

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2013 – 2014

**Stamcellen in de regeneratieve geneeskunde:
β-cel regeneratie**

door Vanherweghe Kobe

Promotoren: Prof. dr. Christian Burvenich
Drs. Xanthippe Boulougouris

Literatuurstudie in het kader
van de Masterproef

© 2014 *Vanherweghe Kobe*

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten bieden geen enkele garantie met betrekking tot de juistheid of volledigheid van de gegevens vervat in deze masterproef, noch dat de inhoud van deze masterproef geen inbreuk uitmaakt op of aanleiding kan geven tot inbreuken op de rechten van derden.

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten aanvaarden geen aansprakelijkheid of verantwoordelijkheid voor enig gebruik dat door iemand anders wordt gemaakt van de inhoud van de masterproef, noch voor enig vertrouwen dat wordt gesteld in een advies of informatie vervat in de masterproef.

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2013 – 2014

**Stamcellen in de regeneratieve geneeskunde:
β-cel regeneratie**

door Vanherweghe Kobe

Promotoren: Prof. dr. Christian Burvenich
Drs. Xanthippe Boulougouris

Literatuurstudie in het kader
van de Masterproef

© 2014 *Vanherweghe Kobe*

VOORWOORD

Stamcellen in de regeneratieve geneeskunde is voor een student diergeneeskunde niet het meest toegankelijke onderwerp, maar uit nieuwsgierigheid over het gebruik van stamcellen in de kliniek werd mijn interesse gewekt. Het is een zeer breed gebied en ik ben blij dat ik het, als is het maar voor een zeer klein deel, verkend heb. Ik zou graag mijn beide promotoren Xanthippe Boulougouris en Christian Burvenich willen bedanken voor hun input om tot dit werk te komen, en ik bedank ook graag Luc Bouwens van de Universiteit Brussel voor het beschikbaar stellen van zijn artikels.

VOORBLAD	
TITELBLAD	
VOORWOORD	
INHOUDSOPGAVE	
SAMENVATTING	1
INLEIDING.....	2
LITERATUURSTUDIE.....	4
1. STAMCELLEN EN PLASTICITEIT.....	4
2. B-CEL REGENERATIE <i>IN VIVO</i>	7
2.1. CELTYPES IN DE PANCREAS	7
2.2. VAN WAAR KOMEN DE NIEUWE β -CELLEN IN DE PANCREAS?.....	7
3. β -CEL PRODUCTIE <i>IN VITRO</i>	10
3.1. β -CEL PROLIFERATIE <i>IN VITRO</i>	10
3.2 STAMCEL DIFFERENTIATIE OF VERTICAAL REPROGRAMMEREN <i>IN VITRO</i>	11
3.3. TRANSDIFFERENTIATIE OF LATERAAL PROGRAMMEREN <i>IN VITRO</i>	13
4. REGENERATIEVE THERAPIEËN VOOR DIABETES.	16
4.1 STIMULEREN VAN DE ENDOGENE REGENERATIE	16
4.2 REPROGRAMMEREN VAN ADULTE CELLEN <i>IN VIVO</i>	17
4.3. CELTRANSPLANTATIE VAN DE <i>IN VITRO</i> GEPRODUCEERDE β -CEL.....	18
BESPREKING	20
REFERENTIES.....	21

SAMENVATTING

De endocriene pancreas of eilandjes van Langerhans bestaat uit groepjes van cellen die willekeurig verspreid liggen in de pancreas en heeft als voornaamste functie het onderhouden van de glucosehomeostase. De β -cellen binnen het eiland secreteren insuline waardoor de glucoseconcentratie in het bloed zal dalen. De α -cellen secreteren glucagon dat een antagonistisch effect heeft op insuline en zorgt voor een stijging van de glucosespiegels in het bloed. Diabetes of suikerziekte ontstaat wanneer het glucosegehalte in het bloed niet meer binnen de fysiologische grenzen kan gehouden worden. Onafhankelijk van de pathogenese ontstaat zowel bij type 1 als bij type 2 diabetes mellitus een daling in het gehalte β -cellen in het lichaam. De regeneratieve geneeskunde in het kader van diabetes heeft als doel de β -cel populatie in het lichaam te herstellen. Dit kan via transplantatie van β -cellen geproduceerd *in vitro* in het lichaam van de patiënt of via het stimuleren van de endogene regeneratiemechanismen aanwezig in de pancreas.

Het einddoel m.b.t. de celtransplantatie is de productie van een β -cel *in vitro*. Pluripotente stamcellen zijn hiervoor de meest geschikte bron, want door hun onbeperkte proliferatiecapaciteit *in vitro* zijn ze vlot beschikbaar voor elke patiënt. Er bestaan tegenwoordig protocollen voor de *in vitro* differentiatie van pluripotente stamcellen tot β -cellen, maar deze hebben echter nog enkele tekortkomingen. Er ontstaan problemen door het verschil van de *in vivo*- en de *in vitro* niche van de cellen. De directe omgeving van een cel, of ook wel de cel "niche" genoemd, is immers van vitaal belang voor haar functie en eigenschappen.

Naast transplantatietechnieken tracht men ook de endogene regeneratie in de pancreas te induceren of stimuleren. Gedifferentieerde cellen in de adulte pancreas bezitten immers nog een graad van plasticiteit waardoor ze ook kunnen gereprogrammeerd worden tot β -cellen *in vivo*. Het reprogrammeren van de reeds aanwezige cellen in de adulte pancreas is dus een alternatief voor celtransplantatietechnieken.

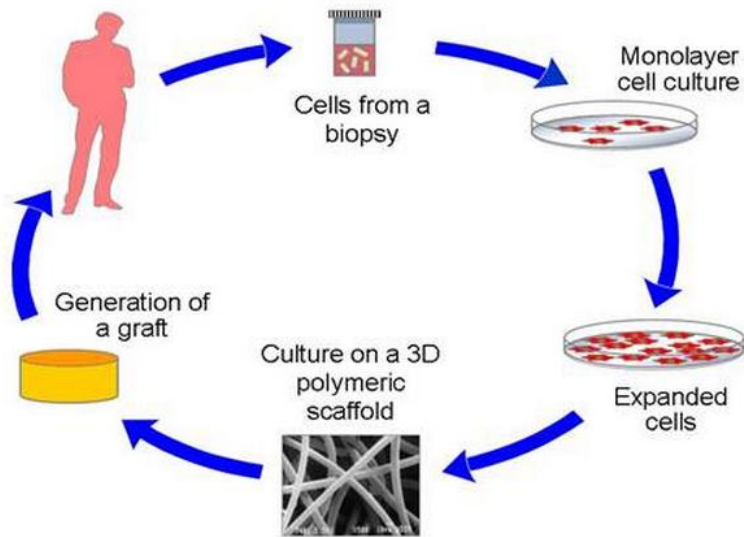
Diabetes-regeneratieve geneeskunde-stamcel-reprogrammeren- β -cel

INLEIDING

Diabetes mellitus of suikerziekte is een ziekte waarbij de normale glucose homeostase niet meer onderhouden kan worden. De cellen die verantwoordelijk zijn voor de glucose homeostase in het lichaam zijn voornamelijk de β -cellen in de endogene pancreas of eilandjes van Langerhans. Er verschijnen klinische symptomen van diabetes mellitus type 1 en type 2 wanneer er een daling is in het aantal β -cellen onder een bepaalde grens (Weir and Bonner-Weir 2013). In type 1 diabetes mellitus (T1DM) ontstaat er door auto-immune destructie een absoluut tekort aan β -cellen, dit gaat gepaard met klinische symptomen wanneer het gehalte aan β -cellen onder de 20 procent van de normale β -cel massa gaat. Bij type 2 diabetes mellitus (T2DM) of insuline resistente diabetes is de β -cel massa niet in staat om aan de gestegen insuline vraag te voldoen. Bij obesitas bijvoorbeeld ontstaat er door de constant gestegen insulinespiegels een verminderde respons op insuline door de vetcellen, hierdoor zijn er hogere spiegels insuline in het bloed nodig voor hetzelfde effect op de vetcel. De verhoogde productie van insuline zorgt voor een stress-situatie voor de β -cellen. Door deze metabole overbelasting daalt ook hier de β -cel massa tot 40-60 procent. De huidige behandeling voor diabetes mellitus bestaat uit perifere insulinetoediening, maar deze volstaat echter niet om de functie van volwaardig functionerende β -cellen in het lichaam te vervangen. Bij chronische diabetes patiënten ziet men tot op heden diverse secundaire complicaties. De fysiologische controle van de bloed glucosegehalten kan dus slechts volledig opgelost worden door het herstellen of vernieuwen van de β -cellen in het lichaam. In T1DM patiënten zijn transplantaties van pancreaseilandjes beschreven die een de glucosehomeostase kunnen onderhouden tot 1 jaar, waarna het aantal getransplanteerde cellen gradueel daalt. Na 5 jaar is nog slechts 20 procent van deze graft cellen aanwezig. Het grote probleem hier is de beschikbaarheid van β -cellen voor transplantatie. Er zijn 2 tot 3 pancreata nodig om diabetes gedurende één jaar te onderdrukken. Dit alles verantwoordt de zoektocht naar een alternatieve bron voor functionele β -cellen (Bouwens, Houbracken et al. 2013).

De geneeskunde van de toekomst zou wel eens deze van de regeneratieve geneeskunde kunnen worden. Dit is een recent ontstane tak van de geneeskunde en ze heeft als doel de aangetaste cellen, of weefsels en zelfs organen, te vervangen via implantatie of deze te regenereren in het lichaam zonder dat transplantatie nodig is. Dit laatste kan via stimulatie van het natuurlijke regeneratieproces in het lichaam of via inductie van latente regeneratieve mechanismen. Dit nieuwe onderzoeksveld en de translatie naar de kliniek is voornamelijk gebaseerd op stamcel- en regeneratieve- biologie. De regeneratieve geneeskunde maakt gebruik van compleet nieuwe moleculaire en cellulaire technieken. Het is zowel fascinerend als (soms) controversieel. Het klassieke principe van een celtherapie of tissue engineering in de regeneratieve geneeskunde is weergegeven in figuur 1. Een celtherapie is niets anders dan een celtransplantatie, met de term "tissue engineering" bedoelt men het transplanteren van een weefsel of orgaan dat *in vitro* werd aangemaakt.

Basic principles of Tissue engineering



Figuur 1: Basisprincipe van een celtherapie of “tissue engineering”. Patiënt specifieke cellen worden *in vitro* vermeerderd in een gepaste omgeving of “scaffold” waarna ze terug in het lichaam van de patiënt getransplanteerd worden d.m.v. een “graft”. Bij transplantatie van enkel cellen spreekt men over celtherapie, bij transplantatie van een geheel weefsel of orgaan geproduceerd *in vitro* spreekt men over “tissue engineering”. Fig. uit (Muschler, Nakamoto et al. 2004).

