



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Desenvolupament de noves estratègies per generar cèl·lules productores d'insulina

Marta Fontcuberta Pi-Sunyer

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

A fluorescence microscopy image showing a cluster of cells. The nuclei are stained blue, and the cytoplasm or other cellular components are stained red. The cells are irregular in shape and densely packed in the center, with some smaller cells scattered around. The background is dark, making the stained cells stand out.

**DESENVOLUPAMENT DE NOVES
ESTRATÈGIES PER GENERAR
CÈL·LULES PRODUCTORES
D'INSULINA**

MARTA FONTCUBERTA PI-SUNYER
TESI DOCTORAL 2018



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**DESENVOLUPAMENT DE NOVES ESTRATÈGIES
PER GENERAR CÈL·LULES PRODUCTORES DE
INSULINA.**

Tesi doctoral presentada per

Marta Fontcuberta Pi-Sunyer

Per optar al títol de

Doctora per la Universitat de Barcelona



**Institut
D'Investigacions
Biomèdiques
August Pi i Sunyer**

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció de la doctora **Rosa M Gasa** i del doctor **Ramon Gomis** en el Laboratori de Diabetis i Obesitat de l' IDIBAPS

Dra Rosa M Gasa Arnardich

Dr. Ramon Gomis de Barbarà

Marta Fontcuberta Pi-Sunyer

Barcelona, maig 2018

Abreviacions	19
Introducció	23
El pàncrees.....	25
La cèl·lula β pancreàtica.....	27
Biosíntesi de la insulina.....	27
Secreció de la insulina.....	28
Degradació de la insulina.....	30
Organogènesis pancreàtica.....	30
Especificació pancreàtics i transició primària (E8.5-E12.5).....	31
Transició secundària (E12.5-E16.5).....	36
Transició terciària.....	
Factors de transcripció claus del desenvolupament i manteniment de la cèl·lula β pancreàtica.....	37
Pdx1.....	38
Ngn3.....	39
Factors de transcripció activats per Ngn3.....	41
NeuroD1.....	41
Atoh8.....	41
Nkx2-2.....	42
Pax4.....	44
Insm1.....	45
Factors claus en la maduració de la cèl·lula β	46
Nkx6-1.....	46
Pax6.....	46
MafA.....	47
Implicació de l'epigenètica en el desenvolupament pancreàtic.....	48
Marca repressiva H3K27me3 i els seus reguladors.....	51
H3K27me3 en el desenvolupament pancreàtic.....	53
Diabetis Mellitus.....	55
Diabetis mellitus tipus 1.....	56
Història de la insulina.....	56
Teràpies pel tractament de la diabetis.....	57
Administració d'insulina exògena.....	57
Trasplantament de pàncrees o d'illots pancreàtics.....	58
Generació de cèl·lules β per trasplantament.....	59
Obtenció de cèl·lules β a partir de cèl·lules mare (ES).....	61
Obtenció de cèl·lules β a partir de cèl·lules pluripotents induïdes (iPSC).....	64
Obtenció de cèl·lules β a partir de cèl·lules especialitzades.....	68
Perspectives de futur.....	70
Hipòtesi i objectius	71
Resultats	75
PART1: Estudi dels efectes de la modulació de la marca H3K27me3 sobre	

l'activació del programa endocrino-pancreàtic en diferents models de diferenciació.....	77
Paper de la marca repressiva H3K27me3 en l'activitat transactivadora de Ngn3 en les cèl·lules mPAC.....	79
Estudi de la regulació temporal de marques d'histones en resposta a Ngn3.....	80
Efecte de Ngn3 sobre l'expressió de reguladors de la marca H3K27me3.....	82
Efecte de la inhibició de les demetilases de H3K27me3 en l'activitat transactivadora de Ngn3.....	82
Efecte de la inhibició de la metiltransferasa de H3K27me3 en l'activitat transactivadora de Ngn3.....	85
Els inhibidors químics no afecten l'expressió del transgèn Ngn3.....	88
Efecte del moment d'inhibició d'Ezh2 sobre l'activitat transactivadora de Ngn3.....	89
Efectes de la inhibició de Ezh2 en un model de diferenciació endocrina ex-vivo.....	91
Efectes de la inhibició de Ezh2 en la transdiferenciació endocrina de fibroblasts embrionaris de ratolí.....	93
Efectes de la inhibició de Ezh2 en l'activitat transactivadora de Ngn3 als fibroblasts embrionaris	93
Efecte de la inhibició d'Ezh2 en l'activitat transactivadora Pdx1+Ngn3+MafA als fibroblasts embrionaris.....	94
Efecte de la inhibició de Ezh2 en la diferenciació dirigida de cèl·lules pluripotents induïdes cap a cèl·lula β	96
Caracterització del protocol de diferenciació dirigida a partir de iPSC.....	96
Estudi de l'efecte de la inhibició de Ezh2 en el protocol de diferenciació dirigida a partir de iPSC.....	97
Discussió.....	101
PART2: Transdiferenciació de fibroblasts humans cap a cèl·lules productores d'insulina.....	101
Disseny del protocol de transdiferenciació de fibroblasts cap a cèl·lules productores d'insulina.....	111
Efecte del PNM sobre l'expressió dels gens endocrins en fibroblasts.....	114
Efecte del PNM sobre l'expressió dels gens específics de fibroblasts.....	114
Incorporació de nous factors de transcripció en el protocol de transdiferenciació....	116
Expressió de gens endocrins en fibroblasts transdiferenciats amb el protocol 5FT....	120
Expressió de gens fibroblàstics en fibroblasts transdiferenciats amb el protocol 5FT.....	122
Detecció d'insulina i de pèptid C en fibroblasts transdiferenciats amb el protocol 5FT.....	123
Validació del protocol 5FT en fibroblasts de diferents orígens.....	125
Viabilitat de les cel·lules Fibro- β	126
Cariotip de les cèl·lules Fibro- β	128
Expressió de gens endocrins a les cèl·lules Fibro- β a llarg termini.....	129
Secreció d'insulina de les cèl·lules Fibro- β	130
Flux de calci en les cèl·lules Fibro- β	131

Secreció d'insulina de les cèl·lules fibro- β in vivo.....	133
Estratègies per millorar la transdiferenciació de fibroblast humans	134
Addició d'inhibidors epigenètics.....	135
Addició de reguladors de vies de senyalització intracel·lular.....	135
Cultiu tridimensional (3D).....	136
Secreció d'insulina de les cèl·lules Fibro- β 3D.....	139
Secreció d'insulina de les cèl·lules Fibro- β 3D in vivo.....	139
Comparació de l'expressió gènica de les cèl·lules Fibro- β amb illots pancreàtics humans.....	140
Discussió.....	143
Resum.....	151
Conclusions.....	155
Materials i mètodes.....	159
Línies cel·lulars.....	161
Protocol i obtenció de línies cel·lulars.....	161
Protocol de viabilitat i mort cel·lular.....	163
Immunoprecipitació de cromatina (ChIP).....	164
Protocol extracció RNA i qRT-PCR.....	166
Protocol d'immunofluorescència.....	167
Protocol de Western blot.....	168
Protocol de secreció i contingut d'insulina.....	169
Protocol de detecció flux de calci.....	170
Transplantament de cèl·lules Fibro- β en ratolins.....	171
Transplantament de cèl·lules Fibro- β sota la càpsula renal d'animal immunodeprimit.....	171
Transplantament de cèl·lules Fibro- β a l'ull d'un ratolí C57black6.....	171
Bibliografia.....	173
Paper publicat.....	187
Agraïments.....	203

- Figura 1:** Representació esquemàtica de la anatomia del pàncrees humà. **p.25**
- Figura 2:** Comparació morfològica i cel·lular d'un illot pancreàtic de ratolí i de humà. **p.26**
- Figura 3:** Representació esquemàtica del processament de la insulina. **p.27**
- Figura 4:** Representació esquemàtica del mecanisme de secreció de la insulina en una cèl·lula β pancreàtica. **p.29**
- Figura 5:** Especificació de l'endoderma pancreàtic. **p.32**
- Figura 6:** Estadis temporals del desenvolupament del pàncrees de ratolí. **p.33**
- Figura 7:** Representació esquemàtica del desenvolupament del pàncrees en el ratolí. **p.34**
- Figura 8:** Factors de transcripció i vies de senyalització implicades en el desenvolupament de les diferents cèl·lules pancreàtiques. **p.35**
- Taula 1:** Representació dels fenotips pancreàtics dels models genètics de ratolí pels diferents factors de transcripció claus en el desenvolupament endocrí. **p.37**
- Figura 9:** Representació esquemàtica de l'expressió temporal de Ngn3 durant el desenvolupament del pàncrees de ratolí. **p.40**
- Figura 10:** Model de xarxes transcripcionals implicades en l'especificació de cèl·lules endocrines en les condicions de wildtype (WT), Nkx2.2^{KO} i Nkx2.2 ^{Δ endo}. **p.44**
- Figura 11:** Representació esquemàtica de la via d'especificació de la cèl·lula β i els principals factors de transcripció implicats. **p.48**
- Figura 12:** Representació il·lustrativa dels principals mecanismes epigenètics reguladors de l'expressió gènica. **p.49**
- Figura 13:** Representació il·lustrativa de la distribució de modificacions de la histona H3. **p.51**
- Figura 14:** Representació del procés de la regulació transcripcional a través de la acetilació o metilació de H3K27. **p.52**
- Figura 15:** Representació del programa epigenètic durant el diferenciació de la cèl·lula β pancreàtica. **p.54**
- Figura 16:** Imatge representativa de la història del descobriment i l'evolució de la insulina. **p.57**
- Taula 2:** Avantatges i inconvenients dels tipus cel·lulars utilitzats per processos de reprogramació cel·lulars. **p.60**
- Figura 17:** Imatge representativa d'estratègies per la generació de cèl·lules β funcionals. **p.61**
- Figura 18:** Desenvolupament pancreàtic en embrions de ratolins i en cultius de cèl·lules ES humanes. **p.62**
- Taula 3:** Principals estudis que descriuen la generació de cèl·lules productores d'insulina a partir de cèl·lules pluripotents. **p.66**
- Figura 19:** Principals fonts cel·lulars en protocols de transdiferenciació cap a cèl·lula productora d'insulina. **p.69**
- Figura 20:** Corbes temps-resposta de l'enriquiment en H3K27me3, H3K27ac i H3K4me3 i nivells de mRNA després de la introducció de NGN3 a les cèl·lules mPAC. **p.81**
- Figura 21:** Efectes de NGN3 sobre les l'expressió dels gens que codifiquen les demetilases JmjD3 i Utx i la metiltransferasa Ezh2 a les cèl·lules mPAC. **p.82**
- Figura 22:** Efectes de la inhibició química de les demetilases JmjD3 i Utx sobre la marca H3K27me3 a les cèl·lules mPAC. **p.83**
- Figura 23:** Efectes de la inhibició química de les demetilases JmjD3 i Utx sobre l'activació gènica en resposta a NGN3 a les cèl·lules mPAC. **p.84**

- Figura 24:** Efectes de GSK-J4 sobre l'enriquiment de H3K27ac a les cèl·lules mPAC infectades amb Ad-NGN3. **p.84**
- Figura 25:** Efectes de la inhibició química de la metiltransferasa Ezh2 sobre la marca H3K27me3 a les cèl·lules mPAC. **p.85**
- Figura 26:** Efectes de la inhibició química de la metiltransferasa Ezh2 sobre l'activitat transactivadora de NGN3 a les cèl·lules mPAC. **p.86**
- Figura 27:** Efectes d'EI-1 juntament amb l'activitat transactivadora de NGN3 sobre els nivells de la marca activadora H3K27ac a les cèl·lules mPAC. **p.87**
- Figura 28:** Efectes de l'inhibidor químic GSK-126 sobre l'activitat transactivadora de Ngn3 en les cèl·lules mPAC. **p.87**
- Figura 29:** Efectes dels inhibidors químics GSK-J4 i EI-1 sobre l'expressió a nivell proteic del transgèn Ngn3. **p.88**
- Figura 30:** Efecte del moment d'addició del inhibidor EI-1 sobre l'activitat transactivadora de Ngn3 a les cèl·lules mPAC. **p.89**
- Figura 31:** Efecte de la inhibició d'Ezh2 en la diferenciació endocrina de primordis pancreàtics cultivats *ex-vivo*. **p.91**
- Figura 32:** Efectes dels inhibidors químics d'Ezh2 sobre l'activitat transactivadora de Ngn3 a les cèl·lules MEFs. **p.93**
- Figura 33:** Efectes dels inhibidors químics d'Ezh2 sobre l'activitat gènica en resposta a PNM a les cèl·lules MEFs. **p.95**
- Figura 34:** Activació de gens endocrins en el protocol de diferenciació directa a partir de cèl·lules iPSC cap a cèl·lula β . **p.97**
- Figura 35:** Efecte de la inhibició d'Ezh2 en la diferenciació dirigida de cèl·lules humanes iPSC cap a cèl·lules β . **p.98**
- Figura 36:** Efecte de la inhibició d'Ezh2 sobre l'expressió de marcadors endocrins en la diferenciació dirigida de cèl·lules humanes iPSC cap a cèl·lules β . **p.99**
- Figura 37:** Disseny experimental i avaluació de l'eficiència de la reprogramació en les cèl·lules HFF10.3. **p.112**
- Figura 38:** Activació del gen de la *INSULINA* en resposta a PNM a les cèl·lules HFF10.3 cultivades en diferents medis de cultiu. **p.113**
- Figura 39:** Efecte de PNM sobre l'expressió de marcadors endocrins a les cèl·lules HFF10.3. **p.114**
- Figura 40:** Efectes de PNM sobre l'expressió de gens característics de fibroblasts a les cèl·lules HFF10.3. **p.115**
- Figura 41:** Anàlisi immunocitoquímic dels efectes de PNM sobre l'expressió de vimentina i insulina a les cèl·lules HFF10.3. **p.116**
- Figura 42:** Efecte de la combinació de factors de transcripció sobre els nivells de mRNA d'*INSULINA* a les cèl·lules HFF10.3. **p.117**
- Figura 43:** Estudi de l'efecte de la introducció de PNM juntament amb Pax4 a les cèl·lules HFF10.3. **p.117**
- Figura 44:** Estudi de l'efecte de la introducció de PNM i de Nkx2-2 a diferents moments del cultiu a les cèl·lules HFF10.3. **p.118**
- Figura 45:** Efecte de la combinació dels factors PNM, Pax4 i NKX2-2 a les cèl·lules HFF10.3. **p.119**

- Figura 46:** Efecte de la combinació de factors de transcripció sobre els nivells de mRNA d'*INSULINA* a les cèl·lules HFF10.3. **p.120**
- Figura 47:** Efecte de la introducció de PNM, Pax4 i NKX2-2 sobre l'expressió de marcadors endocrins i específics de la cèl·lula β a les cèl·lules HFF10.3. **p.121**
- Figura 48:** Efecte de la introducció de PNM, Pax4 i NKX2-2 sobre l'expressió de marcadors endocrins endògens a les cèl·lules HFF10.3. **p.122**
- Figura 49:** Efecte de la introducció de PNM, Pax4 i NKX2-2 sobre l'expressió de marcadors específics de fibroblasts a les cèl·lules HFF10.3. **p.123**
- Figura 50:** Anàlisi de l'expressió d'insulina i pèptid C a les cèl·lules reprogramades amb els 5FT. **p.124**
- Figura 51:** Efectes de la introducció de PNM, Pax4 i NKX2-2 en fibroblasts control. **p.125**
- Figura 52:** Efectes de la introducció de PNM, Pax4 i NKX2-2 en les cèl·lules procedents de pacient diabètic HDF1.13. **p.126**
- Figura 53:** Estudis de la viabilitat de les cèl·lules Fibro- β . **p.128**
- Figura 54:** Representació del cariotip obtingut en els fibroblasts transdiferenciats. **p.129**
- Figura 55:** Efectes de la introducció de PNM, Pax4 i Nkx2-2 als 21 de cultiu a les cèl·lules HFF10.3. **p.130**
- Figura 56:** Determinació de la secreció d'insulina i pèptid C de les cèl·lules Fibro- β *in vitro*.
- Figura 57:** Perfils del flux de calci en les cèl·lules β . **p.131**
- Figura 58:** Determinació del flux de calci en les cèl·lules Fibro- β . **p.133**
- Figura 59:** Determinació de la secreció de les cèl·lules Fibro- β *in vivo*. **p.134**
- Figura 60:** Efectes de la inhibició d'Ezh2 sobre la introducció del PNM, Pax4 i NKX2-2 en els fibroblasts. **p.135**
- Figura 61:** Efecte de l'addició de Forskolina i la Nicotinamida en el protocol de transdiferenciació. **p.136**
- Figura 62:** Efecte del cultiu tridimensional en el protocol de transdiferenciació de fibroblasts cap a cèl·lules productores d'insulina. **p.138**
- Figura 63:** Determinació de la secreció d'insulina en les cèl·lules Fibro- β cultivades en 2D i 3D. **p.139**
- Figura 64:** Determinació de la funcionalitat de les esferes Fibro- β *in vivo*. **p.140**
- Figura 65:** Comparació de l'expressió d'*INSULINA* en les cèl·lules Fibro- β , en de les cèl·lules β (generades a partir de iPSC) i en illots pancreàtics humans. **p.141**
- Figura 66:** Comparació de l'expressió de gens endocrins en les cèl·lules Fibro- β i en illots pancreàtics humans. **p.141**

ABREVIACIONES

ATP	Adenosina trifosfat
ARN	Àcid RiboNucleic
BrDU	<i>Bromodeoxyuridine</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> – Tampó fosfat salí
DNA	Àcid DesoxirriboNucleic
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
ECL	<i>Enhanced dchemiluminiscence</i> (quimioluminiscència augmentada)
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> (assaig per immunoabsorció lligat a enzims)
ETOH	Etanol
ESC	<i>Embryonic Stem Cells</i> (cèl·lules mare embrionàries)
EZH1	<i>Enhancer of zeste homologue 1</i>
EZH2	<i>Enhancer of zeste homologue 2</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Serum fetal Boví)
FT	Factor de transcripció
GCG	Glucagó
GCK	Glucocinasa
GLUT1/2	<i>Glucose transporter type 1/2</i>
H3	Histona 3
H3K27me3	Trimetilació de la lisina 27 de la Histona3
H3K27ac	Acetilació de la lisina 27 de la Histona3
H3K4me3	Trimetilació de la lisina 27 de la Histona3
HFF10.3	<i>Human Foreskin Fibroblast cells 10.3</i>
HDF	<i>Human Dermal Fibroblast cells</i>
HNF1α	<i>Hepatocyte nuclear factor 1 Alpha</i>
HNF1β	<i>Hepatocyte nuclear factor 1 Beta</i>
HNF1β	<i>Hepatocyte nuclear factor 1 Beta</i>
IAPP	<i>Islet Amyloid Polypeptide</i>
INS	Insulina
INSM1	<i>Insulinoma-associated 1 gene</i>
IPSC	<i>induced pluripotent stem cells</i> (Cèl·lules pluripotents induïdes)
KCNJ11	<i>Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 11</i>
KO	<i>Knock-out</i> (gen anul·lat)
JMJD3	<i>Jumonji domain containing -3</i>
MPC	<i>Multipotent Pancreatic Progenitor cells</i> (Cèl·lules progenitores pancreàtiques multipotents)
MAFA	<i>v-Maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A</i>
MAFB	<i>v-Maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B</i>
MEFs	<i>Mouse Embryonic Fibroblasts cells</i> (Fibroblasts embrionaris de ratolí)
MIN6	<i>Mouse Insulinoma cells</i>
mPAC-L20	<i>Mouse Pancreatic AdenoCarcinoma cells</i>
MTT	<i>(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>

NeuroD1	<i>Neurogenic differentiation 1</i> o BETA2
Ngn3	<i>Neurogenin3, Neurog3</i>
Nkx2-2	<i>NK2 Homeobox 2</i>
Nkx6-1	<i>NK6 Homeobox 1</i>
OD	Densitat Òptica
Pax6	<i>Paired Box 6</i>
PAX4	<i>Paired domain homeobox gene</i>
PC1	<i>Prohormone convertase 1</i>
PC2	<i>Prohormone convertase 2</i>
pCMV	Promotor de citomegalovirus
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacció en cadena de la polimerasa)
PcG	<i>Polycomb-Group</i>
PCR1	<i>Polycomb Repressive Complex 1</i>
PCR2	<i>Polycomb Repressive Complex 2</i>
Pdx1	<i>Pancreatic duodenal homeobox-1</i>
PFA	Paraformaldehid
PNM	Pdx1+Ngn3+MafA
PTF1A	<i>Pàncrees-specific transcription factor 1</i>
PVDF	<i>Polyvinilidene fluoride</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SDS	<i>Sodium Dodecil Sulfate</i>
SDS program	<i>Sequence detection system</i> (systema de detecció de seqüències)
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>
S.E.M	<i>Standard Error Mean</i> (Mitjana de l'error estàndard)
shRNA	<i>Short Hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small interference RNA</i>
SST	Somatostatina
SUR1	<i>Sulfonylurea receptors1</i>
S/P	Estreptomicina / penicil·lina
TBP	<i>TATA-box binding protein</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
Trx	Trithorax
Utx	(Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome)
FT	Factor de transcripció
ZnT8	<i>Zinc Transporter 8</i>

INTRODUCCIÓ

EL PÀNCREES

El pàncrees és una glàndula que es troba situada en la cavitat abdominal, darrera de l'estómac i connectada al duodè. Aquesta glàndula juga un paper important en el manteniment de la homeòstasi nutricional mitjançant la secreció d'enzims digestius i d'hormones endocrines. El pàncrees està compost per dos tipus de teixit, el teixit endocrí i el teixit exocrí.

La part exocrina és l'encarregada de la secreció d'enzim digestius (lipases, proteases i nucleases), d'electròlits i de secrecions alcalines que donen lloc al suc pancreàtic. El pàncrees exocrí està compost principalment per les cèl·lules acinars que formen acinis i les cèl·lules ductals, i correspon al 98% del volum total del pàncrees. En aquest context, l'aparició d'estímuls hormonals a les cèl·lules acinars provoca la secreció d'enzims digestius en forma de suc pancreàtic a l'intestí, a través de les cèl·lules ductals que formen el conducte.

D'altra banda, la part endocrina està formada per cinc tipus cel·lulars diferents que s'agrupen en els illots de Langerhans, distribuïts per tot el pàncrees. Cada tipus cel·lular endocrí secreta una hormona concreta, que serà alliberada al torrent sanguini gràcies a la presència de capil·lars que es situen a la proximitat d'aquestes estructures com s'observa a la Fig.1.

