

STRESZCZENIE

Skóra jako największy organ ciała jest nieustannie narażona na zagrożenia środowiskowe, m.in. urazy i stres oksydacyjny. Jednym z systemów antyoksydacyjnych skóry jest układ tioredoksyny, który chroni komórkę przed stresem oksydacyjnym, reguluje migrację, proliferację i apoptozę komórek, a także uczestniczy w transmisji sygnału poprzez regulację aktywności czynników transkrypcyjnych. Badania ostatnich lat wskazały korelację pomiędzy naskórkowym czynnikiem transkrypcyjnym Foxn1 a układem tioredoksyny w skórze myszy. Analiza wyników spektrometrii mas, a następnie eksperymenty *in vitro* i *in vivo*, wykazały, że Foxn1 w keratynocytach, szczególnie w warunkach hipoksji, reguluje elementy łańcucha transportu elektronów, a także układ tioredoksyny (Txn2, Txnrd3). Po raz pierwszy zaobserwowano wysokie poziomy mRNA *Txnrd3* w pourazowej skórze myszy Foxn1^{+/+} w porównaniu do myszy Foxn1^{-/-}, a także wykazano, iż Foxn1 w keratynocytach zwiększa poziomy białka Txnrd3. Ponadto, analizy *in silico* wskazały możliwe miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego Foxn1 w układzie Txn. Podsumowując, zaprezentowane w niniejszym przeglądzie dane identyfikują Foxn1 jako nowy składnik systemu antyoksydacyjnego skóry.

SKÓRA: BUDOWA I FUNKCJE

Skóra jako najbardziej zewnętrzna powłoka ciała stanowi barierę ochronną organizmu przed czynnikami zewnętrznymi, m.in. infekcjami, utratą ciepła oraz przegrzaniem, promieniowaniem ultrafioletowym i urazami mechanicznymi [1-3]. Ponadto, jako narząd neuro-immuno-endokrynnny skóra zapewnia utrzymanie homeostazy, a także stanowi organ komunikacji pomiędzy ustrojem a otoczeniem zewnętrznym [4].

Skóra ssaków zbudowana jest z trzech głównych warstw: naskórka, skóry właściwej oraz podskórnej tkanki tłuszczowej (Ryc. 1) [5]. Najbardziej zewnętrzną warstwę skóry stanowi naskórek, który utworzony jest przez nabłonek wielowarstwowy płaski rogowaciejący. Jego główną masę komórkową stanowią keratynocyty, a także: melanocyty (komórki pigmentowe), komórki Merkla (receptory dotyku) oraz komórki Langerhansa (komórki dendrytyczne) [6]. Obecne w warstwie podstawnej naskórka komórki macierzyste i progenitorowe, będące prekursorami dojrzałych keratynocytów warunkują ciągłą jego odnowę i wymianę. Nowopowstające keratynocyty opuszczają warstwę podstawną i rozpoczynają wędrówkę w kierunku zewnętrznej powierzchni skóry, ulegając procesowi stopniowego różnicowania. W zależności od stopnia zróżnicowania, keratynocyty w naskórku układają się w kilka warstw: (1) warstwę podstawną (bazałną), (2) warstwę kolczystą, (3) warstwę ziarnistą, (4) warstwę jasną oraz (5) warstwę rogową (najbardziej zewnętrzną) (Ryc. 1), po czym obumierają, ulegają keratynizacji i złuszczeniu [7,8].

Środkową warstwę skóry stanowi skóra właściwa, która oddzielona jest od naskórka błoną podstawną. Głównym komponentem komórkowym skóry właściwej są fibroblasty, komórki tłuszczowe – adipocyty oraz komórki układu immunologicznego. Fibroblasty, jako najliczniejsze komórki skóry właściwej produkują i wydzielają komponenty macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*), m.in. kolagen, elastynę, proteoglikany, glikozaminoglikany oraz fibronektynę [9]. W obrębie skóry właściwej można wyodrębnić: warstwę brodawkowatą, warstwę siateczkowatą, a także warstwę śródskórnych komórek tłuszczowych (dWAT, ang. *dermal white adipose tissue*) (Ryc. 1). Warstwa brodawkowata zbudowana jest z tkanki włóknistej utworzonej przez włókna kolagenowe (głównie typu I i III), elastynowe i retikulinowe. Natomiast poniżej położona warstwa siateczkowata zbudowana jest z tkanki łącznej zbitnej, o znacznie grubszym utkaniu włókien kolagenowych, zapewniając skórze rozciągliwość i odporność na urazy [9]. Trzeci, poniżej usytuowany komponent skóry właściwej tworzą śródskórne komórki tłuszczowe (dWAT), które zaangażowane są m.in.

dr Sylwia Machcińska-Zielińska,

prof. dr hab. n. med. Barbara Gawrońska-Kozak ✉

Zespół Biologii Regeneracyjnej, Zakład Biologicznych Funkcji Żywności, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

