

DIABETIS AVUI



LA PLASTICITAT CEL·LULAR COM A POSSIBLE DIANA TERAPÈUTICA DE LA DIABETIS.

NOÈLIA TÉLLEZ i BESOLÍ, PhD
Grup de Diabetis i Metabolisme
CIBERDEM, IDIBELL-UB



Lab.4136
Pavelló de Govern
Facultat de Medicina-Campus de Bellvitge
Feixa Llarga s/n
08907- L'Hospitalet de Llobregat



934020149/934035804



934035804



ntellez@idibell.cat

1. Introducció.

La Diabetis Mellitus (DM) és una malaltia degenerativa caracteritzada per una pèrdua total (per la DM1) o parcial (per la DM2) de la massa de cèl·lules beta pancreàtiques. Així doncs, l'aplicació de la teràpia cel·lular i/o regenerativa pot considerar-se adequada per avançar en la curació de la malaltia.

La teràpia regenerativa es basa en la capacitat d'alguns tipus cel·lulars per autorrenovar-se i “convertir-se” en altres cèl·lules amb un fenotip diferent. Aquest procés de “conversió” s'anomena diferenciació cel·lular, i la capacitat que té una cèl·lula per modificar el seu fenotip en funció dels senyals que rep, s'anomena plasticitat cel·lular. No totes les cèl·lules de l'organisme posseeixen aquesta característica, i les que sí, conegudes com a “cèl·lules mare” o cèl·lules troncales (de l'anglès, *stem cells*), poden classificar-se en quatre subtipus: cèl·lules mare totipotents, cèl·lules mare pluripotents, cèl·lules mare multipotents i cèl·lules mare unipotents.

Les cèl·lules mare totipotents són les que poden donar lloc a qualsevol cèl·lula de l'organisme, incloent els teixits embrionaris (el llinatge germinal i les 3 capes o llinatges primitius embrionaris) i els extraembrionaris (membranes fetals i placenta), i per tant a un individu complet. En el cas de l'ésser humà, les úniques cèl·lules totipotents són les que es formen a partir del zigot durant els 2-3 primers dies, ja que aquestes poden evolucionar cap a les cèl·lules de qualsevol dels llinatges embrionaris però també cap a les cèl·lules de la placenta.

Les cèl·lules mare pluripotents són les que poden donar lloc a qualsevol tipus cel·lular corresponent a algun dels 3 llinatges embrionaris (ectoderm, mesoderm i endoderm) així com al sac vitel·lí o al llinatge germinal. Aquests tipus de cèl·lules mare són les conegudes com cèl·lules mare embrionàries, ja que s'extrauen de l'embrió als 4-5 dies posteriors a la fecundació de l'òocit i per tant, quan ja ha passat l'etapa de totipotencialitat.

Les cèl·lules mare multipotents són les que poden donar lloc a qualsevol tipus cel·lular del seu propi llinatge embrionari. Per exemple, les cèl·lules mare mesenquimals de moll d'òs en tenir naturalesa mesodèrmica poden derivar cap a tipus cel·lulars que tinguin el mateix origen mesodèrmic (adipòcits, osteòcits... etc).

Les cèl·lules mare unipotents són les que tenen capacitat d'autorenovar-se i diferenciar-se cap a un tipus cel·lular concret. Un exemple d'aquest tipus de cèl·lules el trobem en les cèl·lules de la pell que posseeixen una excepcional capacitat d'autorenovació.

2. Origen de la cèl·lula beta pancreàtica - Desenvolupament

Embrionari

Les cèl·lules beta pancreàtiques s'originen a partir de cèl·lules precursoras multipotents que són comuns pels 2 compartiments pancreàtics, l'exocrí i l'endocrí. Aquestes cèl·lules, d'origen endodèrmic, es troben en els extrems de l'arbre ductal proto-diferenciat que es forma per invaginació de l'epiteli, al voltant del dia E9.5 del desenvolupament embrionari de ratolí. Aquests progenitors es caracteritzen per expressar Pdx-1 (de l'anglès *Pancreatic Duodenal homeobox-1*), Ptf1a (de l'anglès *Pancreas Transcription Factor subunit-1*), cMyc i CPA (Carboxipeptidasa A) (1).

Tot i que a dia E9.5 es poden trobar algunes cèl·lules endocrines, majoritàriament cèl·lules alfa (positives per glucagó), no és fins als dies E10.5 - E13.5 del desenvolupament pancreàtic quan s'inicia la gran onada de diferenciació del compartiment endocrí del pàncrees, període anomenat "transició secundària" que perdura fins el dia E16.5 (revisat a (2;3)).