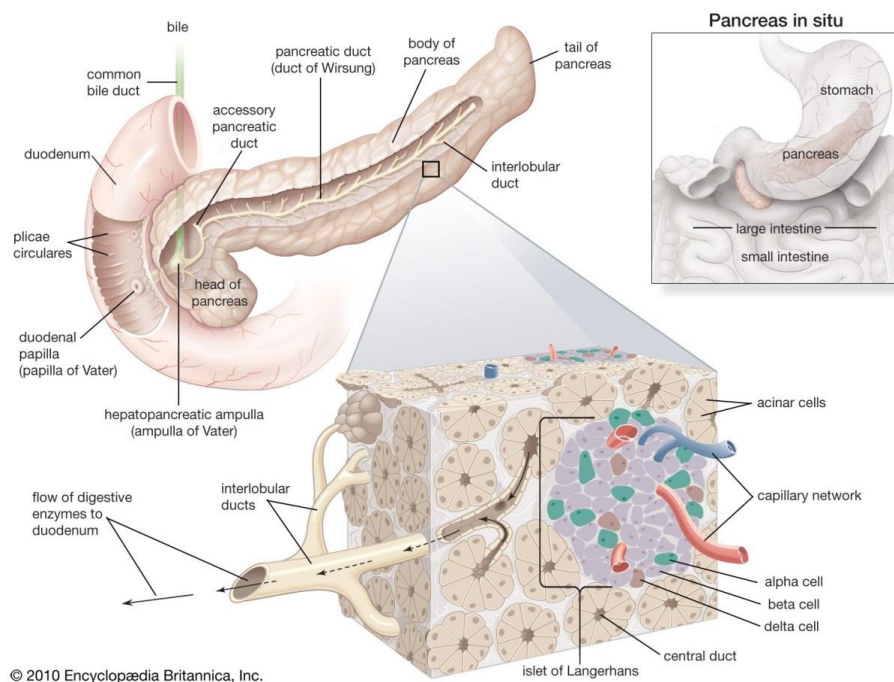


Figura 1. Representació esquemàtica de la anatomia del pàncrees humà.
(Enciclopèdia Britannica, 2010)

Les cèl·lules que formen l'illot de Langerhans són les cèl·lules β (Beta), les cèl·lules α (Alfa), les cèl·lules δ (Delta), les cèl·lules ξ (Èpsilon) i les cèl·lules PP (Polipèptid pancreàtic), encarregades de secretar respectivament les hormones insulina, glucagó, somatostatina, grelina i el polipèptid pancreàtic.

Les hormones més secretades pel pàncrees són la insulina i el glucagó. Aquestes hormones coordinen la regulació de la glucèmia en sang. En aquest context, quan incrementen els nivells de glucosa en sang, la insulina es alliberada per les cèl·lules β del pàncrees i és la responsable d'estimular la captació de glucosa per part del fetge, del múscul i del teixit adipós, provocant l'entrada i l'emmagatzematge de la glucosa en forma de glicogen. Contràriament, quan els nivells de glucosa en sang són baixos, el glucagó és alliberat per la cèl·lula α de l'illot pancreàtic i actua en el fetge activant el metabolisme del glicogen perquè es transformi de nou en glucosa i s'alliberi en el torrent sanguini.

Per altra banda, la somatostatina i el PP tenen un paper en la regulació de la secreció d'altres hormones endocrines i d'enzims digestius. Finalment, encara està poc clar el paper que juga la grelina en la homeòstasi del metabolisme.

La cèl·lula majoritària de l'illot de Langerhans és la cèl·lula β , seguida de les cèl·lula α i, amb un percentatge minoritari, es troba la cèl·lula δ , la cèl·lula PP i la cèl·lula ξ . En l'illot de Langerhans, el percentatge de cada tipus cel·lular juntament amb la seva distribució varia en funció de l'espècie. En el cas dels rosegadors, les cèl·lules β es troben situades al nucli dels illots, envoltades per les altres cèl·lules endocrines. En canvi, en humans, les cèl·lules β es troben distribuïdes heterogèniament per tot l'illot pancreàtic com es mostra en la Fig2.

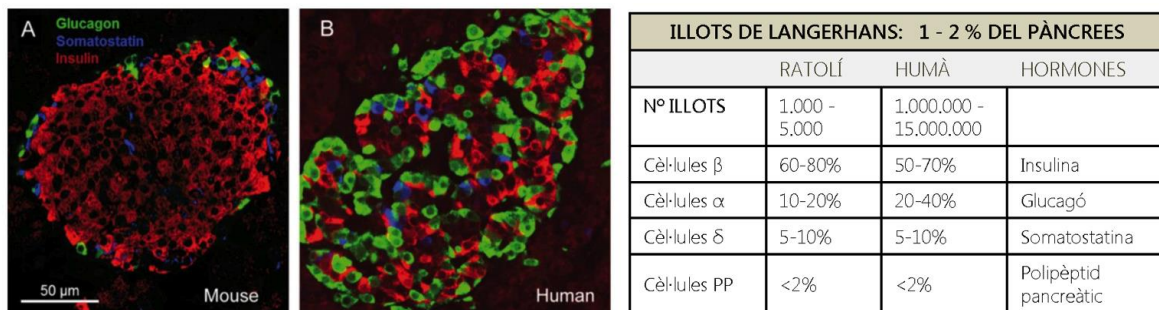


Figura 2. Comparació morfològica i cel·lular d'un illot pancreàtic de ratolí i de humà. (A) Imatge de l'illot de ratolí i **(B)** de l'illot humà. La insulina està marcada en vermell, el glucagó en verd i la somatostatina en blau. Extret de (Abdulreda MH, Caicedo A, 2013). Es mostra la composició cel·lular de l'illot de Langerhans de ratolí i d'humà. Modificat de (Dolensek et al., 2015).

LA CÈL·LULA β PANCREÀTICA

Biosíntesi de la insulina

La insulina és una hormona polipeptídica de 6 KDa formada per 51 aminoàcids, i que està composta per dues cadenes, A i B, unides per ponts disulfurs. Dintre de la cèl·lula β , la producció endògena d'insulina segueix una ruta sintètica. En un primer moment, la insulina és sintetitzada com a **preproinsulina** dintre els ribosomes del reticle endoplasmàtic. La preproinsulina conté un pèptid senyal que permet la seva entrada en el reticle endoplasmàtic rugós i, un cop dintre, una peptidasa talla aquest pèptid senyal per donar lloc a la **proinsulina**. Un cop alliberat el pèptid senyal, la proinsulina passa a l'aparell de Golgi on s'acumula en les vesícules recobertes de clatrina i es dona la maduració del grànul de secreció. La maduració es realitza gràcies a la pèrdua de clatrina, l'acidificació del grànul i la conversió de proinsulina a insulina mitjançant les dues endopeptidases PC1/3 (Pcsk2) i PC2 (Psc2) com es mostra en la Fig.3. Finalment, la insulina dimeritza en presència de zinc, on posteriorment aquest dímer forma hexàmers. La presència d'una concentració elevada de zinc dintre del grànul permet la cristal·lització de la insulina. La insulina cristal·litzada forma el nucli que és envoltat de pèptid C i altres compostos com la cromograninaA i el IAPP. L'obtenció de la insulina dona lloc al subproducte de pèptid C i els dos productes són alliberats de manera equitativa. La insulina es emmagatzemada en un grànul secretor fins a l'arribada d'una senyal cel·lular d'exocitosi o és degradada (review Zhuo Fu et al., 2013; Gomis et al., 2007).

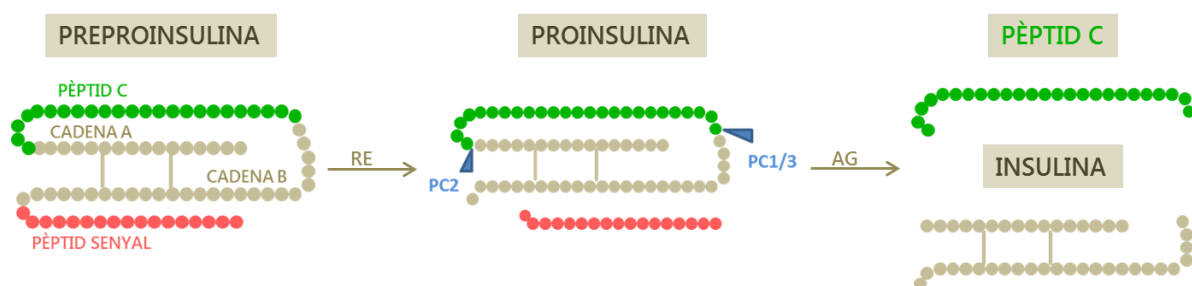


Figura 3. Representació esquemàtica del processament de la insulina. RE: Reticle Endoplasmàtic, AG: Aparell de Golgi, PC2: pro- hormona convertasa2, PC1/3: prohormona convertasa1

Secreció de la insulina

L'alliberació de la insulina es dona en resposta a diferents estímuls externs i interns mitjançant un procés molt complex i molt regulat. El principal estímulo és la glucosa, seguit de neurotransmissors, d'hormones circulants (Incretines: ex GLP1) i de fàrmacs (ex. Sulfonilurees) que poden activar o inhibir la secreció d'insulina (Nepton, 2013).

La glucosa circulant és transportada cap a l'interior de la cèl·lula β amb el fi d'estimular la secreció d'insulina. La glucosa entra a la cèl·lula β mitjançant transportadors específics de glucosa anomenats GLUTs (Slc2a). Hi ha diferents isoformes de transportadors de glucosa i es classifiquen bàsicament pel seu patró tissular, la seva especificitat del substrat, la seva cinètica de transport i per la seva regulació d'expressió sota les diferents condicions fisiològiques. També l'espècie animal determinarà el tipus de GLUT que es troba en cada tipus cel·lular. Per exemple, el Slc2a1 (GLUT1) i el Slc2a3 (GLUT3) estan presents en la cèl·lula β humana mentre que Slc2a2 (GLUT2) és el principal transportador en les cèl·lules β de rosegadors.

En el citoplasma de la cèl·lula, la glucosa és fosforilada per una hexoquinasa específica (glucoquinasa, Gkc) i metabolitzada a través de la glucòlisis fins a piruvat. El piruvat és metabolitzat en la mitocondria a través del cicle de Krebs on dona lloc a molècules de CO_2 , NADH i FADH_2 . Mitjançant la fosforilització oxidativa d'aquests intermediaris s'obtenen molècules d'ATP. Les molècules d'ATP, provoquen un increment del quocient ATP/ADP, i donen lloc a un tancament dels canals de potassi dependents d'ATP (K_{ATP}) causant una acumulació del potassi intracel·lular que indueix una despolarització de la membrana plasmàtica. El canal de potassi (K_{ATP}) està format per dues subunitats Sur1 (ABCC8) i Kir6.2 (KCNJ11), essencials per la funció secretora de la cèl·lula β . La despolarització de la membrana provoca l'obertura dels canals de calci dependents de voltatge (VDCC), i dona lloc a un increment de calci en el citoplasma de la cèl·lula. L'increment de calci intracel·lular estimula la unió dels grànuls de secreció d'insulina amb la membrana plasmàtica i l'alliberació d'insulina a la circulació.

La secreció d'insulina induïda per glucosa és bifàsica, la primera fase d'alliberament apareix als 10 primers minuts de l'exposició a grans quantitats de glucosa en sang seguida d'una fase més continua d'alliberament d'insulina. El procés de secreció de la insulina és donat mitjançant la fusió a la membrana dels grànuls i la posterior exocitosi d'insulina, pèptid C i

proinsulina. La cèl·lula β conté aproximadament uns 10.000 grànuls d'insulina. Es creu que una petita quantitat participa en el procés d'exocitosi estimulada per glucosa i una altra part es secreta de manera constitutiva. La secreció d'insulina es dona de forma ràpida i eficaç adaptant-se a les fluctuacions de glucosa en el torrent sanguini. Canvis sobtats de glucosa en sang són controlats per una resposta molt ràpida de la cèl·lula β que allibera la insulina emmagatzemada, i simultàniament, produeix més insulina.

A més a més, l'acció autocrina de la mateixa insulina alliberada controla la seva pròpia alliberació. Durant la exocitosi el calci alliberat juntament amb la insulina, activen els receptors CaSR de les cèl·lules β veïnes. La activació d'aquests receptors, alteren els canals de potassi i de calci permetent la entrada de calci, la coordinació de l'activitat i l'increment de la secreció d'insulina millorant la capacitat de resposta a la glucosa (Squires et al., 2014).

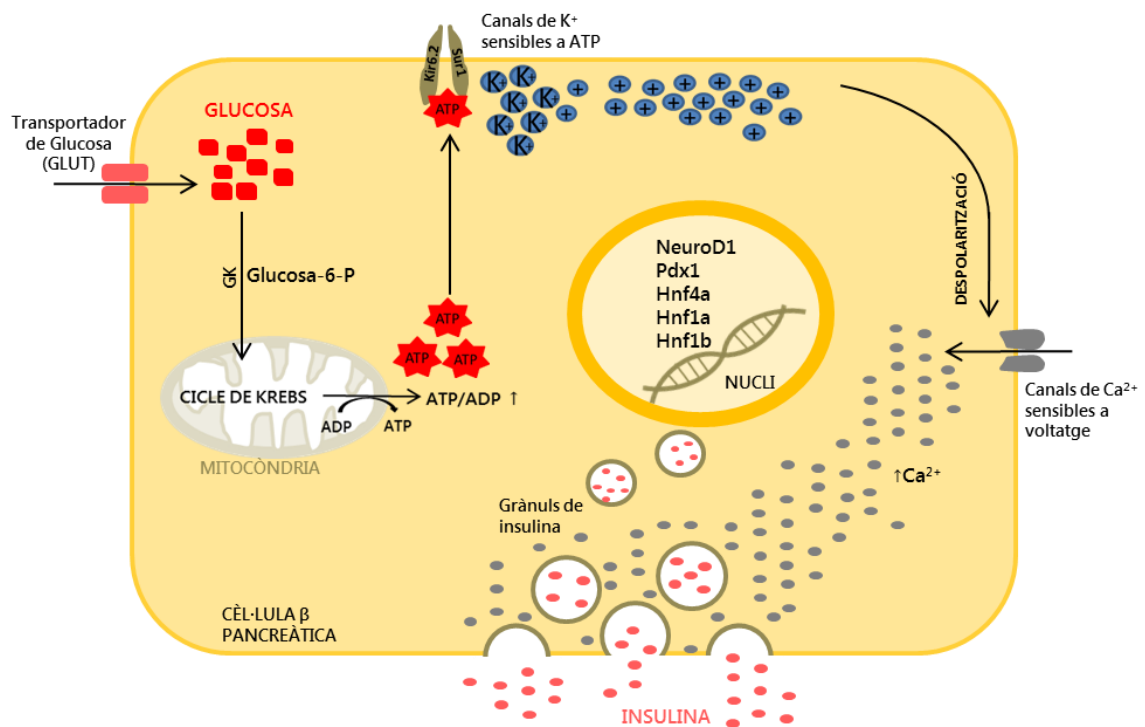


Figura 4. Representació esquemàtica del mecanisme de secreció de la insulina en una cèl·lula β pancreàtica.

La insulina alliberada actua sobre un receptor específic situat a la membrana de la cèl·lula diana. La insulina interacciona amb la subunitat α extracel·lular del seu receptor provocant un canvi conformacional i l'autofosforilació de la subunitat β transmembrana del receptor d'insulina. La unió insulina-receptor provoca una sèrie de senyals intracel·lulars que indueixen

diferents respostes depenen de la cèl·lula diana. Per exemple, la insulina exerceix un paper majoritari en el fetge, el múscul i el teixit adipós provocant un increment en la captació de glucosa pels teixits, un increment en la síntesi de glucògen hepàtic i muscular i un increment en la síntesi de triacilglicèrids en el teixit adipós.

Degradació de la insulina

El 60% de la insulina secretada per les cèl·lules β del pàncrees a la vena porta, no arriba a la circulació perifèrica, ja que és eliminada quan passa pel fetge. El 40% d'insulina restant serà eliminada pel ronyó com el pèptid C. Aquest fet implica que la insulina tingui una vida mitja de 4-6 minuts aproximadament. En canvi, el pèptid C, com s'elimina exclusivament a través del ronyó, té una vida mitja més llarga d'aproximadament 35 minuts. La insulina alliberada s'uneix a les cèl·lules diana dels diferents teixits mitjançant el seu receptor. Un cop ha estimulat l'entrada de glucosa per part de la cèl·lula, la insulina és degradada per la mateixa cèl·lula o tornada al espai extracel·lular.

ORGANOGENÈSIS PANCREÀTICA

Durant el procés de la gastrulació es diferencien les tres capes germinals que donaran lloc als diferents teixits de l'organisme. Aquestes són conegudes com a: ectoderma (forma la pell i el sistema nerviós central), mesoderma (forma el sistema sanguini i els músculs) i endoderma (forma el sistema gastro-intestinal, glàndules i aparell respiratori). Els tres llinatges cel·lulars (ductal, acinar i endocrí) que constitueixen el pàncrees deriven d'un grup comú de progenitors endodèrmics.

En els ratolins, el desenvolupament i el creixement pancreàtic s'ha ordenat en tres etapes, que es diferencien entre elles, a nivell morfològic i molecular, i reben el nom de transició primària, secundària i terciària. La primera transició és referida a l'especificació de la regió del tub endodèrmic que donarà lloc al pàncrees. La segona transició es refereix a la formació i el creixement del epiteli progenitor pancreàtic i la diferenciació de les cèl·lules endocrines i exocrines. I per últim, durant la tercera transició es dona la maduració de les cèl·lules pancreàtiques.

Especificació pancreàtica i transició primària (E8.5-E12.5)

L'especificació pancreàtica es dona en una regió concreta de l'endoderm definitiu on comença el programa pancreàtic cap el dia embrionari (E)8.5 en el ratolí, coincidint amb l'inici de la primera transició. A nivell morfològic es fan visibles els brots pancreàtics dorsal i ventral, que són generats a partir de l'endoderma que surgeix de la part caudal de l'intestí anterior. Els brots dorsal i ventral creixen independentment en dues localitzacions diferents però estan controlats per programes transcripcionals similars que defineixen l'especificació cel·lular.

En aquest procés de l'especificació pancreàtica juguen un paper clau factors extrínsecs ben definits, provinents de teixits mesodèrmics, situats aprop de l'endoderma prepancreàtic, que indueixen respostes transcripcionals en les cèl·lules diana de manera que controlen el procés de formació del pàncrees. Les principals vies de senyalització involucrades són: via del factor de creixement fibroblàstic (*Fibroblast growth factors*, FGF), membres de la família de factor de creixement transformant beta (*Transforming growth Factor beta*, TGF- β) on trobem la proteïna morfogènica òssia (*Bone morphogenic protein*, BMP) i la Activina A (A), l'àcid Retinoic (RA) i via de senyalització *Hedgehog* (HH).

L'especificació del brot pancreàtic dorsal comença quan els senyals FGF2 i Activina A segregats pel notocordi reprimeixen l'expressió de Sonic Hedgehog (Shh) en l'endoderma prepancreàtic dorsal. Aquest silenciament és un requisit per l'expressió del factor de transcripció Pdx1, clau pel desenvolupament pancreàtic, en aquesta regió. A més, la inducció del brot dorsal també requereix la secreció de RA des del mesoderma paraxial o *somites*.

En canvi, la regió ventral del tub digestiu anterior dona lloc tant al pàncrees ventral com al fetge. La secreció de senyals inhibidores de FGF i BMP provinents del mesoderma cardíac adjacent i del mesènquima determinaran l'especificació pancreàtica enfront de la hepàtica, mitjançant la inhibició del factor de transcripció Pdx1, només en la regió prehepàtica, induint el desenvolupament del fetge i restant expressat en la regió que donarà lloc al pàncrees ventral (Fig.5).

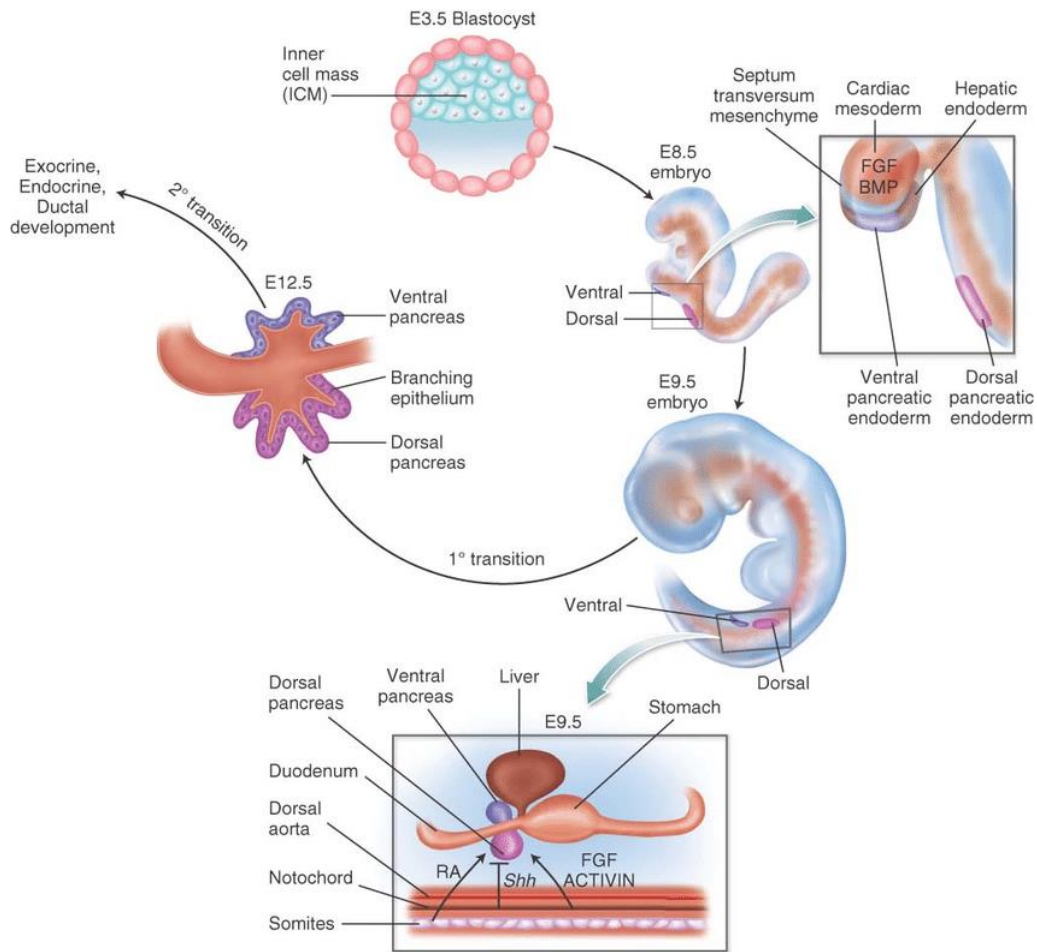


Figura 5. Especificació de l'endoderma pancreàtic. Extret de (Mastracci & Sussel, 2012).

Juntament amb aquestes senyals extrínseques són imprescindibles els factors de transcripció que participen en la inducció del programa pancreàtic de manera intrínseca. A nivell cel·lular, el domini pancreàtic està marcat per l'expressió de dos factors de transcripció (FT) **Pdx1** (*pancreàtic and duodenal homeobox1*) i **Ptf1A** (*pancreas-specific transcription factor*) a dia embrionari E8.5. Tant Pdx1 com Ptf1A són essencials pel desenvolupament del pàncrees, ja que la manca d'un d'aquests factors provoca l'agènesis d'aquest òrgan. Durant el desenvolupament de l'endoderm prepancreàtic, altres factors són expressats per donar lloc a l'especificació pancreàtica com Foxa1/2, Gata4/6, Hnf1β i Onecut1. Durant el període de la primera transició, comença l'especificació de les cèl·lules progenitores pancreàtiques i apareix la primera onada de cèl·lules endocrines, cap el dia E9. Concretament, aquesta primera onada permet la generació de les primeres cèl·lules endocrines, les cèl·lules glucagó positives, on algun percentatge petit de cèl·lules glucagó positives co-expressen insulina i d'on es creu que descendeixen directament algunes cèl·lules insulino-positives, però la contribució d'aquestes

cèl·lules al compartiment endocrí del pàncrees adult és dubtosa (Habener & Stanojevic, 2012).