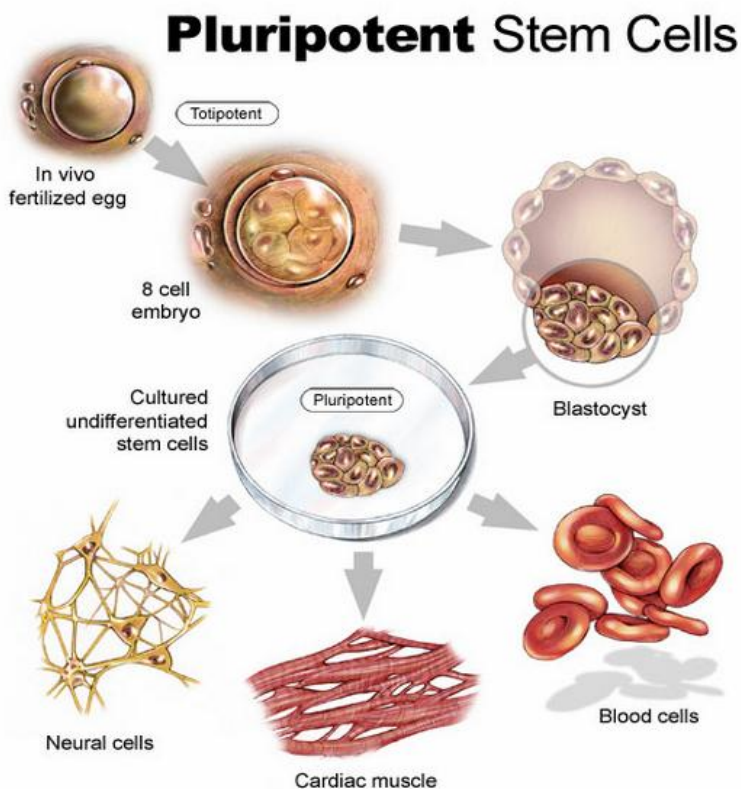
De eilandjes van Langerhans lijken op het eerste zicht een ideale structuur om te genereren *in vitro*. Het zijn slechts groepjes cellen die willekeurig in de pancreas verspreid liggen. Dit groepje cellen lijkt een kleinere uitdaging dan de complexe anatomische structuren die men ziet in organen, zoals bv. een nier of een pees, om te ontwikkelen *in vitro*. Dit werk bekijkt het nog eenvoudiger en tracht een antwoord te geven op de vraag: hoe ver staat men tegenwoordig met de ontwikkeling van een regeneratieve therapie voor de regeneratie van de β -cel? Dit houdt dus in dat slechts 1 cel populatie moet hersteld worden i.p.v. een meer complex weefsel of orgaan.

LITERATUURSTUDIE

1. STAMCELLEN EN PLASTICITEIT

Om het onderzoek i.v.m. een regeneratieve therapie voor diabetes te kunnen begrijpen, is het nodig om eerst even stil te staan bij de basisbegrippen waarrond verder zal gesproken worden. Wat is nu precies een stamcel en waarom is deze van vitaal belang in dit verhaal? Naast de stamcellen zijn ook gedifferentieerde adulte cellen van nut om een β -cel te genereren, dit komt omdat ze een zeer belangrijke eigenschap bezitten, namelijk hun plasticiteit.

Een stamcel is een cel met twee bijzondere eigenschappen: ze bezit een enorme capaciteit om te delen en ze kan differentiëren in één of meer verschillende celtypes. De eigenschap om te differentiëren in één of meerdere celtypes definieert men als de "potentie" van een stamcel. Men maakt een onderscheid tussen toti-, pluri-, multi- of unipotent. Een totipotente stamcel kan differentiëren in alle celtypes van de drie verschillende cellagen en de extra-embryonale weefsels. Een pluripotente stamcel is iets minder potent en kan nog differentiëren in cellen van de drie verschillende cellagen, maar niet meer in extra embryonale weefsels. Een multipotente stamcel geeft aanleiding tot één of meerdere celtypes en een unipotente stamcel differentieert tot slechts één enkel celtype.



Figuur 2: Embryonale stamcellen (ESC) zijn pluripotente stamcellen en worden geïsoleerd uit het blastocyststadium van een embryo. Dit zijn cellen die kunnen differentiëren in cellen van de drie verschillende cellagen. Figuur uit: "Generation of Rat Pancreas in Mouse by Interspecific Blastocyst Injection of Pluripotent Stem Cells" (Kobayashi, Yamaguchi et al. 2010).

Stamcellen worden ingedeeld in stamceltypes, deze types verschillen in het weefsel van waaruit ze worden geïsoleerd. Welke types stamcellen komen nu in aanmerking voor de regeneratie van de pancreas? Hier worden enkel de meest courant beschreven stamceltypes van belang voor een regeneratieve therapie voor diabetes aangehaald, namelijk de embryonale stamcel (ESC), de geïnduceerde pluripotente stamcel (iPSC) en de adulte stamcellen (ASC) met als voornaamste type de mesenchymale stamcel (MSC).

ESC's worden geïsoleerd uit de kiemschijf van het blastocyststadium van een embryo en bezitten de eigenschap om te differentiëren tot cellen van de drie verschillende cellagen (pluripotent). Hun proliferatiecapaciteit *in vitro* is hoger dan de andere stamceltypes hieronder beschreven. De ESC is het oudst beschreven stamceltype (na de eicel) en werd bij de muis voor het eerst geïsoleerd in 1981. In die tijd werden ze nog niet aanzien als bouwsteen voor de regeneratieve geneeskunde. Ze vormden de basis voor het onderzoek i.v.m. stamcelbiologie. Er ontstond een enorme vooruitgang van de wetenschappelijke kennis sinds hun isolatie en ook in de toekomst zal de ESC haar waarde niet verliezen in het onderzoek. Door haar specifieke eigenschappen is de ESC een enorm populair celtype in de regeneratieve geneeskunde, maar door destructie van het embryo geven ze ook aanleiding tot een ethische discussie.

In de literatuur spreekt men ook van “induced pluripotent stem cells” (iPSC). Dit is naast de ESC een tweede voorbeeld van een pluripotente stamcel. De term “induced” wijst hier op het feit dat deze stamcellen niet onder natuurlijke omstandigheden voorkomen in het lichaam, ze immers zijn *in vitro* ontwikkeld. Het zijn adulte lichaamcellen zoals bv. een fibroblast die men reprogrammeert tot een pluripotente stamcel door toevoegen van slechts enkele “key transcription factors”. Deze cellen bezitten dus ook een zeer hoge proliferatiecapaciteit *in vitro* en kunnen eveneens differentiëren tot celtypes van de drie verschillende lagen. Een “key transcription factor” is een groeifactor met een vitale rol in een bepaald cellulair proces. Als voorbeeld past in dit verhaal bv. op het verloop van de differentiatie van de pancreas progenitorcellen de molecule neurogenin 3 (Ngn 3). Zonder de expressie van deze transcriptiefactor (TF) verliest de embryonale pancreas de capaciteit om endocriene progenitorcellen te genereren. Dus voor de specificatie tot een endocriene progenitorcel is Ngn3 van vitaal belang, wat men in de Engelse literatuur omschrijft als een “key transcription factor” voor de endocriene specificatie binnen de pancreas. De techniek voor het bekomen van iPSC is ontwikkeld door Yammanaka et al. in 2008 en is één van de belangrijkste wetenschappelijke verwezenlijkingen van de laatste jaren. Met de komst van de iPSC zijn de ethische bezwaren rond ESC's verdwenen, maar de vraag die zich stelt is of deze iPSC's wel een volwaardig alternatief vormen voor de ESC's. Dit wordt behandeld in het hoofdstuk: “regeneratieve therapieën voor diabetes”.

Tenslotte zijn er de adulte stamcellen (ASC's) in het volwassen lichaam, dit is een populatie van cellen die zich in specifieke micromilieus of niches situeert in de meeste organen. Deze cellen zijn multipotent of unipotent afhankelijk van het weefsel waaruit ze werden geïsoleerd. ASC's worden ook omschreven met de term “weefsel-specifieke stamcellen” en werden reeds geïdentificeerd uit o.a. het beenmerg, de hersenen, de huid, de skeletspieren, het oog. Ze zijn betrokken in de normale turnover van de weefsels en ze zijn ook van belang voor de regeneratie van beschadigde structuren in het lichaam. De “niche” van een cel is het micromilieus in de directe omgeving van de cel. De niche van stamcellen verschillen van deze van adulte gedifferentieerde cellen en is zeer belangrijk voor het behouden van het stamcel fenotype en de –functie. De stamcelniche beschermt de stamcel tegen allerlei stimuli zoals differentiatie-, apoptose-stimuli en andere stamcelpoolbeschadigende signalen. Voor meer info i.v.m. stamcelniches wordt verwezen naar de review “Stem Cells and Their Niches” (Moore and Lemischka 2006).

De meeste studies over β -cel differentiatie van adulte stamcellen zijn gebaseerd op mesenchymale stamcellen (MSC's). Dit zijn multipotente stamcellen die vermenigvuldigen gedurende meerdere passages *in vitro*. Het grote voordeel van deze MSC's is dat ze uit ongeveer elk orgaan kunnen bekomen worden. Ze kunnen differentiëren tot zowel vetweefsel, bot en kraakbeen. MSC's hebben ook een toekomst in de

regeneratieve geneeskunde buiten de pancreas. Ze differentiëren immers preferentieel in cellen van de bindweefsels en worden daarom naar voor geschoven voor therapieën voor beschadigde huid, hart of gastro-intestinaal weefsel. In het kader van de differentiatie tot β -cellen worden de mesenchymale cellen niet zozeer als de ideale bron aanzien. MSC bezitten pro-angiogene en immunomodulerende eigenschappen, sommige wetenschappers hanteren zelfs de term “niche forming” eigenschappen. MSC’s secreteren ook cytokines en groeifactoren die in verschillende contexten anti-apoptotische-, morfogene-, mitogene- en angiogene effecten hebben. Omwille van deze eigenschappen zouden ze de overleving van een graft kunnen verbeteren of de endogene regeneratie van de pancreas kunnen verhogen (Dominguez-Bendala, 2012).

De cellen in het lichaam bezitten een bijzondere eigenschap, namelijk hun plasticiteit. Een plastisch voorwerp is als het ware vervormbaar, het is geen rigide structuur, bv. plasticine. Zo kun je ook de cellen in het lichaam visueel voorstellen. De expressie van hun fenotype is gereguleerd door zowel genetica, maar ook door de epigenetica. Epigenetische regulatie speelt zich af tussen het DNA, het RNA en de proteïnen. Door wijzigingen van het epigenoom, ontstaat er ook een verschillend fenotype in de cel. Deze omvormbaarheid tot een ander celtypespecifiek fenotype wordt gedefinieerd als de “plasticiteit” van een cel. Klassiek zijn de meest ongedifferentieerde cellen ook de meest plastische cellen. Adulte gedifferentieerde cellen in het lichaam bezitten echter ook nog een graad van plasticiteit. Door deze eigenschap is de hoop op het genereren van β -cellen uit verschillende niet β -cellen gegroeid.

Na de identificatie van enkele “key transcription factors” uit de ontwikkelingsbiologie verschenen vele voorbeelden van *ex vivo* of *in vivo* transgene benaderingen (vaak met behulp van virale vectoren). Deze tonen aan dat gedifferentieerde cellen kunnen omgevormd worden in een ander fenotype zonder een intermediaire toestand van multipotentie of pluripotentie. Dit type van conversie wordt gedefinieerd met de termen “transdifferentiatie”, “lateraal reprogrammeren” of “direct programmeren”.

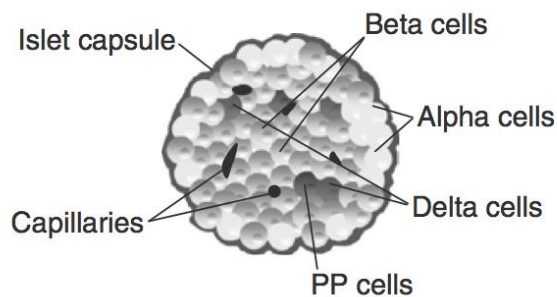
2. B-CEL REGENERATIE *IN VIVO*

Inzicht in het endogene regeneratieproces van de pancreas kan leiden tot nieuwe strategieën in de regeneratieve geneeskunde voor diabetes. In dit hoofdstuk worden eerst de aanwezige celtypes in de pancreas aangehaald, waarna de verschillende manieren waarop deze celtypes bijdragen in het endogene regeneratieproces van de pancreas verder zullen worden behandeld.

2.1. CELTYPES IN DE PANCREAS

De pancreas is een orgaan van het spijsverteringsstelsel met zowel een endocriene als exocriene functie. Het exocriene deel van de pancreas neemt ongeveer 90 tot 95% van de weefsel massa in beslag en heeft als voornaamste functie het secreteren van enzymen in het duodenum, wat nodig is voor de vertering van het voedsel. De exocriene pancreas bevat zowel tubuluscellen als acinuscellen. De tubuluscellen vormen een vertakt netwerk van buisjes: de "tubuli". Deze vertakkingen sluiten aan op groepjes van secreterende cellen: de "acini". De zymogenen, geproduceerd in de acini, worden door het tubulinetwerk geleid. Na excretie in het duodenum worden deze omgezet tot hun actieve vorm.