Durant aquests darrers anys, l'ús de tècniques de marcatge genètic que han permès fer un seguiment del llinatge d'un tipus cel·lular concret, han servit per identificar marcadors dels progenitors de les cèl·lules endocrines. En aquest sentit, la identificació del factor de transcripció Neurogenina 3 (neurog3) com a regulador mestre de la formació de les cèl·lules endocrines (4;5), i les xarxes de factors de transcripció que participen en aquest procés (6), han significat un gran avenç en el camp de la biologia del desenvolupament i de la medicina regenerativa.

Actualment està ben acceptat que una cèl·lula que expressa neurog3 esdevindrà una cèl·lula endocrina, però existeixen discrepàncies respecte a com aquest progenitor decideix diferenciar-se cap a una cèl·lula positiva per glucagó, insulina, somatostatina, polipèptid pancreàtic o grelina. Un estudi recent, dona suport a que el destí de la cèl·lula neurog3⁺ està pre-determinat (7), mentre que n'hi ha d'altres on es planteja que el destí de la cèl·lula neurog3⁺ dependrà del balanç dels nivells d'expressió entre Pax4 i Arx que portaria cap a la formació de cèl·lules beta, en el cas de que "guanyés" Pax4 o bé cap a cèl·lules alfa si fos Arx el que s'expressés en més quantitat (8).

Desgraz i Herrera (7) han demostrat, de manera excel·lent, que cada cèl·lula neurog3⁺ dona lloc a una cèl·lula endocrina diferent, i que el seu destí es decideix en un estadi molt inicial. La propera pregunta que caldria respondre és, quins són els factors que determinen el futur d'aquesta cèl·lula neurog3⁺?. Es tracta d'una resposta a estímuls extracel·lulars del microambient on es troben aquestes cèl·lules, o es tracta d'una pre-determinació anterior a l'expressió de neurog3?. Les respostes a aquestes

preguntes serien de gran utilitat per definir noves estratègies en el camp de la medicina regenerativa del pàncrees endocrí.

L'evolució de les cèl·lules neurog3⁺ cap al llinatge endocrí passa per l'expressió d'altres factors de transcripció claus pel correcte funcionament de les cèl·lules beta diferenciades, com són PDX-1 i NKX6.1 entre d'altres. Aquestes dues proteïnes presenten llocs d'unió a la regió promotora del gen de la insulina, i per tant en regulen la seva expressió.

Un cop definit el llinatge endocrí, i concretament el de cèl·lula productora d'insulina, aquestes cèl·lules presenten una taxa de proliferació molt elevada, mantenen un fenotip pseudo-diferenciat i no assoliran un estat completament madur fins a 3 setmanes després del naixement, coincidint amb el deslletament, en el cas dels rossegadors.

3. Regeneració de la cèl·lula beta pancreàtica en el pàncrees adult

3.1. Obtenció de cèl·lules productores d'insulina *in vivo*.

La formació de les cèl·lules beta s'origina a partir de l'epiteli ductal proto-diferenciat. Aquesta observació ja va ser publicada l'any 1972 per Pictet i Rutter (9), on es va descriure la formació d'acinis immadurs i d'illots a partir dels ductes embrionaris. Més tard, i fent servir tècniques més refinades, es van corroborar aquestes observacions i és per això, juntament amb d'altres evidències que es comentaran a continuació, que els ductes pancreàtics es consideren una font de noves cèl·lules pancreàtiques.

L'estudi de la regeneració endocrina del pàncrees es remunta a l'any 1902, quan *Lagesse i de la Roche* (10) descriuen l'aparició de nous illots provinents dels ductes pancreàtics en un model de dany pancreàtic, el d'obstrucció ductal. Tot i que posteriorment es va continuar treballant per entendre la biologia de l'illot i l'abast de la regeneració endocrina, no va ser fins el darrer terç del segle XX quan es van començar a aplicar noves tècniques més sensibles, com la incorporació de timidina-H3 (ràdio-isòtop timidina tritiada) o BrdU (Bromo-deoxi-Uridina, anàleg de la Timidina) a les cèl·lules que dupliquen el seu ADN, que permetien estudiar de manera més acurada la capacitat proliferativa de les cèl·lules endocrines.

Els models *in vivo* de regeneració pancreàtica més utilitzats han estat el de l'obstrucció ductal i el de la pancreatectomia subtotal. Ambdós models resulten en un increment de la massa de cèl·lules beta. L'aparició de petites agrupacions de cèl·lules beta escampades per la porció exocrina del pàncrees, d'illots en contacte amb els ductes i de cèl·lules ductals expressant insulina han portat a reforçar la hipòtesi de que

les cèl·lules ductals adultes també poden considerar-se cèl·lules progenitores endocrines (11-13).