Al final d'aquest període, els lòbuls pancreàtics s'aproximen i es reorienten mantenint la connexió ductal originat per l'intestí i pel conducte biliar. Passat dos dies (E14) els dos lòbuls pancreàtics es fusionen en un únic òrgan bipolar. El primordi ventral formarà el "cap" del pàncrees mentre que el primordi dorsal forma la resta de la glàndula (Fig.6).

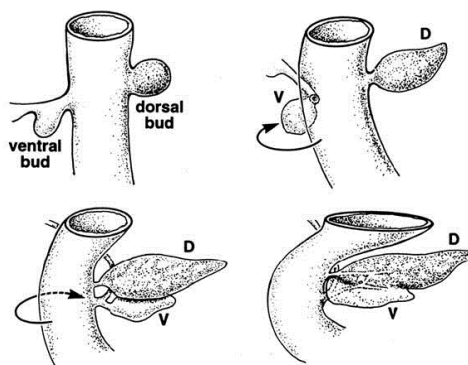


Figura 6. Estadis temporals del desenvolupament del pàncrees de ratolí.
V: ventral i D: dorsal. Extret de (Savides et al., 1996).

Transició secundària (E12.5 - E16.5)

A dia E10.5 comença el creixement i la ramificació de l'epiteli dels dos primordis pancreàtics situats entre l'estómac i l'intestí. Un cop especificat el domini pancreàtic, es dona lloc al creixement i l'expansió de les cèl·lules epitelials pancreàtiques. Les primeres cèl·lules que es troben en aquest domini pancreàtic són les cèl·lules indiferenciades anomenades cèl·lules progenitores pancreàtiques multipotents (*Multipotent Pancreatic Progenitor Cells*, MPC), que co-expressen Pdx1 i Ptf1A. Aquesta multipotencialitat es troba fins E12.5, moment en el qual comença la diferenciació exponencial dels diferents llinatges pancreàtics incloent la segona i definitiva onada de cèl·lules endocrines que formaran l'illot de Langerhans.

Hi ha una xarxa de factors de transcripció que regulen el procés de creixement i la expansió de l'epiteli progenitor pancreàtic. Entre aquests: Pdx1, Ptf1A, Sox9, Foxa1/2, Prox1, Mnx1, Onecut1, Hnf1 β , Nkx6-1 i Gata4/6. Per altra banda, les senyals extrínseques que actuen induint la expansió i la proliferació de l'epiteli progenitor pancreàtic es troben en les vies de senyalització següents: Notch (manté la capacitat progenitora de MPC, inhibint la seva

diferenciació), FGF i Wnt (vies estimuladores de la expansió de les MPC). La senyalització de Notch serà important per regular el nombre de cèl·lules MPC durant el desenvolupament temprà del pàncrees.

Al voltant del dia embrionari E13.5, s'inicia la diferenciació de les cèl·lules MPC cap els diferents llinatges pancreàtics. En aquest moment, hi ha una segregació dels llinatges marcada per una reorganització morfològica cel·lular que determina l'estructura del pàncreas madur. Les cèl·lules MPC situades als extrems de les ramificacions de l'epiteli pancreàtic donen lloc al llinatge acinar. Les cèl·lules MPC situades més a l'interior, al tronc epitelial, adopten una capacitat bipotencial, podent generar cèl·lules endocrines o ductals (Fig.7).

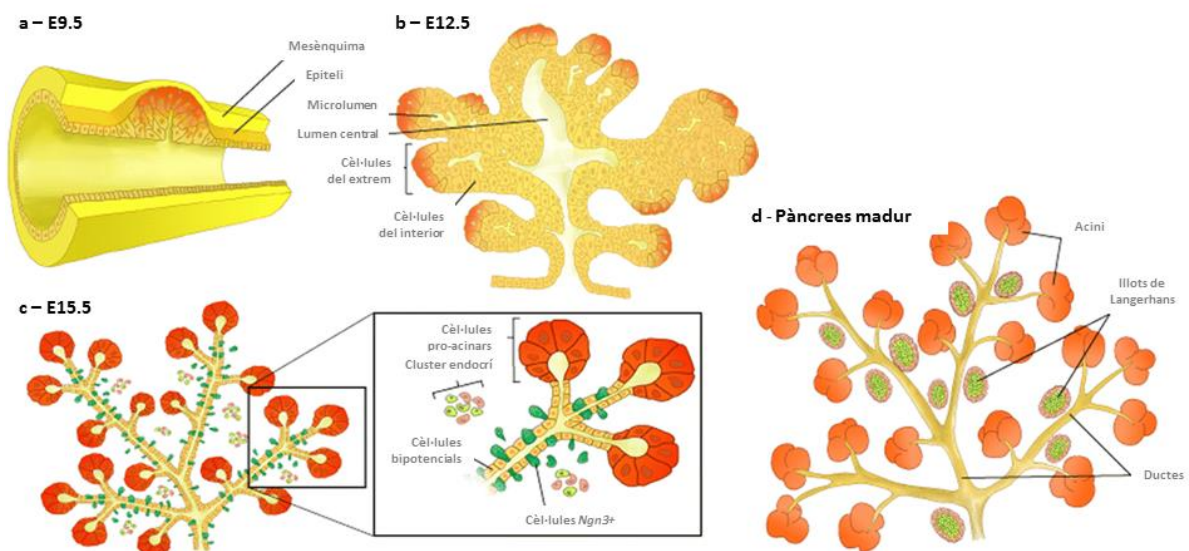


Figura 7. Representació esquemàtica del desenvolupament del pàncrees en el ratolí. **a)** A dia embrionari E9.5, el primordi pancreàtic comença a formar-se. **b)** A dia embrionari E12.5 comença la expansió i ramificació del epiteli pancreàtic. **c)** A dia embrionari E15.5 el epiteli pancreàtic es troba en procés de diferenciació cel·lular, on apareixen cèl·lules Ngn3 positives i proacinars. **d)** El pàncrees madur es troben els 3 tipus cel·lulars: cèl·lules acinars, cèl·lules ductals i cèl·lules endocrines de l'illot de Langerhans. Adaptat de (Cano, Soria, Martín, & Rojas, 2014).

Factors de transcripció específics de cada llinatge actuaràn per determinar el tipus cel·lular. Així, els factors de transcripció Ptf1A i Mist1 juguen un paper primordial en l'especificació, la diferenciació, el manteniment i la organització de les cèl·lules acinars. El factor Ptf1A és crític per la determinació de les cèl·lules acinars i el factor Mist1 és necessari per a la completa maduresa, el manteniment i la correcta funció d'aquestes cèl·lules (Krapp et al., 1998; Pin et al., 2001).

Per l'altra banda, en la població bipotent ducto-endocrina situada en la zona central de l'epiteli els progenitors, es preparen cap al llinatge endocrí, a través de l'expressió transitòria del factor de transcripció Neurogenina3 (Ngn3 o Neurog3) facilitada per nivells baixos de senyalització de Notch. El factor Ngn3 indueix el programa pro-endocrí activant la cascada de factors de transcripció específics per obtenir els diferents tipus cel·lulars que componen l'illot. Les cèl·lules que no expressin Ngn3 esdevindran cèl·lules ductals. Aquest fet es dona gràcies a un important factor de transcripció diana de Notch anomenat Hes1, que reprimeix l'expressió de Ngn3. En els animals deficientes en Hes1 s'observa una hipoplàsia severa del pàncrees i una expansió de la massa endocrina deguda a un increment de cèl·lules Ngn3 positives (Jensen et al., 2000). A més de Hes1, la via de senyalització Notch afavoreix el procés d'especificació ductal, promouen el desenvolupament de la cèl·lula ductal i inhibint la diferenciació de les cel·lules acinars i les cèl·lules endocrines.

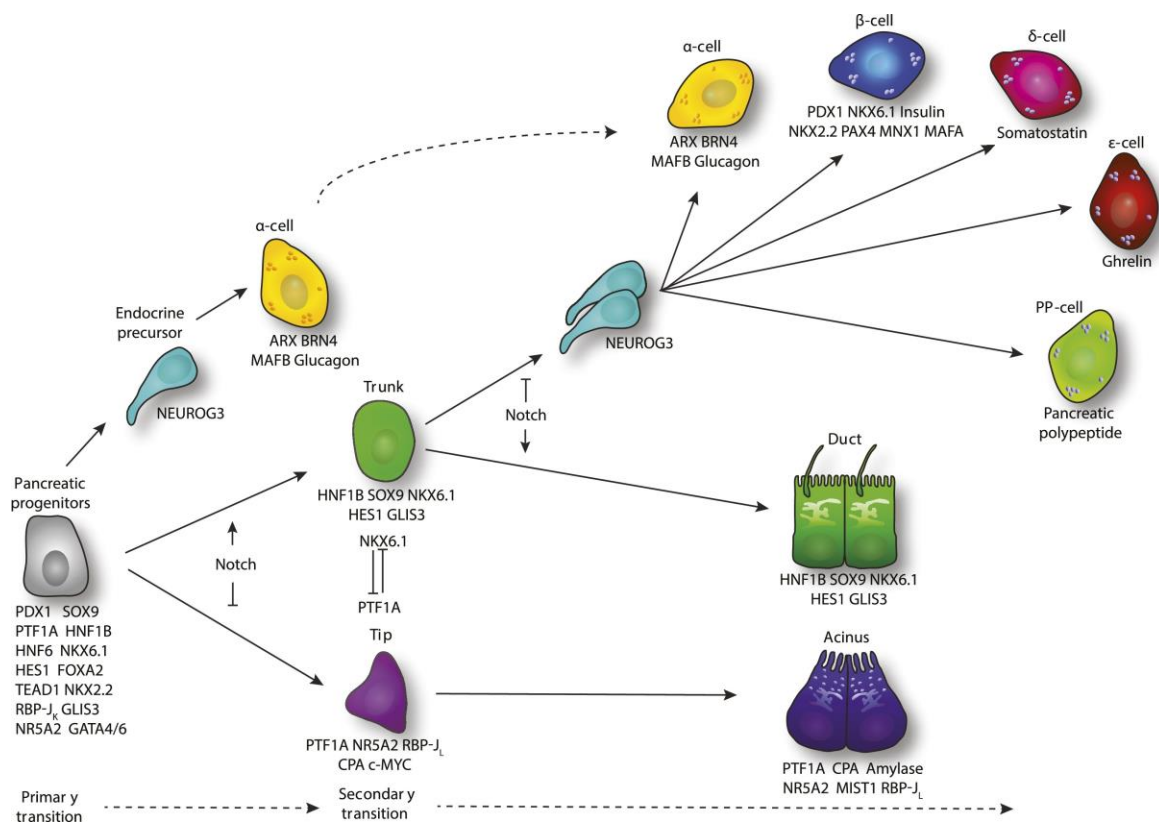


Figura 8. Factors de transcripció i vies de senyalització implicades en la formació de les diferents cèl·lules pancreàtiques. Trunk: cèl·lules del tronc i Tip: cèl·lules de la punta de la ramificació de l'epiteli. Extret (Larsen & Grapin-Botton, 2017).

Alguns factors de transcripció destaquen per ser reconeguts determinants del fenotip cel·lular. Com s'ha indicat anteriorment, Pdx1 marca el llinatge pancreàtic precoç de l'epiteli no diferenciat del conducte, Ngn3 marca el llinatge pro-endocrí i per exemple, la implicació dels factors Pax4 i Arx en cèl·lules progenitores endocrines sembla ser crítica pel seu compromís amb l'especificació de les cèl·lules β i cèl·lules α respectivament (Collombat et al., 2003). Més endavant ens centrarem en factors que estan involucrats en la diferenciació de la cèl·lula β .

Transició terciària

Un cop finalitzada la transició secundària i la diferenciació cap a les diferents cèl·lules pancreàtiques, el pàncrees segueix creixent. En aquest procés es dona l'expansió del pàncrees bàsicament per la proliferació del teixit exocrí i de les cèl·lules endocrines fins al final del període gestacional. Aquesta etapa final de diferenciació i maduració del pàncrees correspon a la **tercera transició** (E16.5-postnatal). Durant el procés de maduració cel·lular, les cèl·lules endocrines comencen a agrupar-se i reorganitzar-se en els illots de Langerhans però no és fins poc abans de néixer (E18-E19) que els illots no estan ben formats. Durant aquest procés morfològic, les cèl·lules endocrines adquireixen la capacitat funcional. En el ratolí, un cop ha nascut, els illots de Langerhans tarden varies setmanes per acabar de madurar i la cèl·lula β va adquirint la capacitat de secretar insulina en resposta a glucosa.

A nivell cel·lular, la maduració de les cèl·lules endocrines està marcada per l'augment de l'expressió de factors de transcripció específics. Els factors necessaris per la maduració i la funció de la cèl·lula β són: Pdx1, NeuroD1, Nkx2-2, Pax6 i MafA. Aquests factors de transcripció es mantenen en tota la etapa adulta per tal de mantenir el correcte funcionament de la cèl·lula β .

Aquest apartat ha estat revisat de (Gittes, 2009; Shih, Wang, & Sander, 2013; Mastracci & Sussel, 2012; Bastidas-Ponce, Scheibner, Lickert, & Bakhti, 2017, Larsen & Grapin-Botton, 2017)

FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ CLAU DEL DESENVOLUPAMENT I MANTENIMENT DE LA CÈL·LULA β PANCREÀTICA

Durant l'embriogènesis, les cèl·lules β es formen a partir de les cèl·lules MPC en un procés amb estadis successius, caracteritzats per perfils d'expressió gènica concrets, promoguts per factors de transcripció específics. En aquest context, els factors de transcripció específics de llinatge controlen les cascades transcripcionals que determinen el compromís del destí i del programa de diferenciació cel·lular.

Gràcies a estudis amb ratolins transgènics s'ha pogut saber el paper dels factors de transcripció que actuen a nivell del desenvolupament i de la especificació dels diferents subtipus cel·lulars endocrins. En la següent taula es mostra el fenotip dels ratolins *Knock-out*, dels factor de transcripció clau pel desenvolupament de les cèl·lules de l'illot pancreàtic (Taula1).

FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ	FENOTIP PANCREÀTIC EN MODELS DE RATOLINS KNOCKOUT	EXPRESSIÓ DE LES CÈL·LULES DE L'ILLOT
MafA	Reducció de la biosíntesi i la secreció d'insulina	Cèl·lules β
MafB	Reducció de cèl·lules β	Cèl·lules α
Neurod1	Reducció de cèl·lules endocrines	Totes les cèl·lules
Ngn3	Absència de cèl·lules endocrines	No detectat
Nkx2.2	Absència de cèl·lula β Reducció de cèl·lules α i cèl·lules PP	Cèl·lules α Cèl·lules β Cèl·lules PP
Nkx6.1	Reducció de cèl·lules β	Cèl·lules β
Pax4	Absència de cèl·lula β i cèl·lules ζ Augment de cèl·lules α i cèl·lules ϵ	No detectat
Pax6	Absència de cèl·lules α Reducció de cèl·lula β , cèl·lules ζ i cèl·lules PP Augment de cèl·lules ϵ	Totes les cèl·lules
Pdx1	Absència de tot el pàncrees	Cèl·lules β Cèl·lules ζ

Taula 1. Representació dels fenotips pancreàtics dels models genètics de ratolí pels diferents factors de transcripció clau en el desenvolupament endocrí.
Adaptat de (Kaneto et al., 2015).

A continuació es descriuen amb més detall els FTs rellevants per aquesta tesi: Pdx1, Ngn3, NeuroD1, Atoh8, Nkx2-2, Nkx6-1, Pax4, Insm1, Pax6 i MafA.

Pdx1

El factor de transcripció **Pdx1** conegut com *Ipf1* (*insulin promoter factor1*) o *Idx* (*Islet/duodenum homeobox1*) es va descobrir a principi dels anys 90. Es va descriure Pdx1 com una proteïna amb homeodomini localitzada selectivament en les cèl·lules β del pàncrees de ratolí adult i com un activador transcripcional del gen de la insulina (Guz et al., 1995; Ohlsson et al., 1993). Posteriorment es va observar que Pdx1 comença a expressar-se en etapes tempranes del desenvolupament pancreàtic, concretament a dia embrionari E8.5, en les regions dorsal i ventral de l'intestí anterior primitiu, on posteriorment es formarà el pàncrees (Guz et al., 1995). Així doncs, Pdx1 és expressat en totes les cèl·lules progenitores pancreàtiques i cap el dia embrionari E13.5 queda restringit principalment en les cèl·lules β , però manté una baixa expressió en les cèl·lules exocrines i en les cèl·lules ductals.

La utilització de ratolins transgènics va permetre millorar el coneixement sobre l'expressió de Pdx1 i la seva importància durant el desenvolupament pancreàtic. Estudis realitzats amb ratolins *knock-out* per Pdx1 (Pdx1^{KO}), demostren que aquests animals presenten desenvolupament del primordi pancreàtic dorsal amb una baixa formació de cèl·lules insulina i glucagó positives (Ahlgren et al., 1996) i al néixer l'animal sobreviu, però mor al cap de poc, presentant una agènesis del pàncrees (Jonsson et al., 1994). Fet que indica el seu paper clau en la propagació i supervivència de les cèl·lules pancreàtiques. Resultats similars es van observar en humans (Stoffers et al. 1998).

Com ja hem comentat, Pdx1 activa el gen de la insulina però també participa en l'expressió d'altres gens de la cèl·lula β com la glucoquinasa, Glut2 i l'Iapp i de gens endocrins no β com la *Somatostatina*. Curiosament, la deleció de Pdx1 en la cèl·lula β , dóna lloc a la pèrdua de marcadors de la identitat d'aquesta cèl·lula i provoca un canvi ràpid en el fenotip amb característiques de cèl·lules α , expressant glucagó i MafB (Gao et al., 2014). Doncs, a part de la implicació de Pdx1 en el desenvolupament pancreàtic també és necessari pel correcte funcionament de la cèl·lula β gràcies al manteniment de la seva identitat i la seva funció (Ahlgren et al., 1998, Gao et al., 2014). De fet, en humans, la mutació en el gen Pdx1 dóna alteracions en el funcionament de la cèl·lula β i a l'aparició d'un tipus de diabetis anomenada MODY4.

Ngn3

Ngn3 és un factor de transcripció de la família dels bHLH (basic-Hèlix-loop-Hèlix). Els factors bHLH engloben una superfamília de reguladors transcripcionals que participen en diferents processos del desenvolupament cel·lular. Durant el desenvolupament, Ngn3 s'expressa en el pàncrees embrionari, el tracte gastrointestinal i en algunes regions del sistema nerviós. Durant l'embriogènesis, Ngn3 esdevé necessari per a la diferenciació de cèl·lules endocrines pancreàtiques i doncs, per la correcta formació de l'illot. L'eliminació de Ngn3 en ratolins transgènics (Ngn3^{KO}) resulta en una pèrdua casi absoluta de cèl·lules endocrines del pàncrees, fet que indica el seu paper clau en la diferenciació cel·lular (Gradwohl et al., 2000). A més, els animals deficients en Ngn3 desenvolupen diabetis i moren al cap de pocs dies al néixer (Gradwohl et al., 2000).

Durant el desenvolupament pancreàtic, Ngn3 presenta una expressió transitòria, que finalitza en les cèl·lules endocrines diferenciades. Hi ha dos pics importants d'expressió de Ngn3 un a la primera i l'altre a la segona transició, i posteriorment desapareix (Fig.9). En la primera transició, Ngn3 comença a expressar-se cap el dia embrionari E9.5, que coincideix en la generació de les primeres cèl·lules glucagó positives. L'expressió de Ngn3 disminueix i posteriorment torna a augmentar en el període de la segona transició coincidint amb l'ona d'expansió més important de les cèl·lules endocrines del pàncrees. El pic de màxima expressió de Ngn3 envolta el dia embrionari E15.5. A partir d'aquest moment, l'expressió d'aquest factor comença a disminuir fins a valors casi indetectables on comença l'organització de cèl·lules endocrines per formar l'illot de Langerhans (Rukstalis et al., 2009).

Estudis realitzats per Johansson i col·laboradors demostren que la funció de Ngn3 és altament depenen del moment d'expressió durant el desenvolupament pancreàtic (Johansson et al., 2007). Els resultats que van obtenir van demostrar que les finestres de temps on s'expressa Ngn3 permet generar un subtipus cel·lular endocrí concret. Com es mostra en la Fig.9, quan l'expressió de Ngn3 es dona, durant 48h, a dia embrionari E8.5 resulta de la generació de cèl·lules glucagó positives. En canvi, quan l'expressió de Ngn3 es dona a dia embrionari E10.5 es comencen a generar cèl·lules insulino-positives i PP positives. Finalment cap el dia E14.5 es dona lloc a la generació de les cèl·lules somatostatina positives.

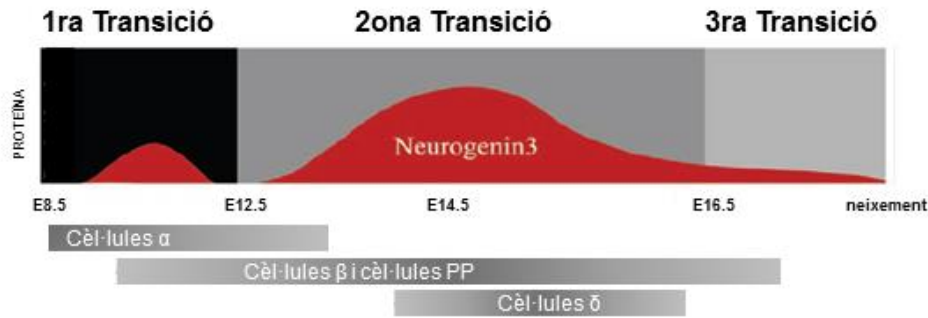


Figura 9. Representació esquemàtica de l'expressió temporal de Ngn3 durant el desenvolupament del pàncrees de ratolí. Es mostren l'expressió del factor de transcripció de Ngn3 durant les 3 transicions del desenvolupament. Adaptat de (Rukstalis et al., 2009).

A més de la importància del moment d'expressió de Ngn3 per l'obtenció de cèl·lules endocrines concretes, s'ha vist que la dosis d'aquest factor de transcripció juga un paper clau en l'especificació cel·lular. La manipulació dels nivells d'expressió de Ngn3 en progenitors endocrins, juntament amb la presència d'altres factors de transcripció, dona lloc a canvis en el destí cel·lular i determinació del subtipus cel·lular endocrí. Per exemple, s'ha observat que nivells baixos d'expressió de Ngn3 dona lloc a adoptar un destí pancreàtic diferent a l'endocrí com l'exocrí, reduint la massa cel·lular endocrina (S. Wang et al., 2010).

D'altra banda, diversos estudis demostren que Ngn3 és capaç de promoure el destí endocrí en certs contextos cel·lulars. Per exemple, l'expressió ectòpica d'aquest factor en cèl·lules ductals pancreàtiques humanes (Heremans et al., 2002) o cèl·lules ductals (mPAC) de ratolí (Gasa et al., 2004) permet la inducció del programa endocrí. L'activació del programa endocrí mediat per la sobreexpressió de Ngn3 es dona gràcies a l'activació de factors de transcripció primerencs i tardans de la cascada transcripcional endocrina (Gasa et al., 2004).

A nivell molecular, aquest factor de transcripció pro-endocrí actua en els progenitors pancreàtics com a interruptor genètic iniciant la cascada transcripcional de gens encarregats de dur a terme la diferenciació de totes les cèl·lules endocrines. Ngn3 activa gens importants per promoure la diferenciació dels progenitors pancreàtics cap a cèl·lules endocrines com NeuroD1, Insm1, Pax4 i Nkx2-2 (Gasa et al., 2004; Huang et al., 2000; Smith et al., 2004).

