

Poznań, 06.11.2025r.

dr hab. Agnieszka Fiszer

Zakład Biotechnologii Medycznej

ICHB PAN w Poznaniu

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Edyty Urbaniak p.t.:
„Rola FKBP2 w fałdowaniu proinsuliny i powstawaniu komórek β trzustki
zróżnicowanych z ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych”**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana w Laboratorium Komórek Macierzystych Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod opieką prof. UAM dr. hab. Małgorzaty Borowiak. Rozprawa jest przygotowana na podstawie zbioru powiązanych tematycznie artykułów naukowych, a dokładnie zawiera dwie opublikowane prace przeglądowe oraz manuskrypt pracy eksperymentalnej, dostępnej obecnie jako tzw. *pre-print*. We wszystkich artykułach udział Doktorantki jest wiodący (w jednej z prac przeglądowych pierwsze autorstwo jest współdzielone).

Tematyka pracy jest związana z identyfikacją molekularnych czynników oraz procesów komórkowych kluczowych dla prawidłowego działania komórek β trzustki, w kontekście nieprawidłowego funkcjonowania tych komórek w przypadku cukrzycy. Identyfikacja oraz analiza funkcjonalna genów zaangażowanych w prawidłowe różnicowanie komórek β oraz wydzielanie insuliny na odpowiednim poziomie, stanowi niewątpliwie istotny problem badawczy. Cukrzyca, w szczególności typu 2, jest powszechną chorobą, stanowiącą ważny problem medyczny i społeczny. Głębsze poznanie mechanizmów molekularnych prowadzących do zaburzenia funkcjonowania komórek β , może przyczynić się do skuteczniejszego i wcześniejszego rozpoznania choroby oraz opracowania lepszego leczenia.

Rozprawa została przygotowana w języku polskim oraz angielskim. Jej układ jest bardzo logiczny. Dla czytelności zawartości umieszczono najpierw spis treści, streszczenie, wykaz prac wchodzących w skład rozprawy oraz listę skrótów. Następnie przedstawiono wstęp, cele badawcze, szczegółowe założenia badawcze, najważniejsze ustalenia rozprawy doktorskiej oraz dyskusję i wnioski z przeprowadzonych badań. Zagadnienia w części są bardzo klarownie przedstawione, opisane bardzo poprawnie jeśli chodzi o język naukowy i na odpowiednio wyważonym poziomie szczegółowości. Ogólnie uważam, że rozprawa została przygotowana bardzo starannie i jednocześnie w przygotowanych tekstach widoczna jest ciekawość i dojrzałość naukowa Doktorantki. W dalszych częściach rozprawy załączono oświadczenia Doktorantki oraz współautorów o wkładzie w powstanie artykułów naukowych, informację o finansowaniu badań

oraz wykaz dodatkowych publikacji Doktorantki i spis referencji cytowanych w rozprawie. Na końcu załączono artykuły wchodzące w skład rozprawy.

Artykuł 1: Diabetes and SARS-CoV-2-Is There a Mutual Connection?

Jedrzejak AP*, Urbaniak EK*, Wasko JA*, Ziojła N, Borowiak M.

Front Cell Dev Biol. 2022 Jun 13;10:913305.

Pierwsza przedstawiona praca to obszerny artykuł przeglądowy, w którym Doktorantka jest pierwszym równorzędnym autorem. W publikacji tej tematyka badań prowadzonych w zespole została odniesiona do aspektów molekularnych i komórkowych związanych z zakażeniem wirusem SARS-CoV-2. Jest to powiązanie uzasadnione ze względu na podwyższone ryzyko ciężkiego przebiegu COVID-19 u osób z cukrzycą, oraz ryzykiem rozwoju cukrzycy w wyniku zakażenia SARS-CoV-2.

Opracowano obszerne tabele zbierające statystyki związane z hospitalizacją i śmiertelnością pacjentów z COVID-19 z rozdzieleniem na przypadki, gdzie pacjenci również chorowali na cukrzycę, jak i podsumowanie opublikowanych danych klinicznych dla przypadków cukrzycy po zakażeniu SARS-CoV-2. Wartościowe są zebrane informacje na temat potencjalnego wnikania wirusa SARS-CoV-2 do różnych typów komórek trzustki, jak i efektów na poziomie molekularnym, jakie mogą być wywoływane. Na początku listopada br. artykuł ma osiem cytowań (wg Web of Science, Core Collection).

Artykuł 2: Molecular puzzle of insulin: structural assembly pathways and their role in diabetes.

