



**Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie**

PRACA DOKTORSKA

Sylwia Bronisława Machcińska-Zielińska

***Wpływ indukowanego hipoksja czynnika Hif-1 α oraz czynnika
transkrypcyjnego Foxn1 na ukierunkowanie procesu gojenia
urazów skóry (regeneracyjny vs reperacyjny)***

Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Biologicznych Funkcji Żywności
Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie
pod kierunkiem
Prof. dr hab. n. med. Barbary Gawrońskiej-Kozak

Olsztyn, 2022

*Pragnę złożyć najszczerze podziękowania
Pani Profesor dr hab. n. med. Barbarze Gawrońskiej-Kozak
za możliwość realizacji pracy doktorskiej,
nieocenione wsparcie merytoryczne na które zawsze mogłam liczyć,
cierpliwość i ogrom życzliwości, której doświadczyłam z Pani strony.*

*Koleżankom z Zespołu Biologii Regeneracyjnej
dziękuję za pomoc w realizacji badań, wyrozumiałość
i wspianą atmosferę- praca z Wami to czysta przyjemność.*

*Dziękuję też Pracownikom Zakładu Biologicznych Funkcji Żywności
Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie
którzy zawsze byli dla mnie serdeczni i chętni do pomocy*

Badania sfinansowano ze środków projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki:

OPUS 14 Nr 2017/27/B/NZ5/02610



Spis treści

Streszczenie	1
Summary	3
Wykaz skrótów	5
Publikacje stanowiące rozprawę doktorską	8
1. Wstęp	9
1.1. Skóra: budowa i funkcje.....	9
1.2. Gojenie urazów skórnych.....	11
1.2.1. Gojenie bliznowe.....	11
1.2.2. Gojenie bezbliznowe - regeneracyjne	13
1.3. Czynn timeranskrypcyjny Foxn1	15
1.4. Hipoksja i indukowany hipoksją czynnik Hif-1 α	17
1.5. Tioredoksyny- obrona antyoksydacyjna skóry	19
2. Hipoteza i cele badawcze	21
3. Materiał i metody	23
3.1. Materiał badawczy	23
3.1.1. Zwierzęta.....	23
3.2. Metody	26
3.2.1. Hodowle komórkowe	26
3.2.2. Analiza proteomiczna.....	28
3.2.3 Analizy bioinformatyczne	32
3.2.4. Test właściwości angiogennych	32
3.2.5. Aktywność metaboliczna komórek (MTT)	33
3.2.6. Migracja keratynocytów.....	34
3.2.7. Cytometria przepływowa	34
3.2.8. Proliferacja komórkowa	34
3.2.9. Makroskopowa analiza procesu gojenia urazów skórnych	35
3.2.10. Izolacja RNA oraz łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym z odwrotną transkrypcją (RT-qPCR).....	35
3.2.11. Analiza ekspresji białek metodą Western Blot	35
3.2.12. Histologia	36
3.2.13. Oznaczanie koncentracji białka chemotaktycznego monocytów 1 (MCP-1)	38
3.2.14. Oznaczanie zawartości hydroksyproliny.....	38
3.2.15. Analiza statystyczna.....	39

4. Wyniki	41
4.1. Porównanie procesu gojenia ran skórnych myszy z aktywnym (Foxn1 ^{+/+}) i nieaktywnym (Foxn1 ^{-/-}) czynnikiem transkrypcyjnym Foxn1.....	41
4.1.1. Analiza przebiegu odpowiedzi immunologicznej	41
4.1.2. Porównanie przebiegu procesu re-epitelializacji.....	41
4.1.3. Porównanie przebiegu angiogenezy	42
4.1.4. Analiza zmian ekspresji mRNA i poziomów białka czynników biorących udział w tworzeniu i degradacji ECM.....	43
4.1.5. Analiza wpływu transformujących czynników wzrostu beta 1 i 3 (Tgfb-1 i 3) na aktywność fibroblastów skóry	45
4.2. Analiza zmian ekspresji czynników regulowanych hipoksją w przebiegu procesu gojenia ran pomiędzy myszami Foxn1 ^{+/+} a Foxn1 ^{-/-}	45
4.3. Czynniki transkrypcyjne Foxn1 oraz hipoksja modulują ekspresję mRNA czynników związanych z obniżoną dostępnością tlenu	46
4.4. Analiza profili proteomicznych keratynocytów transdukowanych wektorem adenowirusowym: Ad-Foxn1 lub Ad-GFP (kontrola) w warunkach normoksji (21% O ₂) lub hipoksji (1% O ₂).....	47
4.4.1. Charakterystyka funkcjonalna białek o zróżnicowanej ekspresji w keratynocytach i keratynocytowych mediach pochodowlanych (KCM)	48
4.4.2. Analiza interakcji białkowych przy użyciu modeli sieciowych.....	49
4.5. Czynniki Foxn1 regulatorem systemu antyoksydacyjnego w keratynocytach (<i>in vitro</i>) i w skórze (<i>in vivo</i>)	50
4.6. Wpływ aktywności czynnika Foxn1 oraz hipoksji na regulacje funkcjonowania keratynocytów w procesach związanych z gojeniem urazów skóry	52
4.6.1. Wpływ Foxn1 na aktywność białek Ccn.....	52
4.6.2. Analiza przebiegu proliferacji i migracji keratynocytów transdukowanych Ad-Foxn1 lub Ad-GFP	53
4.6.3. Analiza aktywności szlaków proangiogennych	53
5. Dyskusja	56
6. Podsumowanie	64
7. Wnioski	66
8. Bibliografia	67
9. Publikacje wraz z oświadczeniami autorów	77

Streszczenie

Skóra jako najbardziej zewnętrzna powłoka ciała jest nieustannie narażona na urazy. Integralność zranionej skóry zostaje przywrócona poprzez gojenie reperacyjne/naprawcze, w wyniku którego powstaje blizna lub sporadycznie obserwowane wśród ssaków gojenie regeneracyjne (bezbliźnowe). Jednym z czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w bliźnowe gojenie urazów skóry jest czynnik Foxn1, którego brak w skórze objawia się niewyjaśnionym jak dotąd mechanizmem gojenia bezbliźnowego – regeneracyjnego.

Jednym z kluczowych czynników środowiskowych, które mogą kierować naprawczym vs regeneracyjnym procesem gojenia ran jest obniżona dostępność tlenu (hipoksja). Indukowany hipoksją czynnik Hif-1 α (*ang. Hypoxia-inducible factor-1 α*), jako główny regulator homeostazy tlenowej, bierze udział we wszystkich etapach gojenia urazów skóry, a nieprawidłowości w jego ekspresji skutkują niegojącymi się ranami (niskie poziomy Hif-1 α) lub bliznami przerostowymi (wysokie poziomy Hif-1 α). Uzyskane przez Zespół Biologii Regeneracyjnej wyniki wykazały znaczące różnice w ekspresji genów związanych z hipoksją (m.in. Hif-1 α) pomiędzy myszami wykazującymi ekspresję czynnika transkrypcyjnego Foxn1 (Foxn1^{+/+}), a osobnikami z nieaktywnym czynnikiem transkrypcyjnym Foxn1 (Foxn1^{-/-}), co wskazuje na obecność interakcji pomiędzy Foxn1, a czynnikami/genami związanymi z niską dostępnością tlenu.

Celem podjętych w pracy badań było wykazanie współdziałania indukowanego hipoksją czynnika Hif-1 α oraz czynnika transkrypcyjnego Foxn1 na przekierowanie procesu gojenia regeneracyjnego (bezbliźnowego) na gojenie naprawcze (bliźnowe).

W oparciu o przeprowadzone doświadczenia *in vivo* wykorzystujące wycięcie jako model urazu skóry (*ang. excisional skin wound model*) potwierdzono, że myszy Foxn1^{-/-} goją urazy skórne na drodze regeneracji, która charakteryzuje się m.in. szybką re-epitelializacją, zmodyfikowanymi, charakterystycznymi dla gojenia bezbliźnowego poziomami ekspresji: transformującego czynnika wzrostu β 3 (Tgf β -3), metaloproteinaz macierzy (MMPs) oraz ich inhibitorów (TIMPs).

Przeprowadzone analizy oparte na doświadczeniach *in vivo* oraz *in vitro* wskazały, iż Foxn1 stymuluje bliznowe gojenie urazów skóry poprzez regulację ekspresji czynników związanych z obniżoną dostępnością tlenu: Hif-1 α , Ep300 oraz Fih-1. Ponadto doświadczenia *in vitro* wykazały, że Foxn1 w warunkach obniżonej dostępności tlenu spowalnia procesy związane z odbudową naskórka (migracja keratynocytów) oraz angiogenezą (obniżona ekspresja Vegfa), cechami charakterystycznymi dla naprawczego gojenia urazów skóry. Przeprowadzone analizy proteomiczne: keratynocytów transdukowanych adenowirusem niosącym Foxn1 (Ad-Foxn1), a następnie hodowanych w warunkach hipoksji lub normoksji, a także odpowiadających im keratynocytowych mediów pochodowlanych (KCM; *ang. keratinocyte conditional media*) pozwoliły na wykazanie wcześniej nierozpoznanej funkcji Foxn1 jako elementu regulującego ochronę antyoksydacyjną w skórze. Przedstawione wyniki są pierwszymi, które wskazują na udział Foxn1 w indukcji systemu obrony antyoksydacyjnej poprzez aktywację układu tioredoksyn w skórze, a także identyfikują Foxn1 jako główny regulator reduktazy tioredoksyny 3 (Txnrd3) w procesie gojenia urazów skóry.

W prezentowanej pracy doktorskiej wykazano, iż Foxn1 w skórze reguluje czynniki związane z obniżoną dostępnością tlenu wpływając przez to na wybór ścieżki gojenia: regeneracyjny vs reperacyjny. Ponadto, dane wskazują na możliwy mechanizm molekularny, w którym Foxn1 wraz z hipoksją uczestniczą w aktywacji obrony antyoksydacyjnej i kontrolują właściwości funkcjonalne keratynocytów. Przyszłe badania mogą dostarczyć nowych rozwiązań w zakresie antyoksydacyjnej ochrony oraz poprawy gojenia się ran skóry.

Summary

The skin, as the outermost barrier of the body, is exposed to threats from the external environment including injuries. The integrity of the wounded skin is restored through a reparative healing process, which results in scar formation or the regenerative healing (scar free) observed occasionally in mammals. One of the transcription factors involved in scar wound healing process is Foxn1, which lack in skin is manifested by scar-free healing – regeneration, that mechanisms is still unexplained.

One of the major factors that may guide reparative vs regenerative skin wound healing is reduced availability of oxygen (hypoxia). Hypoxia inducible factor-1 α (Hif-1 α) as a master regulator of oxygen homeostasis, is involved in all stages of skin wound healing. The abnormalities in Hif-1 α expression may lead to adverse healing as unhealing ulcers (Hif-1 α underexpression) or hypertrophic scars (Hif-1 α overexpression). The results obtained by the Regenerative Biology Team showed the significant differences in the expression of genes associated with hypoxia (Hif-1 α) between skin of Foxn1^{-/-} and Foxn1^{+/+} mice. This data indicates an interaction between Foxn1 and factors/genes associated with low oxygen availability.

The purpose of the present research was to demonstrate interplay/interaction between Foxn1 and Hif-1 α which may direct the outcome of cutaneous repair: reparative (scar-forming) vs regenerative (scarless).

Performed *in vivo* experiments that were based on excisional skin wound model confirmed that mice with inactive transcription factor Foxn1 (Foxn1^{-/-}) heal skin injuries by regeneration, which is characterized by: rapid re-epithelialization, and modified characteristic for scar-free healing process, expression levels of transforming growth factor β (Tgf β -3), matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs)

The analyzes based on *in vivo* and *in vitro* experiments indicated that Foxn1, as a potential regulator of factors related to hypoxia: Hif-1 α , Ep300 and Fih-1, regulates scar wound healing process. Moreover, *in vitro* experiments have shown that Foxn1 under hypoxic conditions, slows down processes related to epidermal reconstruction (keratinocyte migration) and angiogenesis (reduced Vegf expression), which are characteristic for the skin wound

repair. The proteomic analyzes of keratinocytes transduced with adenoviral vector carrying Foxn1-eGFP (Ad-Foxn1) cultured under hypoxic or normoxic conditions as well as corresponding keratinocyte conditional media (KCM) demonstrated a previously unrecognized function of Foxn1 as a regulator of antioxidant defense in the skin. These findings highlight the newly defined role of Foxn1 as an important regulator in the anti-ROS response through regulation of the thioredoxin system (Txn). Furthermore, the results indicate Foxn1 as a major regulator of thioredoxin 3 reductase (Txnrd3) during skin wound healing process.

In the presented doctoral dissertation, it was demonstrated that Foxn1 in the skin regulates factors related to hypoxia thus influencing/affecting the choice of the healing path: regenerative vs reparative. Moreover, the results indicate a possible mechanism by which Foxn1 and/or hypoxia participates in activation of antioxidant defense system and regulates physiological changes in keratinocytes. Future studies may provide new solutions for antioxidative skin protection and improvement in skin wound healing.

Wykaz skrótów

Ad-Foxn1	adenowirus eksprymujący Foxn1-eGFP
Ad-GFP	adenowirus eksprymujący GFP
AMOTL-2	białko podobne do angiomotyny 2
ARNT-2	translokator jądrowy receptora węglowodorów arylowych 2
BrdU	bromodeoksyurydyna
CCN1	bogaty w cysteinę induktor angiogeniczny 61
CCN2	czynniki wzrostu tkanki łącznej
CK6	cytokeratyna 6
COL	kolagen
DAB	3,3'-diaminobenzodyna
DAPI	4',6-diamidyno-2-fenylindol
DFs	fibroblasty skóry właściwej
DMEMF12	medium hodowlane Dulbecco's Modified Eagle's F-12 Ham's
DNA	kwasy deoksyrybonukleinowe
dWAT	śródkórne komórki tłuszczowe
ECM	macierz zewnątrzkomórkowa
EGF	naskórkowy czynnik wzrostu
EGFR	receptor naskórkowego czynnika wzrostu
EMT	przejście epitelialno-mezenchymalne
EP300	acetylotransferaza histonowa p300
ETC	łańcuch transportu elektronów
FBS	płodowa surowica bydlęca
FGF	czynniki wzrostu fibroblastów
FGF-7	czynnik wzrostu fibroblastów-7
FIH-1	czynnik hamujący Hif-1 α
FOXN1	czynnik transkrypcyjny Forkhead Box N1
FOXO	czynniki transkrypcyjne z rodziny Forkhead Box O
GFP	białko zielonej fluorescencji
GRXS	glutaredoksyny

GSH	glutation
HA	kwas hialuronowy
HIF-1 α	czynnik indukowany hipoksją 1 α
HOX	geny homeotyczne
HPRT1	fosforybozylotransferaza hipoksantynowo-guaninowa
HRE	element odpowiedzi na hipoksję
HSP	białka szoku cieplnego
HUVEC	ludzkie komórki śródlonka żyły pępowinowej
LC-MS/MS	chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas
MCP-1	białko chemotaktyczne monocytów 1
MMPs	metaloproteinazy macierzy
myszki Foxn1 ^{-/-}	myszki z nieaktywnym czynnikiem Foxn1
myszki Foxn1 ^{+/+}	myszki z aktywnym czynnikiem Foxn1
NADP	fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego
NDUFS	NADH, oksydoreduktazy ubichinonu
NQO1	dehydrogenaza NAD(P)H [chinon] 1
NRF-1	jądrowy czynnik oddechowy 1
OVOL 1 i 2	transkrypcyjny represor OVO 1/2
PBS	bufor fosforanowy
PDGFB	płytkopochodny czynnik wzrostu podjednostka B
PDPK1	białkowa kinaza 1 zależna od 3-fosfoinozytydu
PFA	paraformaldehyd
PLCD1	1 fosfatydyloinozytolu-4,5-bisfosforan fosfodiesterazy delta
PRX	peroksyredoksyna
RNA	kwas rybonukleinowy
ROMO1	modulator reaktywnych form tlenu 1
ROS	reaktywne formy tlenu
RT-qPCR	łańcuchowa reakcja polimerazy z odwrotną transkrypcją
α SMA	aktyna mięśni gładkich α
SMAD	białka z rodziny SMAD
SRXN1	sulfiredoksyna 1
TGF β s	transformujące czynniki wzrostu β

TIMPs	inhibitory metaloproteinaz macierzy
TXNRDS	reduktazy tioredoksyny
TXNS	tioredoksyny
VDAC1	zależny od napięcia kanał anionselektywny 1
VEGF	czynn timerostu śródbłona naczyniowego
YAP1	składnik szlaku sygnałowego Hippo
AP-1	kompleks białkowy AP-1
PPAR β/δ	receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów β/δ
SMAD2	białko z rodziny SMAD
HOX	geny homeotyczne
TCF/LEF	składniki szlaku sygnałowego Wnt/ β -katenina

Publikacje stanowiące rozprawę doktorską

Wyniki uzyskane w ramach zadań badawczych zostały opublikowane w czasopismach indeksowanych przez ISI Web of Science:

1. Machcinska S, Kopcewicz M, Bukowska J, Walendzik K, Gawronska-Kozak B. „Impairment of the Hif-1 α regulatory pathway in Foxn1-deficient (Foxn1^{-/-}) mice affects the skin wound healing process.” The FASEB Journal.2021;35:e21289. doi: 10.1096/fj.202001907R. PMID: 33475195.

(**IF**₂₀₂₁: 5,834; **MEiN**₂₀₂₁: 140 pkt.)

2. Machcinska S, Walendzik K, Kopcewicz M, Wisniewska J, Rokka A, Pääkkönen M, Słowinska M, Gawronska-Kozak B „Hypoxia reveals a new function of Foxn1 in the keratinocyte antioxidant defense system.” The FASEB Journal. 2022;36:e22436. doi: 10.1096/fj.202200249RR.

(**IF**₂₀₂₁: 5,834; **MEiN**₂₀₂₁: 140 pkt.)

Sumaryczny Impact Factor: 11,668

Sumaryczna liczba punktów MEiN: 280 pkt.

Publikacje przedstawiono w formie załączników do rozprawy doktorskiej.

1. Wstęp

1.1. Skóra: budowa i funkcje

Skóra jako największy organ i jednocześnie najbardziej zewnętrzna powłoka ciała stanowi barierę ochronną organizmu przed czynnikami zewnętrznymi (Ibrahim i wsp. 2021). Do głównych funkcji skóry możemy zaliczyć ochronę organizmu przed infekcjami, utratą ciepła, promieniowaniem ultrafioletowym i urazami mechanicznymi (Cho i wsp. 2009; Romanovsky i wsp. 2014; Piipponen i wsp. 2020). Ponadto jako narząd neuro-immuno-endokrynną skóra pełni istotną rolę w odbiorze sygnałów ze środowiska zewnętrznego (temperatura, dotyk) i wewnętrznego (neurony, hormony) zapewniając przy tym utrzymanie homeostazy ogólnoustrojowej (Słomiński i wsp. 2012; Słomiński i wsp. 2015).

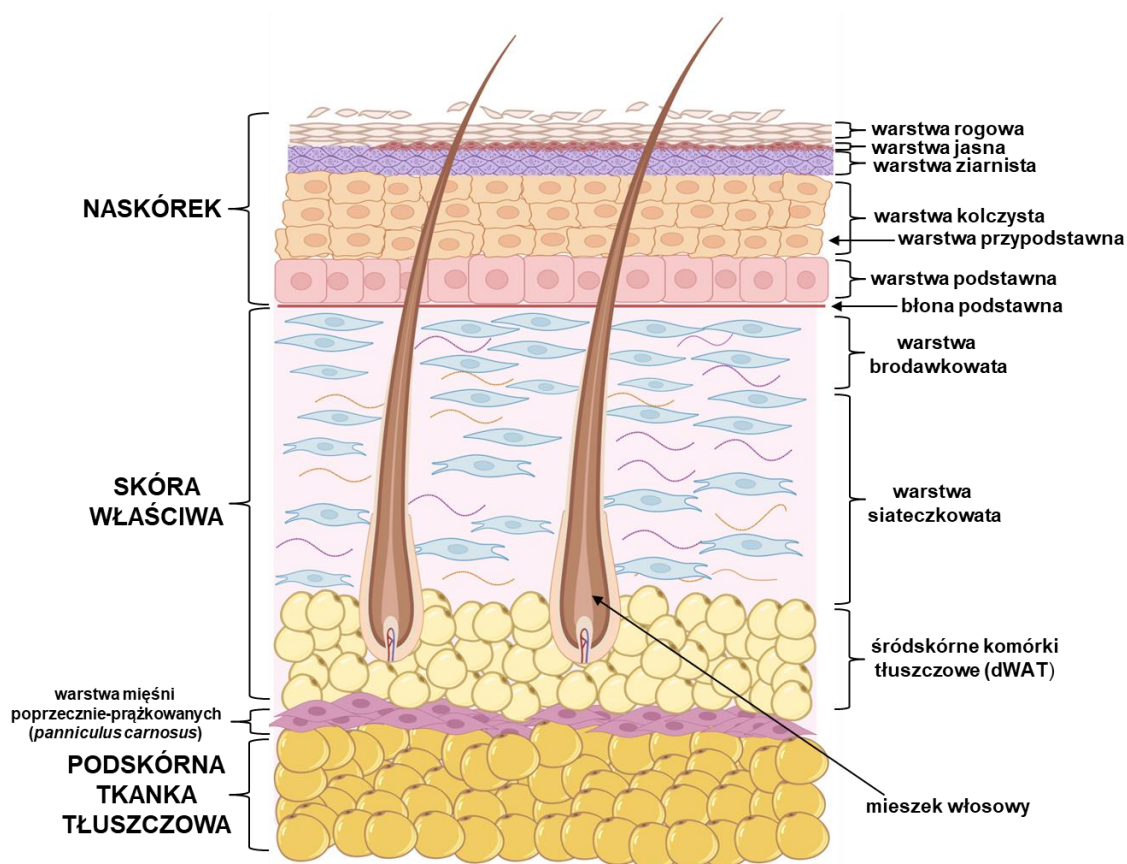
W skórze ssaków wyróżnia się trzy podstawowe warstwy: naskórek (*ang. epidermis*), skórę właściwą (*ang. dermis*) oraz podskórną tkankę tłuszczową (*ang. hypodermis*) (Rycina 1) (Cooper i wsp. 2002). Najbardziej zewnętrzną warstwę skóry stanowi naskórek, który utworzony jest przez nabłonek wielowarstwowy płaski rogowaciejący. Jego główną masę komórkową stanowią keratynocyty a zaraz obok nich komórki Merkla (receptory dotyku), melanocyty (komórki pigmentowe) oraz komórki Langerhansa (komórki dendrytyczne) (Leigh i wsp. 1994). 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 (Rycina 1): (1) warstwę podstawną (bazalną) (*łac. stratum basale*), (2) warstwę kolczystą (*łac. stratum spinosum*), (3) warstwę ziarnistą (*łac. stratum lucidum*), (4) warstwę jasną (*łac. stratum spinosum*) oraz (5) warstwę rogową (najbardziej zewnętrzną) (*łac. stratum corneum*) po czym obumierają, ulegają keratynizacji i złuszczeniu (Bochenek 1989; Czarnecka-Operacz 2006).

Podczas procesu różnicowania keratynocyty podlegają szeregowi zmian czynnościowych i strukturalnych m.in. ulegają transformacjom morfologicznym (zmiana kształtu), a także tracą zdolność do podziału. w zależności od stopnia zróżnicowania, inicjują ekspresję odmiennych markerów naskórka. Stąd też w komórkach warstwy podstawnej dominują keratyna 5 i 14, zaś w warstwie kolczystej keratyna 1 i 10. Natomiast, białkami

markerowymi komórek warstwy ziarnistej są inwolukryna, lorikryna i filagryna (Yuspa i wsp. 1989; Lechler i wsp. 2005; Błaszczyk 2013).

Tuż pod błoną podstawną oddzielającą naskórek znajduje się skóra właściwa, bogata w komórki tkanki łącznej – fibroblasty skóry, komórki tłuszczowe, komórki odpornościowe oraz liczne skupiska naczyń i nerwów. Fibroblasty, jako największa populacja komórek rezydujących w skórze właściwej, produkują i wydzielają komponenty macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, *ang. extracellular matrix*) m.in. kolagen, proteoglikany i fibronektynę (Sawicki 2005; McAnulty i wsp. 2007). w obrębie skóry właściwej można wyodrębnić dwie warstwy: brodawkowatą (*łac. stratum papillare*) oraz ułożoną pod nią warstwę siateczkowatą (*łac. stratum reticulare*). Warstwa brodawkowata zbudowana jest z tkanki włóknistej i składa się z licznych włókien kolagenowych (głównie typu I i III), elastynowych i retikulinowych oraz komórek układu odpornościowego. Niżej położona warstwa siateczkowata zbudowana jest z tkanki łącznej zbitej o znacznie grubszy utkanie włókien kolagenowych zapewniając skórze rozciągliwość i odporność na urazy (Cichocki i wsp. 2009). Badania ostatnich kilku lat wyodrębniły nową populację komórek wchodzącą w skład skóry właściwej – śródskórne komórki tłuszczowe (dWAT, *ang. dermal White Adipose Tissue*) (Wojciechowicz i wsp. 2013), które zaangażowane są m.in. w procesy gojenia urazów, cykliczną regenerację włosów oraz termoregulację (Schmidt i wsp. 2013; Kasza i wsp. 2014; Walendzik i wsp. 2020; Gawronska-Kozak i wsp. 2022).

Podskórna warstwa tłuszczowa to najgłębiej położona warstwa skóry (Rycina 1), zbudowana głównie z tkanki łącznej właściwej luźnej oraz tkanki tłuszczowej. Pełni rolę magazynu substancji zapasowych, izolatora termicznego oraz chroni przed urazami mechanicznymi (Bochenek 2018).



Rycina 1. Budowa skóry myszy. Opracowanie własne wykonane w programie Biorender na podstawie kompendium histologii Cichocki i wsp. 2009 oraz Mescher 2020.