Factors de transcripció activats per Ngn3

NeuroD1

Un altre factor de transcripció bHLH important en el desenvolupament del pàncrees és **NeuroD1** (*Neurogenic differentiation 1* o BETA2). NeuroD1 és una diana directa del factor de transcripció Ngn3 (Huang et al., 2000, Gradwohl et al., 2000) i comença a expressar-se en els precursors endocrins cap el dia embrionari E9.5, sent requerit per el procés de diferenciació endocrina i la formació de l'illot de Langerhans (Gradwohl et al., 2000; Naya et al., 1997). El factor NeuroD1 és expressat principalment en cèl·lula β madura, on té un paper clau en la maduració i la funció secretora d'aquesta cèl·lula (Naya et al., 1997, Gu et al., 2010).

Els animals deficients en NeuroD1 pateixen una diabetis severa i la posterior mort entre el tercer i cinquè dia després del naixement (Naya et al., 1997). A nivell morfològic, la deleció de NeuroD1 té un efecte clar en el procés de diferenciació cap el dia embrionari E14.5, provocant una reducció dràstica de les cèl·lules β i una insuficient maduració de l'illot pancreàtic al naixement (Naya et al., 1997). A més, s'ha descrit que NeuroD1 activa els gens de la insulina, del glucagó, del pdx1 i la secretina. La deleció de NeuroD1 provoca una reducció de l'expressió de Pdx1 que podria explicar el fenotip mutant de l'illot. NeuroD1 és necessari pel bon funcionament de l'illot pancreàtic i pel manteniment de la homeòstasi de la glucosa (Naya et al., 1997, Gu et al., 2010).

S'ha descrit la capacitat de NeuroD1 d'induir la diferenciació endocrina en absència de Ngn3 en cèl·lules pancreàtiques com no pancreàtiques, regulant un grup important de gens similars als activats per Ngn3, però amb diferències en el temps i en els nivells d'expressió (Schwitzgebel et al., 2000; Gasa et al., 2004).

Atoh8

Un altre factor de transcripció diana de Ngn3 és **Atoh8**, anomenat també Math6. Aquest factor de transcripció pertany a la família bHLH com els factor de transcripció Ngn3 i NeuroD1, però a diferència d'ells, Atoh8 s'expressa de manera ubiqua i sembla participar en la diferenciació específica d'una gran varietat de teixits durant el desenvolupament embrionari, com el cervell, el cor, el ronyó, el pulmó, el fetge, el múscul i el pàncrees (Inoue et al., 2001; Yao et al., 2010; Lynn, et al., 2008, Ross et al., 2006). L'absència d'Atoh8 dóna lloc a

la letalitat molt temprana d'embrions indicant la transcendència d'aquest factor durant el desenvolupament embrionari (Lynn et al., 2008).

En el pàncrees, aquest factor es troba implicat en el procés de diferenciació temprana tant de cèl·lules exocrines com de cèl·lules endocrines, però esdevé indetectable en les cèl·lules madures (Lynn et al., 2008) suggerint un rol en els primers estadis de la diferenciació endocrina. Tantmateix *Atoh8* mostra un perfil d'expressió temporal similar el de *Ngn3*. La presència d'*Atoh8* tant en el compartiment endocrí com a l'exocrí pot ser degut a que aquest factor és diana tant de *Ngn3* com de *Ptf1A* (Lynn et al., 2008, Pujadas et al., 2011).

Atoh8 va ser identificat com a diana de *Ngn3*, en estudis realitzats pel nostre grup, on s'havia expressat *Ngn3* de manera ectòpica, en cèl·lules ductals pancreàtiques (Gasa et al., 2008). A diferència del que succeeix amb els factors *Ngn3* i *NeuroD1*, l'expressió ectòpica de *Atoh8* en cèl·lules ductals pancreàtiques no activa l'expressió de factors de transcripció pancreàtics i no induïx l'expressió de marcadors de cèl·lules madures de l'illot (Lynn et al., 2008). Aquests resultats demostren que només l'expressió d'*Atoh8* no pot induir la diferenciació endocrina en aquest model cel·lular, fet que suggereix que no participa directament en l'activació del programa gènic endocrí. Un altre estudi explica que *Atoh8* actua principalment com a activador o repressor però no com a potent activadors transcripcionals com fan *Ngn3* o *NeuroD1* (Ejarque et al., 2013). *Atoh8* és un nou component descrit en la xarxa transcripcional pancreàtica que té un efecte en el programa mediat pel factor de transcripció *Ngn3*, podent modular l'activació del programa endocrí però no és essencial per a la formació del pàncrees o la diferenciació endocrina en el ratolí (Ejarque et al., 2016). Per contra, no es coneixen gens diana d'*Atoh8* o una funció específica en el desenvolupament del pàncrees.

Nkx2-2

Una altra família de factors de transcripció crítica pel desenvolupament pancreàtic és la família *homeobox Nkx*. L'activitat d'un membre d'aquesta família **Nkx2-2**, és necessària per la formació, la maduració i la expansió de la cèl·lula β durant la transició secundària (Sander et al., 2000; Sussel et al., 1998).

El factor Nkx2-2 comença a expressar-se en l'epiteli pancreàtic, en la població MPC, cap el dia embrionari E8.5-E9.5 juntament amb Pdx1 i Ptf1A i es restringeix progressivament als llinatges cel·lulars endocrins. Les cèl·lules endocrines adultes, cèl·lules α , β i PP, menys les cèl·lules δ expressen aquest factor (Sussel et al., 1998), en canvi, no es detecta en el compartiment exocrí.

Malgrat la descripció de llocs d'unió a Ngn3 o NeuroD1 en la regió promotora del gen Nkx2-2 (Watada et al., 2003), un estudi més recent demostra que ni Pdx1 ni Ngn3 són requerits per activar Nkx2-2 i mantenir la seva expressió (Arnes et al., 2012). En canvi, aquest factor és necessari per facilitar i coordinar l'activació de NeuroD1 per Ngn3 en cèl·lules endocrines, a més de mantenir elevats els nivells de NeuroD1 per regular la funció en les cèl·lules β madures (Anderson et al., 2009).

Gràcies a estudis realitzats amb animals *Knock-out* per Nkx2-2 (Nkx2-2^{KO}) s'ha pogut demostrar el paper clau d'aquest factor de transcripció en el procés de diferenciació endocrina (Sussel et al., 1998). Durant el desenvolupament pancreàtic sabem que la falta d'aquest factor desencadena l'absència de cèl·lules β i una reducció de cèl·lules α i PP, provocant en els ratolins adults una hiperglucèmia al néixer i la mort al cap de pocs dies (Sussel et al., 1998). A nivell molecular, la deleció global de Nkx2-2 causa una baixa expressió de Pdx1 en cèl·lules no- β , i una absència de marcadors en la cèl·lula β com Pdx1, Glut2 i Nkx6-1 (Sussel et al., 1998). A més d'una baixada en l'expressió dels factors Ngn3, NeuroD1 i Rfx6 (Churchill et al., 2017).

L'eliminació de l'expressió d'aquest factor aigües avall de Ngn3, Nkx2-2 ^{Δ Endo}, dóna lloc a un fenotip similar al obtingut amb els ratolins Nkx2-2^{KO}, la qual cosa fa pensar en que la especificació endocrina mediada per Nkx2-2 s'estableix dins el llinatge endocrí, aigües avall de l'activació de Ngn3 (Churchill et al., 2017). A nivell molecular, l'expressió de Ngn3, NeuroD1 i Rfx6 no són suficients per conduir l'especificació de la cèl·lula β en l'absència de Nkx2-2.

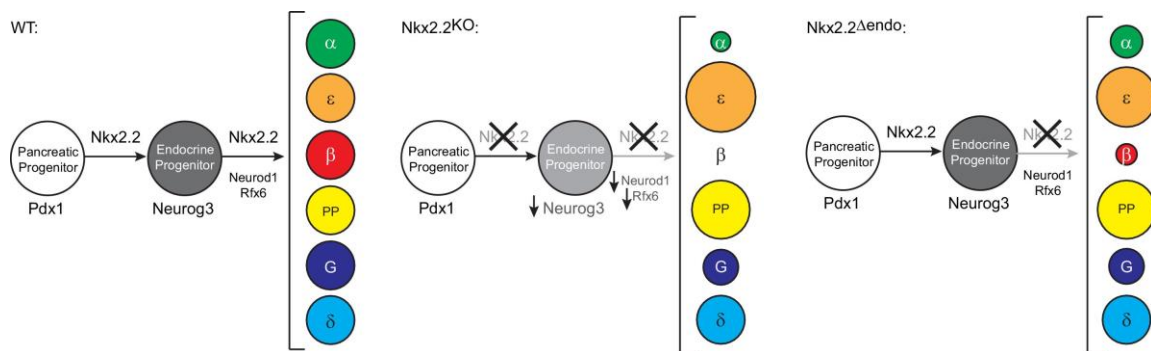


Figura 10. Model de xarxes transcripcionals implicades en l'especificació de cèl·lules endocrines en les condicions de *wildtype* (WT), *Nkx2.2^{KO}* i *Nkx2.2^{Δendo}*. La mida dels cercles representa la proporció del nombre de cèl·lules en comparació amb *wildtype*. Extret de (Churchill et al., 2017)

Per altra banda, la repressió de Nkx2-2 en cèl·lula β adulta dóna lloc a una desregularització dels gens *MafA* i *Scl2a2*, provocant una baixada de l'expressió i del contingut d'insulina, juntament amb una deficiència en la secreció, fet que ocasiona una diabetis i una intolerància a la glucosa de l'animal. El trastorn en l'arquitectura de l'illot observat en aquests animals pot condicionar aquests problemes de funció descrits (Doyle & Sussel, 2007).

Pax4

El factor de transcripció **Pax4** (*Paired domain homeobox 4*) també és diana de Ngn3. Pax4 és un gen activat en els primers estadis del desenvolupament del pàncrees cap el dia embrionari E9.5 amb un pic d'expressió durant el període E13.5 i E15.5 i quedarà restringida la seva expressió a la cèl·lula β disminuint fins a ser absent en l'òrgan adult (Sosa-Pineda et al., 1997; J. Wang et al., 2004). Aquest pic, ubicat a la segona transició, coincideix amb el període de màxima diferenciació de cèl·lules precursors endocrines.

Ratolins *Knock-out* per Pax4 (*Pax4^{KO}*), tenen una aparença normal al néixer però ràpidament, en 48h, es veu alterada amb un retard en el creixement i una deshidratació ocasionant la mort al cap de 3 dies. A nivell macroscòpic, el pàncrees en aquest animal recent nascut té una morfologia normal però presenta una reducció dràstica o casi inexistència de cèl·lules β madures i cèl·lules δ. En canvi, hi ha un increment del nombre de cèl·lules α amb una agrupació anormal d'aquestes cèl·lules (Sosa-Pineda et al., 1997). Aquest fet ve acompanyat de la manca d'expressió de *Pdx1*, clau per la maduració de la cèl·lula β, en els animals acabats

de néixer (Sosa-Pineda et al., 1997). En el pàncrees dels embrions Pax4^{KO}, a dia embrionari E10.5, s'expressa insulina, glucagó i Pdx1, indicant que Pax4 no és requerit per la generació de precursors de cèl·lules β i cèl·lules α (Sosa-Pineda et al., 1997). Doncs, Pax4 té un paper imprescindible per la maduració de la cèl·lula β . En les cèl·lules progenitores endocrines d'embrions Pax4^{KO} durant el dia E13-E15, la manca d'aquest factor no afecta a l'expressió de Ngn3, Islet1, Nkx2-2 o Pax6, però en canvi, impedeix l'expressió de gens importants per l'obtenció de cèl·lula β madura com Insulina i Pdx1. Aquest fet indica el seu paper en la diferenciació i maduració de la cèl·lula β (J. Wang et al., 2004). A més, s'ha vist que Pax4 i Nkx2-2 regulen paral·lelament vies de senyalització necessàries per la iniciació del programa de diferenciació de la cèl·lula β durant l'embriogènesis.

Insm1

El factor de transcripció **Insm1** (*Insulinoma-associated 1* o IA-1) està caracteritzat per tenir un motiu estructural de dit de zinc (*zinc-finger*). El factor Insm1 s'expressa en les cèl·lules endocrines pancreàtiques i cèl·lules intestinals i és requerit pel seu desenvolupament. Durant el desenvolupament, Insm1 juga un paper important aigües avall de Ngn3 i en paral·lel amb NeuroD1 regulant la diferenciació endocrina, on esdevé essencial en el procés de diferenciació de la cèl·lula β i de la cèl·lula α (Cerf, 2006). Durant el desenvolupament embrionari, Ngn3 i Insm1 presenten patrons d'expressió espacio-temporals casi idèntics. Ngn3 s'uneix a la regió promotora de Insm1, activa la seva transcripció i esdevé necessari per la correcta diferenciació de cèl·lules endocrines mediat pel factor Ngn3 (Mellitzer et al., 2006). De fet, en embrions d'animals Ngn3^{KO} no presenten el factor Insm1 en el pàncrees.

En ratolins *Knock-out* per Insm1 (Insm1^{KO}), es formen cèl·lules precursors endocrines però poques cèl·lules positives per insulina. L'acumulació de cèl·lules precursors endocrines corrobora que no hi ha una correcta diferenciació cel·lular, com a conseqüència d'una baixa regulació dels gens implicats. Concretament, Insm1 és un factor que modula l'expressió del gen de la insulina unit-se al promotor durant el desenvolupament temprà del pàncrees (Wang et al., 2008). També, el factor Insm1 controla l'expressió gènica de proteïnes relacionades amb la màquina secretora i hormonal (Gierl et al., 2006). A més, en embrions Insm1^{KO} hi ha una baixada de la formació de cèl·lules que expressen insulina i glucagó de casi el 40%. En canvi, si es sobreexpressa Insm1 el nombre de les cèl·lules endocrines incrementen.

Factors claus en la maduració de la cèl·lula β

Nkx6-1

El factor **Nkx6-1** forma part de la família amb homeodomini Nkx i té una funció important en el pàncrees, concretament en el desenvolupament de la cèl·lula β . Aquest factor és detectat en l'epiteli pancreàtic a partir del dia embrionari E10.5. Durant el transcurs del desenvolupament pancreàtic, és expressat en cèl·lules Ngn3+ i esdevé restrictiu en les cèl·lules β pancreàtiques, on és mantindrà expressat durant la vida adulta (Sander et al., 2000). En l'illot pancreàtic, Nkx6-1 actua aigües avall de Nkx2-2, i és necessari per la diferenciació i pel manteniment de la funció de la cèl·lula β (Taylor et al., 2013). A dia embrionari E15.5, el factor Nkx6-1 es troba expressat únicament en la cèl·lula β (Lyttle et al., 2008). Per contra, cap el dia embrionari E18.5, Pax4 provoca la baixada d'expressió de Nkx6-1 suggerint que Pax4 contribueix en la regulació de Nkx6-1 (J. Wang et al., 2004).

Estudis realitzats en ratolins transgènics que tenen eliminat Nkx6-1 donen lloc a l'absència de cèl·lules β madures (M Sander et al., 2000). Però, a dia embrionari E12.5 no s'observa una baixada de cèl·lules insulino-positives, en canvi, a dia embrionari E18.5, embrions Nkx6-1^{KO} tenen un tamany pancreàtic normal amb una baixada del 85% de cèl·lules β , la qual cosa suggereix que aquest factor és necessari en la segona transició on es comença a diferenciar la cèl·lula β .

Pax6

Un altre factor de transcripció important és **Pax6**. Aquest factor s'ha descrit com l'activador dels FT necessaris per la diferenciació i l'obtenció de l'identitat i la funció de la cèl·lula β (St-Onge et al., 1997; Sander et al., 1997; Ahmad et al., 2015; Swisa et al., 2016; Mitchell et al., 2017). Aquest factor comença a expressar-se durant els primers estadis del desenvolupament pancreàtic, cap el dia embrionari E9.0, i es manté en les cèl·lules endocrines madures (Sander et al., 1997).

En ratolins *Knock-out* per Pax6 (Pax6^{KO}) ja s'observa una baixada de cèl·lules productores d'insulina i cèl·lules productores de glucagó a dia embrionari E12.5 i seguirà baixant fins el dia embrionari E18.5 (Sander et al., 1997).

En recent nascuts, la deleció de Pax6, condueix a l'absència de cèl·lules α però encara estan presents cèl·lules β i cèl·lules PP (St-Onge et al., 1997). Si la deleció és de Pax4 i Pax6 l'animal

no arriba a desenvolupar ninguna cèl·lula endocrina madura (St-Onge et al., 1997). A més, en pàncrees adult, s'ha descrit que el factor Pax6 és el responsable de la maduració de la cèl·lula β i de la cèl·lula α , però no de les cèl·lules δ i PP, i la seva absència provoca la pèrdua de les característiques moleculars de la maduració d'aquests dos tipus cel·lulars (Ahmad et al., 2015). Per exemple, la cèl·lula β madura deficient en Pax6, perd l'expressió de MafA, Scl2a2 i baixa l'expressió d'insulina, Pdx1 i Nkx6-1. Tanmateix el pèptid C no es detecta, la qual cosa indica una fallada en la maquinària del processament de la insulina. La deficiència d'aquest factor en cèl·lules β i en cèl·lules α provoca una conversió cap a cèl·lules grelina-positives (Ahmad et al., 2015).

Finalment, la deleció de Pax6 en les cèl·lules β d'animals adults, provoca una hiperglucèmia i una hipoinsulinèmia afectant l'homeostasi de la glucosa (Swisa et al., 2016). Juntament amb aquest resultats s'ha determinat una baixada en la síntesi d'ATP regulada per glucosa, a més d'alteracions en el flux de calci. I a nivell molecular s'observa una baixada de l'expressió de gens funcionals com el receptor de Glp1 (*Glp1r*), el gen *scl2a2* (*Glut2*), i el gen que codifica pel transportador de zinc (*Scl30a8*) necessari en la secreció d'insulina (Mitchell et al., 2017).

MafA

MafA és un factor de la mateixa família de *basic leucine-zipper TF*, importants per la maduració de la cèl·lula β . A més, s'ha descrit com a un factor crucial i específic de la cèl·lula β , activador clau per la transcripció del gen de la insulina (Matsuoka et al., 2003). L'inici de l'expressió de *MafA* és al dia E13.5 juntament amb l'onada de cèl·lules insulino-positives i es mantindrà expressat en aquesta població cel·lular en l'etapa adulta (Matsuoka et al., 2004).

En animals *Knock-out* pel factor MafA (*MafA*^{KO}) pateixen una baixada de l'expressió d'insulina en la majoria de cèl·lules β , acompanyada de la pèrdua de la identitat cel·lular (Nishimura et al., 2014). La deficiència en aquest factor provoca la baixada d'expressió de gens importants per la maduració de la cèl·lula β ja a dia embrionari E18.5 com *insulina1*, *insulina2*, *Pdx1*, *NeuroD1* i *Scl2a2* acompanyada d'una deficiència en la secreció d'insulina *in vivo*, fet que mostra el seu paper necessari pel manteniment dels nivells normals d'insulina (Zhang et al., 2005). Animal *MafA*^{KO} desenvolupen una estructura de l'illot anormal just després de néixer. A més, aquest factor, específic de cèl·lula β s'expressa de manera tardana en la segona transició i actua aigües avall de Nkx6-1 (Matsuoka et al., 2004).

En la Fig.11 es mostren importants factors de transcripció involucrats en cada etapa del desenvolupament de la cèl·lula β .

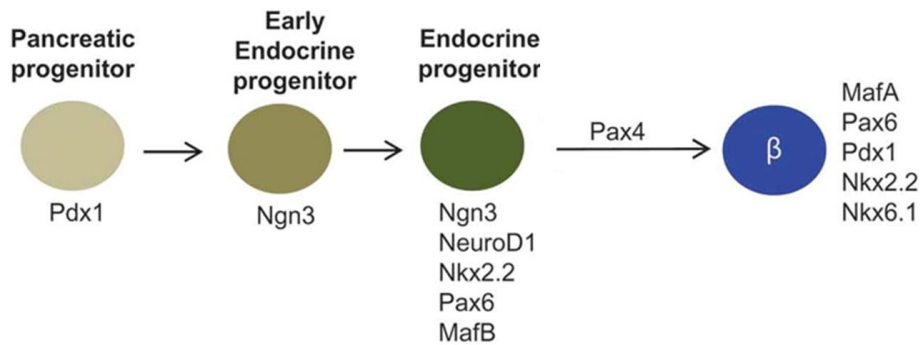


Figura 11. Representació esquemàtica de la via d'especificació de la cèl·lula β i els principals factors de transcripció implicats. Extret i adaptat de (Dong & Wu, 2017).

IMPLICACIÓ DE L'EPIGENÈTICA EN EL DESENVOLUPAMENT PANCREÀTIC

Els programes de diferenciació estan controlats per sistemes de senyalització cel·lular, per factors de transcripció i per mecanismes epigenètics. Els canvis dinàmics de l'expressió gènica s'associen a canvis epigenètics. L'epigenètica es defineix com a un sistema de regulació heretable que controla l'expressió de gens sense modificar la seqüència del DNA. Aquests canvis epigenètics són reversibles però acostumen a ser estables durant cicles de divisió cel·lular. Els mecanismes epigenètics són essencials en tot el procés de regulació transcripcional exercint un paper en els patrons de l'expressió gènica. Els principals mecanismes epigenètics descrits fins el moment són la metilació del DNA, les modificacions en el RNA no codificant (RNAi, RNAs, ...) i les modificacions d'histones que donen lloc a canvis en l'estructura de la cromatina.