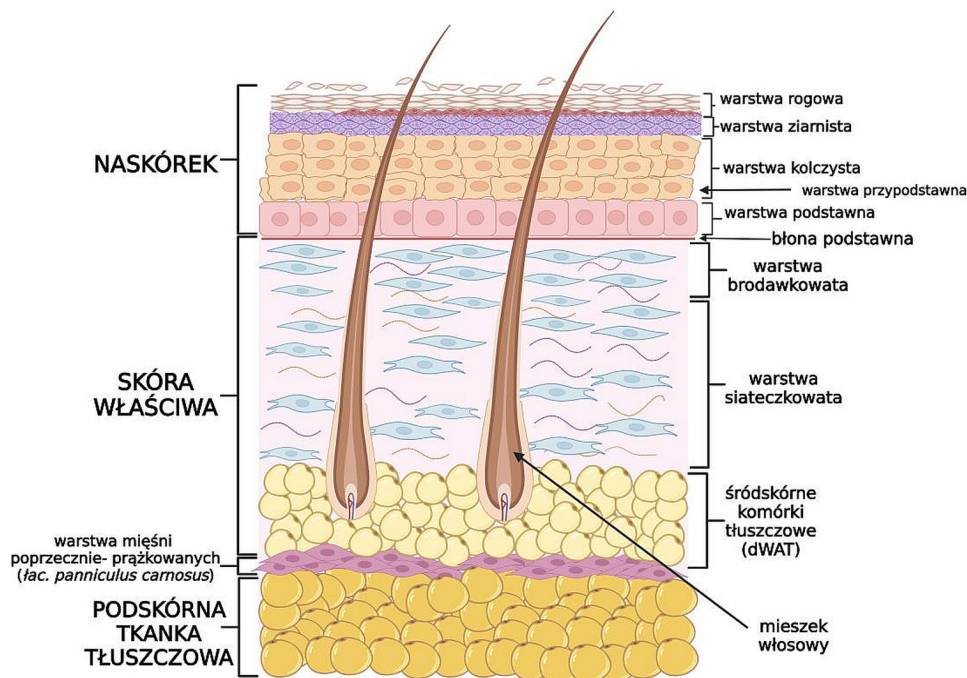
https://doi.org/10.18388/pb.2021_503

✉ autor korespondujący: b.kozak@pan.olsztyn.pl
<https://pan.olsztyn.pl/regenerative-biology-team>

Słowa kluczowe: skóra, Foxn1, hipoksja, Hif-1 α , układ tioredoksyny, antyoksydacja

Wykaz stosowanych skrótów: Ad-Foxn1 (ang. *adenovirus expressing Foxn1-eGFP*) – adenowirus ekspresyjny Foxn1-eGFP; Ad-GFP (ang. *adenovirus expressing GFP*) – adenowirus ekspresyjny GFP; Hif-1a (ang. *hypoxia inducible factor-1a*) – czynnik indukowany hipoksją 1 α ; Hif-1 (ang. *factor-inhibiting hypoxia-inducible factor 1a*) – czynnik hamujący Hif-1 α ; Ep300/p300/CBP (ang. *histone acetyltransferase p300*) – acetylotransferaza histonowa p300; FOXN1 (ang. *forkhead box N1*) – czynnik transkrypcyjny Forkhead Box N1; Glx5 (ang. *glutaredoxin 5*) – glutaredoksyna 5; RFT (ang. *ROS-reactive oxygen species*) – reaktywne formy tlenu; Srxn1 (ang. *sulfiredoxin*) – sulfiredoksyna-1; Txn (ang. *thioredoxin*) – tioredoksyna; Txnrd (ang. *thioredoxin reductase*) – reduktazy tioredoksyny

Podziękowania: Praca powstała podczas realizacji projektu badawczego OPUS 14 (2017/27/B/NZ5/02610) finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Ryciny wykonano przy użyciu programu Bio-Render.com.



Rycina 1. Budowa skóry myszy. Opracowanie własne wykonane w programie Biorender, zmodyfikowane na podstawie kompendium histologii [9].

w procesy gojenia urazów, cykliczną regenerację włosów oraz termoregulację [10,11].

Najgłębszą warstwę skóry stanowi tkanka podskórna zbudowana z tkanki łącznej właściwej luźnej oraz tkanki tłuszczowej [9].

CZYNNIK TRANSKRYPCYJNY FOXN1 W SKÓRZE

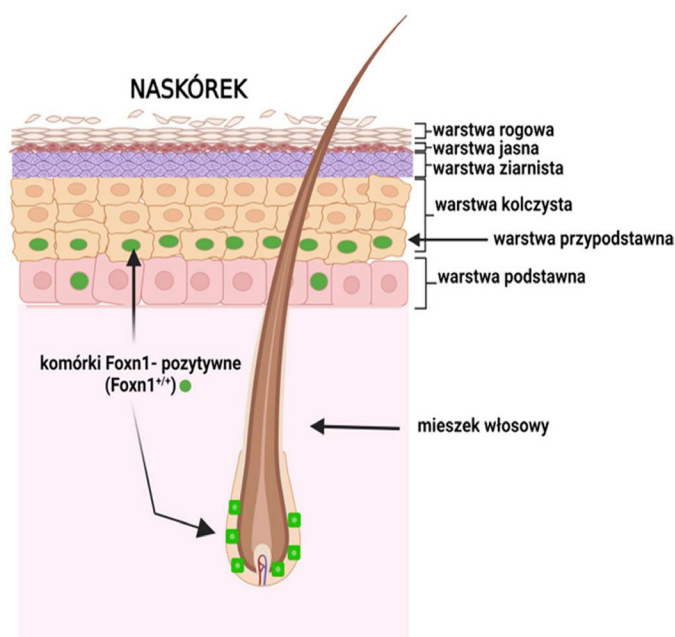
Czynniki transkrypcyjne stanowią grupę niezwykle istotnych regulatorów procesów zachodzących w skórze, m.in. procesu gojenia urazów skórnych. Do najlepiej poznanych należą: kompleks białkowy – AP-1, receptory aktywowane proliferatorami peroksydomów – Ppar β/δ , geny homeotyczne – HoxA3 i HoxD3, grupa mediatorów – Smad2, Tcf/Lef (szlak sygnałowy Wnt/ β -katenina), czynniki należące do rodziny Foxo1 i 3 oraz Ovol1 i 2 [13-18].

Czynnik transkrypcyjny Foxn1 (ang. *forkhead box N1*) z rodziny *Forkhead/winged helix* [19] ulega ekspresji w nabłonku dwóch organów: skóry i grasicy. W skórze Foxn1 występuje w pierwszej warstwie keratynocytów tworzących warstwę kolczystą (warstwa przypadawna), w pojedynczych komórkach warstwy podstawnej oraz w mieszkach włosowych (Ryc. 2) [20-22].

W skórze niezranionej Foxn1: (1) reguluje równowagę między proliferacją a różnicowaniem się keratynocytów [20,21], (2) stymuluje proliferację poprzez kontakt komórka-komórka i sekrecję parakrynną [20,21], (3) bierze udział w procesach pigmentacji skóry i włosów [23] a także (4) w rozwoju mieszków włosowych [20,23].

