



Gdański Uniwersytet Medyczny  
Wydział Lekarski

**Justyna Marta Wierzbicka**

***Modulacja ekspresji elementów skórniego analogu  
osi podwzgórze-przysadka nadnercza (ang. HPA)  
w procesie różnicowania keratynocytów  
– wpływ witaminy D***

---

ROZPRAWA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

**Promotor:  
Prof. dr hab. Michał A. Żmijewski**

Pracę wykonano w Katedrze i Zakładzie Histologii  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

**Gdańsk 2017**

***Pragnę podziękować wszystkim  
bez których niniejsza praca nie mogła by powstać.***

***Przede wszystkim mojemu Promotorowi,  
Panu Profesorowi Michałowi Żmijewskiemu  
za przekazaną mi wiedzę, ogromną życzliwość,  
oraz nieocenioną pomoc podczas powstawania niniejszej pracy.***

***Kierownikowi Katedry i Zakładu Histologii GUMed,  
Panu Profesorowi Zbigniewowi Kmieciovii  
za życzliwość oraz zapewnienie  
znakomitych warunków do pracy naukowej.***

***Panu Profesorowi Michałowi Woźniakowi  
za możliwość prowadzenia badań naukowych  
w przyjaznej atmosferze na Katedrze Chemii Medycznej.***

***Moim Kolegom z zespołu badawczego  
dr Annie Piotrowskiej i mgr Jakubowi Antoniewiczowi  
za to, że zawsze mogłam na nich liczyć.***

***Koleżankom i Kolegom z Katedry i Zakładu Histologii  
za życzliwość i wspaniałą atmosferę pracy.***

***Moim Bliskim,  
za ogromne wsparcie, cierpliwość i wyrozumiałość.***

## **SPIS TREŚCI**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Wykaz zastosowanych skrótów .....</b>                               | <b>4</b>  |
| <b>Wykaz prac wchodzących w skład rozprawy.....</b>                    | <b>5</b>  |
| <b>Streszczenie w języku polskim.....</b>                              | <b>6</b>  |
| 1. Wprowadzenie.....   | 6         |
| 2. Cele pracy.....   | 9         |
| 3. Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej ..... | 9         |
| 4. Podsumowanie .....  | 15        |
| <b>Summary in English .....</b>  | <b>16</b> |
| 1. Introduction .....  | 16        |
| 2. Objectives of the work .....  | 19        |
| 3. Review of the publications .....                                    | 19        |
| 4. Summary .....   | 25        |
| <b>Wykaz cytowanego piśmiennictwa.....</b>                             | <b>26</b> |
| <b>Publikacje wchodzące w skład rozprawy .....</b>                     | <b>28</b> |

## WYKAZ ZASTOSOWANYCH SKRÓTÓW

|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ | $1\alpha,25$ -dehydroksywitamina $\text{D}_3$ , kalcitriol |
| 7-DHC                               | 7-dehydrocholesterol                                       |
| $20(\text{OH})\text{D}_3$           | 20S-hydroksywitamina $\text{D}_3$                          |
| $21(\text{OH})\text{pD}$            | 21-hydroksypregnalalciferel                                |
| $25(\text{OH})\text{D}_3$           | 25-hydroksywitamina $\text{D}_3$ , kalcifediol             |
| ACTH                                | Adrenokortykotropina                                       |
| CaR                                 | Receptor dla wapnia  |
| CRF                                 | Kortykoliberyna, czynnik uwalniający kortykotropinę        |
| CRFR1-2                             | Receptor dla kortykoliberyny 1 i 2                         |
| $\beta$ -END                        | Beta-endorfina   |
| GR                                  | Receptor dla glukokortykoidów                              |
| INV                                 | Inwolukryna  |
| IFN- $\gamma$                       | Interferon $\gamma$  |
| IL-2, 6 i 8                         | Interleukiny 2, 6 i 8                                      |
| KRT1, KRT14, KRT15                  | Keratyna 1, 14 i 15  |
| $\beta$ i $\gamma$ -LPH             | Lipotropiny $\beta$ i $\gamma$                             |
| MC1-5R                              | Receptor dla melanokortyny 1-5                             |
| $\alpha$ , $\beta$ i $\gamma$ -MSH  | Melanotropiny $\alpha$ , $\beta$ i $\gamma$                |
| Oś HPA                              | Oś podwzgórze-przysadka-nadnercza                          |
| Oś sHPA                             | Skórny analog osi podwzgórze-przysadka-nadnercza           |
| POMC                                | Proopiomelanokortyna                                       |
| RXR                                 | Receptor kwasu 9-cis-retinowego                            |
| UCN1-3                              | Urokortyna 1-3   |
| UV(B)                               | Promieniowanie ultrafioletowe (typu B)                     |
| VDR                                 | Receptor dla witaminy D                                    |

W tekście pracy symbole genów oznaczono czcionką pochylą, a symbole białek czcionką prostą.

## WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY

- Wierzbicka J, Piotrowska A, Zmijewski MA:  
**The renaissance of vitamin D.**  
Acta Biochim Pol 2014, 61:679-686  
*Impact Factor* – 1,153; Punktacja ministerstwa – 15.000
- Piotrowska A, Wierzbicka J, Zmijewski MA:  
**Vitamin D in the skin physiology and pathology.**  
Acta Biochim Pol 2016, 63:17-29  
*Impact Factor* – 1,183; Punktacja ministerstwa – 15.000
- Wierzbicka JM, Zmijewski MA, Antoniewicz J, Sobjanek M, Slominski AT:  
**Differentiation of Keratinocytes Modulates Skin HPA Analog.**  
*J Cell Physiol* 2017, 232:154-66  
*Impact Factor* – 4,155; Punktacja ministerstwa – 30.000
- Wierzbicka JM, Zmijewski MA, Piotrowska A, Nedoszytko B, Lange M, Tuckey RC, Slominski AT:  
**Bioactive forms of vitamin D selectively stimulate the skin analog of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in human epidermal keratinocytes.**  
*Mol Cell Endocrinol* 2016, 437:312-322  
*Impact Factor* – 3,859; Punktacja ministerstwa – 35.000

Łączny współczynnik Impact Factor: 10,35

Łączna punktacja ministerstwa: 95.000

Praca została wykonana w ramach grantu MNiSW nr N402 662840 kierowanego przez Prof. dr hab. Michała Żmijewskiego oraz zadania badawczego MN nr 01-0203/08/280 kierowanego przez mgr Justynę Wierzbicką.

Badania realizowane w ramach pracy doktorskiej uzyskały akceptację Niezależnej Komisji Bioetycznej przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (nr zgody NKEBN/292/210).

# STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

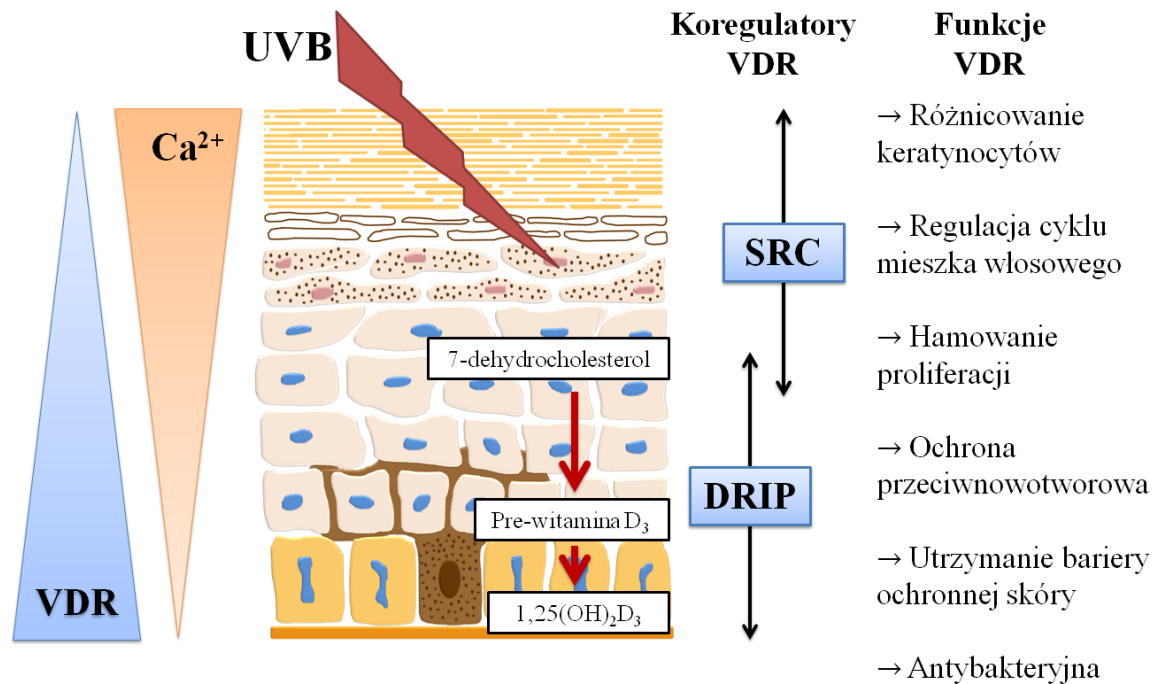
## 1. WPROWADZENIE

Skóra nie tylko stanowi warstwę ochronną organizmu zapewniającą utrzymanie wewnętrznej homeostazy, ale również pełni istotną rolę w przekazywaniu bodźców oraz termoregulacji. Aby efektywnie pełnić różnorodne funkcje, komórki skóry produkują szereg neuropeptydów, hormonów oraz innych aktywnych cząstek [1]. Wykazano na przykład ekspresję elementów osi przysadkowo-podwzgórzowo-nadnerczowej (ang. hypothalamic–pituitary–adrenal axis, HPA) [2] w komórkach skóry, która umożliwia miejscową odpowiedź na czynniki stresogenne takie jak promieniowanie UV, czynniki chemiczne czy biologiczne [2-4]. Ale przede wszystkim naskórek jest naturalnym źródłem witaminy D<sub>3</sub> [5].

