

Autoreferat

*Mechanizmy molekularne determinujące los
komórki w odpowiedzi na stres retikulum
endoplazmatycznego*

Dr Sylwia Bartoszevska

Rada Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk, 2020

1. Imię i nazwisko:

Sylwia Bartoszevska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

21 kwietnia 2016 roku – *doktor nauk medycznych*

Wydział Lekarski Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Rozprawa doktorska pt. "*Rola mikro-RNA w mechanizmach komórkowej odpowiedzi na wybrane czynniki stresu metabolicznego*". Promotor prof. dr hab. Leszek Kalinowski.

12 października 2001 roku – *magister chemii*

Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Promotor dr Ewa Kwaskowska-Chęć.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

2017 - teraz: *adiunkt.*

Wydział Farmaceutyczny Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej.

2012 - 2017: *asystent*

Wydział Farmaceutyczny z Oddz. Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej

2009-2011: *research assistant.*

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

2008-2009: *research technician.*

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

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy.

Tytuł osiągnięcia naukowego:

Mechanizmy molekularne determinujące los komórki w odpowiedzi na stres retikulum endoplazmatycznego

a. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia:

- 4.1. **S. Bartoszevska***, A. Cabaj, M. Dąbrowski, J. F. Collawn, R. Bartoszevski; *miR-34c-5p modulates X-box-binding protein 1 (XBP1) expression during the adaptive phase of the unfolded protein response*; 2019; The FASEB Journal Oct, 33(10), 11541-11554. IF₂₀₁₉ = 5,391.
- 4.2. M. Gebert, **S. Bartoszevska**, A. Janaszak-Jasiecka, A. Moszyńska, A. Cabaj, J. Króliczewski, P. Madanecki, R. J. Ochocka, D. K. Crossman, J. F. Collawn & R. Bartoszevski; *PIWI proteins contribute to apoptosis during the UPR in human airway epithelial cells*; 2018; Scientific Reports 8 (18), Article no 16431. IF₂₀₁₉ = 4.011.
- 4.3. R. Bartoszevski, M. Gebert, A. Janaszak-Jasiecka, A. Cabaj, J. Kroliczewski, **S. Bartoszevska**, A. Sobolewska, D. K. Crossman, R. Ochocka, W. Kamysz, L. Kalinowski, M. Dabrowski, J. F. Collawn; *Genome-wide mRNA profiling identifies RCAN1 and GADD45A as regulators of the transitional switch from survival to apoptosis during ER stress*; 2020; FEBS Journal; <https://doi.org/10.1111/febs.15195>. IF₂₀₁₉ = 4,739.
- 4.4. **#S. Bartoszevska***, J. F. Collawn; *Unfolded protein response (UPR) integrated signaling networks determine cell fate during hypoxia*; 2020; Cellular & Molecular Biology Letters (48). IF₂₀₁₉ = 3,367.
- 4.5. **S. Bartoszevska**, W. Kamysz, B. Jakiela, M. Sanak, J. Króliczewski, Z. Bebok, R. Bartoszevski & J. F. Collawn; *miR-200b downregulates CFTR during hypoxia in human lung epithelial cells*; 2017; Cellular & Molecular Biology Letters 22 (4), Article no 23 (2017). IF₂₀₁₇ = 1.291.

Szczegółowy udział w poszczególnych pracach podano w "5. Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny", załączono również oświadczenia współautorów (Załącznik nr 4.1).

Łączny Impact Factor przedstawionego cyklu publikacji wynosi 18.799; punktacja MNiSW: 375.

* autor korespondujący; # praca pogładowa.

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

Występujące u wszystkich komórek eukariotycznych retikulum endoplazmatyczne (ER, *endoplasmic reticulum*) to organelum wydzielone przez system pojedynczych błon, które kontroluje metabolizm komórek, modulując zależnie od ich potrzeb syntezę białek błonowych oraz sekrecyjnych, jak i lipidów i steroli [1]. ER, poza kluczową rolą w procesach zwijania oraz kierowania białek, odpowiada również za utrzymanie komórkowej homeostazy redoks i poziomu jonów wapnia, jak i za przebieg komórkowych szlaków przekazywania sygnału [1]. Wspomniane funkcje retikulum endoplazmatycznego mogą jednak zostać upośledzone pod wpływem czynników stresu metabolicznego (jak m.in. hipoksja, infekcje i chroniczne stany zapalne, nowotwory, czy obecność mutacji uniemożliwiających poprawne ich składanie w tym organelum) [2], i wtedy procesy zachodzące w ER nie będą mogły zaspokoić potrzeb komórki i organizmu, co określa termin stresu ER (*ER stress*). Jedną z konsekwencji stresu ER jest upośledzenie zdolności ER do zwijania białek i ich nagromadzenie w tym przedziale komórki [3].

Utrzymanie i przywrócenie homeostazy ER bazuje na współdziałaniu trzech odmiennych szlaków sygnałowych, zaangażowanych w mechanizm mający za zadanie wzmożenie procesów zwijania białek - mechanizm odpowiedzi na niezwinięte białka (*UPR, unfolded protein response*) [4].

Akumulacja niezwiniętych bądź źle zwiniętych białek w ER u ssaków, zwiększa zapotrzebowanie komórki na białka opiekuńcze (wspomagające procesy zwijania), w tym białko wiążące immunoglobuliny, (*BiP, binding immunoglobulin protein* znane też jako *GRP78, 78 kDa glucose-regulated protein*) [5]. W warunkach homeostazy ER białko BiP jest związane w świetle ER z trzema białkami przezbłonowymi zapobiegając ich aktywacji, są to: PERK (*protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase, gen EIF2AK3*, białko przezbłonowe o aktywności kinazy), IRE1 α (*inositol-requiring and ER-to-nucleus signaling protein, gen ERN1*, białko przezbłonowe o aktywności rybonukleazy) oraz ATF6 (*activating transcription factor 6, gen ATF6*, czynnik transkrypcyjny) [6].

Wywołany przez stres ER, wzrost zapotrzebowania na BiP prowadzi do jego dysocjacji od wymienionych białek, i w konsekwencji aktywacji trzech odmiennych szlaków sygnałowych mechanizmu UPR [5]. Po uwolnieniu BiP, PERK oraz IRE1 α ulegają

oligomeryzacji i trans-autofosforylacji, natomiast ATF6 jest translokowany do aparatu Golgiego, gdzie podlega obróbce proteolitycznej, której produktem jest jego aktywna transkrypcyjnie forma ATF6f, uwalniana do cytoplazmy (**Rycina 1**) [7, 8].

