes to chronic psychosocial stress. We also demonstrated that microbiota impact the response of the pituitary, adrenals and intestine to acute restraint stress. Together we can conclude that local regeneration of glucocorticoids plays an important role in central feedback regulation of HPA axis response and in local restriction of immune system. The microbiota are involved in modulation not only the HPA response to stress but also behavior and local extra-adrenal glucocorticoid regeneration and de-novo synthesis.

Obsah/Table of Contents

Abstrakt	3
Abstract.....	4
Obsah/Table of Contents	5
Seznam zkratk/List of abbreviations	6
1 Úvod.....	8
2 Cíle	10
3 Metodické přístupy	11
4 Souhrn hlavních výsledků a diskuse	14
5 Závěry	23
6 Publikace <i>in extenso a podíl autora</i>	25
7 Další publikace autora.....	26
1 Introduction.....	27
2 Aims	29
3 Methodological approaches	30
4 Results and discussion	33
5 Conclusions.....	43
6 List of publications <i>in extenso</i> and contributions of the author	45
7 Other publications by the author.....	47
8 Seznam literatury / References	48

Seznam zkratek/List of abbreviations

11HSD1	dehydrogenáza 11 β -hydroxysteroidů typu 1/11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1
ACTH	adrenokortikotropní hormon/ adrenocorticotropic hormone
CA2	cornu Ammonis 2 pole hipokampu / cornu Ammonis 2 subfield of the hippocampus
CA3	cornu Ammonis 3 pole hipokampu / cornu Ammonis 3 subfield of the hippocampus
CCE	epitel krypt kolonu / colonic crypt epithelium
CeA	centrální amygdala / central amygdala
CRH	kortikoliberin/ corticotropin-releasing hormone
CRHR1	receptor pro kortikoliberin 1 / corticotropin-releasing hormone receptor 1
CRHR2	receptor pro kortikoliberin 2 / corticotropin-releasing hormone receptor 2
CYP11A1	cholesterol side-chain cleavage enzyme (P450sc)
CYP11B1	11 β -hydroxyláza / 11 β -hydroxylase (P450c11b1)
CYP21	hydroxyláza 21- steroidů / steroid 21-hydroxylase (P450c21)
dCA1	dorzální část cornu Ammonis 1 oblasti hipokampu / dorsal portion of cornu Ammonis 1 subfield of the hippocampus
F344	potkani kmene Fischer 344 / Fischer 344 rat strain
FKBP5	FK506 binding protein 51
GF	bezmikrobní / germ free
GR	glukokortikoidní receptor / glucocorticoid receptor
HPA	hypothalamus-hypofýza-nadledviny / hypothalamo-pituitary-adrenal
<i>Hsd11b1</i>	gen kódující 11HSD1 / gene encoding 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1
IL	interleukin
ILF	isolovaný lymfatický folikul / isolated lymphoid follicles
ilPFC	infralimbická prefrontální kůra / infralimbic prefrontal cortex
LA	laterální amygdala / lateral amygdala
LEW	potkani kmene Lewis / Lewis rat strain
LRH-1	liver receptor homolog-1
MLN	mesenterická lymfatická uzlina / mesenteric lymph node
<i>Nr3c1</i>	gen pro glukokortikoidní receptor / gene encoding the glucocorticoid receptor
OXT	oxytocin
PACAP	pituitary adenylate cyclase activating polypeptide
plPFC	prelimbická prefrontální kůra / prelimbic prefrontal cortex
POMC	pro-opio-melanokortin / pro-opio-melanocortin
PVN	paraventrikulární jádro hypotalamu / paraventricular nucleus of hypothalamus
SF-1	steroidogenic factor 1

SPF	bez specifických patogenů / specific pathogen free
TNF	tumor necrosis factor
UCN	urocortin
vCA1	ventrální část cornu Ammonis 1 oblasti hipokampu / ventral portion of cornu Ammonis 1 subfield of the hippocampus

1 Úvod

Pro úspěšné přežití a reprodukci v podmínkách nepředvídatelného světa se zvířata (i lidé) musí vyrovnat s řadou obtížných situací způsobených predátory, nedostatkem potravy, vnitrodruhovou rivalitou, špatným počasím, infekcí apod. Proto se u organismů vyvinul mechanismus, který v dynamicky se měnícím prostředí udržuje homeostázu, tzv. stresová odpověď. Stresová odpověď je definována jako odpověď organismu na podnět (stresor), který ohrožuje homeostázu (nebo je organismem vyhodnocen jako homeostázu ohrožující) a je zacílena na její znovuobnovení (Chrousos, 2009; Pacak and Palkovits 2001). Stres je často dáván do souvislosti s patologickými stavy, nicméně je důležité mít na paměti, že akutní stresová odpověď představuje fyziologicky významný nástroj, který je navržen tak, aby aktivoval silné prostředky ve chvílích, kdy je v sázce zdraví či život organismu.

Stresová odpověď vzniká v mozku, odkud jsou stresové signály přenášeny dvěma hlavními větvemi, osou sympatoadrenomedulární a osou hypothalamus-hypofýza-nadledviny (HPA), které aktivují systémy nutné k boji o život, například kardiovaskulární systém, metabolismus a imunitní systém. HPA osa představuje hlavní endokrinní součást stresové odpovědi. Zároveň se jedná o autoregulační dráhu, která negativní zpětnou vazbou pomocí vlastních produktů, kortisolu a kortikosteronu řídí svoji aktivaci a odpověď. Nicméně HPA osa je ovlivněna také centrálními excitačními a inhibičními okruhy, které integrují stresové signály z intra- i extra-hypothalamických struktur (Ulrich-Lai and Herman, 2009). Systemické i psychogenní podněty jsou zpracovávány v mnoha limbických oblastech včetně prefrontální kůry, amygdaly a hipokampu. Obecně lze říci, že kromě zpracování emocionálních a motivačních pochodů, učení a paměti je limbický systém zapojen do koordinace behaviorální odpovědi na stres a podílí se i na regulaci HPA osy (Herman, 2013; Morgane et al., 2005).

Kvůli vysoké účinnosti působků HPA osy, glukokortikoidů, je nutná jejich přesná regulace. Účinek glukokortikoidů nezávisí pouze na jejich plasmatické koncentraci kortikosteronu, ale také na hustotě receptorů, extra-adrenální de novo syntéze glukokortikoidů a modulaci glukokortikoidního signálu uvnitř buňky. Enzym dehydrogenáza 11 β -hydroxysteroidů 1 (11HSD1) moduluje lokální metabolismus steroidů pomocí oxo-redukce, která uvnitř buňky obnovuje aktivní kortikosteron z neaktivního 11-dehydrokortikosteronu. Regulace

glukokortikoidního signálu může být ovlivněna také proteinem 51 vázícím FK506 (FKBP5), který snižuje afinitu glukokortikoidního receptoru (GR) pro glukokortikoidy a tím vytváří extrémně rychlou zpětnou vazbu, kde aktivace GR vede ke zvýšené expresi FKBP5, který následně snižuje aktivitu GR (Gjerstad et al., 2018).

Pro překonání různých podmínek se vyžadují různé vlastnosti. Nelze tedy jednoznačně říci, která vlastnost je univerzálně nejlepší. To může být ukázáno na dvou kmenech potkana, které se liší v reaktivitě HPA osy na stres, stres hyper-reaktivních potkanů kmene Fischer 344 (F344) a stres hypo-reaktivních potkanů kmene Lewis (LEW). Hyper-reaktivita může přinášet výhodu v připravenosti na útěk z nebezpečné situace, ale za cenu allostatické zátěže stresem. Naproti tomu hypo-reaktivní potkani jsou náchylnější k autoimunitním a zánětlivým onemocněním (Bellavance and Rivest, 2014; Korte et al., 2005; Sternberg et al., 1989, 1992). Genetické predispozice mohou být modulovány mnoha vnějšími faktory, mezi jinými například předchozí zkušenost se stresovou situací, spánek, dieta, nebo složení mikrobioty. Konkrétně mikrobiota byla identifikována jako jeden z faktorů, který formuje jak endokrinní, tak behaviorální odpověď vůči stresorům (Cryan and Dinan 2012; Foster et al. 2017). Mnoho studií ukázalo, že odpověď HPA osy při stresu je ovlivněna složením mikrobioty. Bezmikrobní (GF) myši vykazují přehnanou odpověď HPA osy při akutním stresu znehybněním, a tento jev může být odvrácen asociací probiotickými bakteriemi (Clarke et al., 2013; Crumeyrolle-Arias et al., 2014; Sudo et al., 2004).

2 Cíle

Z předchozího textu vyplývá, že stres nelze oddělit od přirozeného života. Nicméně, individuální odpovědi k jednotlivým stresorům se mohou lišit. Proto je důležité zkoumat stresovou odpověď a popisovat její mechanismy, abychom zlepšili léčbu a prevenci nemocí spojených se stresem. Tato práce je zacílena na analýzu stresové odpovědi u zvířat lišících se v odpovědi HPA osy (potkanů kmene F344 proti kmeni LEW a myši bez specifických patogenů (SPF) proti GF myším) se zaměřením na regulaci HPA osy, regeneraci glukokortikoidů a vliv mikrobioty. V prvním projektu jsme zkoumali vliv různých stresorů na expresi genů kódujících proteiny zapojené do centrální a periferní regulace glukokortikoidní signalizace a regulace HPA osy za použití hyper-responsivního kmene F344 a hypo-responsivního kmene LEW, které představují opačné póly spektra odpovědi HPA osy vůči stresu a náchylnosti k imunitním chorobám. Druhý projekt byl zaměřen na roli mikrobioty na utváření stresové odpovědi. Mikrobiota mají schopnost modulovat reaktivitu HPA osy a GF myši vykazují přehnanou odpověď vůči psychologickým stresorům. Proto jsme se zaměřili na interakci mezi stresem a střevní mikrobiotou, tedy jakým způsobem střevní mikrobiota ovlivňuje odpověď HPA osy při stresu. Konkrétně jsme zkoumali následující cíle:

1. Vliv krátkodobého a chronického stresu na aktivaci HPA osy a metabolismus glukokortikoidů ve strukturách mozku náležících k HPA ose a ve strukturách mozku podílejících se na regulaci HPA osy u stres hyper-reaktivních potkanů kmene F344 a u vůči stresu hypo-reaktivních potkanů kmene LEW
2. Vliv chronického stresu na lokální metabolismus a regeneraci glukokortikoidů v lymfatických orgánech
3. Vliv mikrobioty na aktivaci HPA osy při akutním a chronickém stresu
4. Vliv mikrobioty a stresu na regulační dráhy ve střevu
5. Zhodnocení změn v chování při testu resident-intruder, které jsou zapříčiněny mikrobiotou

3 Metodické přístupy

3.1 Stresové procedury

3.1.1 Sociální porážka

Stresový model sociální porážky byl použit u experimentů s potkany i s myši. Konkrétně, potkani kmene F344 staří 65 dní byli využiti coby resident i intrudeři. Týden před začátkem pokusů byli residenti ustájeni samostatně, zatímco intrudeři byli ustájeni ve skupinách po třech až čtyřech. Po uplynutí sedmidenní izolace residentů, bylo přistoupeno k sociální konfrontaci, která trvala po dobu sedmi po sobě následujících dní. Bylo zajištěno, aby se každý intruder denně setkal s daným residentem po dobu třiceti minut. Zvířata byla utracena hned po posledním resident-intruder sezení (Publikace A). V experimentech s potkany kmenů F344 a LEW jsme použili identický protokol s následujícími změnami. Intrudeři kmene F344 a LEW byli vystaveni staršímu vyřazenému chovnému samci agresivnějšího kmene Long-Evans a konfrontace mezi residentem a intruderem trvala 15 min denně po dobu deseti dní.(Publikace E).

V případě myších pokusů byli použiti dva měsíce staří GF a SPF samci kmene BALB/c. GF zvířata byla držena ve sterilních podmínkách izolátoru Trexlerova-typu od narození. Měsíc před začátkem pokusů byly do podobných nesterilních izolátorů přemístěny i SPF myši, aby měly obě skupiny stejné podmínky. Myši byly ustájeny ve skupinách po 4-5 na klec. Jako residenti byli využiti vyřazení chovní samci (staří 7-12 měsíců) kmene BALB/c. Residenti byli ustájeni individuálně týden před začátkem pokusu bez výměny podestýlky (pro zvýšení teritoriality a agresivity). Při testu byl každý intruder přemístěn ze své klece do klece residenta. Po 10 min interakci byly myši odděleny ocelovou mřížkou, aby byl zachován sensorický kontakt po dobu dalších 50 min. Při tom byl resident vystaven psychologickému stresu díky sensorickému kontaktu s residentem. Tento postup byl opakován po dobu 5 následujících dní vždy s jiným residentem, aby nedocházelo k habituaci. Po posledním sezení byla zvířata vyjmuta z izolátorů a usmrcena pod isofluranovou anestezií. (Publikace C).

3.1.2 Třídenní variabilní stresový protokol (Publikace B)

K pokusům byli použiti samci potkanů kmene F344 a LEW staří 60-65 dní. První den byli vystaveni nucenému plavání po dobu 15 min (teplota vody 22 ± 1 °C). Druhý den byla zvířata umístěna na vyvýšenou platformu (12 cm × 12 cm ve výšce 70 cm nad podlahou) v dobře osvětlené místnosti po dobu 30 min. Tato procedura byla opakována třikrát s hodinovou přestávkou mezi

jednotlivými procedurami. Třetí den byla zvířata vystavena dvouhodinovému stresu znehybněním v neprůhledné plastové krabici, která omezila pohyb zvířete. Stresové protokoly byly aplikovány všem zvířatům v jedné kleci ve stejný čas. Zvířata byla usmrcena ihned po skončení posledního stresového sezení.

3.1.3 Akutní stres znehybněním (Publikace D)

Dospělí samci GF a SPF myši byli vystaveni jediné dvouhodinové proceduře znehybnění v 50 ml plastové zkumavce vybavené několika odvětrávacími otvory.

3.1.4 Akutní zánět (Publikace F)

Akutní kolitida byla u samců BALB/c myši vyvolána podáním 2% dextran sulfátu sodného do pitné vody po dobu 5 dní.