**Powstawianie i rola witaminy D<sub>3</sub> w skórze.** W skórze, a przede wszystkim w keratynocytach warstwy podstawnej, pod wpływem promieniowania ultrafioletowego typu B (UVB) zachodzi fotoliza 7-dehydrocholesterolu (7-DHC) do prowitaminy D<sub>3</sub> [6] (Rysunek 1). Następnie w wyniku izomeryzacji prowitaminy D<sub>3</sub> powstaje nie tylko witamina D<sub>3</sub>, ale również tachysterol i lumisterol. Witamina D<sub>3</sub> zostaje przekształcona w aktywny hormon – kalcytriol (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) poprzez następujące po sobie hydroksylacje węgla w pozycji C-25 i C-1, które zachodzą odpowiednio w wątrobie i nerkach [7]. Badania ostatnich lat wykazały, iż szereg organów, w tym również skóra, posiada niezbędne enzymy do pełnej aktywacji witaminy D<sub>3</sub>, ale wyłącznie w keratynocytach możliwa jest synteza 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> z 7-DHC [8]. Ponadto, keratynocyty podobnie jak inne komórki skóry produkują funkcjonalny receptor dla witaminy D<sub>3</sub> (VDR) [9]. Dzięki temu, skóra jest nie tylko źródłem witaminy D<sub>3</sub>, ale również ważnym miejscem docelowym jej działania. Jedną z lepiej poznanych funkcji witaminy D<sub>3</sub> jest regulacja homeostazy jonów wapnia i fosforanów w ludzkim organizmie [10]. Poza tym aktywne metabolity witaminy D<sub>3</sub> charakteryzują się szerokim spektrum działań biologicznych, takich jak hamowanie proliferacji keratynocytów oraz indukcja ich różnicowania [8]. Dzięki powyższym właściwościom, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> oraz jego analogi od lat z powodzeniem były stosowane w leczeniu chorób hiperproliferacyjnych, np. łuszczycy [20].

Wapń wraz z witaminą D<sub>3</sub> odgrywają istotną rolę w procesie różnicowania naskórka [11] (Rysunek 1). 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> nie tylko stymuluje produkcję białek uczestniczących w procesie różnicowania, takich jak inwolukryna, transglutaminaza, lorykryna czy filagryna [12], ale również uwrażliwia keratynocyty na różnicowanie indukowane wapniem poprzez zwiększenie ekspresji genu receptora dla wapnia (CaR) [13]. Regulacja transkrypcji przez aktywną formę witaminy D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) następuje za pośrednictwem jądrowego receptora dla witaminy D (ang. Vitamin D Receptor, VDR). Po aktywacji ligandem, VDR ulega heterodimeryzacji z receptorem kwasu 9-cis-retinowego (ang. Retinoid X Receptor, RXR). Powstały dimer VDR–RXR

rozpoznaje charakterystyczne sekwencje promotorowe DNA (ang. vitamin D responsive element, VDRE) dla genów zależnych od witaminy D<sub>3</sub> [14]. Do kompleksu dołączają się również jądrowe białka koregulatorowe modulując zależną do witaminy D ekspresję genów. Wykazano, iż w skórze podczas procesu różnicowania kompleks VDR–RXR wiąże się selektywnie z kompleksem DRIP (również znany, jako MDI1) lub SRC, zależnie od stopnia zróżnicowania keratynocytów [15] (Rysunek 1).



**Rysunek 1** Regulacja funkcji, proliferacji i różnicowania keratynocytów przez wapń, VDR oraz jego koregulATORY.

**Analog osi HPA w skórze (sHPA).** Szlak produkcji neuropeptydów w skórze zachodzi zgodnie z algorytmem występującym w klasycznej osi HPA (omówione w [2, 16, 17]). Czynniki uwalniające kortykotropinę (kortykoliberyna, CRF) jest jednym z kluczowych elementów osi HPA odpowiedzialnej za odpowiedź na stres [18]. Aktywacja receptorów CRF uruchamia kaskadę sygnalizacyjną prowadzącą do syntezy szeregu hormonów peptydowych będących efektem proteolizy proopiomelanokortyny (POMC): adrenokortykotropiny (ACTH), melanotropiny ( $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ -MSH), lipotropiny ( $\beta$  i  $\gamma$ -LPH), beta-endorfiny ( $\beta$ -END) [19]. ACTH, poprzez selektywne oddziaływanie z receptorem dla melanokortyn (MC2R), pobudza wydzielanie glikokortykosteroidów, w tym kortyzolu w ludzkiej skórze [20]. Kortyzol, wiążąc się z receptorem dla glikokortykosteroidów (*NR3C1*), przeciwdziała czynnikom stresogennym, takim jak odpowiedź zapalna, dodatkowo hamując dalszą sekrecję CRF oraz ACTH na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego [16, 21].

Co ciekawe, na modelu hodowli keratynocytów *in vitro* wykazano szereg działań plejotropowych dla CRF, charakterystycznych również dla witaminy D<sub>3</sub>. Podobnie do witaminy D<sub>3</sub>, produkcja CRF jest indukowana przez UV. Dodatkowo CRF efektywnie hamuje proliferację komórek [22] oraz stymuluje różnicowanie keratynocytów [23]. Wykazano także, że neuropeptydy mogą stymulować ekspresję cząsteczek adhezyjnych [22], jak również indukować produkcję cytokin [24].

Zaburzenie ekspresji osi HPA zaobserwowano w szeregu schorzeń skóry związanych z nadmiernym podziałem komórek naskórka (np. łuszczyca) lub o podłożu autoimmunologicznym (np. atopowe zapalenie skóry). Nadal nie jest znany pełen mechanizm oraz wpływ zaburzeń funkcjonowania osi HPA na występowanie chorób skórnych. Dwa niezależne badania wykazały obniżony poziom receptora CRFR1 na poziomie mRNA [25] oraz białka [26] w biopsjach skórnych pacjentów łuszczycowych. Dodatkowo, kolejne badania wykazały wyraźne zwiększenie poziomu CRF w surowicy, przy równoczesnym obniżeniu ekspresji genów CRFR1 u pacjentów chorych na łuszczycę oraz atopowe zapalenie skóry [27]. Z drugiej strony wzrost ekspresji CRFR1 stwierdzono u pacjentów z innymi chorobami zapalnymi skóry, takimi jak kontaktowe zapalenie skóry czy przewlekła pokrzywka [28].

Wydaje się, iż zaobserwowane zmiany w ekspresji CRF i CRFR1 w chorobach skóry mogą podkreślać istotność funkcji CRF w hamowaniu proliferacji komórek oraz indukowaniu różnicowania. Ponadto witamina D<sub>3</sub> ze względu na szereg podobnych właściwości do CRF może być istotnym modulatorem ekspresji elementów osi sHPA. Warto podkreślić, że interakcja między elementami osi HPA oraz witaminą D nie była jak dotąd dokładnie badana.



## 2. CELE PRACY

Cel 1:

Prześledzenie dynamiki zmian w poziomie ekspresji elementów osi HPA wraz z różnicowaniem się komórek naskórka.

Cel 2:

Zbadanie wpływu witaminy D oraz jej analogów o niewielkim wpływie na wapń (20(OH)D<sub>3</sub>, 21(OH)pD) na ekspresję elementów osi HPA w hodowli keratynocytów *in vitro*.

## 3. OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Na rozprawę doktorską składają się cztery prace, w tym dwa artykuły pogładowe, stanowiące wprowadzenie do tematyki roli witaminy D w skórze. Pozostałe dwie publikacje to prace oryginalne, w których zaprezentowano badania nad wpływem procesu różnicowania się keratynocytów oraz witaminy D na elementy osi HPA w skórze.

