

AUTOREFERAT

*Mechanizmy transkrypcyjne komórkowej
odpowiedzi na nieprawidłowo zwinięte białka*

Dr Rafał Bartoszewski

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego
Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk, 2014

1. Imię i nazwisko:

Rafał Bartoszewski

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

22 grudnia 2005 roku – *doktor nauk biologicznych w zakresie biochemii.*

Wydział Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego. Rozprawa doktorska pt. „Charakterystyka karboksylazy - oksygenazy rybulozo 1,5 bisfosforanu (rubisko) z termofilnej sinicy *Thermosynechococcus elongatus*”. Promotor prof. dr hab. Andrzej Szczepaniak.

19 czerwca 2001 roku – *magister biotechnologii,*

Wydział Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego. Promotor prof. dr hab. Andrzej Szczepaniak.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

2011 - teraz: *adiunkt.*

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej.

2009-2011: pracownik naukowy (*research associate*).

Department of Cell Biology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL USA

2006 - 2008: *postdoctoral fellow.*

Department of Cell Biology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL USA

4. Wskazane osiągnięcia¹ naukowe wynikające z art. 16, Ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

Tytuł osiągnięcia naukowego:

Mechanizmy transkrypcyjne komórkowej odpowiedzi na nieprawidłowo zwinięte białka

¹ W przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie – Załącznik nr 5.

a) Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia:

- 4.1. **R. Bartoszewski**, A. Rab, G. Twitty, L. Stevenson, J. Fortenberry, A. Piotrowski, J. P. Dumanski, Z. Bebok; *The mechanism of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator transcriptional repression during the unfolded protein response*; 2008; Journal of Biological Chemistry 283 (18), 12154-12165. IF₂₀₀₈ = 5,52.
- 4.2. **R. Bartoszewski**, A. Rab, A. Jurkuvenaite, M. Mazur, J. Wakefield, J.F. Collawn, Z. Bebok; *Activation of the unfolded protein response by $\Delta F508CFTR$* ; 2008; American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 39 (4), 448.-457. IF₂₀₀₈ = 4,477.
- 4.3. A. Rab, **R. Bartoszewski**, A. Jurkuvenaite, J. Wakefield, J. F. Collawn, Z. Bebok; *Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response regulate genomic cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression*; 2007; American Journal of Physiology - Cell Physiology 292 (2), C756-C766. IF₂₀₀₇ = 4,230.
- 4.4.[#] **R. Bartoszewski**, A. Rab, L. Fu, S. Bartoszewska, J. Collawn, Z. Bebok; *CFTR expression regulation by the unfolded protein response*; 2011; Methods in Enzymology 491, 3-24. IF₂₀₁₁ = 2,042.
- 4.5. **R. Bartoszewski***, J.W. Brewer, A. Rab, D. K. Crossman, S. Bartoszewska, N. Kapoor, C. Fuller, J. F. Collawn, Z. Bebok; *The unfolded protein response (UPR)-activated transcription factor X-box-binding protein 1 (XBP1) induces microRNA-346 expression that targets the human antigen peptide transporter 1 (TAP1) mRNA and governs immune regulatory genes*; 2011; Journal of Biological Chemistry 286 (48), 41862-41870. IF₂₀₁₁ = 4,773.
- 4.6.[#] S. Bartoszewska, K. Kochan, P. Madanecki, A. Piotrowski, R. J. Ochocka, J. F. Collawn, **R. Bartoszewski***; *Regulation of the unfolded protein response by microRNAs*; 2013; Cellular & Molecular Biology Letters 18 (4), 555-578. IF₂₀₁₂=1.953.

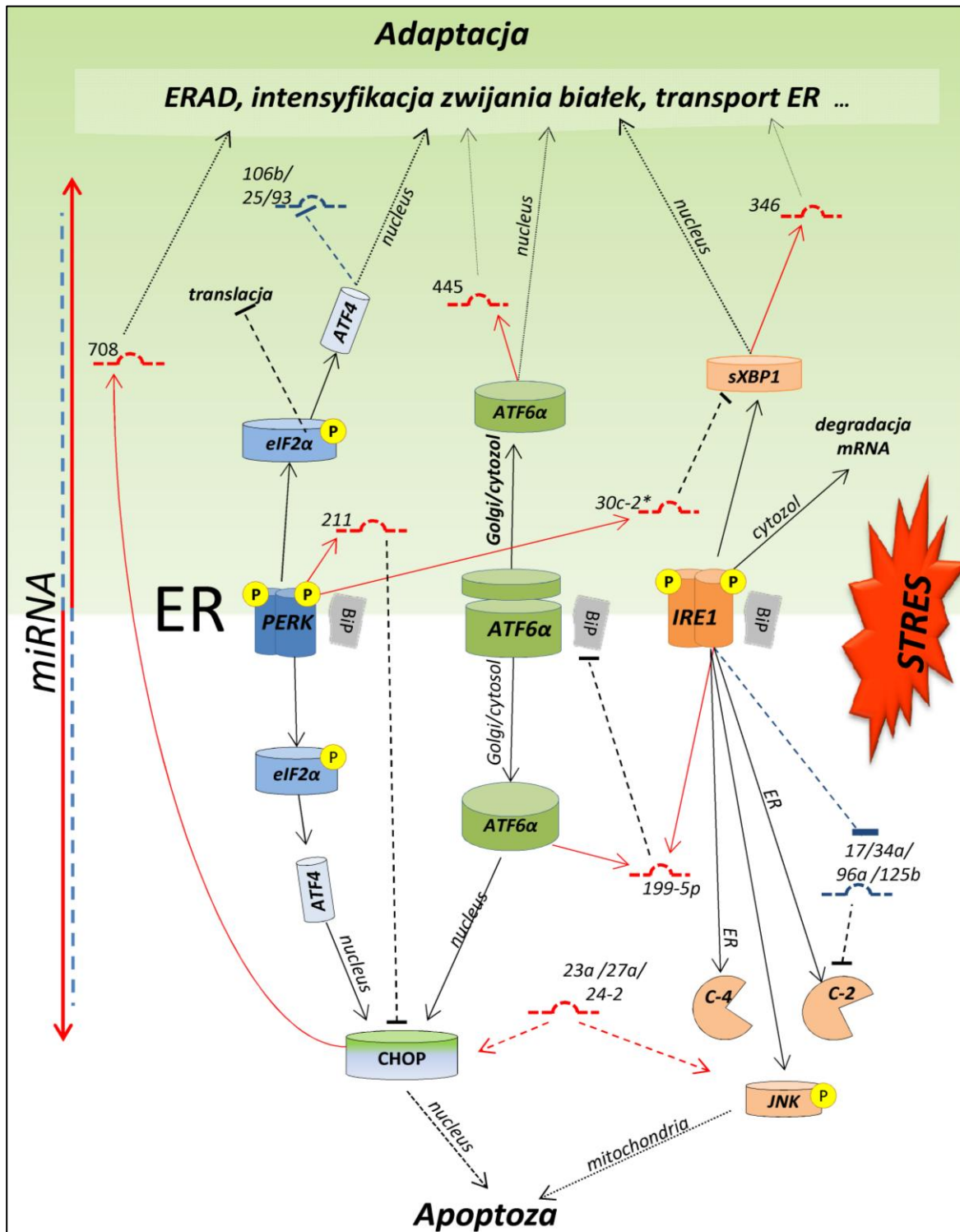
* autor korespondujący; [#] praca przeglądowa.

b) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie

Retikulum endoplazmatyczne (ER, ang. *endoplasmic reticulum*) jest centralnym organellum do syntezy, zwijania oraz potranslacyjnych modyfikacji białek błonowych i sekrecyjnych. Zaburzenie funkcji ER prowadzące do akumulacji niepoprawnie zwiniętych białek, inhibicji degradacji białek w ER lub zaburzenia dystrybucji białek w oraz z ER, określa się terminem stresu ER. W odpowiedzi na nagromadzenie niepoprawnie zwiniętych białek, w ER, komórki aktywują odpowiedź na niepoprawnie zwinięte białka (UPR, ang. *unfolded protein response*) [1]. Głównym zadaniem UPR jest przywrócenie homeostazy komórek poprzez intensyfikację procesów zwijania i degradacji białek w ER (ERAD, ang. *ER associated degradation*) [2], zahamowanie syntezy białek oraz zwiększenie pojemności tego organellum [1, 3]. UPR ma drugą funkcję, równie ważną, którą jest indukcja apoptozy komórek, gdy stan równowagi w ER, nie może zostać przywrócony [1, 4-6]. Zarówno adaptacja komórek do warunków stresu, jak i wysłanie sygnałów prowadzących do ich apoptozy podlegają ścisłej kontroli na poziomie transkrypcyjnym i potranskrypcyjnym.