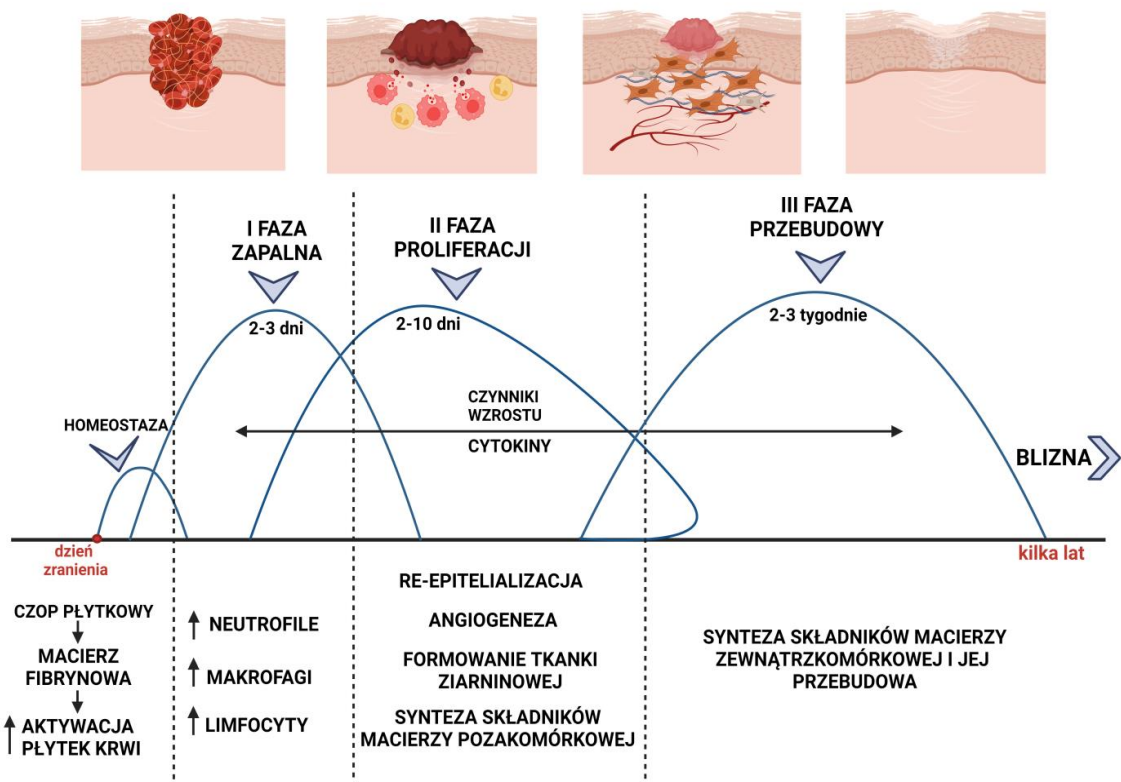
1.2. Gojenie urazów skórnych

1.2.1. Gojenie bliznowe

Przerwanie ciągłości skóry wywołane urazem, ingerencją chirurgiczną czy też chorobą może skutkować zaburzeniami homeostazy. Integralność zranionej skóry zostaje przywrócona dzięki skutecznym systemom naprawy i niezwykle mechanizmowi interakcji komórek, cytokin i czynników wzrostu (Piipponen i wsp. 2020; Tottoli i wsp. 2020). Zraniona skóra dorosłych ssaków goi się w procesie naprawczym (reperacyjnym), którego efektem jest wytworzenie blizny. Proces gojenia ran skórnych został scharakteryzowany jako szereg postępujących i zachodzących na siebie faz: fazy zapalnej, fazy migracji i proliferacji komórkowej oraz fazy przebudowy i dojrzewania tkanki bliznowej (Rycina 2) (Singer i wsp. 1999; Gurtner i wsp. 2008). Bezpośrednim następstwem zranienia jest powstanie miejscowego krwotoku i niedotlenienia tkanek spowodowanego przerwaniem ciągłości naczyń krwionośnych. Powstały w miejscu zranienia skrzep stanowiący siatkę fibryny wraz z osadzonymi w niej płytkami krwi przywraca homeostazę i staje się rusztowaniem dla

komórek infiltrujących obszar zranienia (Singer i wsp. 1999; Gurtner i wsp. 2008). Obecne w miejscu urazu komórki układu immunologicznego (neutrofile, makrofagi, limfocyty) zapobiegają infekcji i uwalniają liczne mediatory: cytokiny i czynniki wzrostu, między innymi: płytkowy czynnik wzrostu (PDGF, *ang. platelet-derived growth factor*), naskórkowy czynnik wzrostu (EGF, *ang. epidermal growth factor*), transformujące czynniki wzrostu (TGF β , *ang. transforming growth factor β*) oraz czynnik wzrostu fibroblastów-7 (FGF-7, *ang. fibroblast growth factor 7*) które mobilizują makrofagi, neutrofile i fibroblasty inicjując zapalną fazę gojenia (Park i wsp. 2004). w kolejnej fazie procesu gojenia następuje intensywna migracja i proliferacja keratynocytów celem odbudowy uszkodzonego naskórka (*ang. re - epithelialization*). w tym samym czasie dochodzi również do procesu odbudowy naczyń krwionośnych (*ang. angiogenesis*) i wytworzenia tkanki ziarninowej. Pojawiające się w miejscu zranienia fibroblasty i miofibroblasty produkują i wydzielają kolagen typu III, glikozoaminoglikany oraz proteoglikany stanowiące główne składniki macierzy zewnątrzkomórkowej, tworząc ziarninę (Singer i wsp. 1999; Gurtner i wsp. 2008; Guo i wsp. 2010).

Ostatnim etapem procesu gojenia urazów skórnych jest przebudowa tkanki bliznowej. Ta faza kontrolowana jest przez metaloproteinazy macierzy (Mmps, *ang. matrix metalloproteinases*) i ich inhibitory tkankowe (Timps, *ang. tissue inhibitor of metalloproteinases*). Fibroblasty produkujące składniki macierzy zewnątrzkomórkowej (w tym kolagen) przekształcają się w bardzo aktywne miofibroblasty, zdolne do obkurczania rany. Początkowo rusztowanie rany stanowi kolagen typu III, który jest częściowo zastępowany przez kolagen typu I przy udziale enzymów, głównie metaloproteinaz macierzy oraz ich inhibitorów. Następnie większość komórek w łóżysku rany (makrofagi, komórki śródbłónka i miofibroblasty) ulega zaprogramowanej śmierci komórkowej i powstaje blizna przywracająca ciągłość skóry i jej funkcje ochronne (Gurtner i wsp. 2008). Jednakże powstała blizna nieodwracalnie upośledza prawidłowe funkcjonowanie skóry jako narządu neuro-immuno-endokrynnego.



Rycina 2. Fazy gojenia urazów skórnych. Opracowanie własne wykonane w programie Biorender na podstawie Singer i wsp. 1999 oraz Gurtner i wsp. 2008.

1.2.2. Gojenie bezbliznowe - regeneracyjne

Regeneracja (gojenie bezbliznowe) urazów skóry przywraca budowę i funkcję tożsamą z tkankami niezranionymi. Jednakże zdolność do regeneracji jest cechą spotykaną głównie u bezkręgowców i niższych kręgowców m.in. u przedstawicieli ryb *Danio pręgowany* (*łac. Danio rerio*) (Poss i wsp. 2003) oraz gadów i płazów ogoniastych – jaszczurki (*łac. Lacertilia*), aksolotla (*łac. Ambystoma*) (Brockes i wsp. 2002, Kato i wsp. 2003). Zjawisko regeneracji u ssaków jest ewenementem (Brockes i wsp. 2002; Kato i wsp. 2003). Dotychczasowe badania wykazały, że ludzkie płody, które rozwijają się w środowisku wewnątrzmacicznym o obniżonej dostępności tlenu (hipoksja), są zdolne do regeneracji urazów skóry, jednak tracą tę zdolność w trzecim trymestrze rozwoju płodowego (Rowlatt i wsp. 1979; Lorenz i wsp. 1992). Podobnie płody myszy i szczurów są zdolne do regeneracji urazów skóry przez pierwsze dwa trymestry, czyli do odpowiednio 16 i 18 dnia rozwoju płodowego (Ihara i wsp. 1990). Dotychczas wykazano, że unikalne cechy własne regenerującej się skóry a nie środowisko (płyn owodniowy), w którym rozwija się płód warunkują bezbliznowy proces gojenia. Na charakterystykę tego procesu składają się m.in.

obniżona odpowiedź immunologiczna, odmienna charakterystyka fibroblastów, zwiększony poziom Tgf- β 3 i zwiększona ilość kwasu hialuronowego (HA, *ang. hyaluronic acid*) (Tabela 1) (Lorenz i wsp. 1993). Jednak pomimo obszernych badań, które wskazują na potencjalne przyczyny unikatowej predyspozycji płodów do regeneracji zranionej skóry, dokładny mechanizm tej zdolności wciąż nie został poznany. U dorosłych ssaków gojenie bezbliznowe ran jest bardzo rzadkie, i jak dotąd wykazane u: (1) królików w małżowinie usznej (Goss i wsp. 1975), (2) ludzi i myszy – regeneracja opuszek palców (Han i wsp. 2005; Han i wsp. 2008), (3) myszy kolczastych (*Acomys*) (Seifert i wsp. 2012) oraz (4) myszy pozbawionych aktywności Foxn1 (*Foxn1^{nu}*; *Foxn1^{-/-}*), tzw. myszy nagich (*ang. nude mice*) (Gawronska-Kozak 2004; Gawrońska-Kozak i wsp. 2006; Manuel i Gawronska-Kozak 2006; Gawronska-Kozak 2011).

Tabela 1. Porównanie elementów składowych procesu gojenia urazów skóry w modelu bliznowym oraz bezbliznowym

Elementy składowe procesu gojenia urazów skóry	Gojenie bliznowe	Gojenie bezbliznowe			
		Niższe kręgowce	Płody	Ssaki	
				Dorosłe	
				Myszy Foxn1 ^{-/-}	Myszy kolczaste (<i>Acomys cahirinus</i>)
Obniżona odpowiedź immunologiczna	-	+	+	+	+
Przyspieszony proces re-epitelializacji	-	+	+	+	+
Wysoki stosunek kolagenu III do kolagenu	-	+	+	+	+
Wysoki poziom TGF β 3 (pro-regeneracyjny)	-	+	+	+	+
Wysoki poziom TGF β 1 (pro-bliznowy)	+	-	-	-	-
Wysoki poziom kwasu hialuronowego	-	+	+	+	+
Odmienne w stosunku do gojenia bliznowego poziomy MMP/TIMP	-	+	+	+	+
Obecność blizny	+	-	-	-	-

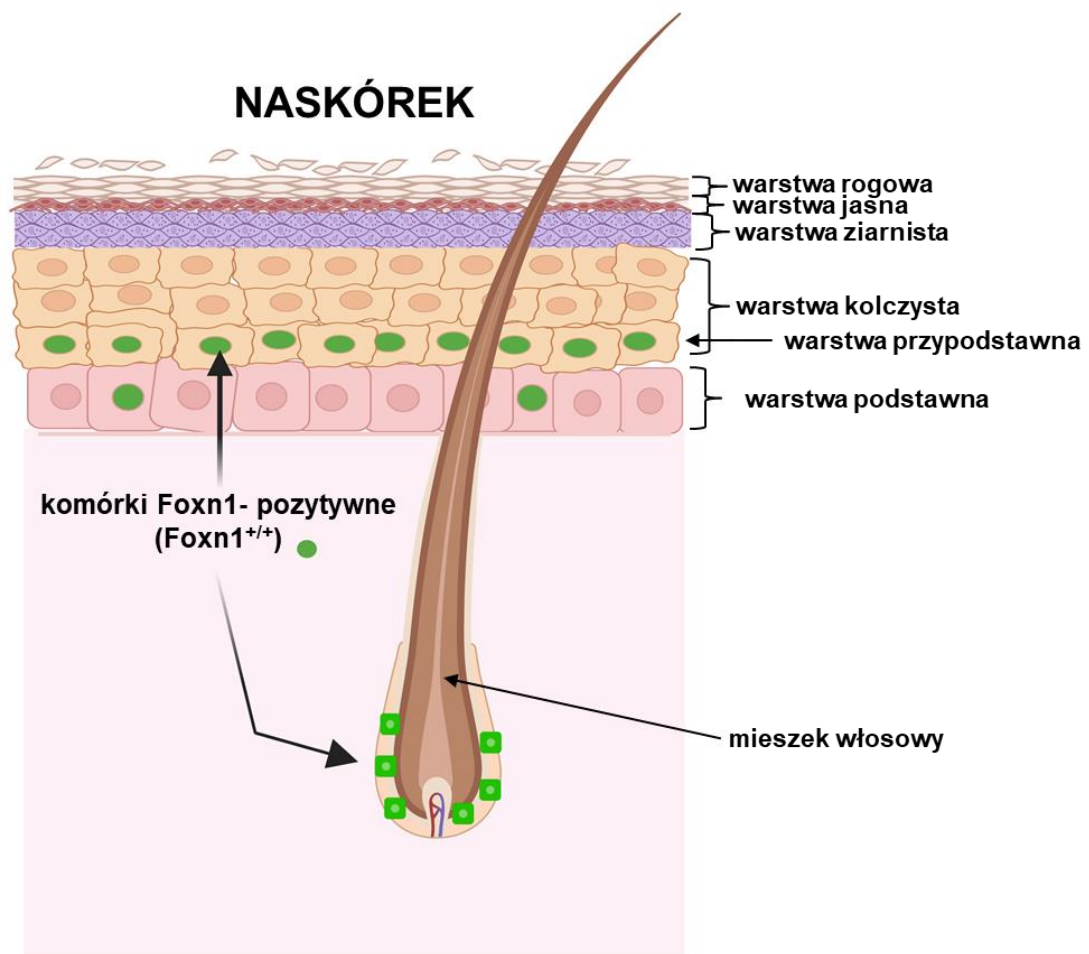
Opracowano na podstawie: Manuel i wsp. 2006, Roy i wsp. 2008, Seifert i wsp. 2012, Gawrońska-Kozak i wsp. 2006 i 2014, Bukowska i wsp. 2017, Yoon i wsp. 2020

1.3. Czynniki transkrypcyjne Foxn1

Czynniki transkrypcyjne stanowią grupę niezwykle istotnych regulatorów procesu gojenia urazów skórnych, w której wyróżnia się m.in. kompleks białkowy – AP-1 (*ang. activator protein 1*), receptory aktywowane proliferatorami peroksysomów - Ppar β/δ (*ang. peroxisome proliferator-activated receptor β/δ*), geny homeotyczne - HoxA3 i HoxD3 (*ang. homeobox genes*), grupę mediatorów – Smad2 (*ang. mothers against decapentaplegic homolog 2*) i Tcf/Lef (*ang. T cell factor/lymphoid enhancer factor family*) (szlak sygnałowy Wnt/ β -katenina), czynniki należące do rodziny Foxo1 i 3 (*ang. forkhead box O family*) oraz Ovol1 i 2 (*ang. ovo-like transcriptional repressor 1 and 2*) (Teng i wsp. 2007; Schafer i wsp. 2007; Bellavia i wsp. 2014; Lee i wsp. 2014; Mori i wsp. 2014; Donati i wsp. 2014).

Jednym z czynników transkrypcyjnych zaangażowanym w utrzymywaniu homeostazy skóry jest naskórkowy czynnik Foxn1 (forkhead box N1) należący do rodziny Forkhead/winged helix (Nehls i wsp. 1994). Ekspresja Foxn1 ogranicza się do komórek nabłonkowych grasicy i skóry. w grasicy Foxn1 pełni funkcję regulatora różnicowania się komórek nabłonkowych warunkujących dojrzewanie limfocytów typu T (Nehls i wsp. 1996). Badania wykazały, że wraz z fizjologicznym procesem inwolucji grasicy następuje zmniejszona produkcja limfocytów T (niedobór odporności), która koreluje z jednoczesnym spadkiem poziomu mRNA Foxn1 (Pignata i wsp. 1996; Sun i wsp. 2010; Zhang i wsp. 2012; Bredenkamp i wsp. 2014).

W skórze czynnik transkrypcyjny Foxn1 ulega ekspresji w pierwszej warstwie keratynocytów tworzących warstwę kolczystą (warstwa przypadawna), w pojedynczych komórkach warstwy podstawnej oraz w mieszkach włosowych (Rycina 3) (Lee i wsp. 1999; Prowse i wsp. 1999; Gawrońska-Kozak i wsp. 2016). Dane literaturowe wykazały, że w skórze niezaranej Foxn1: (1) reguluje równowagę między proliferacją a różnicowaniem się keratynocytów (Prowse i wsp. 1999; Lee i wsp. 1999), (2) stymuluje proliferację poprzez kontakt komórka-komórka i sekrecję parakrynną (Prowse i wsp. 1999; Lee i wsp. 1999), (3) bierze udział w procesach pigmentacji skóry i włosów (Weiner i wsp. 2007), a także (4) w rozwoju mieszków włosowych (Lee i wsp. 1999; Weiner i wsp. 2007). Ponadto wykazano, iż 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*) (Gawrońska-Kozak i wsp. 2016; Kopcewicz i wsp. 2017).



Rycina 3. Ekspresja czynnika transkrypcyjnego Foxn1 w skórze. Opracowanie własne wykonane w programie Biorender na podstawie Lee i wsp. 1999; Prowse i wsp. 1999; Gawronska-Kozak i wsp. 2016.

Inaktywująca mutacja w obrębie genu Foxn1 (myszy Foxn1^{-/-}) ma działanie pleiotropowe i prowadzi do powstania tzw. fenotypu nagiego charakteryzującego się brakiem włosów, deficytem odporności immunologicznej oraz zmianami w budowie skóry (Frank i wsp. 1999; Brissette i wsp. 1996; Pignata i wsp. 1996; Nehls i wsp. 1994). Badania prowadzone przez Prof. Barbarę Gawrońską-Kozak wykazały, że myszy pozbawione czynnika Foxn1 posiadają zdolność do regeneracji owalnych wycięć w małżowinie usznej z następującą regeneracją chrząstki (Gawrońska-Kozak 2004) oraz do gojenia bezbliznowego urazów skóry (Gawrońska-Kozak i wsp. 2006; Manuel i wsp. 2006; Gawrońska-Kozak 2011). Co niezwykle istotne, brak aktywności czynnika Foxn1 jest cechą wspólną przedstawicieli ssaków wykazujących zdolność do gojenia regeneracyjnego (bezbliznowego): płodów ssaczych (dwa pierwsze trymestry ciąży) oraz myszy Foxn1^{-/-}. Wykazano również, że pojawienie się ekspresji Foxn1 w skórze w okresie życia płodowego pokrywa się z tzw.

punktem przejścia (*ang. transition point*), w którym zanika zdolność do gojenia bezbliznowego a rozpoczyna się gojenie naprawcze (bliznowe) (Lee i wsp. 1999). Wspomniany punkt przejścia następuje między 16,5 a 18,5 dniem życia płodowego u myszy i szczurów (Ihara i wsp.1990), a 24 tygodniem u ludzi (Lorenz i wsp.1992). Zatem, czy ekspresja Foxn1 w skórze warunkuje bliznowe gojenie urazów skóry, a jego brak odpowiada za fenomen regeneracji?

Chcąc odpowiedzieć na to pytanie w dalszych analizach Zespół Biologii Regeneracyjnej pod kierownictwem Prof. B. Gawrońskiej-Kozak porównał transkryptomy skóry myszy zdolnych do regeneracji (płody myszy Foxn1^{+/+} z 14 dnia życia płodowego oraz dorosłe myszy pozbawione aktywnej formy Foxn1 (myszy Foxn1^{-/-})) do transkryptomów skóry myszy gojących urazy skórne z wytworzeniem blizny (płody myszy Foxn1^{+/+} z 18 dnia życia płodowego; oraz dorosłe myszy Foxn1^{+/+}) (Kur-Piotrowska i wsp. 2017).

Wyniki wykazały, iż dwa modele gojenia bezbliznowego (płody myszy w 14 dniu rozwoju oraz dorosłe myszy Foxn1^{-/-}) posiadają liczne podobieństwa w profilach transkryptomicznych m.in. łączył je zmieniony profil ekspresji genów skóry związanych z przebudową tkanek, budową cytoszkieletu, gojeniem urazów, odpowiedzią immunologiczną i różnicowaniem (Kur-Piotrowska i wsp. 2017). Te charakterystyczne zmiany w ekspresji genów sugerują, iż Foxn1 stanowi istotny element na drodze przekierowania szlaków bezbliznowych na szlaki naprawcze podczas procesu gojenia urazów skórnych. Jednakże rozpoznanie genów docelowych czynnika Foxn1, a w konsekwencji ich funkcji w procesie gojenia urazów skóry wciąż oczekuje na wyjaśnienie.

1.4. Hipoksja i indukowany hipoksją czynnik Hif-1α

Jednym z kluczowych bodźców środowiskowych, które mogą kierować zdolnościami naprawczymi vs regeneracyjnymi gojenia ran jest obniżona dostępność tlenu (hipoksja). Ostre niedotlenienie uszkodzonych tkanek, w tym skóry, jest czynnikiem wyzwalającym proces gojenia się ran (Lokmic i wsp. 2012). Jak wskazują dane literaturowe głównym regulatorem homeostazy tlenowej jest indukowany hipoksją czynnik Hif-1α. Czynnik transkrypcyjny Hif-1 jest heterodimerem złożonym z dwóch podjednostek, Hif-1α i Hif-1β (Xiao i wsp. 2013). w tkankach, w warunkach normalnej dostępności tlenu (normoksja), Hif-1α ulega szybkiej degradacji (proces potranslacyjny) w reakcji katalizowanej przez prolilo-4-hydroksylazy HIF (PHD) i czynnik hamujący Hif-1 (Fih-1, *ang. factor-inhibiting hypoxia-inducible factor*) w sposób zależny od tlenu. Obniżona dostępność tlenu blokuje degradację Hif-1α wskutek

niedoboru PHD i Fih-1 prowadząc ostatecznie do jego akumulacji. Dodatkowo stabilizacja poziomu białka Hif-1 α jest uzyskiwana przez aktywność tioredoksyny 1 (Txn1, *ang. thioredoxin 1*) (Welsh i wsp. 2002). Wskutek niedoboru tlenu podjednostka Hif-1 α nie ulega degradacji i możliwa jest jej heterodimeryzacja z podjednostką β , a następnie przyłączenie koaktywatora Hif-1 α – Ep300 (p300/CBP; Kallio i wsp. 1998). Taki kompleks wiąże się do specyficznej sekwencji DNA – HRE (*ang. hypoxia response element*), powodując aktywację transkrypcji wielu 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*) (Semenza 2004; Chen i wsp. 2012; Dengler i wsp. 2014). Ponadto, jako główny regulator homeostazy tlenowej, Hif-1 α bierze udział we wszystkich stadiach gojenia: migracji, proliferacji keratynocytów i fibroblastów, uwalniania cytokin oraz syntezy elementów macierzy zewnątrzkomórkowej. Liczne doniesienia wykazały, iż niedobór Hif-1 α prowadzi do chronicznej hipoksji, a w konsekwencji do niegojących się ran. Natomiast, wysoka ekspresja Hif-1 α jest odpowiedzialna za tworzenie blizn przerostowych (Hong i wsp. 2014). Dane te wskazują, że środowisko hipoksji oraz poziomy ekspresji Hif-1 α determinują gojenie urazów skórnych.

Wspomniane we wcześniejszym rozdziale badania Prof. Gawrońskiej-Kozak wykazały, że myszy z nieaktywnym czynnikiem transkrypcyjnym Foxn1 (Foxn1^{-/-}) są dorosłymi przedstawicielami modelu gojenia regeneracyjnego (bezbliźnowego) (Gawrońska-Kozak i wsp. 2004, 2006, 2011). Co niezwykle istotne, brak aktywności czynnika transkrypcyjnego Foxn1 jest cechą wspólną myszy nagich (Foxn1^{-/-}) oraz płodów ssaków (do trzeciego trymestru rozwoju płodowego), które rozwijają się w środowisku o obniżonej dostępności tlenu. Biorąc pod uwagę możliwe powiązanie aktywności Foxn1 i hipoksji w procesie gojenia urazów skórnych, Zespół Biologii Regeneracyjnej przeprowadził szczegółowe analizy ekspresji genów w skórze myszy Foxn1^{-/-} i Foxn1^{+/+}. Wysokoprzepustowe sekwencjonowanie nowej generacji, wykazało znaczące różnice w ekspresji genów związanych z hipoksją (m.in. Hif-1 α oraz Txn 1) pomiędzy myszami Foxn1^{+/+} i Foxn1^{-/-} (Kur-Piotrowska i wsp. 2017). Ponadto, doświadczenia *in vitro* wykazały, że ekspresja Foxn1 w hodowlach pierwotnych keratynocytów jest indukowana warunkami obniżonej dostępności tlenowej (Kur-Piotrowska i wsp. 2018). Zatem, jeśli hipoksja w warunkach *in vitro* indukuje ekspresję Foxn1, to czy hipoksja mająca miejsce w początkowych etapach procesu gojenia urazów skóry może angażować czynnik Foxn1? Wspomniane badania rzuciły nowe światło na fenomen bezbliźnowego procesu gojenia,

sugerując, iż interakcje pomiędzy Foxn1 a czynnikami związanymi z niską dostępnością tlenu (np. Hif-1 α) warunkują fizjologiczny wybór sposobu gojenia skóry: regeneracyjny vs reperacyjny.

1.5. Tioredoksyny- obrona antyoksydacyjna skóry

Jedną z ważniejszych ról jakie odgrywa układ tioredoksyn w skórze, jest obrona komórek przed stresem oksydacyjnym wywołanym hipoksją w miejscu urazu. Wiele badań wykazało, że środowisko o zredukowanych poziomie tlenu wpływa na stabilizację Hif-1 α , zwłaszcza poprzez aktywność tioredoksyny 1 (Welsh i wsp. 2002; Zhou i wsp. 2007; Cao i wsp. 2020). Tioredoksyny stanowią grupę białek enzymatycznych, których kluczowa rola polega na utrzymaniu homeostazy oksydoredukcyjnej. System tioredoksyn obejmuje: tioredoksyny (Txns, *ang. thioredoxins*), reduktazy tioredoksynowe (Txnrds, *ang. thioredoxin reductases*), fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADP, *ang. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) i białka oddziałujące z tioredoksynami. Do tej pory zidentyfikowano i opisano w komórkach ssaków dwie izoformy Txns: cytozolową Txn1 (12 kDa) i mitochondrialną Txn2 (15,5 kDa) oraz ich reduktazy – Txnrd1 i Txnrd2. Warto nadmienić, że dane literaturowe wskazują na obecność trzeciej niedawno zidentyfikowanej izoformy reduktazy tioredoksyny 3 (Txnrd3), jednak jak dotąd nie ustalono jej dokładnej funkcji i lokalizacji tkankowej.

Należy podkreślić, że prawidłowo działający system tioredoksyn chroni komórkę przed stresem oksydacyjnym, reguluje migrację, proliferację i apoptozę komórek, a także uczestniczy w transmisji sygnału poprzez regulację aktywności czynników transkrypcyjnych. Skóra narażona na zagrożenia środowiskowe, w tym urazy i stres oksydacyjny, rozwija skuteczny, ale nie do końca rozpoznany system naprawczy i antyoksydacyjny. w wyniku zranienia aktywowane są czynniki indukowane hipoksją m.in. Hif-1 α , cytoplazmatyczna forma Txn1 wzmacniająca aktywność Hif-1 α oraz będąca głównym niszczycielem wolnych rodników tlenowych. Wspomniane w poprzednich rozdziałach badania zespołu Prof. Gawrońskiej-Kozak wykazały, iż hipoksja moduluje ekspresję Foxn1 w keratynocytach (Kur-Piotrowska i wsp. 2017). Dalsze badania zespołu wykazały obecność aktywnej formy Txn w keratynocytach stymulowanych przez Foxn1 (Kur-Piotrowska i wsp. 2018). Tak więc nasuwa się pytanie czy istnieje możliwość interakcji układu tioredoksyn z czynnikiem transkrypcyjnym Foxn1 i warunkami obniżonej dostępności tlenowej? w niniejszej rozprawie poszukuje się odpowiedzi na to pytanie.