3.2 Laserová mikrodisekce

3.2.1 Oblasti mozku (Publikace A a B)

Koronální řezy mozku (20 μ m) byly sériově nařezány na kryostatu při -19°C . Jednotlivé řezy obsahující studované struktury byly přichyceny na sklíčka potažené polyetylén-nafatalátovou membránou, fixovány v 95% lihu, nabarveny 4% kresylovou violetí a promyty třikrát v 95% lihu. Paraventriculární jádro hypotalamu (PVN), centrální (CeA) a laterální (LA) amygdala, Prelimbická prefrontální kůra (plPFC) a infralimbická prefrontální kůra (ilPFC), CA2 a CA3 oblasti hipokampu a ventrální (vCA1) a dorsální (dCA1) pól hipokampu byly identifikovány na základě anatomických orientačních bodů a stereotaktických koordinát dle Paxinose a Watsona (2007). Studované mozkové oblasti byly vyřezány za použití LMD6000 Laser Microdissection System a zachyceny do víček mikrozukumavky. Vyřezané tkáně byly zhomogenizovány v 75 μ l RLT pufru a uloženy při -80°C do izolace RNA.

3.2.2 Colon and MLN (Publikace F)

Dvacetimikrometrové řezy ze zmražených bločků kolonu a mezenterálních lymfatických uzlin (MLN) byly přichyceny na sklíčka potažené polyetylén-nafatalátovou membránou. Tkáně byly následně dehydratovány a nabarveny kresyl-violetí a eosinem B. Ihned po nabarvení byly cílové oblasti vyřezány za použití Leica LMD 6000 Laser Microdissection System. Barvení umožnilo identifikaci funkčně odlišných oblastí ve střevu (izolovaný lymfatický folikul (ILF), lamina propria, a epitel krypt kolonu (CCE)) a MLN (kortex, parakortex, medulla).

3.3 Analýza exprese mRNA

Celková RNA byla izolována z mikrovzorků získaných laserovou mikrodisekcí za použití RNeasy Micro Kitu a z makro vzorků za použití GeneElute Mammalian Total RNA Miniprep Kitu. Jednovláknová cDNA byla získána z totální RNA izolované z mikro- i makro- vzorků použitím random hexamerů a jednoho z kitů, Enhanced Avian Reverse Transcriptase nebo High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. Vzorky cDNA byly analyzovány pomocí real-time qPCR za použití TaqMan Assays specifické pro studovaný transkript.

3.4 Měření hormonů

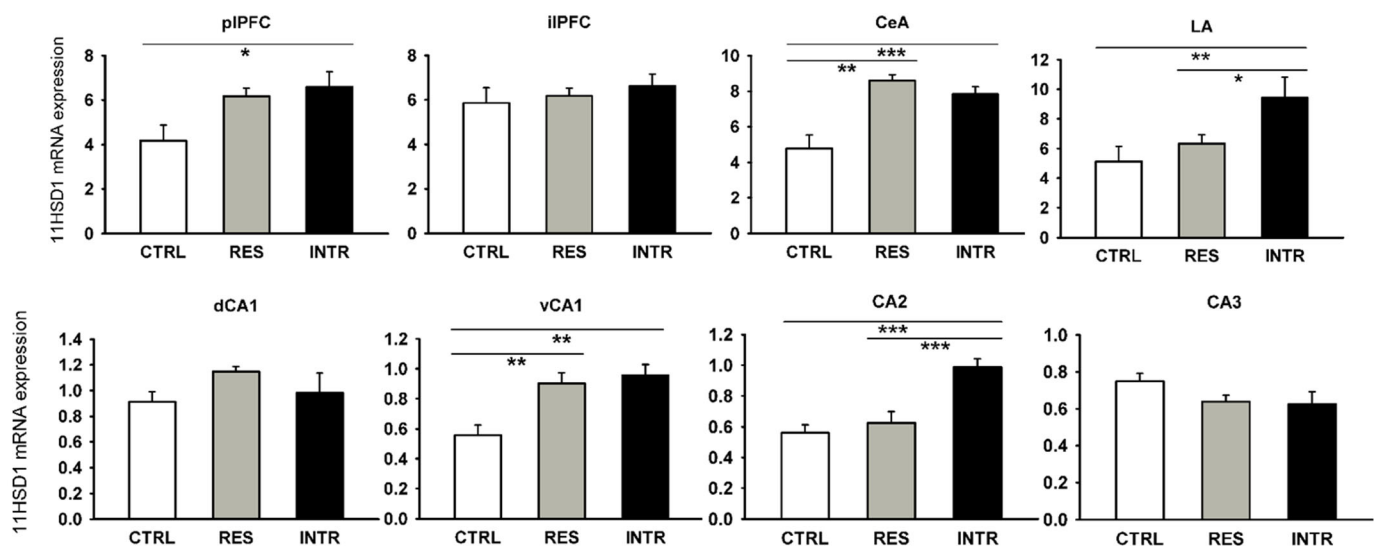
Plazmatická hladina kortikosteronu byla změřena za použití komerčních kitů pro měření kortikosteronu u myši/potkana ELISA (Publikace D) nebo RIA (Publikace A, B a E).

Plazmatické hladiny ACTH byly zjištěny pomocí ACTH ELISA kitu (Publikace E).

4 Souhrn hlavních výsledků a diskuse

4.1 Vliv chronického a krátkodobého stresu na aktivaci HPA osy a lokální metabolismus glukokortikoidů v HPA ose a v oblastech mozku podílejících se na řízení HPA osy u kmenů potkana lišících se reaktivitou HPA osy

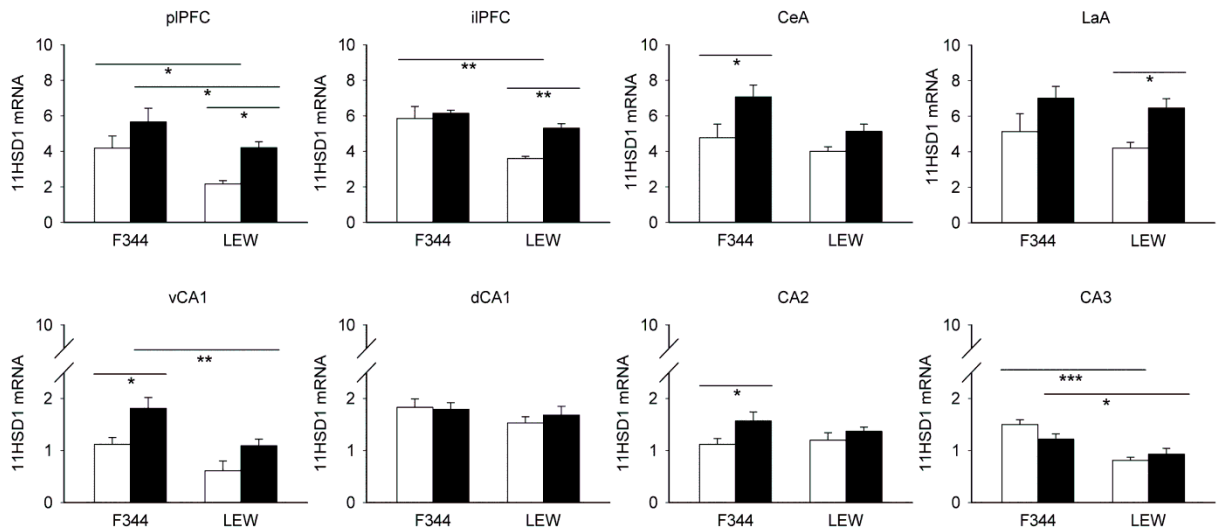
Chronický psychosociální stres zvýšil expresi *Hsd11b1* u potkanů kmene F344 v oblastech zapojených do regulace HPA osy, konkrétně pIPFC, CeA, LA, CA1, a CA2 pole hipokampu (Obr. 1). Naproti tomu vystavení stresu nemělo vliv na expresi *Hsd11b1* ve vlastních částech HPA osy jako je PVN, hypofýza a dřeň a kůra nadledvin (Obr. 3)(Vodička et al., 2014/Publikace A).



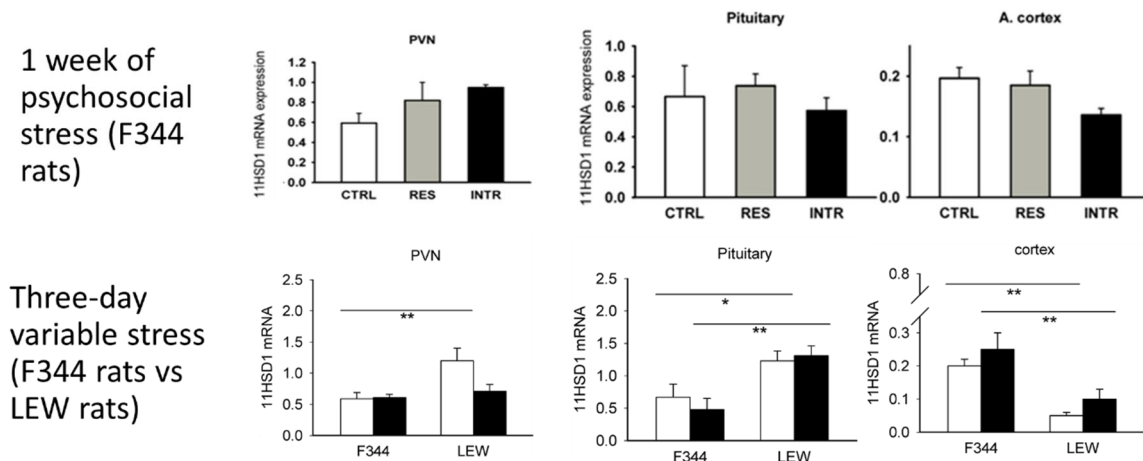
Obrázek 1. Vliv opakovaného sociálního stresu na mRNA expresi 11HSD1 v oblastech mozku spojených s HPA osou. CTRL, kontrolní potkani; RES, residenti; INTR, intruder; pIPFC, prelimbický prefrontální kortex; iIPFC, infralimbický prefrontální kortex; CeA, centrální amygdala; LA, laterální amygdala; dCA1 and vCA1, dorzální a ventrální část CA1 hipokampu; CA2 a CA3, CA2 a CA3 oblasti hipokampu; PVN, paraventriculární jádro. Všechny hodnoty jsou uvedeny jako průměr± SEM. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Třídenní stresový protokol vedl k podobnému vzoru exprese *Hsd11b1* jako chronický psychosociální stres. Nicméně byly pozorovány i na kmeni závislé rozdíly. U potkanů kmene F344 byla zvýšená exprese *Hsd11b1* v CeA, vCA1 a CA2 oblastech hipokampu. U potkanů kmene LEW indukoval stres zvýšení *Hsd11b1* v pIPFC a LeA (Obr. 2). Nebyly pozorovány změny exprese *Hsd11b1* ve vlastních oblastech HPA osy (PVN, hypofýza, dřeň a kůra nadledvin) (Obr. 3). Stres také stimuloval expresi *Oxt*, *Crh*, *Ucn3* a *Pacap* v paraventriculárním jádře u obou kmenů, ale exprese *Crh* v amygdale byla stresem zvýšená pouze u potkanů kmene LEW, zatímco exprese

Ucn2/Ucn3 se zvýšila u kmene F344. Stres také zvýšil expresi enzymů syntézy katecholaminů *Th* a *Pnmt* u obou kmenů výrazněji u kmene F344 (Ergang et al., 2015/Publikace B).



Obrázek 2. Vliv stresu na expresi dehydrogenázy 11 β -hydroxysteroidů typu 1 (11HSD1) v oblastech mozku spojených s HPA osou u potkanů kmene Fisher 344 (F344) a Lewis (LEW). Bílé sloupce, nestresovaní potkani; černé sloupce, potkani vystavení třídnímu variabilnímu stresu; pIPFC, prelimbický prefrontální kortex; iIPFC, infralimbický prefrontální kortex; CeA, centrální amygdala; LA, laterální amygdala; dCA1 and vCA1, dorzální a ventrální část CA1 hipokampu; CA2 a CA3, CA2 a CA3 oblasti hipokampu; PVN, paraventriculární jádro. Všechny hodnoty jsou uvedeny jako průměr \pm SEM. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.



Obrázek 3. Vliv chronického psychosociálního stresu a třídního variabilního stresu na expresi dehydrogenázy 11 β -hydroxysteroidů typu 1 (11HSD1) v paraventriculárním jádře (PVN), hypofýze a kůře nadledvin.

Horní řada: CTRL, kontrolní potkani; RES, rezidenti; INTR, intrudeři.

Dolní řada: nestresovaní (bílé sloupce) a stresovaní (černé sloupce) potkani kmene Fisher 344 (F344) a Lewis (LEW).

Všechny hodnoty jsou uvedeny jako průměr \pm SEM. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

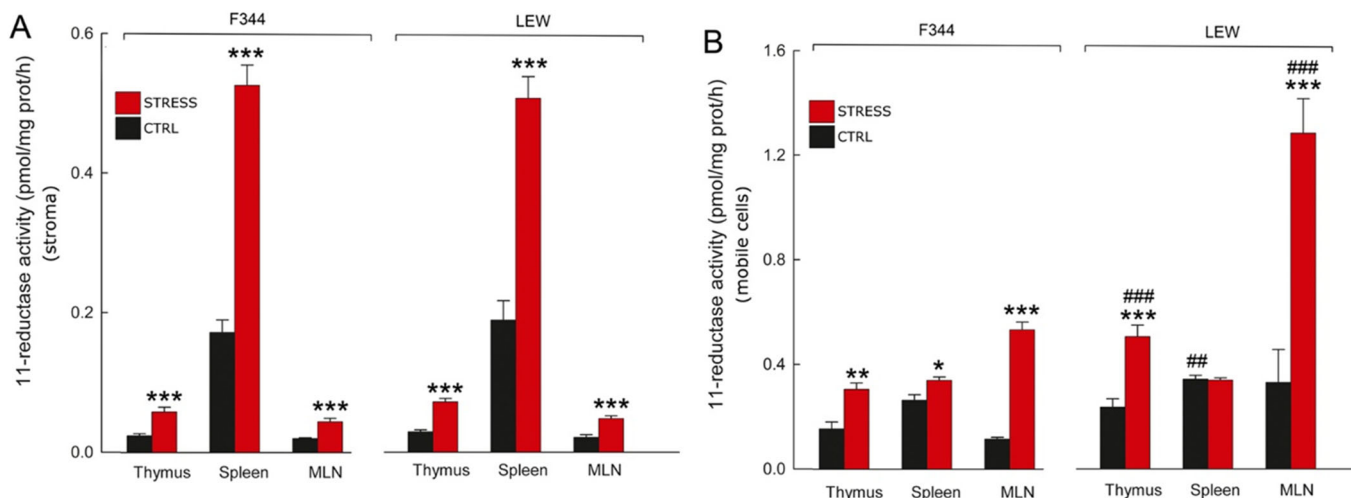
Výsledky ukazují, že (i) stres nemá vliv na expresi 11HSD1 ve vlastních částech HPA osy (PVN, hypofýza, kůra nadledvin), ale selektivně upreguluje 11HSD1 v oblastech mozku spojených s regulací HPA osy (prefrontální kůra, amygdala a některé oblasti hipokampu) (ii) byly pozorovány významné mezikmenové rozdíly v bazální hladině 11HSD1 v některých oblastech HPA osy, konkrétně hyper-responsivní potkani kmene F344 mají vyšší expresi 11HSD1 v prefrontální kůře, vCA1 a CA3 a kůře nadledvin a nižší expresi v PVN a hypofýze oproti vůči stresu hypo-responsivním potkanům kmene LEW, (iii) mezikmenové rozdíly byly také zjištěny v případě neuropeptidů, které se podílejí na aktivaci HPA osy, jmenovitě se jednalo o CRH/UCN2,3 v amygdale, ale nezměnila se mRNA exprese jejich receptorů CRHR1 a CRHR2, a (iv) vliv stresu na neuropeptidy a jejich receptory byl místně specifický. Souhrnně výsledky z našich experimentů ve světle dalších prací naznačují, že lokální metabolismus glukokortikoidů a CRH dráhy v mozkových strukturách spojených s regulací HPA osy nejsou stejné pro oba kmeny a mohou přispívat k rozdílům v odpovědi HPA osy na stres mezi potkany kmene F344 a LEW.