Inaktywująca mutacja w obrębie genu Foxn1 (Foxn1^{-/-}) zarówno u ludzi jak i myszy ma działanie plejotropowe i prowadzi do powstania tzw. fenotypu nagiego (ang. *nude*),

charakteryzującego się zaburzeniami: keratynizacji, rozwoju mieszków włosowych oraz rozwoju grasicy i związanym z tym niedoborem limfocytów typu T [24-26]. Jak dotąd zidentyfikowano jedynie kilka przypadków fenotypu Foxn1^{-/-} u ludzi [26,27]. Natomiast, badania prowadzone na modelu mysim wykazały, iż myszy pozbawione czynnika Foxn1 (Foxn1^{-/-}) oprócz cech charakterystycznych dla tego fenotypu posiadają również niezwykle zdolność do regeneracji owalnych wycięć w małżowinie usznej z następującą regeneracją chrząstki [28] oraz do gojenia bezbliznowego



Rycina 2. Ekspresja czynnika transkrypcyjnego Foxn1 w skórze. Opracowanie własne wykonane w programie Biorender, zmodyfikowane na podstawie [20-22].

urazów skóry [28-31]. Co niezwykle istotne brak aktywności czynnika Foxn1 jest cechą wspólną przedstawicieli ssaków wykazujących zdolność do gojenia regeneracyjnego (bezbliźnowego): płody ssacze (dwa pierwsze trymestry ciąży) oraz myszy Foxn1^{-/-} a utrata zdolności do regeneracji urazów skóry w życiu płodowym zbiega się z czasem, w którym uaktywnia się czynnik transkrypcyjny Foxn1 [32].

Badania ostatnich lat wykazały, że Foxn1 bierze udział w procesie bliźnowego gojenia urazów skóry [22,33]. Doświadczenia zostały przeprowadzone na modelu myszy transgenicznych (Foxn1::eGFP) u których transgen eGFP (ang. *enhanced Green Fluorescent Protein*; wzmocnione białko zielonej fluorescencji) znajduje się pod kontrolą sekwencji regulatorowej Foxn1 i umożliwia śledzenie ekspresji czynnika Foxn1 poprzez ekspresję GFP w skórze. Analiza skrawków pourazowej skóry myszy Foxn1::eGFP wykazała, że w procesie gojenia urazów skórnych Foxn1 uczestniczy w: odbudowie naskórka aktywując keratynę 6 i 16 (markery proliferacji i migracji keratynocytów) a także w przejściu nabłonkowo-mezenchymalnym (EMT, ang. *Epithelial-Mesenchymal Transition*) [22,33].

FOXN1 JAKO REGULATOR HOMEOSTAZY TLENOWEJ SKÓRY

Tlen jest pierwiastkiem niezbędnym do życia, bierze udział w wielu kluczowych procesach biochemicznych, m.in. w wytwarzaniu energii poprzez mitochondria, tworzeniu naczyń krwionośnych czy naprawie uszkodzonych tkanek [34]. Dopływ tlenu do skóry odbywa się poprzez naczynia krwionośne obecne w skórze właściwej i w tkance podskórnej a także poprzez bezpośredni kontakt naskórka z powietrzem atmosferycznym [35].

Jednym z głównych regulatorów homeostazy tlenowej jest indukowany hipoksją czynnik Hif-1 α (ang. *hypoxia inducible factor-1 α*) [36]. W tkankach, w warunkach dostępności tlenu (normoksja), Hif-1 α ulega szybkiej degradacji w procesie potranslacyjnym w reakcji katalizowanej przez hydrolazę prolilową (PHD, ang. *prolyl hydroxylase*) i czynnik hamujący Hif-1 α (Fih-1, ang. *factor-inhibiting hypoxia-inducible factor 1 α*) w sposób zależny od tlenu. Natomiast obniżona dostępność tlenu (hipoksja) blokuje degradację Hif-1 α (spowodowaną niedoborem PHD i Fih-1) prowadząc do jego akumulacji i heterodimeryzacji z podjednostką β , a następnie przyłączenia Ep300, koaktywatora czynnika Hif-1 α [37]. Taki kompleks wiąże się do specyficznej sekwencji DNA – HRE (ang. *hypoxia response element*), powodując aktywację transkrypcji genów regulowanych hipoksją, m.in. czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (Vegf, ang. *vascular endothelial growth factor*), płytkowego czynnika wzrostu B (Pdgf-b, ang. *platelet derived growth factor-B*) oraz białka szoku cieplnego 90 (Hsp-90, ang. *heat shock protein 90*) [38,39].

Jako główny regulator homeostazy tlenowej, Hif-1 α w skórze bierze udział we wszystkich stadiach gojenia urazów skóry: migracji i proliferacji keratynocytów i fibroblastów, uwalnianiu cytokin oraz syntezie elementów macierzy zewnątrzkomórkowej [40]. Liczne doniesienia wykazały, iż niedobór Hif-1 α prowadzi do chronicznej hipoksji, a w konsekwencji do niegojących się ran. Natomiast, zbyt wysoka

ekspresja Hif-1 α przyczynia się do tworzenia bliźnowców (bliźn przerostowych) [40]. Dane te wskazują, że zmienne poziomy ekspresji Hif-1 α wywołane zróżnicowaną dostępnością tlenu (normoksja/hipoksja) determinują proces gojenia urazów skórnych.

Przeprowadzona przez Zespół Biologii Regeneracyjnej analiza porównawcza ekspresji genów pomiędzy myszami Foxn1^{+/+} a Foxn1^{-/-} wykazała znaczące różnice w ekspresji genów związanych z hipoksją (m.in. Hif-1 α) [41], wskazując na obecność potencjalnych możliwości współdziałania pomiędzy czynnikiem Foxn1 a regulatorem homeostazy tlenowej – czynnikiem Hif-1 α . W kolejnym etapie badań prześledzono ekspresję mRNA oraz poziomy białek czynników indukowanych hipoksją tj. Hif-1 α , Fih-1, Arnt-2, Ep300 w skórze pourazowej myszy Foxn1^{+/+} i Foxn1^{-/-} [42,43]. Zraniona skóra myszy Foxn1^{+/+} wykazała wzrost ekspresji mRNA *Hif-1 α* przy jednoczesnym spadku *Fih-1* w tkance pourazowej [42,43]. Natomiast skóra myszy Foxn1^{-/-} charakteryzowała się stabilną i niezmienną pod wpływem urazu ekspresją kluczowych czynników regulowanych warunkami obniżonej dostępności tlenowej (*Hif-1 α* , *Fih-1*, *Ep300*).