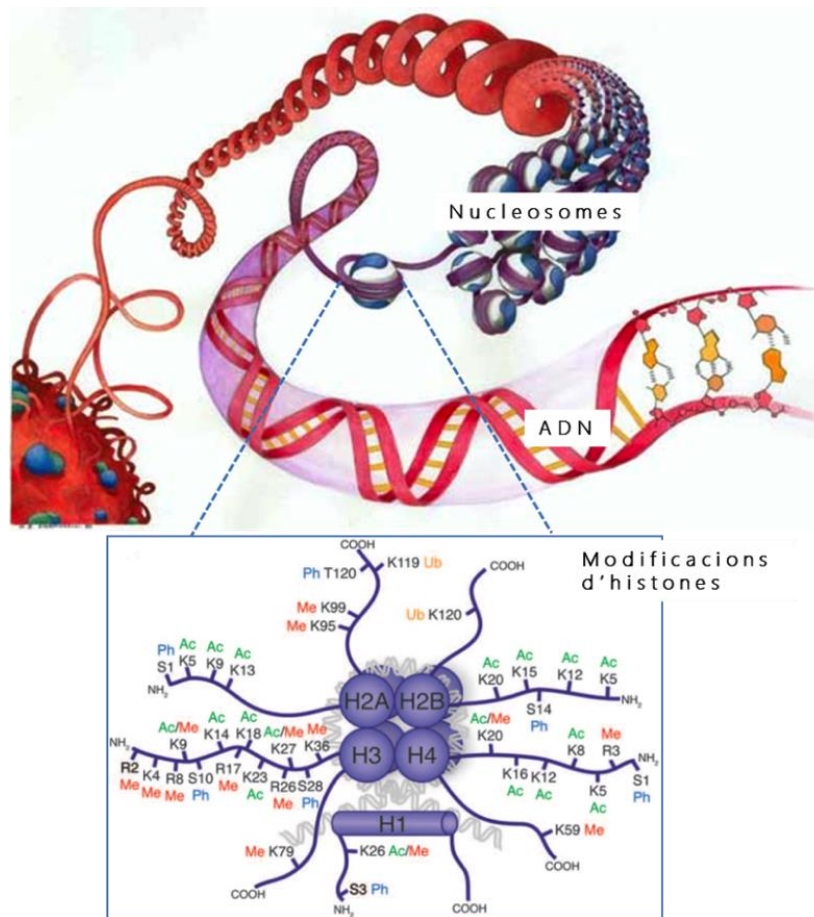


Figura 12. Representació il·lustrativa dels principals mecanismes epigenètics reguladors de l'expressió gènica. La doble cadena de ADN porta la informació genètica. L'ADN s'associa a proteïnes, anomenades histones, encarregades de formar la cromatina. La unitat més petita de la cromatina és el nucleosoma que està constituït per 147 pb de DNA enrotllat a 8 proteïnes de histona (2 unitats de H2A, H2B, H3 i H4). La cromatina controla l'accés de la informació guardada en el ADN a través de la seva compactació heterocromatina (més compactada - transcripcionalment inactiva) i eucromatina (menys compactada - transcripcionalment activa). Normalment la heterocromatina, té les histones hipoacetilades i està enriquida en marques de metilació associades al silenciament gènic (per exemple: H3K9me3, H3K27me3,...) a més de tenir un elevat nivell de metilació en el ADN. Per contra, l'eucromatina, té les histones enriquides en grups acetils i metils relacionats amb l'activació transcripcional (per exemple H3K4me3) i els nucleosomes estan menys compactats fet que permet l'accés a la maquinària transcripcional. Adaptació de (Tollervey & Lunyak, 2012).

Les histones són proteïnes que juntament amb el ADN s'organitzen en nucleosomes constituint la cromatina. Aquestes modificacions d'histones consisteixen principalment en processos de metilació, acetilació, deaminació i ubiquïtinització, mitjançant la incorporació o l'eliminació de diferents grups químics (metils, acetils, ubiquïtines, fosforilacions o altres) a les diferents "cues" de les proteïnes histones com es mostra en la Fig.12. Existeixen diferents grups d'enzims reguladors d'aquestes modificacions d'histones: acetiltransferases (HAT), desacetilases (HDAC), metiltransferases (HMT), demetilases (HDM)... que incorporen o

eliminen de forma dinàmica els diferents grups regulant així l'activitat transcripcional de la cromatina.

Dins d'un nucleosoma, el tetràmer de les histones H3-H4 formen un complex amb l'ADN. Aquest tetràmer estable permet que les modificacions post-traduccionals de l'histona siguin marques epigenètiques heredables, així com modificacions directes sobre l'ADN. Qualsevol modificació en les histones pot afectar l'estructura de la cromatina i en conseqüència l'activitat gènica podent resultar tant en una activació transcripcional com en una repressió gènica. En general, l'acetilació de la lisina es relaciona amb l'activitat transcripcional mentre que la metilació pot provocar l'activitat o l'inhibició transcripcional depenent del residu que es metili.

A la histona 3 (H3) els principals llocs d'acetilació inclouen les lisines K14, K18, K23 i K27, i tota l'acetilació està correlacionada essencialment amb l'activitat transcripcional que es localitzen en els llocs d'inici de la transcripció (TSS) o enhancers dels gens transcrits activament. En canvi, la relació de la metilació en la H3 amb la transcripció depèn del seu nivell i residu. Per exemple, a la histona 3 la trimetilació de la lisina 4 (H3K4me3) i la trimetilació de la lisina 9 (H3K9me3) estan associats amb l'activació i la repressió transcripcional respectivament. La modificació d'histona H3K4me3, és un bon marcador associat amb gens activament transcrits. Concretament, H3K4me3 s'enriqueix en els llocs TSS mentre que H3K4me2 i H3K4m1 es troben enriquits en una regió diferent del gen, com es pot observar en la Fig.13. Els enhancers de gens actius generalment estan marcats per H3K4me1 i amb la marca acetilada de la lisina 27 (H3K27ac) però també es poden trobar enriquits altres regions més avall de l'inici de la transcripció (Kimura, 2013).

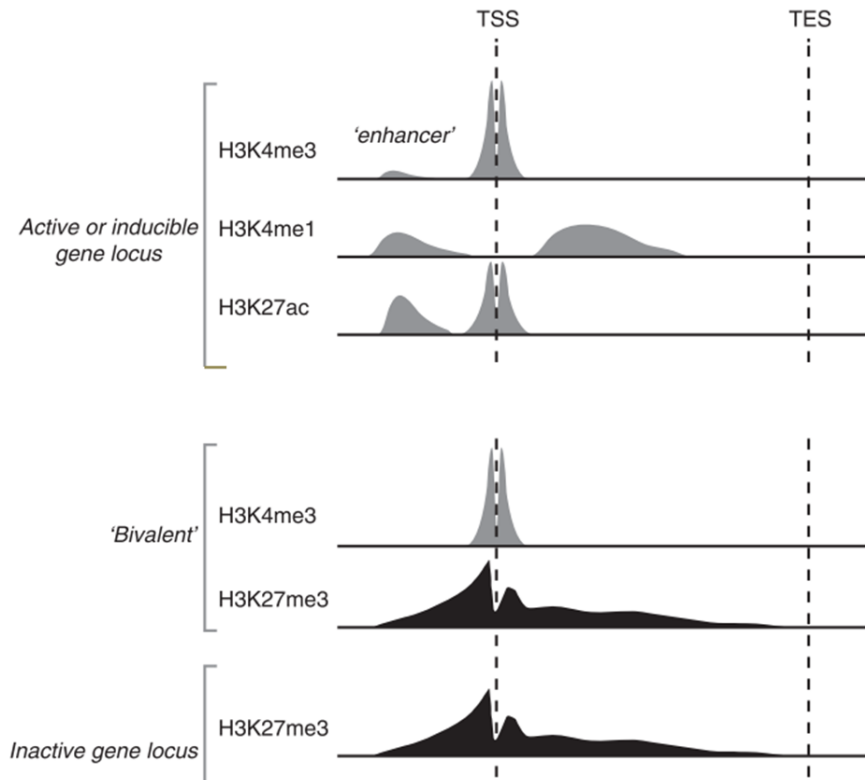


Figura 13. Representació il·lustrativa de la distribució de modificacions de la histona H3. La distribució de 4 modificacions de H3 respecte a la seva distribució d'enriquiment en el gen. TSS: lloc d'inici transcripcional. TES: lloc de fi transcripcional. L'enriquiment de la marca H3K4me3 es dona al voltant de TSS. H3K4me1 és enriquit al voltant d'enhancers i a zones posteriors a TSS. L'enriquiment de H3K27ac es dona a enhancers de gens actius i a TSS. En cèl·lules mare no diferenciades, hi ha marcatge bivalent, on hi ha l'enriquiment de la marca H3K4me3 i de la marca H3K27me3 al voltant de TSS en molts gens. En cèl·lules somàtiques, la marca H3K27me3 es troba enriquida en zones TSS inactives. Extret i modificat de (Kimura, 2013)

En les cèl·lules mare no diferenciades, els llocs TSS de la majoria dels gens estan enriquits amb la marca H3K4me3, independentment de l'estat d'expressió gènica, i els gens reprimits estan associats amb H3K27me3, donant lloc a les modificacions bivalents actives i inactives al mateix nucleosoma. Durant la diferenciació, les marques H3K4me3 o H3K27me3 s'eliminen per establir gens reprimits o activats respectivament (Kimura, 2013).

Marca repressiva H3K27me3 i els seus reguladors

La trimetilació de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3) és una marca repressiva que juga un paper crucial durant processos de desenvolupament, de diferenciació i de manteniment del destí cel·lular, en cèl·lules ja diferenciades, reprimint la transcripció de gens no específics

pel tipus cel·lular concret (Tollervey et al., 2012). Aquesta marca repressiva actua com un mecanisme important de repressió de gens que promouen la pluripotència a més de controlar programes de llinatge selectius en les cèl·lules descendents (Van Arensbergen et al., 2010).

La maquinària enzimàtica que catalitza l'addició de grups metil a H3K27 és el complex repressiu PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*), compost per les metilases Ezh2 o Ezh1 i els compostos Eed, Suz12 i RbAp46/48. Aquest complex PCR2 catalitza la di- i tri- metilació de H3K27, provocant un estat de la cromatina més condensada i causant una repressió transcripcional. Per altra banda, existeixen demetilases específiques de H3K27 que eliminen els grups metils. Aquests enzims són Utx i Jmjd3 que contenen un *domini JmjC* (Jumonji) i formen complexos amb altres compostos com MLL, RBBP5 i WDR5. Com a conseqüència de l'acció d'aquestes demetilases, s'elimina la marca repressiva H3K27me3, fet que provoca l'acetilació d'aquesta lisina 27 (H3K27ac) i genera una cromatina transcripcionalment activa (Hong et al., 2007, Swigut et al., 2007, Yoo et al., 2011).

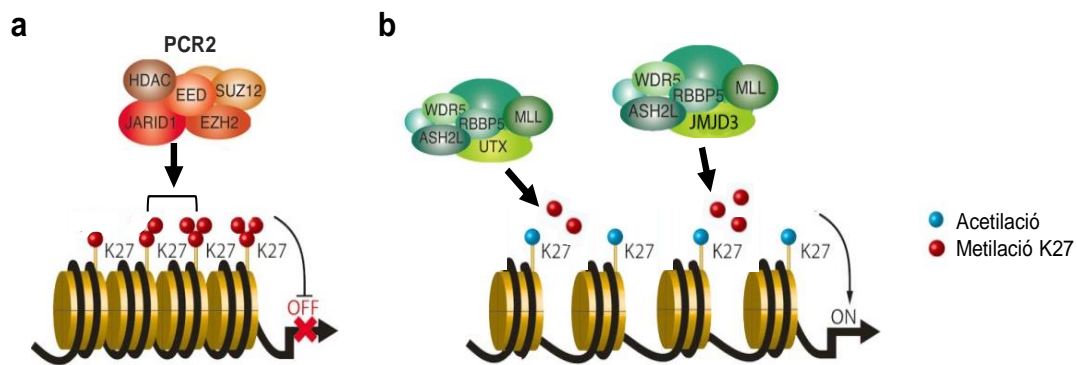


Figura 14. Representació del procés de la regulació transcripcional a través de l'acetilació o metilació de H3K27. Adaptat de (Yoo et al., 2011).

De fet, se sap, que les marques repressives H3K27me3 són molt importants durant la embriogènesis degut a que la falta de components de la maquinària enzimàtica del complex PCR2, com Suz12 i Ezh2, o mutants per EED en ratolins transgènics, provoca la mort de l'embrió en les primeres etapes post-implantació mostrant defectes greus en el desenvolupament i la proliferació (Pasini et al., 2004).

H3K27me3 en el desenvolupament pancreàtic

En cèl·lules mare embrionàries, la majoria dels promotors de gens involucrats en el desenvolupament, es caracteritzen per un marcatge bivalent basat en la presència de la marca repressiva H3K27me3 dominant i la marca activadora H3K4me3. La presència d'una senyal de diferenciació cel·lular permet l'eliminació de la marca repressiva o la no incorporació *de novo* de la marca H3K27me3, provocant una ràpida activació de gens claus del procés de diferenciació (Xie et al., 2013; Arnes et al., 2015; Voigt et al., 2013; Xie et al., 2015)

S'ha descrit el paper clau de JmjD3 per conduir les cèl·lules mare cap al llinatge endoderm definitiu (Kartikasari et al., 2013). A partir d'aquí, el procés de diferenciació de l'endoderma cap a un destí hepàtic o pancreàtic varia segons les modificacions d'histones que es trobin en els elements dels gens silenciosos involucrats en un o altre llinatge. S'ha observat que en les cèl·lules progenitores pancreàtiques multipotents i en les cèl·lules progenitores del fetge tenen patrons de cromatina diferents. En el fetge, predominen les marques d'acetilació H3K9 i H3K14 i en el pàncrees està present la marca repressiva H3K27me3. En aquest mateix context, s'ha descrit que Ezh2 es troba present en la regulació del desenvolupament pancreàtic i no hepàtic, jugant un rol important en el moment d'escollir el destí cel·lular (Xu et al., 2011).

A partir de l'obtenció de progenitor pancreàtic actuen enzims de la família de les histones deacetilases (o HDAC) com HDAC I i II, que estan involucrats en l'establiment dels diferents llinatges endocrins. Un estudi demostra que el tractament de primordis pancreàtics amb inhibidors de HDACs provoca un increment del nombre de cèl·lules Ngn3 positives (Haumaitre et al., 2008). Juntament amb aquests enzims, Ezh2 intervé per regular els diferents destins cel·lulars. En un model de ratolí on Ezh2 s'elimina en estadis de progenitor pancreàtic (cèl·lules Pdx1+) provoca un increment de cèl·lules β en les críes de ratolí. Aquest fet suggereix que l'expressió d'Ezh2 restringeix el desenvolupament del pàncrees endocrí (C. R. Xu et al., 2014). Addicionalment, la inhibició d'Ezh2 en els primordis pancreàtics i en protocols de diferenciació de hESC incrementa el nombre de cèl·lules progenitores endocrines *in vitro* (C. R. Xu et al., 2014). S'ha descrit que les cèl·lules progenitores pancreàtiques pateixen canvis en la marca H3K27me3 involucrats en la diferenciació de les cèl·lules β (Van Arensbergen et al., 2010). Concretament durant el procés d'especificació endocrina se sap que existeix pèrdua

de la marca repressiva de H3K27me3 en els promotors dels FT endocrins específics. És més, se sap que el factor de transcripció Ngn3, que promou el destí endocrí, pot influenciar el patró de metilació d'histones (H3K27me3 i H3K4me3) en regions promotores d'una selecció dels seus gens diana (Pujadas et al., 2011).

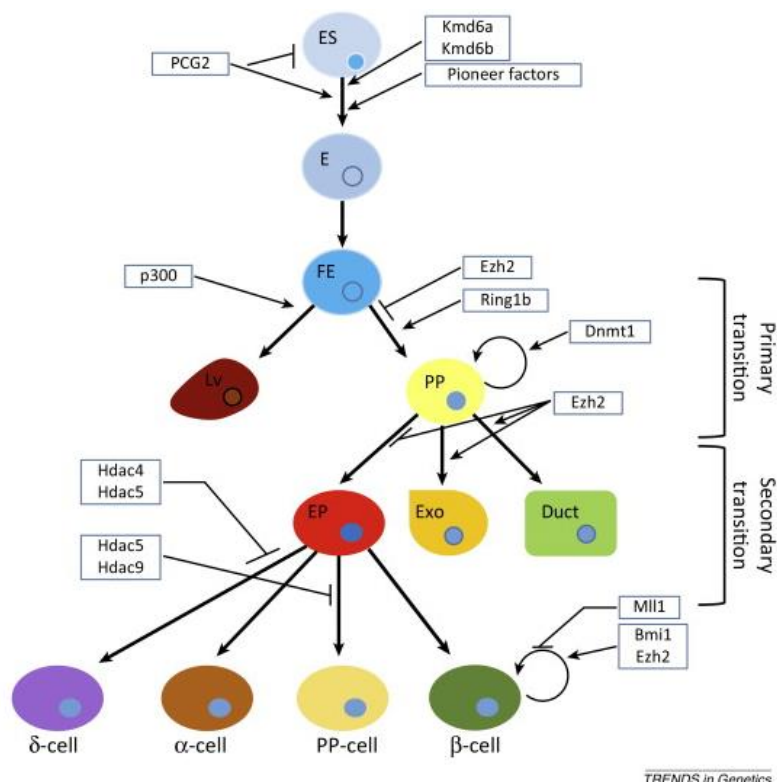


Figura 15. Representació del programa epigenètic durant la diferenciació de la cèl·lula β pancreàtica. ES: cèl·lules mare, E: endoderma, FE: Progenitor intestí anterior, PP: progenitor pancreàtic, NGN3: cèl·lules endocrines, β : cèl·lula beta pancreàtica, α : cèl·lula α pancreàtica. Extret de (Arnes & Sussel, 2015).

DIABETIS MELLITUS

La diabetis mellitus és un conjunt de trastorns metabòlics caracteritzats per un increment de la concentració de glucosa en sang, com a conseqüència d'un defecte en el mecanisme de secreció de la insulina i/o de l'acció d'aquesta hormona. La hiperglicèmia crònica de la diabetis s'associa a llarg plaç a un conjunt de complicacions secundàries com la retinopatia, la neuropatia i la nefropatia diabètica, les malalties cardiovasculars, les úlceres, la enteropatia diabètica i les amputacions de les extremitats inferiors.

Segons la Federació Internacional de la Diabetis (IDF, *International Diabetes Federation*), en el 2015, 415 milions de persones adultes van estar afectades per la diabetis. Per l'any 2040, es preveu que la xifra incrementi a 642 milions de persones, convertint aquesta malaltia en una pandèmia. La majoria de casos de DM diagnosticades en el món s'engloben en dues categories: la DM tipus I i la DM tipus II. A més, existeixen altres tipus de diabetis menys freqüents. Segons la Associació Americana de Diabetis (ADA), la diabetis es pot classificar en:

- *Diabetis tipus 1 (DM1)*: és una enfermetat metabòlica crònica deguda a la destrucció de la cèl·lula β pancreàtica dels illots de Langerhans i sol provocar una deficiència absoluta de la insulina. Representa entre el 5-10% dels casos de diabetis.
- *Diabetis tipus 2 (DM2)*: és una enfermetat que es produeix per un defecte en la secreció d'insulina en el context d'una resistència a la insulina per part dels teixits perifèrics. Correspon al 90-95% de tots els casos de diabetis. La DM2 és un trastorn poligènic complex on hi ha un impacte de factors ambientals, normalment relacionats amb l'estil de vida.
- *Diabetis gestacional*
- Altres:
 - Síndrome de diabetis monogènica*: causada per mutacions produïdes en un sol gen i que presenten un patró d'herència autosòmic dominant. Entre les diabetis monogèniques més conegudes es troben les diabetis tipus MODY i alguns tipus de diabetis neonatal permanent.
 - Enfermetats de pàncrees exocrí* (fibrosi quística)
 - Secundària a fàrmacs* (ex. Anti-VIH) o *diabetis post-trasplant*.

Diabetis mellitus tipus 1

La diabetis tipus I (DM1) és una malaltia d'etiologia desconeguda que es dona com a conseqüència d'una resposta immunitària inapropiada de l'organisme contra les cèl·lules β . La DM1 és diagnosticada principalment en la infància o en la joventut després d'un llarg període asimptomàtic durant el qual les cèl·lules del sistema immunitari invaeixen l'illot de Langerhans i inicien la insulinitis i l'eliminació selectiva de les cèl·lules β pancreàtiques. Els símptomes de la DM1 són: augment de la sed, augment de l'apetit, micció freqüent, pèrdua de pes sobtada, visió borrosa, somnolència, marejos, nàusees, vòmits i disminució de la resistència en l'exercici. Els pacients que pateixen aquesta malaltia necessiten de l'administració d'insulina per mantenir els nivells de glucosa en sang controlats i sobreviure.

En la DM1 la destrucció de les cèl·lules β pancreàtiques és variable depenent de l'individu. Es desconeix el desencadenant de la reacció autoimmunitària però s'han descrit factors de susceptibilitat tant genètics com ambientals i s'ha identificat la seva base autoimmunitària. La susceptibilitat a la DM1 és poligènica. En humans s'han pogut identificar més de 50 *loci* de susceptibilitat definits com IDDM i descrits en la base de dades T1Dbase (www.t1dbase.org).

Història de la insulina

Durant el segle 20, es van donar lloc els grans avenços de la teràpia en diabetis. Al 1916 es va descobrir el principi actiu de la insulina pel científic romanès Paulescu i 5 anys més tard, l'hormona de la insulina va ser aïllada, del pàncrees d'un gos, pels científics Banting i Best amb el nom de *Isletin*. L'aïllament de la insulina va permetre la fabricació, la comercialització i el tractament d'aquesta hormona amb el nom de *Isletin* a partir de l'any 1923. En aquell moment, es va introduir a Barcelona pel Dr. Carrasco Formiguera qui va realitzar els primers tractaments a la ciutat. En els següents anys es va aïllar l'hormona cristal·litzada i l'hormona d'acció lenta. Malauradament, l'hormona produïda fins el moment era procedent de porc i variava en un aminoàcid de la humana, la qual cosa provocava al·lèrgies en alguns pacients. Amb l'objectiu de resoldre aquest problema, l'any 1980, Hoescht va canviar aquest aminoàcid (alanina) per una treonina mitjançant la *transpeptidació*. En la mateixa època i concretament, l'any 1977, Gilbert i Villa-Komaroff van identificar el gen de la insulina i, Riggs, Itaura i Boyer van sintetitzar les dues cadenes per separat i van unir-les mitjançant mètodes químics. Elli

Lilly va comercialitzar aquesta nova insulina amb el nom comercial de *Humulin*. Posteriorment, van aparèixer noves insulina d'efecte més ràpid *Humalog*, o d'efecte més lent, la *Glargina*. Actualment totes les insulines es sintetitzen mitjançant tècniques d'enginyeria genètica, fet que permet un tractament accessible a tothom (Mulet. 2013).

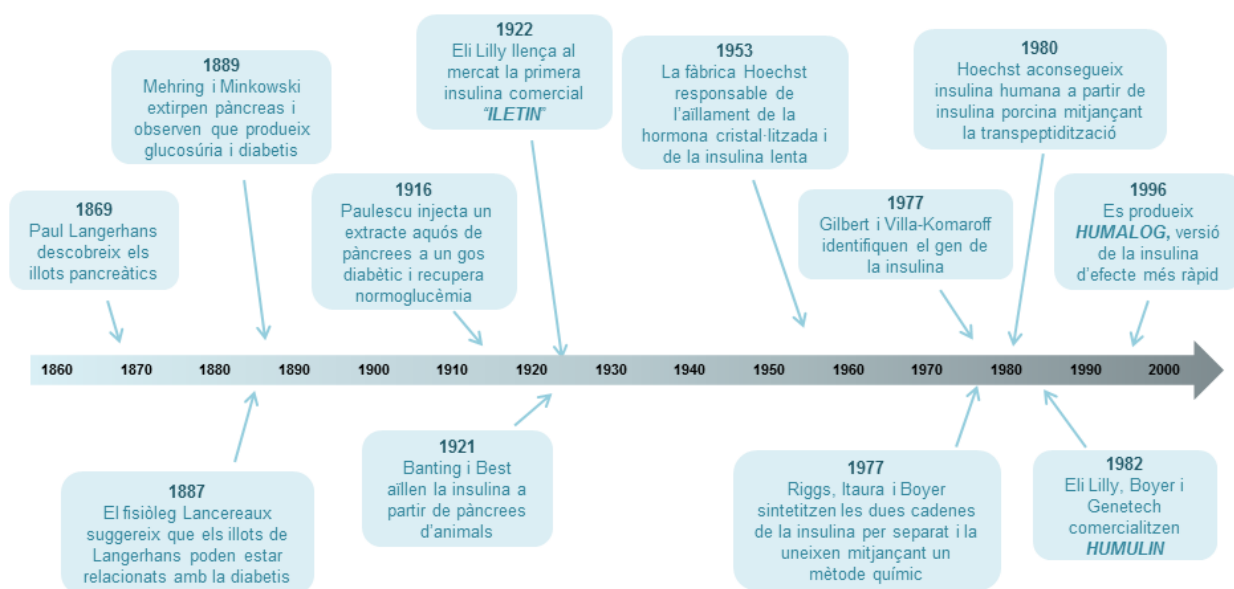


Figura 16. Imatge representativa de la història del descobriment i l'evolució de la insulina. (Adaptació de <https://nutrirecomendacionesdiabetes.files.wordpress.com/2014/09/historia-de-insulina.jpg>)

TERÀPIES PEL TRACTAMENT DE LA DIABETIS

Administració d'insulina exògena

Avui en dia, la principal teràpia de la DM1 es basa en l'administració d'insulina exògena, mitjançant múltiples injeccions diàries o bombes d'insulina. Aquest tractament obliga al pacient a dur a terme un autocontrol dels nivells glucèmics, dels ajustos de les dosis d'insulina, del càlcul de carbohidrats de la dieta i de l'exercici físic. El control glucèmic no és sempre precís i adequat, i en algú cas es fa difícil obtenir la normoglicèmia.