Urbaniak E, Henry S, Lalowski M, Borowiak M.

Front Cell Dev Biol. 2025 Feb 20;13:1502469.

Druga praca to publikacja przeglądowa, gdzie Doktorantka jest pierwszym autorem. Jest to obszerna praca, w której przedstawiono zagadnienia związane z dojrzewaniem insuliny w komórkach β trzustki, w nawiązaniu do zaburzeń fałdowania proinsuliny, co może prowadzić do rozwoju cukrzycy. Na uwagę zasługuje też sześć umieszczonych w publikacji, bardzo przejrzystych rycin, na których przedstawiono schematycznie wybrane ścieżki molekularne związane m.in. z dojrzewaniem insuliny i stresem retikulum endoplazmatycznego (ER). Publikację kończy przedstawiona graficznie hipoteza co do powiązania zaburzeń w ER i aparacie Golgiego z nieprawidłowym fałdowaniem proinsuliny.

Z racji mojego zainteresowania RNA, zastanowiło mnie czy również znane są zaburzenia dojrzewania mRNA kodującego insulinę – co dla różnych przypadków mogłoby prowadzić m.in. do powstawania нефункционального białka lub białka o znacząco pogorszonym działaniu, czy utrudnionym fałdowaniu. W suplementarnej tabeli omawianego artykułu zebrano informacje o mutacjach skutkujących zmianami aminokwasu w insulinie i w ten sposób indukującymi stres ER i prowadzącymi do rozwoju cukrzycy. Czy znane są również czynniki (np. mutacje w genie insuliny czy innych genach) prowadzące do zaburzeń w dojrzewaniu mRNA i mogące prowadzić do cukrzycy?

Artykuł 3: ER stress and cell fate: FKBP2 regulates proinsulin folding and α - vs. β cell differentiation via NFAT and HDAC9

Urbaniak E, Baginska M, Szlachcic WJ, Grabowska M, Shcheglova E, Jankowski A, Marzec MT, and Borowiak M.

bioRxiv 2025

Główny artykuł, w którym są przedstawione wyniki badań opisanych w rozprawie doktorskiej, to obszerna praca eksperymentalna, w której Doktorantka jest pierwszym autorem. Problem badawczy Doktorantki dotyczył roli genu *FKBP2* w procesie różnicowania komórek β trzustki i powstawaniu insuliny, co postanowiono zbadać z wykorzystaniem ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych (hPSC). Gen *FKBP2* koduje peptydylo-prolyl cis-trans izomerazę 2, białko z grupy izomeraz peptydylo-prolilowych, które katalizują izomeryzację między formami cis i trans wiązań peptydowych wokół reszty prolilowej. Relacja ta jest istotna dla prawidłowego fałdowania białek. Hipoteza badawcza Doktorantki zakładała, że białko FKBP2 uczestniczy w prawidłowym fałdowaniu proinsuliny w komórkach ludzkich, a w przypadku braku tego białka dochodzi do aktywacji stresu ER i istotnych zmian w różnicowaniu w kierunku komórek β .

Podjęte badania mają ścisły związek z mechanizmami molekularnymi stojącymi u podłoża cukrzycy typu 2, polegającymi na deregulacji systemów odpowiedzialnych za proteostazę w komórkach β . Długotrwałe zaburzenia homeostazy ER mogą prowadzić do akumulacji nieprawidłowo sfałdowanej proinsuliny, co w konsekwencji zaburza produkcję insuliny. Dodatkowo stres ER może prowadzić do apoptozy komórek β . Wybór genu *FKBP2* był uzasadniony m.in. wynikami badań w komórkach szczurzych, opublikowanych w artykule, gdzie Doktorantka jest także współautorem (Hoefner, C. *et al.* 2023, publikacja, która wchodzi w skład dodatkowego dorobku Doktorantki). Obserwowano również podwyższony poziom ekspresji *FKBP2* w komórkach α i β trzustki.

Na uwagę zasługuje wybrany model badawczy ludzkich komórek hPSC. Ze względu na możliwości różnicowania do wielu typów komórek, jest to model o olbrzymim potencjale w modelowaniu chorób, jak i dla zrozumienia procesów różnicowania. Uzasadnione jest wykorzystanie tego modelu do analizowania czynników kluczowych w procesie różnicowania w kierunku komórek β trzustki oraz opisanie zaburzonych procesów, które mogą prowadzić do rozwinięcia cukrzycy. Doktorantka we wstępie przejrzystości przedstawiła kluczowe etapy różnicowania hESC do komórek β , jak i podsumowała aktualną wiedzę na temat czynników mających kluczowy wpływ na to różnicowanie. Ciekawie zostały opisane „wyzwania” jakie stoją przed komórkami β w związku z bardzo intensywną produkcją insuliny i etapami jej dojrzewania i fałdowania. Jednym z istotnych procesów jest izomeryzacja reszt proliny, która ma znaczenie dla prawidłowej struktury insuliny.