W pracy pogładowej pt. „**The renaissance of vitamin D**” opublikowanej w *Acta Biochimica Polonica* w 2014 roku została omówiona historia badań podkreślająca rolę witaminy D, jako globalnego regulatora homeostazy organizmu z perspektywy historycznej, jak i również został przedstawiony aktualny stan wiedzy na temat jej znaczenia w fizjologii człowieka.

Witamina D jest prawdopodobnie jednym z najstarszych hormonów na ziemi. Już najwcześniejsze form życia miały zdolność wytwarzania witaminy D<sub>2</sub> pod wpływem promieni słonecznych [29]. Współczesna historia badań nad witaminą D ma swój początek w czasach rewolucji przemysłowej (XVIII w.). W 1822 polski lekarz, Jędrzej Śniadecki, jako pierwszy zauważył, że dzieci mieszkające w zanieczyszczonej Łodzi, czy centrum Warszawy, znacząco częściej chorowały na krzywicę w porównaniu do dzieci żyjących w słonecznych obszarach wiejskich. Dzięki tym obserwacjom zaproponował skuteczną metodę leczenia krzywicy za pomocą zwiększonej ekspozycji na światło słoneczne [30]. Dopiero ponad 100 lat później, powiązano wpływ światła słonecznego z produkcją witaminy D<sub>3</sub> w skórze. Przełomem w badaniach nad witaminą D, dającym podstawy przyszłych odkryć, była izolacja witaminy D<sub>2</sub> [31], a następnie D<sub>3</sub> [32, 33], odpowiednio w 1932 i 1937 roku. Kolejne dekady przyniosły szczegółowe opisy fotoprodukcji witaminy D, jej metabolizmu oraz interakcji z receptorem dla witaminy D (VDR) [34]. Ponadto duże badania epidemiologiczne dostarczyły

pośrednich, ale przekonujących dowodów, na to, że optymalny poziom witaminy D w surowicy ma korzystne skutki dla naszego zdrowia, jak i zmniejsza ryzyko występowania wielu chorób, w tym nowotworów [35]. W ostatnich latach prowadzone są zaawansowane badania analogów witaminy D, alternatywnych szlaków jej metabolizmu oraz poszukiwanie nowych celów wewnątrzkomórkowych, które przyczynią się do opracowania nowych narzędzi w profilaktyce oraz leczeniu wielu chorób cywilizacyjnych.

Praca pogładowa pt. „**Vitamin D in the skin physiology and pathology**”, opublikowana w *Acta Biochimica Polonica* w 2016 roku, jest kontynuacją powyżej omawianej publikacji. Przedstawia ona obszerny przegląd bieżącej wiedzy na temat wpływu witaminy D i jej analogów w fizjologii i patologii skóry oraz ich aplikacje kliniczne.

Skóra pełni nie tylko funkcję ochronną organizmu, ale również odgrywa istotną rolę w przekazywaniu bodźców pomiędzy organami wewnętrznymi, a otaczającym środowiskiem, termoregulacji, czy też syntezie i wydzielaniu cząsteczek biologicznie czynnych. Naskórek jest głównym źródłem witaminy D<sub>3</sub> dla całego organizmu [36]. Keratynocyty, podobnie jak większość innych komórek, są wrażliwe na 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> dzięki ekspresji receptora dla witaminy D (VDR) [8]. Witamina D<sub>3</sub> oraz VDR wpływa między innymi na: proliferację komórek (hamowanie), różnicowanie keratynocytów (stymulacja), odporność wrodzoną (pobudzanie) oraz regulację cyklu mieszka włosowego [5]. Wszystkie z powyżej wymienionych aktywności witaminy D znacząco przyczyniają się do hamowania powstawania nowotworów skóry.

Różnicowanie keratynocytów prowadzi do wytworzenia się zrogowaciałej warstwy komórek naskórka, która stanowi barierę ochronną. Wszelkie zaburzenia tego procesu mogą prowadzić do powstawania poważnych zaburzeń skórnych, w tym łuszczycy, atopowego zapalenia i raka skóry [8]. Warto zwrócić uwagę, że patologie skóry mają ogromny wpływ na współczesne społeczeństwo, wpływając nie tylko na stan fizyczny, ale i psychikę pacjentów, a także na ich status społeczny. Praca ta zawiera omówienie roli witaminy D w rozwoju oraz przebiegu wybranych chorób skóry, wskazując na potencjalne cele terapeutyczne dla witaminy D. Dla przykładu w zmianach łuszczycowych bariera ochronna naskórka jest niedostatecznie wykształcona, a dzięki zastosowaniu 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> następuje indukcja ekspresji inwolukryny, składników warstwy rogowej i transglutaminazy [37], enzymu wspomagającego jej odnowę. Ponadto witamina D zmniejsza ekspresję prozapalnych cytokin produkowanych przez limfocyty T – IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-6 i IL-8 (wszystkie odgrywają istotną rolę w zapaleniu skóry) [38]. A zatem przeciwłuszczycowa aktywność witaminy D wynika również z jej właściwości antyproliferacyjnych, immunomodulujących oraz promujących różnicowanie komórek.

W pracy oryginalnej pt. „**Differentiation of Keratinocytes Modulates Skin HPA Analog**”, opublikowanej w *Journal of Cellular Physiology* w 2017 roku, wykazano zmianę w ekspresji elementów osi sHPA podczas różnicowania się keratynocytów.

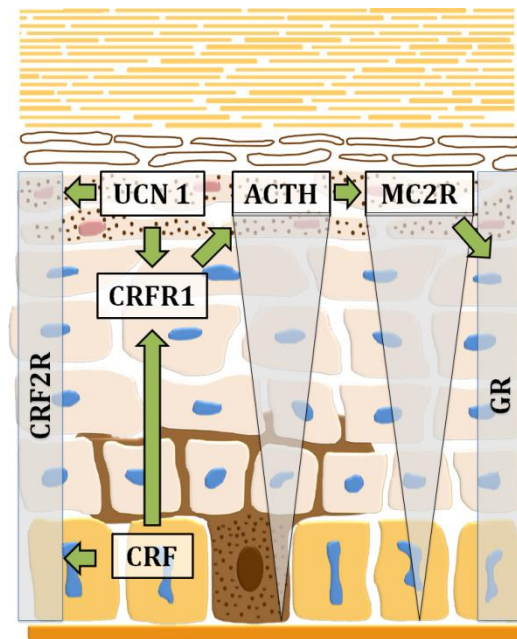
W komórkach skóry, takich jak keratynocyty, melanocyty, fibroblasty oraz mastocyty, ulegają ekspresji wszystkie elementy osi HPA – głównego systemu odpowiedzi na stres w organizmie [1, 17, 39]. Wykazano, że w keratynocytach ekspresja elementów osi HPA jest regulowana przez promieniowanie UV [4], a ich aktywacja wpływa modulująco na lokalną odpowiedź immunologiczną [2, 3, 17, 40, 41]. Dlatego też, komórki skóry nie tylko odpowiadają na poszczególne neuropeptydy oraz kortykosteroidy, ale także efektywnie produkują elementy osi HPA [21, 42]. Proces proliferacji i różnicowania keratynocytów ma zasadnicze znaczenie dla odnowy bariery naskórkowej, i jest ściśle regulowany przez wapń oraz witaminę D<sub>3</sub> [5, 43-45]. Co ciekawe, różnicowanie się keratynocytów może być również indukowane przez neuropeptydy, w tym lokalne elementy osi sHPA [2, 17, 39].

Dotychczasowe badania wielokrotnie wykazywały zmiany w ekspresji elementów osi HPA w chorobach skórnych, przykładowo u pacjentów chorych na łuszczycę oraz atopowe zapalenie skóry zaobserwowano między innymi podwyższony poziom kortykoliberyny (CRF) w surowicy oraz obniżoną ekspresję CRFR1 w zmienionych chorobowo biopsjach skórnych [27]. W związku z brakiem informacji na temat roli procesu różnicowania keratynocytów w regulacji osi sHPA, w niniejszej pracy zbadalam ekspresję neuropeptydów i ich receptorów w poszczególnych warstwach naskórka oraz w hodowli pierwotnych keratynocytów, w których indukowano różnicowanie.

W przeprowadzonych doświadczeniach użyłam dwóch modeli różnicowania keratynocytów – przedłużoną hodowlę keratynocytów (wzrost gęstości hodowli powodował zahamowanie podziałów komórkowych i indukował ich różnicowanie) oraz biopsje skóry ludzkiej, zawierające zarówno naskórek jak i skórę właściwą. Ekspresję wybranych neuropeptydów oraz ich receptorów (CRF, CRF1, MC1R, MC2R, NR3C1, POMC) zbadalam zarówno na poziomie mRNA (Real-Time PCR), jak i białka (barwienia immunofluorescencyjne).