U ssaków UPR to wielofunkcyjny komórkowy szlak sygnalizacyjny o zdefiniowanych receptorach oraz białkach efektorowych, które regulują ekspresję genów. Zadaniem UPR jest zwiększenie wydajności zwijania białek w ER oraz redukcja transportu białek do ER (m.in. poprzez inhibicję ekspresji genów) [1]. Za inicjację UPR u ssaków odpowiadają trzy główne przezbłonowe receptory (**Rysunek 1**): ATF6 (ang. *activating transcription factor 6*), IRE1 (ang. *inositol-requiring and ER-to-nucleus signaling protein*) i PERK (ang. *protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase*) [4]. W warunkach homeostazy receptory te są związane, w świetle ER, z białkiem opiekuńczym BiP (ang. *immunoglobulin heavy chain-binding protein* znanym też jako GRP78, ang. *glucose-regulated protein, 78 kDa*) [1].



Rysunek 1. Składowe UPR: adaptacyjna (panel zielony) i apoptotyczna (panel biały). Aktywacja PERK, ATF6 oraz IRE1 w ER chroni komórkę przed stresem poprzez inhibicję translacji (eIF2 α) i degradację mRNA (IRE1). Aktywacja tych głównych receptorów stresu ER prowadzi również do transkrypcyjnej indukcji genów pozwalających na adaptację do stresu (za pośrednictwem czynników transkrypcyjnych ATF4, ATF6 α i sXBP1). Gdy przywrócenie równowagi w ER okaże się niemożliwe, te same receptory inicjują apoptozę komórki. miRNA biorą udział zarówno w adaptacji, jak i apoptozie (kolorem czerwonym zaznaczono miRNA indukowane, a niebieskim redukowane - podczas UPR). P: grupa fosforanowa; C-2 i C-4: odpowiednio kaspaza - 2 i kaspaza - 4; „ \rightarrow ”: pozytywna regulacja, „-|” ”: wpływ negatywny. Na podstawie [22].

W warunkach stresu ER czynnik transkrypcyjny ATF6 jest transportowany do aparatu Golgiego, gdzie ulega aktywacji proteolitycznej [7]. Aktywny ATF6 (ATF6 α) jest następnie przekazywany do jądra komórkowego, a tam reguluje transkrypcję genów związanych z UPR [7].

Pozostałe receptory IRE1 i PERK mają zależne od stresu ER, domeny odpowiedzialne za ich oligomeryzację [8]. IRE1 pod wpływem stresu ER ulega oligomeryzacji i autofosforylacji. Ufosforylowana forma IRE1 α ma właściwości endorybonukleazy i odpowiada m.in. za składanie mRNA genu XBP1 (ang. *X-box binding protein 1*), tworząc aktywną transkrypcyjnie, formę tego białka (sXBP1) [9]. Aktywne formy ATF6 α i sXBP1 są odpowiedzialne za zwiększenie ekspresji białek opiekuńczych oraz innych białek wspomagających proces fałdowania (foldaz), a także składowych błony retikulum endoplazmatycznego, przyczyniających się do zwiększenia jego rozmiaru i pojemności [10, 11]. IRE1 niezależnie od XBP1 może również degradować wybrane mRNA, zlokalizowane w sąsiedztwie ER [12, 13].

Natomiast aktywne w skutek dimeryzacji i autofosforylacji białko PERK fosforyluje eIF-2 α (ang. *eukaryotic initiation factor 2 alpha*), który odpowiada za aktywację ATF4 (ang. *activating transcription factor 4*) oraz inhibicję translacji i tym samym zmniejszenie ilości białek w ER [1]. ATF4 reguluje m.in. transkrypcję genów odpowiedzialnych za metabolizm aminokwasów i homeostazę redoks komórek [14-16].

UPR redukuje więc ilość białek w ER na wielu płaszczyznach, wpływając na procesy transkrypcji, translacji oraz degradacji białek. Tworzenie kompleksów represorowych z ATF6 oraz hypermetylacja regionów promotorowych wielu genów prowadzą do inhibicji transkrypcji [17]. Natomiast indukowana przez PERK fosforylacja eIF2 α hamuje syntezę białek [18, 19]. Ponadto ilość białek w ER jest obniżana na skutek aktywności IRE1 i mechanizmu ERAD [9, 12, 13, 20].

Redukcja ilości mRNA podczas stresu ER może być skutkiem nie tylko inhibicji transkrypcji [17, 21], lecz także obniżenia stabilności mRNA. Wzmocniona degradacja mRNA może być spowodowana aktywnością IRE1 lub przez krótkie niekodujące RNA - mikroRNA (miRNA, ang. *microRNA*) [22].

Jeśli opisane powyżej aktywności mające na celu przywrócenie równowagi w ER okażą się niewystarczające, UPR niezwłocznie inicjuje apoptozę komórek [23]. Zarówno IRE1, jak i PERK biorą udział w aktywacji proapoptycznej kinazy JNK (ang. *c-JunNH2-*

terminal kinase) [24, 25], zaś ATF4 i ATF6 odpowiadają za aktywację proapoptycznego czynnika transkrypcyjnego CHOP (ang. *C/EBP-homologous protein*, znanego też jako GADD153, ang. *growth arrest and DNA-damage-inducible protein 153*) [26, 27]. W komórkach ludzkich stres ER odpowiada również za aktywację kaspazy 4 (C-4) [28]. Chroniczny stres ER prowadzi do aktywacji kaspazy 2 (C-2) i w konsekwencji indukcji mitochondrialnego szlaku apoptozy [29]. Inne białkowe komponenty związanej z UPR apoptozy to: PUMA (ang. *p53 upregulated modulator of apoptosis*), białko p53 i NOXA (wyraz *noxa* w języku łacińskim oznacza „uszkodzenie”) [30, 31].

MikroRNA, będące nową klasą krótkich niekodujących RNA, odpowiadają za selektywną regulację szlaków komórkowych, w tym UPR, na poziomie potranskrypcyjnym. Obecnie są postulowane dwa główne mechanizmy wpływu miRNA na ekspresję białek: inhibicja translacji i degradacja mRNA [32-34]. Podczas UPR, transkrypcja nielicznych genów ulega inhibicji, mimo że można oczekiwać generalnego obniżenia poziomu mRNA oraz białek w komórce (celem obniżenia ilości białek w ER) [35]. Uznanie, że mikroRNA odpowiadają jedynie za degradację mRNA podczas UPR, wydaje się więc niewłaściwe [22, 35]. Wyniki ostatnich badań pokazały, że miRNA regulują nie tylko poziom kluczowych dla UPR czynników transkrypcyjnych, lecz także same podlegają ścisłej kontroli transkrypcyjnej podczas tego procesu (**Rysunek 1**) [22].

Zaburzenia działania UPR i związanej z nią apoptozy są częścią patomechanizmu wielu ludzkich schorzeń jak m.in.: niektórych nowotworów, cukrzycy typu pierwszego, przewlekłych stanów zapalnych, chorób neurodegeneracyjnych (np. choroby Alzheimera, choroby Parkinsona), chorób autoimmunologicznych [36]. Aktywacja UPR towarzyszy również wielu schorzeniom układu oddechowego, takim jak mukowiscydoza czy przewlekła obturacyjna choroby płuc, znacząco determinując ich przebieg [37, 38]. Trudno przecenić znaczenie społeczne, jakie ma opracowanie nowych, skutecznych terapii dla wspomnianych schorzeń. Ponadto odkrycie mikroRNA stworzyło nowe możliwości kontroli procesów biologicznych i tym samym nowych strategii terapeutycznych opartych na wykorzystaniu miRNA lub ich antagonistów. Jednak mechanizmy, regulujące działanie tej klasy niekodujących RNA są jeszcze słabo poznane. Identyfikacja nowych, obiecujących celi terapeutycznych wymaga więc dogłębnego zrozumienia zarówno mechanizmu UPR, jak i

znaczenia jej regulacji przez miRNA. Dlatego też prezentowane poniżej badania mechanizmów transkrypcyjnej regulacji UPR koncentrowały się na dwóch aspektach:

- mechanizmie indukowanej przez UPR transkrypcyjnej represji ludzkiego białka CFTR (ang. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*): redukcja ilości tego białka i/lub jego aktywności biologicznej prowadzi do mukowiscydozy (*praca 4.1-4.4*);

- znaczeniu miRNA dla regulacji UPR - nowym opartym na miRNA mechanizmie kontroli importu peptydów do ER, kierowanym przez aktywną formę czynnika sXBP1 (*praca 4.5-4.6*).

