

Trzustka jest narządem składającym się z dwóch głównych części: zewnątrzwydzielniczej, która wytwarza enzymy trawienne, oraz wewnątrzwydzielniczej (endokrynną), w której wyspecjalizowane komórki współpracują ze sobą w celu regulacji poziomu glukozy we krwi. Kiedy komórki endokrynną, szczególnie komórki  $\beta$  produkujące insulinę nie działają prawidłowo albo zostaną utracone, wynikająca z tego choroba nazywana jest cukrzycą. Ukierunkowane różnicowanie *in vitro* to proces, w którym kierujemy ludzkimi pluripotencjalnymi komórkami macierzystymi (IPKM) tak, aby stały się różnymi rodzajami dojrzałych komórek. Naszym celem są komórki prekursorowe trzustki i komórki  $\beta$  produkujące insulinę. Różnicowanie *in vitro* jest obiecującym narzędziem medycyny regeneracyjnej do badania przyczyn i nowych możliwości leczenia cukrzycy. Takie podejście pozwala również na badanie procesów rozwojowych w kontekście człowieka, przewyższając etyczne ograniczenia wykorzystywania tkanek płodowych do celów badawczych. W ciągu ostatniej dekady protokoły różnicowania IPKM w kierunku komórek trzustki zostały udoskonalone i obecnie dają solidne i wiarygodne wyniki. Ostatecznym celem jest uzyskanie funkcjonalnych komórek  $\beta$  z IPKM, które mogłyby potencjalnie zostać przeszczepione osobom z cukrzycą. Pomimo znacznego postępu komórki  $\beta$  pochodzące z IPKM nie są szeroko stosowane w klinikach i badaniach z powodu niepełnego zrozumienia sygnałów i czynników kontrolujących powstawanie komórek  $\beta$ . Dlatego tak ważne jest zrozumienie procesów rozwojowych trzustki, gdyż wiedza ta może zostać przełożona na generowanie funkcjonalnych ludzkich komórek  $\beta$  *in vitro*.

Na podstawie istniejącej literatury i wstępnych danych wysuwam hipotezę, że FKBP2:

- odgrywa znaczącą rolę w dojrzewaniu ludzkiej insuliny w komórkach  $\beta$
- reguluje powstawanie komórek  $\beta$  *in vitro*, ponieważ zidentyfikowaliśmy ekspresję FKBP2 nie tylko w komórkach  $\beta$ , ale także w ich komórkach prekursorowych
- wpływa na sieć retikulum endoplazmatycznego (ER), aparat Golgiego i macierz zewnątrzkomórkową (ECM)

Aby przetestować te hipotezy, wygenerowałam linię IPKM z wyłączoną ekspresją genu FKBP2 (knockout (KO)). Po zróżnicowaniu tych komórek w komórki  $\beta$  zaobserwowałam zmiany w fizjologii komórki oraz dojrzewaniu insuliny. Dojrzewanie insuliny to proces polegający na zwijaniu i cięciu łańcucha białkowego w celu uzyskania odpowiedniego kształtu, który jest niezbędny do funkcjonowania insuliny. Korzystając z platformy różnicowania IPKM, chcę wyjaśnić zmiany molekularne zachodzące w komórkach z niedoborem FKBP2 i ich znaczenie dla rozwoju i funkcji ludzkich komórek  $\beta$ . Projekt będzie realizowany poprzez następujące cele:

1. Zbadam szczegółowo, w jaki sposób FKBP2 wpływa na powstawanie ludzkich komórek  $\beta$  trzustki *in vitro*.
2. Zbadam, jak FKBP2 wpływa na dojrzewanie i wydzielanie insuliny zarówno *in vitro* (w komórkach  $\beta$  pochodzących z IPKM), jak i *in vivo* (na modelu mysim). Przeanalizuję poziom insuliny i produktów ubocznych dojrzewania insuliny, proinsuliny i c-peptydu, oraz ich lokalizację w komórkach. Ponieważ stwierdziliśmy ekspresję FKBP2 w prekursorach komórek  $\beta$ , musimy rozróżnić wpływ niedoboru FKBP2 na tworzenie komórek  $\beta$  i dojrzewanie insuliny. W tym celu wykonam indukowalny KO, aby umożliwić naturalną ekspresję FKBP2 w prekursorach komórek  $\beta$ , ale wyłączyć ekspresję FKBP2 w już utworzonych komórkach  $\beta$ . Ponadto sprawdzę funkcjonalność komórek  $\beta$  *in vitro* poprzez indukcję uwalniania insuliny w odpowiedzi na glukozę w komórkach  $\beta$  pochodzących z IPKM. Na koniec przeszczepię komórki  $\beta$  pochodzące z IPKM myszom z cukrzycą, aby sprawdzić, czy mogą one wytwarzać wystarczającą ilość dojrzałej insuliny, aby cofnąć cukrzycę.
3. Sprawdzę, jakie zmiany molekularne leżą u podstaw nieprawidłowego dojrzewania insuliny w FKBP2 KO. Korzystając z sekwencjonowania RNA pojedynczych komórek, przeanalizuję różnice w ekspresji genów między FKBP2 KO a kontrolą, koncentrując się na ER, aparacie Golgiego, macierzy pozakomórkowej, rozwoju komórek  $\beta$  i dojrzewaniu insuliny.

Poprzez to kompleksowe badanie mam na celu pogłębienie naszej wiedzy na temat roli odgrywanej przez FKBP2 w rozwoju trzustki i funkcji komórek  $\beta$ , rzucając światło na jego potencjalne zastosowanie terapeutyczne w leczeniu cukrzycy.