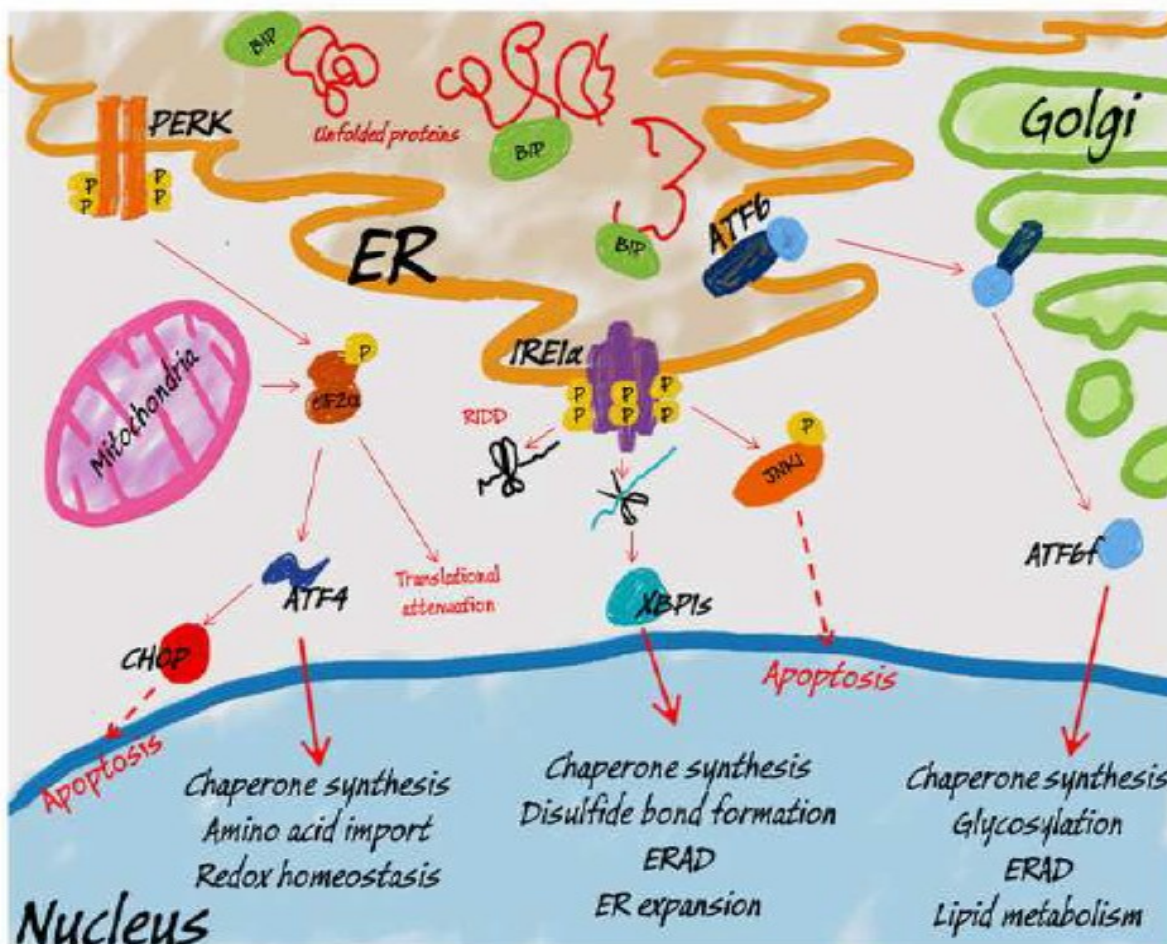
Aktywna kinaza PERK fosforyluje eIF2 α (*eukaryotic initiation factor 2 alpha*, gen *eIF2*), selektywnie wspierając translację czynników ważnych dla przebiegu UPR (w tym czynników transkrypcyjnych: ATF4 (*activating transcription factor 4*); GADD34 (*growth arrest DNA damage inducible protein 34*) oraz CHOP (*CCAAT/enhancer binding homologous protein*)), jednocześnie hamując inicjację tego procesu dla większości pozostałych białek, prowadząc do redukcji ich ilości w ER [5, 9-11]. ATF4 reguluje transkrypcję genów odpowiedzialnych m.in. za metabolizm aminokwasów, zwijanie białek, utrzymanie homeostazy redoks oraz redukcję ilości reaktywnych form tlenu [12], oraz wspiera akumulację apoptycznego białka CHOP [13]. GADD34 odpowiada za defosforylację eIF2 α , i umożliwia reaktywację syntezy białek po przywróceniu homeostazy ER [14] (**Rycina 1**).

Aktywna forma IRE1 α , redukuje syntezę białek w ER poprzez degradację wybranych mRNA [15], jak również składa mRNA czynnika transkrypcyjnego *XBPI* (*X-box binding protein 1*, gen *XBPI*), do aktywnej transkrypcyjnie izoforny tego białka (*XBPIs*, *spliced XBPI*) [16]. Selektywna degradacja mRNA i zahamowanie translacji podczas stresu mogą być również wspierane przez krótkie niekodujące RNA - mikro-RNA (miRNA) [17]. *XBPIs* poprzez wpływ ekspresję genów, wspiera zwijanie białek w ER, syntezę błon tego organelum, oraz procesy mające na celu degradację niezwinionych białek w ER (*ERAD*, *ER associated degradation*) [16]. Jednakże, aktywność kinazy IRE1 α (oraz PERK) prowadzi również do aktywacji kinazy JNK (*Janus N-terminal kinase*), inicjując autofagię lub apoptozę [18] (**Rycina 1**).

ATF6f, wzmacnia transkrypcję genów białek opiekuńczych (w tym BiP) oraz genów białek odpowiedzialnych za syntezę lipidów i ERAD [19]. Jednakże, ATF6f indukuje również ekspresję genów białek apoptycznych, w tym białka CHOP [20] (**Rycina 1**).

Mimo że, wiodącą rolą mechanizmu UPR jest umożliwienie komórce przetrwania stresu i przywróceniu poprawnych funkcji ER, to w sytuacji gdy opisane szlaki sygnałowe zawiodą, UPR wykorzystuje je do skierowania komórki na drogę apoptozy [21]. Jak już wspomniano, aktywacja proapoptycznej kinazy JNK jest wspierana przez aktywności PERK i IRE1 α , zaś ATF4 i ATF6 prowadzą do akumulacji CHOP [22].

Chroniczny stres ER może prowadzić nie tylko do apoptozy, przy udziale apoptycznych białek PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*), i NOXA (w języku łańciskim uszkodzenie) [23, 24], której towarzyszy aktywacja kaspaz 2, 4, i 8 [25, 26], ale również do aktywacji alternatywnych szlaków śmierci komórek, jak m.in. zależna od PERK nekroptoza [27].



Rycina 1. Szlaki sygnałowe mechanizmu UPR: Aktywacja PERK, ATF6, oraz IRE1, w ER, chroni komórkę przed stresem, poprzez inhibicję translacji (eIF2α) i degradację mRNA (IRE1). Aktywacja tych głównych receptory stresu ER, prowadzi również, do transkrypcyjnej indukcji genów pozwalających na adaptację do stresu (za pośrednictwem czynników transkrypcyjnych ATF4, ATF6α, i XBP1s). Gdy przywrócenie równowagi w ER, okaże się niemożliwe, te same receptory inicjują apoptozę Na podstawie pracy 4.4.

