

Tytuł rozprawy

Udział fibroblastycznych czynników wzrostu 1 i 2 (FGF1 i FGF2) w procesie apoptozy

Streszczenie

Fibroblastyczne czynniki wzrostu 1 i 2 (FGF1 i FGF2) należą do rodziny białkowej, w skład której wchodzi 22 białka kręgowców. Białka z rodziny fibroblastycznych czynników wzrostu są zaangażowane w wiele procesów fizjologicznych, w tym rozwój embrionalny, gojenie ran czy angiogenezę. Egzogenne czynniki FGF1 i FGF2 wiążą się do specyficznych receptorów (FGFR) na powierzchni komórek, aktywując wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe, zależne od: fosfolipazy C γ i kinazy białkowej C (szlak PLC γ /PKC), kinazy fosfatidyloinozytolu i kinazy Akt (szlak PI3K/Akt), a także białka Ras i kaskady kinaz aktywowanych przez sygnały mitogenne (szlak Ras/MAPK). Aktywacja receptorów przez fibroblastyczne czynniki wzrostowe powoduje proliferację, migrację i różnicowanie wielu typów komórek. Białka FGF1 i FGF2 ulegają endocytozie w kompleksie z FGFR, a następnie są one translokowane przez błonę endosomalną do cytozolu i jądra komórkowego. Jest to unikalny proces, który zaobserwowano dla zaledwie kilku białek. Pomimo wielu lat badań, rola translokowanych białek FGF1 i FGF2 we wnętrzu komórki jest nieznana. Proces translokacji nie zachodzi konstytutywnie, lecz jest indukowany przez czynniki stresowe, takie jak brak czynników wzrostowych czy stres oksydacyjny. Co ciekawe, endogenne białka FGF1 i FGF2 obecne w jądrze komórkowym mogą pełnić funkcję antyapoptotyczną. Ponadto, zidentyfikowano szereg białek zaangażowanych w proces apoptozy, potencjalnie wiążących FGF1 i FGF2. Sugeruje to udział wewnątrz-komórkowych FGF1 i FGF2 w procesach związanych z przeżywalnością komórek.

Celem niniejszej pracy była weryfikacja hipotezy o wpływie translokowanych do cytozolu i jądra komórkowego białek FGF1 i FGF2 na proces apoptozy.

Przy pomocy techniki *pull-down* oraz powierzchniowego rezonansu plazmonowego potwierdzono oddziaływanie FGF1 i FGF2 z białkami: p53, MDM2, PCAF, UACA, Sirt1 i CDK4. Uzyskane wyniki wskazują możliwość tworzenia

kompleksów przez FGF1 i FGF2 z wymienionymi białkami, sugerując wpływ badanych czynników wzrostowych na przeżywalność komórek.

Sprawdzono, czy egzogenne białka FGF1 i FGF2 wpływają na proces apoptozy. Apoptozę badano przy pomocy dwóch ilościowych metod (barwienia aneksyną V i 7AAD, a także pomiarów aktywności kaspaz w stosunku do żywotności) oraz obrazowania komórek w mikroskopii świetlnej. W celu rozdzielenia efektu biologicznego translokacji czynników wzrostowych do cytozolu i jądra komórkowego od aktywacji receptorów FGF, eksperymenty przeprowadzono przy użyciu inhibitorów aktywności kinazowej FGFR. Zaobserwowano hamowanie procesu apoptozy w komórkach NIH 3T3, indukowanej głodem w nieobecności surowicy, przez egzogenne FGF1 i FGF2. Zauważono również antyapoptotyczny wpływ egzogennych FGF1 i FGF2 na komórki BJ i NIH 3T3 przy indukcji apoptozy staurosporyną. Ponadto obserwowano hamowanie apoptozy w obecności egzogennych FGF1 i FGF2, po indukcji apoptozy w komórkach NIH 3T3 przy pomocy aktywatorów białka p53 (NSC348884 lub tenowiny-6).

Aby zweryfikować, czy za antyapoptotyczną aktywność egzogennych FGF1 i FGF2, w obecności inhibitorów aktywności kinazowej FGFR, odpowiadają translokowane do wnętrza komórki czynniki wzrostowe, wykonano eksperymenty z użyciem substancji blokujących translokację FGF1 i FGF2 z endosomów do cytozolu (a w konsekwencji do jądra komórkowego): geldanamycyny, radisikolu, SB203580 i bafylomycyny A1. W obecności wymienionych inhibitorów i jednoczesnym zahamowaniu aktywności FGFR nie obserwowano antyapoptotycznego wpływu egzogennych FGF1 i FGF2. Ponadto, przeprowadzono eksperymenty z użyciem monenzyny, która znosi blokujący translokację wpływ bafylomycyny A1. W obecności bafylomycyny A1 i monenzyny obserwowano hamowanie apoptozy przez egzogenne FGF2. Otrzymane wyniki wskazują, że antyapoptotyczna aktywność egzogennych FGF1 i FGF2 jest związana z obecnością tych czynników wzrostowych w cytozolu i jądrze komórkowym, na skutek translokacji.

Dodatkowo wykazano, że endogenne FGF1 i FGF2, produkowane w transfekowanych komórkach HEK 293 i U2OS, hamują apoptozę indukowaną przez staurosporynę. Potwierdza to, że obecne wewnątrz komórki FGF1 i FGF2 wykazują antyapoptotyczną aktywność.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy pokazują, że translokacja FGF1 i FGF2 z przestrzeni zewnątrzkomórkowej do cytozolu i jądra komórkowego powoduje

zahamowanie apoptozy indukowanej różnymi czynnikami. Biorąc pod uwagę, że translokacja FGF1 i FGF2 jest stymulowana warunkami stresowymi, można postulować hipotezę, że rolą translokacji tych białek do cytozolu i jądra komórkowego jest zwiększenie przeżywalności komórek w niekorzystnych warunkach.