Cel badań i hipotezy badawcze są jasno sformułowane. Dla zbadania roli białka FKBP2 w procesach różnicowania do komórek β oraz w prawidłowym powstawaniu insuliny, Doktorantka postawiła hipotezy zakładające, że (I) „FKBP2 uczestniczy w prawidłowym fałdowaniu proinsuliny w ER”, (II) „FKBP2 odgrywa rolę regulatora rozwoju komórek endokrynnych”, oraz (III) „Efekty rozwojowe i strukturalno-funkcjonalne wynikające z wycięcia genu *FKBP2* mogą być od siebie

niezależne". Do weryfikacji hipotez wykorzystano trzy modele oparte na hPSC ze zmienioną ekspresją genu *FKBP2*: klasyczny *knock-out* (KO), nadekspresję oraz indukowany *knock-out* (iKO).

Rozdział rozprawy „Założenia badawcze i ich charakterystyka” przedstawia główne założenia co do opracowanych modeli, wykorzystywanych metod i wykonanych analiz. To wartościowa część rozprawy pozwalająca wstępnie poznać stosowany warsztat, cele wykonania poszczególnych eksperymentów i podejście do analizy wyników.

Wyniki badań Doktorantki są przedstawione w rozdziale „Najważniejsze ustalenia rozprawy doktorskiej”. W przeprowadzonych badaniach potwierdzono najpierw ekspresję genu *FKBP2* w komórkach β ludzkiej dorosłej trzustce, na poziomie białka metodą immunofluorescencji oraz na poziomie RNA na podstawie dostępnych danych sekwencjonowania RNA z pojedynczych komórek (scRNA-seq). Następnie Doktorantka przeszła do modelu hESC i różnicowania tej linii do komórek β . Po potwierdzeniu prawidłowego przebiegu różnicowania, wykazano obecność znaczącej ilości białka FKBP2 począwszy od etapu EP (około 3 tygodnie od rozpoczęcia różnicowania). Doktorantka wygenerowała następnie w hESC linię *knock-out* (KO) dla genu *FKBP2* i przeprowadziła jej różnicowanie do komórek β . Zaobserwowano spodziewany spadek w tych komórkach dojrzałej insuliny, przy braku zmiany w poziomie proinsuliny. Indukcja nadekspresji *FKBP2* w modelu KO spowodowała wzrost poziomu dojrzałej insuliny, jak i białka CHGA i peptydu C-PEP, które są markerami w różnicowaniu do komórek β na późniejszych etapach. Następnie analizowano morfologię ziarnistości insulinowych i wykazano ich zwiększoną heterogenność i gęstość, co sugeruje ich nieprawidłowe dojrzewanie.

Dla uzyskanego modelu KO analizowano dane scRNA-seq z komórek w 31 dniu różnicowania do komórek β . Na podstawie sekwencjonowania ponad 5 tys. komórek WT i KO, zidentyfikowano siedem kłastrów komórkowych, o podobnej dystrybucji dla obu linii. Identyfikowano istotne różnice, m.in. spadek liczby komórek β w linii KO, a w obecnych komórkach β zmianę poziomu określonych markerów i czynników, w tym obniżenie ekspresji *HDAC9*, genu kodującego deacetylazę histonową, co będzie jeszcze dokładniej badane w dalszej części pracy.

W modelu KO zidentyfikowano obniżenie ekspresji genów zaangażowanych w fałdowanie białek i funkcjonowanie ER, oraz podwyższenie dla genów związanych z organizacją cytoszkieletu i sygnalizacją wapniową. Co istotne, wskazano na konkretne mechanizmy kompensacyjne, które mogą być uruchamiane w komórkach β KO, aby zrównoważyć zaburzenia proteostazy i zaburzenia w przetwarzaniu proinsuliny. Wg barwienia immunofluorescencyjnego komórki KO mają obniżony poziom dojrzałej insuliny o około 50 %, natomiast jest wspomniane w pracy o spadku o około 70%. Czy to było zbadane inną metodą? W przypadku braku FKBP2 to wspomniane szlaki kompensacyjne mogłyby zapewniać produkcję insuliny na poziomie 30-50%. Czy jednak przy braku peptydylo-propyl cis-trans izomerazy, powstająca insulina jest w pełni funkcjonalna?