Podsumowując, gdy homeostaza ER nie może zostać przywrócona komórka, musi podjąć decyzję o swoim dalszym losie, i ewentualnej śmierci. Mimo że, wieloletnie badania umożliwiły dobre poznanie mechanizmów molekularnych determinujących adaptację i apoptozę podczas UPR, nadal nie rozumiemy jakie czynniki decydują o wyborze między tymi ścieżkami. Co istotne zaburzenia wspomnianego procesu decyzyjnego, są częścią patomechanizmu wielu ludzkich schorzeń jak m.in.: niektóre nowotwory, cukrzyca typu pierwszego, przewlekłe stany zapalne, choroby neurodegeneracyjne (np. choroba Alzheimera, choroba Parkinsona), choroby autoimmunologiczne, schorzenia układu oddechowego (mukowiscydoza czy przewlekła obturacyjna choroby płuc). Tym samym, zrozumienie mechanizmów leżących u podstaw decyzji o losie komórek w warunkach stresu, może być kluczowym dla opracowanie nowych strategii terapeutycznych i identyfikacji celów leków dla wymienionych schorzeń

Celem nadrzędnym prowadzonych przeze mnie badań było więc zrozumienie mechanizmów leżących u podstaw decyzji o losie komórki w warunkach zaburzenia funkcji ER, zarówno w klasycznym farmakologicznym modelu stresu ER (prace 4.1-4.3) jak i podczas hipoksji, która również zaburza funkcje retikulum endoplazmacyjnego (prace 4.4 i 4.5)

Wpływ miR-34c-5p na przebieg zależnej od XBP1 adaptacji do stresu ER.

(praca 4.1)

mikro-RNA to endogenne, jednoniciowe, krótkie (o średniej długości 22 nukleotydów), niekodujące RNA, odpowiedzialne za selektywną potranskrypcyjną regulację ekspresji genów i w konsekwencji, ze względu na funkcje kodowanych przez te geny białek, procesów komórkowych [28]. Ekspresja miRNA jest często zależna od czynników transkrypcyjnych, co umożliwia zwrotną integrację działania tych niekodujących RNA (ncRNA) z aktualnym przebiegiem procesów i szlaków sygnałowych komórki, w tym tych aktywowanych w odpowiedzi na stres [29].

Jak już wspomniano, obniżenie ilości białek procesowanych w ER jest jednym z głównych zadań adaptacyjnych szlaków UPR, które hamują translację i degradują wybrane mRNA. Te działania UPR są zbieżne z biologiczną funkcją mikro-RNA, które specyficznie

hamują translację transkryptów, lub prowadzą do ich degradacji [30-32]. Jednakże, mimo że rola tych ncRNA w odciążeniu ER, poprzez degradację mRNA i zahamowanie translacji, wydaje się atrakcyjna, to jest ona słabo odzwierciedlona w badaniach naukowych. Zaobserwowano bowiem że, podczas stresu ER poziom miRNA spada (praca 4.2), zaś w komórkach nie obserwuje się generalnego obniżenia ilości mRNA [33]. Sugeruje to, że miRNA pełnią podczas UPR ściśle określone role biologiczne, specyficznym modulując poziom czynników transkrypcyjnych ważnych dla adaptacji do stresu, bądź związanej z nim śmierci komórki [17].

Ta hipoteza, znajduje odzwierciedlenie wynikach moich badań, w których zidentyfikowałam nowy, właściwy dla adaptacji, zależny od miR-34c-5p mechanizm kontroli ekspresji czynnika XBP1, podczas stresu ER.

Możliwość interakcji biologicznej między miR-34c-5p a XBP1s przewidziałam z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych we wcześniejszych badaniach [34]. Kolejnym etapem moich badań była weryfikacja znaczenia funkcjonalnego tego niekodującego RNA, dla zależnych od XBP1s procesów UPR.

W omawianej pracy wykazałam doświadczalnie, że miR-34c-5 jest zdolny do regulacji ilości zarówno XBP1 jak i jego izoformy XBP1s (z wykorzystaniem systemu reporterowego). Zaobserwowałam również, że po ekspozycji na stres ER (wywołany farmakologicznie), poziom tego miRNA wzrasta w ludzkich komórkach (zarówno normalnych jak i nowotworowych). Co istotne, w badanych modelach stresu ER, modulacja ilości miR-34c-5p (za pomocą sztucznych analogów i inhibitorów tego mikro-RNA) miała odzwierciedlenie w ilości mRNA i białka XBP1s, oraz w ekspresji genów adaptacyjnych zależnych od tego czynnika transkrypcyjnego, jak również w przeżywalności komórek podczas stresu. Bezpośrednie oddziaływanie miR-34c-5p z właściwą dla niego sekwencją w obrębie mRNA *XBP1*, potwierdziłam za pomocą specyficznej dla tej sekwencji cząsteczki "target protector", która zapobiegała wiązaniu mikro-RNA do tego transkryptu.

Wyniki moich badań sugerują, że miR-34c-5p jest ważnym regulatorem przebiegu adaptacji do stresu ER, a podczas długotrwałego stresu umożliwia inaktywację tego aspektu UPR. Co ciekawe, bezpośredni wpływ tego niekodującego RNA ograniczał się jedynie do kontroli przebiegu i ewentualnej inhibicji adaptacji komórek do warunków stresu.

Wykazałam również, że miR-34c-5p może obniżać ilość, nieprocesowanej przez IRE1 α , izoforny XBP1 (XBP1u), która podczas stresu ER negatywnie wpływa na odpowiedź adaptacyjną zależną od ATF6 i XBP1s. Ta obserwacja sugeruje, że badane mikro-RNA może również zapobiegać niechcianej aktywności XBP1u podczas UPR.

W swoich badaniach podjęłam się również ustalenia przyczyn wzrostu ilości miR-34c-5p na skutek ekspozycji na stres ER. Gen tego niekodującego RNA jest lokalizowany na chromosomie 11 (NC_000011.10: 111513439 -111513515), zaś analizy bioinformatyczne jego otoczenia (wykonane w ramach współpracy z grupą dr hab. Michała Dąbrowskiego) zidentyfikowały w jego obrębie potencjalne sekwencje wiązania czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w UPR (w tym ATF6 i CHOP). Dlatego też, wykorzystując specyficzne inhibitory poszczególnych szlaków sygnałowych UPR, weryfikowałam eksperymentalnie ich wpływ na ekspresję miR-34c-5p podczas stresu. Jednakże wyniki tych badań nie potwierdziły przewidywań teoretycznych.

Mając na względzie że, uzyskanie kontroli nad zależną od XBP1 adaptacją do stresu, jest celem rozwijanych terapii przeciwnowotworowych [35], zaś ekspresja miR-34c-5p jest powszechnie obniżona w guzach [36], wyniki moich badań, łącząc te dwie obserwacje, definiują nowy potencjalny cel terapeutyczny.

piRNA i białka PIWI jako nowy mechanizm kontroli losu komórki podczas stresu ER.

(praca 4.2)

miRNA zostały już powszechnie zaakceptowane jako ważny element regulacji przebiegu UPR [34], jednak rola innych klas niekodujących RNA w tym procesie jest bardzo słabo poznana.

Podczas analizy zależnych od stresu ER, globalnych zmian w ilości niekodujących RNA w nienowotworowych komórkach ludzkiego nabłonka płuc, zaobserwowaliśmy, że mimo redukcji ilości mikro-RNA, wzrasta ilość innej klasy niekodujących RNA - RNA-oddziałujących z piwi (*piwi-interacting RNAs*, piRNAs). piRNA to krótkie, endogenne, niekodujące RNA, powstające w mechanizmie niezależnym od aktywności endorybonukleazy Dicer [37]. piRNA wraz z białkami PIWI (*P-element induced WImpy proteins*) biorą udział w wyciszaniu retrotranspozonów w komórkach rozrodczych [38], zaś ostatnie doniesienia

wskazują, że mogą one pełnić rolę analogiczną do miRNA w komórkach somatycznych, i regulować stabilność mRNA [39].