W badaniach wykazałam podwyższoną ekspresję genu *CRF* w średnio zróżnicowanych keratynocytach, podobne wyniki uzyskałam dla genu *UCN1* kodującego urokortynę 1. Dodatkowo barwienia immunofluorescencyjne wykazały podwyższony poziom immunoreaktywności dla receptora CRFR1 w zróżnicowanych keratynocytach. Ekspresja genu *POMC* wzrastała wraz ze stopniem różnicowania keratynocytów, natomiast poziom jego receptora (*MC2R*) wyraźnie wzrastał w pierwszych dniach hodowli, a następnie sukcesywnie spadał. Natomiast poziom receptora dla glikokortykosteroidów (*NR3C1*) nie ulegał większym wahaniom. Wyniki te zostały potwierdzone immunohistochemicznie na skrawkach zdrowej skóry.

Podsumowując, wiele publikacji wskazuje na istotną rolę osi sHPA w fizjologii skóry. Przeprowadzone przez mnie badania po raz pierwszy pokazują dynamiczne zmiany w ekspresji elementów osi sHPA na różnych etapach zróżnicowania keratynocytów (Rysunek 2). Na podstawie otrzymanych danych w prezentowanej pracy wysunięto wniosek, że selektywna ekspresja neuropeptydów i ich receptorów przyczynia się do procesu powstawania bariery naskórkowej, a także uczestniczy w lokalnej odpowiedzi na stres oraz moduluje działanie układu immunologicznego. Dlatego też wydaje się, że jakiegokolwiek nieprawidłowości w lokalnej ekspresji neuropeptydów oraz ich receptorów mogą mieć istotny wpływ na fizjologię skóry, a w konsekwencji prowadzić do rozwoju chorób skórnych.



**Rysunek 2** Proponowany model lokalizacji elementów osi HPA w naskórku.

W drugiej pracy oryginalnej pt. „**Bioactive forms of vitamin D selectively stimulate the skin analog of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in human epidermal keratinocytes**” opublikowanej w *Molecular and Cellular Endocrinology* w 2016 roku, opisano wpływ witaminy D<sub>3</sub> oraz jej analogów na wzrost i różnicowanie, ale również na zdolność do modulacji ekspresji elementów sHPA w keratynocytach.

Promieniowanie UVB nie tylko indukuje ekspresję elementów osi HPA w keratynocytach [4], ale przede wszystkim stymuluje produkcję witaminy D<sub>3</sub>. Niedawno wykazano, że CYP11A1 (jeden z głównych enzymów steroidogenezy) metabolizuje 7-dehydrocholesterol i witaminę D<sub>3</sub> do aktywnych biologicznie pochodnych, takich jak 20S-hydroksywitamina D<sub>3</sub> (20(OH)D<sub>3</sub>) oraz 21(OH)pD (opisanych w [46, 47]), wykazujących niewielki wpływ na gospodarkę wapniową. Witamina D<sub>3</sub> i jej analogi modulują ekspresję co najmniej 3000 genów [14, 48]. Jednak

wpływ witaminy D<sub>3</sub> oraz jej analogów na ekspresję elementów osi HPA nie został do tej pory zbadany. Głównym celem badania było określenie czy 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> oraz jej pochodne o obniżonym wpływie na wapń (20(OH)D<sub>3</sub>, 21(OH)pD) modulują ekspresję elementów osi sHPA.

Badania zostały przeprowadzone na komercyjnej linii pierwotnych keratynocytów (HPEKp). Wrażliwość keratynocytów na witaminę D oraz jej analogi została zbadana przy użyciu testów proliferacyjnych (test SRB). Zbadałam również ekspresję genów związanych z metabolizmem witaminy D<sub>3</sub>, wybranych neuropeptydów oraz ich receptorów. Badania zostały przeprowadzone zarówno na poziomie mRNA (Real-Time PCR), jak i białka (barwienia immunofluorescencyjne, Western Blot, cytometria przepływowa).

W pierwszym etapie pracy zbadałam ogólny efekt 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> oraz jego analogów na hodowlę pierwotnych keratynocytów. Wszystkie sekosteroidy (analogi witaminy D) znacząco hamowały proliferację komórek w sposób zależny od dawki. Jednakże 20(OH)D<sub>3</sub> wykazywało wyższą skuteczność w porównaniu do 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 21(OH)pD, zmniejszając liczbę komórek o 60-70% w porównaniu z 20%, dla pozostałych związków. Została również sprawdzona ekspresja genów markerowych dla procesu różnicowania się keratynocytów. Stwierdzono podwyższoną ekspresję genów markerowych wczesnego zróżnicowania (cytokeratyna 14, cytokeratyna 1) we wszystkich traktowanych próbach. Natomiast, tylko 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 20(OH)D<sub>3</sub> znacząco zwiększyły poziom mRNA dla involukryny (*INV*, markera późnego zróżnicowania). Dodatkowo zbadałam zmiany w ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm witaminy D<sub>3</sub>. Do najważniejszych obserwacji należało obniżenie ekspresji *VDR* przez 21(OH)pD, przy jednoczesnym braku indukcji *CYP24A1*, kodującego 24-hydroksylazę biorącą udział w katabolizmie witaminy D. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> i 20(OH)D<sub>3</sub> nie wykazywały wpływu na ekspresję *VDR*, natomiast efektywnie indukowały ekspresję *CYP24A1*. Względny poziom mRNA pozostałych enzymów metabolizujących witaminę D (*CYP3A4*, *CYP2R1*) uległ umiarkowanej stymulacji przez testowane związki. Co ciekawe, wyłącznie 21(OH)pD znacząco zwiększył ekspresję genu 1 $\alpha$ -hydroksylazy, *CYP27B1*. Powyższe dane sugerują, że 21(OH)pD może aktywować alternatywny szlak, niezależny od receptora dla witaminy D (*VDR*).

Powszechnie wiadomo, że wapń oraz witamina D należą do silnych induktorów procesu różnicowania się keratynocytów. Dlatego też w kolejnym etapie pracy zbadałam wpływ powyższych induktorów na ekspresję elementów osi HPA (*CRF*, *UNC1-3*, *POMC*, *MC1R*, *MC2R* oraz *NR3C1*) w pierwotnych keratynocytach. Wykazałam, że traktowanie pierwotnych keratynocytów 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> w połączeniu z wapniem (Ca<sup>+2</sup>) efektywnie indukuje ekspresję, przynajmniej na poziomie mRNA, wszystkich elementów osi HPA. Efekt samego wapnia na ekspresję elementów HPA był znacząco słabszy, niż efekt 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Najwyższa indukcja ekspresji była obserwowana po 24h w próbach traktowanych kombinacją 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> oraz Ca<sup>+2</sup>.

To sugeruje, że witaminy D<sub>3</sub> może działać na elementy naskórkowe HPA zarówno poprzez ścieżki zależne jak i niezależne od wapnia.

W ostatnim etapie pracy porównałam zdolność stymulacji ekspresji elementów osi sHPA przez 20(OH)D<sub>3</sub> i 21(OH)pD, do 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Oba testowane analogii stymulowały ekspresję *CRF* w porównywalnym stopniu do 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Co ciekawe, najwyższy poziom ekspresji *CRF* i *UCN* obserwowałam w przypadku 21(OH)pD. Geny *POMC*, *MC1R* i *MC2R* były indukowane przez 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 20(OH)D<sub>3</sub> oraz 21(OH)pD, z porównywalnymi efektami. Co ciekawe, mRNA *MC3R* było niewykrywalne w hodowli kontrolnej pierwotnych keratynocytów, natomiast jego ekspresja była skutecznie indukowana przez wszystkie testowane sekosteroidy. Wykazałam również, że tylko 21(OH)pD umiarkowanie obniżało ekspresję *NR3C1*.

Dodatkowo zbadalam czy stopień zróżnicowania keratynocytów, monitorowany poziomem ekspresji INV, wpływa na stymulację ekspresji ACTH i MC2R przez witaminę D<sub>3</sub> oraz jej analogii. Stosując cytometrię przepływową przetestowałam dwie populacje keratynocytów, INV pozytywne (INV<sup>+</sup>, zróżnicowane) i INV ujemne (INV<sup>-</sup>, niezróżnicowane). 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> zwiększyło produkcję ACTH i MC2R tylko w komórkach INV<sup>+</sup>, natomiast 20(OH)D<sub>3</sub> (umiarkowanie) i 21(OH)pD (silnie) stymulowało produkcję MC2R w keratynocytach INV<sup>-</sup>. Ponadto w przeciwieństwie do 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> nie stwierdzono istotnego wpływu 21(OH)pD na produkcję ACTH w obu populacjach keratynocytów.