Aquests models de dany pancreàtic presenten com a característica comú, un augment del nombre de cèl·lules amb fenotip ductal que es troben formant complexos tubulars (**Figura 1**). S'ha postulat que aquestes cèl·lules amb fenotip ductal podrien albergar cèl·lules mare multipotents (12-14). En aquest sentit, l'administració de molècules amb accions mitogèniques com EGF, Gastrina o anàlegs del GLP-1 als animals sotmesos a lesió pancreàtica incrementa l'expansió de la massa beta (15-17). Aquest augment de la massa beta ve donat, principalment, per la diferenciació de cèl·lules amb fenotip ductal que actuen com a progenitors de les cèl·lules endocrines (18). Així bé, els mecanismes que es troben regulant aquests processos romanen, encara, desconeguts.

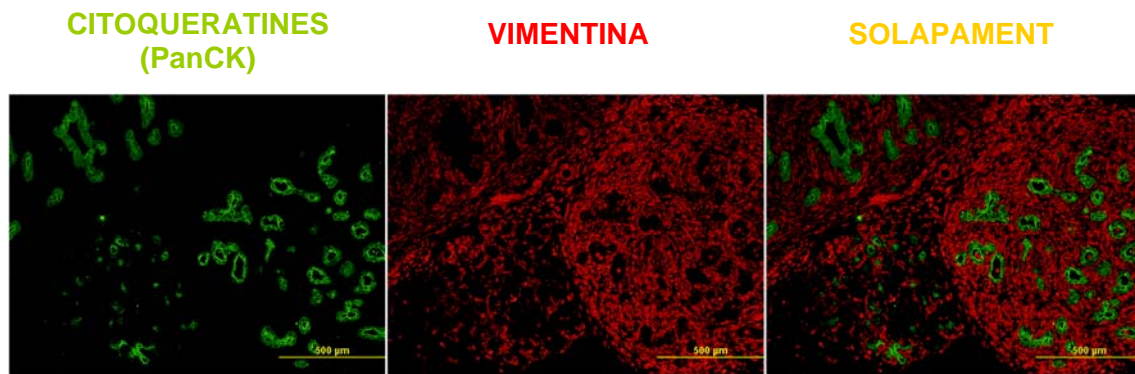


Figura 1. Complexos tubulars formats per cèl·lules amb fenotip ductal que es generen durant els primers dies després de la pancreatectomia. Les imatges corresponen a un remanent pancreàtic de rata, 3 dies després de la cirurgia i s'han visualitzat mitjançant un microscopi confocal espectral. En verd queden marcades les cèl·lules amb fenotip ductal que expressen citoqueratines (CK) i, com es pot apreciar en la imatge, es troben formant estructures tubulars. En vermell s'observen les cèl·lules marcades per vimentina, que es tracta d'un filament intermedi expressat en les cèl·lules mesenquimals. Aquestes cèl·lules es troben envoltant els complexos tubulars, i presenten un índex de proliferació cel·lular molt elevat (no es mostra en aquestes imatges).

Actualment, des de principis del segle XXI, les tècniques de marcatge genètic induïble han permès estudiar d'una manera més precisa l'origen de les cèl·lules beta que es generen després de la lesió del pàncrees. Tot i que aquesta tècnica ha representat un pas de gegant en el camp de la biologia cel·lular, l'elecció del gen a marcar determina clarament el resultat de la investigació. L'any 2008, el grup de Boston dirigit per la Dra. Susan Bonner-Weir va descriure, mitjançant el marcatge genètic de les cèl·lules ductals utilitzant el promotor del gen de l'anhidrasa carbònica, que aquestes cèl·lules actuaven de progenitores de les cèl·lules del compartiment endocrí i exocrí del pàncrees de ratolí adult sotmés a lesió (19). Un any més tard, els estudis realitzats pel grup de Barcelona dirigit pel Dr. Jorge Ferrer descriuen, mitjançant el marcatge genètic de les cèl·lules ductals utilitzant el promotor del gen que codifica pel factor nuclear hepàtic-1 β (hnf-1 β , de l'anglès *hepatic nuclear factor-1 β*), que en el pàncrees del ratolí adult danyat, les cèl·lules ductals donen lloc, exclusivament, a cèl·lules ductals (20). Ambdós estudis fan servir el mateix model de lesió pancreàtica, el d'obstrucció ductal, i tots dos són de gran qualitat i rigurositat. A més, aquest darrer estudi, posa en entredit l'existència de fenòmens de transdiferenciació acino-ductal que s'havien proposat anteriorment (18;21;22). Les discrepàncies entre els resultats obtinguts podrien originar-se en el moment de l'elecció del marcatge genètic, és a dir, en la tria del gen utilitzat per marcar la cèl·lula progenitora potencial a estudiar.