Biorąc pod uwagę przytoczone dane literaturowe oraz badania własne Zespołu Biologii Regeneracyjnej wskazujące na szeroki zakres działania Foxn1 założono, że czynnik transkrypcyjny Foxn1 poprzez współdziałanie z indukowanym hipoksją czynnikiem Hif-1 α i jego genami docelowymi może wpływać na przekierowanie procesu gojenia regeneracyjnego (bezbliźnowego) na gojenie naprawcze (bliźnowe).

2. Hipoteza i cele badawcze

W oparciu o badania własne i dostępne dane literaturowe, w ramach przedstawionej pracy doktorskiej, postawiono nadrzędną hipotezę badawczą, iż:

Indukowany hipoksją czynnik Hif-1 α poprzez współdziałanie z czynnikiem transkrypcyjnym Foxn1 przekierowuje proces gojenia regeneracyjnego (bezbliznowego) na gojenie reperacyjne (bliznowe).

Szczegółowe hipotezy sformułowano i poddano weryfikacji w dwóch zadaniach badawczych:

Hipoteza I:

Interakcja między czynnikiem transkrypcyjnym Foxn1, a indukowanym hipoksją czynnikiem Hif-1 α reguluje proces gojenie się ran skóry

Zadania badawcze:

1. Porównanie procesu gojenia ran skórnych pomiędzy myszami pozbawionymi aktywności czynnika Foxn1 (Foxn1^{-/-}), a osobnikami kontrolnymi (Foxn1^{+/+});
2. Wykazanie zależności pomiędzy aktywnością czynnika Foxn1 a ekspresją genów regulowanych hipoksją (1% O₂) w skórze niezranionej i pourazowej;
3. Zbadanie wpływu czynnika Foxn1 oraz zmiennych warunków dostępności tlenu (hipoksja vs normoksja) na poziomy ekspresji mRNA czynników związanych z obniżoną dostępnością tlenu w keratynocytach.

Hipoteza II:

Czynnik transkrypcyjny Foxn1 oraz hipoksja regulują zmiany fizjologiczne w keratynocytach na poziomie molekularnym i funkcjonalnym.

Zadania badawcze:

1. Wykazanie różnic w profilach białkowych keratynocytów transdukowanych wektorem adenowirusowym: Ad-Foxn1 lub Ad-GFP (kontrola), a następnie hodowanych w warunkach: normoksji (21% O₂) lub hipoksji (1% O₂);

2. Wyłonienie i usystematyzowanie białek zgodnie z pełnioną funkcją przy zastosowaniu ogólnodostępnych baz bioinformatycznych (G:profiler, Panther, String);
3. Zbadanie udziału Foxn1 w regulacji funkcji antyoksydacyjnej keratynocytów;
4. Wykazanie regulującego wpływu Foxn1 oraz hipoksji na cechy funkcjonalne keratynocytów w procesach związanych z gojeniem urazów skóry:
 - proliferacja
 - migracja
 - regulacja aktywności szlaków proangiogenicznych

3. Materiał i metody

3.1. Materiał badawczy

3.1.1. Zwierzęta

W serii doświadczeń *in vivo* wykorzystano 4-6 miesięczne myszy szczepu Balb/c: CBy.Cg-Foxn1 ^{-/-}/cmdb (Foxn1^{-/-}) oraz Balb/c/cmdb (Foxn1^{+/+}). Zwierzęta przebywały w indywidualnie wentylowanych klatkach (IVC) z kontrolowaną temperaturą (22°C) i wilgotnością (55%), a także regulowanym oświetleniem (12-godzinny cykl dzień/noc) ze stałym dostępem do wody i pożywienia. Doświadczenia na zwierzętach laboratoryjnych przeprowadzono w Centrum Medycyny Doświadczalnej (CMD) Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

W serii doświadczeń *in vitro* wykorzystano skórę pobraną od nowonarodzonych myszy szczepu C57BL/6 (Foxn1^{+/+}; w celu izolacji keratynocytów) oraz skórę pochodzącą od 8-11 tygodniowych myszy CBy.Cg-Foxn1 ^{-/-}/cmdb (Foxn1^{-/-}; w celu izolacji fibroblastów). Zwierzęta przebywały w pomieszczeniach o temperaturze 22±2°C oraz wilgotności 35-65%, a także regulowanym oświetleniu (12-godzinny cykl dzień/noc) ze stałym dostępem do wody i pożywienia w Zwierzętarni Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie.

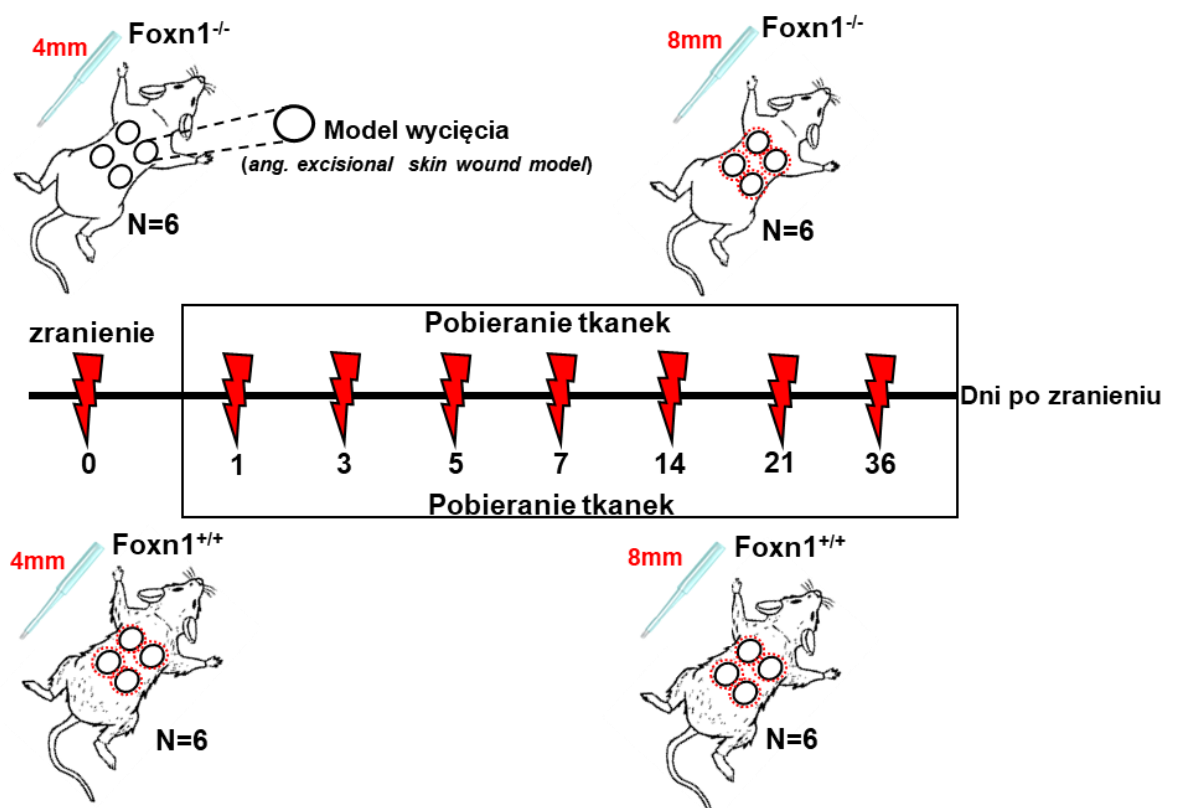
Procedury doświadczalne na zwierzętach zostały przeprowadzone za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie (zgoda nr 68/2018). Zwierzętarnie spełniają standardy utrzymania zwierząt oraz prowadzenia doświadczeń określone w Dyrektywie Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/EU z dnia 22 września 2010 roku.

Doświadczenie 1

- **Procedura wykonywania ran skórnych oraz pobierania tkanek**

W celu porównania przebiegu procesu gojenia ran skórnych pomiędzy myszami pozbawionymi aktywności czynnika Foxn1 (Foxn1^{-/-}), a osobnikami kontrolnymi (Foxn1^{+/+}), zwierzęta zostały poddane zranieniu stosując wycięcie jako model urazu skóry (*ang. excisional skin wound model*), (Rycina 4). Dzień przed eksperymentem myszy Foxn1^{+/+} usypiano poprzez wziewne podanie izofluranu. Sierść w części grzbietowej usuwano przy użyciu golarki elektrycznej, a ogoloną część skóry dezynfekowano wacikiem nasączonym

70% etanolem. Następnego dnia, myszy $Foxn1^{+/+}$ (n=48) i $Foxn1^{-/-}$ (n=48) usypiano poprzez wziewne podanie izofluranu, po czym skórę myszy dezynfekowano 70% etanolem. Przy pomocy sterylnych 4 mm sztanc biopsyjnych wykonano cztery przezskórne rany na grzbietach myszy. Wycięte w ten sposób fragmenty skóry stanowiły kontrolę (tkanka niezraniona, dzień 0). Po wykonaniu ran skórnych zwierzęta zostały przeniesione do indywidualnych klatek i obserwowane do czasu wybudzenia. Następnie, w dniach 1, 3, 5, 7, 14, 21 i 36 po zranieniu (n=6/dzień zranienia/grupa myszy), zwierzęta usypiano przez wziewne podanie izofluranu (dawka początkowa 3-4 %; dawka podtrzymująca 2,5 %) oraz uśmiercano poprzez dekapitację. Tkanki pourazowe pobierano przy użyciu sztanc biopsyjnych o średnicy 8 mm (Rycina 4). Pobrane próbki skóry: (1) umieszczano w ciekłym azocie i przechowywano do czasu izolacji RNA oraz białka, lub (2) utrwalano w 10% formalinie bądź 4% paraformaldehydzie w celu przeprowadzenia analiz immunohistochemicznych oraz immunofluorescencyjnych.



Rycina 4. Schemat ranienia zwierząt oraz pobierania tkanek pourazowych od myszy $Foxn1^{-/-}$ i $Foxn1^{+/+}$. Opracowanie własne wykonane w programie Biorender.

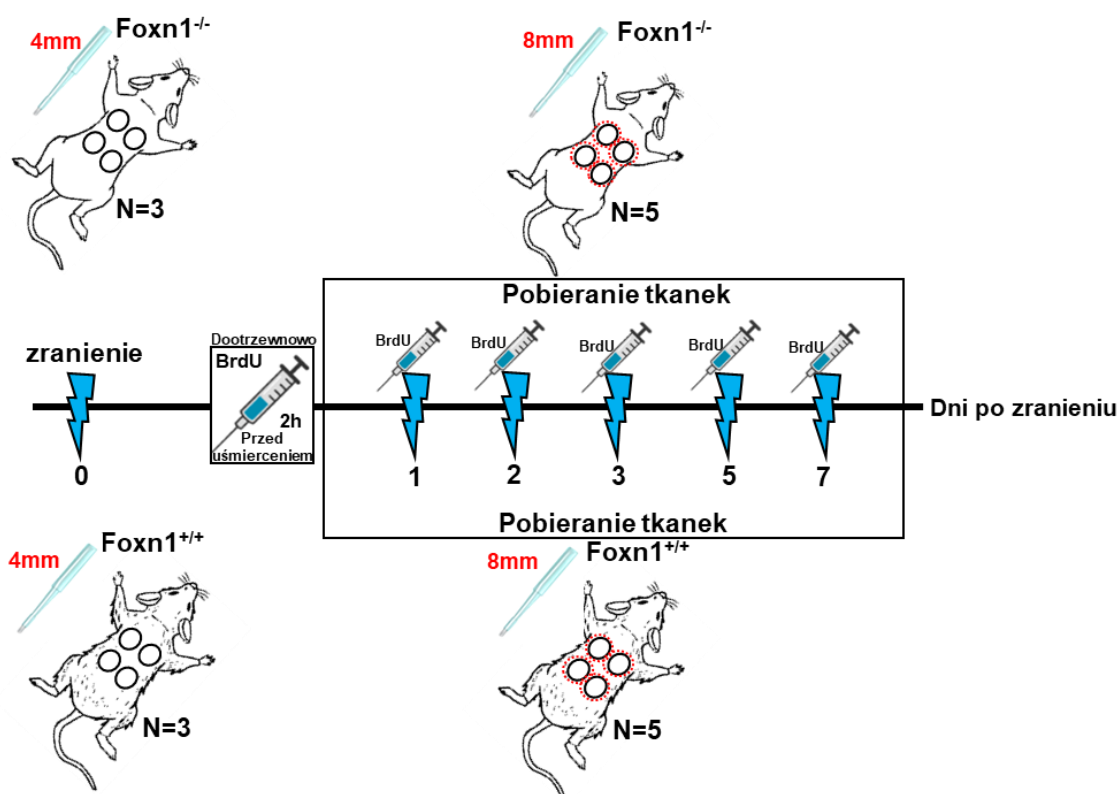
Doświadczenie 2

• Procedura wykonywania ran skórnych oraz znakowania bromodeoksyurydyną (BrdU)

Aby zidentyfikować oraz porównać odsetek aktywnie proliferujących komórek w zranionej skórze myszy $Foxn1^{-/-}$ i $Foxn1^{+/+}$ zastosowano przyżyciowe znakowanie bromodeoksyurydyną (BrdU). w celu ustalenia optymalnego czasu inkorporacji BrdU do proliferujących komórek wykonano doświadczenie wstępne z wykorzystaniem myszy szczepu C57BL/6 ($Foxn1^{+/+}$), które na 2 lub 4 godziny przed uśmierceniem otrzymywały dootrzewnową iniekcję BrdU. Dzień przed wykonaniem doświadczenia wstępnego myszy ogolono, a następnie w dniu doświadczenia zwierzęta usypiano poprzez wziewne podanie izofluranu. Ogoloną skórę zdezynfekowano 70% etanolem. Na grzbiecie zwierząt przy użyciu sztańc biopsyjnych, wykonano cztery rany skórne o średnicy 4 mm. w dniach 1 (n=4), 3 (n=2), 5 (n=2) i 7 (n=2) po zranieniu myszy ponownie usypiano i podano dootrzewnowo znacznik BrdU (4 mg BrdU w 300 μ l soli fizjologicznej/na mysz). Tkanki pourazowe skóry zbierano pośmiertnie w drugiej (n=10) lub czwartej (n=10) godzinie po podaniu znacznika BrdU.

Zawiesiny komórek skóry uzyskane w wyniku enzymatycznego trawienia kolagenazą (1,36 mg/ml, 80 minut) analizowano metodą cytometrii przepływowej z zastosowaniem przeciwciał anti-BrdU. Największy odsetek komórek BrdU pozytywnych uzyskano w próbach izolowanych 2 godziny po przyżyciowym wstrzyknięciu znacznika, dlatego też czas ten zastosowano w doświadczeniu właściwym.

W głównym doświadczeniu wykorzystano myszy $Foxn1^{-/-}$ (CBy.Cg- $Foxn1^{tm1.1Jax}$; n=28) i myszy kontrolne $Foxn1^{+/+}$ (Balb/c/cmdb; n=28) (Rycina 5). Proces ranienia zwierząt przeprowadzano zgodnie z procedurą zastosowaną w doświadczeniu wstępnym. Ranione zwierzęta otrzymały dootrzewnową iniekcję BrdU na 2 godziny przed uśmierceniem w dniach 1, 2, 3, 5 i 7 po zranieniu (Rycina 5). Tkanki pobierano przy użyciu sztańc biopsyjnych o średnicy: 4 mm w dniu 0 (tkanka niezraniona; n=3/grupa doświadczalna myszy) oraz 8 mm w dniach 1, 2, 3, 5 i 7 po zranieniu (n=5/dzień zranienia/grupa doświadczalna myszy). Jedną z czterech prób (pourazowych obszarów) utrwalano w 10% formalinie w celu przeprowadzenia analiz histologicznych. Pozostałe fragmenty skóry zawierające 3 obszary zranienia przeznaczono do izolacji komórek oraz analizy z zastosowaniem cytometrii przepływowej.



Rycina 5. Schemat ranienia zwierząt, iniekcji BrdU oraz pobierania tkanek pourazowych od myszy $Foxn1^{-/-}$ i $Foxn1^{+/+}$. Opracowanie własne wykonane w programie Biorender.

3.2. Metody

3.2.1. Hodowle komórkowe

W przeprowadzonych doświadczeniach *in vitro* wykorzystano:

- komórki naskórka – keratynocyty;
- komórki skóry właściwej – fibroblasty (*ang. dermal fibroblasts; DFs*);

Keratynocyty

Keratynocyty izolowano ze skóry nowonarodzonych (1-5 dniowych) myszy $Foxn1^{+/+}$ i $Foxn1^{-/-}$ uśmiercanych przez dekapitację. Wyciętą skórę płukano w 70% etanolu oraz w sterylnym, ciepłym buforze fosforanowym (PBS) o pH 7,4 z dodatkiem antybiotyku (1% penicyliny/streptomycyny). Pobrane próbki skóry inkubowano w roztworze dispazy (6 U/mL) przez noc w temperaturze 4°C. Oddzielony naskórek trawiono w 0,05% trypsinie-2mM EDTA (37°C) w serii 3x trawień po 3 minuty. Działanie enzymu neutralizowano poprzez dodanie medium DMEM/F12 z dodatkiem 15% FBS i 1% roztworu penicyliny

i streptomycyny. Uzyskaną zawiesinę komórek filtrowano przez filtr o średnicy porów 70 μm , następnie wirowano przy 270 x g przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Po wirowaniu nadsącz usuwano, a wyizolowane keratynocyty liczono przy użyciu błękitu trypanu i licznika komórek Countess. Komórki zawieszano, a następnie wysiewano w medium DMEM/F12 wzbogaconym w 10% FBS z dodatkiem antybiotyku (Primocin; 0,2%) oraz 120 μM β -merkaptotoetanolu ($p=0$). Po 24 godzinnej hodowli media były zmieniane na medium dedykowane do hodowli keratynocytów (CELLnTEC). Wszystkie doświadczenia wykonano z użyciem hodowli pierwotnych keratynocytów ($p=0$).

Fibroblasty skóry właściwej (DFs)

DFs izolowano ze skóry młodych myszy Foxn1^{-/-} lub Foxn1^{+/+} uśmiercanych przez przedawkowanie dwutlenku węgla. Tkankę pobierano z grzbietu i przepłukiwano w 70% roztworze alkoholu etylowego oraz w sterylnym PBS, a następnie cięto na drobne fragmenty przy pomocy nożyczek. Rozdrobnioną tkankę poddawano trawieniu enzymatycznemu w roztworze kolagenazy typu I (3,68 mg/ml) przez 80 minut w wytrząsarce inkubatora w temperaturze 37° C. Uzyskaną zawiesinę komórek filtrowano przez filtr o średnicy porów 100 μm . Następnie komórki wirowano przez 5 minut przy 270 x g w temperaturze pokojowej. Nadsącz usuwano, a osad komórkowy zawieszano w medium DMEM/F12 z 15% FBS z dodatkiem antybiotyku (gentamycyna/amfoterycyna). Komórki wysiewano na płytki typu Petri o średnicy 60 mm bądź 100 mm ($p=0$). Po osiągnięciu konfluencji, komórki przepłukiwano w PBS oraz poddawano działaniu 0.05% roztworu trypsyny przez 4 minuty w temperaturze 37°C. Do zawiesiny komórek dodawano świeże medium, komórki liczono, ponownie wirowano, a następnie zawieszano w medium do mrożenia, które stanowiło DMEM/F12 z 15% FBS oraz 10% DMSO i przechowywano w ciekłym azocie do dalszych eksperymentów.

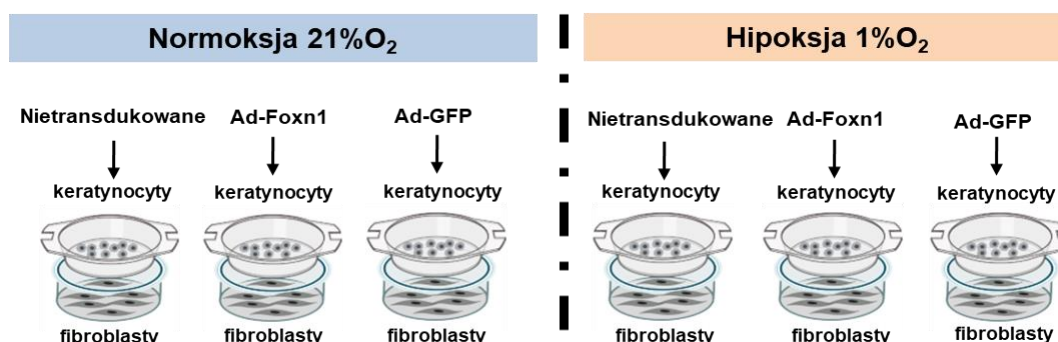
Transdukcja keratynocytów

Transdukcję przeprowadzono z wykorzystaniem adenowirusów: Foxn1-GFP (Ad-Foxn1) oraz kontrolnego (Ad-GFP) które otrzymano od Profesor Janice L. Brissette (Harvard Medical School, Boston, MA/State University of New York Downstate Medical Center: Brooklyn, NY) (Li i wsp. 2007). Namnażanie adenowirusów zostało przeprowadzone przez dr Artura Padzika (Turku Center for Biotechnology, Turku, Finlandia/Biovian Oy, Turku, Finlandia). Keratynocyty ($p=0$) wysiewano w insertach (membrana PET 0,4 μm). Konfluentne keratynocyty (70%) przepłukiwano sterylnym roztworem PBS, a następnie

transdukowano adenowirusem niosącym Foxn1-GFP (Ad-Foxn1) lub wektorem kontrolnym (Ad-GFP), zawieszonymi w medium podstawowym przeznaczonym do hodowli keratynocytów (CELLnTEC). Po 4 godzinach do każdego insertu dodawano medium przeznaczone do hodowli keratynocytów wzbogacone w suplementy zgodnie z zaleceniami producenta.

Model kokultury

Keratynocyty Foxn1^{+/+} lub Foxn1^{-/-} ($p=0$) wysiewano w insertach, które następnie dzielono na 3 grupy: (1) keratynocyty nietransdukowane (2) keratynocyty transdukowane adenowirusem Ad-Foxn1 lub (3) keratynocyty transdukowane Ad-GFP (kontrola). Po 4 godzinnej inkubacji z adenowirusem keratynocyty zestawiano z DFs rosnącymi na płytkach 6-dołkowych (Rycina 6) i hodowano przez 12 (Publikacja 1, Figura 9), lub 24 (Publikacja 1, Figura 9 i Publikacja 2, Figura 1 i 8) godziny w warunkach normoksji (21% O₂) lub hipoksji (1% O₂) w inkubatorach w temperaturze 37°C.



Rycina 6. Schemat doświadczenia in vitro z wykorzystaniem modelu kokultury i transdukcji wektorem adenowirusowym. Opracowanie własne wykonane w programie Biorender.

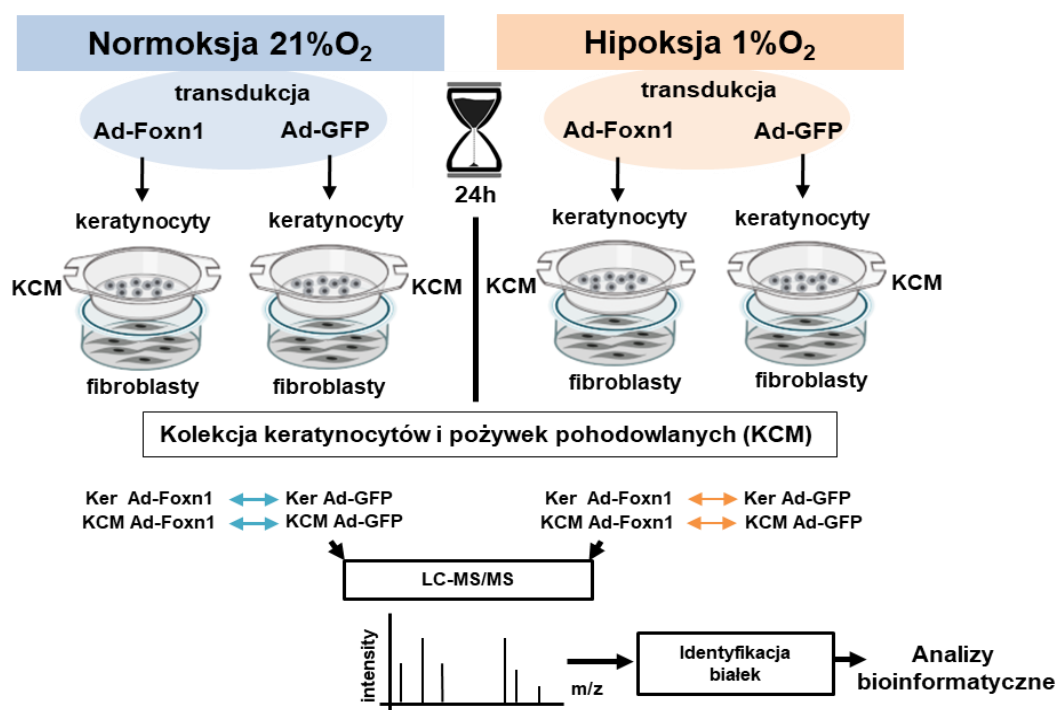
3.2.2. Analiza proteomiczna

Model kokultury keratynocyty-DFs z przeznaczeniem do analiz proteomicznych

Keratynocyty wyizolowane od myszy Foxn1^{+/+} transdukowano Ad-Foxn1 lub Ad-GFP i hodowano wspólnie z DFs pochodzącymi od myszy Foxn1^{-/-} (model kokultury) przez 24 godziny w warunkach normoksji (21% O₂) lub hipoksji (1% O₂) (Rycina 7).

Ekstrakcja białek keratynocytów

Keratynocyty przepłukiwano zimnym PBS i poddawano lizie przy użyciu buforu 2% SDS, 50mM Tris-HCl (pH 7,55) z dodatkiem inhibitorów proteaz (1%), przez 10 minut na lodzie. w kolejnym etapie, keratynocyty zeszkrobowano z insertu plastikową skrobaczką, a powstałą zawiesinę komórek umieszczano w schłodzonych probówkach i poddawano sonikacji w 3 seriach po 20 sekund, w amplitudzie 20kHz przy użyciu sonikatora Vibra-Cell VCX 130PB. Uzyskane lizaty komórkowe inkubowano przez 45 minut na lodzie i odwirowywano przy 10 000 x g przez 15 minut w 4°C. Powstały supernatant przenoszono do nowych probówek i przechowywano w temperaturze -80°C do dalszych analiz. Koncentrację białka mierzono przy użyciu standardowego protokołu BCA.



Rycina 7. Schemat eksperymentu proteomicznego. Opracowanie własne wykonane w programie Biorender.

