

**Joanna Bober**

## **Wewnątrzkomórkowe białka partnerskie czynnika wzrostu fibroblastów 1 (FGF1)**

### STRESZCZENIE

Białko FGF1 jest jednym z najlepiej opisanych przedstawicieli rodziny fibroblastycznych czynników wzrostu. Działa mitogennie na wiele komórek, indukując syntezę DNA, oraz bierze udział w takich procesach, jak stymulacja migracji komórek, angiogeneza czy gojenie ran. FGF1 przekazuje sygnał do komórki poprzez specyficzne receptory FGF (FGFR1-4), należące do rodziny receptorowych kinaz tyrozynowych. Aktywacja receptorów prowadzi w efekcie do uruchomienia trzech głównych kaskad sygnałowych: PLC $\gamma$ /PKC, PI3K/Akt i Ras/MAPK, które pośredniczą w szerokim zakresie odpowiedzi komórkowych, w tym: przeżywalności komórki, ruchliwości, proliferacji, różnicowaniu i apoptozie.

Unikalną, na tle innych czynników wzrostu, cechą białka FGF1 jest translokacja do cytozolu i jądra komórkowego. Na podstawie dotychczasowych badań ustalono, że FGF1 ulega transportowi przez błonę komórkową na drodze endocytozy po związaniu do jednego z dwóch specyficznych receptorów FGF (FGFR1 i FGFR4). Translokacja z endosomów do cytozolu wymaga aktywności kilku białek, takich jak: PI3K, kinaza p38 i HSP90, oraz występowania potencjału błonowego generowanego przez pompy protonowe.

Translokacja FGF1 jest zjawiskiem częściowo opisanym, ale przyczyna, dla której do niej dochodzi nie została jeszcze wyjaśniona. Jednym ze sposobów na poznanie funkcji wewnątrzkomórkowego czynnika wzrostu jest identyfikacja jego wewnątrzkomórkowych białek partnerskich, co było głównym celem niniejszej pracy.

W przedstawionych badaniach zastosowano następujące metody identyfikacji białek partnerskich: drożdżowy system dwuhybrydowy (Y2H), a także dwa rodzaje analiz kompleksów białkowych z wykorzystaniem spektrometrii mas (MS). Ostatecznie zidentyfikowano 20 nowych wewnątrzkomórkowych białek partnerskich oddziałujących z FGF1. Dla wybranych białek potwierdzono ich bezpośrednie oddziaływanie z FGF1 za pomocą techniki *Western blot* oraz pomiarów powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR). Analiza wykazała, że aż połowa z 20 otrzymanych białek zaangażowana jest w procesy związane z żywotnością komórki: apoptozę, proliferację i regulację cyklu komórkowego, co pozwoliło po raz pierwszy zaproponować rolę wewnątrzkomórkowego FGF1.

Hipotezę tę poddano weryfikacji, dołączając do badań białko FGF2, należące do tej samej podrodziny kanonicznych białek FGF co FGF1. Potwierdzono, że egzogenne FGF1 i FGF2 dodane do hodowli komórek fibroblastycznych w obecności specyficznych inhibitorów aktywności kinazowej FGFR (PD173074 lub SU5402) hamują apoptozę wywołaną głodem, staurosporyną oraz aktywatorami białka p53 (tenowiną-6 i NSC348884). Zastosowanie szeregu inhibitorów procesu translokacji (geldanamycyny, radisikolu, SB203580 oraz bafylomycyny A1) potwierdziło, że działanie antyapoptotyczne FGF1 i FGF2 jest konsekwencją ich translokacji do wnętrza komórki.

Analizując funkcje, w jakie zaangażowane są zidentyfikowane białka partnerskie FGF1, zwrócono szczególną uwagę na białko, które może być zaangażowane w proces translokacji – nukleolinę, biorącą udział w transporcie jądrowo-cytoplazmatycznym. Przeprowadzone badania pokazały, że nukleolina jest niezbędna do fosforylacji FGF1 przez kinazę PKC $\delta$  w jądrze komórkowym, co jest kluczowym sygnałem wydzielania FGF1 z jądra do cytozolu.

Podsumowując, w niniejszej pracy zidentyfikowano 20 nowych wewnątrzkomórkowych partnerów białka FGF1. Analizując oddziaływanie jednego z nich, nukleoliny, z FGF1 częściowo wyjaśniono mechanizm eksportu czynnika wzrostu z jądra komórkowego. Co istotne, ustalono, że translokacja obu czynników wzrostu, FGF1 i FGF2, dostarcza, zupełnie niezależny od aktywacji receptora FGF, sygnał, który chroni komórkę przed apoptozą i sprzyja jej przeżyciu w warunkach stresowych.