Postanowiliśmy więc, zbadać czy obserwowany podczas stresu ER wzrost ilości piRNA ma konsekwencje dla przebiegu UPR i losu komórki.

Nasze badania wykazały, że obserwowane podczas stresu ER profile ekspresji piRNA, korelują z aktywnością apoptyczną UPR (zarówno zależną od białka CHOP jak i białka NOXA). Ponadto, wykazaliśmy że, wyciszenie białek PIWI (niezbędnych do biogenezy i działania piRNA) wspiera przeżywalność komórek podczas stresu ER.

Podsumowując zidentyfikowaliśmy znaczenie piRNA i białek PIWI dla podjęcia decyzji o śmierci komórki podczas stresu ER.

Mając na względzie rolę białek PIWI dla biogenezy piRNA i ich funkcji biologicznej, podjęłam się oceny wywołanych stresem zmian w ich ilości (jak i skuteczności wyciszenia ich ekspresji). Zaobserwowałam, że farmakologiczna indukcja stresu ER, ma znikomy wpływ na poziom białek PIWIL2 i PIWIL4 (jedyne białka PIWI ekspresowane w naszym modelu badawczym), co sugeruje, że zarówno obserwowany podczas stresu wzrost ilości piRNA, jak i związana z nim aktywność apoptyczna, mają podłoże w modyfikacji aktywności biologicznej tych białek.

RCAN1 i GADD45A jako składowe mechanizmu decydującego o losie komórki podczas stresu ER.

(praca 4.3)

Jedną z głównych przeszkód na drodze do zrozumienia mechanizmu decyzji o losie komórki podczas stresu i determinacji jego uniwersalnych elementów, są niedoskonałe modele badawcze. Obecnie do badań na odpowiedź na stres ER wykorzystuje się szerokie spektrum tzw. stresorów farmakologicznych, które są odmienne pod względem potencji i wpływu na poszczególne szlaki UPR (co więcej konsekwencje ich działania na komórkę mają charakter globalny i wykraczają poza wspomniane szlaki sygnałowe). Dodatkowym ograniczeniem badań nad UPR, jest ich zawężanie do pojedynczych linii nowotworowych

(charakteryzujących się specyficznymi adaptacjami antyapoptycznymi) i analiza uzyskanych wyników w ujęciu statycznym (często ograniczona do jednego czasu ekspozycji na stres).

Aby podjąć ten problem wykorzystaliśmy nienowotworową linię komórkową ludzkiego nabłonka płuc i porównaliśmy, w ujęciu kinetycznym, przebieg szlaków sygnałowych UPR, jak i zmiany w przeżywalności komórek, związane z wywołaniem stresu ER za pomocą trzech odmiennych, klasycznych stresorów farmakologicznych (zahamowanie glikozylacji w ER, inhibicja proteasomu, oraz deregulacja homeostazy wapniowej). Celem potwierdzenia aktywacji szklaku zależnego od PERK, przeprowadziłam eksperymenty z wykorzystaniem specyficznego inhibitora tej składowej UPR.

Następnie, w oparciu o całogenomowe profile ekspresji genów, po czasach ekspozycji na stres ER odpowiadających odpowiednio: fazie adaptacji, decyzji o losie komórki, oraz fazie apoptozy; identyfikowaliśmy zmiany w ilości transkryptów potencjalnie odpowiedzialne za przetrwanie warunków stresu bądź śmierć komórek. Niezależna weryfikacja obserwowanych zmian w ilości mRNA, pozwoliła nam na wskazanie *GADD45A* (*growth arrest and DNA damage inducible alpha*) oraz *RCAN1* (*regulator of calcineurin 1*) jako nowych elementów mechanizmów, decydujących o losie komórek podczas stresu ER.

Nasze dalsze badania z wykorzystaniem m.in. specyficznego wyciszenia tych genów, wykazały, że obserwowany podczas stresu ER, wzrost ilości mRNA *RCAN1* wspiera przeżywalność eksponowanych na stres komórek, podczas gdy indukcja ekspresji *GADD45A* kieruje je na drogę apoptozy. Znaczenie tych dwóch genów dla losu komórki podczas stresu ER, oraz ich wpływ przebieg adaptacyjnych i apoptycznych mechanizmów UPR, potwierdziliśmy niezależnie, dla wszystkich użytych klasycznych stresorów, i w szerokim spektrum ludzkich linii komórkowych (również w ludzkich komórkach pierwotnych i komórkach nowotworowych).

Podsumowując, nasze badania zidentyfikowały zmiany ekspresji RCAN1 i GADD45A jako uniwersalną składową mechanizmu decydującego o losie komórek podczas stresu ER.

Czy hipoksja może być przyczyną stresu ER ?*(praca 4.4)*

Hipoksję, definiowaną na poziomie komórki jako niezaspokojone zapotrzebowanie na tlen, należy również rozpatrywać w charakterze stresu i związanej z nim odpowiedzi komórkowej. Niedobór tlenu aktywuje bowiem szlaki sygnałowe mające za zadanie adaptację metabolizmu komórek do obniżonej podaży tlenu i przywrócenie homeostazy tlenowej, bądź też w przypadku niemożności jej przywrócenia, skierowanie komórek na drogę apoptozy [40-44].

Adaptacji do warunków hipoksji i dążeniu do przywrócenia homeostazy tlenowej towarzyszy jednak zaburzenie homeostazy takich organelli komórkowych jak mitochondria czy ER, i w konsekwencji procesów zwijania białek [45-48], co może aktywować mechanizmy UPR. Tym samym hipoksja może prowadzić do stresu ER, a to organellum ma krytyczne znaczenie dla wydajnej syntezy i wydzielania czynników angiogennych i wspierających erytropoezę [49-51]. Co więcej aktywacja UPR przez hipoksję, może mieć wpływ na przeżywalność "niedotlenionych" komórek [52], co jest istotnym zagadnieniem dla m.in. terapii schorzeń kardiowaskularnych i nowotworowych. Jednakże, wzajemna regulacja i interakcje między odpowiedzią na hipoksję a UPR, są obecnie bardzo słabo zrozumiane.

W prezentowanej prac krytycznie podsumowaliśmy obecny stan wiedzy na temat wpływu hipoksji na homeostazę retikulum endoplazmatycznego i aktywację szlaków sygnałowych związanych z UPR.