Przygotowanie mediów pochodowlanych do analizy proteomicznej

Keratynocytowe media pochodowlane (KCM, ang. *keratinocytes conditional medium*) zbierano z keratynocytów transdukowanych wektorem adenowirusowym: Ad-Foxn1 lub Ad-GFP i hodowanych w kokulturze z fibroblastami skóry (model kokultury, Rycina 6) przez 24 godziny w warunkach normoksji (21% O₂) lub hipoksji (1% O₂). Zebrane media pochodowlane odwirowywano przy 300 x g przez 10 minut w 4°C, a następnie filtrowano

i przechowywano w -80°C w celu przeprowadzenia precypitacji białka do analiz proteomicznych.

Precypitacja białka z mediów pohodowlanych

Do rozmrożonych keratynocytowych mediów pohodowlanych dodawano 2% roztwór deoksycholanu sodu (v/v) i inkubowano na lodzie przez 30 minut. Następnie, do każdej próby dodawano kwas trichlorooctowy do stężenia 7,5% (v/v) i inkubowano ponownie na lodzie przez 60 minut. Wytrącone białka odwirowywano przy $15\,000 \times g$ przez 20 minut w 4°C , a supernatanty odrzucano. Osady płukano w 20 ml 100% aceton (-20°C), następnie inkubowano przez 10 minut w temperaturze -20°C . Po odwirowaniu ($15\,000 \times g$ przez 5 minut w 4°C), supernatanty odrzucano. Płukanie osadu białkowego powtarzano dwukrotnie poprzez dodanie 5 ml 100% acetonu (-20°C). Powstały osad suszono na powietrzu przez 10 minut i rozpuszczano w 2% SDS i 50mM Tris-HCl (pH 7,55). Stężenie białek określano metodą BCA.

Protokół mikrokolumnowy S-Trap

Próby białek wyizolowanych z keratynocytów i ich mediów pohodowlanych rozmrażano, i sonikowano (5 minut w cyklach 30 sekundowych). Następnie próby wirowano przez 10 min przy $16\,000 \times g$. Białka trawiono przy użyciu trypsyny na mikrokolumnach S-Trap. Objętość próbek wyrównywano do objętości 150 μl przy użyciu 2% SDS w 100 mM wodorowęglanie trietyloamoniowym (TEAB), pH 7,1. Redukcję mostków dwusiarczkowych białek przeprowadzano z użyciem 5,5 mM lub 9,5 mM 1,4-ditiotreitolu (DTT, dla prób keratynocytów i KCM odpowiednio) w 100 mM TEAB. Próby inkubowano w 37°C przez 1 godzinę. Alkilację reszt sulfhydrylowych cysteiny przeprowadzano z użyciem 25mM lub 37 mM jodoacetamidu (IAA, dla prób keratynocytów i KCM odpowiednio) w 100 mM TEAB. Próby inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Reakcję zatrzymywano przez dodanie 25 mM lub 36 mM DTT. Następnie do wszystkich próbek dodawano wodny kwas fosforowy do uzyskania stężenia 1,2%. w kolejnym etapie dodawano sześć objętości 90% metanolu w 100 mM TEAB.

Próby nanoszono na kolumny S-Trap, które następnie wirowano przy $4\,000 \times g$ do momentu przejścia całej objętości prób przez kolumnę. Związane białka przemywano czterokrotnie 150 μl 90% MeOH w 100 mM TEAB, pH 7,1. Białka trawiono w 20 μl 50mM wodorowęglanu amonu zawierającego 1 lub 1,5 μg trypsyny, a następnie inkubowano przez 2

godziny w 47°C. Peptydy wymywano w trzech etapach. Po każdym etapie następowało odwirowanie przy prędkości obrotowej wirówki 4000 x g. w pierwszym kroku na kolumnę nanoszono 40 µl 50mM roztworu wodorowęglanu amonu i inkubowano przez 30 minut. Następnie nanoszono wodny roztwór kwasu mrówkowego. Peptydy hydrofobowe eluowano z użyciem 35 µl 50% acetonitrylu zawierającego 0,2% kwas mrówkowy. Wyeluowane peptydy suszono poprzez odparowanie roztworu w SpeedVac.

Przed analizą do peptydów dodawano 0,1% kwas mrówkowy, a stężenia peptydów mierzono za pomocą spektrofotometru NanoDrop One. w celu kalibracji czasu retencji peptydów, próbki wzbogacano peptydami iRT (Biognosys AG) w stosunku 1:40. Do analizy spektrometrii masowej użyto 400ng peptydów z próbek KCM i 500ng peptydów z keratynocytów.

Analiza białka metodą LC–MS/MS

Analizę LC-MS/MS przeprowadzano w systemie nanoflow HPLC w połączeniu z spektrometrem masowym Orbitrap Fusion Lumos z jonizacją przez elektrorozpylanie. Peptydy związano na kolumnie typu trapp, a następnie rozdzielono liniowo na kolumnę C18 (75µmx15cm, ReproSil-Pur 5µ 200 a C18-AQ, Dr. Maisch HPLC GmbH). Faza ruchoma składała się z wody z 0,1% kwasem mrówkowym (rozpuszczalnik A) i acetonitryl/woda (80:20; v/v) z 0,1% kwasem mrówkowym (rozpuszczalnik B). Peptydy wymywano stosując liniowy dwustopniowy gradient. Do KCM zastosowano gradient 80 minut natomiast do lizatów komórkowych zastosowano gradient 120 minut. Dane MS były pozyskiwane automatycznie przez oprogramowanie Thermo Xcalibur 4.1. Akwizycja niezależna od danych (Data Independent Acquisition – DIA) zawierała jeden kompletny skan (400-1000 m.z) oraz 40 skanów MS/MS w zakresie 400-1000 m/z.

Parametry analizy danych

Dane proteomiczne zostały przetworzone przy użyciu oprogramowania Spectronaut 14.3. Przeprowadzono bezbiblioteczną analizę directDIA z plikiem FASTA o Mus musculus (SwissProt, 5.12.2019). Białka z wartością q niższą lub równą 0.05 oraz bezwzględnym stosunkiem log2 powyżej 0.58 uznano za istotnie różniące (*Publikacja 2, Materiały i Metody; Sekcja 2.9*).

3.2.3. Analizy bioinformatyczne

Analizę ontologii genów (GO) zróżnicowanych białek przeprowadzono przy użyciu internetowych narzędzi bioinformatycznych: PANTHER (*ang. Protein Analysis Through Evolutionary Relationships*) i g:Profiler (*ang. Gene list functional enrichment analysis and namespace conversion*). Następnie zastosowano Encyklopedię Kyoto Genów i Genomów (KEGG, *ang. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) do analizy ścieżek biologicznych zaangażowanych w odpowiedź komórkową na transdukcję Ad-Foxn1 lub Ad-GFP w warunkach hipoksji lub normoksji. Do analizy potencjalnych interakcji białko-białko użyto internetowej bazy STRING (z odcięciem średniego wyniku ufności 0,4). Sieci interakcji białko-białko zbudowano za pomocą oprogramowania Cytoscape, zaś mapę termiczną (heatmap) zawierającą wyselekcjonowane białka wyekstrahowane z keratynocytów transdukowanych Ad-Foxn1 w warunkach hipoksji lub normoksji stworzono przy użyciu programu GraphPad Prism w wersji 9.0.

Identyfikację miejsc/motywów wiązania czynnika transkrypcyjnego Foxn1 w obrębie systemu tioredoksyn (Txn1, Txn2, Txnrd1, Txnrd2 i Txnrd3) przeprowadzono z wyodrębnieniem sekwencji promotorowych tioredoksyn i ich reduktaz w zakresie od -3000 pz do +200 pz względem miejsca startu transkrypcji (TSS) przy użyciu bazy danych EPD-Eukariotic Promoter Database. Określony region został skanowany w poszukiwaniu dopasowań do miejsca wiązania Foxn1 (GACGC) przy wartości p odcięcia $\leq 0,01$ lub wartości $p \leq 0,001$ przy użyciu FIMO w obrębie MEME Suite 5.4.1.

3.2.4. Test właściwości angiogennych

Ludzkie komórki śródbłónka żyły pępowinowej (*ang. Human Umbilical Endothelial Vein; HUVEC*) ($p=2$; komercyjnie dostępna linia komórkowa; ScienCell Research Laboratories) wysiewano na płytce hodowlanej typu flask T25 w gęstości 1×10^6 w medium dedykowanym do wzrostu komórek śródbłónka EBMTM-2. Po 3 dniowej hodowli, medium pełnowartościowe usuwano i przez 1 godzinę komórki inkubowano w niepełnowartościowym (pozbawionym suplementów) medium hodowlanym EBMTM-2 z 0,5% FBS (Wiśniewska i wsp. 2021). Następnie komórki płukano PBS oraz poddawano działaniu roztworu trypsyny 0.05%, przeliczano i wysiewano na płytce 96 dołkowej μ -Plate Angiogenesis w ilości $2,5 \times 10^4$ komórek / dołek. Przed wysianiem komórek każdy dołek płytki opłaszczano 10 μ l GeltrexTM Reduced Growth Factor Basement Membrane. Komórki inkubowano z mediami

pohodowlanymi keratynocytów (opisane w sekcji: przygotowanie mediów pohodowlanych do analiz proteomicznych):

1. KCM-hipoksja Ad-Foxn1
2. KCM-hipoksja Ad-GFP
3. KCM-normoxia Ad-Foxn1
4. KCM-normoksja Ad-GFP

rozcieńczonymi w stosunku 1:1 z medium dedykowanym do hodowli HUVEC (EBMTM-2). Jako próbę kontrolną zastosowano medium przeznaczone do hodowli keratynocytów (CELLnTEC) rozcieńczone w stosunku 1:1 w medium EBMTM-2, z dodatkiem antybiotyku (1% penicylina/streptomycyna). Przebieg powstawania przestrzennych struktur kapilarnych był monitorowany i fotografowany w czasie rzeczywistym przy użyciu mikroskopu Zeiss Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss Microscopy) wyposażonego w oprogramowanie ZEN2.6 (wersja Blue) (Carl Zeiss Microscopy). Zdjęcia wykonywano w punktach czasowych 0, 6, 12 i 18 godzin. Obrazy analizowano za pomocą oprogramowania CellSens Dimension wzbogaconym o moduł do analizy struktur przestrzennych (np. sieci neuronowej) TruAI. w przestrzennych, kuboidalnych strukturach utworzonych przez komórki endotelialne wyodrębniono na podstawie pola powierzchni (μm^2) trzy typy form: małe (2000–10 000 μm^2), średnie (10 000–50 000 μm^2) i duże (>50 000 μm^2).

3.2.5. Aktywność metaboliczna komórek (MTT)

Keratynocyty izolowano ze skóry nowonarodzonych myszy Foxn1^{+/+} ($p=0$) uśmiercanych przez dekapitację. Komórki wysiewano na 24-dołkowych płytkach w gęstości 3×10^5 . Po osiągnięciu 50%–60% konfluencji, keratynocyty transdukowano wektorem adenowirusowym: Ad-Foxn1 lub Ad-GFP i hodowano przez 24 godziny w warunkach normoksji (21% O₂) lub hipoksji (1% O₂). Następnie do każdego dołka dodawano po 10 μl sterylnego roztworu MTT (bromek 3-(4,5- dimetylotiazol-2-yl)- 2,5-difenylo-tetrazoliowy; 5 mg/ml) i inkubowano przez 4 godziny w warunkach normoksji lub hipoksji. Po inkubacji medium usuwano, a powstałe kryształy formazanu rozpuszczano poprzez 30 minutową inkubację w 100 μl DMSO w 37° C z delikatnym wytrząsaniem (30 obrotów/minutę). Absorbancję mierzono przy długości fali 570 nm za pomocą spektrofotometru mikropłytkowego (spektrofotometr mikropłytkowy Multiskan Sky).

3.2.6. Migracja keratynocytów

Keratynocyty izolowano ze skóry nowonarodzonych myszy $Foxn1^{+/+}$ ($p=0$) uśmiercanych przez dekapitację. Komórki wysiewano na 12-dołkowych płytkach w gęstości $0,6 \times 10^6$. Po osiągnięciu 50%–60% konfluencji keratynocyty transdukowano za pomocą wektora: Ad-Foxn1 lub Ad-GFP. Keratynocyty inkubowano przez 3 godziny z mitomycyną C ($10 \mu\text{g/ml}$; inhibitor replikacji DNA) zawieszoną w medium keratynocytowym (CELLnTEC) wraz z suplementami. w następnym etapie przy użyciu końcówki pipety $200 \mu\text{l}$ wykonywano tzw. test zarysowania polegający na wykonaniu prostego zadrapania biegnącego przez środek każdego dołka płytki 12-dołkowej. Komórki jednokrotnie przepłukiwano PBS, a następnie dodawano świeże medium z suplementami. Płytki umieszczono w inkubatorach w warunkach normoksji ($21\% \text{O}_2$) lub hipoksji ($1\% \text{O}_2$). w 3, 6, 20, 24 oraz 30 godzinie po wykonaniu testu zadrapania wykonywano zdjęcia mikroskopowe. Szybkość migracji komórek obliczono na podstawie odległości pomiędzy zarysowanymi krawędziami w miejscu wykonania zadrapania. Odległość w godzinie 0 uznano za fazę początkową testu zarysowania.

3.2.7. Cytometria przepływowa

Niezeranione (dzień 0; $n=3$) lub pourazowe (dni 1, 3, 5, 7; $n=5$ /na każdy dzień ranienia) tkanki skórne pobrane od myszy $Foxn1^{-/-}$ oraz $Foxn1^{+/+}$ trawiono w roztworze kolagenazy i o stężeniu $3,68 \text{ mg/mL}$ przez 80 minut w 37°C . Wyizolowane komórki skóry filtrowano przez filtr o średnicy porów $100 \mu\text{m}$ i $70 \mu\text{m}$, przesącz wirowano przy $270 \times g$ przez 5 minut w temperaturze pokojowej, zaś uzyskane komórki liczono. Następnie, komórki zawieszano w ciepłym sterylnym PBS i inkubowano ze znakowanymi fluorochromami przeciwciałami anty: -CK6, -CD68, -CD44-PE, -CD45-PE-Cy7, -BrdU postępując zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta (BD Pharmingen BrdU Kit). Wszystkie wybarwione komórki analizowano za pomocą cytometru przepływowego BD LSR Fortessa wyposażonego w oprogramowanie BD FACSDiva TM v6.2.

3.2.8. Proliferacja komórkowa

Keratynocyty izolowano ze skóry nowonarodzonych myszy $Foxn1^{+/+}$ ($p=0$), a następnie komórki wysiewano na płytkach 6-dołkowych o gęstości 1×10^6 . Po osiągnięciu około 70% konfluencji komórki transdukowano wektorem: Ad-Foxn1 lub Ad-GFP, a następnie hodowano w warunkach hipoksji lub normoksji. Po 8 godzinnej hodowli, do komórek dodawano $10 \mu\text{l}$ BrdU (10mM) i inkubowano przez kolejne 16 godzin. Następnie keratynocyty trypsynizowano ($0,05\%$ trypsyny), zneutralizowano w medium DMEM/F12 z 15% FBS i 1% penicyliny/streptomycyny i policzono. w kolejnym kroku keratynocyty

wirowano przy 270 x g przez 5 minut w temperaturze pokojowej i zawieszano w ciepłym, sterylnym PBS zgodnie z z protokołem dostarczonym przez producenta (BD Pharmingen BrdU Kit). Komórki analizowano za pomocą cytometru przepływowego BD LSR Fortessa wyposażonego w oprogramowanie BD FACSDiva TM v6.2.

3.2.9. Makroskopowa analiza procesu gojenia urazów skórnych

Proces gojenia ran monitorowano makroskopowo, analizując zdjęcia cyfrowe wykonane w dniach 1, 3, 5, 7, 14, 21 i 36 po urazie. Do pomiarów wielkości ran stosowano ogólnodostępne oprogramowanie ImageJ. Rozmiar rany (mm^2) obliczano na podstawie pola elipsy wg wzoru: promień długości $\times$ promień szerokości $\times \pi$ (Gawrońska-Kozak i wsp. 2016).

3.2.10. Izolacja RNA oraz łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym z odwrotną transkrypcją (RT-qPCR)

Całkowite RNA ekstrahowano z pobranych tkanek skórnych oraz hodowli komórkowych z wykorzystaniem odczynnika TRI Reagent w oparciu o zmodyfikowaną metodę Chomczyński i Sacchi (1987). Ilość oraz jakość otrzymanego RNA oceniano odpowiednio przy użyciu spektrofotometru Nano Drop oraz wykonując elektroforezę w żelu agarozowym. cDNA syntetyzowano z 500 ng całkowitego RNA stosując zestaw High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit zgodnie z zaleceniami producenta. Analizę ekspresji mRNA badanych genów (*Foxn1*, *Fih-1*, *Arnt-2*, *Collagen 1*, *Collagen 3*, *Mmp-9*, *Timp-1*, α -SMA, *Vegfa*, *Ker 10*, *Ker 14*, *Txn1*, *Txnrd1*, *Txn2*, *Txnrd2*, *Txnrd3*, *Ep300*, *Tgfb-1*, *Tgfb-3*, *CD68*) wykonywano z zastosowaniem komercyjnych sond Single Tube TaqMan® Gene Expression Assays. Jako najbardziej stabilny gen referencyjny wybrano fosforybozylotransferazę hipoksantynowo-guaninową (*Hprt1*). Reakcję amplifikacji przeprowadzono w termocyklerze 7900HT Fast Real-Time PCR System stosując następujące warunki: wstępna denaturacja przez 10 minut w 95° C; 40 cykli po 15 sekund w 95° C i 1 minutę w 60° C. Wartości ekspresji badanych genów odczytano z krzywej standardowej, a normalizację wykonywano względem genu referencyjnego *Hprt1*, mnożąc wynik przez 10.

3.2.11. Analiza ekspresji białek metodą Western Blot

Próbki skóry pobrane w dniach 0, 1, 3, 5, 7, 14, 21 i 36 po zranieniu od myszy *Foxn1*^{-/-} oraz *Foxn1*^{+/+}, rozdrabniano w oparach ciekłego azotu i homogenizowano w buforze RIPA (ang. radioimmunoprecipitation assay buffer) zawierającym inhibitory proteaz. Keratynocyty z hodowli *in vitro* przepłukiwano PBS, a następnie poddawano lizie w buforze RIPA

z inhibitorami proteaz i fosfataz. Natomiast do oszacowania poziomu białka Hif-1 α (białko jądrowe) frakcję jądrową z próbek skóry z doświadczenia *in vivo* ekstrahowano poprzez lizę tkanek w buforze NE-PER (odczynniki do ekstrakcji jądrowej i cytoplazmatycznej) uzupełnionym inhibitorami proteaz. Dalszą część procedury wykonano zgodnie z protokołem załączonym przez producenta.

Wszystkie próby, zarówno rozdrobnione tkanki jak i materiał pochodzących z hodowli komórkowej poddawano procesowi sonikacji (3 cykle po 5 sekund przy amplitudzie 40%), z następującą 45 minutową inkubacją na lodzie. Uzyskane lizaty wirowano przy 10 000 x g przez 15 minut w temperaturze 4°C, a uzyskany supernatant zbierano do nowej probówki. Stężenie białka mierzono przy użyciu spektrometru Direct Detect. Następnie do prób o koncentracji 35-50 μ g białka dodawano bufor redukujący Laemmliego. Białka denaturowano w termocyklerze przez 5 minut w temperaturze 95°C. w kolejnym kroku dokonywano rozdziału elektroforetycznego białek w 9% żelu trycynowym. Białka przenoszono na drodze mokrego transferu na aktywowaną uprzednio w metanolu membranę z polifluorku winylidenu (PVDF). Membranę po transferze blokowano w roztworze Odyssey Blocking Buffer w połączeniu z buforem PBS w stosunku 1:1. Następnie membrany inkubowano przez noc z przeciwciałami pierwszorzędowymi (anty-Mmp 9, anty-ker 10, anty-ker 14, anty-VE-cadherin, anty-Vegfa, anty-Txn1, anty-Hif-1 α , anty-Ccn2, anty- β -aktyna) w temperaturze 4°C. Następnego dnia membrany inkubowano 1 godzinę z drugorzędowymi przeciwciałami fluorescencyjnymi (Alexa Fluor 594, IRDye 800 oraz Cy5.5). Wizualizację membran przeprowadzono w aparacie ChemiDoc Imaging System i analizowano za pomocą oprogramowania Image Lab wersja 6.0.

3.2.12. Histologia

Barwienie immunohistochemiczne

Próbki skóry utrwalano w formalinie, zatopiano w parafinie zgodnie ze standardowym protokołem i cięto na skrawki o grubości 3 μ m. Przed rozpoczęciem barwień skrawki poddawano deparafinizacji poprzez inkubację preparatów w dwóch zmianach ksylenu (2 x 15 minut) oraz uwodnieniu w szeregu alkoholi etylowych o malejących stężeniach 100%, 100%, 96%, 96%, 70%, 70%, 50% (po 5 minut w każdym ze stężeń). Preparaty przeznaczone do wykrywania kolagenu wybarwiano trójbarwną metodą wg Massona zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta (kit Masson trichrome). Pozostałe preparaty płukano w buforze PBS (3 x 5 minut), a następnie gotowano w buforze cytrynianowym o pH 6.0 przez

30 minut w celu odsłonięcia determinant antygenowych. Po 10 minutowym chłodzeniu, preparaty płukano w wodzie destylowanej i PBS, a następnie przeprowadzono inaktywację endogennej peroksydazy poprzez inkubację skrawków w 3% roztworze nadtlenu wodoru. Niespecyficzne miejsca wiążące antygeny blokowano poprzez inkubację w 10% mieszaninie surowicy koziej lub końskiej z 1% BSA przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Zaraz po inkubacji, skrawki trzykrotnie płukano w buforze PBS (3 x 5 minut) oraz inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi (anty-Ki67, anty-CD68, anty-keratyna 16, anty-BrdU, anty-Txn1, anty-Ccn2) przez noc w temperaturze 4°C. Po inkubacji preparaty trzykrotnie płukano w buforze PBS (3 x 5 minut). Po czym na szkiełka nakładano biotynylowane przeciwciała drugorzędowe oraz odczynnik awidyna – biotynylowana peroksydaza chrzanowa wchodzące w skład komercyjnego zestawu detekcyjnego (tzw. kompleks ABC). w skrawkach stanowiących negatywną kontrolę barwienia przeciwciała pierwszorzędowe zastępowano niespecyficzną immunoglobuliną G (IgG). Do wizualizacji aktywności peroksydazy chrzanowej zastosowano inkubację z tetrachlorowodorkiem 3,3'-diaminobenzydyny (DAB) w roztworze nadtlenu wodoru. w ostatnim etapie, skrawki podbarwiano hematoksyliną (20 sekund), przepłukiwano w wodzie destylowanej i w buforze PBS oraz poddawano dehydratacji w szeregu wzrastających stężeń alkoholi (po 5 minut w 50%, 70%, 70%, 96%, 96%, 100%, 100% alkoholu etylowego), a następnie w ksylenie (2 x 15 minut). Preparaty zamykano w DPX lub Entelanie.

Pomiar tempa re-epitelializacji

Detekcja białka keratyny 16 w tkankach pourazowych pozwoliła na wykrycie komórek aktywnie odbudowujących zraniony naskórek. w celu określenia szybkości procesu re-epitelializacji (odbudowy) naskórka zmierzono oraz zsumowano długość nowo powstałego naskórka na obu brzegach rany, a następnie podzielono przez całkowitą długość rany i pomnożono przez 100 (Gawrońska-Kozak i wsp. 2016).

Barwienie immunofluorescencyjne

Próbki skóry utrwalano w 4% roztworze paraformaldehydu, płukano w PBS, a następnie przechowywano w 18% roztworze sacharozy z dodatkiem azydku sodu w temperaturze 4°C. Tkankę mrożono w medium osadzającym – Tissue-Tek, krojono przy użyciu kriostatu na skrawki o grubości 5-10 µm w temperaturze -20°C. Preparaty przeznaczone do wybarwienia inkubowano 20 minut w temperaturze pokojowej, po czym trzykrotnie płukano w PBS i inkubowano w roztworze blokującym (mieszanina 10%

surowicy koziej oraz końskiej w roztworze 0,1% albuminy bydlęcej) przez 1 godzinę. Następnie nakładano przeciwciała pierwszorzędowe: anty-eGFP, anty- α -SMA, anty-Ccn2, anty-Vimentin lub anty-Cd31. Po całonocnej inkubacji w temperaturze 4°C, preparaty płukano w PBS (3 x 5minut) i inkubowano odpowiednio z przeciwciałami drugorzędowymi wyznakowanymi fluorochromami: Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 488 przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej w zaciemnionym pomieszczeniu. Po zakończonej inkubacji skrawki ponownie płukano w PBS (3 x 5minut) i zamykano wykorzystując medium zamykające z ProLong™ Gold Antifade Mountant z wybarwiającym jądra komórkowe DAPI.

Immunofluorescencyjna kolokalizacja Foxn1 i Ccn2 oraz Foxn1 i Txn1 została przeprowadzona na próbkach skóry pobranych od młodych transgenicznym myszy Foxn1::Egfp w 3 i 5 dniu po zranieniu, które pochodziły ze wcześniejszych doświadczeń Zespołu Bologii Regeneracyjnej (Kopcewicz i wsp. 2016 ; Walendzik i wsp. 2020).

3.2.13. Oznaczanie koncentracji białka chemotaktycznego monocytów 1 (MCP-1)

Koncentrację białka MCP-1 oznaczono w homogenatach skóry: niezranionej (dzień 0) oraz pourazowej (dzień 1, 3, 5, 7, 14 i 21 po zranieniu) pobranej od myszy Foxn1^{-/-} i Foxn1^{+/+}. Próbki skóry ważono i rozdrabniano w móździerzu w oparach ciekłego azotu, a następnie homogenizowano w buforze PBS w stosunku: 50 mg tkanki na 0,5 ml PBS. Homogenaty tkankowe przechowywano w temperaturze -20°C przez noc, a następnie po rozmrożeniu wirowano przy 5000 x g w temperaturze 4°C przez 5 minut. Supernatant zbierano, wykonywano serię rozcieńczeń i przechowywano w temperaturze -80°C do momentu wykonania analizy. Test immunoenzymatyczny (ELISA) wykonywano zgodnie z protokołem załączonym przez producenta (Elisa kit).