Reforçant la idea de l'existència de cèl·lules precursors en l'epiteli ductal del pàncrees adult danyat, el mateix any 2009 i a la prestigiosa revista *Cell*, es va publicar un treball realitzat pel grup del Dr. Harry Heimberg (23) on es mostrava la presència de cèl·lules neurog3⁺ en l'epiteli ductal del pàncrees del ratolí adult, i que aquestes cèl·lules eren capaces de diferenciar-se cap a cèl·lules beta en un cultiu d'explants pancreàtics embrionaris.

Fins aquí s'ha parlat de les cèl·lules ductals adultes com a possibles progenitores de les cèl·lules pancreàtiques, que es tracta d'una hipòtesi de treball amb més d'un segle d'antiguetat i sobre la qual, actualment, s'hi recolzen un bon nombre d'estudis de gran rellevància. Aquesta hipòtesi, però, no exclou la possibilitat de que altres tipus cel·lulars pancreàtics puguin actuar de progenitors de les cèl·lules beta en determinats casos. En aquest sentit, la reprogramació de les cèl·lules acinars mitjançant la modificació genètica d'aquestes *in vivo* va quedar pal·lesa l'any 2008, quan el grup del Dr. Melton va demostrar la diferenciació de les cèl·lules acinars cap a un fenotip beta *in vivo* (24). En aquest cas es va injectar, directament en la regió del pàncrees esplènic dels ratolins, una barreja de 3 vectors d'expressió que codificaven pels gens neurog3,

pdx-1 i mafA, i que tenien com a cèl·lules diana les dels acinis pancreàtics. Deu dies després de la transferència gènica es va observar l'aparició de noves cèl·lules beta en la zona tractada del pàncrees, demostrant, d'aquesta manera, que les cèl·lules acinars es poden reprogramar per donar lloc a cèl·lules beta *in vivo*.

Per altra banda, Liu i col·laboradors (25) han mostrat la presència de cèl·lules progenitores formant part dels propis illots pancreàtics i que en determinades situacions, com són l'edat o el dany pancreàtic, poden donar lloc a cèl·lules productores d'insulina. La naturalesa d'aquestes cèl·lules, però, roman desconeguda. En canvi, Thorel i col·laboradors (26) han demostrat que les cèl·lules alfa poden transdiferenciar-se cap a cèl·lules beta, *in vivo*. Aquest estudi, publicat en la revista Nature aquest any 2010, utilitza la tècnica d'eliminació cel·lular per determinació genètica combinada amb el marcatge genètic. En aquest cas, l'abolició de les cèl·lules beta pancreàtiques es realitza mitjançant l'expressió del receptor de la toxina diftèrica sota el promotor de la insulina. D'aquesta manera, quan s'administra la toxina diftèrica als ratolins, moren selectivament i per apoptosi, les cèl·lules beta pancreàtiques. Amb aquest mètode els autors aconsegueixen que un 99% de les cèl·lules beta pancreàtiques desapareguin. Aquest model de destrucció pràcticament total de les cèl·lules beta permet estudiar quines cèl·lules són les responsables del repoblament de la massa cel·lular beta. En aquest sentit, els autors d'aquest treball proposen les cèl·lules alfa com a cèl·lules progenitores de les cèl·lules beta i per poder demostrar aquesta hipòtesi utilitzen el promotor del glucagó per marcar les cèl·lules alfa, i seguir-les en el procés de regeneració de la massa beta. Finalment, creuant aquests dos ratolins i administrant la toxina diftèrica observen que veritablement les cèl·lules alfa poden donar lloc a noves cèl·lules beta en situacions de destrucció massiva de la massa beta pancreàtica.