4.2 Vliv chronického stresu na lokální metabolismus a regeneraci glukokortikoidů v lymfatických orgánech

4.2.1 Vliv stresu na lokální metabolismus glukokortikoidů v lymfatických orgánech potkana

Chronický psychosociální stres zvýšil expresi *Hsd11b1* v MLN a slezině potkanů kmene F344 (Ergang et al., 2015/Publikace B). V identickém stresovém protokolu byla zvýšena regenerace kortikosteronu z 11-dehydrokortikosteronu v thymu, slezině a MLN jak u potkanů kmene F344, tak u potkanů kmene LEW. Oproti potkanům kmene F344, potkani kmene LEW vykazovali vyšší regeneraci kortikosteronu ve splenocytech nestresovaných zvířat a v mobilních buňkách thymu a MLN po stresu, avšak ve stromatu všech lymfatických orgánů byla regenerace kortikosteronu podobná u obou kmenů. (Obr. 4) (Ergang et al., 2018/Publikace E).

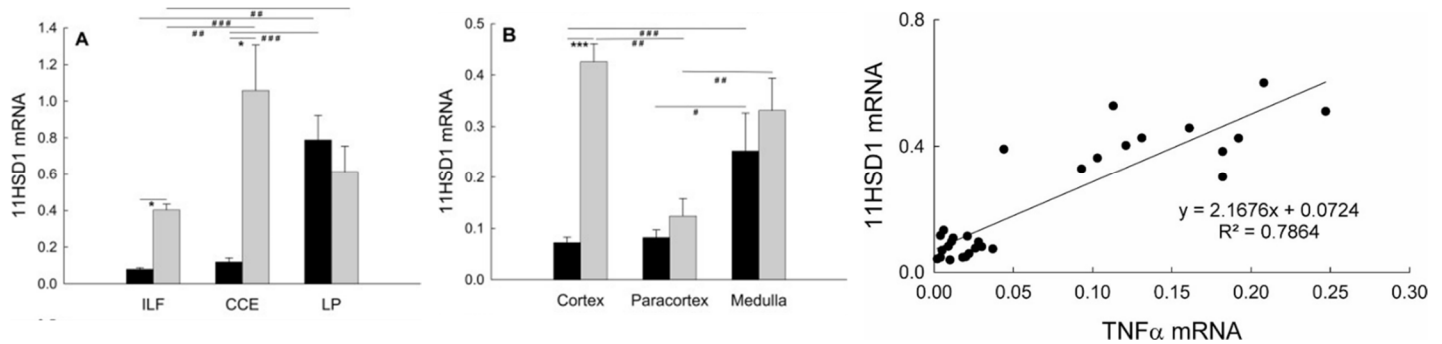
Naše výsledky ukazují, že sociální stres zvyšuje lokální produkci glukokortikoidů v lymfatických orgánech cestou regenerace kortikosteronu z biologicky neaktivního 11-oxo derivátu, 11-dehydrokortikosteronu a tato regenerace je částečně kmenově závislá. Protože je stresem indukovaný nárůst produkce glukokortikoidů v mobilních buňkách lymfatických orgánů vyšší u potkanů kmene LEW než u kmene F344, lze předpokládat, že tyto stresem-indukované rozdíly mohou přispívat k vyšší vnímavosti kmene LEW k zánětlivým onemocněním.



Obrázek 4. Vliv stresu na 11-reduktázovou aktivitu 11HSD1 ve stromatu (A) a mobilních buňkách (B) v lymfatických orgánech (thymus=tymus; spleen=slezina) nestresovaných (CTRL) a stresovaných potkanů. Všechny hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM. Signifikantní rozdíly mezi stresovanými a nestresovanými potkany stejného kmene: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ a mezi kmeny F344 a LEW stejného zacházení: ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$.

4.2.2 Vliv stresu na regeneraci glukokortikoidů a expresi cytokinů v mukózním imunitním systému myši

Podobně jako psychologický sociální stres u potkana, tak i zánětlivý stres u myši představovaný kolitidou indukovanou dextran sulfátem sodným (DSS), vedl ke zvýšení exprese *Hsd11b1* ve specifických mikroanatomických částech kolonu a MLN. Kolitida zvýšila expresi *Hsd11b1* v CCE, ILF kolonu a MLN kortexu, ale ne v lamina propria kolonu, parakortexu a meduly MLN. Exprese *Hsd11b1* také pozitivně korelovala s expresí *Tnfa* (Obr 5.) (Ergang et al., 2017/Publikace F).



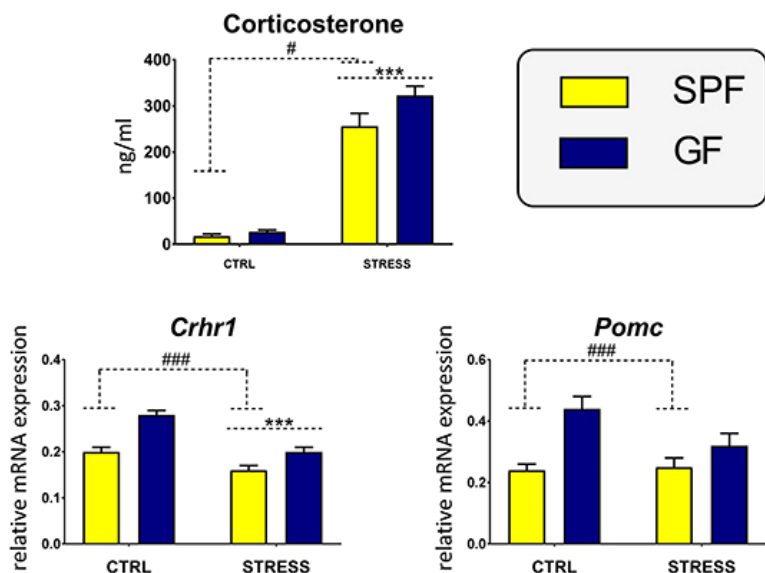
Obrázek 5. Vliv kolitidy na expresi dehydrogenázy 11 β -hydroxysteroidů typu 1 (11HSD1) v různých mikroanatomických oblastech kolonu (A) a mezenterálních lymfatických uzlin (B). Regresní analýza ukazující korelaci mezi hladinami 11HSD1 a TNF α mRNA ve zdravých myších a myších s DSS-kolitidou (C). Černé sloupce reprezentují zdravé myši, šedivé sloupce myši s DSS kolitidou. ILF, izolovaný lymfatický folikul; CCE, epitel krypt kolonu; LP, lamina propria. Všechny hodnoty jsou uvedeny jako průměr \pm SEM; Porovnání stejných mikroanatomických oblastí kontrolních zvířat a zvířat s DSS-kolitidou: *P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001; Porovnání mezi jednotlivými mikroanatomickými oblastmi: #P < 0.05, ##P < 0.01 and ###P < 0.001.

Tyto topograficky odlišné změny v regulaci mRNA exprese 11HSD1 v jednotlivých anatomických oblastech kolonu a MLN v průběhu zánětu naznačují různou dostupnost endogenních glukokortikoidů a amplifikaci glukokortikoidního signálu. Tyto změny mohou facilitovat regulační a/nebo protizánětlivé působení glukokortikoidů v imunitních procesech vzniklých následkem aktivace imunitního systému. Korelace mezi *Hsd11b1* a *Tnf α* naznačuje, že TNF α je stěžejním faktorem pro zvýšenou regulaci *Hsd11b1*, přestože efekt dalších cytokinů nemůže být vyloučen. Tento závěr je v souladu s dříve popsányými stimulačními efekty cytokinů na expresi *Hsd11b1* v různých experimentech *in vitro*. Exprese 11HSD1 bylo upregulována cytokiny Th2/Th17, nikoliv však Th1 cytokiny v mukóze dýchacích cest a hladkých svalech (Hu et al., 2006; Jun et al., 2014), fibroblastech (Hardy et al., 2006) a monocytech (Thieringer et al., 2001). 11HSD1 byla také zvýšena pleiotropními cytokiny TNF α and IL-1 β v kulturách různého původu (Ergang et al., 2011; Staab and Maser, 2010).

4.3 Vliv mikrobioty na aktivaci HPA osy akutním a chronickým stresem

4.3.1 Vliv mikrobioty na hypofýzu a nadledviny vystavené akutnímu stresu znehybněním

Po akutním stresu znehybněním vykazovaly GF myši vyšší hladinu plazmatického kortikosteronu než SPF myši. V nadledvině akutní stres a mikrobiota snížili expresi *Crhr1* a mikrobiota snížila expresi *Pomc* (Obr. 6). V nadledvině mikrobiota zvýšila genovou expresi *Cyp11a1*, *Hsd3b1* and *Cyp21a1* kódující enzymy steroidogeneze (Vagnerová et al., 2019/Publikace D).

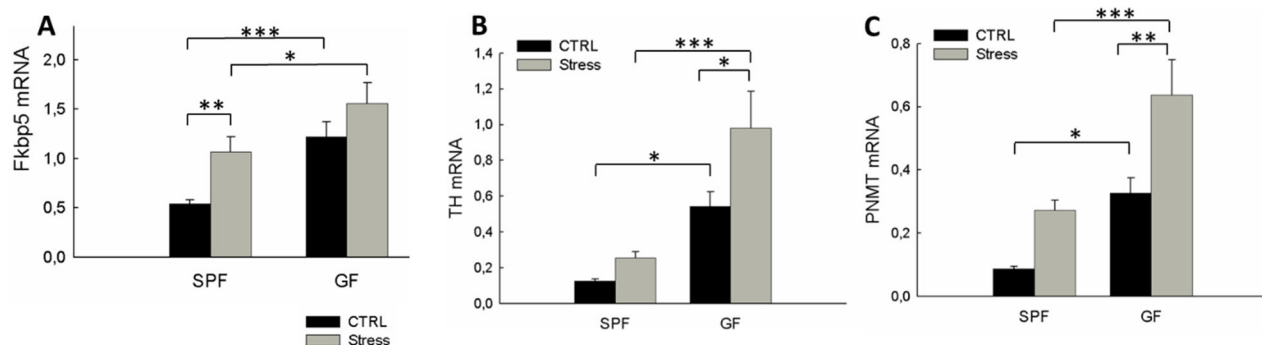


Obrázek6. Vliv akutního stresu znehybněním na plazmatickou hladinu kortikosteronu a expresi genů zapojených do syntézy adrenokortikotropního hormonu v hypofýze myši bez specifických patogenů (SPF) a bezmikrobních myši (GF). CTRL, nestresované myši; STRESS, myši vystavené stresu znehybněním na 2 h; *Crhr1*, Receptor pro kortikoliberin typu 1; *Pomc*, pro-opiomelanokortin. Všechny hodnoty jsou uvedeny jako průměr± SEM. Hlavní efekt stresu je znázorněn čárkovanou horizontální čarou a hvězdičkou nad stresovanými skupinami (** $p < 0.001$) hlavní efekt mikrobioty je znázorněn čárkovanou čarou a křížkem nad SPF skupinou (### $p < 0.001$, # $p < 0.05$). Interakce nebyla pozorována.

Uvedené výsledky ukazují, že absence mikrobioty má signifikantní dopad na odpověď periferních komponent HPA osy v akutním stresu znehybněním. Zejména nižší exprese *Pomc* a *Crhr1* v hypofýze *Pomc* a *Crhr1* SPF myši může částečně vysvětlovat zvýšenou odpověď HPA osy u GF zvířat. Naproti tomu, mírné zvýšení exprese některých genů steroidogeneze v nadledvině mikrobiotou ukazuje, že zvýšená hladina kortikosteronu u GF myši není spojena s vyšší expresí enzymů steroidogeneze v nadledvině.

4.3.2 Vliv mikrobioty na expresi genů zapojených do regulace HPA osy v chronickém psychosociálním stresu

Chronický psychosociální stres a absence mikrobioty zvýšila expresi regulačního ko-chaperonu *Fkbp5* v hypofýze a expresi enzymů zapojených do syntézy katecholaminů *Th* a *Pnmt* v nadledvině (Obr. 7) (Vodička et al., 2018/Publikace C).



Obrázek 7. Vliv sociální porážky na (A) hladiny mRNA *Fkbp5* v hypofýze a odpovědi genů kódujících adrenální biosyntézu katecholaminů (B) tyrozin hydroxyláza (TH) a (C) fenyletanolamin N-methyltransferáza(PNMT). Myši bez specifických patogenů (SPF) a bezmikrobní myši (GF). Všechny hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

FKBP5 je ko-chaperon vykazující inhibiční efekt na GR signalizaci (Bekhat et al., 2017). Proto je možné, že zvýšená exprese *Fkbp5* v hypofýze GF myši může snižovat efektivitu zpětnovazebné inhibice v hypofýze a přispívat ke zvýšené aktivitě HPA osy u GF myši. Protein FKBP5 je součástí rychlé inhibiční zpětné vazby a je přímo aktivován kortikosteronem. Pokud vezmeme do úvahy, že transport zvířat z izolátorů představuje stres, nelze vyloučit, že zvýšení exprese *Fkbp5* odráží vyšší odpověď GF myši na tento nevyhnutelný stres. Přestože jsou glukokortikoidy dávány do souvislosti s regulací exprese PNMT (Kvetnansky et al., 2009), nedáváme zvýšenou expresi *Hsd11b1* v nadledvině GF myši do souvislosti se zvýšenou expresí *Pnmt*, protože na glukokortikoidech závislá *Pnmt* a na glukokortikoidech nezávislá *Th* vykazují podobnou expresi. Další studie budou potřeba pro objasnění vlivu mikrobioty na funkci nadledvin.