3.2.14. Oznaczanie zawartości hydroksyproliny

Zawartość kolagenu przy zastosowaniu biochemicznej analizy poziomów hydroksyproliny oznaczano w homogenatach skóry: niezranionej (dzień 0) oraz w 1, 3, 5, 7, 14 i 21 dniu po zranieniu u myszy Foxn1^{-/-} i Foxn1^{+/+}. Próbki skóry rozdrabniano w móździerzu w oparach ciekłego azotu. Rozdrobnione tkanki zawieszano w 1ml buforu PBS i przechowywano w temperaturze 4°C przez noc. w kolejnym dniu 0,5ml porcje homogenatu przenoszono do probówek zawierających 0,25ml 6N HCl i hydrolizowano przez 4,5 godziny w temperaturze 120°C. w celu przygotowania krzywej standardowej przygotowywano rozcieńczenia głównego stoku hydroksyproliny w stężeniu od 0 do 20mg/ml w roztworze buforu PBS i 6N HCL (2:1). Na płytkę 96-dołkową nanoszono odpowiednio w duplikatach po

20µl próby oraz 20µl kolejnych punktów krzywej standardowej po czym inkubowano 20 minut z dodatkiem 50µl roztworu chloraminy T. Następnie do każdej próby dodawano po 50 µl roztworu Ehrlicha i inkubowano przez 15 minut w temperaturze 65°C. Po schłodzeniu dokonywano odczytu absorbancji przy długości fali 550nm na spektrometrze Multiskan Sky.

3.2.15. Analiza statystyczna

Analiza statystyczna została wykonana przez firmę Biostat, Polska.

W celu określenia wpływu Foxn1 (porównanie Foxn1^{-/-} vs Foxn1^{+/+}) i czasu (dni pourazowe) na parametry skóry (badania *in vivo*) oraz cechy funkcjonalne (badania *in vitro*) (Publikacja 1) zastosowano modele liniowe, w których uwzględniono interakcję między tymi współzmiennymi. Na podstawie uzyskanych modeli obliczono oraz porównano wartości lsmeans (średnie najmniejszych kwadratów – średnie obliczone na podstawie współczynników modelu). Za poziom istotności przyjęto p=0,05, wskazując również na wyniki statystycznie istotne dla poziomów p=0,01 oraz p=0,001. Wszystkie obliczenia wykonano w programie R (wersja 3.5.3) przy użyciu następujących pakietów: emmeans (wersja 1.4.1) i tidyverse (wersja 1.2.1).

Do zbadania zależności pomiędzy zmiennymi w przypadku braku współzależności grup wykorzystano model regresji liniowej dla wyników uzyskanych w Publikacji 2: Txnrd1 (Figura 4G), Txn2 (Figura 4H), Txnrd2 (Figura 4I), Txnrd3 (Figura 4J), Ep300 (Figura 5C), MTT (Figura 7E), BrdU (Figura 7F), Vegfa (Figura 8C). w celu dokonania porównań parami między poszczególnymi grupami, zostały obliczone średnie marginalne. Następnie zastosowano liniowy model efektów mieszanych (LMM) z korektą Tukeya dla wielokrotnych porównań. Poziom istotności ustalono na p≤0,05. Wszystkie obliczenia zostały wykonane w programie R (wersja 4.0.2). Szacowane marginalne średnie (dostosowane do wielokrotnych testów w dowolnym modelu) były obliczone przy użyciu pakietu lsmean (wersja 2.25).

Analizę statystyczną wyników uzyskanych w Publikacji 2 dotyczących: Foxn1 (Figura 1A), Txn1 (Figura 4B), Txnrd1 (Figura 4C), Txn2 (Figura 4D), Txnrd2 (Figura 4E), Txnrd3 (Figura 4F), Ep300 (Figura 5B), Vegfa (Figura 8B), migracja keratynocytów (Figura 7B) i tworzenie tub śródbłónka (Figura 8D'-F') przeprowadzono za pomocą programu GraphPad Prism, wersja 9.0, gdzie dokonano oceny pod kątem zgodności rozkładów zmiennej z rozkładem normalnym za pomocą testu Shapiro–Wilka. Następnie, w celu określenia istotnych różnic między otrzymanymi wartościami zastosowano jedno- lub dwuczynnikową analizę wariancji (odpowiednio one way lub two way ANOVA). Uzyskane

dane wyrażono jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe (SD). Za poziom istotności przyjęto $p\leq 0,05$.

Producenci sprzętów, odczynników oraz stężenia zastosowanych przeciwciał zostały opisane w poszczególnych publikacjach stanowiących element niniejszej pracy doktorskiej.

4. Wyniki

4.1. Porównanie procesu gojenia ran skórnych myszy z aktywnym (Foxn1^{+/+}) i nieaktywnym (Foxn1^{-/-}) czynnikiem transkrypcyjnym Foxn1

4.1.1. Analiza przebiegu odpowiedzi immunologicznej

W celu porównania poziomów odpowiedzi zapalnej w niezranionych i pourazowych próbkach skóry pomiędzy myszami Foxn1^{-/-} i Foxn1^{+/+} przeprowadzono: (1) immunoenzymatyczną analizę poziomów białka MCP-1, (2) immunohistochemiczną lokalizację makrofagów (CD68; marker makrofagów) oraz (3) oznaczenie procentowej zawartości komórek wykazujących ekspresję białka CD68 przy zastosowaniu cytometrii przepływowej (*Publikacja 1, Figura 5*). Badania wykazały, iż skóra niezraniona, jak i pourazowa, u obu szczepów myszy ujawniła podobne poziomy chemokiny MCP-1 oraz podobny odsetek komórek CD68-pozytywnych (*Publikacja 1, Figura 5A-B*). Istotny wzrost procentowy komórek CD68-pozytywnych w dniu 5 i 7 po zranieniu w porównaniu ze skórą niezranioną zaobserwowano zarówno u myszy Foxn1^{-/-} jak i Foxn1^{+/+} (*Publikacja 1, Figura 5B*). Analiza immunohistochemiczna wykazała obecność komórek CD68-pozytywnych w skórze właściwej, naczyniach krwionośnych i warstwie śródskórnych komórek tłuszczowych (dWAT) u obu grup doświadczalnych myszy. Jednakże największą akumulację komórek CD68-pozytywnych obserwowano u myszy Foxn1^{-/-} w dniu 5 po zranieniu (*Publikacja 1, Figura 5C*).

4.1.2. Porównanie przebiegu procesu re-epitelializacji

Re-epitelializacja obejmuje intensywną migrację, proliferację oraz różnicowanie się keratynocytów do nowego naskórka. w celu porównania szybkości odbudowy uszkodzonego naskórka przeanalizowano makroskopowo i mikroskopowo obszar zranienia skóry myszy Foxn1^{-/-} oraz Foxn1^{+/+}. Analiza makroskopowa skóry pourazowej wykazała szybsze tempo zamykania się ran u myszy Foxn1^{-/-} w porównaniu do myszy Foxn1^{+/+} w dniu 3 po zranieniu ($p < 0,01$) (*Publikacja 1, Figura 3A,B*). Immunodetekcja keratyny 16 (marker aktywowanych keratynocytów) przeprowadzona na utrwalonych preparatach skóry pobranych w dniu 1, 2, 3 oraz 5 po zranieniu potwierdziła w obrazach mikroskopowych wyższy procent powierzchni rany pokrytej nowo uformowanym nabłonkiem w skórze myszy Foxn1^{-/-} w porównaniu do myszy Foxn1^{+/+}. Całkowite zamknięcie rany zaobserwowano w dniu 5 po zranieniu u obu szczepów myszy (*Publikacja 1, Figura 3C,D*). Aby porównać potencjał proliferacyjny komórek oraz zidentyfikować komórki aktywnie proliferujące zastosowano przyżyciowe

znakowanie myszy $Foxn1^{+/+}$ i $Foxn1^{-/-}$ roztworem bromodeoksyurydyny (BrdU). Następnie izolaty komórkowe uzyskane z niezranionej i pourazowej skóry myszy $Foxn1^{-/-}$ i $Foxn1^{+/+}$ przeanalizowano przy zastosowaniu metody cytometrii przepływowej (*Publikacja 1, Figura 4A,B*). Niezraniona skóra zarówno myszy $Foxn1^{-/-}$, jak i $Foxn1^{+/+}$ wykazała podobny odsetek komórek aktywnie proliferujących (BrdU-pozytywnych) (*Publikacja 1, Figura 4A, B, Tabela S9*). Natomiast analiza tkanek pourazowych wykazała wyższy procent komórek proliferujących (BrdU⁺/CD45⁻; CD45 marker linii krwiotwórczej) w skórze myszy $Foxn1^{-/-}$ w porównaniu do $Foxn1^{+/+}$ w dniach pourazowych 1, 2 i 3 ze statystycznie istotnymi różnicami w dniu 2 ($4,94\% \pm 0,58\%$ vs $2,40\% \pm 0,58$; $p < 0,05$) (*Publikacja 1, Figura 4A, B, Tabela S9*). Charakterystyka fenotypowa komórek BrdU-pozytywnych wykazała, że odsetek komórek dodatnich pod względem cytokeratyny 6 (CK6; marker aktywowanych keratynocytów) (Freedberg i wsp. 2001) w populacji komórek znakowanych BrdU był wyższy w zranionej skórze myszy $Foxn1^{+/+}$ niż $Foxn1^{-/-}$ w dniu 2 ($p < 0,05$) i 3 ($p < 0,01$) (*Publikacja 1, Figura 4D, Tabela S10*). Celem zidentyfikowania lokalizacji proliferujących komórek wykonano immunodetekcję BrdU i Ki67 w pourazowych tkankach skórnych myszy $Foxn1^{-/-}$ i $Foxn1^{+/+}$ (*Publikacja 1, Figura 4E-G*). Pozytywną reakcję zaobserwowano w naskórku oraz w mieszkach włosowych u obu szczepów myszy. w naskórku komórki BrdU-pozytywne występowały w warstwie podstawnej i sporadycznie w warstwie ponadpodstawnej, a także w mieszkach włosowych niezależnie od szczepu myszy. Najwyższą akumulację komórek BrdU- i Ki67- pozytywnych obserwowano w dniu 2 i 3 po zranieniu (*Publikacja 1, Figura 4E-G*). Obecność komórek BrdU- pozytywnych obserwowano w naskórku sąsiadującym z regionem uszkodzenia, ale nie w rejonie nowo powstałego nabłonka (*Publikacja 1, Figura 4E-G*).

4.1.3. Porównanie przebiegu angiogenezy

W celu porównania przebiegu angiogenezy w pourazowych próbkach skóry myszy $Foxn1^{-/-}$ i $Foxn1^{+/+}$ dokonano analizy: (1) ekspresji mRNA oraz białka: czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (Vegfa) i kadheryny komórek śródbłonka naczyniowego (VE-kadheryny) przy zastosowaniu metod qRT-PCR i Western blot, (2) immunofluorescencyjnej detekcji komórek CD31-pozytywnych (marker komórek śródbłonka). Poziomy ekspresji mRNA (*Publikacja 2, Figura 8C*), jak i białka Vegfa (*Publikacja 1, Figura 2D*) nie wykazały istotnie statystycznych różnic w skórze niezranionej i pourazowej u obu szczepów myszy. Jakkolwiek poziomy mRNA *Vegfa* w dniach 5-21 były wyższe u myszy pozbawionych czynnika *Foxn1* ($Foxn1^{-/-}$). Natomiast, zaobserwowano zmniejszoną akumulację komórek

CD31-dodatnich (*Publikacja 2, Rycina S6A*) i niższe poziomy białka VE-kadheryny (*Publikacja 2, Figura S6B*) w skórze niezranionej myszy Foxn1^{+/+}.

4.1.4. Analiza zmian ekspresji mRNA i poziomów białka czynników biorących udział w tworzeniu i degradacji ECM

Kolagen

W celu wykazania potencjalnych różnic w poziomach kolagenu pomiędzy myszami Foxn1^{+/+} a Foxn1^{-/-} przeprowadzono: analizę ekspresji mRNA *kolagenu i i III*, określono całkowitą zawartość kolagenu (analiza poziomów hydroksyproliny w skórze), a także przeprowadzono detekcję lokalizacji kolagenu metodą histologiczną wg. Massona w próbkach skóry niezranionej oraz pobranych w dniu 1, 3, 5, 7, 14 i 21 po zranieniu. Niezraniona (dzień 0) skóra myszy Foxn1^{-/-} wykazała wyższą w porównaniu do myszy Foxn1^{+/+} ekspresję mRNA *kolagenu i* (*Publikacja 1, Figura 6A*). w trakcie procesu gojenia ran, najwyższe poziomy ekspresji *kolagenu i* wykryto w skórze myszy Foxn1^{+/+} w dniu 5 po zranieniu (*Publikacja 1, Figura 6A*). Poziomy ekspresji mRNA *kolagenu III* w skórze niezranionej były podobne u obu szczepów myszy (*Publikacja 1, Figura 6B*). Stopniowy wzrost ekspresji mRNA *kolagenu III* (dni 3-5) a następnie spadek (dni 5-7) wykazano wyłącznie w skórze myszy Foxn1^{+/+}, podczas gdy u myszy Foxn1^{-/-} poziomy te były niskie i stabilne w trakcie całego procesu gojenia urazów skórnych (*Publikacja 1, Figura 6B*). Znacznie wyższą zawartość całkowitego kolagenu (mierzona poziomami hydroksyproliny) obserwowano w niezranionej skórze myszy Foxn1^{+/+} w porównaniu z Foxn1^{-/-} (*Publikacja 1, Figura 6C*). Natomiast w dniach pourazowych (dni 3-21) zawartość hydroksyproliny była porównywalna u obu szczepów myszy (*Publikacja 1, Figura 6C*). Analiza histologiczna z zastosowaniem metody barwienia trójbarwnego wg Massona wykazała podobne nagromadzenie się włókien kolagenowych w pourazowych tkankach zarówno u myszy Foxn1^{-/-} jak i Foxn1^{+/+} (*Publikacja 1, Figura 6D*).

Mmp-9, Timp-1

Metaloproteinazy macierzy (MMPs) oraz ich inhibitory tkankowe (TIMPs) stanowią liczną rodzinę enzymów proteolitycznych zaangażowanych w wiele procesów fizjologicznych m.in. gojenie urazów skóry. MMPs posiadają zdolność do degradacji elementów składowych macierzy pozakomórkowej (kolagen, proteoglikany), dzięki czemu możliwa jest m.in. migracja komórkowa.

W poprzednich badaniach Prof. Gawrońskiej-Kozak, w których zastosowano nacięcie przezskórne (*ang. incisional*) jako model gojenia rany, wykazano różnice w ekspresji Mmp-9 i Timp-1 pomiędzy myszami Foxn1^{+/+} i Foxn1^{-/-} (Manuel i Gawrońska-Kozak 2006, Gawrońska-Kozak 2011). w obecnej pracy zastosowano model wycięcia (*Rycina 4*), a pourazowe próby skóry stanowiły 8µm dyski zawierające miejsce zranienia pobrane od myszy Foxn1^{+/+} i Foxn1^{-/-} w dniach 1, 3, 5, 7, 14 i 21. Wykazano, iż niezraniona skóra myszy Foxn1^{-/-} w porównaniu do Foxn1^{+/+} charakteryzowała się wyższą ekspresją Mmp-9 zarówno poziomów mRNA, jak i białka (*Publikacja 1, Figura 7 A-C*). Zranienie spowodowało szybki wzrost poziomów mRNA i białka Mmp-9 w pourazowych dniach 1-5, a następnie spadek między dniem 7, a 21 u obu szczepów myszy (*Publikacja 1, Figura 7A*). Pomimo, że profil ekspresji *Mmp-9* w skórze był podobny u obu grup myszy to pourazowa skóra myszy Foxn1^{+/+} odpowiadała na zranienie gwałtownym i bardzo wysokim wzrostem *Mmp-9* szczególnie w dniu 5 (p<0,001) po zranieniu w porównaniu do myszy Foxn1^{-/-} (*Publikacja 1, Figura 7A*). Ekspresja inhibitora metaloproteinazy 1 (Timp-1) w odpowiedzi na zranienie wykazała podobny profil zmian ekspresji u obu szczepów myszy, jednak ze znacznie wyższymi poziomami mRNA w skórze myszy Foxn1^{+/+} w porównaniu do Foxn1^{-/-} w dniach 1-5 po zranieniu (*Publikacja 1, Figura 7B*).

Transformujący czynnik wzrostu beta 1 i 3 (TGFβ-1,3)

Analiza mRNA *Tgfb-1* wykazała podobne poziomy ekspresji u obu szczepów myszy, jedynie w dniu 5 po zranieniu zaobserwowano spadek ekspresji *Tgfb-1* w skórze myszy Foxn1^{-/-} (*Publikacja 1, Figura 6E*). Jednak najbardziej istotne różnice pomiędzy myszami Foxn1^{+/+}, a Foxn1^{-/-} zaobserwowano analizując ekspresję *Tgfb-3*. Choć wzór ekspresji *Tgfb-3* był podobny między dwiema grupami myszy, to poziom ekspresji był znacznie wyższy u myszy Foxn1^{-/-} niż Foxn1^{+/+} zarówno w skórze niezranionej pourazowej (*Publikacja 1, Figura 6F*). Najistotniejszy wzrost ekspresji mRNA *Tgfb-3* zaobserwowano w skórze myszy Foxn1^{-/-} w dniach 5, 7 i 21 po zranieniu (*Publikacja 1, Figura 6E*).

Przeprowadzone analizy wykazały zmienność w procesie gojenia ran pomiędzy myszami Foxn1^{-/-} a Foxn1^{+/+} w aspekcie różnic w poziomach kolagenu, Mmp-9/Timp-1 oraz Tgfb-3. Wykazano również szybszy proces re-epitelializacji ran skórnych myszy Foxn1^{-/-}. Wyniki te potwierdzają oraz rozszerzają zaobserwowane uprzednio różnice w procesie gojenia ran skórnych pomiędzy myszami Foxn1^{+/+}, a Foxn1^{-/-}.

4.1.5. Analiza wpływu transformujących czynników wzrostu beta 1 i 3 (Tgfb-1 i 3) na aktywność fibroblastów skóry

Fibroblasty stanowiące jeden z głównych rodzajów komórek skóry właściwej, odpowiedzialne są między innymi za syntezę kolagenu, elastyny i kwasu hialuronowego (Xue i wsp. 2015). Biorąc pod uwagę dane literaturowe i przedstawione powyżej wyniki badań *in vivo*, w kolejnym etapie oceniono wpływ Tgfb-1 i Tgfb-3 na fibroblasty skóry (DFs) myszy Foxn1^{+/+} oraz Foxn1^{-/-} (Publikacja 1, Figura 8). Immunofluorescencyjna lokalizacja wimentyny (marker fibroblastów) oraz αSMA (aktywna mięśni gładkich; marker miofibroblastów) została wykazana zarówno w DFs kontrolnych (nietraktowanych TGFβ i pochodzących zarówno od myszy Foxn1^{+/+} i Foxn1^{-/-}), jak i traktowanych Tgfb-1 lub Tgfb-3 (Publikacja 1, Figura 8A). w celu wykazania potencjalnych różnic pomiędzy DFs kontrolnymi (pochodzącymi od myszy Foxn1^{+/+} i Foxn1^{-/-}), a także traktowanymi Tgfb-1 i Tgfb-3 przeanalizowano: (1) ekspresję mRNA αSMA i kolagenu III (Publikacja 1, Figura 8B,C) oraz (2) oznaczono koncentrację kolagenu i w mediach pohodowlanych (ELISA) (Publikacja 1, Figura 8D). Zarówno fibroblasty Foxn1^{-/-} jak i Foxn1^{+/+} traktowane Tgfb-1 lub Tgfb-3 odpowiadały na stymulację istotnym wzrostem ekspresji mRNA αSMA (Publikacja 1, Figura 8B) oraz obniżeniem poziomu ekspresji kolagenu III (Publikacja 1, Figura 8C) w porównaniu do komórek kontrolnych. w celu wykazania potencjalnych różnic w produkcji kolagenu I, DFs wyizolowane ze skóry myszy Foxn1^{+/+} lub Foxn1^{-/-} były hodowane w obecności Tgfb-1 lub 3 przez 24, 48 i 72 godziny (w tych samych punktach czasowych zebrano media pohodowlane) (Publikacja 1, Figura 8D). Analiza immunoenzymatyczna (ELISA) wykazała, iż stężenie kolagenu I było istotnie wyższe w mediach pohodowlanych z grupy fibroblastów Foxn1^{-/-} traktowanych Tgfb-3 (48 i 72 godziny) w porównaniu z mediami z grupy fibroblastów Foxn1^{+/+}. Natomiast, Tgfb-3 (48 godzin) i Tgfb-1 (72 godziny) wykazały hamujący wpływ na wydzielanie kolagenu I w mediach pohodowlanych tylko z grupy Foxn1^{+/+} w porównaniu do medium kontrolnego (Publikacja 1, Figura 8D).

4.2. Analiza zmian ekspresji czynników regulowanych hipoksją w przebiegu procesu gojenia ran pomiędzy myszami Foxn1^{+/+} a Foxn1^{-/-}

Obniżona dostępność tlenu (hipoksja) to jeden z głównych elementów środowiskowych uruchamiających proces gojenia się ran skórnych (Lokmic i wsp. 2012). Wcześniejsze doniesienia Zespołu Biologii Regeneracyjnej wykazały, że to właśnie niska dostępność tlenu indukuje ekspresję Foxn1 w keratynocytach, a aktywacja Foxn1 zwiększa poziomy białek regulowanych hipoksją (Hif-1α, Arnt-2, Fih-1 i Txn) w pierwotnych

hodowlach keratynocytów (Kur-Piotrowska i wsp. 2018). w pierwszym etapie prezentowanych badań porównano ekspresję genów związanych z hipoksją (*Hif-1α*, *Fih-1*, *Arnt-2*) w niezranionej (dzień 0) i pourazowej (dni 1-21) skórze myszy *Foxn1*^{+/+} i *Foxn1*^{-/-}. Niezraniona skóra myszy pozbawionych czynnika *Foxn1*^{-/-} wykazała niższą ekspresję mRNA *Hif-1α* ($p < 0,001$, Publikacja 1, Figura 1A, Tabele S1-S2) oraz białka (Publikacja 1, Figura 1B) w porównaniu do myszy *Foxn1*^{+/+}. Podczas procesu gojenia urazów, poziomy ekspresji mRNA *Hif-1α* były znacznie niższe w skórze myszy *Foxn1*^{-/-} w porównaniu do myszy *Foxn1*^{+/+} co obserwowano w dniach 1 ($p < 0,001$), 3 ($p < 0,01$) i 5 ($p < 0,001$) po zranieniu (Publikacja 1, Figura 1A, Tabela S1). Analiza obecności białka *Hif-1α* w ekstraktach jądrowych uzyskanych ze skóry myszy *Foxn1*^{+/+} i *Foxn1*^{-/-} potwierdziła wyniki uzyskane dla mRNA *Hif-1α*. (Publikacja 1, Figura 1A i 1B). Wykazano zdecydowany wzrost poziomów białka *Hif-1α* w skórze myszy *Foxn1*^{+/+} w pourazowych dniach 1-5 przy znikomym wzroście w skórze myszy *Foxn1*^{-/-} (Publikacja 1, Figura 1B). Ponadto skóra myszy *Foxn1*^{-/-} wykazywała brak ekspresji białka *Hif-1α* już w dniu 5 po zranieniu (Publikacja 1, Figura 1B).

Poziomy ekspresji mRNA *Fih-1* (czynnik hamujący *Hif-1α*, ang. *factor-inhibiting hypoxia-inducible factor*) u myszy *Foxn1*^{-/-} utrzymywały się na tym samym poziomie zarówno w skórze niezranionej, jak i pourazowej. w skórze myszy *Foxn1*^{+/+} odnotowano znaczny spadek poziomu mRNA *Fih-1* w dniu 1 ($p < 0,05$) i 5 po zranieniu ($p < 0,01$; Publikacja 1, Figura 1C, Tabela S3). Translokator jądrowy receptora węglowodorów arylowych 2 – *Arnt-2* (sygnalizator pośredniczący w niedotlenieniu) wykazywał podobne poziomy mRNA u obu szczepów myszy (Publikacja 1, Figura 1D).

4.3. Czynn timeranskrypcyjny Foxn1 oraz hipoksja moduluje ekspresję mRNA czynników związanych z obniżoną dostępnością tlenu

Biorąc pod uwagę wcześniejsze dane wskazujące na udział hipoksji w regulacji ekspresji *Foxn1* w keratynocytach, zbadano wpływ dostępności tlenu (21% O₂ vs 1% O₂) i czasu hodowli (12 vs 24 godziny) na ekspresję *Foxn1*, *Hif-1α* i *Fih-1* w keratynocytach izolowanych ze skóry myszy *Foxn1*^{+/+} (Publikacja 1, Figura 9A,C,E) lub *Foxn1*^{-/-} (Publikacja 1, Figura 9B,D,F) i hodowanych w ko-kulturze z DFs. Keratynocyty wyizolowane ze skóry myszy *Foxn1*^{-/-} były transdukowane wektorem Ad-*Foxn1* lub Ad-GFP (kontrolnym), a następnie hodowane w kokulturze z DFs w warunkach hipoksji lub normoksji. Przeprowadzone badania wykazały, iż niskie poziomy tlenu w hodowli (1% O₂)

spowodowały wzrost ekspresji mRNA *Foxn1* zarówno w keratynocytach pochodzących od myszy *Foxn1*^{+/+}, jak i w keratynocytach *Foxn1*^{-/-} z wprowadzonym na drodze transdukcji czynnikiem *Foxn1* (*Publikacja 1, Figura 9A i 9B, Tabele S35-S36*). Ekspresja *Hif-1α*, w keratynocytach *Foxn1*^{+/+} wzrastała wraz z czasem hodowli (12 < 24 godziny) niezależnie od warunków: normoksja/hipoksja (*Publikacja 1, Figura 9C*). z kolei keratynocyty *Foxn1*^{-/-}, transdukowane Ad-GFP wykazały znaczny wzrost mRNA *Hif-1α* w normoksji w porównaniu z hipoksją (p<0,01) (*Publikacja 1, Figura 9D, Tabele S39-S42*). Przeciwnie, keratynocyty *Foxn1*^{-/-} transdukowane Ad-*Foxn1* wykazały znaczną redukcję ekspresji mRNA *Hif-1α* w warunkach normoksji w stosunku do hipoksji (p<0,05; *Publikacja 1, Figura 9D, Tabele S39-S42*). Ponadto podwyższona ekspresja *Fih-1* mRNA w keratynocytach *Foxn1*^{-/-} transdukowanych Ad-*Foxn1* i hodowanych w warunkach normoksji (21% O₂), ale nie hipoksji (1% O₂) (*Publikacja 1, Figura 9F, Tabele S43-S44*) sugeruje, że w warunkach normoksji czynnik *Foxn1* jest czynnikiem ograniczającym ekspresję *Hif-1α*.