3.2. Obtenció de cèl·lules productores d'insulina *in vitro*.

Com ja s'ha comentat anteriorment, els models de lesió pancreàtica fan pensar que les cèl·lules de l'epiteli ductal podrien retenir la capacitat progenitora per diferenciar-se cap a cèl·lules beta pancreàtiques. A més, en algun cas s'ha observat transdiferenciació cap a cèl·lula beta a partir de cèl·lules similars a ducte ("duct-like cells") presents en el teixit pancreàtic metaplàsic que eventualment podrien tenir un origen acinar. Així doncs, es tractaria d'una transdiferenciació acino-endocrina passant per un fenotip ductal intermig. Aquests indicis van portar a estudiar la capacitat de les cèl·lules ductals i de les cèl·lules acinars per donar lloc a cèl·lules beta en una placa de cultiu. Tot i que les condicions del cultiu són veritablement diferents a les que s'obtenen en els models *in vivo* i per tant l'extrapolació de resultats presenta certes

limitacions, aquesta aproximació permet analitzar, de manera més acurada, el paper concret de certes molècules sobre la plasticitat cel·lular i a més, estudiar el comportament del teixit pancreàtic humà.

El cultiu enriquit de cèl·lules acinars passa per una sèrie d'estadis que presenten un perfil d'expressió gènica i proteica concret i diferent per cada estadi. Inicialment la major part de cèl·lules expressen amilasa, lipasa i Ptfα-p48, que correspon al patró d'expressió proteica de les cèl·lules acinars. Posteriorment, passen a expressar marcadors clarament ductals que en presència d'EGF i LIF en el medi de cultiu, acabaran expressant marcadors de cèl·lula beta diferenciada (revisat per Baeyens i Bowens (27)). En el procés de transdiferenciació acino-ductal-insular sembla que el contacte cèl·lula-cèl·lula mitjançant les proteïnes d'adhesió dependents de Calci, Cadherines, podrien jugar un paper important, ja que l'expressió d'E-Cadherina en les cèl·lules acinars és necessària per la transdiferenciació acino-insular (28). De la mateixa manera que el bloqueig de la via de senyalització de Notch, descrit per la diferenciació de les cèl·lules endocrines durant el desenvolupament pancreàtic en l'embrió (29;30), també és un requeriment per obtenir cèl·lules beta a partir del cultiu de cèl·lules acinars (31).

Per altra banda, també s'han obtingut cèl·lules beta pancreàtiques a partir del cultiu de cèl·lules ductals (32;33). En aquest cas el mètode utilitzat per obtenir el cultiu primari de les cèl·lules ductals determina, en part, el rendiment del procés de transdiferenciació. Quan el cultiu inicial està format per cèl·lules ductals que representen un 90% de puresa, el nombre de cèl·lules beta obtingudes al final del procés és considerablement més baix que si es parteix d'un cultiu heterogeni que conté una part de cèl·lules d'origen mesenquimal (34). Aquestes cèl·lules mesenquimals, que provenen de l'estroma pancreàtic, podrien secretar factors inductors de la diferenciació pels quals, les cèl·lules ductals en serien diana i respondrien diferenciant-se cap a un fenotip cel·lular beta pancreàtic. Aquesta hipòtesi es recolza en la, ja coneguda, interacció epiteli-mesenquima que és requerida per una correcta formació del patró d'estructuració de les cèl·lules embrionàries per formar els teixits i per l'adequada morfogènesi de l'endoderm pancreàtic durant la formació del pàncrees embrionari (35-39).

Fins ara s'ha parlat de la plasticitat de les cèl·lules pancreàtiques, de la capacitat que tenen per diferenciar-se cap a un fenotip beta *in vitro*, sense necessitat de modificar forçadament la seva genètica. Per altra banda, aplicant tècniques de modificació genètica, s'han obtingut cèl·lules productores d'insulina a partir de cèl·lules hepàtiques (40;41). Concretament, la inducció d'expressió de PDX-1 en les cèl·lules

hepàtiques mitjançant transferència gènica, afavoreix l'expressió d'insulina i de les proteïnes de la maquinària secretora de les cèl·lules beta resultant en una població de cèl·lules beta funcionals (42).

4. Obtenció de cèl·lules productores d'insulina a partir de cèl·lules pluripotencials induïdes (iPS)

A principis del segle XXI, coincidint amb la presidència de George Bush als Estats Units i la seva política contrària a la recerca amb cèl·lules mare embrionàries, va sorgir la idea de generar cèl·lules mare pluripotencials, similars a les embrionàries, a partir de cèl·lules somàtiques adultes. Aquesta aproximació esquivava, per una banda, els conflictes ètics existents envers la utilització de cèl·lules embrionàries humanes i per una altra, la limitació que representa el rebuig a l'empelt al·logènic, ja que es podrien realitzar autotrasplantaments.