Czy stres ER i związana z nim UPR regulują poziom ludzkiego CFTR?

(*praca 4.3*)

Białko CFTR, to kanał chlorkowy i kluczowy regulator funkcji nabłonka. Mutacje w genie *CFTR* prowadzą do zmniejszenia ilości lub powstania dysfunkcyjnego białka CFTR, czego efektem jest mukowiscydoza (CF, ang. *cystic fibrosis*). CF jest najpowszechniejszą, śmiertelną chorobą genetyczną populacji kaukaskiej. CF powoduje ogólną egzokrynopatię, wpływającą na wiele narządów. Jednak, zachorowalność i śmiertelność są związane głównie z chorobą płuc. Najczęstsza forma CF, jest wywołana delecją fenyloalaniny w pozycji 508 ($\Delta F508$) genu *CFTR*. $\Delta F508CFTR$ jest mutacją konformacyjną, która powoduje nieprawidłowe zwijanie białka CFTR, co prowadzi do jego przedwczesnej degradacji proteosomalnej [39, 40]. Choć mutacja $\Delta F508CFTR$ jest obecna na jednym lub na obu allelach, u około 90% chorych na CF, zidentyfikowano prawie 2000 innych mutacji, które prowadzą do tego schorzenia [39]. Mimo braku mutacji w obrębie genu *CFTR* podobne do mukowiscydozy symptomy w płucach (akumulacja śluzu, chroniczne zakażenia) mają również inne schorzenia, takie jak przewlekła obturacyjna choroba płuc (COPD, ang. *chronic obstructive pulmonary disease*), astma oraz zapalenie oskrzeli [41]. Główne czynniki ryzyka dla tych schorzeń wiążą się ze stresem środowiskowym, zanieczyszczeniami, infekcjami prowadzącymi do niedotlenienia, dymem tytoniowym i reaktywnymi formami tlenu [42, 43]. Wymienione czynniki prowadzą do obniżenia aktywności kanału CFTR i jednocześnie stresu ER [44].

Postanowiono więc zbadać, czy istnieje korelacja między stresem ER a poziomem ludzkiego CFTR. Mianowicie, czy stres ER obniża poziom CFTR za pośrednictwem mechanizmów UPR.

Wykazano, że różne mechanizmy indukcji UPR (np. blokada aktywności proteasomu, blokada glikozylacji białek w ER) powodują spadek ilości zarówno transkryptu, jak i białka CFTR. Aktywację UPR monitorowano mierząc poziom transkryptów: *sXBP1* oraz *BiP*. Związaną z UPR redukcją ilości mRNA genu *CFTR* zaobserwowano we wszystkich użytych ludzkich liniach komórkowych (zarówno w ludzkich nowotworowych komórkach nabłonka płuc, jak i w ludzkich nowotworowych komórkach nabłonka okrężnicy). Prezentowane tu badania wykazały również, że UPR zaburza dojrzewanie białka CFTR, obniżając wydajność powstawania jego całkowicie zwiniętej formy (z 90% do 40%), co sugeruje udział mechanizmu ERAD (***Rysunek 2***).

Aby ustalić, czy ta obserwowana redukcja ilości mRNA genu *CFTR* jest skutkiem inhibicji transkrypcji, wykorzystano egzogenny konstrukt ekspresyjny zawierający cDNA genu *CFTR* pozbawionego 5' i 3' fragmentów nieulegających translacji (5' UTR i 3'UTR, ang. *untranslated regions*). Wykonane pomiary wykazały, że poziom mRNA egzogenego genu *CFTR* nie podlegał regulacji przez UPR. Sugeruje to związaną z UPR inhibicję transkrypcji genu *CFTR*, ponieważ brak sekwencji 5' UTR eliminuje oddziaływanie z czynnikami transkrypcyjnymi mogącymi modulować ekspresję tego genu. Alternatywnym mechanizmem redukcji ilości mRNA endogenego *CFTR* mogła być jego degradacja. Jednak przeprowadzone badania wpływu aktywności RNAz cytozolowych podczas UPR nie wykazały zmian w ilości transkryptu endogenego *CFTR*, co częściowo wykluczyło możliwość związanej z UPR degradacji mRNA tego genu.

Prezentowana praca wykazała wpływ UPR na ekspresję genu CFTR (zarówno na poziomie transkrypcyjnym, jak i potranskrypcyjnym) oraz przyczyniła się do wyjaśnienia przyczyn spadku aktywności tego kanału obserwowanego podczas stresu ER.

Jaki jest mechanizm transkrypcyjny represji CFTR podczas UPR?

(praca 4.1)

W kolejnej pracy zdefiniowano mechanizmy transkrypcyjne odpowiedzialne za zahamowanie ekspresji *CFTR* podczas UPR. Wykorzystując konstrukty reporterowe

zawierające różnej długości fragmenty obszaru 5' UTR cDNA genu *CFTR*, określono region sekwencji odpowiedzialny za transkrypcyjną inhibicję tego genu podczas stresu ER. Odpowiada on sekwencji zdefiniowanej jako minimalna sekwencja promotorowa genu *CFTR* [45].

Po analizie tego obszaru pod kątem sekwencji oddziałujących z czynnikami transkrypcyjnymi, zidentyfikowano w jego obrębie, miejsce wiązania czynnika ATF6. Bezpośrednie wiązanie ATF6 do badanej sekwencji w warunkach aktywnej UPR, potwierdzono metodą immunoprecypitacji chromatyny (ChIP, ang. *chromatin immunoprecipitation assay*). Jednocześnie, wykluczono oddziaływanie minimalnej sekwencji promotorowej genu *CFTR* z czynnikiem sXBP1.

Jak już wspomniano, białko ATF6 podczas stresu ER ulega obróbce proteolitycznej, za pośrednictwem proteazy serynowej. Powstała rozpuszczalna forma białka ATF6 α jest uwalniana z aparatu Golgiego do jądra komórkowego, gdzie reguluje ekspresję genów. Aby ocenić funkcjonalny wpływ ATF6 na ekspresję *CFTR*, zablokowano aktywację ATF6, wykorzystując specyficzny inhibitor protez serynowych, co z kolei uniemożliwiło uwolnienie ATF6 α z aparatu Golgiego. Przy braku ATF6 α poziom mRNA genu *CFTR* nie ulegał redukcji na skutek UPR.

Wyniki powyższych badań wykazały, że oddziaływanie minimalnej sekwencji promotorowej genu CFTR z białkiem ATF6 α reguluje poziom mRNA genu CFTR podczas UPR. Potwierdzono tym samym, że ekspresja genu CFTR jest regulowana przez UPR na poziomie transkrypcyjnym.

W obrębie minimalnej sekwencji promotorowej genu *CFTR* zidentyfikowano również trzy regiony bogate w dinukleotydowe sekwencje CpG oraz miejsce wiązania dla czynnika transkrypcyjnego MAZ (ang. *Myc-associated zinc finger protein binding*). Wymienione motywy transkrypcyjne zlokalizowano w bliskim sąsiedztwie potwierdzonej sekwencji wiązania czynnika ATF6. Obecność tych regionów w obrębie analizowanej sekwencji sugerowała, że metylacja DNA i/lub acetylacja białek histonowych mogą przyczyniać się do obserwowanej podczas UPR redukcji mRNA genu *CFTR*.