Ponadto przeprowadzone badania wykazały w skórze myszy Foxn1^{+/+} wysokie poziomy białka Txn1 (ang. *thioredoxin 1*) zaangażowanego w ochronę komórki przed stresem oksydacyjnym, a także odpowiedzialnego za stabilizację poziomu białka Hif-1 α [42]. Biorąc pod uwagę fakt, że białka układu Txn należą do najsilniejszych oksydoreduktorów/antyoksydantów organizmu to potencjalny udział czynnika Foxn1 w koordynacji procesów systemu redoks w obrębie naskórka stał się nadrzędnym kierunkiem badań.

FOXN1 W REGULACJI OBRONY ANTYOKSYDACYJNEJ SKÓRY

Skóra, stanowiąc barierę ochronną organizmu, narażona jest na negatywne działanie wolnych rodników, powstających zarówno w trakcie procesów metabolicznych [44] jak i pod wpływem środowiska zewnętrznego [45]. Skutecznie działające mechanizmy antyoksydacyjne skóry pozwalają na usuwanie reaktywnych form tlenu – RFT (ROS, ang. *Reactive Oxygen Species*), a tym samym na utrzymanie równowagi oksydacyjnej [46]. Jednym z ważniejszych układów antyoksydacyjnych chroniących skórę przed negatywnym działaniem stresu oksydacyjnego i utrzymujących równowagę redoks jest układ zależny od tioredoksyny. Układ tioredoksyny stanowi grupę białek enzymatycznych: tioredoksyny (Txns, ang. *thioredoxins*), reduktazy tioredoksynowe (Txnrds, ang. *thioredoxin reductases*) oraz fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADP, ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) [47,48]. Prawdopodobnie działający układ tioredoksyny nie tylko chroni komórkę przed stresem oksydacyjnym, ale też reguluje migrację, proliferację i apoptozę komórek, uczestnicząc w transmisji sygnału poprzez regulację aktywności czynników transkrypcyjnych [49,50].

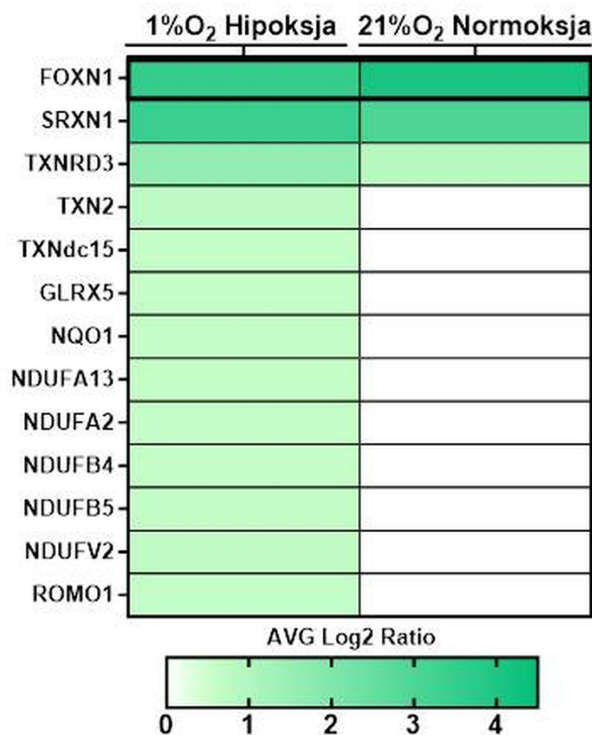
Do tej pory zidentyfikowano i opisano w komórkach ssaków dwie izoformy Txns: cytozoolową Txn1 (12 kDa) i mitochondrialną Txn2 (15,5 kDa) oraz ich reduktazy – Txnr1 i Txnr2 [48,51]. Dokładna funkcja i lokalizacja trzeciej izo-

formy reduktazy tioredoksyny (Txnrd3) jak dotąd nie została zbadana [52-53].

W celu wyjaśnienia potencjalnego udziału Foxn1 w obronie antyoksydacyjnej naskórka, przeprowadzono szczegółową analizę proteomiczną (LC-MS-MS; chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas) keratynocytów transdukowanych Ad-Foxn1 (wektor adenowirusowy z insertem Foxn1) w porównaniu do keratynocytów kontrolnych (transdukowanych Ad-GFP), a następnie hodowanych w warunkach hipoksji lub normoksji. Spośród grupy białek stymulowanych Ad-Foxn1 w warunkach hipoksji wykazano wzrost 411, a spadek 156 białek, natomiast w warunkach normoksji wzrost wykazało 371, a spadek 169 białek [43]. Aby przyporządkować zidentyfikowane białka do pełnionej funkcji dokonano ich charakterystyki funkcjonalnej. W kategorii funkcji molekularnych wprowadzenie Foxn1 do keratynocytów spowodowało zmiany w poziomach białek pełniących rolę katalityczną do których należą białka systemu redoks tj. układ tioredoksyny i glutationu [43]. Utworzona mapa interakcji białkowych, wyodrębniła oddziałujące ze sobą: (i) białka należące do grupy oksydoreduktaz, oraz (ii) grupę białek funkcjonalnych zaangażowanych w procesy migracji i proliferacji oraz angiogenezy [43].

Przeprowadzone analizy pozwoliły na wykazanie wcześniej nierozpoznanej funkcji Foxn1 jako elementu regulującego ochronę antyoksydacyjną skóry. W grupie oksydoreduktaz większość białek indukowanych Foxn1 została zidentyfikowana w warunkach hipoksji w porównaniu do normoksji, wśród których wyróżniono: (i) białka zaangażowane w aktywność łańcucha transportu elektronów (Ndufa13, Ndufb5, Ndufb4, Ndufa2, Ndufb1, Ndufv2, Romo1), (ii) białka układu tioredoksyny (Txns) i ich reduktazy (Txnrds), a także (iii) białka detoksykacyjne, m.in Glrx5 (ang. *Glutaredoxin 5*) i Srxn1 (ang. *Sulfiredoxin 1*) [43], wspólnie tworzące spójny system obrony antyoksydacyjnej keratynocytów [47-50] (Ryc. 3). Dokładna analiza profili białkowych keratynocytów stymulowanych Foxn1 wykazała silny wzrost poziomów Txn2 i Txnrd3, szczególnie w warunkach hipoksji (Ryc. 3).