4.1. Inducció de pluripotencialitat a les cèl·lules adultes.

La transferència nuclear de cèl·lules somàtiques (SCNT, de l'anglès *Somatic Cell Nuclear Transfer*), desenvolupada durant els anys 60, va demostrar que el nucli d'una cèl·lula adulta diferenciada es podia reprogramar cap a un estat totipotent quan s'injectava en un oòcit anucleat. Tenint en compte aquesta capacitat que tenen les cèl·lules adultes per ser reprogramades, l'any 2007, el grup del Dr. Yamanaka demostra, per primer cop, que les cèl·lules somàtiques adultes poden

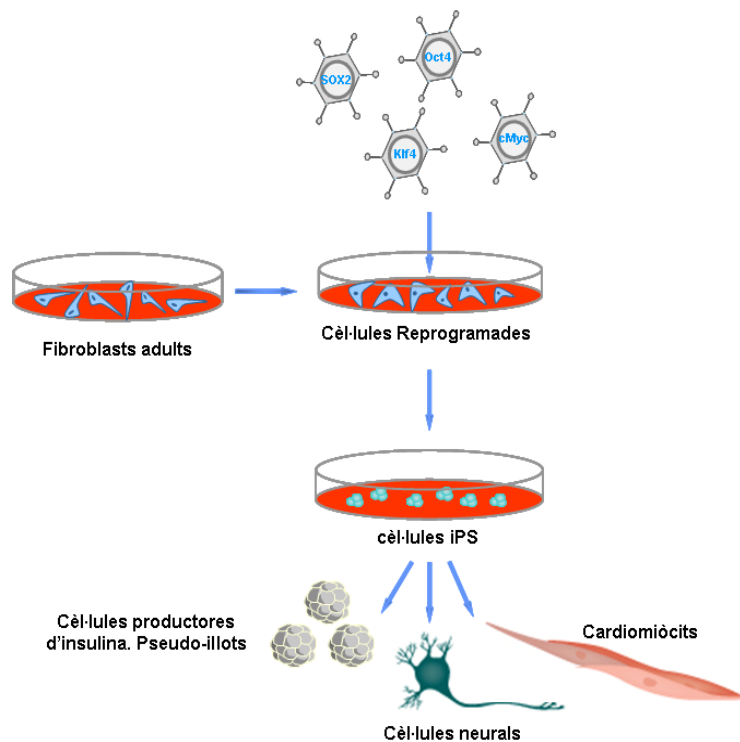


Figura 2. Esquema de la generació de cèl·lules multipotents a partir de cèl·lules adultes i diferenciació d'aquestes cap a cèl·lules de diferents llinatges. La inducció de pluripotencialitat consisteix en la transferència gènica de 4 factors de transcripció mitjançant adenovirus que fan de vectors d'expressió. Cèl·lules iPS: cèl·lules troncales pluripotencials induïdes, de l'anglès *induced Pluripotent Stem*.

revertir a un estat pluripotencial mitjançant la inserció de 4 gens: Oct4, Sox2, c-Myc i Klf4. A més, aquestes cèl·lules es poden diferenciar cap a cèl·lules dels diferents llinatges seguint els protocols de diferenciació utilitzats per les cèl·lules mare embrionàries (43;44) (**Figura 2**).

Actualment, s'han aconseguit reprogramar fibroblasts adults provinents de pacients diabètics inserint, només, 3 factors de transcripció, Oct-4, Sox2 i Klf4. L'eliminació de cMyc de la barreja inicial ha estat possible per l'addició d'un inhibidor de la histona deacetilasa 1 (HDAC1, de l'anglès *Histone Deacetylase 1*), l'àcid valproic (45). A més, aquestes cèl·lules poden derivar cap a cèl·lules productores d'insulina. (Revisat per Borowiak i Melton (46).

La plasticitat cel·lular és una característica que presenten les cèl·lules eucariotes i que té un potencial terapèutic molt interessant. En aquest sentit, els resultats obtinguts fins al moment són alentadors i porten a pensar que cada cop estem més a prop de la generació de cèl·lules beta, productores d'insulina, en el laboratori. De totes formes hi ha un seguit de limitacions que encara s'han de superar, com ara aconseguir unes cèl·lules beta totalment diferenciades. Les cèl·lules que resulten dels protocols de diferenciació de les cèl·lules pluripotencials, tant les induïdes com les embrionàries, expressen i secreten insulina en resposta a glucosa, però a uns nivells molt més baixos dels que ho fan les cèl·lules beta madures. L'expressió de més d'una hormona per part d'aquestes cèl·lules, normalment insulina i glucagó, i la manca d'expressió de factors de transcripció claus pel correcte funcionament de la cèl·lula beta, com mafA, caracteritzen aquestes cèl·lules de desdiferenciades.