A més a més, és coneguda la relació que existeix entre el control glucèmic dels pacients amb el retràs de les complicacions secundàries provocades per la diabetes anomenades anteriorment. En els últims anys, s'ha intensificat la recerca per desenvolupar una

insulinoteràpia que permeti imitar la secreció endògena d'insulina i el comportament fisiològic d'aquesta hormona.

Trasplantament de pàncrees o d'illots pancreàtics

Pel tractament de la diabetis, seria ideal poder establir una insulinoteràpia de forma automatitzada i que contribueixi a obtenir un control glucèmic similar al que s'obté en un individu no diabètic. Teòricament, es podria establir aquest control mitjançant el trasplantament d'un pàncrees o d'illots de Langerhans, que ha portat a anys de recerca en aquesta estratègia.

El primer trasplantament de pàncrees es va realitzar l'any 1966 en la Universitat de Minnesota però no va ser fins els anys 90 que es va començar a considerar una opció terapèutica real per pacients amb DM1. A diferència d'altres trasplantaments d'òrgans, el trasplantament de pàncrees no és vital, ja que les persones diabètiques poden viure amb l'administració d'insulina exògena. En els casos en que està indicat, el trasplantament pot millorar la supervivència de la persona malalta i la seva qualitat de vida, aconseguir el control de sucre a la sang sense necessitat d'administrar insulina, i evita determinades complicacions secundàries de la diabetis. La complicació secundària més freqüent de la diabetis és la insuficiència renal crònica, generalment el trasplantament pancreàtic es fa juntament amb el ronyó (89%) o posteriorment al trasplantament de ronyó (10%). Només el 1% dels casos es realitza el trasplantament del pàncrees aïllat. El trasplantament de pàncrees permet la insulinodependència en la majoria de casos però no indica la cura de la diabetis, ja que la persona continua tenint els factors de risc.

Per altra banda, l'any 2000, va ser un any important pel trasplant d'illots pancreàtics, ja que es va aconseguir grans avenços. El trasplantament d'illots procedents de donadors cadavèrics a 7 pacients amb DM1, va permetre evitar l'administració d'insulina durant un cert temps (Shapiro et al.,2000). Actualment, el trasplantament d'illots pancreàtics en malalts diabètics, que encara no han desenvolupat complicacions cròniques, es troba en fase experimental i només es practica en clíniques molt especialitzades.

Malgrat els resultats raonablement positius, aquestes dues estratègies tenen inconvenients ja que existeix un reduït nombre de donants per tots els possibles receptors, possibilitat de

rebuig de l'òrgan trasplantat i existeixen efectes adversos del tractament d'immunosupressors que limiten l'ús d'aquesta pràctica.

Generació de cèl·lules β per trasplantament

El descobriment de les cèl·lules mare embrionàries capaces de diferenciar-se en qualsevol cèl·lula de l'organisme va inspirar noves estratègies per reemplaçar completament teixits danyats o perduts en malalts. L'any 1998 Thomson i col·laboradors van aconseguir satisfactòriament generar les 3 capes de cèl·lules germinals a partir de cèl·lules mare embrionàries humanes (hESC). Aquest fet va revolucionar la teràpia cel·lular, on des de fa uns anys s'han aconseguit grans èxits. Per exemple, s'ha descrit l'obtenció de cardiomiòcits a partir d'ESC, capaços de prevenir arítmies, un cop trasplantats en el múscul cardíac danyat de ratolins (Shiba et al., 2012). O l'obtenció de cèl·lules progenitores d'oligodendròcits a partir d'ESC, que un cop trasplantats han aconseguit millorar la funció motora en rates que patien dany de la medul·la espinal (Keirstead et al., 2005).

Vistes les limitacions del trasplantament d'illots pancreàtics, hi ha un gran interès en trobar altres maneres d'obtenir cèl·lules β que puguin ser utilitzades per curar la diabetis. En aquest context, la medicina regenerativa, i en particular **la teràpia cel·lular substitutiva**, es fa una candidata atractiva en diabetis ja que té com objectiu reemplaçar les cèl·lules β pancreàtiques perdudes o malmeses principalment gràcies a la generació de cèl·lules productores d'insulina capaces de recuperar les funcions normals. Doncs, s'intenta generar cèl·lules β madures i funcionals capaces de secretar insulina en resposta a estímuls fisiològics com la glucosa.

Un element clau en el plantejament de teràpies cel·lulars substitutives és l'elecció de la cèl·lula d'origen a partir de la qual es generaran les cèl·lules substituïdes. La utilització d'una cèl·lula pluripotent, ja sigui una cèl·lula mare embrionària (ESC) o una cèl·lula pluripotent induïda (iPSC), com una cèl·lula especialitzada aporta avantatges i inconvenients que descrivim en la Taula 2.

TIPUS CEL·LULAR	CARACTERISTIQUES	AVANTATGES	INCONVENIENTS
Cèl·lules mare embrionàries (ES cells)	Provenen d'un embrió en els seus primers estadis. No especialitzades Pluripotents	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Proliferació il·limitada (immortals) ➤ Fàcil manteniment en el laboratori 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Problemes ètics ➤ Problemes de rebuig ➤ Risc de producció de tumors
Cèl·lules pluripotents induïdes (iPS cells)	Provenen de cèl·lules somàtiques (ex. fibroblasts) No especialitzades Pluripotents	<ul style="list-style-type: none"> ➤ No problemes ètics ➤ S'obtenen del propi pacient ➤ Possibilitat de la teràpia de reemplaçament per les cèl·lules del pacient 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Ineficient, baixa producció ➤ Reprogramació incompleta ➤ Risc de producció de tumors
Cèl·lules somàtiques	Especialitzades (per ex. cèl·lules musculars, nervioses, fibroblasts...)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ No problemes ètics ➤ S'obtenen del propi pacient ➤ Possibilitat de la teràpia de reemplaçament per les cèl·lules del pacient ➤ No hi ha risc de producció de tumors 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Baixa producció ➤ Reprogramació incompleta

Taula 2. Avantatges i inconvenients dels tipus cel·lulars utilitzats per processos de reprogramació cel·lulars.

Les estratègies per generar cèl·lules β que parlarem en aquesta tesi es descriuen en la Fig.17.

D'una banda, tenim els protocols de **diferenciació dirigida**, on s'intenta dirigir cèl·lules pluripotents cap a cèl·lules especialitzades a partir de modificacions seqüencials dels seus perfils d'expressió gènica mitjançant l'addició de morfògens i molècules de senyalització. En un primer moment es va pensar en la utilització de cèl·lules mare embrionàries, pel fet que són capaces de proliferar de manera il·limitada i mantenir el seu potencial de diferenciació en qualsevol teixit de l'organisme. Posteriorment, va sorgir l'opció d'utilitzar cèl·lules pluripotents induïdes (iPS).

D'altra banda, una estratègia alternativa a l'ús de cèl·lules pluripotents consisteix en generar cèl·lules d'interès a partir de cèl·lules adultes especialitzades mitjançant un procés de **transdiferenciació**, on s'utilitzen generalment factors de transcripció claus en el desenvolupament de la cèl·lula destí.

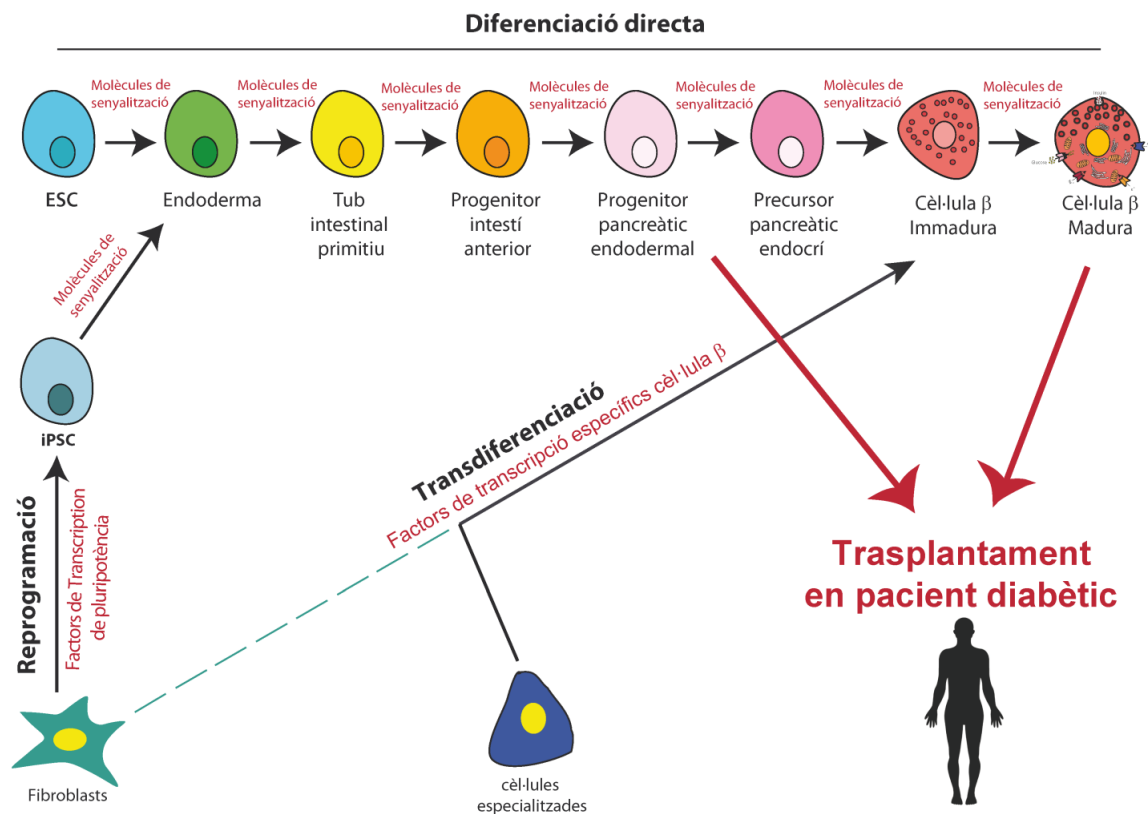


Figura 17. Imatge representativa d'estratègies per la generació de cèl·lules β funcionals. Resum de les diferents estratègies per generar cèl·lules productores d'insulina. Els protocols de diferenciació dirigida utilitzen factors de creixement i molècules solubles que poden induir el pas de cèl·lules pluripotents cap als diferents estadis fins arribar a una cèl·lula β . Els protocols de transdiferenciació utilitzen bàsicament l'addició de factors de transcripció i/o molècules solubles per obtenir cèl·lules β a partir de diferents cèl·lules especialitzades. Adaptació de (Rovira & Gasa).

Obtenció de cèl·lules β a partir de cèl·lules mare (ES)

En la teràpia cel·lular en diabetis, els protocols de diferenciació dirigida es basen en conduir la cèl·lula pluripotent pels mateixos estadis transicionals que recorre la cèl·lula progenitora durant el seu desenvolupament embrionari fins arribar a generar cèl·lules β madures. En aquest context, els principals estadis que es contemplan normalment en un protocol de diferenciació dirigida són els següents: endoderma, progenitor intestí anterior, progenitors pancreàtics, cèl·lules endocrines i cèl·lula β . El coneixement previ sobre els mecanismes implicats en el desenvolupament del pàncrees i en els processos de diferenciació de la cèl·lula β ha estat clau a l'hora d'identificar molècules de senyalització i factors de creixement essencials que poden guiar les cèl·lules mare a través d'aquests estadis.

Ja fa prop de 15 anys que es van publicar els primers protocols de diferenciació dirigida de cèl·lules ESC cap a cèl·lules productores d'insulina. Els primers estudis descrits on utilitzaven cèl·lules mare pluripotents van identificar els estadis necessaris i efectius per l'especificació de les ESC cap el endoderma definitiu, tub intestinal primitiu i progenitors pancreàtics (review Keller, 2005). En el 2005, D'Amour i col·laboradors van aconseguir realitzar amb èxit un protocol de diferenciació cap al llinatge pancreàtic a partir de cèl·lules ESC (K. A. D'Amour et al., 2005). En aquell primer moment es van descriure els factors de regulació claus pel progrés del desenvolupament pancreàtic, com Sox17 i Foxa2, necessaris per induir les ESC cap a l'endoderma i posteriorment el tub intestí primitiu. A més, van descriure l'importància de molècules senyalitzadores com els membres de la superfamília TGF- β , el Nodal i l'Activina A en aquest procés de diferenciació. Les característiques d'Activina A van permetre obtenir un protocol eficient induint la diferenciació cap a endoderma definitiu a partir d'ESC *in vitro*.

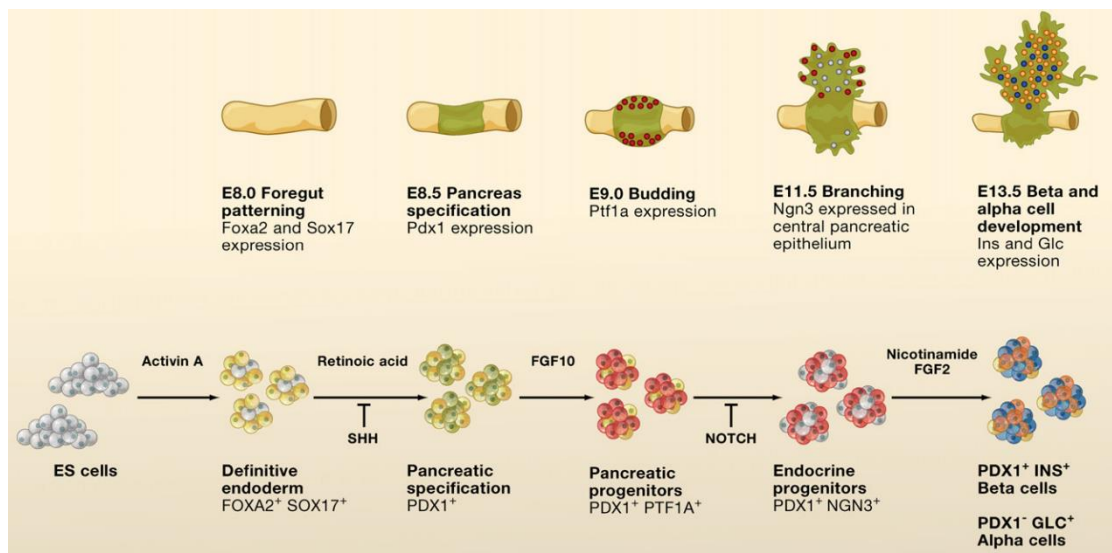


Figura 18. Desenvolupament pancreàtic en embrions de ratolins i en cultius de cèl·lules ES humanes. (Murry & Keller, 2008)

Posteriorment, un cop s'ha aconseguit obtenir endoderma definitiu aquest ha de diferenciar-se a endoderma pancreàtic, i per això és necessari senyals apropiades. Un factor clau és Pdx1 que dona lloc a la regió pancreàtica en el desenvolupament de l'organisme. Altres factors com Hnf1 β i Hnf6 (Onecut1) són factors també expressats en pàncrees i ajuden a guiar en la diferenciació de les cèl·lules mare cap a cèl·lules β *in vitro*. A més, la combinació de senyals involucrats en la diferenciació pancreàtica com Àcid retinoic, inhibidor de SHH i FGF10 són suficients per induir l'epiteli pancreàtic a partir de l'endoderma definitiu derivat de cèl·lules

ESC humanes (K. a D'Amour et al., 2006). També, el protocol descrit per D'Amour i col·laboradors aconseguixen obtenir cèl·lules amb un contingut d'insulina similar al de les cèl·lules β adultes. Per contra, les cèl·lules generades no responen a l'estimulació de glucosa. S'han publicat diverses variacions sobre el protocol anterior, on han aconseguit desenvolupar progenitors pancreàtics mitjançant la utilització de factors com Nkx6-1, Ptf1A, i de molècules químiques com inhibidors de la proteïna BMP i activadors de la proteïna Kinase C (PKC) (review Pagliuca et Melton, 2013).

Finalment, l'objectiu és l'obtenció de cèl·lula β funcional. Concretament s'espera que la cèl·lula generada expressi factors de transcripció específics, formin grànuls secretors d'insulina, exhibeixin secreció d'insulina per estimulació de la glucosa i que siguin capaces de corregir la hiperglucèmia quan són trasplantades en animals diabètics. En la majoria d'estratègies es veu la dificultat d'obtenir cèl·lules β completament funcionals i s'observen signes de immaduresa. Es van presentar com a possibles causes potencials la presència de cèl·lules multihormonals que co-expressen insulina i glucagó, la falta de resposta a la glucosa degut, possiblement, a defectes en els canals de K_{ATP} i la falta de transportadors de glucosa com GLUT1 (Bruin et al., 2014). En el mateix context, s'ha demostrat que el perfil epigenètic de la cèl·lula β és únic, establint una connexió necessària entre la xarxa de FTs i el perfil epigenètic. Aquest fet provoca que la epigenètica també pot juga un paper important en els processos de diferenciació cap a cèl·lules productores d'insulina. Concretament, s'ha mostrat que anomalies en la marca H3K27me3 poden estar darrera de la immaduresa de les cèl·lules productores d'insulina generades a partir de cèl·lules ESC (Xie et al., 2013). Estudis recents assenyalen que la manipulació epigenètica, mitjançant inhibidors químics d'enzims epigenètics, en protocols de diferenciació dirigida milloren l'obtenció de les cèl·lules endocrines (Katz et al., 2013; Pennarossa et al., 2013).

En els darrers anys, s'ha invertit molt d'esforç per millorar l'eficiència i la maduració de les cèl·lules productores d'insulina generades. Des de fa menys de 5 anys, es veu un progrés en els mètodes de diferenciació de cèl·lules mare embrionàries cap a cèl·lules productores d'insulina (reviews: Domínguez-Bendala, et al., 2016; Wei & Hong, 2016; Millman & Pagliuca, 2017). No obstant això, les condicions requerides per a la maduració funcional de les cèl·lules productores d'insulina generades que responen a la glucosa continuen sent imprecises.

Es va posar en valor l'importància de l'ambient en els protocols de diferenciació dirigida indicant que un model *in vivo* podria ser propici per a la maduració funcional de les cèl·lules

β generades en comptes de les condicions *in vitro* que estaven sent utilitzades, incapaces de madurar les cèl·lules. En aquest context, Kroon i col·laboradors van observar que al voltant dels 3 mesos, les cèl·lules progenitores pancreàtiques generades a partir d'ESC i trasplantades en un ratolí tractat amb STZ prevenien la diabetis (Kroon et al., 2008). Els resultats d'aquest estudi van demostrar que les cèl·lules progenitores pancreàtiques havien esdevingut cèl·lules productores d'insulina funcionals. Per contra un dels problemes que van veure va ser l'alt percentatge de teratomes al voltant de l'empelt. Reznia i col·laboradors, va obtenir resultats similars amb el seu protocol, on diferenciaven ESC humanes fins a la fase de progenitor pancreàtic i posteriorment la maduració de les cèl·lules es realitzava *in vivo* (Reznia et al., 2012).

Malgrat l'avantatge en la utilització de cèl·lules mare embrionàries, l'obtenció d'aquestes cèl·lules posa en relleu un conflicte ètic, moral i polític, ja que per iniciar un nou llinatge cel·lular, és necessari la destrucció de l'embrió.

Obtenció de cèl·lules β a partir de cèl·lules pluripotents induïdes (iPSC)

L'any 2006 el món de la medicina regenerativa va fer un gir important, gràcies al descobriment del Dr. Yamanaka, quan va generar per primer cop les anomenades cèl·lules pluripotents induïdes (iPSC). La introducció de 4 factors de transcripció anomenats els *factors de Yamanaka* (Oct4, Sox2, cMyc i Klf4) va permetre obtenir cèl·lules pluripotents a partir de cèl·lules diferenciades adultes, concretament de fibroblasts de la pell. Malgrat que la reprogramació i l'obtenció de colònies de cèl·lules iPSC ben caracteritzades és un procés llarg, les iPSC tenen diverses avantatges enfront a la utilització de cèl·lules ESC, com són que les cèl·lules fibroblastiques d'origen poden obtenir-se del propi pacient, podent arribar a fer teràpia personalitzada.

Els protocols de diferenciació de iPSC cap a cèl·lules productores d'insulina són molt semblants als protocols utilitzats per les ESC. S'han realitzat millores dels protocols inicialment descrits, fins el punt que s'ha aconseguit diferenciar amb èxit cèl·lules progenitores pancreàtiques cap a cèl·lules endocrines i cèl·lules productores d'insulina. Els últims treballs exitosos, on utilitzen els dos tipus de cèl·lules pluripotents (ESC i iPSC) mostren que diferents compostos com vitamina C, inhibidors específics de la via de TGF- β i hormona

tiroidea, juntament amb l'expressió transitòria de Ngn3 permetien l'obtenció de cèl·lules productores d'insulina (Rezania et al., 2014). Pagliuca i col·laboradors van millorar el seu protocol de diferenciació afegint additius químics o nous factors (T3, SANT1, Heparina, etc.) en el medi de cultiu durant la segona fase de l'obtenció de progenitors pancreàtics. Les cèl·lules productores d'insulina obtingudes *in vitro* i el posterior trasplantament a animals diabètics corroboren que són cèl·lules funcionals molt similars a les cèl·lules β humanes (Pagliuca et al., 2014).

En els darrers anys els últims protocols realitzats han millorat molt mitjançant la incorporació de factors de creixement i molècules inhibidores o activadores, importants en vies de senyalització, on han aconseguit cèl·lules similars a les cèl·lules β , que responen a alts nivells de glucosa quan es trasplanten en ratolins (Pagliuca et al., 2014; Rezania et al., 2014; Millman et al., 2016; Russ et al., 2015; Vegas et al., 2016; S. Zhu et al., 2016). En la figura següent es mostra els darrers protocols rellevants realitzats fins el 2016 on obtenen cèl·lules endocrines i cèl·lules productores d'insulina a partir de progenitors pancreàtics obtinguts tant de cèl·lules ESC i de cèl·lules iPSC (Taula.3).