De endocriene pancreas bestaat uit de eilandjes van Langerhans. Dit zijn groepjes van cellen die bestaan uit vijf celtypes: α -, β -, δ -, pp- en ϵ - cellen. Deze cellen produceren respectievelijk glucagon, insuline, somatostatine, pancreas polypeptide en ghreline. De meest abundante celtypes zijn dezelfde bij meerdere verschillende species, namelijk α -cellen (20-50%) en β -cellen (50 – 80%) (Stefan, Orci et al. 1982). De andere celtypes zijn zeldzaam. De voornaamste functie van de endocriene pancreas is het in stand houden van de glucose homeostase.



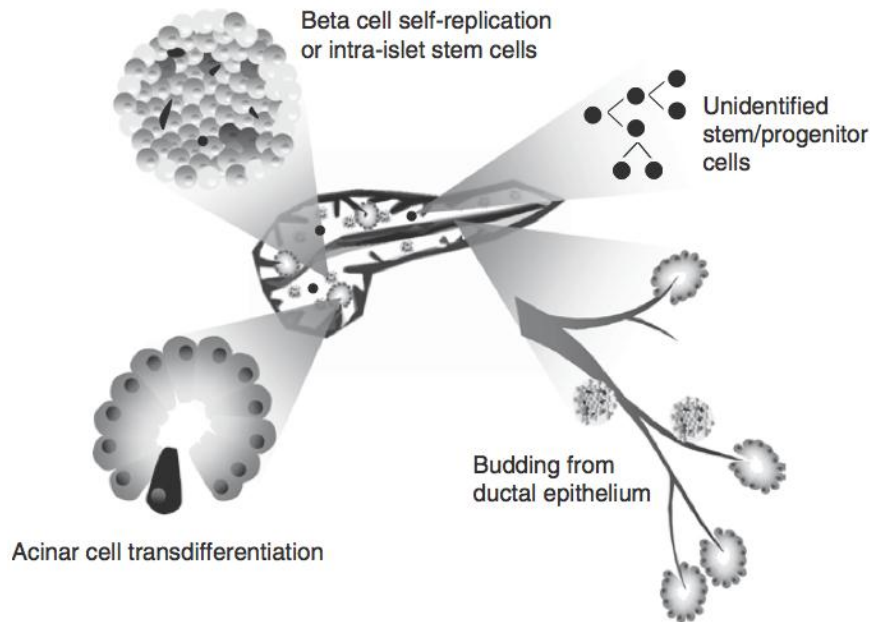
Figuur 3: De eilandjes van Langerhans in de pancreas bezitten verschillende celtypes. Dit zijn de alpha-, beta-, delta-, epsilon en pancreas polypeptide cellen. β -cellen komen het meeste voor, gevolgd door de α -cellen. Andere celtypes zijn zeldzaam en liggen verspreid in het eiland. Figuur uit boek "Pancreatic stem cells" {Dominguez-Bendala, 2009,p5}.

In de pancreas hebben de cellen een trage turnover, waardoor ze jarenlang als post- mitotische cellen beschouwd werden. De β -cel massa in het bijzonder was, dacht men, constant in het volwassen individu, er was enkel een daling met de leeftijd of bij beschadiging door ziekte (Messier and Leblond 1960). Tegenwoordig weet men echter dat onder specifieke omstandigheden, zowel fysiologisch als pathologisch, de pancreas toch de capaciteit bezit om het β -cel gehalte aan te passen. Enkele voorbeelden waar men een verhoogde β -cel massa kan zien zijn in de neonatus, tijdens de zwangerschap en bij obesitas.

2.2. VAN WAAR KOMEN DE NIEUWE β -CELLEN IN DE PANCREAS?

De mogelijke bronnen van de nieuwe β -cellen zijn in theorie alle aanwezige celtypes in de pancreas, deze kunnen via verschillende mechanismen nieuwe β -cellen genereren. Proliferatie van de reeds aanwezige β -cellen (β -cel replicatie) is de meest voor de hand liggende verklaring voor de stijging in de β -cel massa. Ook andere celtypes in de adulte pancreas zijn via transdifferentiatie een potentiële bron, want adulte cellen zowel van het endocriene en het exocriene type bezitten voldoende plasticiteit om tot β -cel te

transformeren. Tenslotte kunnen ook ongedifferentieerde progenitorcellen, zowel afkomstig van de pancreas zelf (uit de tubuli of binnenin het eiland van Langerhans) of elders in het lichaam, de nieuwvorming van β -cellen verklaren (zie figuur 4).



Figuur 4: De mogelijke bronnen van de nieuwe β -cellen zijn in theorie alle aanwezige celtypen in de pancreas. Proliferatie van de reeds aanwezige β -cellen (β -cel replicatie) is een eerste bron. Ook andere celtypen in de adulte pancreas zijn via transdifferentiatie een potentiële bron. Adulte cellen, zowel van het endocriene en het exocriene type, bezitten voldoende plasticiteit om tot β -cel te transformeren. Tenslotte kunnen ook ongedifferentieerde progenitorcellen, zowel afkomstig van de pancreas zelf (uit de tubuli of binnenin het eiland van Langerhans) of elders in het lichaam, de β -cel neogenese verklaren. Figuur uit boek “Pancreatic Stem Cells” (Dominguez-Bendala, 2009, p40).

2.2.1 β -cel replicatie

De β -cel massa in de pancreas wordt voornamelijk onderhouden door replicatie van de reeds aanwezige volwassen β -cellen in de muis. In 2004 verscheen een “breakthrough study” van Dor et al. Die beschreef voor de eerste keer een “pulse-chase lineage tracking” experiment, en ontwikkelde hiermee als eerste een manier om de origine van bepaalde cellen op te sporen. Het model stelt de onderzoeker in staat om op een bepaald moment naar keuze in de ontwikkeling van de pancreas insuline producerende cellen te labelen, dit is de “pulse”. De gelabelde cellen kunnen vervolgens na variabele tijdstippen na de “pulse” gevisualiseerd worden *in vitro* na opoffering van de muis, dit is de “chase”. De verhouding van gelabelde en niet-gelabelde cellen wijzigde niet en de auteurs concludeerden dat de nieuw gevormde β -cellen voor het overgrote deel door zelf-vernieuwing van de reeds aanwezige β -cellen komt (β -cel replicatie) (Dor, Brown et al. 2004). Ook andere studies d.m.v. lineage tracking bevestigen het β -cel replicatie als mechanisme (Nir, Melton et al. 2007, Teta, Rankin et al. 2007, Xiao, Chen et al. 2013). De proliferatieve capaciteit van β -cellen is ook afhankelijk van de leeftijd, species en neemt af met ouder worden (Kushner 2013).

Zwangerschap is een fysiologisch voorbeeld van verhoogde β -cel massa, waar men bij de mens 1.4 tot 2.4 keer meer β -cel massa ziet bij de vrouw (Butler, Cao-Minh et al. 2010). Deze stijging is bij de mens

misschien afkomstig van β -cel neogenese d.m.v. progenitorcellen omdat tevens nieuwe kleinere eilandjes werden geobserveerd en ook zijn tubuluscellen positief voor insuline geïdentificeerd (Butler, Cao-Minh et al. 2010). De term "neogenese" betekent letterlijk "nieuwvorming van". Bij de muis ziet men eerder hypertrofie en replicatie van β -cellen. β -cel replicatie is ook bij de mens een van de voornaamste mechanismen in de vroege postnatale periode (Meier, Butler et al. 2008). Er zijn dus speciesverschillen in het regeneratieproces van de pancreas. Dit illustreert dat de regeneratie van de pancreas in muizen, waar de meeste experimenten op gebaseerd zijn, niet altijd extrapoleerbaar is naar de mens.

Een belangrijke opmerking bij "lineage tracking" studies is dat de label-efficiëntie nooit 100% bedraagt, waardoor de aanwezigheid van pancreas progenitorcellen niet uitgesloten kan worden (Magnuson and Osipovich 2013). Deze genetische labeltechnieken zijn ontworpen met de veronderstelling dat een mogelijke progenitorcel als kenmerk een de novo expressie van insuline vertoont. Dit neemt dus niet in overweging dat de progenitorcellen al reeds insuline produceerden voor hun labelen. Zo is recent een studie verschenen die het bestaan van pancreas multipotente precursoren (PMP) aantoont die reeds lage spiegels van insuline produceerden. Deze PMP zijn in staat *in vitro* te differentiëren tot zowel pancreas als neuronaal weefsel. Het exacte mechanisme waarmee deze PMP's afkomstig van het endoderm de "lineage barrier" kunnen oversteken is onbekend (Seaberg, Smukler et al. 2004). Desondanks het aantonen van PMP in bovenstaande publicatie blijft de aanwezigheid van pancreas progenitorcellen of stamcellen in de adulte pancreas tot op heden voor de meeste wetenschappers een open vraag, het antwoord ligt misschien in de buurt van de tubuli van de pancreas.

2.2.2 Tubuli als herberg voor pancreas progenitorcellen

Een verklaring voor nieuwvorming van β -cellen wordt sinds lang gezocht in de buurt van de tubuli van de pancreas. Men stelde dat deze tubuli progenitorcellen zouden bevatten in de adulte pancreas. Deze hypothese ontstond door het beeld op een histologisch preparaat, waar men zag dat de nieuwe eilandjes in nauw contact met de tubuli cellen gelegen zijn (Bouwens and Pipeleers 1998). Ook tijdens de embryogenese ziet men een proces vanuit de tubuli, dat misschien in de adulte pancreas nog geactiveerd zou kunnen worden tijdens het regeneratieproces. Bij de specificatie tot endocriene cellen in het embryo is er een delaminatie van Ngn3 positieve cellen uit de embryonale tubuli. Neurogenin3 (Ngn3) is een celmarker voor endocriene progenitorcellen. De vrijgekomen endocriene progenitorcellen vormen later de eigenlijke eilandjes van Langerhans in het embryo.

Zeer recent zijn studies verschenen op basis van pancreasbeschadiging en analyse van tubuluscellen *in vitro* die aangeven dat de tubuli in de adulte pancreas de capaciteit behouden hebben om Ngn3 te activeren. Deze adulte tubuli zouden dus toch in staat zijn om het endocriene programma te initiëren (Kopp, Dubois et al. 2011, Jin, Feng et al. 2013). Ook Rankin et al. beschreven dat tubuluscellen een bron vormen voor nieuwe β -cellen. Het afbinden van een pancreaslob aanleiding geeft tot massale pancreas beschadiging, waardoor de cellulaire samenstelling verandert, eerder dan de β -cel massa aangetast wordt. Na de schade zag men dat de tubuluscellen omgezet werden tot β -cel (Rankin, Wilbur et al. 2013).

Een andere studie die deze hypothese staakt is deze van Al-Hasani et al. Deze auteurs beschreven dat de TF pax4 naast conversie van α - naar β -cel ook tubulus progenitorcellen kan activeren die differentiëren tot endocriene cel. Dit zou via het epitheel-mesenchym transitie (EMT) proces gaan en toont aan dat onder sommige omstandigheden de tubuli als facultatieve progenitorcellen kunnen dienen (Al-Hasani, Pfeifer et al. 2013).

2.2.3 Transdifferentiatie

De gedifferentieerde cellen in het lichaam kunnen omgevormd worden in een ander fenotype "zonder" een intermediaire toestand van multipotentie of pluripotentie. Dit type van conversie wordt gedefinieerd met de termen "transdifferentiatie", "lateraal reprogrammeren" of "direct programmeren". Het omvormen van een exocrien celtype tot een endocrien celtype in de pancreas echter vereist een dedifferentiatie stap (cf. Infra) Men hanteert de term transdifferentiatie om dit proces te beschrijven ondanks deze tussenstap. De twee

celtypes die recent de meeste aandacht genieten in het onderzoek m.b.t. transdifferentiatie van cellen binnen de pancreas zijn de acinuscel en de α -cel (cf. infra onder transdifferentiatie *in vitro*). Transdifferentiatie is klassiek een artificieel geïnduceerd mechanisme door toevoegen van enkele “key transcription factors”, maar de vraag die men stelt is of dit fenomeen ook gebeurt bij de endogene regeneratie van de pancreas. Een studie van Pan et al. heeft spontane vorming van pancreatic multipotent progenitorcellen aangetoond, dus zonder ectopische expressie van TF. Deze auteurs hebben aangetoond dat acinuscellen tijdens pancreas beschadiging terug eigenschappen van embryonale progenitorcellen vertonen en vervolgens transdifferentiëren in tubuli cellen en β -cellen zonder het toevoegen van exogene factors (Pan, Bankaitis et al. 2013).