Finalment, tot i que cal avançar en el coneixement de la plasticitat cel·lular i concreament, en l'obtenció de cèl·lules beta pancreàtiques completament funcionals, l'atac autoimmunitat contra les cèl·lules beta en els pacients diabètics tipus 1 continua sent el major obstacle al que s'enfronta la medicina regenerativa aplicada a la diabetis.

5. Bibliografia

1. **Zhou Q, Law AC, Rajagopal J, Anderson WJ, Gray PA, Melton DA** 2007 A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis. *Dev Cell* 13:103-114
2. **Oliver-Krasinski JM, Stoffers DA** 2008 On the origin of the beta cell. *Genes Dev* 22:1998-2021
3. **Jorgensen MC, Ahnfelt-Ronne J, Hald J, Madsen OD, Serup P, Hecksher-Sorensen J** 2007 An illustrated review of early pancreas development in the mouse. *Endocr Rev* 28:685-705

4. **Apelqvist A, Li H, Sommer L, Beatus P, Anderson DJ, Honjo T, Hrabe dA, Lendahl U, Edlund H** 1999 Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 400:877-881
5. **Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F** 2000 neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1607-1611
6. **Wilson ME, Scheel D, German MS** 2003 Gene expression cascades in pancreatic development. *Mech Dev* 120:65-80
7. **Desgraz R, Herrera PL** 2009 Pancreatic neurogenin 3-expressing cells are unipotent islet precursors. *Development* 136:3567-3574
8. **Collombat P, Xu X, Ravassard P, Sosa-Pineda B, Dussaud S, Billestrup N, Madsen OD, Serup P, Heimberg H, Mansouri A** 2009 The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells. *Cell* 138:449-462
9. **Pictet RL, Clark WR, Williams RH, Rutter WJ** 1972 An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. *Dev Biol* 29:436-467
10. **Laguesse E, de la Roche AG.** 1902 Les ilots de Langerhans dans le pancreas du Cobaye après ligature. *C R Seances Soc Biol* 54:854-857
11. **Rosenberg L, Brown RA, Duguid WP** 1983 A new approach to the induction of duct epithelial hyperplasia and nesidioblastosis by cellophane wrapping of the hamster pancreas. *J Surg Res* 35:63-72
12. **Wang RN, Kloppel G, Bouwens L** 1995 Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats. *Diabetologia* 38:1405-1411
13. **Bonner-Weir S, Baxter LA, Schuppin GT, Smith FE** 1993 A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes* 42:1715-1720
14. **Sharma A, Zangen DH, Reitz P, Taneja M, Lissauer ME, Miller CP, Weir GC, Habener JF, Bonner-Weir S** 1999 The homeodomain protein IDX-1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration. *Diabetes* 48:507-513
15. **Xu G, Kaneto H, Lopez-Avalos MD, Weir GC, Bonner-Weir S** 2006 GLP-1/exendin-4 facilitates beta-cell neogenesis in rat and human pancreatic ducts. *Diabetes Res Clin Pract* 73:107-110
16. **Rooman I, Bouwens L** 2004 Combined gastrin and epidermal growth factor treatment induces islet regeneration and restores normoglycaemia in C57Bl6/J mice treated with alloxan. *Diabetologia* 47:259-265
17. **Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S** 1999 Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* 48:2270-2276
18. **Rooman I, Lardon J, Bouwens L** 2002 Gastrin stimulates beta-cell neogenesis and increases islet mass from transdifferentiated but not from normal exocrine pancreas tissue. *Diabetes* 51:686-690
19. **Inada A, Nienaber C, Katsuta H, Fujitani Y, Levine J, Morita R, Sharma A, Bonner-Weir S** 2008 Carbonic anhydrase II-positive pancreatic cells are progenitors for both endocrine and exocrine pancreas after birth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:19915-19919