Referència	Cèl·lules utilitzades	% de cèl·lules productores d'insulina	Secreció d'insulina <i>in vitro</i>	Índex d'estimulació <i>in vitro</i>	Concentració <i>in vivo</i> (després bolus glucosa)	Índex d'estimulació <i>in vivo</i>	Reversió/prevençió Diabetis?	Altres característiques
Rezania et al., 2014	ES, iPSC	~40% (INS-/ NKX6-1 ⁺)	n.d.	1.4–3.3 ^b (Pèptid C)	0.5–2.5 ng/mL; 167–833 pmol/L (Pèptid C; 2 setmanes; 1.25 x 10 ⁶ cèl·lules) ^ε	~1.4 (2 setmanes)	SI (40 dies ^a)	<ul style="list-style-type: none"> Grànuls d'insulina. Flux de calci citosòlic. Expressió gènica similar al perfil de la cèl·lula β. Resposta a l'entrada de insulina exògena reduïnt el pèptid C <i>in vivo</i>.
Pagliuca et al., 2014	ES, iPSC	33 ± 3% (Pèptid C-/ NKX6-1 ⁺)	1.6 ± 0.2 μIU/10 ³ cèl·lules (INS)	2.2 ± 0.3 ^b (INS)	8.4 ± 1.8 μIU/mL (INS; 2 setmanes; 5 x 10 ⁶ cells) ^ε	1.7 ± 0.2 ^b (2 setmanes)	SI (18 dies ^a)	<ul style="list-style-type: none"> Grànuls d'insulina. Flux de calci citosòlic. Múltiples respostes seqüencials a l'increment de glucosa <i>in vitro</i>. Expressió gènica similar al perfil de la cèl·lula β. % baix de cèl·lules polihormonals.
Russ et al., 2015	ES	17 ± 6% (Pèptid C-/ NKX6-1 ⁺)	n.d.	1.8 ± 0.9 (Pèptid C)	0.12 ± 0.08 ng/mL; 40 ± 28 pmol/L (Pèptid C; 7–10 dies; 5 x 10 ⁶ cèl·lules) ^ε	~1.3 (7–10 dies)	No	<ul style="list-style-type: none"> Grànuls d'insulina. % baix de cèl·lules polihormonals.
Zhu et al., 2016	Fibroblast	15% (Pèptid C-/ GCG-/SST-)	n.d.	2.0 ± 0.4 ^b (INS)	0.04–1.2 ng/mL; 14–400 pmol/L (CP; 2 mesos; 5 x 10 ⁶ cèl·lules) ^ε	2.2 ^b (2 mesos)	SI ^d	<ul style="list-style-type: none"> Capacitat d'expansió dels progenitors primers generats. Expressió gènica de gens característics de la cèl·lula β. % baix de cèl·lules polihormonals.
Vegas et al., 2016	ES	~47% (Pèptid C-/ NKX6-1 ⁺)	1.7–2.1 μIU/10 ³ cèl·lules (INS)	1.7–2.0 (INS)	0.72 ± 0.06 ng/mL; 240 ± 20 pmol/L (CP; 3 setmanes; 250 cell clusters) ^a	n.d.	SI (7 dies ^a)	<ul style="list-style-type: none"> Reversió de la diabetis en ratolins immunocompetents amb l'empelt encapsulat. Múltiples respostes seqüencials a l'increment de glucosa <i>in vitro</i>.
Millman et al., 2016	iPSC (T1D)	24 ± 2% (Pèptid C-/ NKX6-1 ⁺)	2.0 ± 0.4 μIU/10 ³ cèl·lules (INS)	1.9 ± 0.5 ^b (INS)	6.1 ± 1.0 μIU/mL (INS; 2 setmanes; 5 x 10 ⁶ cells) ^ε	1.4 ± 0.3 ^b (2 setmanes)	SI ^d	<ul style="list-style-type: none"> Grànuls d'insulina. Múltiples respostes seqüencials a l'increment de glucosa <i>in vitro</i>. Expressió gènica similar al perfil de la cèl·lula β.
Millman et al., 2016	iPSC	27 ± 2% (Pèptid C-/ NKX6-1 ⁺)	1.9 ± 0.3 μIU/10 ³ cèl·lules (INS)	2.2 ± 0.5 ^b (INS)	7.4 ± 0.9 μIU/mL (INS; 2 setmanes; 5 x 10 ⁶ cells) ^ε	1.5 ± 0.2 ^b (2 setmanes)	SI ^d	<ul style="list-style-type: none"> Grànuls d'insulina. Múltiples respostes seqüencials a l'increment de glucosa <i>in vitro</i>. Expressió gènica similar al perfil de la cèl·lula β.

Taula 3. Principals estudis que descriuen la generació de cèl·lules productores d'insulina a partir de cèl·lules pluripotents. Extret i modificat de (Millman & Pagliuca, 2017). Nd: no detectat, CP: Pèptid C, INS: insulina, ES: cèl·lules mare embrionàries, iPSC: cèl·lules pluripotents induïdes, CGC: glucagó, SST: somatostatina, a: primer temps mostrat; b: estadísticament significatiu, c: després del bolus de glucosa, d: inducció diabetis 2-4 mesos després del trasplant, e: després d'1h de dejú.

En tot cas, la diferenciació de cèl·lules iPSC és una estratègia que permet obtenir qualsevol tipus cel·lular, i posteriorment ser trasplantat sense generar rebuig per part del sistema immunològic del propi pacient, la qual cosa no ofereix la utilització de cèl·lules ESC. A més, l'utilització de iPSC esquivia els conflictes ètics existents envers a la utilització de cèl·lules ESC. Doncs, amb la utilització de iPSC podríem imaginar teràpies "personalitzades" en què el rebuig de l'empelt quedarà eliminada de l'equació.

Un altre punt a considerar quan es parla de teràpia cel·lular substitutiva en diabetis és la reacció autoimmunitària que es pot donar quan les noves cèl·lules generades són trasplantades a un pacient diabètic. No sabem si aquestes cèl·lules presenten els mateixos epítops que donen lloc a l'eliminació de les cèl·lules β per part del sistema immune en pacients diabètics. Per aquest motiu incrementen els esforços per evitar aquest fet mitjançant sistemes de protecció de les noves cèl·lules productores d'insulina generades. Un dels dissenys prometedors són els sistemes d'encapsulació que permeten la difusió d'oxigen, nutrients i hormones a les cèl·lules, i que eviten l'atac immunològic de l'hoste (Bruin et al., 2013, Kirk et al., 2014). L'any 2016, Vegas i col·laboradors van trasplantar cèl·lules productores d'insulina mitjançant una càpsula d'alginat en un ratolí diabètic durant 174 dies, i van obtenir resposta als canvis de glucèmies demostrant un control de glucosa en sang rellevant (Vegas et al., 2016). Però són múltiples les possibilitats d'encapsulament que s'estan plantejant avui en dia.

Desavantatges en la utilització de cèl·lules pluripotents per la generació de cèl·lules productores d'insulina

S'han posat molts esforços en obtenir cèl·lules productores d'insulina i s'ha avançat molt en els protocols però encara trobem limitacions en el seu ús. Per una banda, els protocols descrits donen un percentatge baix de cèl·lules productores d'insulina. Per altra banda, la presència de cèl·lules pluripotents residuals ocasionen l'aparició de teratomes en els ratolins on s'han trasplantat les cèl·lules generades. A més del risc de tumorigènesis, també hi pot haver risc de mutagènesis degut a l'acumulació de mutacions obtingut durant el cultiu *in vitro*.

Avui en dia, hi ha molta dedicació per actuar contra aquestes limitacions. Algunes estratègies plantejades fins el moment són l'utilització de sistemes que permetin seleccionar les cèl·lules

diferenciades d'interès mitjançant marcadors de superfície i l'eliminació de les cèl·lules pluripotents residuals mitjançant medis selectius.

Obtenció de cèl·lules β a partir de cèl·lules especialitzades

Algunes de les limitacions lligades als protocols de diferenciació dirigida han portat als investigadors a valorar altres alternatives per generar cèl·lules β substituïdes. Una alternativa a l'utilització de cèl·lules pluripotents que està apareixent amb força durant els últims anys és la utilització de cèl·lules somàtiques mitjançant un procés de transdiferenciació. Aquesta estratègia té com a objectiu transformar una cèl·lula especialitzada en una altra, evitant passar per estadis pluripotents, reduint el risc potencial de tumorigènesis associat. La conversió d'una cèl·lula en una altra es pot aconseguir mitjançant la introducció de factors de transcripció claus del desenvolupament i la diferenciació de la cèl·lula d'interès, inhibint factors de transcripció o mitjançant l'administració de factors solubles, entre d'altres. Durant aquest procés, l'objectiu és establir una nova xarxa transcripcional corresponent a la de cèl·lula que es vol obtenir. Aquesta estratègia en general és ràpida i permet aconseguir una conversió molt eficient en molts pocs dies, a diferència de les setmanes o mesos que es necessiten per generar i diferenciar les cèl·lules iPSC. Un altre avantatge clar d'aquesta aproximació és que a l'evitar passar per un estat pluripotencial es redueix el risc de formació de teratomes. Un dels punts interessants que es posen sobre la taula és el tipus cel·lular que s'ha de emplear. Es necessita una font cel·lular amb capacitat auto-regenerativa per evitar la fi de la població i es pensa que la cèl·lula d'origen i la cèl·lula final han de compartir un origen embrionari comú perquè els canvis d'expressió gènica no siguin massa grans.

S'ha vist que l'activació de la xarxa transcripcional endocrina regulada per la presència de factors de transcripció (FT) claus de llinatge endocrí pot promoure la conversió de diversos tipus cel·lulars diferenciats cap a cèl·lules productores d'insulina. El Dr. Melton va ser el primer en descriure com la introducció de 3 FT claus en el desenvolupament de la cèl·lula β Pdx1, Ngn3 i MafA (PNM) en les cèl·lules acinars dona lloc a cèl·lules productores d'insulina in vivo (Zhou et al., 2008). Després altres autors van observar que aquests mateixos FTs permetien, amb major o menor èxit, convertir hepatòcits (Ham et al., 2011), cèl·lules gastrointestinals (Chen et al., 2014) i cèl·lules estomacals (Ariyachet et al., 2016) en cèl·lules β . Addicionalment, si s'afegia un altre factor Pax6 juntament amb Pdx1, Ngn3 i MafA millorava la conversió de cèl·lules ductals en cèl·lules capaces de sintetitzar, processar i emmagatzemar insulina, amb

més de secretar-la en resposta a glucosa i altres estimuladors (Lee et al., 2013). Un any més tard, Li i col·laboradors van transdiferenciar cèl·lules acinars en els tres subtipus de cèl·lules endocrines α – β – δ , jugant amb la combinació d'aquests 3 FTs (Li et al., 2014).

Per altra banda, altres estudis demostren l'obtenció de cèl·lules β a partir de cèl·lules α forçant la sobre-expressió de Pdx1 (Yang et al., 2011), de Pax4 (Collombat et al., 2009) o inactivant el FT crucial en cèl·lula α Arx en el desenvolupament pancreàtic (Courtney et al., 2013). També, s'ha demostrat com cèl·lules exocrines AR42J són reprogramades en cèl·lules productores d'insulina mitjançant una estratègia no integrativa basada en mRNAs codificants per els FTs Pdx1, Ngn3 i MafA (Koblas et al., 2016).

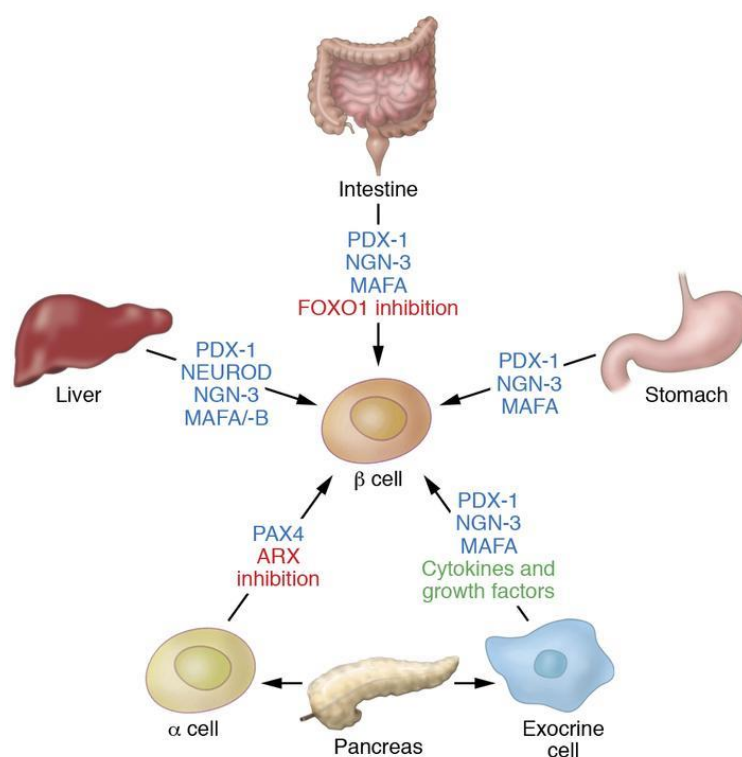


Figura 19. Principals fonts cel·lulars en protocols de transdiferenciació cap a cèl·lula productora d'insulina. Extret de (Benthuisen et al., 2016).

Les cèl·lules que s'han utilitzat fins el moment, com cèl·lules hepàtiques, intestinals, estomacals i del propi pàncrees, per obtenir cèl·lules productores d'insulina, provenen de l'endoderma i comparteixen un origen embrionari proper amb les cèl·lules β pancreàtiques, fet que pot afavorir la conversió ja que permet mantenir una certa relació en el perfil d'activitat gènica. Però la dificultat per l'obtenció d'aquestes cèl·lules fa que sigui una aproximació inviable per ús terapèutic.

Prespectives de futur

S'ha avançat molt en els últims anys en els descobriments de noves tècniques i de noves molècules que han permès millorar l'obtenció de cèl·lules productores d'insulina. El trasplantament de les cèl·lules generades sembla ser el futur tractament a escollir, i això ha portat als investigadors a centrar-se en la viabilitat de la teràpia cel·lular en pacients diabètics. En aquest context, un dels principals problemes és com protegir les cèl·lules β generades de la destrucció autoimmune en DT1, on els científics ja s'estan plantejant com hauria de ser la càpsula òptima per la supervivència i la funció de les cèl·lules trasplantades. Un cas d'èxit és l'obtingut per l'empresa privada de medicina regenerativa ViaCyte. Aquesta empresa va crear un dispositiu anomenat Encaptra® amb l'idea de protegir les cèl·lules progenitores pancreàtiques trasplantades d'un atac immune de l'hoste. Estudis pre-clínics *PEC-Encap* van demostrar que les cèl·lules progenitores pancreàtiques trasplantades havien madurat cap a cèl·lules productores d'insulina i havien estat constantment capaces de controlar la concentració de glucosa a la sang en ratolins. En 2014, aquesta empresa va començar l'assaig clínic *PEC-Encap* als centres clínics d'Estats Units d'Amèrica i del Canadà. Actualment aquest estudi es troba en fase 1/2 i s'està avaluant la seguretat i l'eficiència d'aquesta teràpia en pacients amb diabetis tipus 1.

Altres qüestions importants que es posen sobre la taula són fins a quin punt aquestes cèl·lules generades són pures i no hi ha contaminacions amb presència d'altres tipus cel·lulars com cèl·lules pluripotents residuals. Quin serà el nombre de cèl·lules necessàries per tenir un efecte en el pacient? Quina serà la viabilitat i la longevitat d'aquestes cèl·lules trasplantades? Quina serà l'efectivitat i la durabilitat del dispositiu en un entorn amb un possible atac auto-immune? Les cèl·lules reprogramades i encapsulades seran revascularitzades i arribaran a ser funcionals? I moltes més preguntes que aniran sorgint durant els pròxims anys.

Està clar que en la pròxima dècada, veurem la configuració de noves generacions de teràpies cel·lulars substitutives de cèl·lula β en pacients diabètics.

HIPÒTESI I OBJECTIUS

La diabetis mellitus tipus I resulta de la destrucció per un atac autoimmune de les cèl·lules β pancreàtiques productores d'insulina i es caracteritza per alts nivells de glucosa en sang. Als anys 20 el descobriment i la comercialització de la insulina va ser un èxit pel tractament de la diabetis ja que va permetre la supervivència dels malalts. Però el control de la glucèmia via l'administració d'insulina exògena no és sempre precís i no evita les complicacions secundàries devastadores que genera la hiperglucèmia.

La reprogramació cel·lular pretèn generar cèl·lules productores d'insulina a partir d'altres tipus cel·lulars. Una possible aproximació és la generació de cèl·lules β a partir de cèl·lules mare embrionàries o pluripotents induïdes iPSC (diferenciació dirigida). Fins el dia d'avui, els protocols descrits no són molt eficients i les cèl·lules obtingudes són immadures. Una alternativa a la diferenciació dirigida de cèl·lules pluripotents és la reprogramació de cèl·lules somàtiques d'altres llinatges cap a cèl·lula productora d'insulina sense passar per un estadi pluripotent (reprogramació directa o transdiferenciació). Entre els avantatges d'aquesta aproximació hi ha la seva rapidesa i la reducció del perill de tumorigènesis que té associat l'ús de cèl·lules pluripotents.

Hom considera que l'estructura de la cromatina pot esdevenir un escull important per aconseguir la diferenciació terminal (i maduresa funcional) de les cèl·lules productores d'insulina generades tant en protocols de diferenciació dirigida com en protocols de transdiferenciació. La trimetilació de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3) és una marca repressiva molt important durant el desenvolupament. S'ha postulat que anomalies en aquesta marca associades a gens clau podrien estar relacionades amb la immaduresa de les cèl·lules β obtingudes a partir de cèl·lules pluripotents (Xie et al 2013). D'altra banda, resultats del grup previs a aquesta tesi havien demostrat que l'activitat transdiferenciadora de Neurogenina3, factor de transcripció clau pel desenvolupament de les cèl·lules endocrines durant la embriogènesis, s'associava a la pèrdua de marques H3K27me3 en zones promotores de gens diana d'aquest factor (Pujadas et al., 2011). Totes aquestes evidències ens van portar a postular, en la primera part de la recerca doctoral, que la modulació de l'activitat de les proteïnes reguladores de la marca H3K27me3 podria servir per a millorar l'activació del programa endocrino-pancreàtic *in vitro*.

Els protocols de reprogramació directa es basen en la introducció de factors de transcripció específics de la cèl·lula destí a la cèl·lula que es vol transdiferenciar. Idealment, aquests

factors de transcripció estableixen una xarxa transcripcional nova similar a la de la cèl·lula que es vol obtenir. El laboratori del Dr. Melton va ser el primer en demostrar que la combinació de factors Pdx1+Ngn3+MafA converteixen cèl·lules exocrines en cèl·lules productores d'insulina *in vivo* (Zhou et al., 2008). Posteriorment, altres investigadors han aconseguit obtenir, amb major o menor èxit, cèl·lules productores d'insulina a partir d'altres tipus cel·lulars, com cèl·lules ductals, hepàtiques, intestinals o estomacals mitjançant la mateixa combinació. No obstant, tots aquests exemples corresponen a cèl·lules que comparteixen un origen embrionari proper al de les cèl·lules β pancreàtiques. El fibroblast de pell es troba més allunyat embriològicament a la cèl·lula β però és un tipus cel·lular de fàcil obtenció i de cultiu senzill *in vitro*, fets que el fan un bon candidat com a font cel·lular d'origen per reprogramacions cel·lular amb finalitats terapèutiques. Malgrat això, fins ara no s'ha demostrat que el fibroblast es pot reprogramar directament cap a cèl·lula productora d'insulina. En la segona part de la tesi, hem postulat que aquesta conversió és possible si es troba la combinació adequada de factors de transcripció.

L'objectiu general d'aquesta tesi és investigar estratègies que permetin generar cèl·lules productores d'insulina en el laboratori per ser trasplantades a pacients amb diabetis.

Els objectius específics són:

Objectiu 1: Estudiar els efectes de la modulació de la marca de cromatina H3K27me3 sobre l'activitat transactivadora del factor de transcripció pro-endocrí NGN3.

Objectiu 2: Dissenyar estratègies de reprogramació directa amb factors de transcripció específics per tal de convertir fibroblasts humans en cèl·lules productores d'insulina.

RESULTATS

Els resultats d'aquesta tesi estan separats en dos parts corresponents als dos objectius.

PART 1:

Estudi dels efectes de la modulació de la marca H3K27me3 sobre l'activació del programa endocrino-pancreàtic en diferents models de diferenciació

L'expressió ectòpica de NGN3 en cèl·lules mPAC activa el programa de diferenciació endocrino-pancreàtica en aquestes cèl·lules (Gasa et al., 2004). Un estudi previ del grup va mostrar que la introducció de NGN3 provocava una pèrdua de la marca repressiva H3K27me3 a les zones promotores dels gens diana d'aquest factor de transcripció en cèl·lules ductals mPAC (Pujadas et al., 2011).

A partir d'aquests resultats ens vam plantejar si es podia afectar l'activitat transcripcional d'aquest factor pro-endocrí modulant aquesta marca epigenètica. Per dur a terme aquest objectiu hem utilitzat inhibidors químics de proteïnes reguladores de H3K27me3: l'inhibidor de les demetilases Jmjd3 i Utx GSK-J4, i els inhibidors de la metiltransferasa Ezh2, EI-1 i GSK-126.

Hem estudiat l'efecte d'aquests inhibidors en diferents models cel·lulars:

1. El primer model cel·lular són les cèl·lules mPAC amb el qual havíem descrit la pèrdua de H3K27me3 associada a l'expressió ectòpica de NGN3.
2. El segon model cel·lular usat és el cultiu de primordis pancreàtics *ex-vivo*, on s'expressa NGN3, de manera autònoma.

Els dos següents models utilitzats són cèl·lules embrionàriament més allunyades a les cèl·lules β pancreàtiques:

3. El tercer model utilitzat són els fibroblasts embrionaris de ratolí (MEFs) on hem expressat ectòpicament NGN3.
4. L'últim model usat són cèl·lules iPSC subjectes a un protocol de diferenciació dirigida cap a cèl·lula β establert.

PAPER DE LA MARCA REPRESSIVA H3K27me3 EN L'ACTIVITAT TRANSACTIVADORA DE NGN3 EN LES CÈL·LULES mPAC

Per observar el paper de la marca repressiva H3K27me3 en l'activitat transactivadora de Ngn3 hem utilitzat en primer lloc, un model cel·lular que ens ha permès discriminar els efectes de Ngn3 d'altres aconteixements que es poden donar durant el desenvolupament. Per aquesta raó, hem utilitzat un model experimental de diferenciació endocrina *in vitro* dependent de Ngn3 (Gasa et al., 2004). Aquest model consisteix en l'expressió ectòpica de Ngn3, mitjançant

la introducció d'un adenovirus recombinant que codifica per aquest factor, en la línia establerta mPAC L20 (*mouse Pancreatic AdenoCarcinoma cells*). Les cèl·lules mPAC expressen factors de transcripció característics dels progenitors bipotencials endocrins/ductals però no expressen marcadors de cèl·lula endocrina diferenciada (Yoshida & Hanahan, 1994). Per tant, aquest model cel·lular ens permet investigar els estadis inicials de la diferenciació endocrina activats per Ngn3.

Estudi de la regulació temporal de marques d'histones en resposta a Ngn3

En primer lloc, i a partir de resultats previs del grup, vam voler estudiar la correlació temporal de la activació de gens diana de Ngn3 i modificacions en l'enriquiment de marques epigenètiques en regions promotores d'aquests mateixos gens. Vam analitzar 3 marques d'interès: H3K27me3 com a marca repressiva, la seva marca antagònica, l'acetilació de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27ac) i la trimetilació de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3), ambdós últimes marques activadores, durant la inducció del programa endocrí mediat per l'expressió de Ngn3.