4.4. Analiza profili proteomicznych keratynocytów transdukowanych wektorem adenowirusowym: Ad-*Foxn1* lub Ad-GFP (kontrola) w warunkach normoksji (21% O₂) lub hipoksji (1% O₂)

W celu wyboru najbardziej odpowiedniego modelu pozwalającego na zbadanie mechanizmu, w którym *Foxn1* i/lub hipoksja regulują zmiany fizjologiczne w keratynocytach, przeprowadzono eksperyment z wykorzystaniem pierwotnej hodowli keratynocytów izolowanych od nowonarodzonych myszy *Foxn1*^{+/+} oraz transdukowanych Ad-*Foxn1* lub Ad-GFP hodowanych przez 24 godziny w warunkach hipoksji (1% O₂) lub normoksji (21% O₂) (*Publikacja 2, Figura 1A*). w pierwszym etapie oceniano skuteczność transdukcji wektora Ad-*Foxn1* wprowadzanego do keratynocytów. Analiza qRT-PCR potwierdziła bardzo wysokie poziomy ekspresji mRNA *Foxn1* w keratynocytach transdukowanych Ad-*Foxn1* i niskie poziomy w keratynocytach Ad-GFP (kontrola) oraz nietransdukowanych (*Publikacja 2, Figura 1A*).

Czynnik transkrypcyjny *Foxn1* jest zlokalizowany w pojedynczych komórkach warstwy podstawnej oraz w pierwszej warstwie komórek kolczystych naskórka (warstwa przypodstawna), gdzie stymuluje różnicowanie się keratynocytów (Lee i wsp. 1999; Gawrońska-Kozak i wsp. 2016). Aby ocenić lokalizację oraz funkcjonalność *Foxn1* w hodowanych keratynocytach przeanalizowano poziom markerów różnicowania keratynocytów: keratyny 10 (marker przypodstawnych keratynocytów) i keratyny 14 (marker

podstawnych keratynocytów). Wzrost ekspresji mRNA, jak i białka keratyny 10 został wykazany wyłącznie w keratynocytach transdukowanych Ad-Foxn1, potwierdzając tym samym skuteczność transdukcji Foxn1 (*Publikacja 2, Figura S1*).

Szczegółowa analiza proteomiczna (LC-MS-MS) keratynocytów i keratynocytowych mediów pochodzących pozwoliła na identyfikację: 5200 białek w keratynocytach hodowanych w normoksji oraz 5000 białek w keratynocytach hodowanych w hipoksji, oraz 2025 białek w KCM w normoksji i 2100 w KCM w hipoksji (*Publikacja 2, Figura 1C*). w grupie keratynocytów transdukowanych Ad-Foxn1 wykryto obecność: w warunkach hipoksji 567 białek, a w warunkach normoksji 540 białek (*Publikacja 2, Figura 1D*). w celu wyłonienia różnic (wzrost lub spadek) w poziomach ekspresji białek w keratynocytach oraz w ich mediach pochodzących (KCM) użyto bazy danych Mus Muculus (SwissProt). Spośród grupy białek stymulowanych Foxn1: w warunkach hipoksji wykazano wzrost 411 białek i spadek 156 białek, natomiast w warunkach normoksji wzrost wykazało 371 białek a spadek 169 białek (*Publikacja 2, Figura 1D*). Wśród białek zidentyfikowanych w KCM pobranym z keratynocytów transdukowanych Ad-Foxn1, a hodowanych w hipoksji wykazano obniżenie ekspresji 8 z 11 oraz 3 z 7 białek hodowanych w warunkach normoksji. (*Publikacja 2, Figura 1D*).

4.4.1. Charakterystyka funkcjonalna białek o zróżnicowanej ekspresji w keratynocytach i keratynocytowych mediach pochodzących (KCM)

W kolejnym etapie określono wpływ Foxn1 i warunków hodowli (hipoksja vs normoksja) na profil białkowy keratynocytów i KCM.

Wyodrębniono 4 główne kategorie funkcjonalne białek:

- 1) Funkcje molekularne (*Publikacja 2, Figura 2A*)
- 2) Procesy biologiczne (*Publikacja 2, Figura 2B*)
- 3) Składnik komórkowy (*Publikacja 2, Figura S2A*)
- 4) Klasa białek (*Publikacja 2, Figura S2B*)

W kategorii „funkcje molekularne” wprowadzenie Foxn1 do keratynocytów spowodowało zmiany w poziomach białek pełniących rolę: katalityczną, wiążącą oraz regulującą funkcje molekularne (*Publikacja 2, Figura 2A*). w grupie aktywatorów katalitycznych zidentyfikowano białka przynależące do systemu redoks m.in. układ

tiodoksyn (Txn) i glutationu (GSH) (*Publikacja 2, Figura 2A*). Podobnie w KCM, wzrost ekspresji Foxn1 stymulował wzrost poziomu białek zaangażowanych w aktywność katalityczną, wiązanie i regulacje molekularne (*Publikacja 2, Figura S3C*). Szczegółowa analiza białek należących do kategorii procesów biologicznych ujawniła grupę białek m.in. macierzy zewnątrzkomórkowej: Ccn (Ccn1, ang. Cellular communication network factor 1), (Ccn2, ang. Cellular communication network factor 2), regulatora transkrypcyjnego Yap1 (Yap1, ang. Yes1 associated protein 1), Vegfa, białka wiążącego angiostatynę (Amlt2, ang. Angiostatin-binding protein), receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (Egfr, ang. Epidermal growth factor receptor), 3-fosfoinozytydową kinazę białkową-1 (Pdk1, ang. Phosphoinositide-dependent kinase-1), 1-fosfatydyloinozytol-4,5-bisfosforan fosfodiesterazy delta-1 (Plcd1, ang. 1-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase delta-1), które zaangażowane są w procesy: komunikacji komórkowej, transdukcji sygnału oraz odpowiedzi na bodźce (*Publikacja 2, Figura 2B*).

4.4.2. Analiza interakcji białkowych przy użyciu modeli sieciowych

Kyoto encyklopedia genów i genomów (KEGG, ang. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) pozwoliła na zbadanie interakcji między białkami stymulowanymi Foxn1 w warunkach hipoksji lub normoksji przy użyciu modeli sieciowych zdeponowanych w bazie danych STRING (<http://string-db.org>). Silne korelacje białkowe w połączeniu z wcześniejszymi danymi (Kur-Piotrowska i wsp. 2018) umożliwiły skonstruowanie mapy sieci białkowych (ang. *heatmap*).

Mapa sieciowa zobrazowała kaskadową aktywację białek zaangażowanych w procesy komórkowe m.in. gojenie urazów skórnych (*Publikacja 2, Figura 3A,B*). Białka te zostały usystematyzowane w dwa oddziałujące ze sobą zespoły/klastery tworzące:

1. Grupę oksydoreduktaz
2. Grupę funkcjonalną

Pierwsza grupa zawiera białka indukowane Foxn1 zaangażowane w aktywność łańcucha transportu elektronów (Ndufa13, Ndufb5, Ndufb4, Ndufa2, Ndufb1, Ndufv2, Romo1) oraz układ oksydoreduktaz: system tiodoksyn i glutationu (Txn1, Txnrd1, Txn2, Txnrd2, Glrx5, Txnrd3, Srxn1) (*Publikacja 2, Figura 3B*). Istotym jest, że większość z tych białek została zidentyfikowana w warunkach hipoksji i jest charakterystyczna dla pierwszych etapów gojenia urazów skórnych.

Druga grupa białek została zdefiniowana jako system funkcjonalny, gdzie wyróżnić można białka biorące udział m.in. w procesach migracji i proliferacji (Ccn1, Ccn2, Yap1), sygnalizacji (Egfr, Pdpk1, Plcd1) i angiogenezy (Vegf, Timp3, Amotyl2). Interesującym jest, iż większość białek należących do tej grupy wykazała obniżoną ekspresję w odpowiedzi na stymulację Foxn1 niezależnie od warunków hodowli (hipoksja/normoksja) (*Publikacja 2, Figura 3 a i B*).

4.5. Czynniki Foxn1 regulatorem systemu antyoksydacyjnego w keratynocytach (*in vitro*) i w skórze (*in vivo*)

Analiza z zastosowaniem spektrometrii mas do badania białek wyekstrahowanych z keratynocytów transdukowanych Ad-Foxn1 wykazała silną regulację białek należących do grupy oksydoreduktaz, w tym systemu Txn (Txn2 i Txnrd3) (*Publikacja 2, Figura 4A*).

W celu weryfikacji uzyskanych danych proteomicznych przeprowadzono analizę qRT-PCR na próbach uzyskanych z niezależnych eksperymentów *in vitro*: (1) keratynocyty izolowane ze skóry myszy Foxn1^{+/+}, transdukowane: Ad-Foxn1 lub Ad-GFP oraz nietransdukowane, (2) keratynocyty izolowane ze skóry myszy Foxn1^{-/-} transdukowane: Ad-Foxn1 lub Ad-GFP (*Publikacja 2, Figura 4B–F*). Keratynocyty hodowano w warunkach hipoksji lub normoksji przez 24 godziny (*Publikacja 2, Figura 4B–F*).

Analiza ekspresji mRNA *Txn1* (*Publikacja 2, Figura 4B*) i *Txnrd1* (*Publikacja 2, Figura 4C*) w keratynocytach izolowanych od myszy Foxn1^{+/+} lub Foxn1^{-/-} nie wykazały różnic niezależnie od transdukcji (Ad-Foxn1 vs Ad-GFP) lub warunków hodowli (1% O₂ vs 21% O₂). Wykazano wzrost ekspresji mRNA mitochondrialnej *Txn2* w keratynocytach Foxn1^{+/+} transdukowanych Ad-Foxn1 w porównaniu z keratynocytami nietransdukowanymi w warunkach obniżonej dostępności tlenu (*Publikacja 2, Figura 4D*). Natomiast, w przypadku keratynocytów Foxn1^{-/-} transdukowanych Ad-Foxn1 odnotowano obniżenie ekspresji *Txn2* w warunkach hipoksji (*Publikacja 2, Figura 4D*). Najwyższy poziom ekspresji *Txnrd2* zaobserwowano w nietransdukowanych keratynocytach Foxn1^{+/+} w hipoksji (*Publikacja 2, Figura 4E*). Ponadto, odnotowano obniżony poziom ekspresji *Txnrd2* mRNA niezależnie od zastosowanego wektora adenowirusowego (Ad-Foxn1 lub Ad-GFP) (*Publikacja 2, Figura 4E*). Jednak najbardziej spektakularne wyniki uzyskano w analizie ekspresji mRNA *Txnrd3*, która wykazała, iż niezależnie od pochodzenia keratynocytów (myszy: Foxn1^{+/+} lub Foxn1^{-/-}) wprowadzony na drodze transdukcji czynnik Foxn1 (Ad-Foxn1) spowodował znaczny wzrost ekspresji *Txnrd3* (*Publikacja 2, Figura 4F*). Ponadto

zaobserwowano, że wzrost ekspresji mRNA *Txnrd3* był znacznie wyższy w keratynocytach transdukowanych Foxn1 w warunkach normoksji (*Publikacja 2, Figura 4F*).

Wyniki uzyskane z przeprowadzonych analiz *in vitro* (model komórkowy-keratynocyty) zostały zestawione z wynikami analiz *in vivo* (model systemowy) przeprowadzonymi na dwóch szczepach myszy: Foxn1^{+/+} i Foxn1^{-/-} zarówno w skórze niezranionej (dzień 0) jak pourazowej (dzień 1, 3, 5, 7, 14, 21) (*Publikacja 2, Figura 4G–J, Tabela S1–S5*). Przeanalizowano system tioredoksyn: cytoplazmatyczną tioredoksynę 1 (Txn1) i jej reduktazę (Txnrd1), mitochondrialną tioredoksynę 2 (Txn2) i jej reduktazę (Txnrd2) oraz reduktazę tioredoksyny 3 (Txnrd3) stanowiące układ oksydoredukcyjny aktywowany w warunkach hipoksji.

Analiza Western blot wykazała wyższe poziomy białka Txn1 w skórze myszy Foxn1^{+/+} (*Publikacja 1, Figura 2C, Rysunek S3*). Immunohistochemiczna detekcja wykazała obecność Txn1 w naskórku i mieszkach włosowych w skórze niezranionej, z widocznym silniejszym produktem reakcji w skórze myszy Foxn1^{+/+} w porównaniu do Foxn1^{-/-} (*Publikacja 1, Figura 2A*). Zranienie wywołało wzrost poziomów białka Txn1 w naskórku przylegającym do brzegu rany, a także w nowo powstałym naskórku. Biorąc pod uwagę, że zarówno czynnik transkrypcyjny Foxn1 jak i Txn1 wykryto w naskórku oraz mieszkach włosowych w kolejnym kroku wykonano immunofluorescencyjną analizę współwystępowania (kolokalizacji) Txn1 z białkiem GFP (pośredni wskaźnik/marker ekspresji Foxn1 w skórze myszy Foxn1::Egfp). w tym celu użyto preparatów histologicznych skóry pochodzącej od myszy transgeniczných Foxn1::Egfp, u których ekspresja genu eGFP znajduje się pod kontrolą sekwencji regulatorowej w genie Foxn1 (Gawronska-Kozak i wsp. 2016; Kopcewicz i wsp. 2020; Walendzik i wsp. 2020). Pozwoliło to na śledzenie ekspresji czynnika Foxn1 poprzez wizualizację obecności białka eGFP. Obrazowanie konfokalne wykazało, że Txn1 i Foxn1 współwystępują w warstwie przypodstawnej i warstwie różnicujących się keratynocytów, co wskazuje na możliwe współdziałanie obu czynników (*Publikacja 1, Figura 2B*).

Analiza ekspresji transkryptu *Txnrd1* wykazała wyższe poziomy mRNA w skórze myszy Foxn1^{+/+} w dniach 3–21 po urazie (*Publikacja 2, Figura 4G, Tabela S1*) w porównaniu do myszy Foxn1^{+/+}.

Analiza ekspresji *Txn2* mRNA w skórze nie wykazała różnic pomiędzy myszami Foxn1^{+/+} i Foxn1^{-/-} zarówno w skórze niezranionej, jak i pourazowej (*Publikacja 2, Figura 4H*).

Poziomy ekspresji mRNA *Txnrd2* były podobne u obu szczepów myszy, z wyjątkiem wzrostu ekspresji, który zaobserwowano w dniu 1 po zranieniu u myszy *Foxn1^{+/+}* (*Publikacja 2, Figura 4I, Tabele S2 i S3*).

Najistotniejsze zmiany w ekspresji mRNA odnotowano dla reduktazy tioredoksyny 3 (*Txnrd3*). Wykazano istotnie wyższe poziomy *Txnrd3* w skórze niezranionej (dzień 0; $p < 0,001$) oraz pourazowej (dni 3, 5, 21) myszy *Foxn1^{+/+}* w porównaniu do myszy *Foxn1^{-/-}* (*Publikacja 2, Figura 4J, Tabele S4 i S5*). Uzyskane dane *in vivo* potwierdziły wyniki analiz proteomicznych keratynocytów *in vitro* (*Publikacja 2, Figura 4B-F vs 4G-J*).

Uzyskane wyniki *in vitro* i *in vivo* wraz z wcześniejszymi badaniami Zespołu Biologii Regeneracyjnej (Kur-Piotrowska i wsp. 2018) wykazują, iż *Foxn1* może regulować działanie układu tioredoksyn (Txn) wpływając przez to na aktywność obrony antyoksydacyjnej komórek.

4.6. Wpływ aktywności czynnika *Foxn1* oraz hipoksji na regulację funkcjonowania keratynocytów w procesach związanych z gojeniem urazów skóry

4.6.1. Wpływ *Foxn1* na aktywność białek Ccn

Szczegółowa analiza z zastosowaniem spektrometrii mas wykazała zależne od aktywności *Foxn1* obniżenie poziomów białek *Ccn1* i *Ccn2* w keratynocytach i KCM, niezależnie od dostępności tlenowej (*Publikacja 2, Figura 6A*). Biorąc pod uwagę wyniki analiz proteomicznych dokonano oceny poziomu białka *Ccn2* w niezranionej (dzień 0 i pourazowej (1- 21 dzień) skórze myszy *Foxn1^{+/+}* i *Foxn1^{-/-}*. Analiza Western blot wykazała niższe poziomy białka *Ccn2* w pourazowej skórze (dzień 3, 5 i 21) myszy *Foxn1^{+/+}* w porównaniu do myszy *Foxn1^{-/-}* (*Publikacja 2, Figura 6B*). Dane te są zgodne z wynikami proteomicznymi (keratynocyty) wskazującymi, iż obecność *Foxn1* obniża poziomy białka *Ccn2* (*Publikacja 2, Figura 6A,B*). Obecność komórek *Ccn2* pozytywnych wykazano w nieuszkodzonym naskórku i mieszkach włosowych, zaś w skórze zranionej w nowo powstającym naskórku u obu szczepów myszy (*Publikacja 2, Figura 6C*). Jednakże silniejszą reakcję na obecność białka *Ccn2* obserwowano w skórze myszy *Foxn1^{-/-}*. w związku z tym, iż ekspresja *Foxn1* i *Ccn2* lokalizuje się w komórkach naskórka oraz mieszkach włosowych, w kolejnym etapie wykonano podwójne barwienie immunofluorescencyjne w celu wykazania możliwego współwystępowania obu białek. Podobnie jak w przypadku kolokalizacji białka *Txn1* oraz *Foxn1* (eGFP) użyto preparaty histologiczne skóry pobranej od myszy

transgenicznym Foxn1::Egfp. Obrazowanie konfokalne wykazało silną kolokalizację eGFP (Foxn1) i Ccn2 w naskórku przylegającym do obszaru rany i jej brzegu. Pozytywna reakcja była ograniczona do warstwy przypodstawnej, ale nie do warstwy podstawnej naskórka (*Publikacja 2, Figura 6D*).

Uzyskane wyniki wykazały: (1) kolokalizację Foxn1 z Ccn2 w naskórku (2) obniżoną ekspresję zarówno Ccn1, jak i Ccn2 w keratynocytach wykazujących ekspresję Foxn1 niezależnie od warunków tlenowych (dane proteomiczne) oraz (3) niższe poziomy białka Ccn2 w pourazowej skórze myszy Foxn1^{+/+} w porównaniu do myszy Foxn1^{-/-}.

4.6.2. Analiza przebiegu proliferacji i migracji keratynocytów transdukowanych Ad-Foxn1 lub Ad-GFP

W celu określenia wpływu czynnika Foxn1 oraz dostępności tlenu na proces proliferacji i migracji, przeprowadzono doświadczenie *in vitro* w którym keratynocyty wyizolowane ze skóry myszy Foxn1^{+/+} transdukowano Ad-Foxn1 lub Ad-GFP (kontrola) i hodowano przez 24 godziny w warunkach hipoksji (1% O₂) lub normoksji (21% O₂). Hipoksja stymulowała nieznacznie tempo metabolizmu (*Publikacja 2, Rycina 7E*) i proliferacji keratynocytów (*Publikacja 2, Figura 7F, Tabela S12*) niezależnie od obecności Foxn1. Następnie oceniono wskaźnik migracji keratynocytów poprzez wykonanie testu zarysowania w badaniach *in vitro* (*Publikacja 2, Figura 7A–D, Tabele S8–S11*). Hipoksja jako pojedyncza zmienna, stymulowała migrację keratynocytów, co obserwowano szczególnie w 3 i 6 godzinie hodowli (*Publikacja 2, Figura 7A,B, Tabela S8*). Transdukcja Ad-Foxn1 w tych samych warunkach (hipoksja) spowodowała znacznie spowolnione zdolności migracyjne keratynocytów (3 i 24 godzina hodowli) (*Publikacja 2, Figura 7D, Tabela S9*). Natomiast nadekspresja Foxn1 w keratynocytach w warunkach normoksji przyspieszyła migrację, szczególnie w 3 i 6 godzinie hodowli (*Publikacja 2, Figura 7C, Tabela S11*).

4.6.3. Analiza aktywności szlaków proangiogennych

Następnym etapem badań było określenie wpływu Foxn1 oraz hipoksji na aktywność szlaków proangiogennych. Analiza z zastosowaniem spektrometrii mas białek wyizolowanych z keratynocytów myszy Foxn1^{+/+}, które transdukowano Ad-Foxn1 lub Ad-GFP i hodowano przez 24 godziny w warunkach hipoksji (1% O₂) lub normoksji (21% O₂) wykazała obniżoną ekspresję głównego regulatora angiogenezy Vegfa oraz Amotl-2 w keratynocytach transdukowanych Ad-Foxn1 niezależnie od warunków tlenowych

(Publikacja 2, Figura 8A, Supplement 2). Aby zweryfikować uzyskane wyniki proteomiczne wykonano analizę ekspresji mRNA *Vegfa* przy użyciu techniki qRT-PCR w niezależnych próbkach biologicznych keratynocytów pobranych ze skóry myszy *Foxn1*^{+/+}: nietransdukowanych lub transdukowanych Ad-Foxn1 lub Ad-GFP oraz keratynocytów wyizolowanych ze skóry myszy *Foxn1*^{-/-}, które transdukowano Ad-Foxn1 lub Ad-GFP (Publikacja 2, Figura 8B). Odnotowano istotnie podwyższoną ekspresję mRNA *Vegfa* tylko w warunkach hipoksji niezależnie od pochodzenia keratynocytów (*Foxn1*^{+/+} vs *Foxn1*^{-/-}) czy transdukcji wektorem wirusowym (Ad-Foxn1 vs Ad-GFP) (Publikacja 2, Figura 8B). Zaobserwowano obniżony poziom mRNA *Vegfa* zarówno w keratynocytach transdukowanych *Foxn1*, jak i keratynocytach *Foxn1*^{-/-} w porównaniu do keratynocytów kontrolnych (GFP i nietransdukowanych) (Publikacja 2, Figura 8B).

Biorąc pod uwagę powyższe dane, w kolejnym kroku zbadano możliwy wpływ zebranych mediów pochodowlanych (KCM) z keratynocytów transdukowanych Ad-Foxn1 lub Ad-GFP w warunkach hipoksji lub normoksji na potencjał angiogeny ludzkich komórek śródbłónka żyły pępowinowej (HUVEC). w przeprowadzonym doświadczeniu komórki HUVEC hodowano z różnymi KCM:

1. KCM-Hyp-Foxn1 - KCM pochodzące z keratynocytów transdukowanych Ad-Foxn1 i hodowanych w hipoksji,
2. KCM-Hyp-GFP - KCM pochodzące z keratynocytów transdukowanych Ad-GFP i hodowanych w hipoksji,
3. KCM-Nor-Foxn1 - KCM pochodzące z keratynocytów transdukowanych Ad-Foxn1 i hodowanych w normoksji,
4. KCM-Nor-GFP – KCM pochodzące z keratynocytów transdukowanych Ad-GFP i hodowanych w normoksji

przez 6, 12 lub 18 godzin w celu wykazania możliwego wpływu mediów pochodowlanych na tworzenie się pętli śródbłónka (Publikacja 2, Figura 8D,E,F). Wyniki wykazały, że 6-godzinna hodowla obfitowała w małe i średnie typy sieci śródbłónka, lecz nie zaobserwowano żadnych istotnych różnic w szybkości powstawania naczyń, niezależnie od typu zastosowanego KCM (Publikacja 2, Figura 8D–F). 12-godzinna hodowla ujawniła wzrost liczby małych i średnich sieci śródbłónka w grupie HUVEC hodowanych w KCM-Hyp-GFP w porównaniu do KCM-Nor-Foxn1 (Publikacja 2, Figura 8E) i w porównaniu do hodowli kontrolnych (Publikacja 2, Figura 8E). Natomiast, po upływie 18 godzin

obserwowano utrzymujący się efekt większej liczby małych i średnich sieci śródbłónka przy zastosowanym medium KCM-Hyp-GFP (*Publikacja 2, Figura 8F*) przy jednoczesnym wzroście dużych sieci niezależnie od zastosowanego KCM.

Wyniki wskazują, iż obecność Foxn1 koreluje z obniżonymi poziomami głównych regulatorów angiogenezy (Vegfa, Amotyl2). Dane te korespondują z wynikami *in vivo* wskazującymi na obniżone poziomy mRNA *Vegfa* u myszy Foxn1^{+/+} w dniach pourazowych 5-21, jakkolwiek nie są one istotne statystycznie (*Publikacja 2, Figura 8C*).

5. Dyskusja

Gojenie urazów skóry stanowi złożony proces, który zachodzi na drodze reperacji (powstanie blizny) bądź regeneracji (brak blizny). Proces regeneracji, prowadzi do odbudowy tkanek pourazowych odtwarzając architekturę i funkcjonalność identyczną z tkankami niezranionymi. Natomiast, proces reperacji prowadzi do odbudowania bariery ochronnej skóry (wytworzenie blizny), jednakże skóra pourazowa nie odzyskuje pełnej funkcjonalności skóry niezranionej. Na przebieg, koordynację, a w efekcie rezultat procesu gojenia, składa się wiele elementów, szlaków oraz czynników (komórki, geny, molekuły), które wykazują odmienną dynamikę ekspresji w procesie naprawy i regeneracji. Pomimo licznych badań mechanizm odpowiedzialny za przekierowanie szlaków regeneracyjnych na reperacyjne/naprawcze nie został jeszcze poznany.

Kaskada zdarzeń wywołana zranieniem i co za tym idzie indukcją procesu gojenia urazów skórnych aktywuje zespół czynników transkrypcyjnych stanowiących nadrzędny element regulujący włączanie/wyłączanie genów docelowych. Poznanie szlaków regulowanych przez czynniki transkrypcyjne jest największym wyzwaniem w obszarze tych badań.

Jednym z czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w efektywność procesów gojenia urazów skóry jest omawiany w rozprawie doktorskiej naskórkowy czynnik Foxn1. Natomiast, bodźcem środowiskowym, który aktywuje w miejscu zranienia proces gojenia się ran jest hipoksja. Dotychczasowe badania prowadzone przez zespół Prof. Barbary Gawrońskiej-Kozak wykazały iż: (1) myszy pozbawione czynnika Foxn1 w skórze wykazują zdolność gojenia na drodze regeneracji w modelu nacięcia (*ang. incisional model*) (Gawrońska-Kozak i wsp. 2006) oraz (ii) znaczące różnice w ekspresji genów związanych z hipoksją w skórze pomiędzy myszami Foxn1^{-/-} a myszami kontrolnymi (Foxn1^{+/+}) (Kur-Piotrowska i wsp. 2018).

Dane te sugerujące, iż interakcje pomiędzy Foxn1 a czynnikami/genami związanymi z niską dostępnością tlenu (np. Hif-1 α) mogą warunkować fizjologiczny wybór sposobu gojenia urazów skóry: regeneracyjny vs reperacyjny stały się stymulatorem i podstawą zaprezentowanych w mojej pracy doktorskiej badań.

Nadrzędną hipotezą badawczą przedstawionej rozprawy doktorskiej było wykazanie współdziału i potencjalnego mechanizmu działania czynnika indukowanego hipoksją Hif-1 α oraz czynnika transkrypcyjnego Foxn1 w wyborze ścieżki gojenia urazów skóry: regeneracyjny vs reperacyjny zarówno na poziomie komórkowym (*in vitro*) oraz podczas

procesu gojenia urazów skóry (*in vivo*). Zbadanie ścieżek łączących hipoksję z czynnikiem Foxn1 może pozwolić na ukierunkowaną ingerencję w proces gojenia, która umożliwi przekierowanie gojenia bliznowego na regeneracyjne, a niegojących się ran na gojenie bliznowe.