Celem potwierdzenia tej hipotezy sprawdzono czy stres ER, zmienił profil metylacji, regionu promotorowego genu *CFTR*, wykorzystując metodę analizy metylacji genów opartą na reakcji PCR (MSP, ang. *metylation specific PCR*). Wykazano, że stres ER spowodował metylację specyficznych dinukleotydów CpG w sąsiedztwie regionu wiązania czynnika MAZ. Następnie sprawdzono, czy obserwowana podczas stresu ER zmiana profilu metylacji jest związana z acetylacją białek histonowych. W tym celu badano wpływ indukcji UPR na

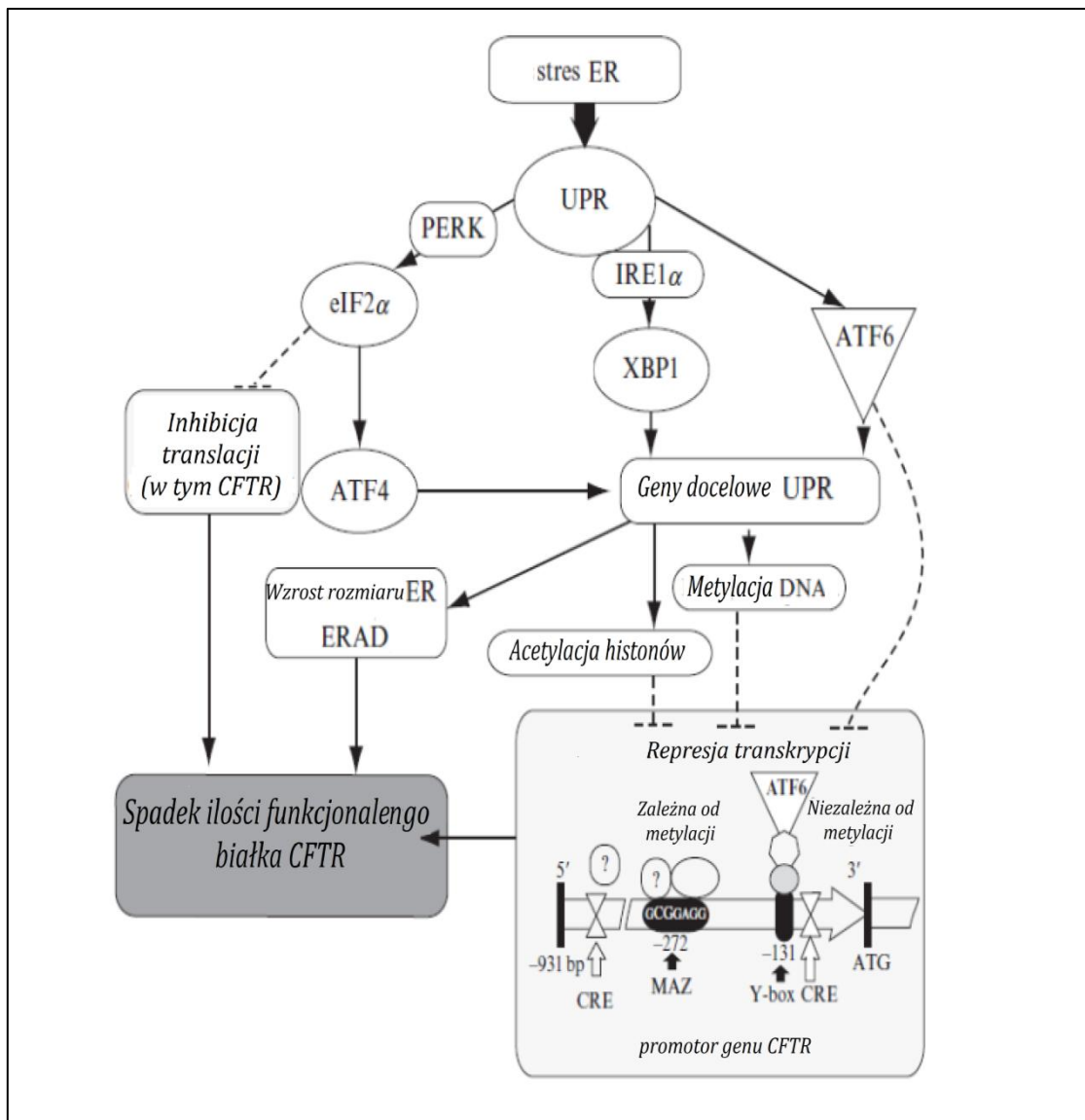
poziom mRNA genu *CFTR* w obecności specyficznych inhibitorów metylacji oraz aktywności deacetylazy histonowej. Żaden z użytych inhibitorów sam nie znosił transkrypcyjnej represji *CFTR* podczas UPR. Jednakże obecność obu wykorzystanych inhibitorów nie tylko znosiła wywołaną przez UPR represję transkrypcji genu *CFTR*, lecz także prowadziła do zwiększenia poziomu transkryptu tego genu. Opisane rezultaty pozwalają wnioskować, że obserwowana podczas stresu ER transkrypcyjna represja genu *CFTR* jest efektem związanej z metylacją acetylacji histonów.

Warto wspomnieć, że analogiczne badania przeprowadzono dla egzogenego genu *CFTR* (pozbawionego sekwencji 5' i 3' UTR). Ani inhibicja funkcji ATF6, ani zablokowanie metylacji lub/i acetylacji histonów nie miały wpływu na poziom mRNA egzogenego genu *CFTR*.

Ponadto w dyskutowanej pracy wyznaczono czas połowicznego rozpadu dla mRNA genu *CFTR* w warunkach aktywnej lub nieaktywnej UPR. Uzyskane wartości okazały się bardzo zbliżone (odpowiednio 5,5 i 5,8 godziny). Pozwala to ostatecznie odrzucić hipotezę postulującą, że obserwowany podczas stresu ER spadek ilości transkryptu endogenego *CFTR* może być spowodowany jego degradacją (wywołaną przez UPR).

Podsumowując, wykazano, że indukcja UPR prowadzi do inhibicji funkcji CFTR. Zdefiniowano również mechanizm transkrypcyjny odpowiedzialny za to zjawisko.

Ustalony w omawianych pracach (*prace 4.1 i 4.3*) wpływ aktywacji UPR na poziom ludzkiego białka CFTR przedstawiono na ***Rysunku 2***.



Rysunek 2. Regulacja ekspresji CFTR podczas UPR. "→": pozytywna regulacja; "--|": wpływ negatywny Na podstawie [21].

Czy nieprawidłowo zwinięta forma białka CFTR ($\Delta F508CFTR$) może być przyczyną indukcji UPR?

(praca 4.2)

Jak już wspomniano, najbardziej rozpowszechniona forma CF jest spowodowana delecją fenyloalaniny w pozycji 508 ($\Delta F508$) genu *CFTR*. Obecność tej mutacji skutkuje powstaniem niepoprawnie zwiniętego białka $\Delta F508CFTR$, które ulega wczesnej degradacji proteasomalnej. Wiele strategii terapeutycznych koncentruje się na zwiększeniu ilości funkcjonalnego białka $\Delta F508CFTR$, m.in. poprzez chemiczną korekcję defektu jego zwijania, zwiększenie wydajności jego dojrzewania w ER lub zablokowanie jego przedwczesnej

degradacji. Wiedząc, że poziom endogennego białka CFTR jest obniżany przy aktywnej UPR postanowiono sprawdzić, czy zwiększenie ekspresji nieprawidłowo zwiniętego białka $\Delta F508CFTR$ może prowadzić do indukcji UPR. W świetle wspomnianych strategii terapeutycznych konieczne jest bowiem określenie możliwości zwiększenia ilości nieprawidłowo zwiniętego białka CFTR bez jednoczesnej aktywacji UPR.

Aby rozstrzygnąć ten problem, wykorzystano nowotworowe linie komórkowe ludzkiego nabłonka płuc, które poza ekspresją endogennego *CFTR* (*WT CFTR*) wytwarzały różne ilości egzogenego (rekombinowanego) $\Delta F508CFTR$. Analiza poziomu mRNA genów związanych z aktywacją UPR (*sXBP1*, *BiP*) wykazała indukcję tego szlaku w komórkach o najwyższym poziomie egzogenego $\Delta F508CFTR$. Aktywacji UPR w komórkach o najwyższej ekspresji egzogenego $\Delta F508CFTR$ towarzyszył spadek poziomu transkryptu i białka endogenego *WT CFTR*.