Następnie Doktorantka analizowała aktywację stresu ER oraz zaburzenia gospodarki wapniowej, które stwierdzono w modelu KO. Wysłunięto wniosek, że zaburzenia w fałdowaniu insuliny prowadzą do patologicznej kaskady prowadzącej do dysfunkcji komórek β .

W kolejnej części badań, na podstawie analizy ekspresji *FKBP2* w rozwijającej się ludzkiej trzustce, wskazano na potencjalną rolę *FKBP2* w kształtowaniu się komórek endokrynnych. Aby zweryfikować tę hipotezę przeanalizowano poziomy ekspresji markerów różnych etapów różnicowania w komórkach KO i wskazano na zaburzenia różnicowania na etapie EP. Na podstawie wyników scRNA-seq z 21 dnia różnicowania, stwierdzono, że w linii KO dochodzi do zaburzonej równowagi pomiędzy proliferacją, różnicowaniem a dojrzewaniem komórek endokrynnych.

Na podstawie wyników RNA-seq obserwowano inny profil zmiany ekspresji *HDAC9* w 21 i 31 dniu różnicowania linii KO: najpierw poziom był znacząco podwyższony, a następnie silnie obniżony. Jednak analiza poziomu białka wykazała znaczące podwyższenie poziomu *HDAC9* w obu punktach czasowych. Czy próbowano się przyjrzeć pokryciu odczytów dla *HDAC9* z RNA-seq aby spróbować wyjaśnić rozbieżności w uzyskanych wynikach dla poziomu RNA i białka? Czy może są inne możliwości ich wyjaśnienia, biorąc pod uwagę efektywność translacji czy stabilność białka?

Podwyższony poziom *HDAC9* w KO prowadził do zwiększonej lokalizacji w jądrze. Podobny efekt podwyższenia poziomu *HDAC9* osiągnięto poprzez indukcję stresu ER z pomocą DTT w komórkach WT. Zmianę poziomu ekspresji *HDAC9* udało się powiązać z czynnikiem transkrypcyjnym NFAT2. Poziom mRNA *NFAT2* nie ulegał zmianie w linii KO, wykazano jednak podwyższenie poziomu białka - prawdopodobnie jako wynik zmian w gospodarce wapniowej. Dodatkowo wykazano, że inhibicja *HDAC9* nie ma wpływu na poziom *NFAT2* w linii KO, stąd wnioskowano, że to *NFAT2* wpływa na ekspresję *HDAC9*.

Ciekawym ostatnim wątkiem badań było analizowanie efektów wywoływanych brakiem *FKPB2* w dojrzałych już komórkach β – tak, aby oddzielić te efekty od zaburzeń rozwojowych. W tym celu zastosowano indukowalny model KO (iKO), dla którego wyłączenie ekspresji *FKPB2* występowało w 20 dniu różnicowania, kiedy osiągnięty był fenotyp komórek β . W takim układzie, nie obserwowano zmian w poziomie markerów progenitorów endokrynnych. Natomiast wykazano podwyższony poziom czynników wskazujących na stres ER, jak i podwyższony poziom *NFAT2*, co prowadzi do przesunięcia osi różnicowania komórek w kierunku komórek α . Zastanowiło mnie czy rozważano wyłączenie ekspresji *FKPB2* na jeszcze późniejszym etapie różnicowania, już po pełnym zróżnicowaniu endokrynnym? Czy taki model jeszcze dokładniej pozwoliłby zweryfikować trzecią hipotezę badawczą Doktorantki?

Podsumowując, Doktorantka w swoich badaniach wykazała, że *FKBP2*, białko opiekuńcze ER, nie tylko reguluje fałdowanie proinsuliny, ale także, kontroluje powstawanie ludzkich komórek endokrynnych trzustki. Uzyskane obszernie i wielowątkowe wyniki wskazują, że brak *FKBP2* zaburza różnicowanie w kierunku komórek β , i prowadzi do nadmiernej aktywności czynnika transkrypcyjnego *NFAT2* i zaburzeń w działaniu czynnika epigenetycznego *HDAC9*. W konsekwencji, te zaburzenia prowadzą do utraty tożsamości komórek β . Według uzyskanych wyników, jest bardzo prawdopodobne, że występujące w populacji określone warianty sekwencyjne *FKBP2*, wpływające na aktywność białka *FKBP2*, mogą być związane z podatnością na zachorowanie na cukrzycę typu 2.