Jednym z zadań badawczych (Zadanie badawcze 1) było przeanalizowanie i porównanie procesu gojenia urazów skóry myszy Foxn1^{-/-} (model regeneracyjny) i kontrolnych (Foxn1^{+/+}; model reperacyjny) w aspekcie ekspresji genów związanych z hipoksją. Natomiast, seria doświadczeń *in vitro* (Zadanie badawcze 2) miała na celu zbadanie mechanizmu, w którym hipoksja i Foxn1 regulują zmiany fizjologiczne keratynocytów.

Skóra niezraniona oraz pourazowa pobrana od myszy Foxn1^{-/-} i Foxn1^{+/+} została przeanalizowana w kontekście przebiegu procesu gojenia oraz ekspresji czynników związanych z hipoksją. Badania *in vivo* przeprowadzone na zwierzętach, u których zastosowano uraz skóry oparty na modelu wycięcia potwierdziły wcześniejsze doniesienia oparte na modelu nacięcia wskazujące na zdolność myszy Foxn1^{-/-} do gojenia bezbliznowego (regeneracyjnego; *ang. scar-free*) lub o zminimalizowanej bliznie obecnej w postaci delikatnych włókien kolagenowych jedynie w warstwie skóry właściwej (*ang. scar-less*) (Gawrońska-Kozak i wsp. 2006; Manuel i Gawrońska-Kozak 2006; Gawrońska-Kozak 2011).

Bezpośrednio po zranieniu pierwszoplanową rolę odgrywają złożone mechanizmy odpowiedzi immunologicznej oraz rekonstrukcji uszkodzonego nabłonka, wśród których wyróżnia się m.in. zdolność komórek do migracji i proliferacji. Sposób gojenia urazu skórno opartego na modelu wycięcia potwierdził u myszy Foxn1^{-/-} zdolności przypisywane gojeniu regeneracyjnemu wykazanemu uprzednio w modelu nacięcia wskazując m.in. (i) szybką odbudowę nabłonka po urazie (re-epitelializacja), (ii) zwiększoną ekspresję Tgfb-3 (izofорма pro-regeneracyjna), która korelowała ze spadkiem ekspresji Tgfb-1 (izofорма pro-bliznowa), (iii) przesunięcie balansu Mmp-9/Timp-1 w kierunku wyższych poziomów Mmp-9 i niższych poziomów Timp-1 (Manuel i Gawrońska-Kozak 2006; Gawrońska-Kozak 2011). Prócz podobieństw modelu wycięcia i nacięcia skórno wskazujących na ścieżkę gojenia bezbliznowego, zaobserwowano również różnice między tymi modelami m.in. pod względem ilości odkładanego kolagenu w pourazowej skórze myszy Foxn1^{-/-}. Pourazowa skóra myszy Foxn1^{-/-} w dniu 21 po zranieniu (model nacięcia) wykazywał prawie niewykrywalne włókna kolagenowe, wskazując miejsce urazu (Gawrońska-Kozak i wsp. 2011). Natomiast stosując model wycięcia skórno u myszy Foxn1^{-/-} w 21 dniu po urazie ujawniono dobrze

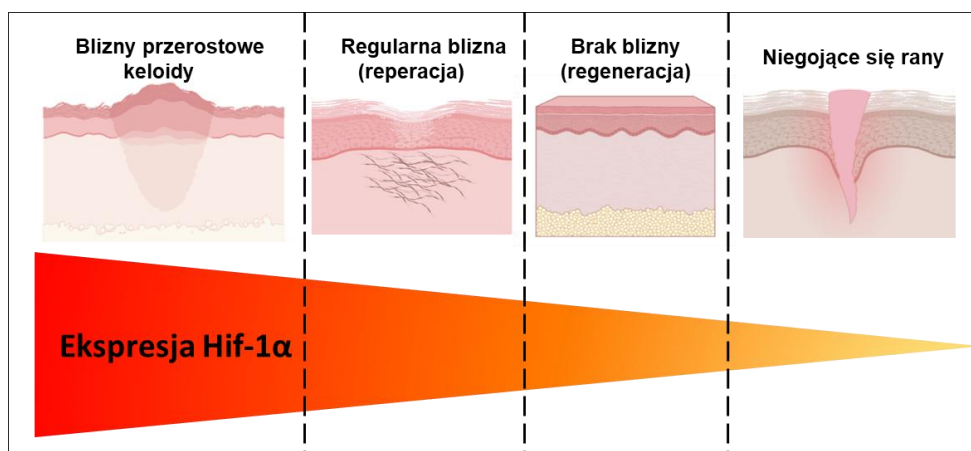
odgraniczone od otaczającej tkanki odkładanie nowego kolagenu, chociaż obszar akumulacji kolagenu był mniejszy niż u myszy Foxn1^{+/+}. Dane te potwierdzają koncepcję, iż rodzaj nacięcia skóry odzwierciedla profil gojenia (Ansell i wsp. 2014).

Wykazane w niniejszej pracy doktorskiej cechy gojenia regeneracyjnego urazów skóry myszy Foxn1^{-/-} są spójne z wzorcowymi modelami bezbliznowej regeneracji tj. regeneracja płetw u *Danio rerio* (Poss i wsp. 2003), regeneracja kończyn aksolotla (Endo i wsp. 2004; Kragl i wsp. 2009) oraz u ssaków: regeneracja skóry u myszy kolczastych (Seifert i wsp. 2012) w aspekcie przyspieszonej w porównaniu do gojenia bliznowego re-epitelializacji oraz zwiększonych poziomów Tgfβ-3.

Kolejnym aspektem omawianym w pracy doktorskiej jest hipoksja, która regulując szereg procesów fizjologicznych i patofizjologicznych, została rozpoznana jako kluczowy element środowiskowy uruchamiający proces gojenia ran (Hong i wsp. 2014). Przeprowadzone analizy ekspresji mRNA oraz poziomów białka wskazują, że czynniki indukowane hipoksją (*Hif-1α*, *Fih-1*, *Arnt-2*, *Ep300*) mogą być również regulowane aktywnością czynnika transkrypcyjnego Foxn1. Zraniona skóra myszy Foxn1^{-/-} wykazywała stabilną i niezmienną pod wpływem urazu ekspresję kluczowych czynników regulowanych warunkami obniżonej dostępności tlenowej (*Hif-1α*, *Fih-1*, *Ep300*). Natomiast skóra myszy Foxn1^{+/+} wykazała wzrost ekspresji mRNA *Hif-1α* przy jednoczesnym spadku *Fih-1* w tkance pourazowej. Uwzględniając charakterystykę bezbliznowego gojenia myszy Foxn1^{-/-} przedstawione dane sugerują, że nieprawidłowości w regulacji ekspresji *Hif-1α* spowodowane brakiem Foxn1 mogą uruchamiać proces gojenia bezbliznowego (regeneracji). Ponadto, analizy *in vitro* wykazały, że wprowadzenie Foxn1 na drodze transdukcji do keratynocytów pozbawionych endogennego Foxn1 (keratynocyty pochodzące od myszy Foxn1^{-/-}) doprowadziło do obniżenia ekspresji mRNA *Hif-1α* w warunkach normoksji, ale nie w hipoksji, zaś w przypadku *Fih-1* odnotowano zahamowanie ekspresji mRNA wyłącznie w warunkach hipoksji. Uzyskane dane wskazują, iż w warunkach normoksji czynnik transkrypcyjny Foxn1 jest czynnikiem ograniczającym ekspresję *Hif-1α*. Podobne wyniki przedstawili Wang i wsp., stosując wyciszanie RNA jądrowego czynnika oddechowego-1 (NRF-1, ang. *Nuclear respiratory factor 1*) (Wang i wsp. 2016). Obniżenie NRF-1 w komórkach HEK293T zwiększyło akumulację białka *Hif-1α* w warunkach normoksji, a efekt ten został dodatkowo wzmocniony w warunkach hipoksji (Wang i wsp. 2016).

Dotychczasowa literatura dysponuje jedynie kilkoma opublikowanymi pracami, w których badano związek między hipoksją a aktywnością czynnika Foxn1, jednak dotyczyły one aspektu niedoboru limfocytów T lub przebiegu nowotworzenia, ale nie samego czynnika Foxn1 (Muller i wsp. 2005; Szatvari i wsp. 2016). Zatem, kontekst korelacji Foxn1 i hipoksji nigdy wcześniej nie został zbadany, a przedstawione w niniejszej pracy wyniki są pierwszymi wskazującymi na możliwe współdziałanie Foxn1 i Hif-1 α w skórze.

Jak dotąd wykazano, że Hif-1 α jako główny regulator homeostazy tlenowej uczestniczy w procesie gojenia urazów. Natomiast, wszelkie zaburzenia w ekspresji Hif-1 α wiążą się z niekorzystnymi skutkami gojenia ran skóry. Dane literaturowe wskazują, że nadekspresja Hif-1 α prowadzi do powstania blizn przerostowych, podczas gdy niedobór Hif-1 α przyczynia się do powstawania trudno gojących się ran (Hong i wsp. 2014; Rycina 8). Co ciekawe, skóra płodów ssaków, które rozwijają się w środowisku wewnątrzmacicznym o obniżonej dostępności tlenu (hipoksja), goi się w sposób bezbliznowy (regeneracyjny) (Scheid i wsp. 2002). Różnice w ekspresji Hif-1 α między gojeniem regeneracyjnym (płody ssaczce), a reperacyjnym (dorosłe ssaki) w skórze zostały już opisane (Scheid i wsp. 2002). Badania Scheid i wsp. nie wykazały wzrostu ekspresji Hif-1 α w pourazowej skórze płodów owiec (okres gojenia bez blizn). Przeciwnie, podwyższony poziom Hif-1 α obserwowano w skórze dorosłych owiec (okres gojenia bliznowego). Wyniki naszych badań silnie korelują z badaniami Scheid i wsp. wskazując na związek pomiędzy pourazowym wzrostem ekspresji czynnika Foxn1, stymulowanymi w warunkach hipoksji genami oraz tworzeniem blizny. Co plasuje Foxn1 jako potencjalny regulator Hif-1 α , w naprawczym (bliznowym) gojeniu się ran skóry (Rycina 8).



Rycina 8. Ekspresja Hif-1 α w różnych typach gojenia urazów skóry ssaków. Opracowanie własne wykonane w programie Biorender.

Istotnym aspektem gojenia urazów skóry jest zamykanie się rany, osiągane dzięki procesom migracji i proliferacji keratynocytów, na którą wpływa środowiskowa dostępność tlenu w miejscu urazu (O'Toole i wsp. 1997; Xia i wsp. 2001). Jednak mechanizm leżący u podstaw stymulacji migracji w warunkach hipoksji zaobserwowany w keratynocytach nadal pozostaje niewyjaśniony (O'Toole i wsp. 1997; Xia i wsp. 2001). Analiza funkcjonalna keratynocytów (test zadrapania, *ang. scratch assay*) potwierdziła wcześniejsze doniesienia wykazując, iż migracja keratynocytów jest stymulowana warunkami obniżonej dostępności tlenu (Cowburn i wsp. 2014; Guo i wsp. 2010). Podczas gdy hipoksja jako pojedyncza zmienna indukowała migrację keratynocytów, to transdukcja Ad-Foxn1 do keratynocytów w warunkach hipoksji znacznie spowolniła tempo migracji (*Publikacja 2, Figura 7A-D*). Przeciwnie, nadekspresja Foxn1 w warunkach normoksji przyspieszyła migrację keratynocytów. Wyniki te sugerują udział Foxn1 jako elementu kontrolującego i regulującego tempo migracji keratynocytów w zależności od warunków: przyspieszający w normoksji, a obniżający w hipoksji. Analiza proteomu keratynocytów wskazała również grupę białek Ccn, które jako docelowe elementy szlaku hipoksja – Foxn1 i normoksja – Foxn1 mogą być zaangażowane w regulację migracji i proliferacji keratynocytów. Jak do tej pory dane literaturowe wykazały aktywny udział białek Ccn w odbudowie pourazowego naskórka. Badania Du i wsp. wykazały, że Ccn1 może bezpośrednio stymulować re-epitelializację podczas gojenia się ran skóry (Du i wsp. 2018). Natomiast Kiwanuka i wsp. zidentyfikowali, Ccn2 jako przejściowo syntetyzowany przez hiperproliferacyjne keratynocyty podczas re-epitelializacji rany (Kiwanuka i wsp. 2013). Wyniki przedstawionych danych proteomicznych ujawniły, że w keratynocytach transdukowanych Ad-Foxn1 ekspresja białek Ccn1 i Ccn2 jest obniżona niezależnie od warunków tlenowych (normoksja vs hipoksja). Pomimo wielu doniesień, ekspresja Ccn w keratynocytach wciąż pozostaje kontrowersyjna. Wiele danych z jednej strony wskazuje na obecność ekspresji Ccn2 na przykład w ludzkim naskórku (Quan i wsp. 2009), podczas gdy inne badania wykazują brak ekspresji tych białek w keratynocytach naskórka (Rittie i wsp. 2011). Zaprezentowane w pracy doktorskiej badania *in vivo* wykazały, stabilne poziomy białka Ccn2 w skórze myszy Foxn1^{+/+} podczas procesu gojenia urazów skóry. Natomiast, pourazowa skóra myszy Foxn1^{-/-} wykazała obniżony poziom białka Ccn2, co szczególnie obserwowano w dniach 3 i 5 (*Publikacja 2, Figura 6B*). Uzyskane dane mogą wskazywać na nowy szlak sygnałowy, w którym powstały uraz i hipoksja zwiększają ekspresję Foxn1, powodując obniżenie poziomu Ccn, co w konsekwencji wpływa na migrację keratynocytów (Rycina 9).

Tuż obok migracji i proliferacji komórkowej, angiogeneza odgrywa kluczową rolę w gojeniu się ran skóry, pozwalając na odtworzenie nowych naczyń włosowatych z istniejących naczyń krwionośnych wspomagając odzyskanie integralności tkanki (Tonnesen i wsp. 2000). w naskórku angiogeneza jest prawie nieobecna (Rittie i wsp. 2011). Jednak keratynocyty mogą uwalniać czynniki stymulujące głębsze warstwy skóry tj. skórę właściwą wpływając przez to pośrednio na procesy angiogenezy (Johnson i wsp. 2014). Badnia Gillis i wsp. wykazały silny wzrost ekspresji mRNA *Vegf* w nabłonku hiperproliferacyjnym podczas gojenia się ran (Gillis i wsp. 1999). Ponadto, zaobserwowano indukcję ekspresji *Vegf* po potraktowaniu nieaktywnych komórek odpowiednio: EGF, TGFβ-1, czynnikiem wzrostu keratynocytów (KGF) lub czynnikiem martwicy nowotworu α (TNF-α). Jako że wszystkie te czynniki są obecne w miejscu zranienia we wczesnej fazie gojenia, mogą być również odpowiedzialne za indukcję *Vegf* po uszkodzeniu skóry (Gillis i wsp. 1999). Obecnie wiadomo również, że receptory *Vegf* (VEGFR) występują na powierzchni innych typów komórek zaangażowanych w gojenie ran. Na przykład wykazano, iż keratynocyty i makrofagi, wykazują ekspresję VEGFR i są zdolne do bezpośredniej odpowiedzi na VEGF (Johnson i wsp. 2014).

We wcześniejszych badaniach Zespołu Biologii Regeneracyjnej zaobserwowano proangiogeny wpływ hipoksji na tworzenie przestrzennych sieci przez HUVEC (Wiśniewska i wsp. 2021). Prezentowana w niniejszej rozprawie analiza proteomiczna wykazała spadek poziomów białka *Vegfa* w keratynocytach stymulowanych *Foxn1* i hodowanych w warunkach hipoksji. Test funkcjonalny przeprowadzony z wykorzystaniem mediów pohodowlanych wykazał, iż stymulowane *Foxn1* keratynocyty hodowane w warunkach hipoksji uwalniają czynniki odpowiedzialne za zmniejszenie potencjału proangiogenego komórek HUVEC w porównaniu z medium keratynocytowym kontrolnym. Podobnie jak w przypadku regulacji migracji keratynocytów w zależności od warunków dostępności tlenu, *Foxn1* nadzoruje proces angiogenezy przeciwstawiając się gwałtownym zmianom środowiskowym (hipoksja vs normoksja).

Przeprowadzone analizy proteomiczne zarówno keratynocytów transdukowanych Ad-*Foxn1*, hodowanych w warunkach hipoksji lub normoksji, a także odpowiadających KCM pozwoliły na wykazanie wcześniej nierozpoznanej funkcji *Foxn1* jako elementu regulującego ochronę antyoksydacyjną w skórze. Wyniki tych analiz wskazały, że *Foxn1* reguluje ekspresję białek należących do kompleksu I i III łańcucha transportu elektronów (ETC, *ang. electron transport chain*) oraz uczestniczy w ochronie antyoksydacyjnej poprzez

synchronizację układu tioredoksyn. w kompleksie i wykazany został stymulowany poprzez Foxn1 wzrost ekspresji/poziomów białek Ndufv2, Ndufa2 i Ndufa13, których geny kodowane są przez jądrowe DNA (Koopman i wsp. 2010). Jednak, aby spełnić swoją rolę, białka te muszą być transportowane przez błonę mitochondrialną. Wcześniejsze badania Zespołu Biologii Regeneracyjnej wykazały udział Foxn1 w stymulacji zależnego od napięcia anionoselektywnego białka kanału 1 (*Vdac1*, ang. *Voltage Dependent Anion Channel 1*) (*in vitro*) (Kur-Piotrowska i wsp. 2018).

Podobną zależność obserwowano w badania *in vivo* wykazując wysokie poziomy ekspresji mRNA *Vdac1* w skórze myszy Foxn1^{+/+}, ale nie Foxn1^{-/-} (Kur-Piotrowska i wsp. 2017). Biorąc pod uwagę fakt, iż *Vdac1* tworzy kanały umożliwiające dyfuzję małych cząsteczek hydrofilowych przez zewnętrzną błonę mitochondrialną i błonę plazmatyczną, możliwy jest udział Foxn1 w koordynacji procesów zachodzących w łańcuchu oddechowym.

W mitochondriach do dominujących systemów buforujących reaktywne formy tlenu (RFT; ROS, ang. *Reactive Oxygen Species*) zaliczane są: glutaredoksyny, glutation (GSH), peroksyredoksyny (Prxs) i tioredoksyny (Koopman i wsp. 2010). Zaś, redukcja nadtlenu wodoru występuje przy udziale systemu redoks zawierającego m.in. GSH czy peroksyredoksyny. Aktywność Prxs jest utrzymywana przez sulfidoksyny (Srxn1), endogenne białka antyoksydacyjne hamujące apoptozę i produkcję RFT (He i wsp. 2021). Spośród wymienionych systemów buforujących zaangażowanych w reakcje redoks najsilniejszym układem oksydoredukcyjnym okazał się być układ tioredoksyn, który jest zaangażowany przede wszystkim w ochronę komórek przed stresem oksydacyjnym (Roussel i wsp. 2008). Potencjalna rola Foxn1 w regulacji układu Txn była analizowana w poprzednich badaniach Zespołu Biologii Regeneracyjnej, które wykazały obecność aktywnej formy Txn w keratynocytach stymulowanych Foxn1 (*in vitro*) (Kur-Piotrowska i wsp. 2018). Jednak dopiero szczegółowa analiza proteomu keratynocytów transdukowanych Ad-Foxn1 pozwoliła na skonstruowanie mapy interakcji białkowych. Na podstawie funkcjonalnego powiązania białek wykazano, że Foxn1 silnie aktywuje system redoks. Wśród białek silnie stymulowanych przez Foxn1 wyróżnione zostały białka układu tioredoksyn i ich reduktaz, które wraz z białkami detoksykacyjnymi m.in. Glrx5 i Srxn1 tworzą silny i spójny system obrony antyoksydacyjnej keratynocytów.

Co ciekawe, analizując profil białkowy keratynocytów stymulowanych Foxn1 zaobserwowano silny wzrost ekspresji Txn2 i Txnrd3, szczególnie w warunkach hipoksji.

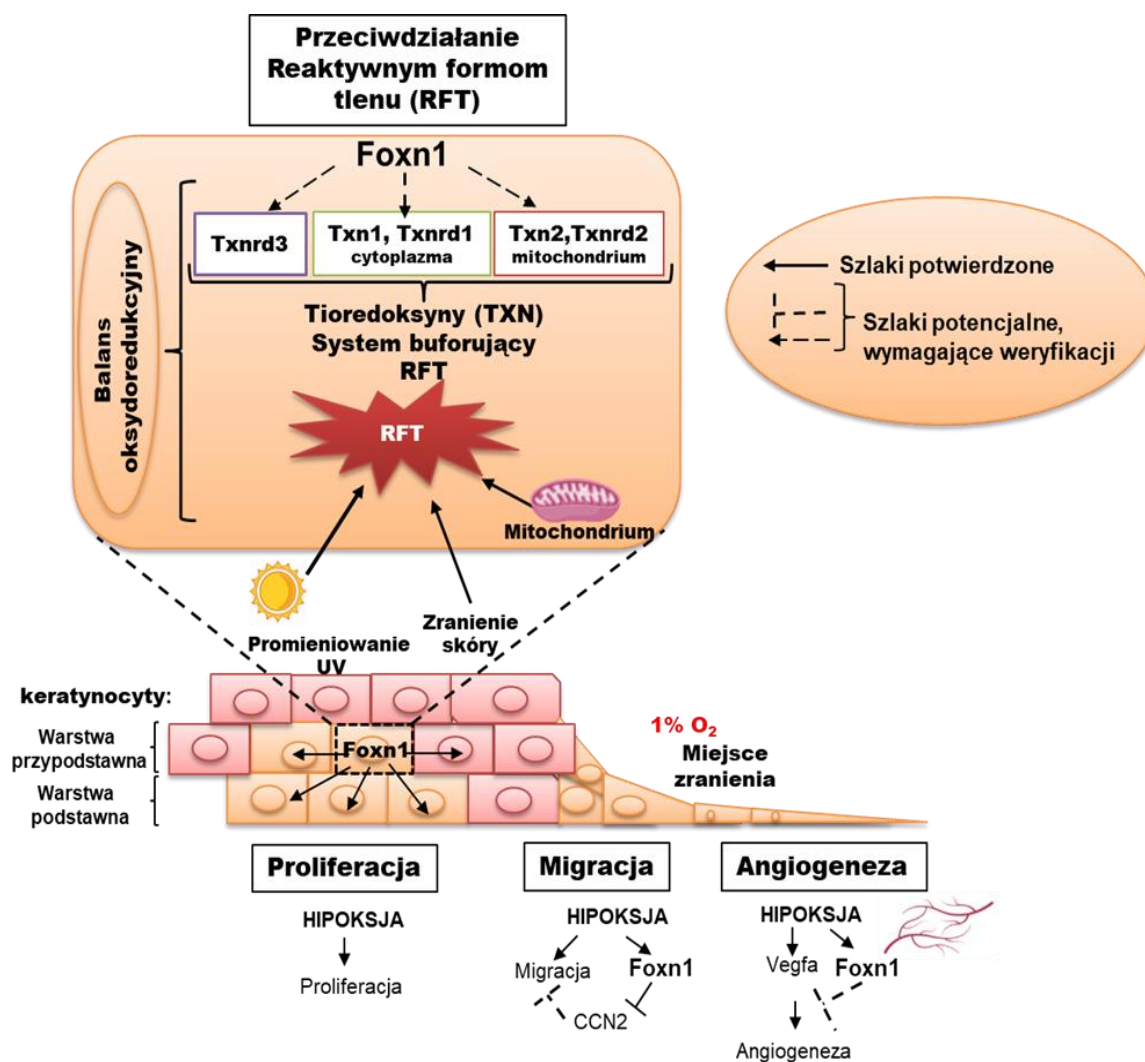
Dane literaturowe wskazują, że Txn2 odgrywa ważną rolę w regulacji potencjału błonowego mitochondriów oraz w ochronie przed apoptozą wywołaną utlenieniem (Damdimopoulos i wsp. 2002). Jednak najbardziej intrygujące wyniki zaobserwowano w przypadku Txnrd3, która działa nie tylko jako reduktor układu Txn, ale także pełni rolę utleniacza glutationu. Jak dotąd obecność Txnrd3 wykazano w narządach płciowych (jądra, jajniki) (Su i wsp. 2005; Rundlof i wsp. 2004), w śledzionie, nerkach, sercu i wątrobie (Rundlof i wsp. 2004). Zaprezentowane w niniejszej rozprawie wyniki analiz proteomicznych wykazały po raz pierwszy obecność białka Txnrd3 w keratynocytach, gdzie wzrost jego poziomów był stymulowany Ad-Foxn1 szczególnie w warunkach hipoksji. Warto nadmienić, iż dotychczas Txnrd3 wykryto jedynie w komórkach ludzkich, psich i szympanich, a prezentowane wyniki są pierwszymi identyfikującymi obecność aktywnej formy Txnrd3 w komórkach mysich (Su i wsp. 2005; Rundlöf i wsp. 2004). Ponadto przeprowadzone analizy *in silico* wykazały możliwe miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego Foxn1 w układzie tioredoksyn (Txn1, Txnrd1, Txn2, Txnrd2 i Txnrd3) (*Publikacja 2, Figura S6*).

6. Podsumowanie

Celem rozprawy doktorskiej było wykazanie współudziału czynnika transkrypcyjnego Foxn1 oraz hipoksji w regulacji procesu gojenia urazów skóry. Przeprowadzone badania wskazują, iż: (i) Foxn1, jako potencjalny regulator Hif-1 α /Fih-1, moduluje naprawcze/reperacyjne (bliznowe) gojenie się ran skóry poprzez regulowanie procesów związanych z odbudową naskórka (migracja keratynocytów) oraz angiogenezą (Rycina 9); (ii) brak aktywności Foxn1 (myszy Foxn1^{-/-}) skutkuje zaburzonymi/niestabilnymi poziomami ścieżki sygnałowej Hif-1 α /Fih-1 czego efektem jest bezbliznowe gojenie urazów skóry.

Ponadto, otrzymane wyniki są pierwszymi, które identyfikują czynnik transkrypcyjny Foxn1 jako możliwy regulator obrony antyoksydacyjnej skóry zaangażowany w modulację układu tioredoksyn (Txn) (Rycina 9).

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki wskazują na nowe kierunki badań dotyczących udziału Foxn1 i układu tioredoksyn w mechanizmach antyoksydacyjnych specyficznych dla skóry zarówno niezranionej, jak i pourazowej. Powszechnie wiadomo, że stres oksydacyjny w skórze odgrywa ważną rolę w procesie starzenia, co ma związek z osłabionymi mechanizmami antyoksydacyjnymi w skórze (Rinnerthaler i wsp. 2015). Biorąc pod uwagę, że większość przeciwutleniaczy wykazuje wyższe stężenie w naskórku niż w skórze właściwej, nasze dane identyfikują Foxn1 jako nowy składnik systemu antyoksydacyjnego.



Rycina 9. Schemat podsumowujący osiągnięte wyniki oraz możliwą rolę Foxn1 w procesie gojenia urazów skórnych. Opracowanie własne.