Dane literaturowe wskazują, że Txn2 odgrywa ważną rolę w regulacji potencjału błonowego mitochondriów oraz w ochronie przed apoptozą [54]. Natomiast Txnrd3 działa nie tylko jako reduktor układu Txn, ale także pełni rolę utleniacza glutationu, uznanego jako klucz do długowieczności. Jak dotąd obecność Txnrd3 wykazano w narządach płciowych (jądra, jajniki) [52,54] oraz śledzionie, nerkach, sercu



Rycina 3. Mapa cieplna ukazująca poziomy białek ekstrahowanych z keratynocytów transdukowanych Ad-Foxn1 (adenowirus ekspresyjny czynnik transkrypcyjny Foxn1) i hodowanych w warunkach hipoksji lub normoksji. Białka zostały wybrane na podstawie analizy ontologii genów (PANTHER, wzbogaconych o g:Profiler). Pasek skali na mapie cieplnej wskazuje zmiany krotności białka w zakresie od 0 do +4. Opracowanie własne, zmodyfikowane na podstawie [43].

i wątrobie [54]. Przeprowadzone analizy proteomiczne wykazały po raz pierwszy obecność białka Txnrd3 w keratynocytach, gdzie wzrost jego poziomów był stymulowany Ad-Foxn1 szczególnie w warunkach hipoksji (Ryc. 3). Istotnym jest również fakt, że dotychczas Txnrd3 wykryto jedynie w komórkach ludzkich, psich i szympanich, a przeprowadzone analizy są pierwszymi identyfikującymi obecność aktywnej formy Txnrd3 w komórkach mysich [52,54]. Białka biorące udział w obronie antyoksydacyjnej ekstrahowane z keratynocytów transdukowanych Ad-Foxn1 zestawiono w Tabeli 1.

W celu weryfikacji danych proteomicznych przeprowadzono analizę ekspresji mRNA tioredoksyn na dwóch niezależnych modelach eksperymentalnych *in vitro*: (i) kera-

Tabela 1. Białka biorące udział w obronie antyoksydacyjnej ekstrahowane z keratynocytów transdukowanych Ad-Foxn1.

Białko	Pełna nazwa	Pełniona funkcja w organizmie
SRXN1	sulfiredoksyna 1 (ang. sulfiredoxin 1)	biomarker prognostyczny raka wątrobowokomórkowego [56] i prostaty [57]
TXNRD3	reduktaza tioredoksyny 3 (ang. thioredoxin reductase 3)	silny antyoksydant [52, 54] reduktor układu Txn, a zarazem utleniacz glutationu – klucz do długowieczności [52, 54]
TXN2	tioredoksyna 2 (ang. thioredoxin 2)	regulacja potencjału błony mitochondrialnej [54] ochrona przed apoptozą [54]
TXNdc15	(ang. thioredoxin domain-containing protein 15)	pozytywny regulator sygnalizacji rzęsek [58]
GLRX5	glutaredoksyna 5 (ang. glutaredoxin 5)	homeostaza żelaza w mitochondriach I komórce [59] synteza hemu [59] regulacja syntezy hemoglobiny [60]

Ochrona przed stresem oksydacyjnym

tylocytach izolowanych ze skóry myszy *Foxn1^{+/+}*, oraz (ii) izolowanych ze skóry myszy *Foxn1^{-/-}*, które następnie były transdukowane: Ad-Foxn1 lub Ad-GFP i hodowane w warunkach hipoksji lub normoksji [43].

Najbardziej spektakularne wyniki uzyskano w analizie ekspresji *Txnrd3*. Wprowadzony do keratynocytów na drodze transdukcji czynnik Foxn1 (Ad-Foxn1) spowodował znaczny wzrost ekspresji *Txnrd3* niezależnie od pochodzenia keratynocytów (myszy: *Foxn1^{+/+}* lub *Foxn1^{-/-}*). Odnotowano również istotny wzrost ekspresji mRNA mitochondrialnej *Txn2* w keratynocytach *Foxn1^{+/+}* transdukowanych Ad-Foxn1 i hodowanych w warunkach hipoksji w porównaniu z keratynocytami nietransdukowanymi [43].

Wykazany w badaniach *in vitro* regulacyjny wpływ Foxn1 na układ Txn został zweryfikowany w badaniach *in vivo*. W doświadczeniach wykorzystano próbki skóry niezranionej i pourazowej pochodzącej od myszy z aktywnym (*Foxn1^{+/+}*) i nieaktywnym (*Foxn1^{-/-}*) czynnikiem Foxn1 [42,43]. Analiza transkryptu *Txnrd3* w skórze niezranionej oraz pourazowej (dni 3, 5, 21) wykazała istotnie wyższe poziomy ekspresji w skórze myszy *Foxn1^{+/+}* w porównaniu do myszy *Foxn1^{-/-}*, potwierdzając wyniki uzyskane w badaniach *in vitro* [43]. Wyższe poziomy białka cytoplazmatycznej Txn1 zaobserwowano również w skórze myszy *Foxn1^{+/+}* w porównaniu do myszy *Foxn1^{-/-}*. Immunohistochemiczna detekcja ujawniła obecność Txn1 w naskórku i mieszkach włosowych w skórze niezranionej, z widocznym silniejszym produktem reakcji w skórze myszy *Foxn1^{+/+}* w porównaniu do *Foxn1^{-/-}*. Zranienie wywołało wzrost poziomów białka Txn1 w naskórku przylegającym do brzegu miejsca pourazowego, a także w nowo powstałym naskórku pokrywającym ranę [42]. Biorąc pod uwagę, że zarówno czynnik transkrypcyjny Foxn1 jak i Txn1 wykryto w naskórku oraz w mieszkach włosowych to kolejnego dowodu wskazującego na bezpośredni udział Foxn1 w regulacji systemu Txn dostarczyła immunofluorescencyjna analiza współwystępowania (kolokalizacji) Txn1 i Foxn1. Obrazowanie konfokalne wykazało, że Txn1 i Foxn1 współwystępują w warstwie przypadkowej i warstwie różnicujących się keratynocytów [42]. Ponadto wyższe poziomy ekspresji transkryptu *Txnrd1* zaobserwowano w skórze myszy *Foxn1^{+/+}* w dniach 3–21 po urazie w porównaniu do myszy *Foxn1^{+/+}*. Natomiast poziomy ekspresji mRNA *Txn2* i *Txnrd2* były podobne u obu szczepów myszy. Analizy *in silico* wskazały miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego Foxn1 w układzie tioredoksyn (Txn1, *Txnrd1*, Txn2, *Txnrd2* i *Txnrd3*) potwierdzając tym samym możliwe bezpośrednie współdziałanie Foxn1 z oksydoredukcyjnym systemem Txn w naskórku [43].

