# Streszczenie w języku polskim

Nabłonek oddechowy stanowi pierwszą linię obrony przed szkodliwymi czynnikami środowiskowymi, a także pełni kluczową rolę w integracji odporności nabytej i wrodzonej. Uszkodzenie nabłonka i utrata jego funkcji jako bariery powoduje zwiększoną przepuszczalność dla środowiskowych alergenów, patogenów i substancji toksycznych i konsekwentnie wymaga jak najszybszej odnowy bariery komórkowej. Kolejne etapy naprawy uszkodzenia składają się z procesów odróżnicowania, migracji, proliferacji i ponownego zróżnicowania komórek, co wymaga zmiennej ekspresji różnych genów. Jednym z mechanizmów regulacji ekspresji są niewielkie (21-25 nukleotydów), niekodujące cząsteczki RNA zwane mikroRNA (miRNA). Głównym celem pracy była ocena wpływu miRNA na naprawę uszkodzonego nabłonka oddechowego in vitro.

Jako model badawczy wykorzystane zostały dwie ludzkie linie komórkowe nabłonka oskrzelowego: unieśmiertelniona linia 16HBE14o- (komórki niezróżnicowane) oraz podlegające różnicowaniu komórki pierwotne (NHBE). RNA zostało wyizolowane podczas różnych punktów czasowych naprawy uszkodzenia (wybranych po obserwacji mikroskopowej w czasie rzeczywistym) i przepisane na cDNA. Ekspresję profilu miRNA oznaczono za pomocą gotowych kart mikrofluidowych TaqMan® Array Human MicroRNA. Celem identyfikacji wspólnego profilu ekspresji genów miRNA, wykonano analizę klasterową za pomocą algorytmu STEM. Za pomocą algorytmu miRNA Body Map wytypowano listę potencjalnych genów docelowych dla miRNA, a następnie preprowadzono analizę wzbogaconych szlaków sygnałowych i genów z wykorzystaniem bazy danych DAVID. Ekspresję genów, będących potencjalnym celem dla wybranego miRNA oznaczano za pomocą specyficznych starterów i mieszaniny reakcyjnej qPCR opartej na barwniku fluorescencyjnym. Analizę statystyczną przeprowadzono w programie Statistica 11.0.

Profil ekspresji mikroRNA był znacząco zmieniony podczas naprawy uszkodzenia w obu liniach komórkowych. Wyciszenie globalnej ekspresji miRNA za pomocą siRNA przeciwko mRNA DROSHA oraz DICER w obu liniach komórkowych spowodowało istotne statystycznie wydłużenie czasu naprawy uszkodzonego nabłonka oddechowego (dla NHBE p=0,004; dla 16HBE14o- p=0,003). Potwierdzono wpływ miR-328 na szybkość naprawy nabłonka oddechowego w linii 16HBE14o-; (prawdopodobnie poprzez szlak sygnałowy regulacji cytoszkieletu aktynowego, p=0.042), podczas gdy miR-342, miR-411, miR-609 i miR-888 nie wykazały regulacji szybkości naprawy uszkodzenia.

Analiza wspólnego profilu ekspresji dla komórek NHBE wykazała dwa istotne profile: profil 9 (p=2,4E-21) oraz profil 17 (p=5,2E-7), odpowiedzialnych za regulację szlaków sygnałowych związanych z podziałem, różnicowaniem, wzrostem, ruchem i przeżywaniem komórek oraz kontrolą ekspresji genów. Co więcej, ekspresja miR-455-3p wykazała znaczące zmiany 16h po uszkodzeniu (p=0.02). Porównanie ekspresji miRNA w niezróżnicowanych i zróżnicowanych hodowlach komórkowych wykazały, że 10 genów miRNA wykazuje podobny wzór ekspresji w obu liniach. Wyselekcjonowane miRNA mogą potencjalnie regulować geny związane z regulacją cytoszkieletu aktynowego, adhezją, połączeniami międzykomórkowymi i interakcją cytokin z ich receptorami.