#### 4. PODSUMOWANIE

Istnieje wyraźna, choć nie do końca poznana, zależność między witaminą D<sub>3</sub>, a osią sHPA. Wydaje się, iż zaobserwowane zmiany w ekspresji CRF i CRFR1 w chorobach skóry mogą podkreślać istotność funkcji CRF w hamowaniu proliferacji komórek oraz indukowaniu różnicowania. **W moich badaniach po raz pierwszy wykazałam dynamiczne zmiany w ekspresji elementów sHPA w trakcie różnicowaniu keratynocytów, oraz indukcję ekspresji elementów osi sHPA przez witaminę D i jej analogi.** Ma to istotne znaczenie w przypadku ochrony komórek skóry przed szkodliwym wpływem promieniowania słonecznego (UVB), które jak wykazano stymuluje również ekspresję skórniego analogu osi HPA. Otrzymane dane w ramach prezentowanych prac podnoszą intrygujące pytania: Czy stymulacja elementów osi HPA przez UVB jest przynajmniej częściowo zależna od lokalnie produkowanej witaminy D<sub>3</sub> oraz jej analogów? A może to właśnie witamina D<sub>3</sub> jest głównym czynnikiem stymulującym ekspresję sHPA w skórze?

Tym bardziej wydaje się uzasadnione prowadzenie dalszych badań nad poznaniem mechanizmów tych interakcji. Wyniki moich badań stanowią podstawę do wyjaśnienia patogenezy szeregu chorób skóry, w których obserwuje się zarówno obniżony poziom witaminy D<sub>3</sub> jak i deregulacje osi HPA, takich jak łuszczyca, czy atopowe zapalenie skóry. Ponadto, uzyskane wyniki wskazują nowe cele terapeutyczne w oparciu o witaminę D<sub>3</sub> oraz jej pochodne o nieznacznym wpływie na gospodarkę wapniową. Zaproponowany przeze mnie nowy mechanizm interakcji między witaminą D<sub>3</sub>, a sHPA potwierdza zasadność suplementowania witaminy D<sub>3</sub> w terapii chorób skóry, w celu zmniejszenia częstości ich występowania oraz łagodzenia objawów i skutków, a co za tym idzie również poprawy jakości życia pacjentów dermatologicznych.

# SUMMARY IN ENGLISH

## 1. INTRODUCTION

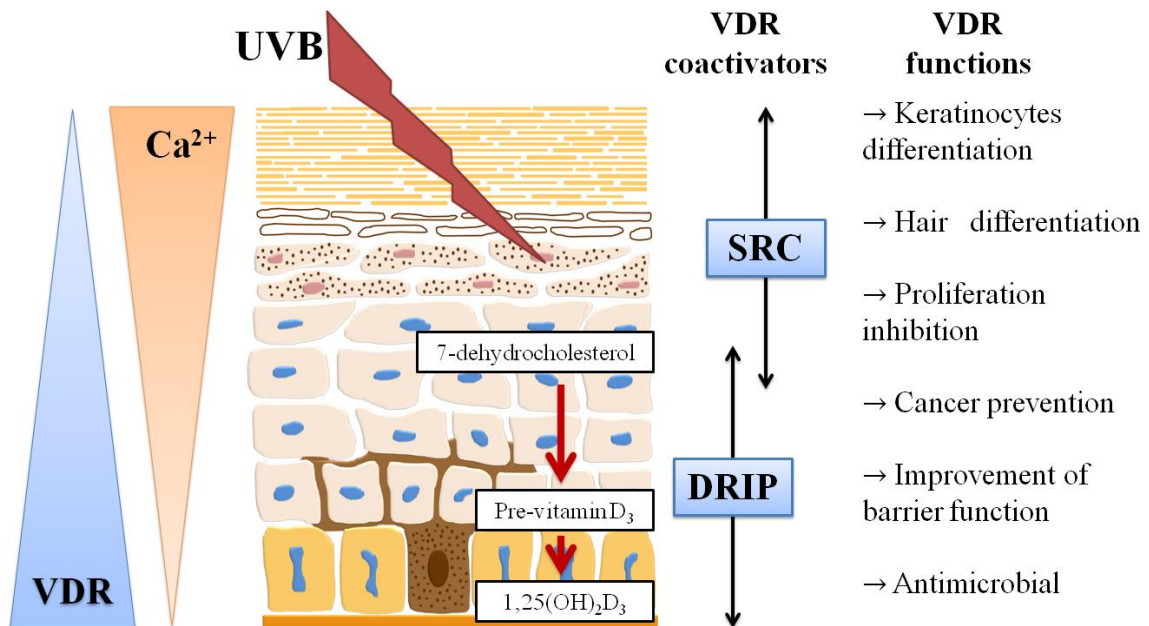
As a protective layer, skin ensures the maintenance of the internal homeostasis, but also plays an important role in the transmission of stimuli and thermoregulation. To efficiently perform those diverse functions, skin cells produce a variety of neuropeptides, hormones, and other active molecules [1]. In the recent years, it was showed that the skin can express its own analog of the stress response coordinating system – hypothalamic pituitary adrenal axis (sHPA) [2], which enables rapid, local response to stress causing stimuli e.g. ultraviolet radiation, chemicals or pathogens [2-4]. But almost importantly, the epidermis is a natural source of vitamin D<sub>3</sub> [5].

**Synthesis and role of vitamin D<sub>3</sub> in the skin.** A vitamin D<sub>3</sub> synthesis in the body depends on ultraviolet light B (UVB) radiation from the sun, that is why this process is only effective in the uppermost layer of the skin – epidermis. Briefly, UVB radiation cause photolysis of 7-dehydrocholesterol (7-DHC) to previtamin D<sub>3</sub> [6] (Figure 1), which further isomerizes to vitamin D<sub>3</sub>, tachysterol<sub>3</sub> (T<sub>3</sub>) and lumisterol<sub>3</sub> (L<sub>3</sub>). Vitamin D<sub>3</sub> undergoes sequential hydroxylations, in position C-25 and C-1, to its fully active form – 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, respectively in the liver and kidney [7]. Recent studies revealed that the essential enzymatic machinery for vitamin D<sub>3</sub> synthesis is also present in a number of distinct tissues and organs, including skin. But, it should be emphasized, that the skin is the only known organ where provitamin D<sub>3</sub> is formed and equipped with complete machinery of vitamin D<sub>3</sub> synthesis (25-hydroxylase and 1 $\alpha$ -hydroxylase) and metabolism (24-hydroxylase) [8]. In an addition, epidermal keratinocytes as well as other skin cells produce functional receptor for vitamin D<sub>3</sub> (VDR) [9]. Thus, the skin is not only the source of vitamin D but also important target of its activity. The most well-known vitamin D<sub>3</sub> functions are linked to the regulation of body levels of calcium and phosphorus, and the mineralization of bone [10]. Beyond that, active metabolites of vitamin D<sub>3</sub> exhibit a broad spectrum of cellular effects such as an inhibition of cell proliferation (both normal and hyperproliferative cells) and an induction of differentiation [8]. Thanks to the above properties, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and its analogs for years have been successfully used for treating hyperproliferative diseases such as psoriasis [20].

Since keratinocytes express VDR, they are able to respond to the fully active form of vitamin D<sub>3</sub> – 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, which, together with calcium, is one of the most potent inducer of the epidermal differentiation [11] (Figure 1). 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> increases the expression of epidermal differentiation markers, such as involucrin, transglutaminase, loricrin and filaggrin [12], but also potentiates keratinocytes response to calcium by the induction of calcium receptor (CaR) gene expression [13]. Vitamin D exerts its biological activity by binding with nuclear receptor for vitamin D – VDR, which after stimulation forms a dimer with 9-cis-retinoic acid receptor – RXR (retinoid



X receptor). The complex is then translocated to the nucleus and acts as a transcriptional factor by binding to a VDR-responder element (VDRE) [14]. Now, it is well established that several co-activators or co-repressors interact with VDR-RXR complex and regulates its activity. During keratinocytes differentiation, two distinct coactivators are involved in VDR transactivation: vitamin D interacting protein (DRIP, also known as MDI1) complex and the steroid receptor coactivator (SRC) family [15] (Figure 1).



**Figure 1** Regulation of keratinocytes functions, proliferation and differentiation by calcium, VDR and its coactivators.

**Skin analog of HPA axis (sHPA).** The production of neuropeptides in the skin follows the same algorithms as the classical HPA axis (reviewed in [2, 16, 17]). The corticotropin releasing factor (CRF) is one of the key components of the HPA axis, which is responsible for stress response [18]. Activation of CRFR1 receptor by CRF results in an induction of the expression of proopiomelanocortin (POMC), which is further processed to POMC-derived peptides – adrenocorticotrophic hormone (ACTH), lipotropins ( $\beta$  and  $\gamma$ -LPH) melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ -MSH), and  $\beta$ -endorphin ( $\beta$ -END) [19]. ACTH selectively interacts with the melanocortin 2 receptor (MC2R), and thereby stimulates production and secretion of glucocorticoids – cortisol in human skin [20]. Cortisol binds to the glucocorticoid receptor (NR3C1) and counteracts the effect of the stressor. The stress response is completed through a negative feedback mechanism on HPA axis by attenuating CRF and ACTH peptide production [16, 21].