Przedstawione wyniki są pierwszymi, które wskazały na udział Foxn1 w indukcji systemu obrony antyoksydacyjnej poprzez aktywację układu tioredoksyny w skórze, a także identyfikują Foxn1 jako główny regulator reduktazy tioredoksyny 3 (*Txnrd3*) w procesie gojenia urazów skóry. Ponadto, dane wskazały na możliwy mechanizm molekularny, w którym Foxn1 wraz z hipoksją uczestniczą w aktywacji obrony antyoksydacyjnej keratynocytów.

PODSUMOWANIE

Czynnik transkrypcyjny Foxn1 został po raz pierwszy zidentyfikowany jako regulator obrony antyoksydacyjnej skóry. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały zaangażowanie Foxn1 w modulację układu tioredoksyn (Txn), szczególnie w stymulacji reduktazy tioredoksyny 3 (*Txnrd3*), uczestniczącej w regulacji potencjału oksydoredukcyjnego zarówno w skórze niezranionej, jak i podczas gojenia urazów. Biorąc pod uwagę, że większość przeciwutleniaczy wykazuje wyższe stężenie w naskórku niż w skórze właściwej, to aktualne dane identyfikują naskórkowy czynnik Foxn1 jako nowy składnik systemu antyoksydacyjnego skóry.

PIŚMIENNICTWO

1. Ibrahim AE, Bagherani N, Smoller BR, Reyes-Baron C, Bagherani N (2021) Functions of the Skin. W: Smoller B, Bagherani N (red) Atlas of Dermatology, Dermatopathology and Venereology. Springer, Cham
2. Piipponen M, Li D, Landén NX (2020) The Immune Functions of Keratinocytes in Skin Wound Healing. Int J Mol Sci 21(22): 8790
3. Romanovsky AA (2014) Skin temperature: its role in thermoregulation. Acta Physiol (Oxf) 210(3): 498-507
4. Słominski AT, Manna PR, Tuckey RC (2015) On the role of skin in the regulation of local and systemic steroidogenic activities. Steroids 103: 72-88
5. Cooper S (2002) The Biology of the Skin. J R Soc Med 95(2): 109
6. Leigh IM, Lane B, Watt FM (1994) The keratinocyte handbook, Cambridge University
7. Czarnecka-Operacz M (2006) Dry skin as an up-to-date clinical problem. Post Dermatol Alergol XXIII 2: 49-56
8. McAnulty RJ (2007) Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. Int J Biochem Cell Biol 39(4): 666-71
9. Cichocki T, Litwin J, Mirecka J (2009) Kompendium histologii wyd.4, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków
10. Wojciechowicz K, Gledhill K, Ambler CA, Manning CB, Jahoda CA (2013) Development of the mouse dermal adipose layer occurs independently of subcutaneous adipose tissue and is marked by restricted early expression of FABP4. PLoS One 8(3): e59811
11. Walendzik K, Kopcewicz M, Bukowska J, Panasiewicz G, Szafranska B, Gawronska-Kozak B (2020) The Transcription Factor FOXN1 Regulates Skin Adipogenesis and Affects Susceptibility to Diet-Induced Obesity. J Invest Dermatol 140(6): 1166-1175.e9
12. Bochenek A, Reicher M, Anatomia człowieka (2018) Tom V. Układ nerwowy obwodowy, Układ nerwowy autonomiczny, Powłoka wspólna, Narządy zmysłów, wyd. VI, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa
13. Teng A, Nair M, Wells J, Segre JA, Dai X (2007) Strain-dependent perinatal lethality of *Ovol1*-deficient mice and identification of *Ovol2* as a downstream target of *Ovol1* in skin epidermis. Biochim Biophys Acta 1772: 89-95
14. Schafer M, Werner S (2007) Transcriptional control of wound repair. Annu Rev Cell Dev Biol 23: 69-92
15. Bellavia G, Fasanaro P, Melchionna R, Capogrossi MC, Napolitano M (2014) Transcriptional control of skin reepithelialization. J Dermatol Sci 73: 3-9
16. Lee B, Villarreal-Ponce A, Fallahi M, Ovadia J, Sun P, Yu Q.C, Ito S, Sinha S, Nie Q, Dai X (2014) Transcriptional mechanisms link epithelial plasticity to adhesion and differentiation of epidermal progenitor cells. Dev Cell 29: 47-58
17. Mori R, Tanaka K, de Kerckhove M, Okamoto M, Kashiyama K, Kim S, Kawata T, Komatsu T, Park S, Ikematsu K, Hirano A, Martin P, Shimokawa I (2014) Reduced FOXO1 expression accelerates skin wound healing and attenuates scarring. Am J Pathol 184: 2465-2479
18. Donati G, Proserpio V, Lichtenberger BM, Natsuga K, Sinclair R, Fujiwara H, Watt FM (2014) Epidermal Wnt/beta-catenin signaling regu-