4.4 Vliv mikrobioty na regulaci glukokortikoidů v kolonu

4.4.1 Regulace lokální steroidogeneze v kolonu mikrobiotou

Jak akutní stres znehybněním, tak mikrobiota modulují expresi některých steroidogenních enzymů, zejména *Nr5a2*, který kóduje klíčový regulační protein střevní steroidogeneze LRH-1, a *Hsd3b2*. Oba geny byly sníženy stresem a absencí mikrobioty. Interakce mezi stresem a mikrobiotou byla nalezena u exprese *Cyp11a1* a *Hsd3b1*; genů, které kódují enzymy steroidogeneze v kolonu (Vagnerová et al. 2019/Publikace D).

Detailní analýza exprese genů steroidogeneze v kolonu odhalila, že exprese několika genů steroidní kaskády je modulována stresem a mikrobiotou. Zejména exprese *Nr5a2*, kódující protein

„liver receptor homolog-1“ (LRH-1), což je transkripční faktor důležitý pro střevní syntézu glukokortikoidů a homolog k steroidogennímu faktoru 1 (SF-1), který plní podobnou roli v nadledvině (Mueller et al., 2006). Oba transkripční faktory však reagují na akutní stres různě. Zatímco transkript *Sf-1* byl zvýšen v nadledvině, exprese *Lrh-1* v kolonu byla snížena stresem u GF i SPF myši. Oproti *Lrh-1* efekt stresu a mikrobiomu vykazoval interakci u exprese *Cyp11a1*; stres snížil expresi *Cyp11a1*, ale pouze u GF zvířat. Tato data nejsou v souladu s předchozími pracemi, které ukázaly zvýšenou expresi *Lrh-1*, *Cyp11a1*, a *Cyp11b1* ve střevu při akutním zánětlivém stresu (Cima et al., 2004). Tento nesoulad je pravděpodobně způsoben rozdíly mezi stresory. Nicméně naše výsledky ukazují, že akutní stres znehyněním může mít vliv na steroidogenezi ve střevu a že tento efekt je modulován přítomností mikrobioty.

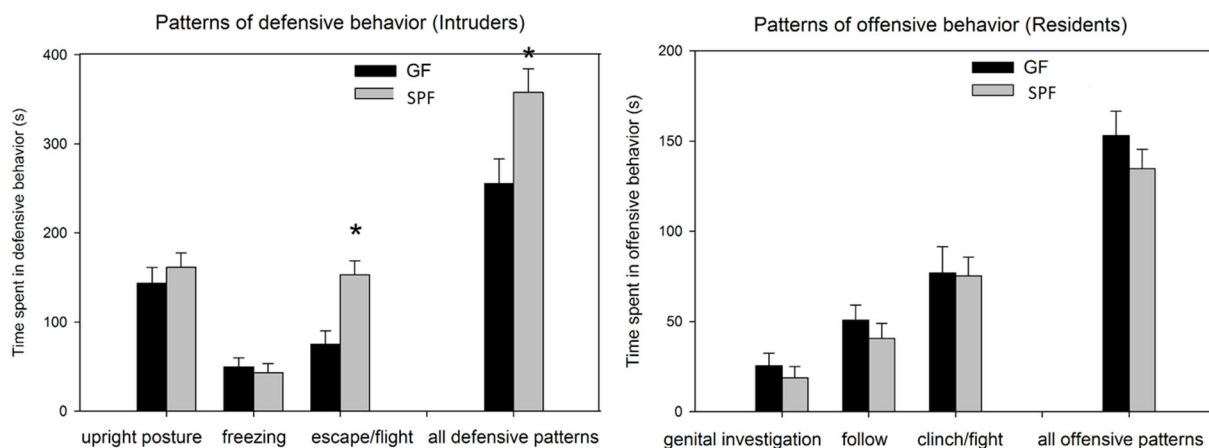
4.4.2 Vliv chronického stresu a mikrobioty na regeneraci glukokortikoidů a cytokinové prostředí v myším kolonu

Chronický psychosociální stres snížil expresi *Hsd11b1* a utlumil expresi panelu cytokinů v závislosti na přítomnosti či absenci mikrobioty (Vodička et al. 2018/Publikace C).

Snížená exprese cytokinů v kolonu u stresovaných zvířat, která je částečně ovlivněna mikrobiotou, podporuje dříve popsané utlumení imunitního systému stresem (Reber et al., 2011). Nalezli jsme korelaci mezi expresí *Hsd11b1* a cytokiny, a proto se domníváme, že exprese *Hsd11b1* v kolonu je modulována cytokinovým prostředím a že je tento účinek silnější u GF oproti SPF myším. Naše výsledky zdůrazňují důležitost mikrobioty/střevních komenzálů při formování odpovědi periferních tkání u stresu a ukazuje na možné dráhy, kterými prostředí střeva může interagovat s glukokortikoidní signalizací.

4.5 Zhodnocení behaviorálních změn ve vztahu k mikrobiotě v průběhu psychosociálního stresu

GF intruderé strávili méně času v celkovém defenzivním chování během interakce s residenty. Tento rozdíl byl způsoben hlavně únikovým chováním. Nenašli jsme rozdíl v ofenzivním chování residentů mezi GF a SPF myšmi (Obr. 8) (Vodička et al. 2018/Publikace C).



Obrázek8. Celkové defenzivní chování intruderů a celkové ofenzivní chování residentů myši bez specifických patogenů (SPF) a bezmikrobních myši (GF); Všechny hodnoty jsou uvedeny jako průměr± SEM: *P < 0.05.

Žádná studie zatím neporovnávala chování GF a SPF myši v uspořádání resident-intruder. Nicméně bylo ukázáno, že bezmikrobní status ovlivňuje sociální preference u myši (Arentsen et al., 2015, Desbonnet et al., 2014). Naproti tomu celá řada studií se věnovala sledování anxiety podobného chování a většina popisuje sníženou anxiету u GF myši (Arentsen et al., 2015, Clarke et al., 2013, Crumeyrolle-Arias et al., 2014, De Palma et al., 2015, Diaz Heijtz et al., 2011, Neufeld et al., 2011, Nishino et al., 2013). V našem experimentálním uspořádání můžeme únikové chování přiřadit k anxiety podobnému chování, což ukazuje na sníženou anxiету GF myši v průběhu opakovaného psychosociálního stresu.

5 Závěry

Stres je často uváděn jako rizikový faktor u celé řady onemocnění. Stresová reakce je však koncipována tak, aby si poradila s život ohrožujícími situacemi, a škodlivé účinky jsou zapříčiněny silou aktivovaných drah. Pokud je množství stresu příliš velké, nebo je deregulována odpověď vůči stresoru, mohou se projevit nežádoucí vedlejší účinky. Proto je nutná přesná regulace stresové odpovědi ve všech jejích částech. Odpověď na stres závisí na mnoha faktorech včetně genetických predispozicí nebo prostředí. Tato práce je zaměřena na poznání mechanismů zapojených do regulace HPA osy a lokálního metabolismu glukokortikoidů. K dosažení vytyčených cílů jsme využili různé kategorie stresorů a zvířecí modely lišící se reaktivitou vůči stresu. Hlavní závěry jsou shrnuty v následujících bodech:

1. Studovali jsme vliv krátkodobého psychologického a chronického psychosociálního stresoru na aktivaci HPA osy a metabolismus glukokortikoidů. Oba stresové protokoly zvýšili expresi *Hsd11b1* v limbických oblastech mozku zapojených do regulace HPA osy, ale neměly vliv na expresi ve vlastní HPA ose. Pozorovali jsme také mezikmenové rozdíly v expresi *Hsd11b1* mezi potkany kmenů F344 a LEW. Společně s minimálními změnami exprese genu *Nr3c1*, kódujícího GR, předpokládáme, že 11HSD1 hraje důležitou roli v regulaci lokální koncentrace glukokortikoidů a představuje důležitý modulátor HPA osy v limbických oblastech mozku. (Publikace A a B)
2. Zjistili jsme, že psychosociální stres zvýšil expresi *Hsd11b1* v MLN a aktivitu 11HSD1 v thymu, slezině a MLN. Zvýšení regenerace glukokortikoidů bylo výraznější u potkanů kmene LEW, oproti potkanům kmene F344. Exprese *Hsd11b1* byla také zvýšena zánětem ve specifických mikroanatomických oblastech myšního imunitního systému střeva a její exprese korelovala s expresí *Tnfa* i dalších cytokinů. Souhrnně naše výsledky naznačují, že zvýšení glukokortikoidů zprostředkované 11HSD1 lokálně snižuje imunitní odpověď a brání tak jejímu přestřelení. (Publikace A, E a F)
3. Absence microbioty vedla ke zvýšení plazmatické hladiny kortikosteronu v akutním stresu. Exprese *Pomc* and *Crhr1* v hypofýze a některých genů kódujících enzymy steroidogeneze v nadledvinách byla také modulována mikrobiotou. V chronickém stresu jsme ukázali stresem a mikrobiotou indukované zvýšení exprese *Fkbp5* v hypofýze a v nadledvině genů kódujících klíčové enzymy syntézy katecholaminů TH

a PNMT. To ukazuje, že mikrobiota představují důležitý faktor určující stresovou odpověď, ale přesné mechanismy nejsou ještě objasněny. (Publikace C a D)

4. Jak akutní stres znehybněním, tak mikrobiota modulovali expresi některých genů steroidogeneze v kolonu, zejména *Nr5a2*, který kóduje LRH-1, klíčový transkripční faktor regulující střevní steroidogenezu. Naproti tomu chronický psychosociální stres snížil expresi *Hsd11b1* a tlumil expresi panelu cytokinů v závislosti na přítomnosti, či nepřítomnosti mikrobioty. Tyto výsledky zdůrazňují vliv mikrobioty na lokální extraadrenální steroidogenezi a metabolismus glukokortikoidů. (Publikace C a D)
5. GF myši vykazovaly méně únikového chování během testu resident-intruder oproti SPF myším, což ukazuje na jejich nižší anxietu. Snížené anxietě podobné chování bylo již dříve popsáno u GF myší, nicméně my jsme jej jako první demonstrovali v podmínkách psychosociálního stresu. (Publikace D)

Dohromady tyto výsledky zdůrazňují roli 11HSD1 v centrální zpětnovazebné regulaci HPA osy, lokální restrikci imunitního systému a důležitost mikrobioty nejen v regulaci odpovědi HPA na stres, ale také v chování a pro lokální a extraadrenální metabolismus glukokortikoidů.

6 Publikace *in extenso* a podíl autora

Publikace A: Vodička M*, Ergang P*, Mikulecká A, Řeháková L, Klusoňová P, Makal J, Soták M, Musílková J, Zach P, Pácha J. Regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 7 α -hydroxylase CYP7B1 during social stress. PLoS One. 2014; 9: e89421. IF=3.234 (2014)

MV – Identifikace oblastí a provedení laserové mikrodisekce v oblastech mozku potkana, podíl na provádění stresových procedur, odběru tkání analýze a interpretaci dat a psaní manuskriptu

Publikace B: Ergang P*, **Vodička M***, Soták M, Klusoňová P, Behuliak M, Řeháková L, Zach P, Pácha J. Differential impact of stress on hypothalamic-pituitary-adrenal axis: gene expression changes in Lewis and Fisher rats. Psychoneuroendocrinology. 2015; 53:49-59. IF=5.44 (2015)

MV – Plánování, organizace a provedení stresového protokolu, identifikace a provedení laserové mikrodisekce v oblastech mozku, podíl na odběru tkání, analýze a interpretaci dat a psaní manuskriptu

Publikace C: Vodička M©, Ergang P, Hrnčíř T, Mikulecká A, Kvapilová P, Vagnerová K, Šestáková B, Fajstová A, Hermanová P, Hudcovic T, Kozáková H, Pácha J. Microbiota affects the expression of genes involved in HPA axis regulation and local metabolism of glucocorticoids in chronic psychosocial stress. Brain Behav Immun. 2018; 73: 615-624. IF=6.170 (2018)

MV – Korespondující autor, design pokusu, organizace a management projektu, podíl na provádění stresového protokolu, odběru tkání, měření kortikosteronu, analýze a interpretaci dat a psaní manuskriptu

Publikace D: Vagnerová K, Vodička M, Hermanová P, Ergang P, Šrůtková D, Klusoňová P, Balounová K, Hudcovic T, Pácha J. Interactions Between Gut Microbiota and Acute Restraint Stress in Peripheral Structures of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and the Intestine of Male Mice. Front Immunol. 2019; 10: 2655. IF=5.085 (2019)

MV - Design pokusu, organizace a management projektu, provedení stresového protokolu, podíl na odběru tkání, měření kortikosteronu, analýze a interpretaci dat a psaní manuskriptu

Publikace E: Ergang P, Mikulecká A, **Vodička M**, Vagnerová K, Mikšík I, Pácha J. Social defeat stimulates local glucocorticoid regeneration in lymphoid organs. Endocr Connect. 2018 Dec;7(12):1389-1396. IF=2.474 (2018)

MV - podíl na provádění stresových procedur, měření ACTH, odběru tkání analýze a interpretaci dat a psaní manuskriptu

Publikace F: Ergang P, Vodička M, Vagnerová K, Moravec M, Kvapilová P, Kment M, Pácha J. Inflammation regulates 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 differentially in specific compartments of the gut mucosal immune system. Steroids. 2017 Oct;126:66-73. IF = 2.647 (2017)

MV - Identifikace a provedení laserové mikrodisekce v ve střevu a lymfatických orgánech, podíl na organizaci pokusu, indukci zánětu, provedení imunohistochemie, odběru tkání analýze a interpretaci dat a psaní manuskriptu

7 Další publikace autora

Balounová K, Soták M, Ergang P, Vodička M, Vagnerová K, Pácha J. Effects of aging and tumorigenesis on coupling between the circadian clock and cell cycle in colonic mucosa. *Mech Ageing Dev.* 2020 Sep;190:111317.

Kroupova P, van Schothorst EM, Keijer J, Bunschoten A, Vodicka M, Irodenko I, Oseeva M, Zacek P, Kopecky J, Rossmesl M, Horakova O. Omega-3 Phospholipids from Krill Oil Enhance Intestinal Fatty Acid Oxidation More Effectively than Omega-3 Triacylglycerols in High-Fat Diet-Fed Obese Mice. *Nutrients.* 2020 Jul 9;12(7):2037.

Soták M, Bryndová J, Ergang P, Vagnerová K, Kvapilová P, Vodička M, Pácha J, Sumová A. Peripheral circadian clocks are diversely affected by adrenalectomy. *Chronobiol Int.* 2016;33(5):520-9.

Svoboda J, Telensky P, Blahna K, Vodicka M, Stuchlik A. The role of rat posterior parietal cortex in coordinating spatial representations during place avoidance in dissociated reference frames on a continuously rotating arena (Carousel). *Behav Brain Res.* 2015 Oct 1;292:1-9.