It is noteworthy, that cutaneous elements of sHPA axis exert also some pleiotropic effects on the skin. Similarly to vitamin D<sub>3</sub>, CRF production can be induced by UV radiation. What is more, CRF was shown to inhibit cell proliferation [22],

and stimulate keratinocytes cell differentiation [23]. It was also demonstrated that neuropeptides can modulate the expression of cell surface adhesion molecules [22], as well as induce production of cytokines [24].

Impairment of HPA axis expression has been observed in a number of skin disorders, associated with overproliferation of keratinocytes (eg. psoriasis) or autoimmunology (eg. atopic dermatitis). The full mechanism and impact of the dysfunction of the HPA axis on the occurrence of skin diseases is still no known. Two independent studies have demonstrated a decreased level of CRFR1 receptor at the mRNA [25] and protein [26] level in the dermis biopsies of psoriatic patients. Distinct studies demonstrated an increased CRF level in the serum, with simultaneous decrease in CRF1R gene expression in lesional skin biopsies from psoriasis and atopic dermatitis patients [27]. On the other hand, an increased CRFR1 expression was found in patients with other inflammatory skin diseases, such as contact dermatitis and chronic urticaria [28].

It seems that altered expression of CRF and CRFR1 in skin diseases may underline antiproliferative and prodifferentiation role of CRF in the skin as shown previously. In addition, vitamin D<sub>3</sub> due to a number of similar properties to CRF may be an important modulator of the expression of sHPA axis elements. It is worth emphasizing that the interaction between the elements of HPA axis and vitamin D has not been thoroughly investigated so far.

## 2. OBJECTIVES OF THE WORK

Objective 1:

Track dynamic changes in the expression of HPA axis elements along with the differentiation of epidermal cells.

Objective 2:

Investigate the effect of vitamin D<sub>3</sub> and its low calcemic analogs (20(OH)D<sub>3</sub>, 21(OH)pD) on the expression of HPA axis elements in *in vitro* keratinocyte culture.

## 3. REVIEW OF THE PUBLICATIONS

The dissertation consists of four scientific publications. Two review articles are the introduction of the topic of the role of vitamin D in the skin. The next two publications are original papers showing the effects of differentiation of keratinocytes and vitamin D on the elements of HPA axis in the skin.

The review paper "**The renaissance of vitamin D**", published in *Acta Biochimica Polonica* in 2014, discusses the history of studies on vitamin D, highlighting its role as a global regulator of homeostasis from a historical perspective, and also presents current knowledge about its importance for human physiology.

Vitamin D is probably one of the oldest hormones that exist on earth. Some of the earliest life forms have the capacity to produce vitamin D<sub>2</sub>, when exposed to the sunlight [29]. The modern history of vitamin D in human health began during Industrial Revolution, in the 17th century. In 1822, polish physician, Jędrzej Śniadecki observed that children living in the polluted, sunless centre of Warsaw or Lodz, more often suffered from rickets than compared to children living in the sunny rural areas. Thanks to these observations, he proposed an effective method of treatment of rickets by direct exposure to sunlight [30]. It was not until over 100 years later, the impact of sunlight has been associated with the production of vitamin D<sub>3</sub> in the skin. A breakthrough in studies on vitamin D, which provided a framework for future discoveries, was the isolation of vitamin [31], and D<sub>3</sub> [32, 33], respectively in 1932 and 1937. The following decades have provided detailed descriptions of the photoproduction of vitamin D, its metabolism and interaction with its receptor (VDR) [34]. In addition, large epidemiological studies have provided indirect but convincing evidence that optimal levels of vitamin D in serum have beneficial effects on our health and reduce the risk of many diseases, including cancer [35]. In recent years, advanced studies are carried out on vitamin D analogs, alternative metabolic

pathways, and the search for new intracellular targets, which may lead to the development of new tools for the prevention and treatment of many civilization diseases.

The review "**Vitamin D in the skin physiology and pathology**", published in *Acta Biochimica Polonica* in 2016, is a continuation of the above discussed publication. It presents a comprehensive overview of current knowledge concerning the impact of vitamin D and its analogs on skin physiology and pathology with potential clinical implications.

The skin acts not only as a protective layer, but also performs an important role in the transmission of stimuli, thermoregulation, synthesis and secretion of biologically active molecules. In humans, the skin is the natural source of vitamin D<sub>3</sub> [36]. Keratinocytes, like most other cells, express VDR, therefore are able to respond to the fully active form of vitamin D<sub>3</sub> – 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> [8]. Vitamin D<sub>3</sub> and VDR can affect: cell proliferation (inhibition), keratinocytes differentiation (stimulation), innate immunity (stimulation) and regulation of the hair follicle cycle [5]. All of the above mentioned properties of vitamin D significantly contribute to the inhibition of skin cancer formation.

Differentiation of keratinocytes leads to the formation of a cornified keratinocytes layer, which forms a protective barrier. Any impairment of this process can lead to severe skin disorders, including psoriasis, atopic dermatitis and skin cancer [8]. It is worth noting that skin pathologies have a huge impact on modern society, affecting not only the physical condition of patients, but also mental health, as well as their social status. This discusses the role of vitamin D in the development and course of selected skin diseases, indicating potential therapeutic targets for vitamin D. For instance, deregulation of the keratinocytes differentiation process observed in psoriasis also prevents the formation of the functional impermeable epidermal barrier. The application of 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> induces, among others, expression of involucrin and transglutaminase [37] and therefore stimulates the formation of cornified envelope. Furthermore, vitamin D inhibits expression of proinflammatory cytokines produced by T lymphocytes, such as IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-6 and IL-8, which are responsible for the exacerbation of the skin inflammation [38]. Thus, having in mind immunosuppressive, prodifferentiation and antiproliferative properties of vitamin D, its successful introduction in the therapy of psoriasis is fully justified.

The original paper "**Differentiation of Keratinocytes Modulates Skin HPA Analog**", published in the *Journal of Cellular Physiology* in 2017, presents data indicating that the process of keratinocytes differentiation is accompanied by significant changes in the expression of the elements of sHPA axis.

In the skin cells such as keratinocytes, melanocytes, fibroblasts, and mast cells, all elements of HPA, principal stress response system of the body axis, are expressed [1, 17, 39]. It has been demonstrated that the expression of sHPA in keratinocyte is regulated by UVB radiation [4], and its elements can modulate skin immune responses [2, 3, 17, 40, 41]. Thus, skin cells are not only responding to its individual components including neuropeptides and corticosteroids, but also effectively produce elements of HPA axis [21, 42]. Process of proliferation and differentiation of keratinocytes is essential for renewal of the epidermal barrier and it is tightly regulated by calcium and vitamin D<sub>3</sub> [5, 43-45]. Interestingly, keratinocytes differentiation may be also regulated by neuropeptides, including local elements of sHPA axis [2, 17, 39].

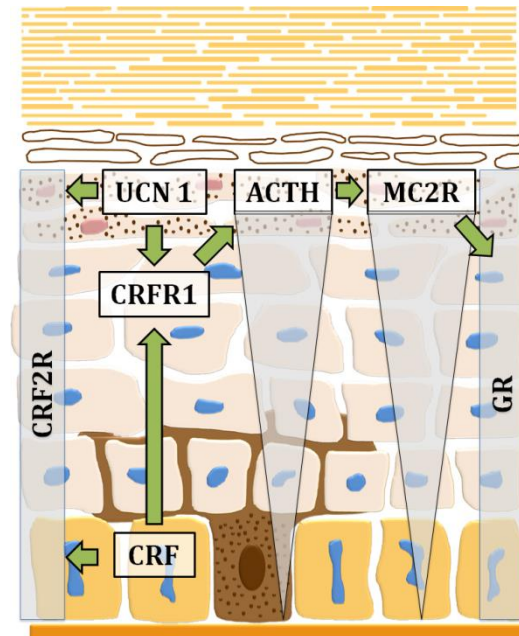
Previous studies have repeatedly demonstrated changes in the expression of the elements of HPA axes in skin diseases. In patients with psoriasis and atopic dermatitis was observed elevated level of CRF in the serum and decreased expression of CRFR1 in disease affected skin biopsies [27]. Since, there is a shortage of information on the role of keratinocytes differentiation program in regulation of the sHPA axis, in this study was investigated the expression of neuropeptides and their receptors in the epidermis and in cultured primary keratinocytes exposed to differentiation stimuli.

In conducted experiments, I used two different models of keratinocytes differentiation – prolonged keratinocytes culture (increased density of the culture caused the contact-inhibition of cell division and induction of differentiation process) and human skin biopsies, containing both epidermis and dermis. The changes in expression of sHPA elements (CRF, UCN1-3, POMC, ACTH, CRFR1, CRFR2, MC1R, MC2R and NR3C1) were observed by means of real time PCR and immunohistochemistry in full thickness skin biopsies.

