

Nabłonek oddechowy stanowi pierwszą linię obrony przed szkodliwymi czynnikami środowiskowymi, a także pełni kluczową rolę w integracji odporności nabytej i wrodzonej. Naprawa uszkodzonego nabłonka oddechowego ma na celu jak najszybsze odtworzenie bariery komórkowej, gdyż utrata jej funkcji powoduje zwiększoną przepuszczalność dla środowiskowych alergenów, patogenów i substancji toksycznych. Przewlekły stan zapalny dróg oddechowych, leżący u podłoża takich chorób jak astma czy choroba obturacyjna płuc, wywołuje zaburzenia w naprawie nabłonka, co prowadzi do tzw. remodelingu – zmian strukturalnych i funkcjonalnych dróg oddechowych. Główne etapy naprawy uszkodzenia to migracja komórek, ich odróżnicowanie, rozciągnięcie celem zasklepienia uszkodzenia, a następnie proliferacja i zróżnicowanie strukturalne i funkcjonalne. Procesy te wymagają zmiennej ekspresji różnych genów. Jednym z mechanizmów regulacji ekspresji są niewielkie, niekodujące cząsteczki RNA zwane mikroRNA (miRNA). Oprócz nielicznych doniesień literaturowych, dokładny udział miRNA w naprawie nabłonka oddechowego nie został dobrze poznany. Wyniki naszych poprzednich badań wykazały zmieniony profil ekspresji wielu miRNA podczas naprawy uszkodzeń hodowli komórkowej ludzkiego nabłonka oddechowego na różnych etapach procesu regeneracji, co wskazuje na znaczący udział tych cząsteczek w tym procesie. Jeden z badanych przez nas miRNA, miR-328, wykazał ponad 10-krotne zmiany w ekspresji na poszczególnych etapach naprawy, a jego inhibicja spowodowała znaczące wydłużenie czasu naprawy uszkodzenia w stosunku do komórek kontrolnych. Dlatego celem niniejszych badań jest identyfikacja docelowych mRNA i białek, których ekspresję reguluje mikroRNA-328, i które mogą być istotne w procesie naprawy nabłonka oddechowego.

Do badań wykorzystana zostanie ludzka linia nabłonka oddechowego 16HBE14o-. Hodowle komórek zostaną poddane uszkodzeniu mechanicznemu, a następnie przeprowadzona zostanie izolacja RNA i białka w wybranych punktach czasowych (przed uszkodzeniem, 4h, 8h i 16h po uszkodzeniu). Ekspresja wybranych potencjalnych genów docelowych dla miR-328 zostanie przeanalizowana za pomocą metody sekwencjonowania nowej generacji. Celem potwierdzenia wiązania między docelowym mRNA a badanym miR-328 zostanie przeprowadzony pomiar aktywności lucyferazy. Dla mRNA zweryfikowanych w teście lucyferazowym zostanie wykonane oznaczenie białek przez nie kodowanych z użyciem metody Western Blot. W przypadku znacznych różnic w ekspresji białka podlegającego regulacji przez miR-328, wykonana będzie immunocytochemia w celu lokalizacji białka w na różnych etapach naprawy nabłonka oddechowego *in vitro*.

Przewlekły stan zapalny dróg oddechowych charakteryzuje się nieprawidłowym procesem naprawy nabłonka oddechowego, a w rezultacie zmianami funkcjonalnymi i strukturalnymi w nabłonku, leżącymi u podłoża patogenezy astmie i przewlekłej obturacyjnej choroby płuc. Identyfikacja mRNA, których ekspresja kontrolowana jest przez miR-328, istotny w naprawie uszkodzeń nabłonka, umożliwi opracowanie nowych metod leczenia tych chorób, takich jak terapia celowana z użyciem inhibitorów lub syntetycznych miRNA, a także nowych metod diagnostycznych, co mogłoby stanowić przełom w leczeniu tych chorób. Wyniki niniejszego projektu będą stanowiły wstęp do dalszych badań nad udziałem miRNA w regeneracji nabłonka również w warunkach *in vivo* na modelu zwierzęcym oraz w badaniach klinicznych, co przekracza jednak ramy finansowe niniejszego projektu.