Vagnerová K, Ergang P, Soták M, Balounová K, Kvapilová P, Vodička M, Pácha J. Diurnal expression of ABC and SLC transporters in jejunum is modulated by adrenalectomy. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2019 Dec;226:108607.

Vavřínová A, Behuliak M, Bencze M, Vodička M, Ergang P, Vaněčková I, Zicha J. Sympathectomy-induced blood pressure reduction in adult normotensive and hypertensive rats is counteracted by enhanced cardiovascular sensitivity to vasoconstrictors. *Hypertens Res.* 2019 Dec;42(12):1872-1882.

Vodička M, Vavřínová A, Mikulecká A, Zicha J, Behuliak M. Hyper-reactivity of HPA axis in Fischer 344 rats is associated with impaired cardiovascular and behavioral adaptation to repeated restraint stress. *Stress.* 2020 Nov;23(6):667-677.

Zemanová N, Anzenbacher P, Zapletalová I, Jourová L, Hermanová P, Hudcovic T, Kozáková H, Vodička M, Pácha J, Anzenbacherová E. The role of the microbiome and psychosocial stress in the expression and activity of drug metabolizing enzymes in mice. *Sci Rep.* 2020 May 22;10(1):8529.

1 Introduction

To successfully survive and procreate in unpredictable world, animals (as well as humans) have to cope with various challenges including predators, shortage of nutrients, intra-species rivals, bad weather, infections etc. To do so, the organisms evolved mechanisms to maintain homeostasis in dynamic environment, the stress response. The stress response was defined as a reaction of the organism to stimulus (stressor) that threatens homeostasis (or is perceived as a threat to the homeostasis by the organism) and is aimed to regain homeostasis (Chrousos 2009; Pacak and Palkovits 2001). Stress is often regarded as something pathological, however it is important to realize, that acute stress response represents a physiologically important emergency tool, which is designed to apply powerful means when the organisms health or existence are at stake.

The stress response originates in the brain and stress signals are transmitted from the brain by two main branches; the sympathoadrenomedullary axis and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis that activates all systems needed to fight for survival, including cardiovascular, metabolic and immune systems. The hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis is the principal endocrine component of stress response and a self-regulatory pathway that utilizes its end products (cortisol and corticosterone) to control its own activation and responsiveness through a negative feedback mechanism. However, HPA axis is also influenced by central stress excitatory and inhibitory circuits that integrate stress-related signals from both intrahypothalamic and extrahypothalamic structures (Ulrich-Lai and Herman, 2009). Both systemic and psychogenic stimuli are processed in multiple limbic areas, including prefrontal cortex, amygdala and hippocampus. In general, the limbic system is involved in emotional and motivational processing, learning, memory, coordination of behavioral responses to stress and participates in the HPA axis regulation (Herman, 2013; Morgane et al., 2005).

The potency of HPA axis effector, the glucocorticoids, requires precise regulation. The effect of glucocorticoids does not depend only on plasma concentration of corticosterone but also on density of the receptors, extra-adrenal de novo steroidogenesis of glucocorticoids, and intracellular modulation of glucocorticoid signal. The enzyme 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 (11HSD1) modulates local metabolism of glucocorticoids via oxo-reduction, which intracellularly regenerates active corticosterone from inactive 11-dehydrocorticosterone. The

regulation of the glucocorticoid signal can also be mediated by the FK506 binding protein 51 (FKBP5), which decreases affinity of glucocorticoid receptors to glucocorticoids. FKBP5 is a part of ultra-short negative feedback loop, where activation of GR increases the expression of FKBP5, which subsequently decreases GR activity (Gjerstad et al., 2018).

Different conditions require different traits in order to successfully cope with these conditions, and it is not possible to say, that one trait is universally ideal. This can be illustrated in two rat strains differing in the HPA axis reactivity, the stress hyper-reactive Fischer 344 rats and stress hypo-reactive Lewis (LEW) rats. The hyper-reactive rats, have an advantage in their readiness to escape dangerous environment, but at the cost of allostatic load of stress. On the other hand, hypo-reactive rats are endangered by autoimmune or inflammatory diseases (Bellavance and Rivest, 2014; Korte et al., 2005; Sternberg et al., 1989, 1992). The genetically determined predisposition to stress reactivity can be also modulated by many external factors such as previous experiences of stress exposure, sleep, diet, or microbiome composition. Microbiome was identified as one of the factors shaping both endocrine and behavioral responses to stressors (Cryan and Dinan 2012; Foster et al. 2017). Several studies have shown that the HPA response to stress is affected by composition of microbiota. Germ free (GF) mice show exaggerated HPA response to acute restraint stress and this effect can be reversed by monoassociation with probiotic bacteria (Clarke et al., 2013; Crumeyrolle-Arias et al., 2014; Sudo et al., 2004).

2 Aims

It is clear from previous text, that stressors are naturally inseparable from life. However, the individual responses to certain stressors vary greatly. Therefore, it is important to study the stress response and dissect mechanisms of its action in order to improve therapy and prevention of stress-related diseases. The topic of this thesis is focused on the analysis of stress response in animals differing in HPA axis responsivity (F344 and LEW rats and GF vs. SPF mice) with special emphasis on the regulation of HPA axis, glucocorticoid regeneration and influence of gut microbiome. In the first project, we studied the effect of various stress paradigms on the expression of genes encoding proteins involved in central and peripheral regulation of glucocorticoid signaling and in regulation of HPA axis responsiveness using hyper-reactive Fisher 344 and the hypo-reactive LEW rats, which represent two ends of a spectrum of HPA axis responsiveness to stress and vulnerability to immune diseases. The second project was focused on the role of microbiota in shaping stress response. Microbiota are capable of modulating the reactivity of the HPA axis and GF mice show exaggerated response of HPA axis to psychological stressors. Therefore, we focused on interaction between stress and gut microbiota, i.e. how microbiota shape the response of HPA axis to stress. Specifically, the following aims were investigated:

7. The impact of short-term and chronic stress on activation of the HPA axis and glucocorticoid metabolism in the structures of the HPA axis in brain regions participating in HPA axis regulation in stress hyper-reactive Fischer 344 and hypo-reactive Lewis rats.
8. The effect of chronic stress on local metabolism and regeneration of glucocorticoids in lymphoid organs
9. The effect of microbiota on activation of the HPA axis by acute and chronic stress
10. The effect of microbiota and stress on regulatory pathways in the intestine.
11. Assessment of microbiota-dependent differences in behavioral phenotype in resident-intruder paradigm

3 Methodological approaches

3.1 Stress procedures

3.1.1 Social defeat

Social defeat paradigm was used in both rat and mice experiments. Specifically, 65-day-old male Fisher 344 rats were used as residents and intruders. Residents were housed individually for one week before the experiment, whereas the intruders were housed in groups of three or four. Following the seven-day isolation period of the residents, the social encounter was performed for seven consecutive days, and arranged to ensure that each intruder rat met each of the corresponding residents for 30 minutes. The animals were sacrificed after the last resident-intruder session. (Publication A). In experiments with F344 and LEW rats we used almost identical protocol with following alteration. The intruder F344 or LEW rat was exposed to older male retired breeder of aggressive Long Evans rats and the confrontation with the resident lasted 15 min once daily for ten consecutive days (Publication E).

In the case of murine experiments two-month-old (GF) and (SPF) male BALB/c mice were used. GF animals were kept under sterile conditions in Trexler-type isolators since birth. One month before the beginning of the experiments, the SPF mice were transferred to similar isolators to ensure identical conditions for all groups during the experiments. Animals were housed in groups of 4–5 per cage. Retired male breeders (7-months to 1-year-old) of the BALB/c strain were used as residents. Resident mice were housed individually for 7 days before the experiment without a change of bedding (to enhance territoriality and aggression). On the days of testing, each intruder was removed from his home cage and placed into the home cage of a resident. Following the 10 min interaction, the mice were divided by a steel mesh to preserve sensory contact between the mice for the next 50 min. Thus, the intruder was subjected to continuous psychological stress due to sensory interaction with the resident. This procedure was repeated for 5 consecutive days with different residents to prevent any habituation to the resident. Following the last stress session, the animals were removed from the isolator and anesthetized with isoflurane vapor (Publication C).

3.1.2 Three-day variable stress protocol (Publication B)

Male F344 and LEW rats that were 60–65 days old at the beginning of the experiments were used. On Day 1, the animals were exposed to forced swim for 15 min (water temperature 22 ± 1 °C). On Day 2, the animals were placed on an elevated platform (12 cm × 12 cm at a height of

70 cm above floor level) in brightly lit room for 30 min. This trial was repeated three times, with a 60 min interval between trials. On day 3, the rats underwent a 2-h restraining stress in an opaque plastic box that prevented the free movement of the animal. These protocols were applied simultaneously to all rats in the cage. The rats were sacrificed immediately after termination of the last stressor.

3.1.3 Acute restraint stress (Publication D)

The adult GF and SPF male mice were subjected to a single 2-hour restraint stress in 50-ml conical centrifuge tubes equipped with multiple ventilation holes.

3.1.4 Acute inflammatory stress (Publication F)

Acute colitis was induced in male Balb/c mice (six to seven weeks old) by administering 2% dextran sodium sulfate in drinking water for a five-day period.

3.2 Laser capture microdissection

3.2.1 Brain areas (Publication A and B)

Coronal brain sections (20 μ m) were serially cut with a cryostat at -19°C . The sections of the studied structures were mounted onto slides coated with polyethylene naphthalate membrane fixed in 95% ethanol, stained with 4% cresyl violet acetate and washed three times in 95% ethanol. The paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN), central (CeA) and lateral amygdala (LA), prelimbic prefrontal (pIPFC) and infralimbic prefrontal cortex (ilPFC), hippocampal CA2 and CA3 regions, and ventral (vCA1) and dorsal (dCA1) parts of CA1 region, were identified based on standard anatomical landmarks and stereotaxic coordinates according to Paxinos and Watson (2007). The studied brain structures were dissected using a LMD6000 Laser Microdissection System and captured into the caps of the microcentrifuge tubes. Microdissected tissues were homogenized in 75 μ l RLT buffer and stored at -80°C until RNA isolation.

3.2.2 Colon and mesenteric lymphatic nodes (Publication F)

The 20- μ m tissue sections were cut from frozen blocks of the colon and mesenteric lymphatic nodes (MLN), and transferred to polyethylene-naphthalate membrane slides. The tissues were dehydrated and stained with cresyl violet acetate and eosin B. Immediately after staining, the tissues were dissected using the Leica LMD 6000 Laser Microdissection System. Staining allowed for the identification of functionally different compartments in the gut (isolated lymphoid follicles (ILF), lamina propria, colonic crypt epithelium (CCE)) and MLN (cortex, paracortex, medulla).

3.3 mRNA expression analysis

Total RNA was isolated using an RNeasy Micro Kit from the captured microsamples and using a GeneElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit from macrosamples. Single-strand cDNA was prepared from total RNA isolated from tissue microsamples and macrosamples using random hexamers and either Enhanced Avian Reverse Transcriptase or High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. The cDNA samples were analyzed by real-time PCR using TaqMan Assays specific for the studied transcript

3.4 Hormone measurement

Plasma corticosterone levels were determined by a commercially available Corticosterone rat/mouse ELISA (Publication E) or RIA (Publication A, B and E).

Plasma ACTH levels were determined by ACTH ELISA kit (Publication E)

4 Results and discussion

4.1 Effect of chronic and short term stress on HPA axis activation and local glucocorticoid metabolism in the components of the HPA axis and brain areas involved in HPA axis control in rat strains differing in HPA axis reactivity

Chronic psychosocial stress upregulated expression of *Hsd11b1* in F344 rats in brain regions involved in HPA axis regulation, notably plPFC, CeA, LA, CA1, and CA2 hippocampal subfields (Fig. 1). On the other hand, stress exposure had no effect on *Hsd11b1* expression in effector regions of the HPA such as the PVN, pituitary, adrenal cortex and adrenal medulla (Fig.

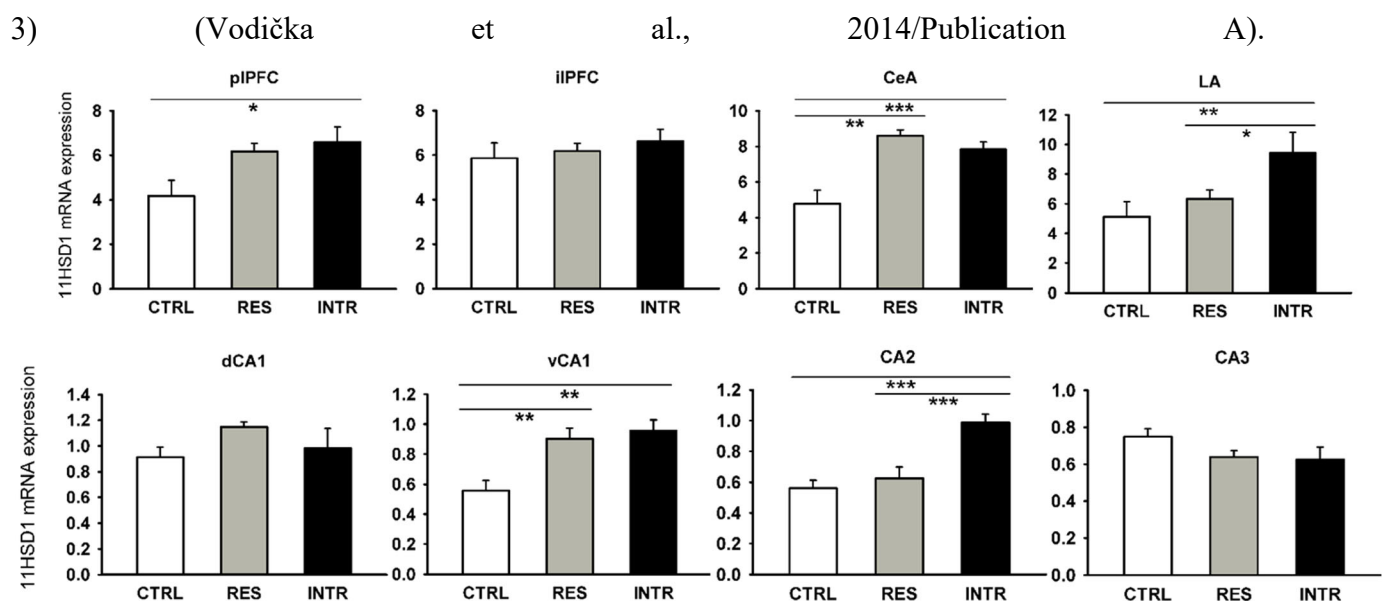


Figure 9. Effect of repeated social stress on expression of 11HSD1 in brain structures associated with the HPA axis. CTRL, control rats; RES, resident rats; INTR, intruder rats; plPFC, prelimbic prefrontal cortex; iIPFC, infralimbic prefrontal cortex; CeA, central amygdala; LA, lateral amygdala; dCA1 and vCA1, dorsal and ventral parts of CA1 hippocampus; CA2 and CA3, hippocampal CA2 and CA3 regions; PVN, paraventricular nucleus. All values are means \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

The three-day stress protocol was accompanied with similar pattern of *Hsd11b1* expression as chronic psychosocial stress. However strain-dependent changes were observed. In F344 rats the *Hsd11b1* was elevated by stress in CeA, vCA1 and CA2 hippocampal subfields. In LEW rats the stress-induced elevation of *Hsd11b1* expression was observed in plPFC and LeA (Fig. 2). No stress induced changes in *Hsd11b1* were observed in canonical HPA axis regions (PVN, pituitary, adrenal cortex, adrenal medulla) (Fig. 3). Stress also stimulated the expression of paraventricular *Oxt*, *Crh*,

Ucn3 and *Pacap* in both strains but expression of amygdalar *Crh* was elevated only in LEW and *Ucn2/Ucn3* in F344 rats, respectively. Stress also upregulated expression of enzymes of catecholamine synthesis *Th* and *Pnmt*, and this upregulation was more pronounced in F344 rats (Ergang et al., 2015/Publication B).