Ook de α -cel zou misschien een endogene bron van nieuwe β -cellen kunnen vormen. Thorel et al. gebruikten transgene muizen die het diphthera toxine receptor op de β -cel tot expressie brengen. Na toedienen van diphthera toxine was er een bijna totale vernietiging van de β -cel massa (>99%). Hierbij kwam men tot de opmerkelijke bevinding dat de nieuwe β -cellen afkomstig waren van de α -cellen binnen het eiland (Thorel, Nepote et al. 2010).

Samengevat zijn er dus studies verschenen die alle mogelijke mechanismen hierboven beschreven staven om de nieuwvorming van β -cellen te verklaren, waarvan de β -cel replicatie het belangrijkste mechanisme is. Men kan zich de vraag stellen welk aandeel van de regeneratie binnen de pancreas wordt verzorgd door welk mechanisme. Dit is op zich ondergeschikt aan de bevinding dat ze wel degelijk kunnen plaatsvinden in de adulte pancreas, want d.m.v. een regeneratieve therapie kunnen we deze mechanismen trachten te induceren. Een grondiger inzicht van pancreas cel plasticiteit, β -cel proliferatie en neogenese vanuit progenitorcellen zal in de toekomst het relatief belang van elk mechanisme voor de regeneratieve geneeskunde uitwijzen. Vooral de identificatie van specifieke progenitorcellen voor β -cellen in de adulte pancreas is nodig. Dit zal ook leiden tot identificatie van receptoren en moleculaire wegen voor β -cel regeneratie.

3. β -CEL PRODUCTIE *IN VITRO*

Het produceren van functionele β -cellen *in vitro* is wat men hoopt te bereiken, want deze cellen vormen een abundante bron voor celtransplantatie in het lichaam van de patiënt. Hieronder worden drie mogelijke manieren beschreven om dit doel te bereiken, namelijk de β -cel zelf doen delen *in vitro*, een stamcel differentiëren tot een β -cel en tot slot adulte cellen omvormen tot een β -cel.

Er zijn verschillende manipulaties *in vitro* mogelijk om tot een β -cel te komen, maar door het plethora aan factoren *in vivo* die het differentiatieproces en de β -cel -overleving en -functie beïnvloeden zijn de eigenschappen van de bekomen “ β -like” cellen niet dezelfde als een functionele β -cel *in vivo*. Met de term “ β -like” geeft men aan dat de ontwikkelde cellen *in vitro* “lijken op” de β -cel en dat ze niet aanzien mogen worden als een volwaardig functionele β -cel *in vivo*. De eigenschappen die men hanteert om deze “ β -like” cellen te karakteriseren *in vitro* zijn: glucose geïnduceerde insuline secretie, insuline productie capaciteit en andere β -cell merkers (Minami and Seino 2013). Om de *in vivo* β -cel eigenschappen van deze artificieel geproduceerde “ β -like” cellen na te gaan kan men deze onderwerpen aan een “functionele test”. Deze bestaat erin het effect na implantatie *in vivo* te evalueren. Het beoogde doel is een reversie van de hyperglycaemie gedurende ruime tijd.

3.1. β -CEL PROLIFERATIE *IN VITRO*

De eerste bron waar men aan denkt met het oog op β -cel expansie *in vitro* is uiteraard de β -cel zelf. Het probleem met *in vitro* replicatie van β -cellen is echter de dedifferentiatie die ermee gepaard gaat, waardoor het β -cel fenotype verdwijnt (Weinberg, Ouziel-Yahalom et al. 2007). De β -cellen verliezen hun insuline-expressie en -secretie, wat het moeilijk maakt te bepalen welke de delende cellen zijn na dedifferentiatie. Deze cellen kunnen zowel β -cellen zijn die hun fenotype verloren hebben, maar ze

kunnen evengoed andere cellen zijn (Beattie, Itkin-Ansari et al. 1999, Ouziel-Yahalom, Zalzman et al. 2006). De capaciteit om te prolifereren van deze gedifferentieerde cellen hangt af van de cultuurcondities. Russ et al. toonden aan dat de β -cellen tot 16 passages doormaken *in vitro* en dat ze dit enkel doen in aanwezigheid van andere pancreas niet β -cellen (Russ, Bar et al. 2008). Het is nu de uitdaging om deze cellen te redifferentiëren tot functionele β -cellen *in vitro*. Dit is analoog aan het probleem van de terminale differentiatie tot β -cel vanuit ESC en ontstaat door de verschillen tussen de *in vivo* en *in vitro* omgeving van de cel (cf. Infra).

Een andere aanpak voor *in vitro* replicatie van β -cellen is beschreven in een studie door Narushima et al. waar men “transiently immortalized β -cells” beschrijft, dit zijn cellen waarin twee genen ingebracht zijn in het genoom die de senescentie verhinderen. Deze genen worden terug verwijderd na 50 passages. De cellen zouden een slapend functioneel β -cel fenotype hebben na reversie (de twee genen worden verwijderd) en waren in staat om de hyperglycaemie te corrigeren in immunosuppressieve diabetische muizen (Narushima, Kobayashi et al. 2005).

3.2 STAMCEL DIFFERENTIATIE OF VERTICAAL REPROGRAMMEREN *IN VITRO*

In dit hoofdstuk worden eerst de algemene methoden beschreven waarmee men een stamcel kan differentiëren tot een specifiek celtype. Vervolgens wordt het belang van de stamcelniche hierbij uitgelegd. Tenslotte worden de verschillende stamceltypes en hun belang bij de productie van een β -cel behandeld.

De differentiatie van stamcellen *in vitro* is mogelijk door verschillende manipulaties. Men maakt een onderscheid tussen de chemische methoden, genetische methoden en proteïne transductie methoden. Klassiek worden de transcriptiefactoren sequentieel toegevoegd aan het cultuurmedium, dit is de chemische benadering. Genetische manipulatie d.m.v. adenovirussen en retrovirussen is een tweede manier om bepaalde genen tot expressie te brengen. Bij deze genetische benadering is het grootste nadeel de onveiligheid voor toepassing in de kliniek door insertie mutagenese en oncogenese (cf. infra). Een veiliger alternatief voor het intracellulair brengen van transcriptiefactoren is met behulp van proteïne transductie. Bij dit proces wordt de TF gekoppeld aan een oligopeptide, die de opname in de cel faciliteert. Deze manier laat toe om zowel de dosering, tijdstip en duur van blootstelling aan de gekoppelde TF te controleren (Dominguez-Bendala, 2009, p 51 tot p57).

3.2.1 Niche van een cel

Het grootste probleem inherent aan *in vitro* modellen is de afwezigheid van het micromilieu of niche wel aanwezig *in vivo*. Deze niche is echter van vitaal belang voor de β -cel functie. In de klassieke opstelling met cellen in suspensie wordt er echter geen rekening gehouden met enkele belangrijke, zeer diverse factoren wel aanwezig in de micro-omgeving van de cel *in vivo*.

Vooreerst zijn de signalen van zowel het mesenchym, het endotheel en de extracellulaire matrix (ECM) van vitaal belang voor de β -cel functie en het differentiatieproces. Er is dus meer dan 1 celtype vereist in de celcultuur. In een studie door Kragl et al. werd het belang van epitheel mesenchym interacties, meer specifiek van de aanwezigheid van de endotheelcellen in de capillairen van het eiland van Langerhans, aangetoond. In de adulte pancreas secreteren de endotheelcellen verschillende groeifactoren, zoals hepatocyte growth factor (HGF) en connective tissue growth factor (CTGF). Deze groeifactoren faciliteren en reguleren tezamen met een weefselspecifieke extracellulaire matrix (ECM) de β -cel functie (Eberhard, Kragl et al. 2010).

De ECM is een essentiële component van het micromilieu rond de β -cel. De ECM is een dynamisch netwerk van glycoproteïnen, de meest bekende zijn fibronectinen, lamininen, proteoglycanen, collageen en glycosaminoglycanen. Vele groei- en differentiatiefactoren zijn gebonden aan de ECM. De interactie tussen de ECM en de aanwezige cellen is een zeer belangrijke factor in het differentiatieproces. Een studie door Speier et al. toonde het verband aan tussen het verlies van een gap junction eiwit connexin-36

en de daling in glucose sensitiviteit bij de muis, wat er op wijst dat de ECM meer dan alleen een structurele rol bezit of dat de structuur in het weefsel ook van belang is voor haar functie (Speier, Gjinovci et al. 2007).

Gedurende de ontwikkeling *in vivo* krijgen de cellen naast signalen in oplossing ook signalen van gebonden factoren. Deze fysische eigenschappen zijn ook van belang voor het differentiatieproces. Fysische factoren, zoals mechanische krachten, bio-elektronische velden, O₂-spanning en basaalmembraan- eigenschappen zullen in de toekomst in rekening moeten gebracht worden (Dominguez-Bendala, 2009, p58). Fraker et al. illustreerden het belang van zuurstofspanning voor de β -cel differentiatie. Deze auteurs vergeleken de endocriene versus exocriene specificatie van de pancreasknoppen van muizen. Ze analyseerden de cellen na zowel hypoxische als hoge oxygenatieomstandigheden. De cellen onder hoge oxygenatie vertoonden een significant verhoogde differentiatie tot endocriene cellen (Fraker, Alvarez et al. 2007).

Een functioneel weefsel vereist een specifieke organisatie van de verschillende componenten aanwezig i.e. zowel de cellen als de ECM. De cellen in het eiland bezitten een apicaal- basaal (AB) oriëntatie en planaire cel polariteit (PCP). Dit is een basisvereiste voor een driedimensionele (3D) organisatie van het pancreas weefsel. De molecule leverkinase B1 speelt een rol in de AB oriëntatie. Na deletie van *Lkb1* zag men een verandering op histologisch preparaat. De β -cellen vormden rozet-achtige clusters rond de capillairen van het eiland. Ook zag men na deletie van *Lkb1* een gestegen β -cel volume en verbeterde glucosetolerantie en verhoogde proliferatie van insuline producerende cellen. AB oriëntatie zorgt dus voor een deel voor de 3D organisatie van het weefsel (Migliorini, 2014) Het belang van PCP zowel voor de differentiatie van de β -cel als voor de β -cel functie in de adulte pancreas is ook aangetoond. Na deletie van PCP *Celsr2* en *Celsr3* in de embryogenese, zag men een belemmering van de differentiatie tot β -cel. Het belang van PCP voor de β -cel functie in mature eilandjes is geïllustreerd a.h.v. de molecule activating transcription factor 2 (ATF2). ATF2/ Wnt signaaltransductie speelt een belangrijke rol in insuline expressie in de adulte β -cellen. ATF2 vertoont ook interactie met enkele "key β -cel transcription factors" zoals MAFA, *pdx1*, en BETA2. Dit alles wijst op het belang van PCP en AB voor een 3 dimensionele organisatie in relatie met de andere structuren aanwezig in de niche van de β -cel. Deze eilandarchitectuur is dan weer van belang voor de β -cel functie en haar regulatie (Migliorini, Bader et al. 2014). Het hoopje cellen willekeurig verspreid in de pancreas is dus meer georganiseerd dan wat je op het eerst zicht zou denken.