Ekspozycja ludzkich komórek nabłonka płuc na hipoksję prowadzi do redukcji ilości białka CFTR za pośrednictwem miR-200b.*(praca 4.5)*

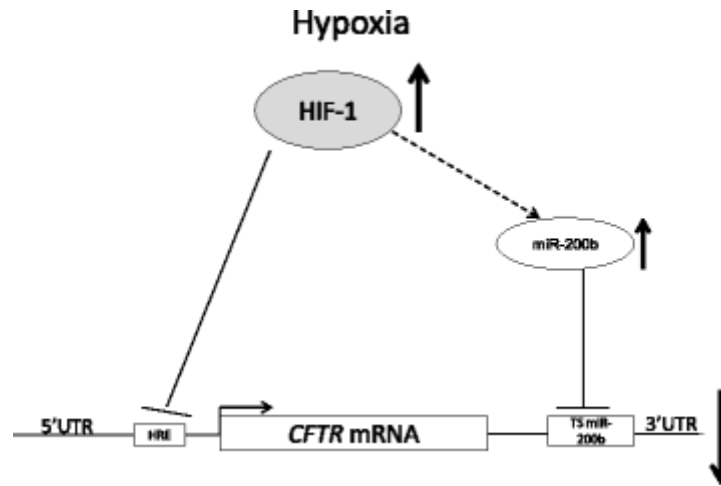
Białko CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), będące kanałem chlorkowym jest jednym z głównych regulatorów homeostazy jonowej, szczególnie istotnym dla poprawnego funkcjonowania układu oddechowego. Komórki nabłonka płuc ekspresją jednak relatywnie niewielkie ilości tego białka, a jego ekspresja obniża się pod wpływem m.in. stresu ER (dym tytoniowy) i hipoksji (infekcje prowadzące do niedotlenienia) [53, 54].

Obniżenie aktywności kanału CFTR towarzyszy takim schorzeniom jak przewlekła obturacyjna choroba płuc, astma oraz zapalenie oskrzeli [55]. Natomiast mutacje w obrębie genu *CFTR*, które zaburzają zwijanie i funkcje tego białka i często ograniczają jego wydajne procesowanie w ER, prowadząc do takich schorzeń jak mukowiscydoza (CF, *cystic fibrosis*).

Jako że, wcześniejsze badania zespołu Profesora Collawna dotyczyły m.in. mechanizmów, za pośrednictwem których stres ogranicza ekspresję *CFTR* [56-59], postanowiłam zbadać czy można do nich zaliczyć miRNA, akumulowane w odpowiedzi na hipoksję. Wyniki wcześniejszych badań [60] i nasze przewidywania bioinformatyczne, zidentyfikowały bowiem potencjalne oddziaływanie między miR-200b a mRNA *CFTR*.

Aby zweryfikować funkcjonalne znaczenie takiej interakcji śledziłam, wywołane ekspozycją na hipoksję, zmiany w ilości mRNA i białka CFTR, jak i miR-200b w ludzkich komórkach nabłonka płuc (zarówno normalnych jak i nowotworowych). Zaobserwowałam, że hipoksja prowadzi do akumulacji miR-200b, czemu towarzyszy obniżenie ilości białka CFTR. Następnie zweryfikowałam bezpośrednie oddziaływanie między miR-200b a właściwą sekwencją w obrębie mRNA *CFTR*, wykorzystując zarówno system reporterowy, jak i analog oraz inhibitor miR-200b. Wykazałam, że inhibicja miR-200b, w komórkach nabłonka płuc wystawionych na hipoksję, przywraca ilość CFTR do poziomu obserwowanego w normoksji.

Co więcej wykazałam że, obserwowane podczas hipoksji obniżenie ekspresji *CFTR* jest konsekwencją zarówno bezpośredniego jak i pośredniego wpływu pierwszego czynnika indukowanego hipoksją (HIF-1). Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami [61], potwierdziłam jego bezpośredni, hamujący wpływ na ekspresję *CFTR* (na poziomie transkrypcyjnym), oraz pośredni z udziałem indukowanego przez ten czynnik miR-200b (na poziomie potranskrypcyjnym) (**Rycina 2**). Wyniki potwierdziłam w pierwotnych ludzkich komórkach nabłonka płuc (uzyskanych dzięki uprzejmości Profesora Marka Sanaka i dr Bogdana Jakięły z Uniwersytetu Jagiellońskiego).



Rycina 2. Zależne od HIF-1 mechanizmy obniżenia ilości białka CFTR w komórkach ludzkiego nabłonka płuc ekspozowanych na hipoksję. Na podstawie pracy 4.5.

Moja praca wykazała wpływ czynnika HIF-1 na ekspresję genu CFTR (zarówno transkrypcyjny jak i potranskrypcyjny), oraz pozwoliła na wyjaśnienie przyczyn spadku aktywności tego kanału obserwowanego, podczas stresu hipoksji.

Podsumowanie

Związana ze stresem ER i hipoksją, aktywacja mechanizmów UPR i zaburzenia związanej z nimi apoptozy, stanowią ważną składową patomechanizmów m.in. nowotworów, cukrzycy typu pierwszego, przewlekłych stanów zapalnych, chorób neurodegeneracyjnych, autoimmunologicznych, jak również schorzeń kardiowaskularnych czy układu oddechowego.

Uzyskanie kontroli nad losem ekspozowanej na stres komórki, mogłoby umożliwić opracowanie nowych, krytycznych dla pacjentów, strategii terapeutycznych dla wspomnianych schorzeń. Realizacja tego celu, wymaga jednak wnikliwego zrozumienia złożonych mechanizmów, leżących u podstaw decyzji o apoptozie w warunkach stresu, i określenia ich elementów mogących być kandydatami na cele leków.

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

1. Zidentyfikowano nowy, właściwy dla adaptacji, zależny od miR-34c-5p, mechanizm kontroli ilości czynnika XBP1, podczas stresu ER, i określono znaczenie tego ncRNA dla mechanizmów UPR (*praca 4.1*).
2. Zidentyfikowano piRNA i białka PIWI jako nowy mechanizm kontroli losu komórki podczas stresu ER. (*praca 4.2*).
3. Zidentyfikowano *RCAN1* i *GADD45A* jako uniwersalne składowe mechanizmu decydującego o losie komórki podczas stresu ER. (*praca 4.3*).
4. Podjęto się krytycznego podsumowania obecnego stanu wiedzy, na temat wpływu hipoksji na homeostazę retikulum endoplazmatycznego i aktywację szlaków sygnałowych związanych z UPR. (*praca 4.4*).
5. Przedstawiono, oparty o wywołaną przez HIF-1 indukcję miR-200b, mechanizm odpowiedzialny za obniżenie ekspresji *CFTR* podczas hipoksji, w ludzkich komórkach nabłonka płuc (*praca 4.5*).

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Studia ukończyłam w 2001 roku, na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego i kontynuowałam pracę nauczyciela chemii w Zespole Szkół Ponadgimnazjalnych w Oławie, rozpoczętą w 1999 roku.

Moja praca naukowa zaczęła się w 2008 roku, od trzyletniego stażu zagranicznego w grupie profesora James'a Collawn'a w *Department of Cell Biology, University of Alabama at Birmingham (UAB), USA (Załącznik nr 4.2)*. Podczas pobytu na UAB, początkowo pełniłam rolę *research technician*, a po roku zostałam promowana na pozycję *research assistant*, zaś moje zadania badawcze dotyczyły mechanizmów molekularnych towarzyszących mukowiscydozie i poszukiwania nowych leków na to schorzenie.

W 2010, w pracy zespołowej (JBC w 2010 r., pozycja **II.4.1** w "Wykazie osiągnięć ...") wykazaliśmy że polimorfizm pojedynczego nukleotydu, towarzyszący patogennej delecji Phe508 w *CFTR*, jest nieznaną dotychczas składową patomechanizmu mukowiscydozy. W 2011 roku brałam również udział w pracach nad rolą krótkich niekodujących RNA w mechanizmach odpowiedzi komórkowej na stres ER, czego rezultatem była identyfikacja miR-346 jako cząsteczki odpowiedzialnej za obniżenie odporności podczas stresu (JBC w 2011 r., pozycja **II.4.2** w "Wykazie osiągnięć ..."). Jest to druga publikacja na świecie identyfikująca mikro-RNA specyficzne dla stresu ER.