Celem weryfikacji hipotezy postulującej, że podniesienie poziomu nieprawidłowo zwiniętego białka $\Delta F508CFTR$ może prowadzić do obniżenia endogenego poziomu białka CFTR w komórkach o niskiej ekspresji $\Delta F508CFTR$ (gdzie nie zaobserwowano aktywacji UPR), chemicznie indukowano ekspresję $\Delta F508CFTR$. W efekcie, zaobserwowano zarówno aktywację UPR, jak i spadek całkowitej ilości białka CFTR, co potwierdziło postulowaną hipotezę.

Warto nadmienić, że podczas realizacji tego projektu konieczny był dokładny pomiar ilości mRNA dla genu *CFTR*, w komórkach w których dochodziło do jego jednoczesnej ekspresji endogennie (*WT CFTR*) i egzogennie ($\Delta F508CFTR$). Dostępne komercyjnie sondy hydrolityczne do pomiarów metodą PCR z analizą ilości produktów w czasie rzeczywistym (qPCR, ang. *quantitative PCR* lub inaczej RT-PCR, ang. *real time PCR*) pozwalały jedynie na detekcję całkowitego mRNA dla genu *CFTR*. Zaprojektowano więc specjalnie na potrzeby tych badań zestaw sond hydrolitycznych pozwalających na specyficzną detekcję mRNA genu *WT CFTR* w obecności mRNA genu $\Delta F508CFTR$ metodą qPCR. Zaprojektowana sonda wykrywa specyficznie obecność kodonu fenyloalaniny w pozycji 508 ludzkiego genu *CFTR*. W komórkach, w których dochodziło do jednoczesnej ekspresji *WT CFTR* jak i $\Delta F508CFTR$, oznaczenie ilości mRNA genu *CFTR* za pomocą zaprojektowanej sondy i porównanie z ilością transkryptu tego genu, oznaczoną za pomocą sondy komercyjnej, umożliwia obliczenie ilości mRNA dla genu $\Delta F508CFTR$. Dodatkowo sonda nie jest ograniczona do dyskryminacji między endo- a egzogennym mRNA. Zaletą opracowanej sondy jest jej specyficzność względem braku mutacji $\Delta F508$, co umożliwia ilościowe pomiary mRNA w próbach od pacjentów heterozygotycznych (*WT/ $\Delta F508$ CFTR*).

W omawianej pracy wykazano, że nadmierna ekspresja $\Delta F508$ CFTR może indukować UPR, prowadząc do obniżenia ilości aktywnego białka CFTR, ograniczając tym samym wykorzystanie niektórych strategii terapeutycznych.

Opracowane metody analizy wpływu UPR na ekspresję i aktywność ludzkiego CFTR zostały zebrane i przedstawione w pracy przeglądowej (praca 4.4).

Dotychczas omówione badania mechanizmu represji ludzkiego CFTR podczas UPR są ważne zarówno z medycznego punktu widzenia (mukowiscydoza i przewlekła obturacyjna choroba płuc), jak i ze względu na to, że opisują szlaki regulacji ekspresji białek błonowych, podczas UPR i stresu ER.

Podczas UPR, sXBP1 kontroluje import białek do ER - rola miR-346.

(praca 4.5)

Kolejnym aspektem omawianych badań było ustalenie znaczenia miRNA dla regulacji szlaku UPR. W nowotworowych liniach komórkowych ludzkiego nabłonka płuc po aktywacji UPR identyfikowano zmiany w profilu ekspresji miRNA (analiza całogenomowych macierzy zmian poziomu miRNA). Związaną z UPR i niezależną od mechanizmu aktywacji tego szlaku komórkowego indukcję zaobserwowano tylko dla dwóch miRNA: miR-346 oraz miR-885-3p.

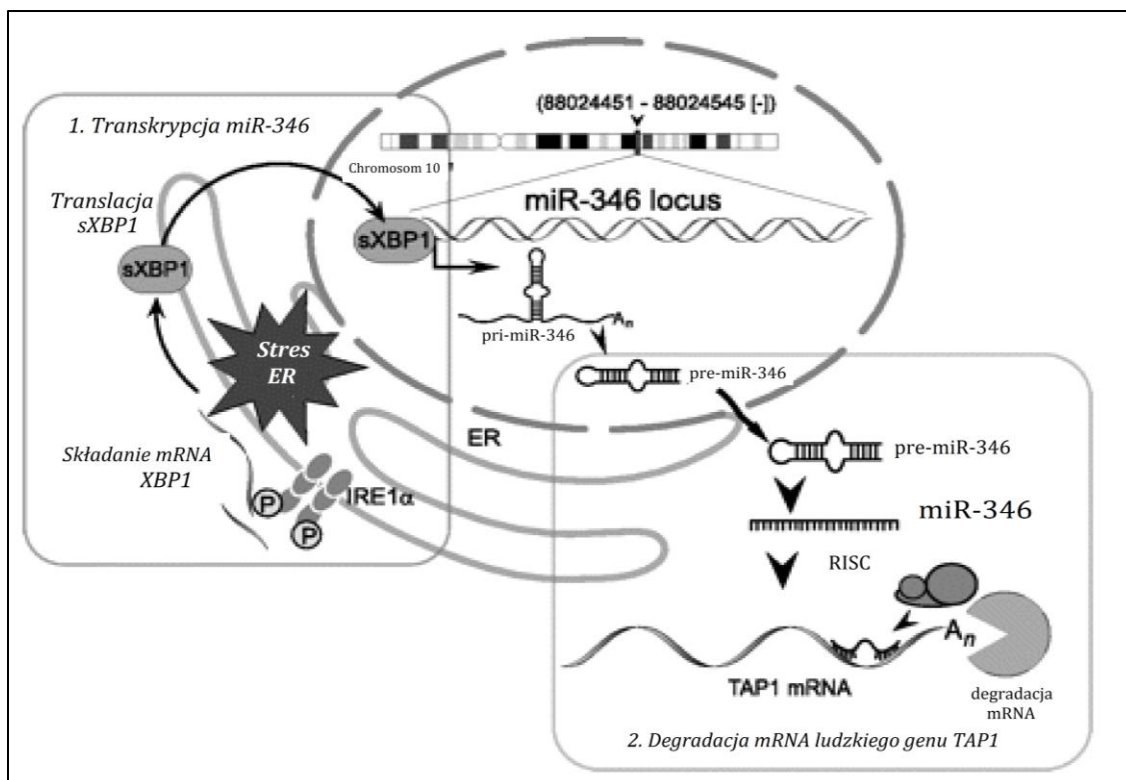
Analiza bioinformatyczna otoczenia sekwencji miR-346 wykazała, że lokalizuje się tam miejsce wiązania dla białka sXBP1 będącego jednym z głównych regulatorów UPR. Ponadto miR-346 był znacznie mocniej indukowany przez UPR niż miR-885-3p. Dlatego też badania koncentrowano na roli interakcji między sXBP1 a miR-346.

Sekwencja dla miR-346 lokalizuje się w obrębie intronu 2 ludzkiego genu *GRID1* (gen kodujący podjednostkę delta-1 receptora glutaminowego) na chromosomie 10. Jednak zarówno pomiary ekspresji genu *GRID1* metodą qPCR, jak i analizy całogenomowych macierzy zmian poziomu mRNA nie wykazały zmian ilości transkryptu tego genu podczas UPR. Jednocześnie ustalono, że, miR-346 był indukowany w odpowiedzi na UPR w różnych ludzkich liniach komórkowych (nowotworowych i pierwotnych) niezależnie od mechanizmu aktywacji UPR.

Zatem związany z UPR wzrost poziomu miR-346 mógł być spowodowany transkrypcyjną aktywnością sXBP1. Szczególnie, że profil ekspresji tego miRNA podczas UPR korelował z ekspresją *sXBP1*. Aby zweryfikować tą hipotezę, sprawdzono czy obecność, aktywnego transkrypcyjnie czynnika sXBP1 spowoduje indukcję miR-346 przy nieaktywnym szlaku UPR. W efekcie zaobserwowano, że obecność aktywnego transkrypcyjnie czynnika sXBP1 wystarczy do indukcji badanego miRNA. Potwierdziły to dalsze badania z wykorzystaniem embrionalnych mysich fibroblastów: pozbawionych genu *XBPI* oraz typu dzikiego (z aktywnym genem *XBPI*). Aktywacja szlaku UPR prowadziła do indukcji miR-346 jedynie w komórkach z aktywnym genem *XBPI*.