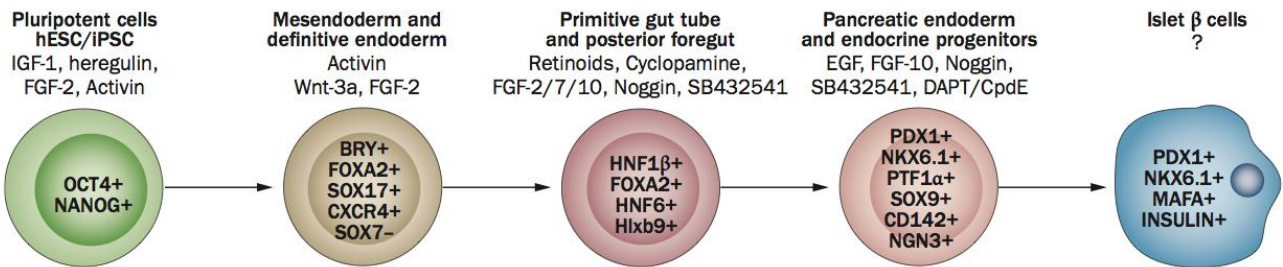
Tenslotte zal ook het ontdekken van nieuwe metabole wegen ons helpen om in de toekomst het differentiatieproces en β -cel functie beter te omvatten. Zo werd recent een nieuwe functie van het renine-angiotensine systeem (RAS) vooropgesteld. Naast het systemisch RAS dat instaat voor vasoconstrictie en vloeistofhomeostase bestaat er ook een lokaal RAS. De lokale RAS-component zou naast een invloed op diverse andere orgaansystemen, ook in de pancreas van belang zijn. Het beïnvloedt zowel de eilandcel-structuur en -functie in de adulte pancreas als de proliferatie en differentiatie van pancreas stam- of progenitorcellen gedurende de ontwikkeling in het embryo (Wang and Leung 2013).

Samengevat kunnen we stellen dat het nabootsen van differentiatie processen *in vivo* buiten het lichaam nog in zijn kinderschoenen staat. Protocollen voor stamceldifferentiatie *in vitro* moeten in de toekomst meer rekening houden met de fysiologische omgeving (niche) van de β -cel.

3.2.2 ESC *in vitro*

De differentiatie tot β -cel vanuit een ESC, met het oog op een regeneratieve therapie voor diabetes, is tegenwoordig een zeer actief onderzoeksgebied. ESC's prolifereren immers het best *in vitro*. Kennis uit de embryologie heeft geleid tot de identificatie van enkele "key transcription factors" in het differentiatieproces tot β -cel. Deze worden gebruikt om gestandaardiseerde protocollen te ontwikkelen om *in vitro* β -cellen te genereren uit stamcellen. Er bestaan tot op heden verschillende reproduceerbare protocollen om ESC *in*

in vitro te doen differentiëren tot de stadia van progenitorcellen van endoderm en –pancreas (en zelfs al tot het stadium van endocriene progenitorcellen) (D'Amour, Agulnick et al. 2005, Cai, Yu et al. 2010, Mfopou, Chen et al. 2010, Xu, Browning et al. 2011). Welke TF en welke celmerkers van belang zijn voor elk stadium in het differentiatieproces tot β -cel, zijn weergegeven in figuur 5. Het transplanteren van deze progenitorstadia is onderzocht als een therapie om de β -cel massa te regenereren, de terminale differentiatie tot β -cel gebeurt dan *in vivo* (cf. infra). Ook is het “proof of principle” geleverd dat het mogelijk is om de ESC tot “ β -like” cel te laten differentiëren. Het percentage “ β -like” cellen ligt bij de verschillende onderzoeksgroepen gemiddeld laag (Minami and Seino 2013). Het probleem situeert zich in de terminale differentiatie van de ESC tot β -cel *in vitro*. Dit heeft nog vele tekortkomingen, met als voornaamste oorzaak opnieuw de β -cel niche *in vitro* die verschilt van deze *in vivo* (zie hierboven).



Figuur 5: Pluripotente stamcellen kunnen *in vitro* differentiëren tot pancreas en (endocriene) precursoren. De grote stappen in het differentiatieproces zijn weergegeven. Deze worden onderscheiden door de expressie van merkers specifiek voor deze fase in het differentiatieproces, deze staan binnenin de cellen in de figuur. De moleculen die men gebruikt om tot deze verschillende differentiatie stadia te komen staan boven de geïllustreerde cellen. Deze moleculen activeren of inhiberen verschillende signaaltransductiewegen. Een bepaalde combinatie van deze signalen induceert de expressie van een aantal transcriptiefactoren specifiek voor elk differentiatie fase. De eindfase, de functionele β -cel werd nog niet bereikt *in vitro*. Afkortingen: CpdE, compound E; DAPT, Notch γ -secretase inhibitor; EGF, epidermal growth factor; FGF, fibroblast growth factor; hESC human embryonic stem cells; hiPSC human induced pluripotent stem cells; IGF-1, insulin- like growth factor 1. Figuur en uitleg uit (Bouwens, Houbracken et al. 2013).

3.2.3 Adulte stamcellen *in vitro*

De mogelijkheid om adulte stamcellen te bestuderen in hun natuurlijke omgeving is zeer beperkt. Ook bij deze cellen ontstaan problemen bij *in vitro* cultuur. Na extractie en expansie ondergaan de adulte stamcellen een adaptatie aan de nieuwe omgeving. Hierdoor zijn de kenmerken geobserveerd *in vitro* niet steeds representatief voor hun eigenschappen en functies *in vivo*. Het nabootsen van de stamcelniches, of een *in vivo* model, zal nodig zijn om in de toekomst deze cellen te bestuderen. Er bestaan nog geen standaard isolatie- en differentiatie protocollen om ASC's om te vormen tot β -cellen *in vitro*. Recent heerst er eerder een tendens om ze als immunomodulator of nichevormers te gebruiken, eerder dan ze als bron voor differentiatie tot β -cel te zien (Bouwens, Houbracken et al. 2013).

3.3. TRANSDIFFERENTIATIE OF LATERAAL PROGRAMMEREN *IN VITRO*

Direct reprogrammeren van adulte cellen tot β -cellen is ook een zeer actief onderzoeksdomein. Door enkele “key transcription factors” uit de embryogenese toe te voegen aan het medium kan men adulte cellen reprogrammeren. Hierbij beschouwt men echter *in vitro* experimenten als weinig informatief. Dit komt opnieuw door de adaptatie aan het *in vitro* milieu, met verlies van de specifieke eigenschappen van de cellen *in vivo* tot gevolg (Dominguez-Bendala and Ricordi 2012). Onderzoek m.b.t. transdifferentiatie naar pancreascellen is begonnen met levercellen door de nauwe link met de pancreas gedurende de embryologie. Men bracht Pdx1 d.m.v. adenovirus vector in de levercel. Pdx1 is de TF die een cel vertelt dat ze pancreas zal worden gedurende de embryogenese. Men kwam eveneens tot de opmerkelijke

bevinding dat, na de transdifferentiatie van een levercel tot pancreascel, het pancreas fenotype zichzelf onderhoud. De auto-activatie van de pancreas genen gebeurt via positieve "feed forward" lussen. Deze permanente reprogrammering is precies wat men nodig heeft in de kliniek (Dominguez-Bendala, 2009, p93)

Daarna zijn ook pancreascellen onderzocht om β -cellen te genereren, aangezien deze nog nauwer verwant zijn met de β -cel. De acinaire cel en α -cel in de pancreas genieten de meeste wetenschappelijke aandacht voor conversie tot β -cel.

3.3.1 Acinuscellen

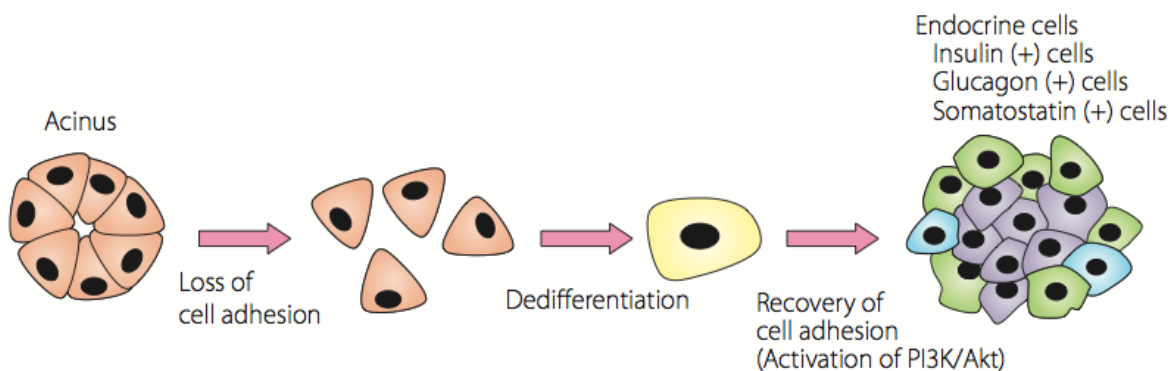
Zhou et al. onderzochten de mogelijkheid om acinaire cellen te reprogrammeren tot insulineproducerende cellen door inductie van ectopische expressie van enkele endocriene specifieke transcriptiefactoren (NGN3, PDX1, MAFA). deze onderzoekers beschreven dat er uit de acinaire cellen nieuwe " β -like" cellen ontstonden. Deze waren niet te onderscheiden van echte β -cellen in hun grootte, vorm en de aanwezigheid en verdeling van de insuline granules (Zhou, Brown et al. 2008). De acinus bekomen " β -like" cellen vormden echter geen clusters die leken op een eiland van Langerhans en bovendien kon een volledige reversie van de hyperglycaemie niet bekomen worden.

Men weet nu dat het exocriene-endocriene transdifferentiatieproces een opregulatie van Ngn3 vereist, en dat de efficiëntie kon verhoogd worden door inhibitie van het Notch-HES-1 signaaltransductieweg, die de endocriene versus exocriene specificatie bepaalt in de pancreas van het embryo (Baeyens, Bonne et al. 2009). Ngn is de celmarker voor endocriene progenitorcellen. Dit wijst erop dat acinaire cellen *in vitro* kunnen dedifferentiëren tot een fenotype dat lijkt op embryonale multipotente progenitoren (Pinho, Rooman et al. 2011).

Bij dit dedifferentiatieproces *in vitro* is ook het verlies van de cel-cel adhesie van de acinuscellen van belang (zie figuur 6). Sommige onderzoekers beweren dat dit de reden is dat transdifferentiatie *in vivo* niet vaak wordt waargenomen, want zelfs bij ernstige beschadiging van de pancreas blijven deze cel-cel contacten intact (Minami, 2013).

De gedifferentieerde acinuscellen zijn uitzonderlijk plastisch, ze kunnen transformeren in tubuluscellen, hepatische cellen en zelfs " β -like" cellen (Lardon, De Breuck et al. 2004).

Baeyens et al. onderzochten de mogelijkheid om acinaire cellen te transdifferentieren tot endocriene cellen door downregulatie van de molecule Notch. In hun leukemie inhiberende factor (LIF) en endotheel groeifactor (EGF) *in vitro* model werd d.m.v. lineage tracing techniek aangetoond dat hun " β -like" cellen afkomstig waren van acinuscellen. Deze cellen konden een reversie van de hyperglycaemie wel verwezenlijken na implanting in een T1DM muis.



Figuur 6: Model voor de transdifferentiatie van acinuscel tot β -cel. Enzymatische dissociatie onderbreekt de epitheliale structuren in de acinus. Hierdoor gaat de cadherine-gemedieerde cel-cel adhesie verloren. Dit verlies zorgt

voor dedifferentiatie van de acinuscellen. Ondertussen worden epidermale groeifactoren geactiveerd, gevolgd door de activatie van de fosfoinositidide 3-kinase PI3K/Akt signaaltransductieweg. Na enkele dagen in cultuur is er terug cadherine gemedieerde cel-cel adhesie door de verhoogde expressie van E-cadherine. Dit is een vereiste voor de redifferentiatie van de gedifferentieerde cellen tot insuline secreterende cellen. Figuur met uitleg uit (Minami and Seino 2013).

3.3.2 α -cellen

Het potentieel van α -cell tot β -cel conversie *in vitro* moet nog onderzocht worden. De eerste “proof of principle” experimenten van deze conversie in humane cellen was d.m.v. manipulatie van het epigenoom, namelijk histone methylatie patroon wijziging (Bramswig, Everett et al. 2013).