7. Wnioski

Weryfikacja postawionej w pracy hipotezy badawczej pozwoliła sformułować następujące wnioski:

1. Myszy pozbawione czynnika Foxn1 (myszy Foxn1^{-/-}) goją urazy skórne w procesie regeneracji, który charakteryzuje się m.in. szybką re-epitelializacją, wysokimi poziomami ekspresji Tgfβ-3 (izoforma pro-regeneracyjna) oraz zmodyfikowanymi charakterystycznymi dla gojenia regeneracyjnego poziomami Mmps/Timps.
2. Czynn timeranskrypcyjny Foxn1 nadzoruje procesy związane z odbudową pourazowego naskórka (migracja i proliferacja keratynocytów) oraz angiogenezą uczestnicząc w naprawczym gojeniu urazów skóry.
3. Foxn1 reguluje proces bliznowego (reperacyjnego/naprawczego) gojenia urazów skóry poprzez modulowanie ekspresji czynników indukowanych hipoksją: Hif-1α, Ep300 oraz Fih-1.
4. Foxn1 uczestniczy w indukcji systemu obrony antyoksydacyjnej poprzez aktywację układu tioredoksyn zarówno w skórze niezranionej, jak i podczas gojenia urazów skóry.
5. Czynn timer Foxn1 odgrywa nadrzędną rolę w stymulacji reduktazy tioredoksyny 3 (Txnrd3) uczestniczącej w regulacji potencjału oksydoredukcyjnego w skórze niezranionej, jak i pourazowej.

8. Bibliografia

1. Ansell DM, Campbell L, Thomason HA, Brass A, Hardman MJ. a statistical analysis of murine incisional and excisional acute wound models. Research Support, Non-U.S. Gov't. *Wound Repair Regen.* 2014;22(2):281-287. <https://doi.org/10.1111/wrr.12148>.
2. Bellavia G, Fasanaro P, Melchionna R, Capogrossi MC, Napolitano M. Transcriptional control of skin reepithelialization. *J. Dermatol. Sci.* 2014;73:3–9.
3. Blackburn CC, Augustine CL, Li R, Harvey RP, Malin MA, Boyd RL, Miller JF, Morahan G. The nu gene acts cell-autonomously and is required for differentiation of thymic epithelial progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jun 11;93(12):5742-6.
4. Błaszczuk M. Histologia dla kosmetologów; Oficyna Wydawnicza PWSZ Nysa 2013, wyd.1.
5. Bochenek A, Reicher M, Anatomia człowieka. Tom V. Układ nerwowy obwodowy. Układ nerwowy autonomiczny. Powłoka wspólna. Narządy zmysłów, wyd. VI, Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2018, ISBN 978-83-200-3258-1.
6. Bochenek A, Reicher M. Anatomia człowieka. Podręcznik dla studentów i lekarzy. T. V. Warszawa: PZWL, 1989.
7. Boehm T, Swann JB: Thymus involution and regeneration: two sides of the same coin? *Nat Rev Immunol* 2013, 13(11):831-838.
8. Bredenkamp N, Nowell CS, Blackburn CC. Regeneration of the aged thymus by a single transcription factor. *Development.* 2014 Apr;141(8):1627-37.
9. Brisette JL, Li J, Kamimura J, Lee D, Dotto GP. The product of the mouse nude locus, Whn, regulates the balance between epithelial cell growth and differentiation. *Genes Dev.* 1996;10(17):2212-2221.
10. Brockes JP, Kumar A: Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3: 566-574.
11. Cao X, He W, Pang Y, Cao Y, Qin A. Redox-dependent and independent effects of thioredoxin interacting protein. *Biol Chem.* 2020;401:1215-1231.

12. Chen L, Gajendrareddy PK, DiPietro LA. Differential expression of HIF-1 α in skin and mucosal wounds. Research Support, N.I.H., Extramural. *J Dent Res*. 2012;91(9):871-876. <https://doi.org/10.1177/0022034512454435>.
13. Cho S, Shin MH, Kim YK, Seo JE, Lee YM, Park CH, Chung JH. Effects of infrared radiation and heat on human skin aging in vivo. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2009 Aug;14(1):15-9.
14. Cichocki T, Litwin J, Mirecka J. Kompendium histologii; Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2009, wyd.4.
15. Cooper S. The Biology of the Skin. *J R Soc Med*. 2002 Feb;95(2):109. PMCID: PMC1279330.
16. Cowburn AS, Alexander LEC, Southwood M, Nizet V, Chilvers ER, Johnson RS. Epidermal deletion of HIF-2 α stimulates wound closure. *J Invest Dermatol*. 2014;134:801-808.
17. Czarnecka-Operacz M. Dry skin as an up-to-date clinical problem. *Post Dermatol Alergol* 2006; XXIII, 2: 49–56.
18. Damdimopoulos AE, Miranda-Vizuite A, Peltó-Huikko M, Gustafsson JA, Spyrou G. Human mitochondrial thioredoxin. Involvement in mitochondrial membrane potential and cell death. *J Biol Chem*. 2002;277:33249-33257.
19. Donati G, Proserpio V, Lichtenberger BM, Natsuga K, Sinclair R, Fujiwara H, Watt FM. Epidermal Wnt/ β -catenin signaling regulates adipocyte differentiation via secretion of adipogenic factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014;111:E1501–E1509.
20. Du H, Zhou Y, Suo Y, et al. CCN1 accelerates re-epithelialization by promoting keratinocyte migration and proliferation during cutaneous wound healing. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;505:966-972.
21. Frank J, Pignata C, Panteleyev AA, et al. Exposing the human nude phenotype. *Nature*. 1999;398(6727):473-474.
22. Freedberg IM, Tomic-Canic M, Komine M, Blumenberg M. Keratins and the keratinocyte activation cycle. *J Invest Dermatol*. 2001 May;116(5):633-40. doi: 10.1046/j.1523-1747.2001.01327.x. PMID: 11348449.

23. Gawronska-Kozak B, Bogacki M, Rim JS, Monroe WT, Manuel JA. Scarless skin repair in immunodeficient mice. *Wound Repair Regen.* 2006;14:265-276.
24. Gawronska-Kozak B, Grabowska A, Kur-Piotrowska A, Kopcewicz M. Foxn1 transcription factor regulates wound healing of skin through promoting epithelial-mesenchymal transition. Research Support, Non-U.S. Gov't. *PLoS ONE.* 2016;11(3):e0150635.
25. Gawrońska-Kozak B, Walendzik K, Machcinska S, Padzik A, Kopcewicz M, Wiśniewska J. Dermal White Adipose Tissue (dWAT) Is Regulated by Foxn1 and Hif-1 α during the Early Phase of Skin Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences.* 2022; 23(1):257.
26. Gawronska-Kozak B. Regeneration in the ears of immunodeficient mice: identification and lineage analysis of mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* 2004, 10: 1251-1265.
27. Gawronska-Kozak B. Scarless skin wound healing in FOXN1 deficient (nude) mice is associated with distinctive matrix metalloproteinase expression. *Matrix Biol.* 2011 May;30(4):290-300.
28. Gillis P, Savla U, Volpert OV, Jimenez B, Waters CM, Panos RJ, Bouck NP. Keratinocyte growth factor induces angiogenesis and protects endothelial barrier function. *J Cell Sci.* 1999 Jun;112 (Pt 12):2049-57.
29. Goss RJ, Grimes LN: Epidermal downgrowths in regenerating rabbit ear holes. *J Morphol.* 1975, 146: 533-542.
30. Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010;89(3):219-229.
31. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008;453(7193):314-321.
32. Han M, Yang X, Lee J, Allan CH, Muneoka K: Development and regeneration of the neonatal digit tip in mice. *Dev Biol.* 2008, 315: 125-135.

33. Han M, Yang X, Taylor G, Burdsal CA, Anderson RA, Muneoka K. Limb regeneration in higher vertebrates: developing a roadmap. *Anat Rec B New Anat.* 2005 Nov;287(1):14-24.
34. He J, Ma M, Li D, et al. Sulfiredoxin-1 attenuates injury and inflammation in acute pancreatitis through the ROS/ER stress/ cathepsin B axis. *Cell Death Dis.* 2021;12:626.
35. Hong WX, Hu MS, Esquivel M, Liang GY, Rennert RC, McArdle A, Paik KJ, Duscher D, Gurtner GC, Lorenz HP, Longaker MT. The Role of Hypoxia-Inducible Factor in Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2014 May 1;3(5):390-399.
36. Ibrahim, AE, Bagherani, N, Smoller, BR, Reyes-Baron, C, Bagherani, N.2021. Functions of the Skin. In: Smoller, B., Bagherani, N. (eds) *Atlas of Dermatology, Dermatopathology and Venereology* . Springer, Cham.
37. Ihara S, Motobayashi Y, Nagao E, Kistler A. Ontogenetic transition of wound healing pattern in rat skin occurring at the fetal stage. *Development*, 1990; 110: 671-680.
38. Johnson KE, Wilgus TA. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2014 Oct 1;3(10):647-661.
39. Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, et al. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 α . *EMBO J.* 1998;17:6573-6586.
40. Kasza I, Suh Y, Wollny D, Clark RJ, Roopra A, Colman RJ, MacDougald OA, Shedd TA, Nelson DW, Yen MI, Yen CL, Alexander CM. Syndecan-1 is required to maintain intradermal fat and prevent cold stress. *PLoS Genet.* 2014; 10:e1004514.
41. Kato T, Miyazaki K, Shimizu-Nishikawa K, Koshiba K, Obara M, Mishima HK i inni: Unique expression patterns of matrix metalloproteinases in regenerating newt limbs. *Dev Dyn*, 2003, 226: 366-376.
42. Kimmel HM, Grant A, Ditata J. The presence of oxygen in wound healing. *Wounds.* 2016;28:264-270.

43. Kiwanuka E, Hackl F, Caterson EJ, et al. CCN2 is transiently expressed by keratinocytes during re-epithelialization and regulates keratinocyte migration in vitro by the ras-MEK-ERK signaling pathway. *J Surg Res.* 2013;185:e109-e119.
44. Koopman WJ, Nijtmans LG, Dieteren CE, et al. Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation. *Antioxid Redox Signal.* 2010;12:1431-1470.
45. Kopcewicz M, Walendzik K, Bukowska J, Kur-Piotrowska A, Machcinska S, Gimble JM, Gawronska-Kozak B. Cutaneous wound healing in aged, high fat diet-induced obese female or male C57BL/6 mice. *Aging (Albany NY).* 2020 Apr 15;12(8):7066-7111.
46. Kopcewicz MM, Kur-Piotrowska A, Bukowska J, Gimble JM, Gawronska-Kozak B. Foxn1 and Mmp-9 expression in intact skin and during excisional wound repair in young, adult, and old C57Bl/6 mice. *Wound Repair Regen.* 2017;25(2):248-259.
47. Kur-Piotrowska A, Kopcewicz M, Kozak LP, Sachadyn P, Grabowska A, Gawronska-Kozak B. Neotenic phenomenon in gene expression in the skin of Foxn1- deficient (nude) mice - a projection for regenerative skin wound healing. *BMC Genomics.* 2017 Jan 9;18(1):56.
48. Kur-Piotrowska A, Kopcewicz M, Kozak LP, Sachadyn P, Grabowska A, Gawronska-Kozak B. Neotenic phenomenon in gene expression in the skin of Foxn1- deficient (nude) mice - a projection for regenerative skin wound healing. *BMC Genomics.* 2017 Jan 9;18(1):56.
49. Lechler T, Fuchs E. Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature.* 2005 Sep 8;437(7056):275-80.
50. Lee B, Villarreal-Ponce A, Fallahi M, Ovadia J, Sun P, Yu Q.C, Ito S, Sinha S, Nie Q, Dai X. Transcriptional mechanisms link epithelial plasticity to adhesion and differentiation of epidermal progenitor cells. *Dev. Cell.* 2014;29:47–58.
51. Lee D, Prowse DM, Brissette JL. Association between mouse nude gene expression and the initiation of epithelial terminal differentiation. *Dev Biol.* 1999 Apr 15;208(2):362-74.

52. Leigh IM, Lane B, Watt FM. The keratinocyte handbook. 1994; Cambridge University 1994.
53. Lokmic Z, Musyoka J, Hewitson TD, Darby IA. Hypoxia and hypoxia signaling in tissue repair and fibrosis. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012;296:139-185.
54. Lorenz HP, Adzick NS. Scarless skin wound repair in the fetus. *West J Med.* 1993 Sep;159(3):350-5.
55. Lorenz HP, Longaker MT, Perkocha LA, Jennings RW, Harrison MR, Adzick NS. Scarless wound repair: a human fetal skinmodel. *Development*, 1992; 114: 253-259.
56. Manuel JA, Gawronska-Kozak B. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) is upregulated during scarless wound healing in athymic nude mice. *Matrix Biol.* 2006 Oct;25(8):505-14.
57. McAnulty RJ. Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(4):666-71.
58. Mori R, Tanaka K, de Kerckhove M, Okamoto M., Kashiya K., Kim S., Kawata T., Komatsu T., Park S., Ikematsu K., et al. Reduced FOXO1 expression accelerates skin wound healing and attenuates scarring. *Am. J. Pathol.* 2014;184:2465–2479.
59. Müller SM, Terszowski G, Blum C, Haller C, Anquez V, Kuschert S, Carmeliet P, Augustin HG, Rodewald HR. Gene targeting of VEGF-A in thymus epithelium disrupts thymus blood vessel architecture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jul 26;102(30):10587-92.
60. Nehls M, Kyewski B, Messerle M, Waldschütz R, Schüddekopf K, Smith AJ, Boehm T. Two genetically separable steps in the differentiation of thymic epithelium. *Science.* 1996 May 10;272(5263):886-9.
61. Nehls M, Pfeifer D, Schorpp M, Hedrich H, Boehm T. New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. *Nature.* 1994;372(6501):103-107.
62. Ortman CL, Dittmar KA, Witte PL, Le PT. Molecular characterization of the mouse involuted thymus: aberrations in expression of transcription regulators in thymocyte and epithelial compartments. *Int Immunol.* 2002 Jul;14(7):813-22.

63. O'Toole EA, Marinkovich MP, Peavey CL, et al. Hypoxia increases human keratinocyte motility on connective tissue. *J Clin Invest.* 1997;100:2881-2891.
64. Park JE, Barbul A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg.* 2004 May;187(5A):11S-16S.
65. Pignata C, Fiore M, Guzzetta V, et al. Congenital Alopecia and nail dystrophy associated with severe functional T-cell immunodeficiency in two sibs. *Am J Med Genet.* 1996;65(2):167-170.
66. Piipponen M, Li D, Landén NX. The Immune Functions of Keratinocytes in Skin Wound Healing. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 20;21(22):8790.
67. Poss KD, Keating MT, Nechiporuk A: Tales of regeneration in zebrafish. *Dev Dyn,* 2003, 226: 202-210.
68. Prowse DM, Lee D, Weiner L, Jiang N, Magro CM, Baden HP, Brissette JL. Ectopic expression of the nude gene induces hyperproliferation and defects in differentiation: implications for the self-renewal of cutaneous epithelia. *Dev Biol.* 1999 Aug 1;212(1):54-67.
69. Quan T, Shin S, Qin Z, Fisher GJ. Expression of CCN family of genes in human skin in vivo and alterations by solar simulated ultraviolet irradiation. *J Cell Commun Signal.* 2009;3:19-23.
70. Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel MK, Trost A, Richter K. Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules.* 2015 Apr 21;5(2):545-89.
71. Rittie L, Perbal B, Castellet JJ Jr, Orringer JS, Voorhees JJ, Fisher GJ. Spatial-temporal modulation of CCN proteins during wound healing in human skin in vivo. *J Cell Commun Signal.* 2011;5:69-80.
72. Romanovsky AA. Skin temperature: its role in thermoregulation. *Acta Physiol (Oxf).* 2014 Mar;210(3):498-507.
73. Roussel X, Bechade G, Kriznik A, et al. Evidence for the formation of a covalent thiosulfinate intermediate with peroxiredoxin in the catalytic mechanism of sulfiredoxin. *J Biol Chem.* 2008;283:22371-22382.

74. Rowlatt U. Cleft lip and palate associated with amniotic band limb amputations in a 20 week human fetus. *Cleft. Palate. J.*, 1979; 16: 206-209.
75. Rundlöf AK, Arnér ES. Regulation of the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase 1 in relation to cellular phenotype, growth, and signaling events. *Antioxid Redox Signal.* 2004 Feb;6(1):41-52.
76. Sano H, Ichioka S, Sekiya N. Influence of oxygen on wound healing dynamics: assessment in a novel wound mouse model under a variable oxygen environment. *PLoS One.* 2012;7:e50212.
77. Sawicki W. *Histologia.* PZWL, 2005. ISBN 83-200-3127-3.
78. Schafer M., Werner S. Transcriptional control of wound repair. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2007;23:69–92. doi: 10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123609.
79. Scheid A, Wenger RH, Christina H, Camenisch I, Ferenc A, Stauffer UG, Gassmann M, Meuli M. Hypoxia-regulated gene expression in fetal wound regeneration and adult wound repair. *Pediatr Surg Int.* 2000;16(4):232-236.
80. Schmidt BA, Horsley V. Intra dermal adipocytes mediate fibroblast recruitment during skin wound healing. *Development.* 2013; 140:1517–27.
81. Seifert AW, Kiama SG, Seifert MG, Goheen JR, Palmer TM, Maden M. Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (*Acomys*). *Nature.* 2012;489(7417):561-565.
82. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999 Sep 2;341(10):738-46.
83. Słominski AT, Manna PR, Tuckey RC. On the role of skin in the regulation of local and systemic steroidogenic activities. *Steroids.* 2015;103:72-88.
84. Słominski AT, Żmijewski MA, Skobowiat C, Zbytek B, Słominski 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.

85. Su D, Novoselov SV, Sun QA, et al. Mammalian selenoprotein thioredoxin-glutathione reductase. Roles in disulfide bond formation and sperm maturation. *J Biol Chem*. 2005;280:26491-26498.
86. Sun L, Guo J, Brown R, Amagai T, Zhao Y, Su DM. Declining expression of a single epithelial cell-autonomous gene accelerates age-related thymic involution. *Aging Cell*. 2010 Jun;9(3):347-57.
87. Szadvari I, Krizanova O, Babula P. Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment. *Physiol Res*. 2016 Dec 21;65(Suppl 4):S441-S453.
88. Teng A, Nair M, Wells J, Segre JA, Dai X. Strain-dependent perinatal lethality of *Ovol1*-deficient mice and identification of *Ovol2* as a downstream target of *Ovol1* in skin epidermis. *Biochim. Biophys. Acta*. 2007;1772:89–95.
89. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2000 Dec;5(1):40-6.
90. Tottoli EM, Dorati R, Genta I, Chiesa E, Pisani S, Conti B. Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound Care and Regeneration. *Pharmaceutics*. 2020 Aug 5;12(8):735.
91. Walendzik K, Kopcewicz M, Bukowska J, Panasiewicz G, Szafranska B, Gawronska-Kozak B. The Transcription Factor FOXN1 Regulates Skin Adipogenesis and Affects Susceptibility to Diet-Induced Obesity. *J Invest Dermatol*. 2020 Jun;140(6):1166-1175.e9.
92. Weiner L, Han R, Scicchitano BM, Li J, Hasegawa K, Grossi M, Lee D, Brissette JL. Dedicated epithelial recipient cells determine pigmentation patterns. *Cell*. 2007 Sep 7;130(5):932-42.
93. Welsh SJ, Bellamy WT, Briehl MM, Powis G. The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis. *Cancer Res*. 2002;62:5089-5095.
94. Wiśniewska J, Słyszewska M, Stańkowska K, Walendzik K, Kopcewicz M, Machcińska S, Gawrońska-Kozak B. Effect of Pig-Adipose-Derived Stem Cells'

Conditioned Media on Skin Wound-Healing Characteristics In Vitro. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(11):5469.

95. Wojciechowicz K, Gledhill K, Ambler CA, Manning CB, Jahoda CA. Development of the mouse dermal adipose layer occurs independently of subcutaneous adipose tissue and is marked by restricted early expression of FABP4. *PLoS One*. 2013;8(3):e59811.
96. Xia YP, Zhao Y, Tyrone JW, Chen A, Mustoe TA. Differential activation of migration by hypoxia in keratinocytes isolated from donors of increasing age: implication for chronic wounds in the elderly. *J Invest Dermatol*. 2001;116:50-56.
97. Xiao H, Gu Z, Wang G, Zhao T. The possible mechanisms underlying the impairment of HIF-1alpha pathway signaling in hyperglycemia and the beneficial effects of certain therapies. *Int J Med Sci*. 2013;10:1412-1421.
98. Xue M, Jackson CJ. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015 Mar 1;4(3):119-136.
99. Yuspa SH, Kilkenny AE, Steinert PM, Roop DR. Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *J Cell Biol*. 1989 Sep;109(3):1207-17.
100. Zhang Z, Burnley P, Coder B, Su DM. Insights on FoxN1 biological significance and usages of the "nude" mouse in studies of T-lymphopoiesis. *Int J Biol Sci*. 2012;8(8):1156-67.
101. Zhou J, Damdimopoulos AE, Spyrou G, Brune B. Thioredoxin 1 and thioredoxin 2 have opposed regulatory functions on hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem*. 2007;282:7482-7490

9. Publikacje wraz z oświadczeniami autorów

Niniejszym oświadczam, że publikacja:

Machcinska S, Kopcewicz M, Bukowska J, Walendzik K, Gawronska-Kozak B.

Impairment of the Hif-1 α regulatory pathway in Foxn1-deficient (Foxn1^{-/-}) mice affects the skin wound healing process." The FASEB Journal.2021;35:e21289 powstała w wyniku poniżej określonego, indywidualnego wkładu współautorów:

Machcińska-Zielińska Sylwia- 55% - udział w przeprowadzeniu doświadczeń *in vivo*; wykonanie i analiza barwień immunohistochemicznych i immunofluorescencyjnych; wykonanie analiz molekularnych oraz biochemicznych; analiza Western Blot; przeprowadzenie doświadczeń *in vitro*; zebranie, opracowanie i interpretacja wyników; przygotowanie manuskryptu; zatwierdzenie publikacji

Kopcewicz Marta - 15% - udział w przeprowadzeniu doświadczenia *in vivo*; wykonanie analiz qRT-PCR ; zatwierdzenie publikacji

Wiśniewska (rodowe Bukowska) Joanna - 5% - analiza komórek z wykorzystaniem cytometrii przepływowej; zatwierdzenie publikacji

Walendzik Katarzyna - 5% - wykonanie analizy hydroksyproliny; zatwierdzenie publikacji

Gawrońska-Kozak Barbara - 20% - udział w przeprowadzeniu doświadczeń *in vivo*; opracowanie koncepcji badań; administracja projektu; interpretacja wyników; przygotowanie manuskryptu; zatwierdzenie publikacji

Olsztyn, 08.11.2022 r.

Sylwia Machcińska-Zielińska
mgr Sylwia Machcińska-Zielińska

Olsztyn, 08. 11.2022 r.

Marta Kopcewicz
dr Marta Kopcewicz

Olsztyn, 08.11.2022 r.

Joanna Wiśniewska
dr Joanna Wiśniewska (Bukowska)

Olsztyn, 08.11.2022 r.

Katarzyna Walendzik
dr Katarzyna Walendzik

Olsztyn, 08.11.2022 r.

Barbara Gawrońska-Kozak
prof. dr. hab. Barbara Gawrońska – Kozak

Niniejszym oświadczam, że publikacja:

Machcinska S, Walendzik K, Kopcewicz M, Wisniewska J, Rokka A, Pääkkönen M, Slowinska M, Gawronska-Kozak B.

„Hypoxia reveals a new function of Foxn1 in the keratinocyte antioxidant defense system.” The FASEB Journal. 2022;36:e22436 powstała w wyniku poniżej określonego, indywidualnego wkładu współautorów:

Machcińska-Zielińska Sylwia - 55% - opracowanie koncepcji badań; przeprowadzenie doświadczeń *in vitro*: izolacja komórek skóry; przygotowanie komórek i mediów pochodowlanych do analizy spektrometrii masowej; wykonanie i analiza barwień immunohistochemicznych i immunofluorescencyjnych; wykonanie analiz molekularnych; wykonanie analiz bioinformatycznych; zebranie, opracowanie i interpretacja wyników; przygotowanie manuskryptu; zatwierdzenie publikacji

Walendzik Katarzyna - 5% - udział w izolacji i hodowli komórek skóry; udział w przygotowaniu komórek i mediów pochodowlanych do analizy spektrometrii masowej; korekta manuskryptu; zatwierdzenie publikacji

Kopcewicz Marta - 5% - wykonanie analizy qRT-PCR; korekta manuskryptu; zatwierdzenie publikacji

Wiśniewska (rodowe Bukowska) Joanna - 5% - analiza komórek z wykorzystaniem cytometrii przepływowej; korekta manuskryptu; zatwierdzenie publikacji

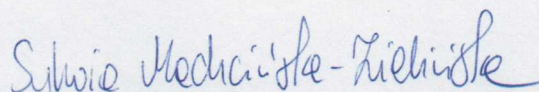
Rokka Anne - 5% - wykonanie analizy spektrometrii masowej (LC-MS/MS); zatwierdzenie publikacji

Pääkkönen Mirva - 5% - wykonanie analizy spektrometrii masowej (LC-MS/MS); zatwierdzenie publikacji

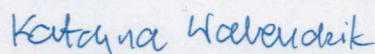
Słowińska Mariola - 5% - udział w przygotowaniu komórek i mediów pochodowlanych do analizy spektrometrii masowej; zatwierdzenie publikacji

Gawronska-Kozak Barbara - 15% - opracowanie koncepcji badań; administracja projektu; interpretacja wyników; przygotowanie manuskryptu; zatwierdzenie publikacji

Olsztyn, 08.11.2022 r.

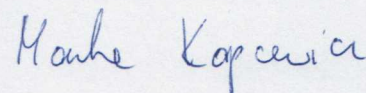

mgr Sylwia Machcińska-Zielińska

Olsztyn, 08.11.2022 r.



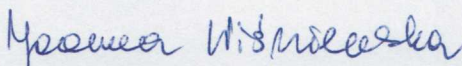
dr Katarzyna Walendzik

Olsztyn, 08.11.2022 r.



dr Marta Kopcewicz

Olsztyn, 08.11.2022 r.


dr Joanna Wiśniewska (Bukowska)

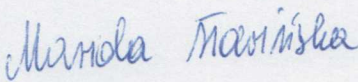
Olsztyn, 08.11.2022 r.


dr Anne Rokka

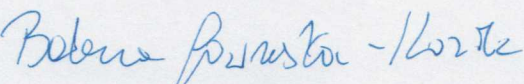
Olsztyn, 08.11.2022 r.


mgr Mirva Pääkkönen

Olsztyn, 08.11.2022 r.


dr hab. Mariola Słowińska

Olsztyn, 08.11.2022 r.


prof. dr. hab. Barbara Gawrońska - Kozak