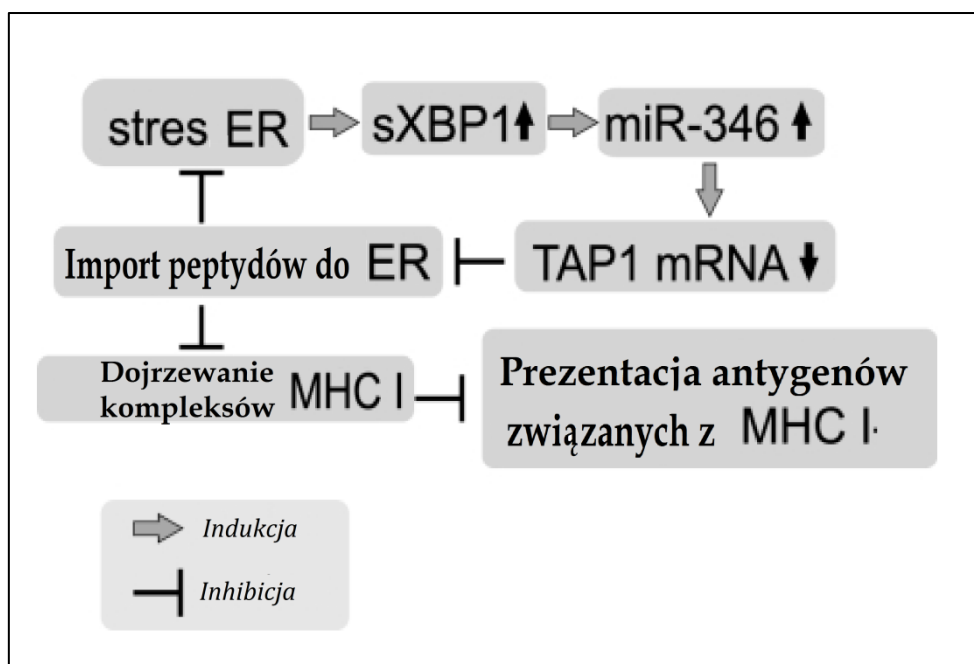
Następnie ustalono funkcjonalne znaczenie opisanej interakcji między miR-346 a sXBP1. W oparciu o całogenomowe profile zmian poziomu mRNA podczas UPR oraz analizę bioinformatyczną docelowych sekwencji wiązania dla miR-346 zidentyfikowano mRNA ludzkiego genu *TAP1* (ang. *ER antigen peptide transporter 1*) jako potencjalną cząsteczkę docelową dla miR-346. Wywołaną przez miR-346 specyficzną represję genu *TAP1* zarówno na poziomie mRNA, jak i białka potwierdzono za pomocą sztucznego analogu miR-346 oraz jego inhibitora. W nowotworowych komórkach ludzkich podniesienie poziomu miR-346 (analog) prowadziło do spadku ilości mRNA i białka TAP1. Zablockowanie aktywności miR-346 (inhibitor) prowadziło do akumulacji transkryptu i białka TAP1.

Wykazano również, że aktywacja UPR powoduje obniżenie poziomu mRNA jedynie dla ludzkiego genu *TAP1*. Sekwencja 3'UTR mysiego genu *tap1* nie zawiera miejsca wiązania dla miR-346, zaś indukcja UPR nie wpływa na ekspresję genu *tap1*. Interakcje między sXBP1, miR-346 oraz *TAP1* podsumowano na **Rysunku 3**.



Rysunek 3. Model regulacji ilości mRNA genu *TAP1* podczas UPR. RISC - złożony kompleks białkowy o aktywności helikazy, endo- oraz egzonukleazy (ang. *RNA-induced silencing complex*). Na podstawie [35].

Białko TAP1 transportuje zdegradowane peptydy cytozolowe do ER, przez co bierze udział w dojrzewaniu głównych kompleksów zgodności tkankowej klasy I (MHC I, ang. *major histocompatibility complex*) [46]. Podczas stresu ER redukcja ilości aktywnego białka TAP1 ogranicza więc import peptydów do ER i dojrzewanie kompleksów MHC I. Może to prowadzić w konsekwencji do ograniczenia prezentacji antygenów związanych z MHC I (**Rysunek 4**).



Rysunek 4. Wpływ stresu ER na dojrzewanie kompleksów MHC I. Na podstawie [35].

Prezentowany mechanizm może stanowić wyjaśnienie dla wcześniejszych raportów o zaburzeniach w prezentacji antygenów i peptydów wirusowych wywołanych przez stres ER [47-49].

miRNA jako ważny element regulacji UPR.

(praca 4.6)

W ostatniej z prezentowanych prac podsumowano obecny stan wiedzy na temat roli miRNA w regulacji szlaku odpowiedzi na nieprawidłowo zwinięte białka. Ponadto wykorzystując dostępne narzędzia bioinformatyczne do analizy sekwencji 3'UTR mRNA kluczowych białkowych regulatorów UPR, zaproponowano nieopisane dotychczas miRNA, które mogą mieć wpływ na ten szlak komórkowy.

Podsumowanie

Zaburzenia działania UPR i związanej z nią apoptozy, spowodowane przez mutacje genetyczne, procesy starzenia bądź czynniki środowiskowe, stanowią część patomechanizmu wielu ludzkich schorzeń. Trwałe zaburzenie homeostazy ER jest jedną z przyczyn występowania niektórych nowotworów, cukrzycy typu pierwszego, przewlekłych stanów zapalnych, chorób neurodegeneracyjnych (np. choroby Alzheimera, choroby Parkinsona), chorób autoimmunologicznych. UPR towarzyszy również wielu schorzeniom układu oddechowego, takich jak mukowiscydoza czy przewlekła obturacyjna choroby płuc, znacząco wpływając na ich przebieg. Trudno przecenić znaczenie społeczne, jakie ma opracowanie nowych, skutecznych terapii dla wspomnianych schorzeń. Opracowanie nowych celów terapeutycznych oraz nowych leków wymaga jednak dogłębnego zrozumienia mechanizmu UPR i określenia kluczowych elementów jego kontroli.

Najważniejsze rezultaty i wnioski wynikające z przeprowadzonych badań wchodzących w skład osiągnięcia:

1. Po raz pierwszy wykazano, że UPR reguluje ekspresję genu *CFTR* (zarówno transkrypcyjnie jak i potranskrypcyjnie), co prowadzi do spadku aktywności tego kanału obserwowanego podczas stresu ER (*praca 4.3*).
2. Zlokalizowano w obrębie sekwencji 5'UTR genu *CFTR* region odpowiedzialny za inhibicję transkrypcyjną podczas UPR (*praca 4.1*).
3. Zdefiniowano mechanizm związanej z UPR transkrypcyjnej represji *CFTR* (udział białka ATF6 oraz rola modyfikacji DNA) (*praca 4.1*).
4. Opracowano nową specyficzną sondę hydrolityczną, umożliwiającą oznaczenie ilości mRNA genu *CFTR* w obecności mRNA jego zmutowanej formy $\Delta F508CFTR$ metodą qPCR (*praca 4.2* i *praca 4.4*).
5. Wykazano, że nadmierna ekspresja nieoprawnie zwijanej formy białka *CFTR* ($\Delta F508CFTR$) może indukować UPR, prowadząc do obniżenia ilości aktywnego białka *CFTR* i ograniczając tym samym wykorzystanie niektórych strategii terapeutycznych (*praca 4.2*).
6. Zidentyfikowano, nieznanym dotychczas mechanizmem kontroli importu peptydów do ER podczas UPR oparty na wywołanej przez sXBP1 indukcji miR-346 (*praca 4.5*).
7. Zaproponowano nieopisane dotychczas miRNA, mogące brać udział w regulacji UPR (*praca 4.6*).