- lates adipocyte differentiation via secretion of adipogenic factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: E1501-E1509
19. Nehls M, Pfeifer D, Schorpp M, Hedrich H, Boehm T (1994) New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. *Nature* 372(6501): 103-107
 20. Lee D, Prowse DM, Brissette JL (1999) Association between mouse nude gene expression and the initiation of epithelial terminal differentiation. *Dev Biol* 208(2): 362-74
 21. Prowse DM, Lee D, Weiner L, Jiang N, Magro CM, Baden HP, Brissette JL (1999) Ectopic expression of the nude gene induces hyperproliferation and defects in differentiation: implications for the self-renewal of cutaneous epithelia. *Dev Biol* 212(1): 54-67
 22. Gawronska-Kozak B, Grabowska A, Kur-Piotrowska A, Kopcewicz M (2016) Foxn1 transcription factor regulates wound healing of skin through promoting epithelial-mesenchymal transition. *PLoS ONE* 11(3): e0150635
 23. Weiner L, Han R, Scicchitano BM, Li J, Hasegawa K, Grossi M, Lee D, Brissette JL (2007) Dedicated epithelial recipient cells determine pigmentation patterns. *Cell* 130(5): 932-42
 24. Frank J, Pignata C, Panteleyev AA, Prowse DM, Baden H, Weiner L, Gaetaniello L, Ahmad W, Pozzi N, Cserhalmi-Friedman PB, Aita VM, Uyttendaele H, Gordon D, Ott J, Brissette JL, Christiano AM (1999) Exposing the human nude phenotype. *Nature* 398(6727): 473-474
 25. Brissette JL, Li J, Kamimura J, Lee D, Dotto GP (1996) The product of the mouse nude locus, Whn, regulates the balance between epithelial cell growth and differentiation. *Genes Dev* 10(17): 2212-2221
 26. Pignata C, Fiore M, Guzzetta V, Castaldo A, Sebastio G, Porta F, Guarino A. (1996) Congenital Alopecia and nail dystrophy associated with severe functional T-cell immunodeficiency in two sibs. *Am J Med Genet* 65(2): 167-170
 27. Giardino G, Sharapova SO, Ciznar P, Dhalla F, Maragliano L, Radha Rama Devi A, Islamoglu C, Ikinciogullari A, Haskologlu S, Dogu F, Hanna-Wakim R, Dbaibo G, Chou J, Cirillo E, Borzacchiello C, Kreins AY, Worth A, Rota IA, Marques JG, Sayitoglu M, Firtina S, Mahdi M, Geha R, Neven B, Sousa AE, Benfenati F, Hollander GA, Davies EG, Pignata C (2021) Expanding the Nude SCID/CID Phenotype Associated with FOXN1 Homozygous, Compound Heterozygous, or Heterozygous Mutations. *J Clin Immunol* 41(4): 756-768
 28. Gawronska-Kozak B (2004) Regeneration in the ears of immunodeficient mice: identification and lineage analysis of mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 10: 1251-1265
 29. Manuel JA, Gawronska-Kozak B (2006) Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) is upregulated during scarless wound healing in athymic nude mice. *Matrix Biol* 25(8): 505-14
 30. Gawronska-Kozak B, Bogacki M, Rim JS, Monroe WT, Manuel JA (2006) Scarless skin repair in immunodeficient mice. *Wound Repair Regen* 14: 265-276
 31. Gawronska-Kozak B (2011) Scarless skin wound healing in FOXN1 deficient (nude) mice is associated with distinctive matrix metalloproteinase expression. *Matrix Biol* 30(4): 290-300
 32. Bukowska J, Kopcewicz M, Walendzik K, Gawronska-Kozak B (2018) Foxn1 in Skin Development, Homeostasis and Wound Healing. *Int J Mol Sci* 19(7):1956
 33. Kopcewicz MM, Kur-Piotrowska A, Bukowska J, Gimble JM, Gawronska-Kozak B (2017) Foxn1 and Mmp-9 expression in intact skin and during excisional wound repair in young, adult, and old C57Bl/6 mice. *Wound Repair Regen* 25(2): 248-259
 34. Xu S, Li S, Bjorklund M, Xu S (2022) Mitochondrial fragmentation and ROS signaling in wound response and repair. *Cell Regen* 11(1): 38
 35. Stücker M, Struk A, Altmeyer P, Herde M, Baumgärtl H, Lübbers D.W (2002) The cutaneous uptake of atmospheric oxygen contributes significantly to the oxygen supply of human dermis and epidermis. *J Physiol* 538: 985-994.
 36. Xiao H, Gu Z, Wang G, Zhao T (2013) The possible mechanisms underlying the impairment of HIF-1 α pathway signaling in hyperglycemia and the beneficial effects of certain therapies. *Int J Med Sci* 10: 1412-1421
 37. Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, Poellinger L (1998) Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 α . *EMBO J* 17: 6573-6586
 38. Semenza GL (2004) Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)* 19: 176-82
 39. Chen L, Gajendrareddy PK, DiPietro LA (2012) Differential expression of HIF-1 α in skin and mucosal wounds. *Research Support, N.I.H., Extramural J Dent Res* 91(9): 871-876
 40. Hong WX, Hu MS, Esquivel M, Liang GY, Rennert RC, McArdle A, Paik KJ, Duscher D, Gurtner GC, Lorenz HP, Longaker MT (2014) The Role of Hypoxia-Inducible Factor in Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 3(5): 390-399
 41. Kur-Piotrowska A, Bukowska J, Kopcewicz MM, Dietrich M, Nynca J, Slowinska M, Gawronska-Kozak B (2018) Foxn1 expression in keratinocytes is stimulated by hypoxia: further evidence of its role in skin wound healing. *Sci Rep* 8(1): 5425
 42. Machcinska S, Kopcewicz M, Bukowska J, Walendzik K, Gawronska-Kozak B (2021) Impairment of the Hif-1 α regulatory pathway in Foxn1-deficient (Foxn1^{-/-}) mice affects the skin wound healing process. *FASEB J* 35: e21289
 43. Machcinska S, Walendzik K, Kopcewicz M, Wisniewska J, Rokka A, Pääkkönen M, Slowinska M, Gawronska-Kozak B (2022) Hypoxia reveals a new function of Foxn1 in the keratinocyte antioxidant defense system. *FASEB J* 36: e22436
 44. Checa J, Aran JM (2020) Reactive Oxygen Species: Drivers of Physiological and Pathological Processes. *J Inflamm Res* 13: 1057-1073
 45. Silva SAME, Michniak-Kohn B, Leonardi GR (2017) An overview about oxidation in clinical practice of skin aging. *An Bras Dermatol* 92(3): 367-374
 46. Koopman WJ, Nijtmans LG, Dieteren CE, Roestenberg P, Valsecchi F, Smeitink JA, Willems PH (2010) Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation. *Antioxid Redox Signal* 12: 1431-1470
 47. Muri J, Heer S, Matsushita M, Pohlmeier L, Tortola L, Fuhrer T, Conrad M, Zamboni N, Kisielow J, Kopf M (2018) The thioredoxin-1 system is essential for fueling DNA synthesis during T-cell metabolic reprogramming and proliferation. *Nat Commun* 9: 1851
 48. Cao X, He W, Pang Y, Cao Y, Qin A (2020) Redox-dependent and independent effects of thioredoxin interacting protein. *Biol Chem* 401: 1215-1231
 49. Nordberg J, Arner ES (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 31: 1287-1312
 50. Sroka J, Madeja Z (2009) Udział reaktywnych form tlenu i reduktazy tioredoksyny w regulacji migracji komórek. *Postępy Biochem* 55(2): ???
 51. Dunn LL, Buckle AM, Cooke JP, Ng MK (2010) The emerging role of the thioredoxin system in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30: 2089- 2098
 52. Su D, Novoselov SV, Sun QA, Moustafa ME, Zhou Y, Oko R, Hatfield DL, Gladyshev VN (2005) Mammalian seleno- protein thioredoxin-glutathione reductase. Roles in disulfide bond formation and sperm maturation. *J Biol Chem* 280: 26491- 26498
 53. Williams DL, Bonilla M, Gladyshev VN, Salinas G (2013) Thioredoxin glutathione reductase- dependent redox networks in platyhelminth parasites. *Antioxid Redox Signal* 19: 735-745
 54. Damdimopoulos AE, Miranda-Vizuete A, Pelto-Huikko M, Gustafsson JA, Spyrou G (2002) Human mitochondrial thioredoxin. Involvement in mitochondrial membrane potential and cell death. *J Biol Chem* 277: 33249-33257
 55. Rundlöf AK, Arnér ES (2004) Regulation of the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase 1 in relation to cellular phenotype, growth, and signaling events. *Antioxid Redox Signal* 6(1): 41-52
 56. Lv X, Yu H, Zhang Q, Huang Q, Hong X, Yu T, Lan H, Mei C, Zhang W, Luo H, Pang P, Shan H (2020) SRXN1 stimulates hepatocellular