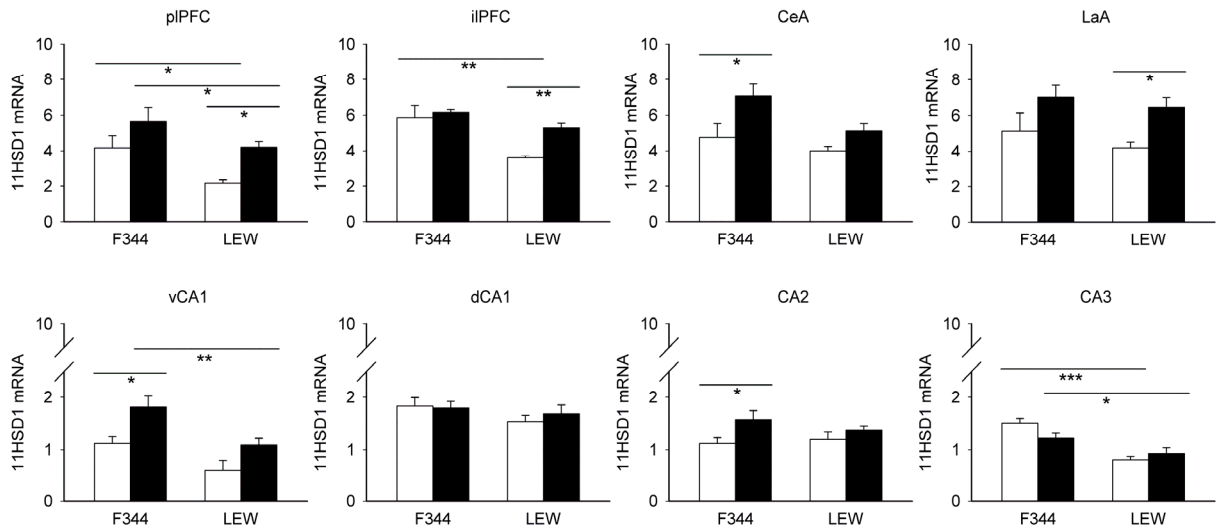
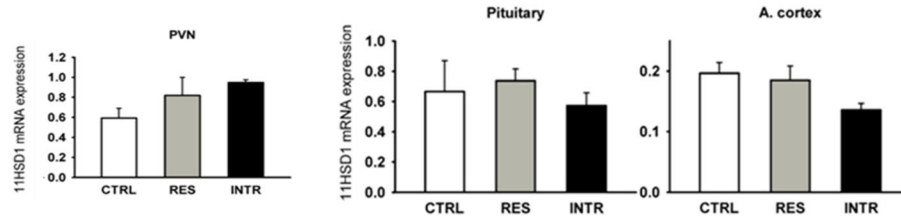


Figure 10. Effect of stress on expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11HSD1) in brain structures associated with the HPA axis in Fisher 344 (F344) and Lewis (LEW) rats. Open bars, unstressed rats, full bars, rats exposed for three days to variable stressors; pIPFC, prelimbic prefrontal cortex; iIPFC, infralimbic prefrontal cortex; CeA, central nucleus of amygdala; LaA, lateral nucleus of amygdala; vCA1 and dCA1, ventral and dorsal part of CA1 hippocampus; CA2 and CA3, hippocampal CA2 and CA3 subfields. The results are expressed as the means \pm SEM. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

1 week of psychosocial stress (F344 rats)



Three-day variable stress (F344 rats vs LEW rats)

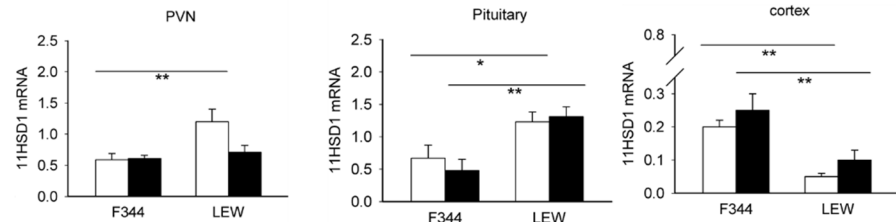


Figure 11. Effect of chronic psychosocial stress and three-day variable stress on expression of 11HSD1 in PVN, pituitary and adrenal cortex.

Upper row: CTRL, control rats; RES, resident rats; INTR, intruder rats.

Lower row: unstressed (*open bars*) and stressed (*full bars*) Fisher 344 (F344) and Lewis (LEW) rats.

The results are expressed as the means \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.001$.**

The results show that (i) stress does not modulate the expression of 11HSD1 in canonical components of the HPA axis (PVN, pituitary gland, adrenal cortex) but selectively upregulates 11HSD1 in brain structures associated with regulation of HPA axis (prefrontal cortex, amygdala, some regions of hippocampus), (ii) there are significant inter-strain differences in basal level of 11HSD1 expression in some components of the HPA axis, specifically the stress hyper-responsive F344 rats have higher 11HSD1 expression in the prefrontal cortex, vCA1, CA3 and adrenal cortex and lower expression in the PVN and pituitary gland than their stress hypo-responsive LEW counterparts, (iii) inter-strain differences are also found in neuropeptides that participate in activation of HPA axis, namely amygdalar CRH/UCN2,3 but not in their receptors CRHR1 and CRHR2, and (iv) the effect of stress on the expression of neuropeptides and their receptors is site-specific. Taken together, the results from the current experiments combined with the observations by others suggest that the local glucocorticoid metabolic system and CRH pathway in the brain structures associated with HPA axis are not identical in both strains and might be involved in the differences of the HPA axis responsiveness between F344 and LEW rats.

4.2 The effects of chronic stress on local metabolism and glucocorticoid regeneration in lymphatic organs

4.2.1 Effect of stress on local metabolism of glucocorticoid in lymphoid organs in rats

Repeated social defeat increased the expression of *Hsd11b1* in mesenteric lymphatic nodes (MLN) and spleen of F344 rats (Ergang et al., 2015/Publication B). In identical stress paradigm,

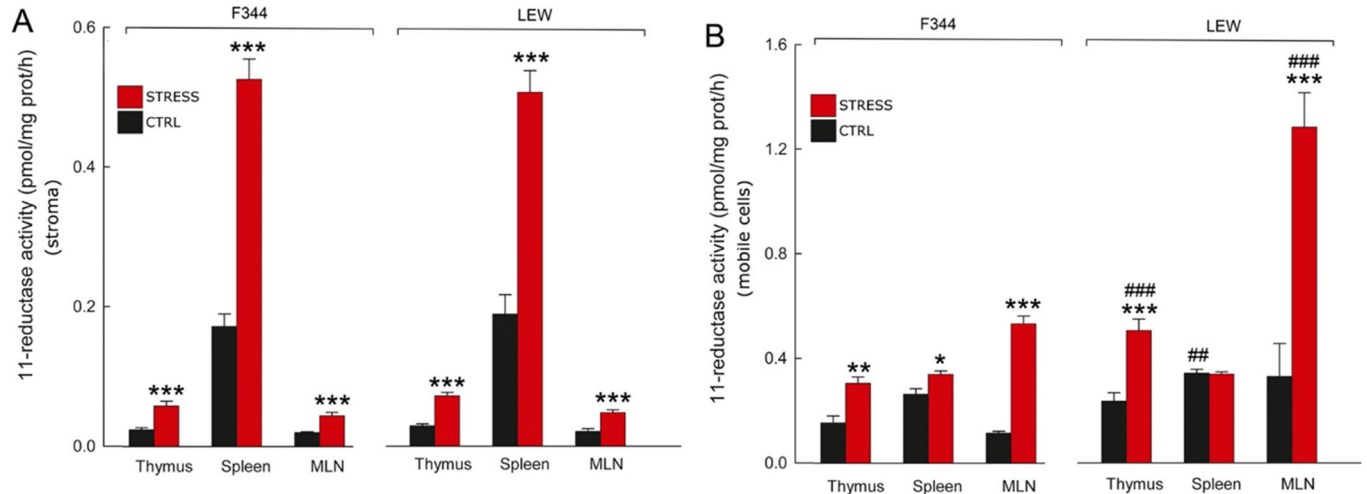


Figure 12. Effect of stress on 11-reductase activity of 11HSD1 in the stroma (A) and mobile cells (B) in lymphoid organs of control unstressed (CTRL) and stressed rats. Data are given as the mean \pm s.e.m. Significant differences between the stressed and unstressed animals of the same strain: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ and between the F344 and LEW rats of the same treatment: ### $P < 0.01$ and #### $P < 0.001$.

regeneration of corticosterone from 11-dehydrocorticosterone was increased by stress in the thymus, spleen and MLN in both F344 and LEW rats. Compared with the F344 strain, LEW rats showed higher corticosterone regeneration in splenocytes of unstressed rats and in thymic and MLN mobile cells after stress but corticosterone regeneration in the stroma of all lymphoid organs was similar in both strains (Fig. 4) (Ergang et al., 2018/Publication E).

Our findings indicate that social stress increases the local glucocorticoid production in lymphoid organs via corticosterone regeneration from a biologically inactive 11-oxo derivative, 11-dehydrocorticosterone, and this regeneration partially depends on the strain. As the stress-dependent increase of glucocorticoid production in mobile lymphoid organ cells is higher in LEW than in F344 rats, it is reasonable to assume that these strain-dependent differences might participate in the higher susceptibility of the LEW strain to inflammatory diseases

4.2.2 Effect of stress on glucocorticoid regeneration and cytokine milieu in murine mucosal immune system

Similarly to psychosocial social stressor in rat, the inflammatory stress in mice represented by DSS induced colitis, led to increased *Hsd11b1* expression in the colon and in specific microanatomical compartments of the mucosal immune system. Colitis increased *Hsd11b1* expression in the colonic crypt epithelium (CCE), isolated lymphatic follicles (ILF) and MLN cortex but not in the lamina propria of colon and paracortex and medulla of the MLN. Expression of *Hsd11b1* also positively correlated with *Tnfa* (Fig 5.) (Ergang et al., 2017/Publication F).

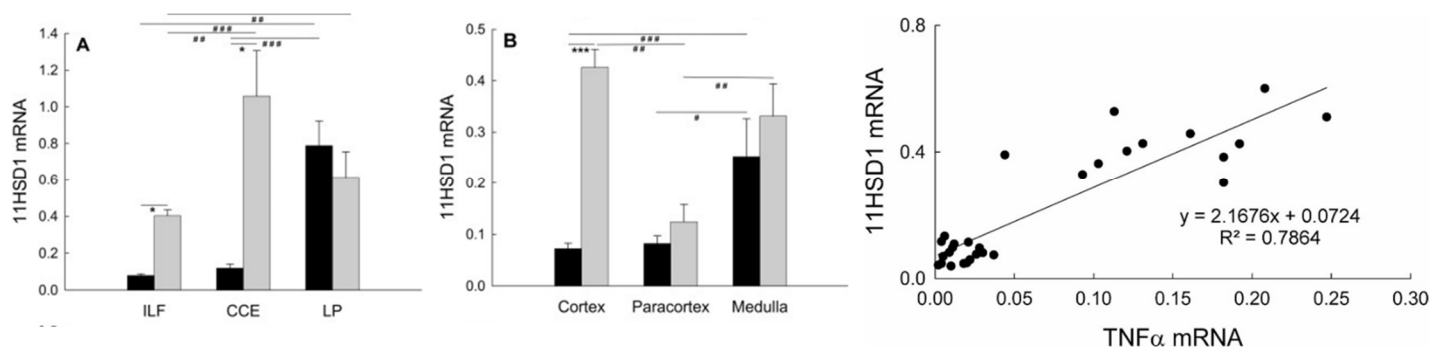


Figure 13. Effect of colitis on the expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11HSD1) in different anatomical compartments of the colon (A) and mesenteric lymph nodes (B). And regression analysis plot showing the correlation between the levels of 11HSD1 and TNF α mRNA in healthy controls and mice with DSS-colitis (C). The bars represent control healthy mice (black bars) and mice with DSS-colitis (grey bars). ILF, isolated lymphoid follicles; CCE, colonic crypt epithelium; LP, lamina propria. Data are given as the mean \pm SEM (n = 7–9); comparison between the identical anatomical compartments of controls and animals treated with DSS: *P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001; comparison between anatomical compartments: #P < 0.05, ##P < 0.01 and ###P < 0.001.

This topographically distinct changes in the regulation of 11HSD1 expression in specific anatomical compartments of the colon and the MLN during inflammation suggests differences in the bioavailability of endogenous glucocorticoids and in local glucocorticoid signaling amplification. These changes may facilitate a regulatory and/or anti-inflammatory role of glucocorticoids in immune processes generated in response to activation of the immune system. The correlation between *Hsd11b1* and *Tnfa* suggest that TNF α is the pivotal factor for *Hsd11b1* upregulation even if the effects of other cytokines cannot be excluded. This conclusion is in agreement with the previously shown stimulatory effects of cytokines on *Hsd11b1* expression in various in vitro experiments. 11HSD1 expression was shown to be upregulated by Th2/Th17 but not Th1 cytokines in airway mucosa and smooth muscle (Hu et al., 2006; Jun et al., 2014),

fibroblasts (Hardy et al., 2006) and monocytes (Thieringer et al., 2001). 11HSD1 was also increased by the pleiotropic cytokines TNF α and IL-1 β in a large variety of cell cultures of various origin (Ergang et al., 2011; Staab and Maser, 2010).