Przebieg kariery zawodowej

Studia ukończyłem w 2001 roku w Instytucie Biochemii i Biologii Molekularnej, Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego. Pracę magisterską wykonałem w Zakładzie Biofizyki, jej promotorem był prof. dr hab. Andrzej Szczepaniak. Następnie kontynuowałem pracę na studiach doktoranckich pod kierownictwem prof. dr hab. Andrzej Szczepaniaka w Zakładzie Biofizyki. W trakcie studiów realizowałem zadania badawcze mające na celu charakterystykę właściwości kinetycznych pochodzącego z termofilnej sinicy kluczowego enzymu fazy ciemnej karboksylazy - oksygenazy rybulozo 1,5 bisfosforanu (rubisko). Badania stanowiły dorobek doktoratu, który obroniłem w grudniu 2005 roku, pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzej Szczepaniaka [50]. Część prezentowanych w pracy doktorskiej wyników uzyskałem przy współpracy z profesorem Gunterem Wildnerem podczas półrocznego pobytu w Ruhr-Universität Bochum, Niemcy (wyjazd w ramach programu SOKRATES).

Następnie od lutego 2006 roku do września 2011 roku kontynuowałem moją pracę naukową na *Department of Cell Biology, University of Alabama at Birmingham*, w USA (UAB). Najpierw w ramach stażu podoktorskiego, a potem jako pracownik naukowy (ang. *research associate*) w laboratorium profesor Zsuzsy Bebok i profesora Jamesa Collawna. Moje zadania badawcze koncentrowały się nie tylko na przedstawionych mechanizmach regulacji UPR, lecz także dotyczyły szeroko pojętej patogenezy mukowiscydozy.

Nasze badania w ludzkich komórkach nabłonka płuc wykazały, że sama chemiczna stabilizacja nieprawidłowo zwiniętego białka $\Delta F508CFTR$ (będąca celem niektórych strategii terapeutycznych) jest niewystarczająca dla uzyskania optymalnej funkcjonalności tego kanału [53]. Uzyskane wyniki sugerują, że skuteczna terapeutycznie modulacja aktywności $\Delta F508CFTR$ winna opierać się na zarówno korekcji zwijania tego białka, jak i zwiększeniu jego aktywności i stabilności w błonie komórkowej [53].

Ponadto podczas moich badań nad dojrzewaniem i funkcją nieoprawnie zwiniętego białka $\Delta F508CFTR$, zauważyłem, że wywołująca ten defekt delecja fenyloalaniny w pozycji 508 skutkuje jednocześnie mutacją synonimiczną w sąsiednim kodonie izoleucyny 507. Wykazałem, że ta zmiana kodonu izoleucyny 507 zmieniła strukturę drugorzędową mRNA $\Delta F508 CFTR$, prowadząc do zaburzenia translacji tego białka [54]. Zwijanie białka CFTR jest procesem kotranslacyjnym [39], dlatego też zmiany kinetyki translacji przyczyniały się do niepoprawnego zwijania tego białka [54]. Zidentyfikowałem więc nieznaną dotychczas składową patomechanizmu mukowiscydozy. Była to jednocześnie jedna z pierwszych prac

postulujących wpływ struktury drugorzędowej mRNA w obrębie sekwencji ulegającej translacji na przebieg translacji i związania białka. Wspominania praca podkreśla znaczenie mutacji synonimicznych dla schorzeń człowieka. Nasze dalsze badania funkcji kanału $\Delta F508CFTR$ pozbawionego opisanej mutacji synonimicznej Ile507 potwierdziły poprawność tej hipotezy [55].

Podczas pracy na UAB podjąłem m.in. współpracę z grupą profesora Dale'a Benosa, co zaowocowało identyfikacją w komórkach glejaka wielopostaciowego, hybrydowych kanałów jonowych tworzonych przez podjednostki nabłonkowego kanału sodowego (ENaC, ang. *epithelial sodium channel*) i kanału ASIC1 (ang. *acid-sensing ion channel 1*) [51]. Nasze dalsze badania wykazały, że obecność tych hybrydowych kanałów (ENaC/ASIC) stanowi warunek niezbędny dla utrzymania fenotypu komórek glejaka wielopostaciowego [51, 52].

Od grudnia 2011 roku jestem zatrudniony jako adiunkt na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej), gdzie realizuję projekt Narodowego Centrum Nauki „Badania udziału miR-200b, miR-429 i miR-200c w regulacji angiogenezy wywołanej przez hipoksję”. Moje obecne cele badawcze koncentrują się na zrozumieniu roli miRNA w kontroli komórkowych mechanizmów odpowiedzi na stres (wywołana hipoksją angiogeneneza [56] oraz odpowiedź na nieprawidłowo zwinięte białka). Pełny opis dorobku znajduje się w załączniku nr 4.

Zestawienie sumaryczne dorobku naukowego

Liczba prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego	6
Sumaryczny <i>impact factor</i> i punkty MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania dla prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego	22,995 i 142
Liczba prac po doktoracie (razem ze stanowiącymi osiągnięcie naukowe)	15
Sumaryczny <i>impact factor</i> i punkty MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania dla wszystkich prac po doktoracie	63,635 i 416
Liczba cytowań publikacji (bez autocytowań) według bazy <i>Web of Science</i>	290
Indeks Hirscha według bazy <i>Web of Science</i>	9

Literatura

1. Schroder, M. and Kaufman, R.J. ER stress and the unfolded protein response. **Mutat Res.** 569 (2005) 29-63.
2. Ellgaard, L. and Helenius, A. Quality control in the endoplasmic reticulum. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 4 (2003) 181-191.
3. Back, S.H., Schroder, M., Lee, K., Zhang, K. and Kaufman, R.J. ER stress signaling by regulated splicing: IRE1/HAC1/XBP1. **Methods.** 35 (2005) 395-416.
4. Ron, D. and Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 8 (2007) 519-529.
5. Rutkowski, D.T. and Kaufman, R.J. A trip to the ER: coping with stress. **Trends Cell Biol.** 14 (2004) 20-28.
6. Faitova, J., Krekac, D., Hrstka, R. and Vojtesek, B. Endoplasmic reticulum stress and apoptosis. **Cell Mol Biol Lett.** 11 (2006) 488-505.
7. Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T. and Mori, K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. **Mol Cell Biol.** 10 (1999) 3787-3799.
8. Shamu, C.E. and Walter, P. Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. **EMBO J.** 15 (1996) 3028-3039.
9. Schroder, M. and Kaufman, R.J. The mammalian unfolded protein response. **Annu Rev Biochem.** 74 (2005) 739-789.
10. Bommasamy, H., Back, S.H., Fagone, P., Lee, K., Meshinchi, S., Vink, E., Sriburi, R., Frank, M., Jackowski, S., Kaufman, R.J. and Brewer, J.W. ATF6alpha induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum. **J Cell Sci.** 122 (2009) 1626-1636.
11. Sriburi, R., Jackowski, S., Mori, K. and Brewer, J.W. XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. **J Cell Biol.** 167 (2004) 35-41.
12. Hollien, J. and Weissman, J.S. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. **Science.** 313 (2006) 104-107.
13. Hollien, J., Lin, J.H., Li, H., Stevens, N., Walter, P. and Weissman, J.S. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. **J Cell Biol.** 186 (2009) 323-331.
14. Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D.F., Bell, J.C., Hettmann, T., Leiden, J.M. and Ron, D. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. **Mol Cell.** 11 (2003) 619-633.
15. Han, J., Back, S.H., Hur, J., Lin, Y.H., Gildersleeve, R., Shan, J., Yuan, C.L., Krokowski, D., Wang, S., Hatzoglou, M., Kilberg, M.S., Sartor, M.A. and Kaufman, R.J. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. **Nat Cell Biol.** 15 (2013) 481-490.
16. Jackson, R.J., Hellen, C.U.T. and Pestova, T.V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 11 (2010) 113-127.
17. **Bartoszewski, R.**, Rab, A., Twitty, G., Stevenson, L., Fortenberry, J., Piotrowski, A., Dumanski, J.P. and Bebek, Z. The mechanism of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator transcriptional repression during the unfolded protein response. **J Biol Chem.** 283 (2008) 12154-12165.