3.3.3 Besluit Transdifferentiatie *in vitro*:

Alle kennis i.v.m. transdifferentiatie *in vitro* is afkomstig van muismodellen, door speciesverschillen in de plasticiteit van de pancreascellen zijn deze resultaten niet altijd extrapoleerbaar van de muis naar de mens. Er is wel al een indicatie over de plasticiteit van humane acinuscel. Men zag spontane transdifferentiatie in tubuluscellen in monolayer cultuur (Houbracken, de Waele et al. 2011).

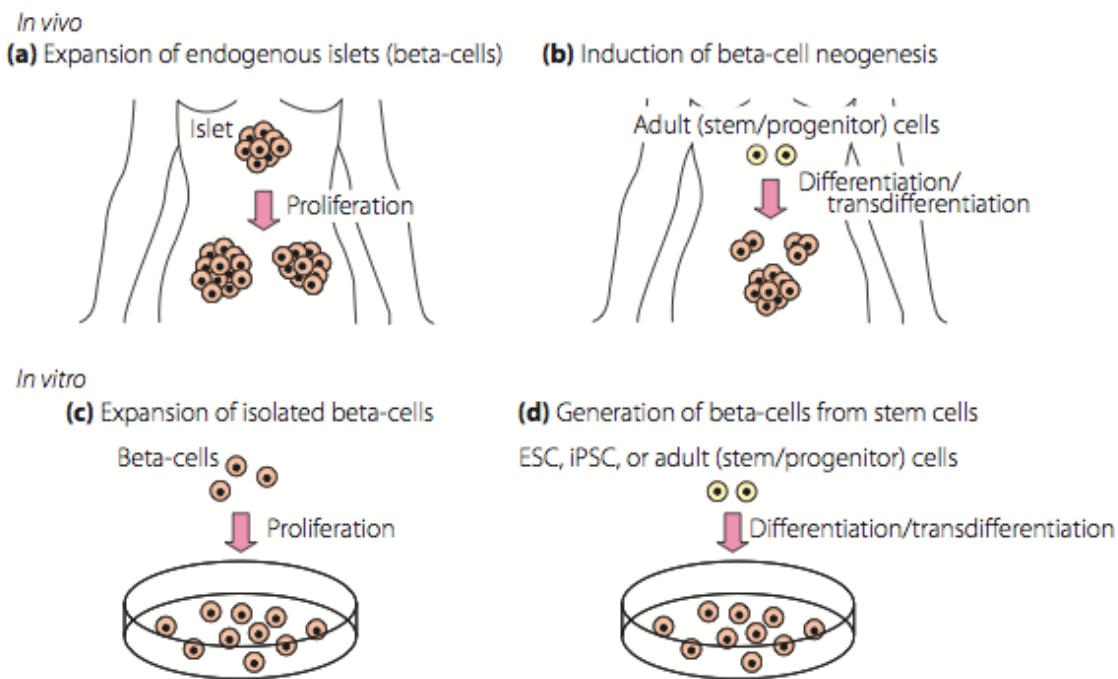
In vitro transdifferentiatie in het algemeen wordt echter beschouwd als weinig informatief door de adaptatie van de cellen aan het *in vitro* milieu waardoor het *in vivo* fenotype verloren gaat.

3.4 ALGEMENE CONCLUSIE β -CEL PRODUCTIE *IN VITRO*:

Tegenwoordig kan men geen volwaardige functionele volwassen β -cellen genereren *in vitro*. Meer onderzoek is vereist om de protocollen te optimaliseren, want transplantatie van functionele β -cellen is immers het ultieme doel. De bron met het meeste succes m.b.t. een toepassing in de kliniek is deze die het vlotst beschikbaar zal zijn voor een zo groot mogelijk aantal patiënten, ESC's genieten door hun hoge proliferatiecapaciteit *in vitro* tegenwoordig de voorkeur van de meeste onderzoekers.

4. REGENERATIEVE THERAPIEËN VOOR DIABETES.

Ook al verschillen de type 1 en type 2 diabetes in hun pathogenese, het herstel van de β -cel functie blijft bij beide types het doel voor de ontwikkeling van een verbeterde therapie. In theorie zijn er twee manieren om het aantal β -cellen in het lichaam te herstellen, namelijk het “regenereren” of het “vervangen van de verloren of dysfunctionele β -cel massa. De verschillende theoretische benaderingen voor een regeneratieve therapie voor β -cel zijn schematisch weergegeven in figuur 7. Als eerste wordt stimulatie van de endogene regeneratie van de pancreaseilandjes behandeld. Vervolgens wordt het reprogrammeren van pancreascellen tot het β -cel fenotype *in vivo* besproken en de celtransplantatie komt het laatst aan bod.



Figuur 7: De verschillende benaderingen voor een regeneratieve therapie voor β -cel. Men onderscheidt *in vivo* en *in vitro* methoden. De *in vivo* strategieën omvatten het promoten van de endogene regeneratie van de pancreaseilandjes. De mogelijke bronnen voor deze laatste zijn de endogene β -cellen, de stem- of progenitorcellen en de adulte cellen in de pancreas. Daartegenover onderscheidt men de *in vitro* methoden of celtherapieën. De *in vitro* bekomen β -cel transplanteert men in het lichaam. Figuur met uitleg uit “Current status of regeneration of pancreatic β -cells (Minami and Seino 2013).

4.1 STIMULEREN VAN DE ENDOGENE REGENERATIE

Het stimuleren van de regeneratie *in vivo* zou een toepassing in de kliniek kunnen vinden wanneer dit op een gecontroleerde manier kan worden gestuurd in de diabetespatiënt. Een eerste manier om dit te bekomen is deze waarbij men tracht de reeds actief aanwezige mechanismen voor endogene regeneratie, met als belangrijkste mechanisme de β -cel proliferatie, te bevorderen.

Opmerking: er bestaan, in theorie, ook nog twee bijkomende mogelijkheden voor β -cel regeneratie, namelijk de β -cel dedifferentiatie tegengaan en het blokkeren van β -cel apoptose zoals het bestrijden van de auto-immuun reacties bij diabetes type 1 (Migliorini, Bader et al. 2014). Immunomodulatie kan men bekomen op verschillende manieren. Compleet Freund’s adjuvans (CFA) en stamcellen hebben immunomodulatie eigenschappen: haematopoetische stamcel transplantatie(HSCT) en “umbilical cord

blood" (UCB) transfusie kunnen tolerantie induceren bij auto-immuunziekten. Deze worden hier verder buiten beschouwing gelaten.

Talrijke studies zijn uitgevoerd betreffende het effect van proliferatie- en differentiatie- bevorderende moleculen op de endogene pancreas regeneratie.

De gastro-intestinale hormonen zijn glucagon-like peptide-1 (GLP-1), glucose afhankelijk insulintrope polypeptide (GIP), Cholecystokinin (CCK), en Gastrine. Naast hun rol in de regulatie van voedselopname hebben deze peptiden ook een rol in de glucose-afhankelijke insuline secretie en β -cel expansie. Door deze eigenschappen worden ze een potentiële kandidaat voor de behandeling van diabetes type 2.

Groefactoren hebben belangrijke functies tijdens de groei en differentiatie van de cellen in het embryo en voor de regeneratie en homeostase in adulte weefsels. Ze zijn echter minder geschikt voor administratie in het lichaam door hun effect op meerdere weefsels. Daarom zijn ze vooral van belang voor *in vitro* onderzoek.

Nicotinamide behoort tot de vitamine β -groep en bezit een anti-diabetisch effect in bepaalde situaties. Dit effect is vooral door het herstellen van NAD⁺ gehaltes (nicotinamide adenine dinucleotide) in de cel.

Meer recent is ook aangetoond dat de molecule GABA de β -cel massa kan regenereren en een reversie van de hyperglycemie veroorzaakt.

Conclusie:

De regulatie van β -cel massa is georganiseerd op meerdere niveaus. Er bestaan zowel systemische signalen tussen de organen als lokale paracrine en autocrine invloeden binnen het orgaan, tussen de cellen van de pancreas. Er zijn dus verschillende metabole wegen aanwezig in het lichaam om de endogene regeneratie van de pancreas te activeren (Migliorini, Bader et al. 2014).

4.2 REPROGRAMMEREN VAN ADULTE CELLEN IN VIVO

Gedifferentieerde cellen bezitten nog een graad van plasticiteit, een tweede manier om de regeneratie van de pancreas te verhogen is d.m.v. het reprogrammeren van cellen. Men tracht dus het fenotype van andere cellen te sturen in de richting die men verlangt, namelijk de β -cel. De meest belovende celtypes die in aanmerking komen voor een regeneratieve therapie voor de β -cellen zijn de acinuscel en α -cel. Dit komt door hun nauwe verwantschap met de β -cel. Door toevoegen van exogene TF in het lichaam kan men deze cellen transdifferentiëren tot " β -like" cellen *in vitro*. Wat is nu hun belang in de kliniek t.o.v. de andere manieren voor β -cel regeneratie?

4.2.1 Acinuscellen.

Er bestaan enkele voordelen van transdifferentiatie van acinuscellen voor de β -cel regeneratie. In het kader van diabetes type 1 zijn deze gereprogrammeerde cellen minder vatbaar voor cytokine gemedieerde celdood (ontsnappen aan auto-immune en inflammatoire schade). De acinuscellen zijn tevens een abundant celtype in de pancreas, dus als deze techniek een toepassing vindt in de kliniek zijn de celtransplantatietechnieken misschien overbodig.

Het nadeel van transdifferentiatie van acinuscellen voor de β -cel regeneratie is dat de kennis van lateraal reprogrammeren vooral uit muismodellen komt en speciesverschillen vormen een rem voor de translatie naar de kliniek.

Klassiek worden de exogene TF tot expressie gebracht m.b.v. genetische benaderingen. Omdat genetische manipulaties een te hoog risico op oncogenese en insertiemutagenese met zich meebrengen, zoekt men naar veilige transdifferentiatiemethoden (Baeyens, Lemper et al. 2014). Er werd door transiënte toediening van epidermal growth factor (EGF) en ciliary neurotropic factor (CNTF) zonder virusvectoren een reversie van de hyperglycemie in diabetische muizen vastgesteld tot 248dagen. Er was een drempelwaarde van Ngn3 expressie vereist om acinaire tot β -cel te reprogrammeren, dit zou verband houden met een dedifferentiatiestap ook vastgesteld bij *in vitro* onderzoek (cf. supra) (Baeyens, Bonne et al. 2006). Hier werd aangetoond dat farmacologische behandeling een klinisch relevante plasticiteit in de

pancreas van levende volwassen muizen kan induceren. Dit wil dus zeggen dat celtransplantatie technieken mogelijks niet meer vereist zullen zijn voor de regeneratie van de β -cellen. De signaalcascades die de transdifferentiatie reguleren moeten nog verder bestudeerd worden.

4.2.2 α -cellen.

De transdifferentiatie van α -cel tot β -cel is de meest recente onderzoekstak. Het in 2009 gepubliceerd boek "pancreatic stem cells" van Juan Dominguez-Bendala spreekt hier nog niet over (Dominguez-Bendala, 2009). Toch zijn er aanwijzingen dat α -cellen belangrijk kunnen zijn in de kliniek.

Zo gebeurt de differentiatie tot de verschillende endocriene celtypes later dan de exo-endocrien cellijn determinatie in de ontwikkeling van de pancreas. Hierdoor zijn de α -cellen epigenetisch nog nauwer verwant met de β -cellen dan de acinuscellen (Bramswig, Everett et al. 2013). Misschien vormen ze daardoor ook een betere bron. α -cellen blijven gespaard in een diabetische patiënt, maar het aantal α -cellen is relatief laag vergeleken met het normale aantal β -cellen in een gezond individu, waardoor er mogelijks niet genoeg α -cellen beschikbaar zijn om een voldoende β -cel massa te krijgen.

Ook hebben sommige studies de inductie van interconversie van intra eiland celtypes naar het β -cel fenotype aangetoond d.m.v. genmanipulaties. Een directe omzetting van glucagon-producerende α -cellen in β -cellen kan dus plaatsvinden onder sommige omstandigheden *in vivo*. Verschillende onderzoekers linkten de ectopische expressie van Pax4 met de omzetting van α - tot β -cel en een verhoogde capaciteit tot regeneratie (Collombat, Xu et al. 2009, Al-Hasani, Pfeifer et al. 2013). Deze verhoogde regeneratiecapaciteit was echter niet genoeg om de diabetische toestand te beëindigen.