The expression of *CRF* was more pronounced in the less differentiated keratinocytes, very similar pattern was observed for Urocortin 1 (*UCN1*). Additional immunohistochemical studies showed high prevalence of CRFR1 in large well differentiated keratinocytes. The *POMC* expression was upregulated in the more differentiated keratinocytes. Furthermore, the mRNA level of *MC2R* was elevated in the first days of culture, and then gradually declined. Finally, the expression of receptor for glucocorticoids (*NR3C1*) was only slightly affected by the process of differentiation. These results have been confirmed by immunohistochemistry on sections of healthy skin.

Summarizing, it is well established that elements of sHPA play important role in the skin physiology and here I am showing for the first time dynamic changes in the expression of the elements of sHPA in differentiating keratinocytes, what corresponded with unique gradient of immunoreactivities in the epidermis (Figure 1). On the basis of obtained data, it is speculated that the selective expression

of neuropeptides and their receptors contributes to the process of formation of epidermal barrier, as well as it participates in the skin stress and immune responses. Therefore, it seems that any alternations in local expression of neuropeptides and their receptors can have a significant effect on skin physiology and, consequently, lead to the development of number of dermatoses.



**Figure 2** Proposed model of localization of the elements of skin analog of HPA axis in the epidermis

In the second original work "**Bioactive forms of vitamin D selectively stimulate the skin analog of the human epidermal keratinocytes**", published in *Molecular and Cellular Endocrinology* in 2016, is described effect of vitamin D<sub>3</sub> and its analogs on growth and differentiation, but also on their ability in modulation of the expression of sHPA elements in keratinocytes.

Ultraviolet radiation B stimulates not only the expression the elements of the skin analog of HPA [4], but above all induces the production of vitamin D<sub>3</sub> in the skin. Recently, CYP11A1, one of the key enzymes in steroidogenesis, was shown to metabolize 7-dehydrocholesterol and vitamin D<sub>3</sub> providing low calcemic but biologically active analogs: 20S-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (20(OH)D<sub>3</sub>) and 21(OH)pD (reviewed in [46, 47]). Vitamin D and its analogs are known to modify expression of at least 3000 genes [14, 48], however the effect on expression of the elements of HPA axis has not been investigated. Therefore, the major aim of this study was to determine whether 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and its low calcemic analogs, 20(OH)D<sub>3</sub> and 21(OH)pD, the expression of the elements of sHPA axis.

The studies were conducted on commercially available human primary keratinocytes (HPEKp). The sensitivity of keratinocytes to vitamin D and its analogs has been tested

by proliferation assays (SRB assay). I also studied the expression of the genes involved in the metabolism of vitamin D<sub>3</sub>, selected neuropeptides and their receptors. The studies were performed both at the mRNA (Real-Time PCR) as well as protein (immunofluorescence staining, Western Blot, flow cytometry) level.

First of all, the general effects of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and its analogs on HPEKp primary keratinocytes were examined. All secosteroids significantly inhibited cell proliferation in a dose-dependent manner. However, 20(OH)D<sub>3</sub> showed higher maximal inhibition (efficiency) in comparison to 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 21(OH)pD, reducing the cell number by 60–70% vs 20%, for 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 21(OH)pD. In addition, I investigated the expression of keratinocytes differentiation marker genes and found that expression of the early differentiation marker genes, cytokeratin 14 (*KRT14*) and cytokeratin 1 (*KRT1*), was elevated in HPEKp keratinocytes treated with all secosteroids tested. Only 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 20(OH)D<sub>3</sub> treatment effectively increased the level of mRNA for the involucrin (*INV*) gene, a late differentiation marker.

I also examined changes in the expression of genes involved in vitamin D<sub>3</sub> signalling following treatment with the secosteroids. The most important observation was downregulation of *VDR* gene expression by only 21(OH)pD treatment, at the same time with no induction of *CYP24A1* encoding 24-hydroxylase involved in vitamin D catabolism. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 20(OH)D<sub>3</sub> had no effect on *VDR* gene expression, but effectively induced *CYP24A1* expression. The relative mRNA levels of remaining enzymes metabolizing vitamin D (*CYP3A4*, *CYP2R1*) were moderately stimulated by tested compounds. Interestingly, only 21(OH)pD significantly increased the expression of the 1 $\alpha$ -hydroxylase gene, *CYP27B1*. These data suggest that 21(OH)pD can activate the alternative pathway that is independent of the vitamin D receptor (VDR).

It is well known that calcium and vitamin D are powerful inducers of keratinocytes differentiation. Therefore, in the next stage of this work, I investigated the influence of the above inducers on the expression of the HPA axis elements (*CRF*, *UNC1-3*, *POMC*, *MC1R*, *MC2R* and *NR3C1*) in primary keratinocytes. I have shown that the treatment of primary keratinocytes with 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in combination with calcium (Ca<sup>+2</sup>) effectively induces expression, at least at the mRNA level, of all elements of the HPA axis. The effect of calcium alone on HPA expression was significantly weaker than the effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. The highest induction of expression was observed after 24h in cultures treated with a combination of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and Ca<sup>+2</sup>. This suggests that vitamin D<sub>3</sub> may act on the epidermal elements of the HPA through overlapping and distinct pathways to that induced by calcium.

Next, 20(OH)D<sub>3</sub> and 21(OH)pD were tested for their ability to stimulate the expression of sHPA genes in comparison to 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Both of these secosteroids stimulated the expression *CRF* similarly to 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Interestingly, the highest level of stimulation of the expression of *CRF* and urocortins (*UCN*)

was observed for 21(OH)pD. The expression of the *POMC*, *MC1R* and *MC2R* genes was stimulated similarly by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 20(OH)D<sub>3</sub> and 21(OH)pD. *MC3R* mRNA was undetectable in primary keratinocytes from the control culture, but its expression was effectively induced by all the secosteroids tested. Only 21(OH)pD moderately decreased the expression of *NR3C1*. I also tested whether the degree of differentiation of keratinocytes, monitored by the level of expression of INV, affects the stimulation of ACTH and MC2R expression by vitamin D compounds. Using flow cytometry I tested two populations of keratinocytes, INV positive (INV<sup>+</sup>, differentiated) and INV negative (INV<sup>-</sup>, undifferentiated) cells. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> treatment increased the number of positive cells for ACTH and MC2R only in INV<sup>+</sup> keratinocytes, while 21(OH)pD (moderately) and 20(OH)D<sub>3</sub> (more strongly) stimulated MC2R production in undifferentiated (INV<sup>-</sup>) keratinocytes. Furthermore, in contrast to 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> there was not a significant effect of 21(OH)pD on ACTH immunoreactivity in both INV<sup>+</sup> and INV<sup>-</sup> keratinocytes.



#### 4. SUMMARY

There is a clear but not fully understood relationship between vitamin D<sub>3</sub> and the sHPA axis. It seems that the observed changes in CRF and CRFR1 expression in skin diseases may underline the importance of CRF in inhibiting cell proliferation and inducing differentiation. **My studies, for the first time, showed that the process of keratinocytes differentiation active forms of vitamin D can stimulate the expression of elements of the skin analog of the HPA axis.** This is especially important in case of the protection of skin cells from the damaging effect of sunlight (UVB), which has also been shown to stimulate expression of the cutaneous HPA axis analog. Obtained data, in the presented work, raises some intriguing questions: Whether the stimulation of the cutaneous elements of the HPA by UVB is mediated, at least in part, by locally synthesized active form of vitamin D<sub>3</sub>? Or is it the vitamin D that is the main stimulant for sHPA expression in the skin?

Specially, it seems justified continue further studies on understanding the mechanisms of these interactions. The results of my research are the basis for explaining the pathogenesis of a number of skin diseases, where reduced vitamin D<sub>3</sub> level and deregulation of the HPA axis is observed, for example: psoriasis and atopic dermatitis. In addition, the results point new therapeutic targets based on vitamin D<sub>3</sub> and its derivatives with a low impact on the calcium homeostasis. The new proposed mechanism for the interaction between vitamin D<sub>3</sub> and sHPA confirms the appropriateness of using / supplementing vitamin D<sub>3</sub> in therapy to reduce the incidence, alleviate the symptoms and effects of skin diseases, and thereby improve the quality of life.