- carcinoma tumorigenesis and metastasis through modulating ROS/p65/BTG2 signalling. *J Cell Mol Med* 24(18): 10714-10729
57. Barquilha CN, Santos NJ, Monção CCD, Barbosa IC, Lima FO, Justulin LA, Pértiga-Gomes N, Felisbino SL (2020) Sulfiredoxin as a Potential Therapeutic Target for Advanced and Metastatic Prostate Cancer. *Oxid Med Cell Longev* 2020: 2148562
58. Shaheen R, Szymanska K, Basu B, Patel N, Ewida N, Faqeih E, Al Hashem A, Derar N, Alsharif H, Aldahmesh MA, Alazami AM, Hashem M, Ibrahim N, Abdulwahab FM, Sonbul R, Alkuraya H, Alnemer M, Al Tala S, Al-Husain M, Morsy H, Seidahmed MZ, Meriki N, Al-Owain M, AlShahwan S, Tabarki B, Salih MA; Ciliopathy WorkingGroup; Faquih T, El-Kalioby M, Ueffing M, Boldt K, Logan CV, Parry DA, Al Tassan N, Monies D, Megarbane A, Abouelhoda M, Halees A, Johnson CA, Alkuraya FS (2016) Characterizing the morbid genome of ciliopathies. *Genome Biol* 17(1): 242
59. Wingert R, Galloway J, Barut B, Foott H, Fraenkel P, Axe J, Weber GJ, Dooley K, Davidson AJ, Schmidt B, Paw BH, Shaw GC, Kingsley P, Palis J, Schubert H, Chen O, Kaplan J, Zon LI (2005) Deficiency of *glutaredoxin 5* reveals Fe-S clusters are required for vertebrate haem synthesis. *Nature* 436: 1035-1039
60. Camaschella C, Campanella A, De Falco L, Boschetto L, Merlini R, Silvestri L, Levi S, Iolascon A (2007) The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood* 110(4): 1353-8

Epidermal factor Foxn1 as a regulator of antioxidant defense in the skin

Sylvia Machcińska-Zielińska, Barbara Gawrońska-Kozak

Regenerative Biology Team, Department of Biological Function of Food, Institute of Animal Reproduction and Food Research Polish Academy of Sciences in Olsztyn

✉ corresponding author: b.kozak@pan.olsztyn.pl
<https://pan.olsztyn.pl/regenerative-biology-team>

Key words: skin, Foxn1, hypoxia, Hif-1 α , thioredoxin system, antioxidant

SUMMARY

The skin, as the largest organ of the body, is constantly exposed to environmental threats, including: injuries and oxidative stress. The thioredoxin system is one of the skin antioxidant systems, which protects cells against oxidative stress, regulates cell migration, proliferation and apoptosis, and also participates in signal transmission by regulating the activity of transcription factors. Recent studies have shown a correlation between the epidermal transcription factor Foxn1 and the thioredoxin system in mouse skin. Mass spectrometry analysis, followed by *in vitro* and *in vivo* experiments, showed that Foxn1 in keratinocytes regulates elements of the electron transport chain as well as the thioredoxin system (Txn2, Txnrd3), especially under hypoxic condition. High levels of *Txnrd3* mRNA were detected for the first time in the injured skin of Foxn1^{+/+} mice compared to Foxn1^{-/-} mice, and also showed that Foxn1 in keratinocytes upregulates Txnrd3 protein expression. Moreover, *in silico* analyzes indicated possible binding sites of the transcription factor Foxn1 in the Txn system. In conclusion, the data presented in this review identify Foxn1 as a novel component of the skin antioxidant system.

