

## „Analiza wewnątrzkomórkowej antyapoptotycznej aktywności fibroblastycznych czynników wzrostowych 1 i 2 (FGF1 i FGF2)”

FGF1 i FGF2 to białka należące do rodziny czynników wzrostu fibroblastów. U kręgowców rodzina ta składa się z 22 homologicznych pod względem sekwencji aminokwasowej białek. Czynniki te posiadają dobrze zachowany ewolucyjnie rdzeń składający się z 6 identycznych i 28 wysoce zachowanych reszt aminokwasowych [Itoh, 2007]. W dorosłym organizmie czynniki wzrostu fibroblastów pełnią funkcję czynników homeostatycznych. Uczestniczą w różnorodnych procesach, jak: rozwój, różnicowanie i proliferacja komórek. Są również niezbędne w procesie angiogenezy. Dodatkowo pełnią funkcję w regeneracji tkanek i uczestniczą w reakcjach na zranienie. W niektórych przypadkach mogą się jednak przyczynić do rozwoju nowotworu [Umemori et al., 2009]. Czynniki wzrostu fibroblastów 1 i 2 mogą wpływać na komórki docelowe poprzez specyficzne wiązanie i aktywację receptorów FGF obecnych na powierzchni komórek - FGFR (ang. *fibroblast growth factor receptor*). Jest to podrodzina powierzchniowych receptorów o aktywności kinaz tyrozynowych. FGF łączy się z receptorem i elementami macierzy zewnątrzkomórkowej, jak np. siarczan heparanu [Lemaitre et al., 1995; Zhang et al., 2001] i aktywuje wewnątrzkomórkowe ścieżki przekazywania sygnałów: szlak PLC $\gamma$ /PKC, szlak PI3K/Akt, a także szlak Ras/MAPK [Lemaitre et al., 1995]. FGF1 i FGF2 w kompleksie z receptorem ulegają endocytozie do wnętrza komórki i translokacji do cytozolu i jądra komórkowego [Zakrzewska et al., 2011]. To unikalny proces, który jest aktywowany czynnikami stresowymi [Sorensen et al., 2006]. Pomimo wielu lat badań nie odkryto dotychczas, jaką rolę w komórce pełnią te dwa czynniki wzrostowe. Badania przeprowadzone w Zakładzie Inżynierii Białka oraz Zakładzie Biotechnologii Białek UW. wykazały, że translokowane do wnętrza komórek FGF1 i FGF2 posiadają właściwości antyapoptotyczne [Kostaś et al., 2018] i oddziałują z białkami zaangażowanymi w proces zaprogramowanej śmierci komórek [Bober et al., 2016].

Celem niniejszej pracy była analiza wewnątrzkomórkowej antyapoptotycznej aktywności FGF1 i FGF2.

Przy pomocy techniki powierzchniowego rezonansu plazmonowego wyznaczono miejsca na powierzchni cząsteczki FGF2 zaangażowane w wiązanie partnerów wewnątrzkomórkowych: p53, MDM2, PCAF, UACA, SIRT1, CDK4, MYL9, nukleolina i Hsp90. Uzyskane wyniki potwierdzają możliwość tworzenia kompleksów przez FGF1 i FGF2 ze wspomnianymi białkami, sugerując wpływ tych czynników na przeżywalność komórek.

Zaobserwowano, że fosforylacja białka FGF1 przez PKC $\delta$ , i będący jej konsekwencją eksport z jądra komórkowego może mieć wpływ na antyapoptotyczne właściwości tego białka. Czynniki FGF2, który nie podlega fosforylacji i dłużej pozostaje w jądrze komórkowym charakteryzuje się większą zdolnością do hamowania procesu apoptozy niż FGF1. Uzyskane wyniki pokazują, że warianty mutacyjne białka FGF1, które nie oddziałują z nukleoliną i nie są eksportowane z jądra komórkowego do cytoplazmy wykazują większą zdolność do zwiększania żywotności komórek niż FGF1 typu dzikiego. Jednocześnie, warianty mutacyjne białka FGF2 o zaburzonym wiązaniu do nukleoliny charakteryzują się podobną antyapoptotyczną aktywnością co typ dziki białka.

Wykazano, że FGF1 i FGF2 hamują apoptozę przebiegającą na drodze szlaku zewnętrznego (zależnego od receptorów śmierci) i wewnętrznego (zależnego od mitochondrium), nie wpływają natomiast na szlak zależny od stresu ER.

Dane otrzymane po "wyciszeniu" ekspresji białek biorących udział w imporcie FGF1 i FGF2 do jądra komórkowego (LRRC59 i translokiny), wskazują na to, że oddziaływanie z nimi jest konieczne do zachowania antyapoptotycznych właściwości FGF1 i FGF2. Ponadto, przeprowadzono eksperymenty, w których wyciszono ekspresję wybranych białek partnerskich i zaobserwowano, że najprawdopodobniej oddziaływanie z sirtuiną1, nukleoliną i nukleofosminą nie warunkuje właściwości antyapoptotycznych badanych fibroblastycznych czynników wzrostowych.

Wyniki uzyskane w prowadzonych eksperymentach potwierdzają tezę, że import FGF1 i FGF2 do jądra komórkowego powoduje zahamowanie apoptozy komórek NIH 3T3 przebiegającej za pośrednictwem szlaku zewnętrznego i wewnętrznego.