4.3.3 Conclusie voor de transdifferentiatie *in vivo*:

Er bestaan cellen die nog nauwer verwant zijn aan de β -cel, zoals de acinaire cellen en α -cellen. Deze laatste zijn voldoende plastisch en vormen tegenwoordig de meest belovende cellen voor transdifferentiatie tot β -cel. *In vivo* transdifferentiatie heeft een toekomst in de kliniek en vormen een alternatief voor de celtransplantatie technieken. Een uitspraak van Juan Domingez Bendala gaat nog verder en stelt dat transdifferentiatie misschien haasje over zal doen om een toepassing te vinden in de kliniek met de celtherapieën. Een grondiger inzicht in de heterogeniteit en de epigenetische status van de endocriene cellen is een vereiste.

4.3. CELTRANSPLANTATIE VAN DE *IN VITRO* GEPRODUCEERDE β -CEL

In dit onderdeel worden de verschillende aspecten die van belang zijn voor een celtransplantatie behandeld, namelijk de klinische verbetering van de symptomen, de vlotte beschikbaarheid van de te transplanteren cellen, de veiligheid na transplantatie en de overleving van de getransplanteerde cellen in de patiënt.

4.3.1 Klinische verbetering van de symptomen.

De optimalisatie van isolatie- en transplantatietechnieken van de eiland van Langerhans bij de mens vormen het bewijs dat een celtransplantatie toepasbaar is in de kliniek. In een notendop kan gesteld worden dat er na transplantatie een reversie van de hyperglycemie en klinische symptomen van diabetes mogelijk is gedurende meer dan 1 jaar bij de muis (Ryan, Paty et al. 2005).

Het doel van een celtherapie voor regeneratie van de β -cellen is een functionele β -cel inplanten in het lichaam. De productie van deze β -cel *in vitro* werd reeds vroeger behandeld (cf. supra). Tegenwoordig zoeken we echter nog steeds naar een methode om *in vitro* een functionele β -cel te produceren. Men weet echter dat ook de implantatie van progenitorstadia vanuit ESC's resulteert in klinisch gunstige resultaten, de terminale differentiatie tot β -cel gebeurt hierbij *in vivo* (Rezania, Bruin et al. 2012, Sui, Mfopou et al. 2013). Als het agentschap van de Amerikaanse overheid food and drug administration (FDA) een goedkeuring geeft, zijn de eerste klinische proeven voor transplantatie met pancreas specifieke progenitoren vanuit hESC gepland in 2014 (Bouwens, Houbracken et al. 2013).

4.3.2 Beschikbaarheid.

De meestbelovende bron voor een celtransplantatie zijn de pluripotente stamcellen, namelijk de ESC of iPSC. Deze bezitten de hoogste proliferatiecapaciteit *in vitro* en vormen dus een vlot beschikbare bron voor β -cellen. De transdifferentiatie *in vitro* naar β -cel en de replicatie van endogene β -cellen zijn van ondergeschikt belang omdat ze een relatief te lage proliferatiecapaciteit hebben.

4.3.3 Veiligheid.

Veiligheid vormt het grootste probleem voor een celtransplantatie met pluripotente stamcellen. ESC bezitten immers mutagene en carcinogene eigenschappen. Ze vormen teratomas na insertie in het lichaam, waardoor ze eerder als onveilige bron worden aanzien.

De twee mogelijke types van pluripotente stamcellen zijn de ESC's en de iPSC's. Men heeft de keuze over welk type met zal gebruiken voor een celtransplantatie. In de literatuur spreekt men tegenwoordig over een "rise and relative fall" van iPSC. De huidige visie is dat ze helemaal geen voordelen bezitten tegenover ESC in de kliniek. iPSC vormen ook teratomas *in vivo*. Bij het reprogrammeren *in vitro* kunnen mutaties geïnduceerd worden en oncogenen geactiveerd worden, dit geldt zowel voor genetische als niet-genetische technieken. iPSC zouden, in vergelijking met ESC, sneller verouderen en nog sporen van hun oorspronkelijke epigenetische geheugen bevatten na reprogrammatie. (Puri and Nagy 2012).

4.3.4 Overleving van de getransplanteerde cellen.

Allorectie vormt een ander probleem. Verschillende mogelijke strategieën bestaan om hun overleving na implantatie te verhogen.

Micro- en macro-omkapseling worden beschreven om de overleving na transplantatie van pluripotente stamcellen te verhogen. Er wordt een barrière gemaakt voor de cellulair immunoreacties door een kapsel aan te brengen rond de getransplanteerde cellen. Wanneer één groot kapsel rond alle getransplanteerde cellen aangebracht wordt heet dit macro-omkapseling. Wanneer kleinere kapsels rond een groepje cellen wordt aangebracht, bv. rondom een eiland van Langerhans, heet dit micro-omkapseling. Deze strategie beschermt echter niet tegen cytokine gemedieerde immunoreacties en er moet nog voldoende voeding en zuurstof beschikbaar zijn voor de omkapselde cellen. Optimalisatie van deze techniek is dus nog vereist. Adulte stamcellen hebben ook een nut bij het probleem van allorectie van een transplant. MSC's bezitten pro-angiogene en immunomodulerende eigenschappen, sommige wetenschappers hanteren zelfs de term "niche forming" eigenschappen. MSC's secreteren cytokines en groeifactoren die in verschillende contexten anti-apoptotische-, morfogene-, mitogene- en angiogene effecten hebben. Omwille van deze eigenschappen zouden ze de overleving van de getransplanteerde cellen kunnen verbeteren.

4.3.5 Conclusie celtherapieën:

Tegenwoordig kan men reeds zeer gunstige resultaten behalen met een celtherapie in muismodellen. De pluripotente stamcellen vormen de meest beschikbare bron voor een celtherapie door hun hoogste proliferatiecapaciteit, deze tracht men te differentiëren tot β -cel *in vitro*. Bij het transplanteren van deze cellen worden tegenwoordig echter nog geen volledig gedifferentieerde β -cellen gebruikt, maar wel de meer ongedifferentieerde pancreasspecifieke progenitorstadia. Men hoopt echter in de toekomst wel de terminaal gedifferentieerde β -cellen te transplanteren. De twee grootste problemen m.b.t. de celtransplantatie met of vanuit pluripotente stamcellen zijn de onveiligheid en de afstoting van de getransplanteerde cellen (allorectie).

BESPREKING

Stamcellen hebben nu zeker hun plaats veroverd als onderzoeksmodel en ook de regeneratieve geneeskunde wint aan belang. Er moet echter opgemerkt worden dat we niet te hard van stapel gaan lopen als we de termen stamcel en regeneratieve geneeskunde in dezelfde zin horen. Door de twee bijzondere eigenschappen van stamcellen, namelijk hun onbeperkte proliferatiecapaciteit en de mogelijkheid om te differentiëren tot elk celtype worden ze soms aanzien als een wondermiddel dat alle beschadigde of verdwenen weefsel terug kan herstellen. In dit werk werd duidelijk dat zelfs de regeneratie van slechts één celtype m.b.v. stamcellen niet zo eenvoudig is als op het eerste zicht zou blijken.

Er bestaan naast stamcelbenaderingen nog andere mogelijkheden in de regeneratie van de β -cel populatie met therapeutisch potentieel. Men kan pancreascellen, namelijk de acinuscel en α -cel, transdifferentiëren *in vivo* tot β -cellen. Deze laatste zijn voldoende plastisch en vormen tegenwoordig de meest belovende cellen voor transdifferentiatie tot β -cel. *In vivo* transdifferentiatie heeft een toekomst in de kliniek en vormt een alternatief voor de celtransplantatie technieken. Een uitspraak van Juan Dominguez-Bendala gaat nog verder en stelt dat transdifferentiatie misschien haasje over zal doen over de celtherapieën. Het beter begrijpen van de heterogeniteit en de epigenetische status van de endocriene cellen is hier een vereiste.

Het grootste translatiepotentieel ligt tegenwoordig bij de celtransplantaties van pluripotente stamcellen, door hun onbeperkte proliferatiecapaciteit *in vitro*. Er moet wel nog gewerkt worden aan de terminale differentiatie tot "functionele β -cel". Het percentage van de productie van " β -like" cellen *in vitro* ligt gemiddeld laag. Voor meer info zie review: "current status of regeneration of pancreatic β -cells" (Minami and Seino 2013). De overleving van het transplant en de veiligheid na implantatie zijn de twee voornaamste problemen.

Onderzoek naar de verschillende reprogrammeermogelijkheden, namelijk transdifferentiatie van adulte cellen en verticaal programmeren van stamcellen doen aan een soort van kruisbestuiving. Vooruitgang in de wetenschappelijke kennis omtrent zowel de fundamentele stamcelbiologie als de translatie van stamcellen naar de kliniek is zeker. Er is reeds lange weg afgelegd. Men is nu tot de fase gekomen van klinische proeven voor een celtransplantatie van pancreasspecifieke progenitorcellen ontwikkeld vanuit hESC bij de mens. Deze zijn gepland in 2014.

De twee belangrijkste bevindingen die volgen uit deze literatuurstudie zijn enerzijds, dat alle info voor de reprogrammatie van (stam-)cellen komt uit het bestuderen van het differentiatieproces *in vivo* van ESC tot β -cel. Dit gebeurt gedurende de embryogenese. Kennis uit de ontwikkeling van de pancreas zorgt voor meer inzicht in het differentiëren van de verschillende cellijnen en de hoop is in de toekomst *in vitro* het proces te herhalen.

Anderzijds viel op dat klinisch relevante resultaten in de kliniek tot nu toe enkel werden geboekt wanneer de *in vivo* niche in de strategie is betrokken, daar ligt immers de sleutel tot succes. Er is een grondiger inzicht vereist in de mechanismen die die β -cel proliferatie, differentiatie en regeneratie reguleren *in vivo*.