20. **Solar M, Cardalda C, Houbracken I, Martin M, Maestro MA, De Medts N, Xu X, Grau V, Heimberg H, Bouwens L, Ferrer J** 2009 Pancreatic exocrine duct cells give rise to insulin-producing beta cells during embryogenesis but not after birth. *Dev Cell* 17:849-860
21. **Rooman I, Heremans Y, Heimberg H, Bouwens L** 2000 Modulation of rat pancreatic acinoductal transdifferentiation and expression of PDX-1 in vitro. *Diabetologia* 43:907-914
22. **Lardon J, Huyens N, Rooman I, Bouwens L** 2004 Exocrine cell transdifferentiation in dexamethasone-treated rat pancreas. *Virchows Arch* 444:61-65
23. **Xu X, D'Hoker J, Stange G, Bonne S, De Leu N, Xiao X, Van de CM, Mellitzer G, Ling Z, Pipeleers D, Bouwens L, Scharfmann R, Gradwohl G, Heimberg H** 2008 Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell* 132:197-207
24. **Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA** 2008 In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 455:627-632
25. **Liu H, Guz Y, Kedeas MH, Winkler J, Teitelman G** 2010 Precursor cells in mouse islets generate new beta-cells in vivo during aging and after islet injury. *Endocrinology* 151:520-528
26. **Thorel F, Nepote V, Avril I, Kohno K, Desgraz R, Chera S, Herrera PL** 2010 Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature* 464:1149-1154
27. **Baeyens L, Bouwens L** 2008 Can beta-cells be derived from exocrine pancreas? *Diabetes Obes Metab* 10 Suppl 4:170-178
28. **Minami K, Okano H, Okumachi A, Seino S** 2008 Role of cadherin-mediated cell-cell adhesion in pancreatic exocrine-to-endocrine transdifferentiation. *J Biol Chem* 283:13753-13761
29. **Miralles F, Lamotte L, Couton D, Joshi RL** 2006 Interplay between FGF10 and Notch signalling is required for the self-renewal of pancreatic progenitors. *Int J Dev Biol* 50:17-26
30. **Parsons MJ, Pisharath H, Yusuff S, Moore JC, Siekmann AF, Lawson N, Leach SD** 2009 Notch-responsive cells initiate the secondary transition in larval zebrafish pancreas. *Mech Dev* 126:898-912
31. **Baeyens L, Bonne S, Bos T, Rooman I, Peleman C, Lahoutte T, German M, Heimberg H, Bouwens L** 2009 Notch signaling as gatekeeper of rat acinar-to-beta-cell conversion in vitro. *Gastroenterology* 136:1750-1760
32. **Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ** 2000 In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7999-8004
33. **Gao R, Ustinov J, Korsgren O, Otonkoski T** 2005 In vitro neogenesis of human islets reflects the plasticity of differentiated human pancreatic cells. *Diabetologia* 48:2296-2304
34. **Yatoh S, Dodge R, Akashi T, Omer A, Sharma A, Weir GC, Bonner-Weir S** 2007 Differentiation of affinity-purified human pancreatic duct cells to beta-cells. *Diabetes* 56:1802-1809
35. **Ball EM, Risbridger GP** 2001 Activins as regulators of branching morphogenesis. *Dev Biol* 238:1-12

36. **Ahnfelt-Ronne J, Ravassard P, Pardanaud-Galvieux C, Scharfmann R, Serup P** 2010 Mesenchymal Bmp signalling is required for normal pancreas development. *Diabetes*
37. **Duvillie B, Stetsyuk V, Filhoulaud G, Guillemain G, Scharfmann R** 2008 Control of pancreatic development by intercellular signals. *Biochem Soc Trans* 36:276-279
38. **Scharfmann R, Duvillie B, Stetsyuk V, Attali M, Filhoulaud G, Guillemain G** 2008 Beta-cell development: the role of intercellular signals. *Diabetes Obes Metab* 10 Suppl 4:195-200
39. **Duvillie B, Attali M, Bounacer A, Ravassard P, Basmaciogullari A, Scharfmann R** 2006 The mesenchyme controls the timing of pancreatic beta-cell differentiation. *Diabetes* 55:582-589
40. **Ferber S, Halkin A, Cohen H, Ber I, Einav Y, Goldberg I, Barshack I, Seiffers R, Kopolovic J, Kaiser N, Karasik A** 2000 Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med* 6:568-572
41. **Ber I, Shternhall K, Perl S, Ohanuna Z, Goldberg I, Barshack I, Benvenisti-Zarum L, Meivar-Levy I, Ferber S** 2003 Functional, persistent, and extended liver to pancreas transdifferentiation. *J Biol Chem* 278:31950-31957
42. **Sapir T, Shternhall K, Meivar-Levy I, Blumenfeld T, Cohen H, Skutelsky E, Eventov-Friedman S, Barshack I, Goldberg I, Pri-Chen S, Ben Dor L, Polak-Charcon S, Karasik A, Shimon I, Mor E, Ferber S** 2005 Cell-replacement therapy for diabetes: Generating functional insulin-producing tissue from adult human liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:7964-7969
43. **Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S** 2007 Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861-872
44. **Takahashi K, Yamanaka S** 2006 Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676
45. **Maehr R, Chen S, Snitow M, Ludwig T, Yagasaki L, Goland R, Leibel RL, Melton DA** 2009 Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:15768-15773
46. **Borowiak M, Melton DA** 2009 How to make beta cells? *Curr Opin Cell Biol* 21:727-732