Podsumowując, kilkanaście miRNA wykazało znaczne zmiany w ekspresji podczas naprawy uszkodzonego nabłonka oddechowego w zróżnicowanych i niezróżnicowanych komórkach, co udowadnia ich istotną rolę w tym procesie. Co wiecej, wyciszenie globalnej ekspresji miRNA znacząco wpływa na spowolnienie naprawy. W linii komórkowej 16HBE14o-, miR-328 wykazał możliwość kontroli szybkości naprawy, prawdopodobnie poprzez regulację cytoszkieletu aktynowego, podczas gdy w komórkach NHBE miR-455-3p wykazał znaczne zmiany w ekspresji 16h po uszkodzeniu; potencjalnymi genami docelowymi dla tego miRNA są TGF-β1 i TGF-βR3. Podobne profile ekspresji dla kilkunastu genów miRNA zaobserwowano w obu liniach, co potwierdza ważną rolę miRNA podczas naprawy nabłonka oddechowego, niezależnie od stanu zróżnicowania.

# Streszczenie w języku angielskim

Airway epithelium is the first line of defence against environmental risk factors and plays a crucial role in the integrating of innate and adaptive immune responses. Increased permeability for environmental allergens, pathogens and toxic substances caused by the loss of barrier function upon injury requires the wounded airway epithelium to restore the cellular barrier. The consecutive stages of wound repair include cell migration, dedifferentiation, spreading of the cells to close the wound, proliferation and differentiation. All of these processes are regulated by changes in gene expression. One of the plausible biological mechanisms of gene expression regulation are small; noncoding RNAs called microRNAs (miRNAs). We aimed to investigate the role of microRNA on epithelial wound repair *in vitro.*

Two types of bronchial epithelial cells were used: immortalised 16HBE14o- cell line and the differentiated primary normal human bronchial epithelium (NHBE). RNA was isolated at different time points following injury (selected after observation with time-lapse microscopy) and reverse transcribed to cDNA. MiRNA expression was analyzed with TaqMan® Array Human MicroRNA Cards. STEM cluster analysis algorithm was performed to investigate the shared common expression profile of miRNA genes during epithelial repair. Potential target gene list was created using miRNA BodyMap database. Pathway enrichment analysis for target genes was performed with the DAVID online database. Target gene expression was analyzed with the use of primers and fluorescent dye-based qPCR mix. Statistical analysis was performed in Statistica 11.0.

MiRNA expression profile was altered during the wound repair in both cell lines. Moreover, silencing of DICER and DROSHA mRNA had significantly lengthened the regeneration process (for NHBE p=0.004; for 16HBE14o- p=0.003). MiR-328 was confirmed to influence the repair rate of injured 16HBE14o- cell line (possibly by regulation of actin cytoskeleton pathway, p=0.042), whereas miR-342, miR-411, miR-609 and miR-888 did not affect this process. Cluster analysis in NHBE had revealed two common miRNA expression profiles: 9 (p=2.4E-21) and 17 (p=5.2E-7), responsible for regulation of several pathways responsible for cell proliferation, differentiation, growth, motility, survival and gene expression control. Moreover, the miR-455-3p expression had shown to be significantly altered 16 h following injury (p=0.02). Comparison analysis had revealed ten genes that shared common expression profile between two cell lines; these genes might regulate actin cytoskeleton pathway, cell adhesion, tight and gap junctions.

In conclusion, multiple miRNAs are expressed differently during airway epithelial repair in differentiated and undifferentiated cells, which suggest their importance in the regulation of this process. Moreover, altered global microRNA expression significantly influenced the rate of repair. In 16HBE14o- cell line, miR-328 had shown to impede repair process, possibly by regulation of the actin cytoskeleton pathway; whereas, in NHBE, miR-455-3p had significantly changed expression 16 h following injury; potential targets of this miRNA are *TGF-β1* and *TGF-βR3.* Similar expression profiles for several miRNA genes were observed in both cell lines, suggesting the important role of miRNA during repair of the injury, regardless of the differentiation state.