REFERENTIES

- Al-Hasani, K., A. Pfeifer, M. Courtney, N. Ben-Othman, E. Gjernes, A. Vieira, N. Druelle, F. Avolio, P. Ravassard, G. Leuckx, S. Lacas-Gervais, D. Ambrosetti, E. Benizri, S. Jacob, P. Gounon, J. Ferrer, G. Gradwohl, H. Heimberg, A. Mansouri and P. Collombat (2013). "Adult Duct-Lining Cells Can Reprogram into beta-like Cells Able to Counter Repeated Cycles of Toxin-Induced Diabetes." Developmental Cell **26**(1): 86-100.
- Baeyens, L., S. Bonne, T. Bos, I. Rooman, C. Peleman, T. Lahoutte, M. German, H. Heimberg and L. Bouwens (2009). "Notch Signaling as Gatekeeper of Rat Acinar-to-beta-Cell Conversion in Vitro." Gastroenterology **136**(5): 1750-1760.
- Baeyens, L., S. Bonne, M. S. German, P. Ravassard, H. Heimberg and L. Bouwens (2006). "Ngn3 expression during postnatal in vitro beta cell neogenesis induced by the JAK/STAT pathway." Cell Death and Differentiation **13**(11): 1892-1899.
- Baeyens, L., M. Lemper, G. Leuckx, S. De Groef, P. Bonfanti, G. Stange, R. Shemer, C. Nord, D. W. Scheel, F. C. Pan, U. Ahlgren, G. Q. Gu, D. A. Stoffers, Y. Dor, J. Ferrer, G. Gradwohl, C. V. E. Wright, M. Van de Castele, M. S. German, L. Bouwens and H. Heimberg (2014). "Transient cytokine treatment induces acinar cell reprogramming and regenerates functional beta cell mass in diabetic mice." Nature Biotechnology **32**(1): 76-+.
- Beattie, G. M., P. Itkin-Ansari, V. Cirulli, G. Leibowitz, A. D. Lopez, S. Bossie, M. I. Mally, F. Levine and A. Hayek (1999). "Sustained proliferation of PDX-1(+) cells derived from human islets." Diabetes **48**(5): 1013-1019.
- Bouwens, L., I. Houbracken and J. K. Mfopou (2013). "The use of stem cells for pancreatic regeneration in diabetes mellitus." Nature Reviews Endocrinology **9**(10): 598-606.
- Bouwens, L. and D. G. Pipeleers (1998). "Extra-insular beta cells associated with ductules are frequent in adult human pancreas." Diabetologia **41**(6): 629-633.
- Bramswig, N. C., L. J. Everett, J. Schug, C. Dorrell, C. Y. Liu, Y. P. Luo, P. R. Streeter, A. Naji, M. Grompe and K. H. Kaestner (2013). "Epigenomic plasticity enables human pancreatic alpha to beta cell reprogramming." Journal of Clinical Investigation **123**(3): 1275-1284.
- Butler, A. E., L. Cao-Minh, R. Galasso, R. A. Rizza, A. Corradin, C. Cobelli and P. C. Butler (2010). "Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy." Diabetologia **53**(10): 2167-2176.
- Cai, J., C. Yu, Y. X. Liu, S. Chen, Y. X. Guo, J. Yong, W. Lu, M. X. Ding and H. K. Deng (2010). "Generation of Homogeneous PDX1(+) Pancreatic Progenitors from Human ES Cell-derived Endoderm Cells." Journal of Molecular Cell Biology **2**(1): 50-60.
- Collombat, P., X. B. Xu, P. Ravassard, B. Sosa-Pineda, S. Dussaud, N. Billestrup, O. D. Madsen, P. Serup, H. Heimberg and A. Mansouri (2009). "The Ectopic Expression of Pax4 in the Mouse Pancreas Converts Progenitor Cells into alpha and Subsequently beta Cells." Cell **138**(3): 449-462.
- D'Amour, K. A., A. D. Agulnick, S. Eliazer, O. G. Kelly, E. Kroon and E. E. Baetge (2005). "Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm." Nature Biotechnology **23**(12): 1534-1541.
- Dominguez-Bendala, J. and C. Ricordi (2012). "Present and future cell therapies for pancreatic beta cell replenishment." World Journal of Gastroenterology **18**(47): 6876-6884.
- Dor, Y., J. Brown, O. I. Martinez and D. A. Melton (2004). "Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation." Nature **429**(6987): 41-46.
- Eberhard, D., M. Kragl and E. Lammert (2010). "'Giving and taking': endothelial and beta-cells in the islets of Langerhans." Trends in Endocrinology and Metabolism **21**(8): 457-463.

Fraker, C. A., S. Alvarez, P. Papadopoulos, J. Giraldo, W. Y. Gu, C. Ricordi, L. Inverardi and J. Dominguez-Bendala (2007). "Enhanced oxygenation promotes beta-cell differentiation in vitro." Stem Cells **25**(12): 3155-3164.

Houbracken, I., E. de Waele, J. Lardon, Z. D. Ling, H. Heimberg, I. Rooman and L. Bouwens (2011). "Lineage Tracing Evidence for Transdifferentiation of Acinar to Duct Cells and Plasticity of Human Pancreas." Gastroenterology **141**(2): 731-U451.

Jin, L., T. Feng, H. P. Shih, R. Zerda, A. Luo, J. Hsu, A. Mahdavi, M. Sander, D. A. Tirrell, A. D. Riggs and H. T. Ku (2013). "Colony-forming cells in the adult mouse pancreas are expandable in Matrigel and form endocrine/acinar colonies in laminin hydrogel." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **110**(10): 3907-3912.

Kobayashi, T., T. Yamaguchi, S. Hamanaka, M. Kato-Itoh, Y. Yamazaki, M. Ibata, H. Sato, Y. S. Lee, J. Usui, A. S. Knisely, M. Hirabayashi and H. Nakauchi (2010). "Generation of Rat Pancreas in Mouse by Interspecific Blastocyst Injection of Pluripotent Stem Cells." Cell **142**(5): 787-799.

Kopp, J. L., C. L. Dubois, A. E. Schaffer, E. G. Hao, H. P. Shih, P. A. Seymour, J. N. Ma and M. Sander (2011). "Sox9(+) ductal cells are multipotent progenitors throughout development but do not produce new endocrine cells in the normal or injured adult pancreas." Development **138**(4): 653-665.

Kushner, J. A. (2013). "The role of aging upon beta cell turnover." Journal of Clinical Investigation **123**(3): 990-995.

Lardon, J., S. De Breuck, I. Rooman, L. Van Lommel, M. Kruhoffer, T. Orntoft, F. Schuit and L. Bouwens (2004). "Plasticity in the adult rat pancreas: Transdifferentiation of exocrine to hepatocyte-like cells in primary culture." Hepatology **39**(6): 1499-1507.

Magnuson, M. A. and A. B. Osipovich (2013). "Pancreas-Specific Cre Driver Lines and Considerations for Their Prudent Use." Cell Metabolism **18**(1): 9-20.

Meier, J. J., A. E. Butler, Y. Saisho, T. Monchamp, R. Galasso, A. Bhushan, R. A. Rizza and P. C. Butler (2008). "beta-Cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans." Diabetes **57**(6): 1584-1594.

Messier, B. and C. P. Leblond (1960). "Cell Proliferation and Migration as Revealed by Radioautography after Injection of Thymidine-H-3 into Male Rats and Mice." American Journal of Anatomy **106**(3): 247-285.

Mfopou, J. K., B. Chen and I. Mateizel (2010). "Noggin, retinoids, and fibroblast growth factor regulate hepatic or pancreatic fate of human embryonic stem cells (vol 138, pg 2233, 2010)." Gastroenterology **139**(6): 2224-2224.

Migliorini, A., E. Bader and H. Lickert (2014). "Islet cell plasticity and regeneration." Molecular Metabolism.

Minami, K. and S. Seino (2013). "Current status of regeneration of pancreatic beta-cells." Journal of Diabetes Investigation **4**(2): 131-141.

Moore, K. A. and I. R. Lemischka (2006). "Stem cells and their niches." Science **311**(5769): 1880-1885.

Muschler, G. E., C. Nakamoto and L. G. Griffith (2004). "Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering." Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume **86A**(7): 1541-1558.

Narushima, M., N. Kobayashi, T. Okitsu, Y. Tanaka, S. A. Li, Y. Chen, A. Miki, K. Tanaka, S. Nakaji, K. Takei, A. S. Gutierrez, J. D. Rivas-Carrillo, N. Navarro-Alvarez, H. S. Jun, K. A. Westerman, H. Noguchi, J. R. T. Lakey, P. Leboulch, N. Tanaka and J. W. Yoon (2005). "A human beta-cell line for transplantation therapy to control type 1 diabetes." Nature Biotechnology **23**(10): 1274-1282.

Nir, T., D. A. Melton and Y. Dor (2007). "Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration." Journal of Clinical Investigation **117**(9): 2553-2561.

Ouziel-Yahalom, L., M. Zalzman, L. Anker-Kitai, S. Knoller, Y. Bar, M. Glandt, K. Herold and S. Efrat (2006). "Expansion and redifferentiation of adult human pancreatic islet cells." Biochemical and Biophysical Research Communications **341**(2): 291-298.

Pan, F. C., E. D. Bankaitis, D. Boyer, X. B. Xu, M. Van de Casteele, M. A. Magnuson, H. Heimberg and C. V. E. Wright (2013). "Spatiotemporal patterns of multipotentiality in Ptf1a-expressing cells during pancreas organogenesis and injury-induced facultative restoration." Development **140**(4): 751-764.

Pinho, A. V., I. Rooman, M. Reichert, N. De Medts, L. Bouwens, A. K. Rustgi and F. X. Real (2011). "Adult pancreatic acinar cells dedifferentiate to an embryonic progenitor phenotype with concomitant activation of a senescence programme that is present in chronic pancreatitis." Gut **60**(7): 958-966.

Puri, M. C. and A. Nagy (2012). "Concise Review: Embryonic Stem Cells Versus Induced Pluripotent Stem Cells: The Game Is On." Stem Cells **30**(1): 10-14.

Rankin, M. M., C. J. Wilbur, K. Rak, E. J. Shields, A. Granger and J. A. Kushner (2013). "beta-Cells Are Not Generated in Pancreatic Duct Ligation-Induced Injury in Adult Mice." Diabetes **62**(5): 1634-1645.

Rezania, A., J. E. Bruin, M. J. Riedel, M. Mojibian, A. Asadi, J. Xu, R. Gauvin, K. Narayan, F. Karanu, J. J. O'Neil, Z. L. Ao, G. L. Warnock and T. J. Kieffer (2012). "Maturation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Pancreatic Progenitors Into Functional Islets Capable of Treating Pre-existing Diabetes in Mice." Diabetes **61**(8): 2016-2029.

Russ, H. A., Y. Bar, P. Ravassard and S. Efrat (2008). "In vitro proliferation of cells derived from adult human beta-cells revealed by cell-lineage tracing." Diabetes **57**(6): 1575-1583.

Ryan, E. A., B. W. Paty, P. A. Senior, D. Bigam, E. Alfidhli, N. M. Kneteman, J. R. T. Lakey and A. M. J. Shapir (2005). "Five-year follow-up after clinical islet transplantation." Diabetes **54**(7): 2060-2069.

Schaffer, A. E., K. K. Freude, S. B. Nelson and M. Sander (2010). "Nkx6 Transcription Factors and Ptf1a Function as Antagonistic Lineage Determinants in Multipotent Pancreatic Progenitors." Developmental Cell **18**(6): 1022-1029.

Seaberg, R. M., S. R. Smukler, T. J. Kieffer, G. Enikolopov, Z. Asghar, M. B. Wheeler, G. Korbitt and D. van der Kooy (2004). "Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages." Nature Biotechnology **22**(9): 1115-1124.

Speier, S., A. Gjinovci, A. Charollais, P. Meda and M. Rupnik (2007). "Cx36-mediated coupling reduces beta-cell heterogeneity, confines the stimulating glucose concentration range, and affects insulin release kinetics." Diabetes **56**(4): 1078-1086.

Stefan, Y., L. Orci, F. Malaisse-lagae, A. Perrelet, Y. Patel and R. H. Unger (1982). "Quantitation of Endocrine Cell Content in the Pancreas of Non-Diabetic and Diabetic Humans." Diabetes **31**(8): 694-700.

Sui, L., J. K. Mfopou, B. Chen, K. Sermon and L. Bouwens (2013). "Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Pancreatic Endoderm Reveals a Site-Specific Survival, Growth, and Differentiation." Cell Transplantation **22**(5): 821-830.

Teta, M., M. M. Rankin, S. Y. Long, G. M. Stein and J. A. Kushner (2007). "Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors." Developmental Cell **12**(5): 817-826.

Thorel, F., V. Nepote, I. Avril, K. Kohno, R. Desgraz, S. Chera and P. L. Herrera (2010). "Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss." Nature **464**(7292): 1149-1154.

Wang, L. and P. S. Leung (2013). "The role of renin-angiotensin system in cellular differentiation: Implications in pancreatic islet cell development and islet transplantation." Molecular and Cellular Endocrinology **381**(1-2): 261-271.

Weinberg, N., L. Ouziel-Yahalom, S. Knoller, S. Efrat and Y. Dor (2007). "Lineage tracing evidence for in vitro dedifferentiation but rare proliferation of mouse pancreatic beta-cells." Diabetes **56**(5): 1299-1304.

Weir, G. C. and S. Bonner-Weir (2013). "Islet beta cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death." Year in Diabetes and Obesity **1281**: 92-105.

Xiao, X. W., Z. A. Chen, C. Shiota, K. Prasad, P. Guo, Y. El-Gohary, J. Paredes, C. Welsh, J. Wiersch and G. K. Gittes (2013). "No evidence for beta cell neogenesis in murine adult pancreas." Journal of Clinical Investigation **123**(5): 2207-2217.

Xu, X. F., V. L. Browning and J. S. Odorico (2011). "Activin, BMP and FGF pathways cooperate to promote endoderm and pancreatic lineage cell differentiation from human embryonic stem cells." Mechanisms of Development **128**(7-10): 412-427.

Zhou, Q., J. Brown, A. Kanarek, J. Rajagopal and D. A. Melton (2008). "In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells." Nature **455**(7213): 627-U630.