## WYKAZ CYTOWANEGO PIŚMIENICTWA:

- [1] Slominski A, Wortsman J. Neuroendocrinology of the skin. *Endocr Rev* 2000;21(5):457-87.
- [2] Slominski AT, Zmijewski MA, Skobowiat C, Zbytek B, Slominski RM, Steketee JD. Sensing the environment: regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2012;212:v, vii, 1-115.
- [3] Zbytek B, Slominski AT. CRH mediates inflammation induced by lipopolysaccharide in human adult epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2007;127(3):730-2.
- [4] Skobowiat C, Dowdy JC, Sayre RM, Tuckey RC, Slominski A. Cutaneous hypothalamic-pituitary-adrenal axis homolog: regulation by ultraviolet radiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;301(3):E484-93.
- [5] Bikle DD. Vitamin D metabolism and function in the skin. *Mol Cell Endocrinol* 2011;347(1-2):80-9.
- [6] Holick MF, Frommer JE, McNeill SC, Richtand NM, Henley JW, Potts JT, Jr. Photometabolism of 7-dehydrocholesterol to previtamin D<sub>3</sub> in skin. *Biochem Biophys Res Commun* 1977;76(1):107-14.
- [7] Wierzbicka J, Piotrowska A, Zmijewski MA. The renaissance of vitamin D. *Acta Biochim Pol* 2014;61(4):679-86.
- [8] Bikle DD. Vitamin D and the skin: Physiology and pathophysiology. *Rev Endocr Metab Disord* 2012;13(1):3-19.
- [9] Luderer HF, Demay MB. The vitamin D receptor, the skin and stem cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;121(1-2):314-6.
- [10] Holick MF. Vitamin D and bone health. *J Nutr* 1996;126(4 Suppl):1159s-64s.
- [11] Bikle DD, Oda Y, Xie Z. Calcium and 1,25(OH)<sub>2</sub>D: interacting drivers of epidermal differentiation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;89-90(1-5):355-60.
- [12] Bikle DD. Vitamin D regulated keratinocyte differentiation. *J Cell Biochem* 2004;92(3):436-44.
- [13] Su MJ, Bikle DD, Mancianti ML, Pillai S. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> potentiates the keratinocyte response to calcium. *J Biol Chem* 1994;269(20):14723-9.
- [14] Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>vitamin D<sub>3</sub>: genomic and non-genomic mechanisms. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011;25(4):543-59.
- [15] Oda Y, Ishikawa MH, Hawker NP, Yun QC, Bikle DD. Differential role of two VDR coactivators, DRIP205 and SRC-3, in keratinocyte proliferation and differentiation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;103(3-5):776-80.
- [16] Zmijewski MA, Slominski AT. Neuroendocrinology of the skin: An overview and selective analysis. *Dermatoendocrinol* 2011;3(1):3-10.
- [17] Slominski AT, Zmijewski MA, Zbytek B, Tobin DJ, Theoharides TC, Rivier J. Key role of CRF in the skin stress response system. *Endocr Rev* 2013;34(6):827-84.
- [18] Slominski A, Wortsman J, Pisarchik A, Zbytek B, Linton EA, Mazurkiewicz JE, et al. Cutaneous expression of corticotropin-releasing hormone (CRH), urocortin, and CRH receptors. *Faseb j* 2001;15(10):1678-93.
- [19] Schauer E, Trautinger F, Kock A, Schwarz A, Bhardwaj R, Simon M, et al. Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes. *J Clin Invest* 1994;93(5):2258-62.
- [20] Cirillo N, Prime SS. Keratinocytes synthesize and activate cortisol. *J Cell Biochem* 2011;112(6):1499-505.
- [21] Slominski AT, Zmijewski MA, Zbytek B, Tobin DJ, Theoharides TC, Rivier J. Key Role of CRF in the Skin Stress Response System. *Endocr Rev* 2013.
- [22] Quevedo ME, Slominski A, Pinto W, Wei E, Wortsman J. Pleiotropic effects of corticotropin releasing hormone on normal human skin keratinocytes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2001;37(1):50-4.
- [23] Zbytek B, Pikula M, Slominski RM, Mysliwski A, Wei E, Wortsman J, et al. Corticotropin-releasing hormone triggers differentiation in HaCaT keratinocytes. *Br J Dermatol* 2005;152(3):474-80.
- [24] Zbytek B, Mysliwski A, Slominski A, Wortsman J, Wei ET, Mysliwska J. Corticotropin-releasing hormone affects cytokine production in human HaCaT keratinocytes. *Life Sci* 2002;70(9):1013-21.
- [25] Tagen M, Stiles L, Kalogeromitros D, Gregoriou S, Kempuraj D, Makris M, et al. Skin corticotropin-releasing hormone receptor expression in psoriasis. *J Invest Dermatol* 2007;127(7):1789-91.

- [26] Zhou C, Yu X, Cai D, Liu C, Li C. Role of corticotropin-releasing hormone and receptor in the pathogenesis of psoriasis. *Med Hypotheses* 2009;73(4):513-5.
- [27] Vasiadi M, Therianou A, Sideri K, Smyrnioti M, Sismanopoulos N, Delivanis DA, et al. Increased serum CRH levels with decreased skin CRHR-1 gene expression in psoriasis and atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129(5):1410-3.
- [28] Arck PC, Slominski A, Theoharides TC, Peters EM, Paus R. Neuroimmunology of stress: skin takes center stage. *J Invest Dermatol* 2006;126(8):1697-704.
- [29] Bikle DD. Vitamin D: an ancient hormone. *Exp Dermatol* 2011;20(1):7-13.
- [30] Mozolowski W, Sniadecki J, Jerdrzej Sniadecki (1768–1838) on the cure of rickets. *Nature* 1939;14:121-4.
- [31] Askew FA, Bourdillon RB, Bruce HM, Jenkins RGC, Webster TA. The distillation of vitamin D. *Proceedings of the Royal Society B* 1931;107:76–90.
- [32] Windaus A, Bock F. Über das provitamin aus dem sterin der schweineschwarte. *Z Physiol Chem* 1937;245:168–70.
- [33] Wolf G. The discovery of vitamin D: The contribution of Adolf Windaus. *Journal of Nutrition* 2004;134(6):1299-302.
- [34] Holick MF. Evolution and function of vitamin D. *Vitamin D Analogs in Cancer Prevention and Therapy* 2003;164:3-28.
- [35] Garland CF, Garland FC, Gorham ED, Lipkin M, Newmark H, Mohr SB, et al. The role of vitamin D in cancer prevention. *Am J Public Health* 2006;96(2):252-61.
- [36] Rajakumar K, Greenspan SL, Thomas SB, Holick MF. Solar ultraviolet radiation and vitamin D: A historical perspective. *American Journal of Public Health* 2007;97(10):1746-54.
- [37] Pillai S, Bikle DD. Role of intracellular-free calcium in the cornified envelope formation of keratinocytes: differences in the mode of action of extracellular calcium and 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J Cell Physiol* 1991;146(1):94-100.
- [38] Manolagas SC, Provvedini DM, Tsoukas CD. Interactions of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and the immune system. *Mol Cell Endocrinol* 1985;43(2-3):113-22.
- [39] Paus R, Langan EA, Vidali S, Ramot Y, Andersen B. Neuroendocrinology of the hair follicle: principles and clinical perspectives. *Trends Mol Med* 2014;20(10):559-70.
- [40] Loite U, Kingo K, Reimann E, Reemann P, Vasar E, Silm H, et al. Gene expression analysis of the corticotrophin-releasing hormone-proopiomelanocortin system in psoriasis skin biopsies. *Acta Derm Venereol* 2013;93(4):400-5.
- [41] O'Kane M, Murphy EP, Kirby B. The role of corticotropin-releasing hormone in immune-mediated cutaneous inflammatory disease. *Exp Dermatol* 2006;15(3):143-53.
- [42] Slominski A, Zbytek B, Nikolakis G, Manna PR, Skobowiat C, Zmijewski M, et al. Steroidogenesis in the skin: implications for local immune functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013;137:107-23.
- [43] Eckhart L, Lippens S, Tschachler E, Declercq W. Cell death by cornification. *Biochim Biophys Acta* 2013;1833(12):3471-80.
- [44] Elias PM, Eichenfield LF, Fowler JF, Horowitz P, McLeod RP. Update on the structure and function of the skin barrier: atopic dermatitis as an exemplar of clinical implications. *Semin Cutan Med Surg* 2013;32(2 Suppl 2):S21-4.
- [45] Piotrowska A, Wierzbicka J, Zmijewski MA. Vitamin D in the skin physiology and pathology. *Acta Biochimica Polonica* 2015;in press.
- [46] Slominski AT, Kim TK, Li W, Yi AK, Postlethwaite A, Tuckey RC. The role of CYP11A1 in the production of vitamin D metabolites and their role in the regulation of epidermal functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014;144 Pt A:28-39.
- [47] Slominski A, Kim TK, Zmijewski MA, Janjetovic Z, Li W, Chen J, et al. Novel vitamin D photoproducts and their precursors in the skin. *Dermatoendocrinol* 2013;5(1):7-19.
- [48] Rid R, Wagner M, Maier CJ, Hundtberger H, Hintner H, Bauer JW, et al. Deciphering the calcitriol-induced transcriptomic response in keratinocytes: presentation of novel target genes. *J Mol Endocrinol* 2013;50(2):131-49.