Ponadto, podczas pracy na UAB, wykonywałam zadania badawcze dla firmy Discovery Biomed mające na celu selekcję i weryfikację kandydatów na leki na mukowiscydozę. Do moich zadań należało m.in. wykonanie analiz biochemicznych wpływu tych związków na komórki pierwotne ludzkiego nabłonka płuc, optymalizacja hodowli tych komórek jak i pomiary elektrofizjologiczne (komora Ussinga) zmian w aktywności kanału CFTR, wywołanych przez badane związki (Załącznik nr 4.3). Ten aspekt mojej aktywności naukowej wymagał zarówno przetestowania jak wyżej opisano zarówno związków wiodących jak i kilku generacji ich pochodnych.

Pobyt na *University of Alabama at Birmingham* pozwolił mi rozwinąć warsztat badacza i od 2012 roku kontynuować działalność naukową w Polsce, w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (Wydział Farmaceutyczny z Oddz. Medycyny Laboratoryjnej,

Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej), jednocześnie utrzymując i rozwijając współpracę badawczą z moim mentorem z UAB, profesorem Jamesem Collawnem (Załącznik nr 4.4).

Moje badania do uzyskania stopnia doktora, dotyczyły roli niekodujących RNA w kontroli angiogenezy wywołanej przez hipoksję. W mojej pracy, z 2015 roku, wykazałam, że podczas niedotlenienia akumulacji głównego czynnika odpowiedzi adaptacyjnej na hipoksję HIF-1, towarzyszy indukcja miR-429, który redukuje ekspresję tego czynnika. Zidentyfikowaliśmy więc pętlę negatywnego sprzężenia zwrotnego między HIF-1 a miR-429 (FASEB J w 2015 r., pozycja **II.4.6** w "Wykazie osiągnięć ..."). Moje dalsze badania wykazały również znaczenie miR-429 dla regulacji ekspresji czynnika HIF-3 (Sci Rep w 2016 r., pozycja **II.4.8** w "Wykazie osiągnięć ..."). Wyniki wspomnianych badań stanowiły podstawę mojej rozprawy doktorskiej, którą obroniłam z wyróżnieniem na Wydziale Lekarskim Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w 2016 roku.

Po uzyskaniu stopnia doktora skoncentrowałam swoje zainteresowania badawcze na mechanizmach determinujących los komórki wystawionej na działanie stresu, ze szczególnym uwzględnieniem możliwości wpływu na tą decyzję, za pomocą analogów ncRNA, co mogłoby być podstawą nowych strategii terapeutycznych (terapia RNAi) dla nieuleczalnych chorób.

Poza pracami zebranymi w charakterze osiągnięcia, naukowego, te aspekty mojej działalności badawczej znalazły odzwierciedlenie w współautorstwie sześciu prac z listy filadelfijskiej (w tym FASEB J w 2019 r., Angiogenesis w 2018 r., oraz CMBL w 2016 r., odpowiednio pozycje **II.4.19**, **II.4.13** oraz **II.4.9**, w "Wykazie osiągnięć ..."). Prace te również zostały realizowane we współpracy międzynarodowej z UAB, oraz z wiodącymi zespołami krajowymi: grupą Profesora Marka Sanaka z Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, oraz grupą dr hab. Michała Dąbrowskiego z Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, w Warszawie.

W obrębie Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego nie tylko kontynuowałam wcześniejsze aktywne współprace badawcze, ale podjęłam również nowe kierunki badawcze, co ma odzwierciedlenie w moim dorobku naukowym. Jestem m. in. zaangażowana w badania grupy profesora Wojciecha Kamysza, nad wykorzystaniem peptydów w charakterze kandydatów na leki, które zaowocowały publikacją pięciu prac z listy filadelfijskiej (pozycje **II.4.12**, **II.4.15**, **II.4.18**, **II.4.20**, **II.4.21**, w "Wykazie osiągnięć ..."). Ponadto

współpracowałam z grupą profesora Jarosława Sławińskiego oraz dr hab. Krystyną Pieńkowską, co zostało odzwierciedlone w dwóch pracach z listy filadelfijskiej (odpowiednio pozycje II.4.16 oraz II.4.17, w w "Wykazie osiągnięć ...")

Ogółem w czteroletnim (2016 - jesień 2020) okresie po uzyskaniu stopnia doktora, opublikowałam 19 prac naukowych, w tym 15 oryginalnych i 4 poglądowe (pozycje II.4.9, II.4.10, II.4.13 oraz I.2.4, w "Wykazie osiągnięć ...") Łączna punktacja IF, prac opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora wynosi 73,105, a liczba punktów KBN/MNiSW 1152.

Na moment składania wniosku mój dorobek naukowy obejmuje 27 prac naukowych (w tym 6 jako pierwszy autor) o łącznej punktacji IF 102,859 (1487 punktów KBN/MNiSW), zaś h-indeks to 12/11, a prace były cytowane 519/478 (432/407 bez cytowań własnych) według odpowiednio baz *Scopus* i *Web of Science Core Collection*.

Dalszy rozwój mojej działalności naukowej i związanego z nią warsztatu badacza, zamierzam poświęcić zagadnieniom związanym z losem komórki wystawionej na działanie stresu, ze szczególnym uwzględnieniem zależnych od siebie odpowiedzi na stres - jak wywołana przez hipoksję, odpowiedź na niezwinęte białka (praca 4.4). Implementacja tego planu badawczego będzie przebiegała również w oparciu o utrzymanie i rozwój moich obecnych krajowych i zagranicznych współpracy badawczych.

Moja działalność naukowa jest możliwa dzięki zaangażowaniu się w charakterze wykonawcy projektów finansowanych ze źródeł zewnętrznych, uzyskanych w procedurach konkursowych:

Pełniłam rolę głównego wykonawcy zrealizowanych projektów Narodowego Centrum Nauki (NCN)

OPUS 2011/03/B/NZ3/04387 „Badania udziału miR-200b, miR-429 i miR-200c, w regulacji angiogenezy, wywołanej przez hipoksję”. (pozycje II.4.6 i II.4.8 w "Wykazie osiągnięć ...");

OPUS 2015/17/B/NZ3/01485 „Czy miRNA decydują o losie komórki podczas odpowiedzi na niezwinęte białka (*UPR, unfolded protein response*)?"; (pozycje I.2.2, I.2.3, I.2.4, I.2.5 w "Wykazie osiągnięć ...").

Jestem również wykonawcą realizowanych projektów NCN SONATA Bis 2015/18/E/NZ3/00687 „Molekularne mechanizmy przebiegu szlaku czynników indukowanych hipoksją (HIF) w ludzkim śródbłonku.” (pozycje **I.2.1**, **II.4.11**, **II.4.13** oraz **II.4.19** w "Wykazie osiągnięć ...");

i projektu NCN OPUS 2016/23/B/NZ7/02919 "Badania nad wykorzystaniem nowych analogów endogennych peptydów w terapii infekcji skórnych o etiologii gronkowcowej". (pozycja **II.4.20** w "Wykazie osiągnięć ...");

projektu NCN OPUS 2016/21/B/ST5/01375 "Badanie procesów samoorganizacji lipopeptydów przeciwdrobnoustrojowych oraz ich wpływu na modelowe błony lipidowe" (pozycja **II.4.21** w "Wykazie osiągnięć ...").