18. Durose, J.B., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Rothblum, L.I. and Niwa, M. Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 α coordinates rRNA transcription and translation inhibition during endoplasmic reticulum stress. **Mol Cell Biol.** 29 (2009) 4295-4307.
19. Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M. and Ron, D. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. **Mol Cell.** 6 (2000) 1099-1108.
20. Oda, Y., Okada, T., Yoshida, H., Kaufman, R.J., Nagata, K. and Mori, K. Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation. **J Cell Biol.** 172 (2006) 383-393.
21. **Bartoszewski, R.**, Rab, A., Fu, L., Bartoszezwska, S., Collawn, J. and Bebok, Z. CFTR expression regulation by the unfolded protein response. **Methods Enzymol.** 491 (2011) 3-24.
22. Bartoszezwska, S., Kochan, K., Madanecki, P., Piotrowski, A., Ochocka, R., Collawn, J.F. and **Bartoszewski, R.** Regulation of the unfolded protein response by microRNAs. **Cell Mol Biol Lett** (2013).
23. Lin, J.H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H.R., Zhang, C., Panning, B., Shokat, K.M., Lavail, M.M. and Walter, P. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. **Science.** 318 (2007) 944-949.
24. Putcha, G.V., Le, S., Frank, S., Besirli, C.G., Clark, K., Chu, B., Alix, S., Youle, R.J., Lamarche, A., Maroney, A.C. and Johnson, E.M., Jr. JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. **Neuron.** 38 (2003) 899-914.
25. Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P. and Ron, D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. **Science.** 287 (2000) 664-666.
26. Wang, X.Z., Lawson, B., Brewer, J.W., Zinszner, H., Sanjay, A., Mi, L.J., Boorstein, R., Kreibich, G., Hendershot, L.M. and Ron, D. Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). **Mol Cell Biol.** 16 (1996) 4273-4280.
27. Wang, X.Z. and Ron, D. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. **Science.** 272 (1996) 1347-1349.
28. Hitomi, J., Katayama, T., Eguchi, Y., Kudo, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Manabe, T., Yamagishi, S., Bando, Y., Imaizumi, K., Tsujimoto, Y. and Tohyama, M. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. **J Cell Biol.** 165 (2004) 347-356.
29. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol.** 35 (2007) 495-516.
30. Li, J., Lee, B. and Lee, A.S. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. **J Biol Chem.** 281 (2006) 7260-7270.
31. Hikisz, P. and Kilianska, Z.M. PUMA, a critical mediator of cell death--one decade on from its discovery. **Cell Mol Biol Lett.** 17 (2012) 646-669.
32. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N. and Sonenberg, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? **Nat Rev Genet.** 9 (2008) 102-114.
33. Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S. and Bartel, D.P. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. **Nature.** 466 (2010) 835-840.

34. Djuranovic, S., Nahvi, A. and Green, R. miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. **Science**. 336 (2012) 237-240.
35. **Bartoszewski, R.**, Brewer, J.W., Rab, A., Crossman, D.K., Bartoszezwska, S., Kapoor, N., Fuller, C., Collawn, J.F. and Bebok, Z. The unfolded protein response (UPR)-activated transcription factor X-box-binding protein 1 (XBP1) induces microRNA-346 expression that targets the human antigen peptide transporter 1 (TAP1) mRNA and governs immune regulatory genes. **J Biol Chem**. 286 (2011) 41862-41870.
36. Lin, J.H., Walter, P. and Yen, T.S. Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. **Annu Rev Pathol**. 3 (2008) 399-425.
37. Wei, J., Rahman, S., Ayaub, E.A., Dickhout, J.G. and Ask, K. Protein misfolding and endoplasmic reticulum stress in chronic lung disease. **Chest**. 143 (2013) 1098-1105.
38. Ribeiro, C.M. and O'neal, W.K. Endoplasmic reticulum stress in chronic obstructive lung diseases. **Curr Mol Med**. 12 (2012) 872-882.
39. Lukacs, G.L. and Verkman, A.S. CFTR: folding, misfolding and correcting the DeltaF508 conformational defect. **Trends Mol Med**. 18 (2012) 81-91.
40. Kerem, B., Rommens, J.M., Buchanan, J.A., Markiewicz, D., Cox, T.K., Chakravarti, A., Buchwald, M. and Tsui, L.C. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. **Science**. 245 (1989) 1073-1080.
41. O'byrne P, M. and Postma, D.S. The many faces of airway inflammation. Asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Asthma Research Group. **Am J Respir Crit Care Med**. 159 (1999) S41-63.
42. Cantin, A.M., Bilodeau, G., Ouellet, C., Liao, J. and Hanrahan, J.W. Oxidant stress suppresses CFTR expression. **Am J Physiol Cell Physiol**. 290 (2006) C262-270.
43. Bebok, Z., Varga, K., Hicks, J.K., Venglarik, C.J., Kovacs, T., Chen, L., Hardiman, K.M., Collawn, J.F., Sorscher, E.J. and Matalon, S. Reactive oxygen nitrogen species decrease cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and cAMP-mediated Cl⁻ secretion in airway epithelia. **J Biol Chem**. 277 (2002) 43041-43049.
44. Kultz, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. **Annu Rev Physiol**. 67 (2005) 225-257.
45. Romey, M.C., Guittard, C., Carles, S., Demaille, J., Claustres, M. and Ramsay, M. First putative sequence alterations in the minimal CFTR promoter region. **J Med Genet**. 36 (1999) 263-264.
46. Kang, J.K., Yoon, S.J., Kim, N.K. and Heo, D.S. The expression of MHC class I, TAP1/2, and LMP2/7 gene in human gastric cancer cell lines. **Int J Oncol**. 16 (2000) 1159-1163.
47. Granados, D.P., Tanguay, P.L., Hardy, M.P., Caron, E., De Verteuil, D., Meloche, S. and Perreault, C. ER stress affects processing of MHC class I-associated peptides. **BMC Immunol**. 10 (2009) 10.
48. Tardif, K.D. and Siddiqui, A. Cell surface expression of major histocompatibility complex class I molecules is reduced in hepatitis C virus subgenomic replicon-expressing cells. **J Virol**. 77 (2003) 11644-11650.
49. Ulianich, L., Terrazzano, G., Annunziatella, M., Ruggiero, G., Beguinot, F. and Di Jeso, B. ER stress impairs MHC Class I surface expression and increases susceptibility of thyroid cells to NK-mediated cytotoxicity. **Biochim Biophys Acta**. 1812 (2011) 431-438.
50. Gubernator, B., **Bartoszewski, R.**, Kroliczewski, J., Wildner, G. and Szczepaniak, A. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*. **Photosynth Res**. 95 (2008) 101-109.

51. Kapoor, N., Lee, W., Clark, E., **Bartoszewski, R.**, McNicholas, C.M., Latham, C.B., Bebok, Z., Parpura, V., Fuller, C.M., Palmer, C.A. and Benos, D.J. Interaction of ASIC1 and ENaC subunits in human glioma cells and rat astrocytes. **Am J Physiol Cell Physiol.** 300 (2011) C1246-1259.
52. Rooj, A.K., McNicholas, C.M., **Bartoszewski, R.**, Bebok, Z., Benos, D.J. and Fuller, C.M. Glioma-specific cation conductance regulates migration and cell cycle progression. **J Biol Chem.** 287 (2012) 4053-4065.
53. Jurkuvenaite, A., Chen, L., **Bartoszewski, R.**, Goldstein, R., Bebok, Z., Matalon, S. and Collawn, J.F. Functional stability of rescued delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in airway epithelial cells. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 42 (2010) 363-372.
54. **Bartoszewski, R.A.**, Jablonsky, M., Bartoszewska, S., Stevenson, L., Dai, Q., Kappes, J., Collawn, J.F. and Bebok, Z. A synonymous single nucleotide polymorphism in DeltaF508 CFTR alters the secondary structure of the mRNA and the expression of the mutant protein. **J Biol Chem.** 285 (2010) 28741-28748.
55. Lazrak, A., Fu, L., Bali, V., **Bartoszewski, R.**, Rab, A., Havasi, V., Keiles, S., Kappes, J., Kumar, R., Lefkowitz, E., Sorscher, E.J., Matalon, S., Collawn, J.F. and Bebok, Z. The silent codon change I507-ATC->ATT contributes to the severity of the DeltaF508 CFTR channel dysfunction. **FASEB J.** 27 (2013) 4630-4645.
56. Madanecki, P., Kapoor, N., Bebok, Z., Ochocka, R., Collawn, J.F. and **Bartoszewski, R.** Regulation of angiogenesis by hypoxia: the role of microRNA. **Cell Mol Biol Lett.** 18 (2013) 47-57.