W zawartej w rozprawie dyskusji Doktorantka podsumowuje wyniki badań i komentuje je w odniesieniu do innych doniesień naukowych opisujących czynniki wpływające na plastyczność

komórek β , czy dodatkowe funkcje FKBP. Ujęte są również zagadnienia nawiązujące do rozwoju terapii i przyszłych kierunków badań. Wnioski z przeprowadzonych badań są również jasno spisane w dziesięcio-punktowym zestawieniu.

Ogólny ciekawy wątek do przedyskutowania podczas obrony rozprawy to podstawy do rozróżniania mechanizmów patologicznych i kompensacyjnych. Ciekawa jestem jak Doktorantka, też na podstawie swoich badań, postrzega możliwości rozróżniania tych mechanizmów, np. czy określona deregulacja może mieć charakter kompensacyjny na określonym etapie różnicowania lub w określonym typie komórek, a już charakter patologiczny w innym?

W podsumowaniu wykonanych przez Doktorantkę badań, na uwagę zasługuje fakt, że w badaniach wykorzystano zaawansowany model badawczy – różnicowane komórki iPSC oraz zastosowano bogaty i nowoczesny warsztat metodyczny. Ponadto, wyniki badań uzyskane podczas różnicowania linii hESC są wspierane analizami z ludzkiej tkanki trzustki (płodowej i dorosłej) na podstawie analizy dostępnych danych i wykonanych dodatkowych eksperymentów. Z zamieszczonych oświadczeń Doktorantki i współautorów artykułu eksperymentalnego jasno wynika, że udział Doktorantki w przeprowadzonych badaniach był wiodący. Inni współautorzy uczestniczyli w wykonywaniu pewnych wąskich zakresów badań.

Badania zostały wykonane w ramach projektów z Narodowego Centrum Nauki, tj. projektów OPUS prof. Borowiak oraz, co także zasługuje na podkreślenie, w ramach projektu PRELUDIUM, kierowanego przez Doktorantkę. Poza trzema artykułami wchodzącymi w skład rozprawy, Doktorantka jest również współautorem dwóch dodatkowych publikacji.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam drobne uwagi, które nie wymagają odnoszenia się podczas obrony, ale mogą być może przydatne dla Doktorantki na przyszłość:

- W kilku miejscach polskiego tekstu nie udało się dopilnować pisowni angielskich słów kursywą. Warto by również uwzględnić to wykazie skrótów.
- Wskazana byłaby w rozdziale wstępu ogólna informacja na temat komórkowej budowy trzustki, jako, że w opisie najważniejszych ustaleń rozprawy Artykułu 1, pojawiają się również komórki przewodowe i zrazikowe.
- Dodatkowej publikacji Doktorantki Hoefner, C. *et al.* 2023, nie określiłabym jako „niezwiązanej z tematyką rozprawy” (choć dotyczy głównie badań na komórkach szczurzych). Uzasadnione jest, że nie została ona włączona do rozprawy, natomiast te dodatkowe artykuły określiłabym jako „niewchodzące w skład rozprawy”.

W podsumowaniu chciałabym podkreślić, że z rozprawa mgr Edyty Urbaniak została przygotowana bardzo starannie i biorąc pod uwagę jej wysoki poziom naukowy, zapoznawałam się z nią przyjemnością i dużym zaciekawieniem. Doktorantka wykazała się wykorzystaniem nowoczesnych technik i zaawansowanego modelu badawczego oraz wykonaniem licznych eksperymentów, które dostarczyły ciekawych odkryć co do procesów molekularnych zachodzących w komórkach β trzustki, jak i zaburzeń tych procesów mogących prowadzić do cukrzycy. Przeprowadzone badania są nowatorskie w kontekście roli białka FKBP2 w rozwoju ludzkich komórek endokrynnych. Dodatkowo, wyniki badań są bardzo czytelnie przedstawione na rycinach.

Z przedstawionej rozprawy i załączonych publikacji wnioskuję, że Doktorantka cechuje się dużym zaangażowaniem w prowadzeniu badań.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Edyty Urbaniak stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdza wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauk biologicznych oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Tak więc, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska całkowicie spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-3 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 r. 1571 z późn. zm.). W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgr Edyty Urbaniak do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Ponadto, zważywszy na wysoką jakość i kompleksowość wykonanych analiz oraz znaczenie uzyskanych wyników dla badań nad cukrzycą, wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

Z poważaniem,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Fisew".