4.3 Role of microbiota in HPA axis activation in acute and chronic stress

4.3.1 The effects of microbiota on pituitary, adrenal gland exposed to acute restraint stress

Plasma corticosterone response to acute restraint stress was higher in GF than in SPF mice. In pituitary, acute stress and microbiota downregulated the expression of *Crhr1* and microbiota downregulated *Pomc* expression (Fig. 6). In adrenals microbiota upregulated expression of genes *Cyp11a1*, *Hsd3b1* and *Cyp21a1* encoding steroidogenic enzymes (Vagnerová et al., 2019/Publication D).

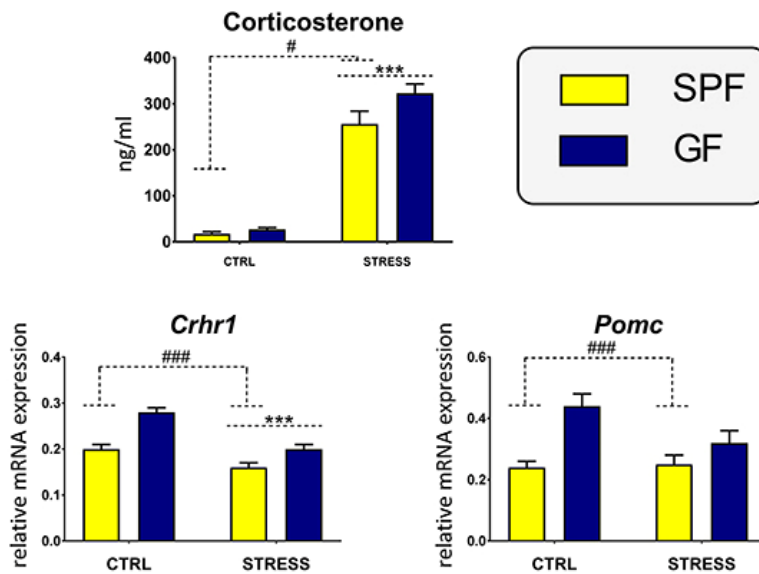


Figure 14. Effect of acute restraint stress on plasma corticosterone and on genes participating in secretion of adrenocorticotrophic hormone in the pituitary of specific pathogen-free (SPF) and germ-free (GF) mice. CTRL, unstressed mice; STRESS, mice exposed to restraint stress for 2 h; *Crhr1*, corticotropin-releasing hormone receptor type 1; *Pomc*, pro-opiomelanocortin. Data are shown as mean \pm SEM. A main effect of stress has been identified by placing a dashed horizontal line with an asterisk (** $p < 0.001$) above the bars for the stress-exposed groups, whereas a main effect of microbiota by placing a dashed horizontal line with a hash sign (### $p < 0.001$, # $p < 0.05$) above the bars for the SPF groups. No interaction effects between stress and microbiota were observed in any of the analyses

The findings reported here demonstrate that the microbiota have a significant impact on the response of the peripheral components of the HPA axis to acute restraint stress. In particular, we found that a lower expression of *Pomc* and *Crhr1* in the pituitary of SPF mice could partially explain the exaggerated HPA axis reactivity in GF animals. In contrast, the weak increase of the

expression of genes of the adrenal glucocorticoid synthetic pathway by microbiota indicates that the increased plasma levels of corticosterone in GF mice is not related to changes in the expression of adrenal steroidogenic enzymes.

4.3.2 The influence of microbiota on expression of genes participating in HPA axis regulation in chronic psychosocial stress

Chronic psychosocial stress and absence of microbiota increased expression of regulatory co-chaperon *Fkbp5* in pituitary and expression of adrenal enzymes involved in synthesis of catecholamines *Th* and *Pnmt* (Figure 7) (Vodička et al., 2018/Publication C).

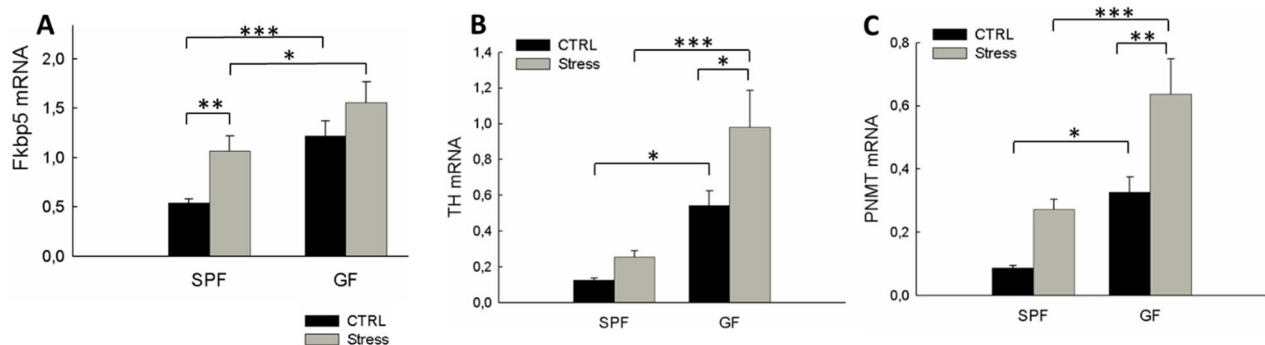


Figure 15. Effect of social defeat stress on (A) immunophilin *Fkbp5* mRNA levels in the pituitary and responses of genes encoding adrenal, catecholamines biogenesis (B) tyrosine hydroxylase (TH) and (C) phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT). Specific pathogen-free (SPF) and germ-free (GF) mice. The data are expressed as the means \pm SEM; Only the statistical differences determined by two-way ANOVA followed by post hoc test are shown; the P-value of the post hoc test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

FKBP5 acts as a co-chaperone that exerts an inhibitory role on GR signaling (Bekhbat et al., 2017) and therefore it is possible that higher *Fkbp5* expression in the pituitary gland of GF mice might decrease efficiency of the negative feedback via GR and contribute to increased HPA activity in GF mice observed by others. The FKBP5 protein represents fast inhibitory feedback loop and is directly activated by corticosterone. Considering the fact that taking mice out of the isolator is a stressful procedure, elevated basal *Fkbp5* expression might reflect higher response of GF mice to this unavoidable handling stress. Despite the fact, that glucocorticoids are heavily involved in the regulation of PNMT expression (Kvetnansky et al., 2009), we do not consider that increased *Hsd11b1* in adrenals of GF animals might substantially participate in up-regulation of *Pnmt*, because glucocorticoid-dependent *Pnmt* and glucocorticoid-independent *Th* show similar

expression pattern. Further studies will be necessary to understand the pathway how microbiota might affect the adrenal gland functions.

4.4 Role of microbiota in glucocorticoid regulation in colon

4.4.1 Regulation of local steroidogenesis by microbiota in colon

Both acute restraint stress and microbiota modulated the expression of some steroidogenic genes in colon, especially *Nr5a2*, which encodes the crucial transcriptional regulator of intestinal steroidogenesis LRH-1 and *Hsd3b2*, both genes were decreased by stress and absence of microbiota. Interaction between stress and microbiota was found in expression of *Cyp11a1*, and *Hsd3b1*; genes encoding steroidogenic enzymes in colon (Vagnerová et al. 2019/Publication D).

Detailed analysis of steroidogenic genes in the colon revealed that expression of several genes of steroidogenic cascade is modulated by stress and microbiota, notably *Lrh-1*, which encodes the liver receptor homolog-1 (LRH-1) protein, a transcriptional factor essential for intestinal glucocorticoid synthesis and homolog of adrenal transcription factor steroidogenic factor 1 (SF-1) (Mueller et al., 2006). However, both transcription factors reacted to acute restraint differently. Although the *Sf-1* transcript was upregulated in the adrenal glands, expression of colonic *Lrh-1* was downregulated by stress in both GF and SPF animals. In contrast to *Lrh-1*, the effect of stress and microbiota on *Cyp11a1* showed interaction; stress downregulated the expression of *Cyp11a1* but only in GF animals. These data do not fit with previous observations, which have demonstrated upregulation of the expression of *Lrh-1*, *Cyp11a1*, and *Cyp11b1* in the intestine by acute inflammatory stress (Cima et al., 2004). This discrepancy probably reflects different quality of stress. However, our results indicate that acute restraint stress might influence intestinal steroidogenesis and that this effect is modulated by microbiota.

4.4.2 Effect of chronic stress and microbiome on glucocorticoid regeneration and cytokine milieu in murine colon

Chronic psychosocial stress downregulated the expression of *Hsd11b1* and damped the expression of a panel of cytokines depending on the presence or absence of gut microbiota (Vodička et al. 2018/Publication C).

The decreased colonic expression of cytokines in stressed animals, which is partially modulated by the microbiota, supports previously described stress-induced immune suppression (Reber et al., 2011). We found correlation between *Hsd11b1* and cytokine expression and thus we hypothesize that *Hsd11b1* expression in colon is modulated by cytokine milieu and that the actions of cytokines are more potent in GF mice than in SPF mice. These results highlight the importance of the microbiota/intestinal commensals in shaping the response of the peripheral tissue to stress and indicates possible pathways by which the environment can interact with glucocorticoid signaling.

4.5 Assessment of behavioral changes in relationship to microbiota in chronic psychosocial stress

GF intruder mice spent less time in total defensive behavior during interaction with residents. This effect was mainly caused by escape/flight behavior. No difference in offensive behavior was found between GF and SPF residents (fig. 8) (Vodička et al. 2018/Publication C).

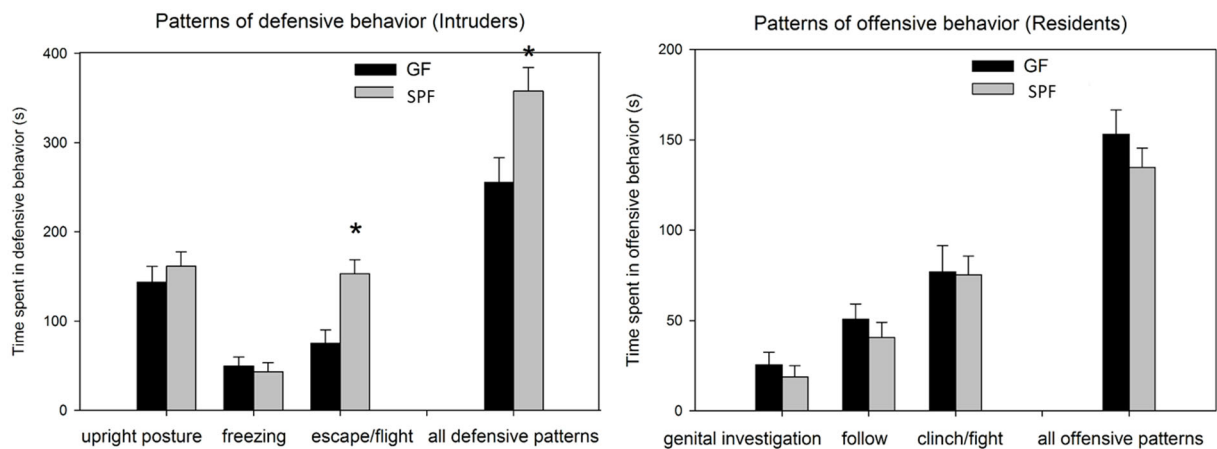


Figure 16. Total defensive behavior of intruder and total offensive behavior of residents of specific pathogen-free (SPF) and germ-free (GF) mice. Data are expressed as the means \pm SEM; Only the statistical differences determined by two-way ANOVA followed by post hoc test are shown; the P-value of the post hoc test: *P < 0.05.

No studies have compared behavior of GF and SPF mice in resident-intruder paradigm yet, but it has been demonstrated that germ-free status can modify social preference in mice (Arentsen et al., 2015, Desbonnet et al., 2014). On the other hand, many studies focusing on anxiety-like behavior have been carried out and majority of them observed diminished anxiety behavior in GF

mice (Arentsen et al., 2015, Clarke et al., 2013, Crumeyrolle-Arias et al., 2014, De Palma et al., 2015, Diaz Heijtz et al., 2011, Neufeld et al., 2011, Nishino et al., 2013). In our experimental setup the escape/flight behavior can be classified as anxiety-like behavior, suggesting that GF mice exhibit less anxiety-like behavior in repeated psychosocial stress

5 Conclusions

Stress is often presented as a risk factor for many diseases. However, the stress reaction is designed to deal with life threatening situation and the deleterious effects usually stems from the potency of stress-activated pathways. When the amount of stress is excessive or the reaction to stressor is deregulated, the harmful side-effects begin to manifest. Therefore, precise regulation of stress response and its components is crucial. Stress reactivity is modulated by several factors including genetic predisposition or the environment. This Thesis was aimed at dissecting the mechanisms involved in regulation of the HPA axis and local glucocorticoid metabolism. To achieve this goal, diverse stress categories and various animals differing in stress reactivity were used. The main conclusions are summarized in the following points:

6. We assessed the impact of short-term psychological and chronic psychosocial stressor on activation of the HPA axis and glucocorticoid metabolism. Both stressor paradigms upregulated expression of *Hsd11b1* in limbic brain areas involved in HPA axis regulation, but not in the HPA axis itself. We also observed strain-dependent differences in *Hsd11b1* between F344 and LEW rats. Together with minimal stress-induced changes in *Nr3c1*, a gene encoding GR, we assume that 11HSD1 plays an important role in local regulation of glucocorticoid concentration and represents an important modulator of the HPA axis in limbic brain areas. (Publications A and B)
7. We found that psychosocial stress increased *Hsd11b1* expression in MLN and 11HSD1 activity in thymus, spleen and MLN. The increase of glucocorticoid regeneration was greater in LEW than F344 rats. The *Hsd11b1* expression was also elevated by inflammation in specific microanatomical compartments of the murine gut immune system and its expression correlated with the expression of *Tnfa* as well as other cytokines. Collectively, these results suggest that the increase of glucocorticoids mediated by 11HSD1 dampens the immune response locally and prevents it from overshooting. (Publications A, E and F)
8. The absence of microbiota increased plasma corticosterone levels in acute stress. Expression of pituitary *Pomc* and *Crhr1* and some genes encoding steroidogenic enzymes in adrenals were also modulated by microbiota. In chronic stress we showed stress- and microbiota-induced changes in expression of pituitary *Fkbp5* and genes

encoding key adrenal enzymes for catecholamine synthesis TH and PNMT, which indicates that microbiota represent an important factor in shaping the stress response, but the specific mechanisms still remain to be elucidated. (Publications C and D)

9. Both acute restraint stress and microbiota modulated the expression of some steroidogenic genes in colon, especially *Nr5a2*, which encodes LRH-1, the crucial transcriptional regulator of intestinal steroidogenesis. In contrast, chronic psychosocial stress down-regulated the expression of *Hsd11b1* and dampens the expression of a panel of cytokines depending on the presence or absence of gut microbiota. These results highlight the effect of microbiota on local extra-adrenal steroidogenesis and glucocorticoid metabolism. (Publications C and D)
10. The GF mice showed less escape behavior during resident-intruder test compared to their SPF counterparts indicating less anxiety. Decreased anxiety-like behavior in GF mice was described previously, we were the first to demonstrate under the conditions of psychosocial stress. (Publication D)

Together the results highlight the role of 11HSD1 in central feedback regulation of HPA axis response, local restriction of immune system and the importance of microbiota in regulating not only the HPA response to stress but also behavior and local extra-adrenal glucocorticoid metabolism.