Biorę również udział w realizacji (jako główny wykonawca) projektu wdrożeniowego Narodowego Centrum Badań i Rozwoju STRATAGMED STRATEGMED3/306853/9/NCBR/2017 „Nowe związki o działaniu przeciwnowotworowym zaburzające funkcje telomerów” (projekt wdrożeniowy, pozycja **II.4.22** w "Wykazie osiągnięć ...").

Opisane zaangażowanie naukowe zostało wielokrotnie docenione w ramach zespołowych nagród J.M. Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (I stopnia w 2015 roku, II stopnia w 2016, II stopnia 2017, dwie II stopnia w 2018 i dwie II stopnia w 2019 roku) .

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Podczas studiów ukończyłam Studium Przygotowania Pedagogicznego na Uniwersytecie Wrocławskim, a od 2012 roku prowadziłam zajęcia dydaktyczne dla studentów kierunków farmacja i analityka medyczna, na Wydziale Farmaceutycznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, które obejmowały:

1. Ćwiczenia laboratoryjne z chemii ogólnej i nieorganicznej dla studentów 1 roku kierunków farmacja i analityka medyczna (od 2012 roku do teraz)
2. Opracowałam i przeprowadziłam wykłady w ramach przedmiotu "Wybrane aspekty chemii nieorganicznej w farmacji" dla studentów 1 roku kierunku farmacja (od 2019 roku)
3. Jestem również kierownikiem dydaktycznym przedmiotu *Inorganic Chemistry*, realizowanego dla studentów kierunku Farmacja *English Division* (od 2018 roku)
4. Pełniłam funkcje opiekuna prac magisterskich studentów kierunku farmacja (w 2019 i 2020 roku; jedna praca zakończona a druga w realizacji)

Od 2017 do 2020 roku zrecenzowałam dziesięć manuskryptów dla 4 czasopism międzynarodowych (publons id <https://publons.com/researcher/1699201/sylwia-bartoszevska>), takich jak m. in. *Cancers* (IF 6.19), *International Journal of Molecular Sciences* (4.18), *BMC Cellular and Molecular Biology Letters* (IF 3.36) oraz *Journal of Herbal Medicine* (IF 1,54).

Wyniki moich badań prezentowałam również w 2019 roku na dwóch seminariach naukowych dla zespołów Profesora Krzysztofa Książka "Rola niekodujących RNA w mechanizmach ludzkich schorzeń" w Pracowni Molekularnych Podstaw Chorób Cywilizacyjnych, oraz "Metodologia badań ludzkich mikro-RNA" w Uczelnianym Centrum Aparaturowym na Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Obecnie jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Chemicznego (od 2019 roku).

W ramach zadań organizacyjnych odpowiadam za obsługę rozliczania i planowania godzin dydaktycznych (system ePensum) w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej (od 2015 roku)

Zestawienie sumaryczne dorobku naukowego

(npdst. Załącznik nr 4.5)

| | |
|---|-----------------------|
| Liczba prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego | 5 |
| Sumaryczny Impact Factor i punkty MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania dla prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego | 18,799 i i 335 |
| Liczba prac po doktoracie (razem ze stanowiącymi osiągnięcie naukowe) | 19 |
| Sumaryczny Impact Factor i punkty MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania dla wszystkich prac po doktoracie | 73,085 i 1230 |
| Całkowita liczba prac | 27 |
| Sumaryczny Impact Factor i punkty MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania dla wszystkich prac | 102,859 i 1487 |
| Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science/Scopus | 478/519 |
| Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science/Scopus z wyłączeniem cytowań własnych | 407/432 |
| Indeks Hirscha według bazy Web of Science/Scopus | 11/12 |

 <http://orcid.org/0000-0001-8063-1272>

Web of Science Researcher ID [L-3922-2019](#)

Sylwia Bartoszevska
.....

(podpis wnioskodawcy)

Piśmiennictwo

1. Ron, D. and Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 8 (2007) 519-529.
2. Hotamisligil, G.S. Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. **Cell.** 140 (2010) 900-917.
3. Ron, D. and Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 8 (2007) 519-529.
4. Schroder, M. and Kaufman, R.J. ER stress and the unfolded protein response. **Mutat Res.** 569 (2005) 29-63.
5. Hetz, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology.** 13 (2012) 89-102.
6. Carrara, M., Prischi, F. and Ali, M.M. UPR Signal Activation by Luminal Sensor Domains. **Int J Mol Sci.** 14 (2013) 6454-6466.
7. Schroder, M. and Kaufman, R.J. The mammalian unfolded protein response. **Annu Rev Biochem.** 74 (2005) 739-789.
8. 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 Biol Cell.** 10 (1999) 3787-3799.
9. Gonen, N., Sabath, N., Burge, C.B. and Shalgi, R. Widespread PERK-dependent repression of ER targets in response to ER stress. **Sci Rep.** 9 (2019).
10. Han, J., Backa, S.H., Hur, J., Lin, Y.H., Gildersleeve, R., Shan, J.X., Yuan, C.L., Krokowski, D., Wang, S.Y., Hatzoglou, M., Kilberg, M.S., Sartor, M.A. and Kaufman, R.J. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. **Nature Cell Biology.** 15 (2013) 481-+.
11. Merksamer, P.I. and Papa, F.R. The UPR and cell fate at a glance. **J Cell Sci.** 123 (2010) 1003-1006.
12. Rutkowski, D.T. and Kaufman, R.J. All roads lead to ATF4. **Developmental Cell.** 4 (2003) 442-444.
13. Oyadomari, S. and Mori, M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. **Cell Death And Differentiation.** 11 (2003) 381.
14. Novoa, I., Zeng, H.Q., Harding, H.P. and Ron, D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 alpha. **Journal of Cell Biology.** 153 (2001) 1011-1021.
15. Han, D., Lerner, A.G., Vande Walle, L., Upton, J.P., Xu, W.H., Hagen, A., Backes, B.J., Oakes, S.A. and Papa, F.R. IRE1 alpha Kinase Activation Modes Control Alternate Endoribonuclease Outputs to Determine Divergent Cell Fates. **Cell.** 138 (2009) 562-575.
16. Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T. and Mori, K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. **Cell.** 107 (2001) 881-891.
17. Bartoszewska, 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).
18. Urano, F., Wang, X.Z., Bertolotti, A., Zhang, Y.H., 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.
19. Zhang, K.Z. and Kaufman, R.J. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. **Journal of Biological Chemistry.** 279 (2004) 25935-25938.

20. Iurlaro, R. and Munoz-Pinedo, C. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. **Febs Journal**. 283 (2016) 2640-2652.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Hekisz, 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.
25. 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.
26. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**. 35 (2007) 495-516.
27. Saveljeva, S., Mc Laughlin, S.L., Vandenabeele, P., Samali, A. and Bertrand, M.J. Endoplasmic reticulum stress induces ligand-independent TNFR1-mediated necroptosis in L929 cells. **Cell Death & Disease**. 6 (2015) e1587.
28. Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D.P., Burge, C.B., Carrington, J.C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., Matzke, M., Ruvkun, G. and Tuschl, T. A uniform system for microRNA annotation. **RNA**. 9 (2003) 277-279.
29. Kloosterman, W.P. and Plasterk, R.H. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. **Dev Cell**. 11 (2006) 441-450.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. Bartoszewski, R., Brewer, J.W., Rab, A., Crossman, D.K., Bartoszewska, S., Kapoor, N., Fuller, C., Collawn, J.F. and Bebek, 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.
34. Bartoszewska, 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**. 18 (2013) 555-578.
35. Chen, X., Iliopoulos, D., Zhang, Q., Tang, Q., Greenblatt, M.B., Hatziapostolou, M., Lim, E., Tam, W.L., Ni, M., Chen, Y., Mai, J., Shen, H., Hu, D.Z., Adoro, S., Hu, B., Song, M., Tan, C., Landis, M.D., Ferrari, M., Shin, S.J., Brown, M., Chang, J.C., Liu, X.S. and Glimcher, L.H. XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 α pathway. **Nature**. 508 (2014) 103-107.

36. Hagman, Z., Haflidadottir, B.S., Ansari, M., Persson, M., Bjartell, A., Edsjö, A. and Ceder, Y. The tumour suppressor miR-34c targets MET in prostate cancer cells. **British Journal of Cancer**. 109 (2013) 1271-1278.
37. Czech, B. and Hannon, G.J. One Loop to Rule Them All: The Ping-Pong Cycle and piRNA-Guided Silencing. **Trends Biochem Sci**. 41 (2016) 324-337.
38. Rouget, C., Papin, C., Boureux, A., Meunier, A.C., Franco, B., Robine, N., Lai, E.C., Pelisson, A. and Simonelig, M. Maternal mRNA deadenylation and decay by the piRNA pathway in the early Drosophila embryo. **Nature**. 467 (2010) 1128-1132.
39. Kwon, C., Tak, H., Rho, M., Chang, H.R., Kim, Y.H., Kim, K.T., Balch, C., Lee, E.K. and Nam, S. Detection of PIWI and piRNAs in the mitochondria of mammalian cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**. 446 (2014) 218-223.
40. Schmedtje, J.F., Jr. and Ji, Y.S. Hypoxia and molecular cardiovascular medicine. **Trends Cardiovasc Med**. 8 (1998) 24-33.
41. Malhotra, R., Tyson, D.W., Rosevear, H.M. and Brosius, F.C., 3rd Hypoxia-inducible factor-1alpha is a critical mediator of hypoxia induced apoptosis in cardiac H9c2 and kidney epithelial HK-2 cells. **BMC Cardiovasc Disord**. 8 (2008) 9.
42. Yanyan, C., Guoxian, Q., Yang, G. and Leting, W. Mechanism of hypoxia-induced factor 1alpha expression in endothelial cells of the human umbilical vein and its induction of apoptosis. **Mol Biol Rep**. 35 (2008) 285-290.
43. Krick, S., Eul, B.G., Hanze, J., Savai, R., Grimminger, F., Seeger, W. and Rose, F. Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells. **Am J Respir Cell Mol Biol**. 32 (2005) 395-403.
44. Chae, H.J., Kim, S.C., Han, K.S., Chae, S.W., An, N.H., Kim, H.M., Kim, H.H., Lee, Z.H. and Kim, H.R. Hypoxia induces apoptosis by caspase activation accompanying cytochrome C release from mitochondria in MC3T3E1 osteoblasts. p38 MAPK is related in hypoxia-induced apoptosis. **Immunopharmacol Immunotoxicol**. 23 (2001) 133-152.
45. Bensellam, M., Maxwell, E.L., Chan, J.Y., Luzuriaga, J., West, P.K., Jonas, J.C., Gunton, J.E. and Laybutt, D.R. Hypoxia reduces ER-to-Golgi protein trafficking and increases cell death by inhibiting the adaptive unfolded protein response in mouse beta cells. **Diabetologia**. 59 (2016) 1492-1502.
46. Wouters, B.G. and Koritzinsky, M. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. **Nature Reviews Cancer**. 8 (2008) 851-864.
47. Maamoun, H., Benameur, T., Pintus, G., Munusamy, S. and Agouni, A. Crosstalk Between Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum (ER) Stress in Endothelial Dysfunction and Aberrant Angiogenesis Associated With Diabetes: A Focus on the Protective Roles of Heme Oxygenase (HO)-1. **Frontiers in Physiology**. 10 (2019).
48. Martinez, J.A. and Banerjee, D.K. Tunicamycin inhibits angiogenesis by ER stress. **Glycobiology**. 10 (2000) 1131-1131.
49. Chiang, C.K., Nangaku, M., Tanaka, T., Iwawaki, T. and Inagi, R. Endoplasmic reticulum stress signal impairs erythropoietin production: a role for ATF4. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**. 304 (2013) C342-C353.
50. Manalo, R.V.M. Anastasis and the ER stress response: Solving the paradox of the unfolded protein response in cancer. **Medical Hypotheses**. 109 (2017) 25-27.
51. Vandewynckel, Y.P., Laukens, D., Geerts, A., Bogaerts, E., Paridaens, A., Verhelst, X., Janssens, S., Heindryckx, F. and Van Vlierberghe, H. The Paradox of the Unfolded Protein Response in Cancer. **Anticancer Research**. 33 (2013) 4683-4694.
52. Petrillo, S., Chiabrando, D., Genova, T., Fiorito, V., Ingoglia, G., Vinchi, F., Mussano, F., Carossa, S., Silengo, L., Altruda, F., Merlo, G.R., Munaron, L. and Tolosano, E.

- Heme accumulation in endothelial cells impairs angiogenesis by triggering paraptosis. **Cell Death Differ.** 25 (2018) 573-588.
53. 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.
54. 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.
55. 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.
56. Bartoszewski, R., Rab, A., Fu, L., Bartoszewska, S., Collawn, J. and Bebok, Z. CFTR expression regulation by the unfolded protein response. **Methods Enzymol.** 491 (2011) 3-24.
57. 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.
58. Bartoszewski, R., Rab, A., Jurkuvenaite, A., Mazur, M., Wakefield, J., Collawn, J.F. and Bebok, Z. Activation of the unfolded protein response by deltaF508 CFTR. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 39 (2008) 448-457.
59. Bartoszewski, R., Rab, A., Twitty, G., Stevenson, L., Fortenberry, J., Piotrowski, A., Dumanski, J.P. and Bebok, Z. The mechanism of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator transcriptional repression during the unfolded protein response. **J Biol Chem.** 283 (2008) 12154-12165.
60. Gillen, A.E., Gosalia, N., Leir, S.H. and Harris, A. MicroRNA regulation of expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. **Biochemical Journal.** 438 (2011) 25-32.
61. Zheng, W., Kuhlicke, J., Jackel, K., Eltzschig, H.K., Singh, A., Sjoblom, M., Riederer, B., Weinhold, C., Seidler, U., Colgan, S.P. and Karhausen, J. Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)-mediated repression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in the intestinal epithelium. **FASEB J.** 23 (2009) 204-213.

Sylwia Bartoszewska