6 List of publications *in extenso* and contributions of the author

Publication A: Vodička M*, Ergang P*, Mikulecká A, Řeháková L, Klusoňová P, Makal J, Soták M, Musílková J, Zach P, Pácha J. Regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 7 α -hydroxylase CYP7B1 during social stress. PLoS One. 2014; 9: e89421. IF=3.234 (2014)

MV – Identification of distinct brain areas and performance of laser capture microdissection; contribution to performance of stress protocol, animal sacrifice and tissue harvesting, analysis and interpretation of the data and writing the manuscript.

Publication B: Ergang P*, Vodička M*, Soták M, Klusoňová P, Behuliak M, Řeháková L, Zach P, Pácha J. Differential impact of stress on hypothalamic-pituitary-adrenal axis: gene expression changes in Lewis and Fisher rats. Psychoneuroendocrinology. 2015; 53:49-59. IF=5.44 (2015)

MV – Management and performance of the stress protocol, identification of distinct brain areas and performance of Laser capture microdissection; contribution to animal sacrifice and tissue harvesting, analysis and interpretation of the data and writing the manuscript.

Publication C: Vodička M©, Ergang P, Hrnčír T, Mikulecká A, Kvapilová P, Vagnerová K, Šestáková B, Fajstová A, Hermanová P, Hudcovic T, Kozáková H, Pácha J. Microbiota affects the expression of genes involved in HPA axis regulation and local metabolism of glucocorticoids in chronic psychosocial stress. Brain Behav Immun. 2018; 73: 615-624. IF=6.170 (2018)

MV – Corresponding author, design of the study, planning and management of the experiments; contribution to performance of the stress protocol, corticosterone measurement, animal sacrifice and tissue harvesting, analysis and interpretation of the data and writing the manuscript.

Publication D: Vagnerová K, Vodička M, Hermanová P, Ergang P, Šrůtková D, Klusoňová P, Balounová K, Hudcovic T, Pácha J. Interactions Between Gut Microbiota and Acute Restraint Stress in Peripheral Structures of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and the Intestine of Male Mice. Front Immunol. 2019; 10: 2655. IF=5.085 (2019)

MV – Design of the study, planning and management of the experiments, performance of the stress protocol, contribution to corticosterone measurement, animal sacrifice and tissue harvesting, analysis and interpretation of the data and writing the manuscript.

Publication E: Ergang P, Mikulecká A, Vodička M, Vagnerová K, Mikšík I, Pácha J. Social defeat stimulates local glucocorticoid regeneration in lymphoid organs. Endocr Connect. 2018 Dec;7(12):1389-1396. IF=2.474 (2018)

MV - contributed to performance of stress procedures, ACTH measurements, animal sacrifice and tissue harvesting, analysis and interpretation of the data and writing the manuscript.

Publication F: Ergang P, Vodička M, Vagnerová K, Moravec M, Kvapilová P, Kment M, Pácha J. Inflammation regulates 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 differentially in specific compartments of the gut mucosal immune system. *Steroids*. 2017 Oct;126:66-73. IF = 2.647 (2017)

MV – Identification and performance of laser capture microdissection in colon and lymphatic organs, contributed to planning and management of the experiment, colitis induction, immunohistochemistry, animal sacrifice and tissue harvesting, analysis and interpretation of the data and writing the manuscript.

*Both authors contributed equally

© Corresponding author

7 Other publications by the author

Balounová K, Soták M, Ergang P, Vodička M, Vagnerová K, Pácha J. Effects of aging and tumorigenesis on coupling between the circadian clock and cell cycle in colonic mucosa. *Mech Ageing Dev.* 2020 Sep;190:111317.

Kroupova P, van Schothorst EM, Keijjer J, Bunschoten A, **Vodicka M**, Irodenko I, Oseeva M, Zacek P, Kopecky J, Rossmeisl M, Horakova O. Omega-3 Phospholipids from Krill Oil Enhance Intestinal Fatty Acid Oxidation More Effectively than Omega-3 Triacylglycerols in High-Fat Diet-Fed Obese Mice. *Nutrients.* 2020 Jul 9;12(7):2037.

Soták M, Bryndová J, Ergang P, Vagnerová K, Kvapilová P, **Vodička M**, Pácha J, Sumová A. Peripheral circadian clocks are diversely affected by adrenalectomy. *Chronobiol Int.* 2016;33(5):520-9.

Svoboda J, Telensky P, Blahna K, **Vodicka M**, Stuchlik A. The role of rat posterior parietal cortex in coordinating spatial representations during place avoidance in dissociated reference frames on a continuously rotating arena (Carousel). *Behav Brain Res.* 2015 Oct 1;292:1-9.

Vagnerová K, Ergang P, Soták M, Balounová K, Kvapilová P, **Vodička M**, Pácha J. Diurnal expression of ABC and SLC transporters in jejunum is modulated by adrenalectomy. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2019 Dec;226:108607.

Vavřínová A, Behuliak M, Bencze M, **Vodička M**, Ergang P, Vaněčková I, Zicha J. Sympathectomy-induced blood pressure reduction in adult normotensive and hypertensive rats is counteracted by enhanced cardiovascular sensitivity to vasoconstrictors. *Hypertens Res.* 2019 Dec;42(12):1872-1882.

Vodička M, Vavřínová A, Mikulecká A, Zicha J, Behuliak M. Hyper-reactivity of HPA axis in Fischer 344 rats is associated with impaired cardiovascular and behavioral adaptation to repeated restraint stress. *Stress.* 2020 Nov;23(6):667-677.

Zemanová N, Anzenbacher P, Zapletalová I, Jourová L, Hermanová P, Hudcovic T, Kozáková H, **Vodička M**, Pácha J, Anzenbacherová E. The role of the microbiome and psychosocial stress in the expression and activity of drug metabolizing enzymes in mice. *Sci Rep.* 2020 May 22;10(1):8529.

8 Seznam literatury / References

Arentsen T, Raith H, Qian Y, Forssberg H, Diaz Heijtz R. Host microbiota modulates development of social preference in mice. *Microb Ecol Health Dis*. 2015 Dec 15;26:29719.

Bekhbat M, Rowson SA, Neigh GN. Checks and balances: The glucocorticoid receptor and NFκB in good times and bad. *Front Neuroendocrinol*. 2017 Jul;46:15-31.

Bellavance MA, Rivest S. The HPA - Immune Axis and the Immunomodulatory Actions of Glucocorticoids in the Brain. *Front Immunol*. 2014 Mar 31;5:136.

Cima I, Corazza N, Dick B, Fuhrer A, Herren S, Jakob S, Ayuni E, Mueller C, Brunner T. Intestinal epithelial cells synthesize glucocorticoids and regulate T cell activation. *J Exp Med*. 2004 Dec 20;200(12):1635-46.

Clarke G, Grenham S, Scully P, Fitzgerald P, Moloney RD, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF. The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol Psychiatry*. 2013 Jun;18(6):666-73.

Crumeyrolle-Arias M, Jaglin M, Bruneau A, Vancassel S, Cardona A, Dauge V, Naudon L, Rabot S. Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2014 Apr;42:207-17.

Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci*. 2012 Oct;13(10):701-12.

De Palma G, Blennerhassett P, Lu J, Deng Y, Park AJ, Green W, Denou E, Silva MA, Santacruz A, Sanz Y, Surette MG, Verdu EF, Collins SM, Bercik P. Microbiota and host determinants of behavioural phenotype in maternally separated mice. *Nat Commun*. 2015 Jul 28;6:7735.

Desbonnet L, Clarke G, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF. Microbiota is essential for social development in the mouse. *Mol Psychiatry*. 2014 Feb;19(2):146-8.

Diaz Heijtz R, Wang S, Anuar F, Qian Y, Björkholm B, Samuelsson A, Hibberd ML, Forssberg H, Pettersson S. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Feb 15;108(7):3047-52.

Ergang P, Mikulecká A, Vodička M, Vagnerová K, Mikšík I, Pácha J. Social defeat stimulates local glucocorticoid regeneration in lymphoid organs. *Endocr Connect*. 2018 Dec;7(12):1389-1396.

Ergang P, Vodička M, Soták M, Klusoňová P, Behuliak M, Řeháková L, Zach P, Pácha J. Differential impact of stress on hypothalamic-pituitary-adrenal axis: gene expression changes in Lewis and Fisher rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2015 Mar;53:49-59.

Ergang P, Vodička M, Vagnerová K, Moravec M, Kvapilová P, Kment M, Pácha J. Inflammation regulates 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 differentially in specific compartments of the gut mucosal immune system. *Steroids*. 2017 Oct;126:66-73.

Ergang P, Vytáčková K, Svec J, Bryndová J, Mikšík I, Pácha J. Upregulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 in lymphoid organs during inflammation in the rat. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011 Aug;126(1-2):19-25

Foster JA, Rinaman L, Cryan JF. Stress & the gut-brain axis: Regulation by the microbiome. *Neurobiol Stress*. 2017 Mar 19;7:124-136.

Gjerstad JK, Lightman SL, Spiga F. Role of glucocorticoid negative feedback in the regulation of HPA axis pulsatility. *Stress*. 2018 Sep;21(5):403-416.

Hardy RS, Filer A, Cooper MS, Parsonage G, Raza K, Hardie DL, Rabbitt EH, Stewart PM, Buckley CD, Hewison M. Differential expression, function and response to inflammatory stimuli of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human fibroblasts: a mechanism for tissue-specific regulation of inflammation. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(4):R108.

Herman JP. Neural control of chronic stress adaptation. *Front Behav Neurosci*. 2013 Aug 8;7:61.

Hu A, Fatma S, Cao J, Grunstein JS, Nino G, Grumbach Y, Grunstein MM. Th2 cytokine-induced upregulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 facilitates glucocorticoid suppression of proasthmatic airway smooth muscle function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009 May;296(5):L790-803.

Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol*. 2009 Jul;5(7):374-81.

Jun YJ, Park SJ, Hwang JW, Kim TH, Jung KJ, Jung JY, Hwang GH, Lee SH, Lee SH. Differential expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 in mild and moderate/severe persistent allergic nasal mucosa and regulation of their expression by Th2 cytokines: asthma and rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 2014 Feb;44(2):197-211.

Korte SM, Koolhaas JM, Wingfield JC, McEwen BS. The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005 Feb;29(1):3-38.

Kvetnansky R, Sabban EL, Palkovits M. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev*. 2009 Apr;89(2):535-606.

Morgane PJ, Galler JR, Mokler DJ. A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Prog Neurobiol*. 2005 Feb;75(2):143-60.

Mueller M, Cima I, Noti M, Fuhrer A, Jakob S, Dubuquoy L, Schoonjans K, Brunner T. The nuclear receptor LRH-1 critically regulates extra-adrenal glucocorticoid synthesis in the intestine. *J Exp Med*. 2006 Sep 4;203(9):2057-62.

Neufeld KM, Kang N, Bienenstock J, Foster JA. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterol Motil*. 2011 Mar;23(3):255-64, e119.

Nishino R, Mikami K, Takahashi H, Tomonaga S, Furuse M, Hiramoto T, Aiba Y, Koga Y, Sudo N. Commensal microbiota modulate murine behaviors in a strictly contamination-free environment confirmed by culture-based methods. *Neurogastroenterol Motil*. 2013 Jun;25(6):521-8.

Pacák K, Palkovits M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev.* 2001 Aug;22(4):502-48.

Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* 2007. Amsterdam: Elsevier.

Reber SO, Peters S, Slattery DA, Hofmann C, Schölmerich J, Neumann ID, Obermeier F. Mucosal immunosuppression and epithelial barrier defects are key events in murine psychosocial stress-induced colitis. *Brain Behav Immun.* 2011 Aug;25(6):1153-61.

Staab CA, Maser E. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is an important regulator at the interface of obesity and inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010 Mar;119(1-2):56-72.

Sternberg EM, Glowa JR, Smith MA, Calogero AE, Listwak SJ, Aksentijevich S, Chrousos GP, Wilder RL, Gold PW. Corticotropin releasing hormone related behavioral and neuroendocrine responses to stress in Lewis and Fischer rats. *Brain Res.* 1992 Jan 20;570(1-2):54-60.

Sternberg EM, Young WS 3rd, Bernardini R, Calogero AE, Chrousos GP, Gold PW, Wilder RL. A central nervous system defect in biosynthesis of corticotropin-releasing hormone is associated with susceptibility to streptococcal cell wall-induced arthritis in Lewis rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Jun;86(12):4771-5.

Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu XN, Kubo C, Koga Y. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol.* 2004 Jul 1;558(Pt 1):263-75.

Thieringer R, Le Grand CB, Carbin L, Cai TQ, Wong B, Wright SD, Hermanowski-Vosatka A. 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is induced in human monocytes upon differentiation to macrophages. *J Immunol.* 2001 Jul 1;167(1):30-5.

Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci.* 2009 Jun;10(6):397-409.

Vagnerová K, Vodička M, Hermanová P, Ergang P, Šrůtková D, Klusoňová P, Balounová K, Hudcovic T, Pácha J. Interactions Between Gut Microbiota and Acute Restraint Stress in Peripheral Structures of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and the Intestine of Male Mice. *Front Immunol.* 2019 Nov 19;10:2655.

Vodička M, Ergang P, Hrnčír T, Mikulecká A, Kvapilová P, Vagnerová K, Šestáková B, Fajstová A, Hermanová P, Hudcovic T, Kozáková H, Pácha J. Microbiota affects the expression of genes involved in HPA axis regulation and local metabolism of glucocorticoids in chronic psychosocial stress. *Brain Behav Immun.* 2018 Oct;73:615-624.

Vodička M, Ergang P, Mikulecká A, Řeháková L, Klusoňová P, Makal J, Soták M, Musílková J, Zach P, Pácha J. Regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 7 α -hydroxylase CYP7B1 during social stress. *PLoS One.* 2014 Feb 21;9(2):e89421.