Per abordar aquesta qüestió, vam expressar ectòpicament Ngn3 en les cèl·lules mPAC i vam analitzar les diferents marques epigenètiques mencionades en intervals de 12h durant dos dies. En la Fig.20 es mostren els resultats obtinguts mitjançant corbes d'enriquiment d'aquestes marques en les zones promotores dels gens diana de Ngn3: *Atoh8*, *Insm1*, *Pax4* i *NeuroD1* a més del propi gen *Ngn3* (Fig.20B).

En primer lloc es van analitzar els nivells de mRNA del transgèn *NGN3* un cop introduït l'adenovirus que codifica per aquest factor i es pot observar que es detecten nivells elevats a partir de les 12h i que es mantenen durant el transcurs de l'experiment.

Els dos primers gens diana de Ngn3 que es mostren a la gràfica, *Atoh8* i *Insm1*, es caracteritzen per tenir la cromatina en un estat bivalent (enriquits doblement amb les marques H3K27me3 i H3K4me3). L'expressió ectòpica de Ngn3 provoca una baixada de l'enriquiment de H3K27me3 que ve acompanyada per un increment de les marques activadores H3K27ac i H3K4me3 a les 24h que concorda amb l'increment dels nivells de mRNA dels gens. Pel que fa el gen no bivalent *Pax4*, pateix una activació temprana en resposta a la introducció de Ngn3 que coincideix amb una pèrdua de la marca repressiva

H3K27me3 i un increment de l'enriquiment de les marques activadores (H3K27ac i H3K4me3). En canvi, gens d'activació tardana (els seus mRNAs es detecten a partir de les 36h després de la introducció de Ngn3) com *NeuroD1* i *Ngn3*, presenten canvis molt lleus o indetectables d'enriquiment d'aquestes marques.

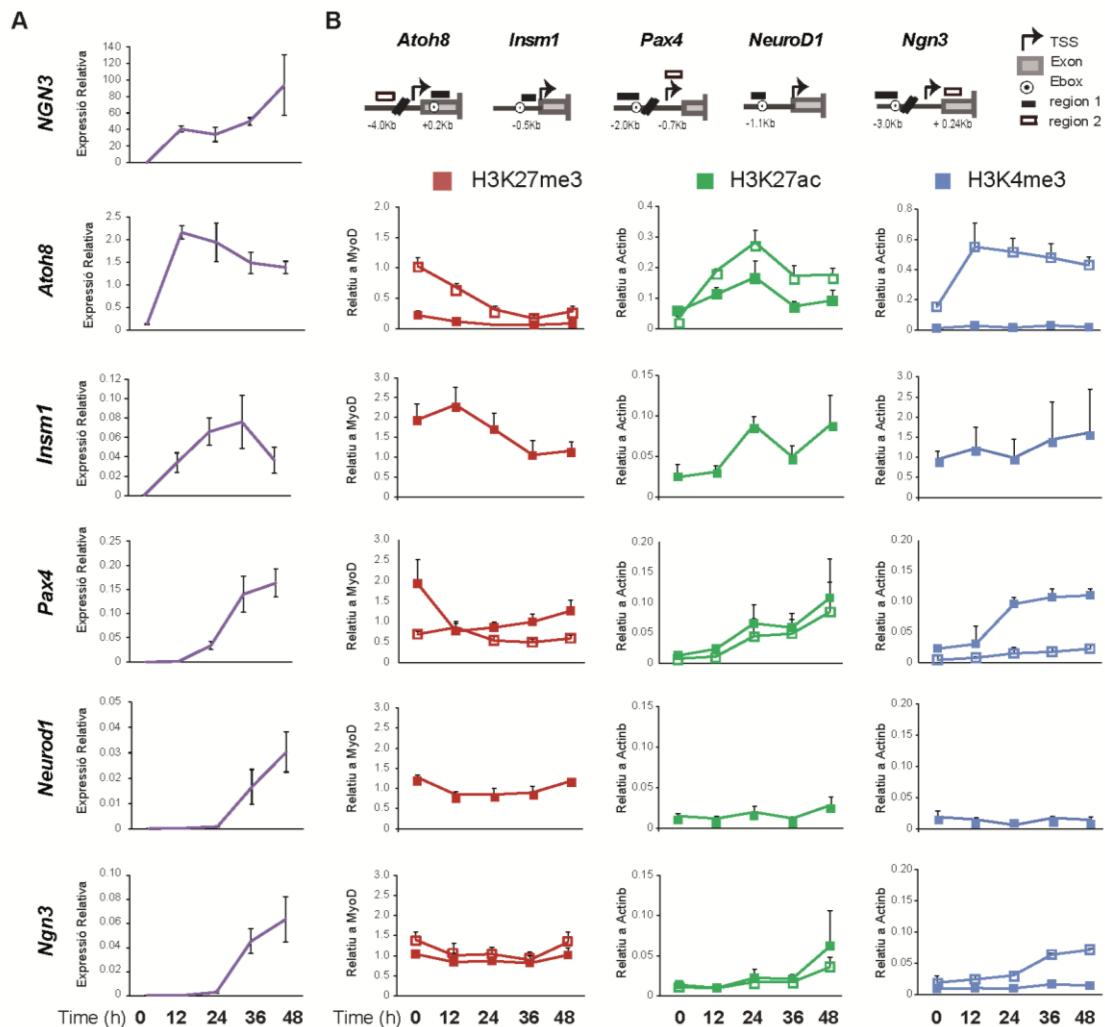


Figura 20. Corbes temps-resposta de l'enriquiment en H3K27me3, H3K27ac i H3K4me3 i nivells de mRNA després de la introducció de Ngn3 a les cèl·lules mPAC. Les cèl·lules mPAC van ser tractades amb l'adenovirus recombinant que codifica per NGN3 durant 2h i es van cultivar durant 48h. Es van recollir mostres en els temps indicat. **(A)** El RNA total va ser extret i es va analitzar els gens descrits mitjançant real time PCR, normalitzat per *Tbp*. Els resultats són Mitjanes±S.E.M per 4 experiments independents. **(B)** Es va immunoprecipitar cromatina amb anticossos específics per les modificacions d'histones H3K27me3, H3K27ac i H3K4me3. El ADN associat es va analitzar mitjançant real time PCR utilitzant primers específic dels gens indicats en els dibuixos. L'enriquiment va ser calculat respecte l'expressió dels controls MyoD (H3K27me3) i de β -Actina (H3K27ac i H3K4me3) a cada punt d'estudi. Els resultats són Mitjanes±S.E.M per 4-6 experiments independents.

Aquest resultat mostren que existeix una relació temporal entre l'eliminació de la marca repressiva H3K27me3 i les activacions gèniques promogudes per l'expressió ectòpica de Ngn3 en les cèl·lules mPAC.

Efecte de Ngn3 sobre l'expressió de reguladors de la marca H3K27me3

Vist els resultats anteriors, vam estudiar si els canvis sobre l'enriquiment en H3K27me3 de les zones promotores dels gens diana de Ngn3 podien estar relacionats amb efectes d'aquest factor de transcripció sobre l'expressió de les proteïnes reguladores d'aquesta marca. En la Fig.21A s'observen els nivells de mRNA de les demetilases *Jmjd3* i *Utx*, i podem observar que s'expressen endògenament en les cèl·lules mPAC i la seva expressió no varia en presència del factor Ngn3. En canvi, la introducció de Ngn3 provoca una baixada significativa dels nivells d'*Ezh2* (Fig.21B).

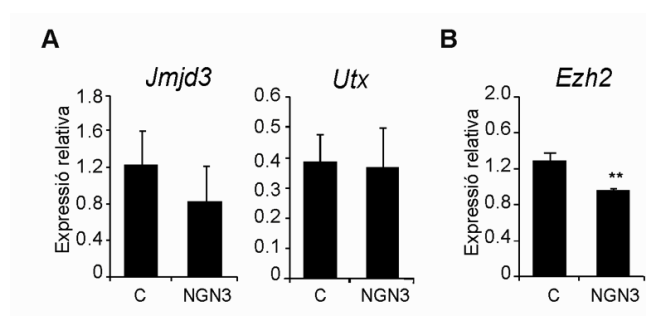


Figura 21. Efectes de Ngn3 sobre l'expressió dels gens que codifiquen les demetilases *Jmjd3* i *Utx* i la metiltransferasa *Ezh2* a les cèl·lules mPAC. Les cèl·lules mPAC van ser infectades amb l'adenovirus que codifica per NGN3 (NGN3) durant 2h i posteriorment cultivades durant 48h. (A-B) Els nivells d'expressió gènica de *Jmjd3*, *Utx* i *Ezh2* van ser estudiats mitjançant real time PCR. Els valors es mostren relatius a *Tbp*. Els valors són Mitjanes ± S.E.M per 3-4 experiments independents, **, p < 0.01 relatiu a les cèl·lules mPAC.

Efecte de la inhibició de les demetilases de H3K27me3 en l'activitat transactivadora de Ngn3

A continuació, vam investigar si l'activitat transcripcional de Ngn3 requeria la funció de les demetilases de H3K27me3, *Jmjd3* i *Utx*. Per tal fi, vam emprar l'inhibidor químic GSK-J4, el qual vam afegir a les cèl·lules mPAC en el moment de treure l'adenovirus recombinant i es va mantenir en el medi de cultiu durant les 48h següents. La comprovació de l'efectivitat de

l'inhibidor GSK-J4 s'ha fet mitjançant l'anàlisi dels nivells totals de H3K27me3 per *western blot*. Els resultats obtinguts mostren un petit increment significatiu dels nivells totals de la marca H3K27me3 en les cèl·lules tractades amb GSK-J4 a concentracions de 2µM (Fig.22A). També s'ha avaluat l'efecte de l'inhibidor sobre l'enriquiment de la marca H3K27me3 en les zones promotores dels gens diana de Ngn3 i s'observa que GSK-J4 no té efectes significatius en l'enriquiment d'aquesta marca H3K27me3 tot i veure's una tendència a un augment en molts casos (Fig.22B). Aquest resultat pot donar-se pel fet que en les cèl·lules mPAC no s'expressen aquests gens i a nivell basal ja tenen molt enriquits els promotors amb la marca repressiva H3K27me3 i no és fàcil detectar on hi pot haver un increment addicional.

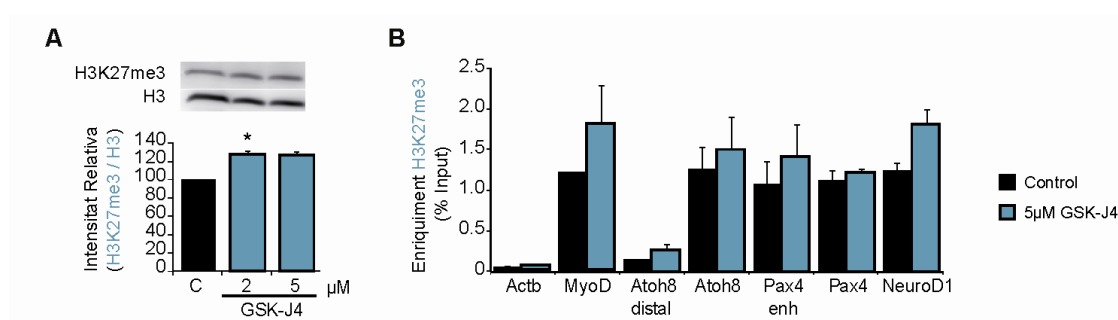


Figura 22. Efectes de la inhibició química de les demetilases Jmjd3 i Utx sobre la marca H3K27me3 a les cèl·lules mPAC. Les cèl·lules mPAC van ser tractades amb l'inhibidor GSK-J4 en les concentracions indicades durant 48h. **(A)** Els nivells totals de H3K27me3 es van determinar mitjançant *immunoblot*. Els valors són Mitjanes±S.E.M per 3 experiments independents, *, $p < 0.05$ relatiu a les cèl·lules cultivades sense inhibidor. **(B)** L'enriquiment de H3K27me3 sobre promotors específics es van estudiar mitjançant ChIP. Promotors proximals dels gens β -Actina i MyoD són inclosos com a gen actiu i inactiu a les cèl·lules mPAC, respectivament. Els valors són Mitjana±S.E.M, 4 experiment independents *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$ relatiu al control.

En l'anàlisi de l'expressió gènica, el tractament amb l'inhibidor GSK-J4 causa un bloqueig significatiu sobre l'activació dels gens diana de Ngn3 estudiats com *Atoh8*, *Pax4*, *NeuroD1*, *Nkx2-2* i *Insm1*. En canvi, l'expressió del gen *Sox9*, expressat endògenament i no diana de Ngn3, queda inalterable. Tampoc promou cap alteració en els nivells de mRNA dels factors de transcripció analitzats en situació basal, excepte pel gen bivalent *Atoh8* (Fig.23).

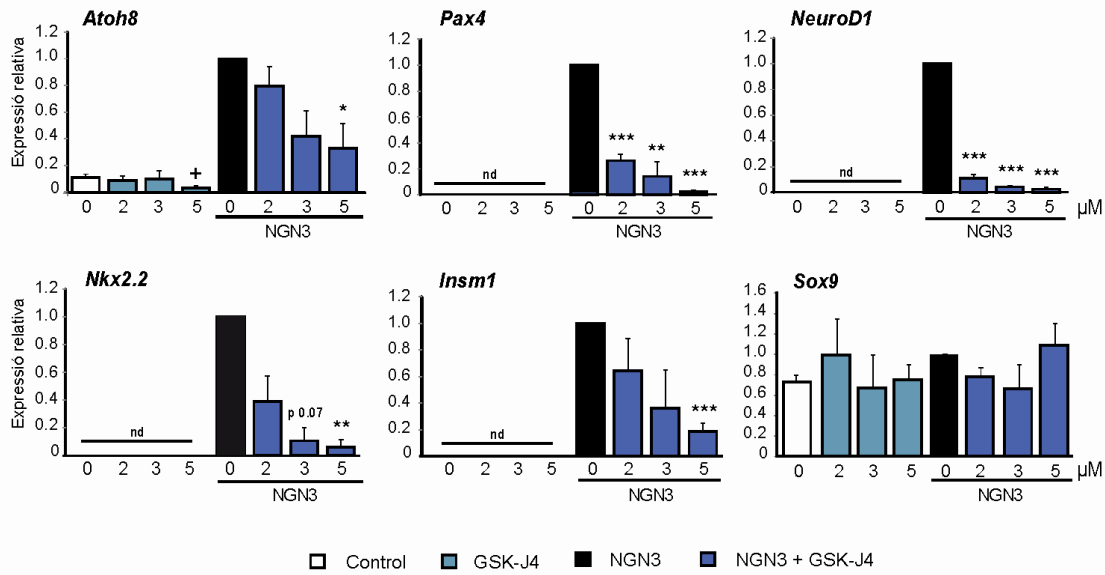


Figura 23. Efectes de la inhibició química de les demetilases Jmjd3 i Utx sobre l'activació gènica en resposta a Ngn3 a les cèl·lules mPAC. Les cèl·lules mPAC són infectades amb l'adenovirus que codifica per NGN3 durant 2h i tractades amb GSK-J4 durant 48h en les concentracions indicades (μM). El RNA total es va extreure i es va analitzar mitjançant qPCR. Se li dona valor de 1 a les cèl·lules infectades amb l'adenovirus que codifica per NGN3 (NGN3) sense inhibidor. *Sox9* és expressat a les cèl·lules mPAC però no és un gen diana de NGN3 i s'ha utilitzat com a control. Els valors són Mitjanes±S.E.M per 4-5 experiments independents, +, p < 0.05 relatiu al control; *, p < 0.05, **, p < 0.01, ***, p < 0.001 relatiu a les cèl·lules NGN3 sense inhibidor (barra negra). (nd=no detectable).

Adicionalment, vam comparar l'enriquiment de la marca activadora H3K27ac en els promotors d'aquests gens en les cèl·lules mPAC que expressen Ngn3 tractades i no tractades amb GSK-J4. La baixada de l'expressió dels gens diana de Ngn3, per la inhibició de Jmjd3 i Utx, està correlacionada amb la baixada de l'enriquiment de la marca activadora H3K27ac a les seqüències promotores dels gens analitzats (Fig.24). Aquest resultat demostra que la baixada de l'expressió dels gens activats per Ngn3 pel tractament amb l'inhibidor GSK-J4 està relacionat amb un canvi en l'estat de la cromatina.

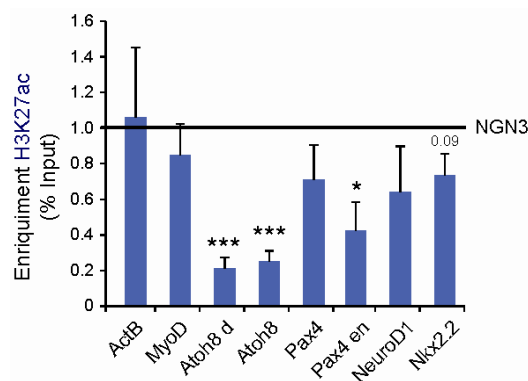


Figura 24. Efectes de GSK-J4 sobre l'enriquiment en H3K27ac a les cèl·lules mPAC infectades amb Ad-NGN3. Les cèl·lules mPAC van ser infectades amb l'adenovirus Ad-NGN3 i posteriorment tractades amb l'inhibidor a 3µM de GSK-J4 durant 48h. L'enriquiment de H3K27ac sobre promotors específics es van estudiar mitjançant ChIP. Els valors són Mitjana±S.E.M, 3 experiment independents *, p < 0.05, *** p < 0.001 relatiu a les cèl·lules infectades amb Ad-NGN3 (valor de 1).

Efecte de la inhibició de la metiltransferasa de H3K27me3 en l'activitat transactivadora de Ngn3

Vist els resultats anteriors, vam especular que la pèrdua de la marca repressiva H3K27me3 podria millorar l'activació del programa endocrí induïda per Ngn3 a les cèl·lules mPAC. Per aquest motiu vam estudiar la inhibició de Ezh2, la metiltransferasa de la marca H3K27me3, en l'activitat transcripcional de Ngn3 a les cèl·lules mPAC. En un primer moment vam utilitzar l'inhibidor químic EI-1 a concentracions creixents. Per tal de corroborar l'efectivitat d'aquest inhibidor es van analitzar els nivells totals de H3K27me3 per *western blot*. Observem una baixada significativa d'aquesta marca a les cèl·lules tractades amb 2, 5 i 10 µM d'EI-1 (Fig.25A). També es va avaluar l'efecte de l'inhibidor sobre l'enriquiment de H3K27me3 en les zones promotores dels gens diana de Ngn3 i s'ha vist que provoca una disminució significativa d'aquesta marca en totes les zones promotores analitzades (Fig.25B) que es correlaciona amb l'increment de l'enriquiment de la marca oposada i activadora H3K27ac (Fig.25C).

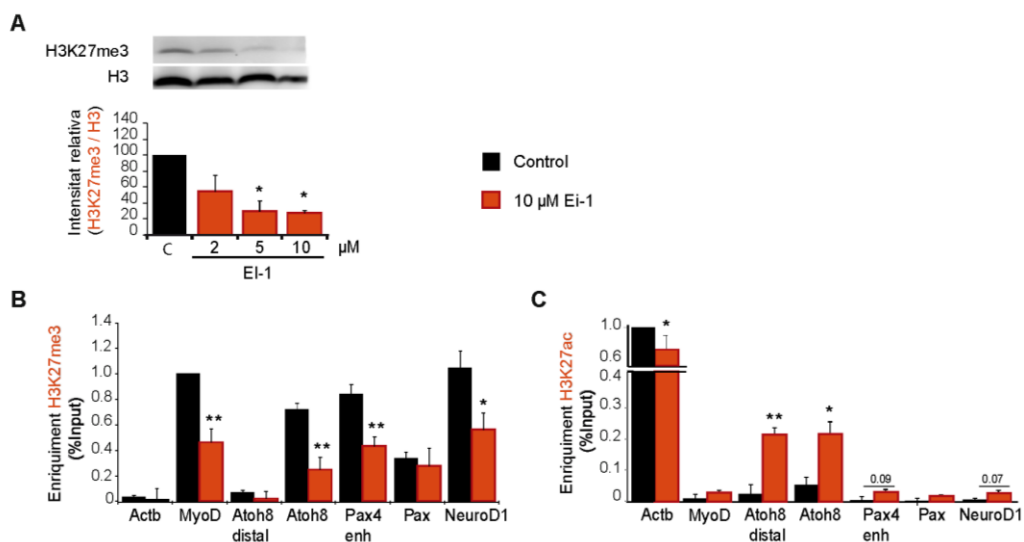
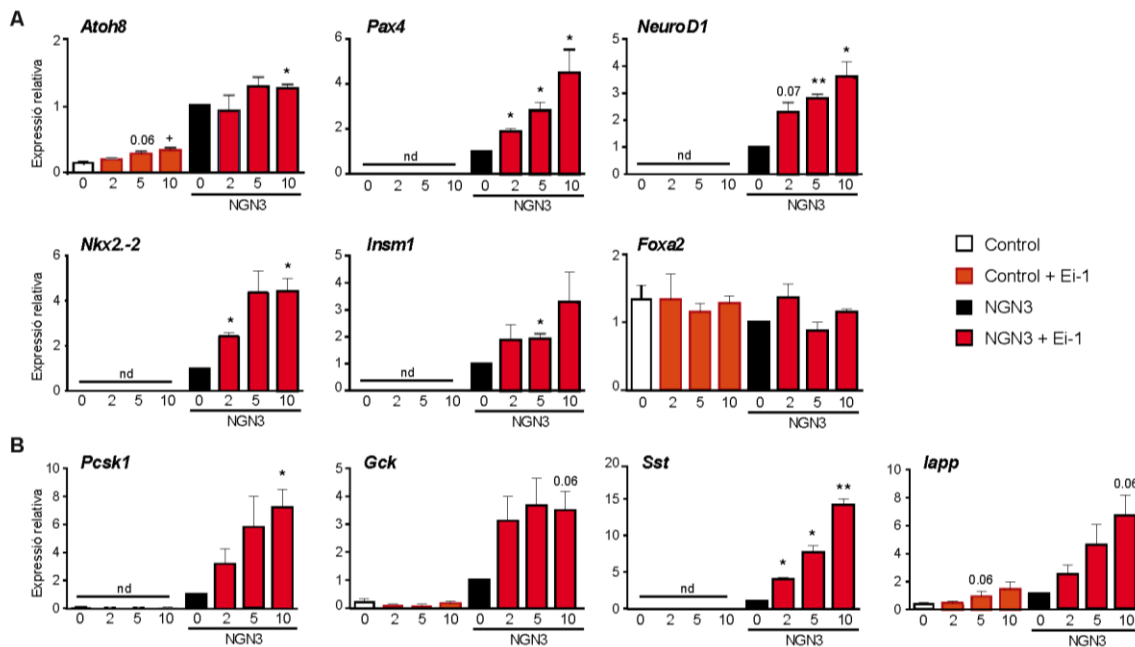


Figura 25. Efectes de la inhibició química de la metiltransferasa Ezh2 sobre la marca H3K27me3 a les cèl·lules mPAC. Les cèl·lules mPAC van ser tractades amb l'inhibidor EI-1 en les concentracions indicades durant 48h. **(A)** Els nivells totals de

H3K27me3 es van determinar mitjançant *immunoblot*. Els valors són Mitjanes±S.E.M per 3 experiments independents, *, $p < 0.05$ relatiu a les cèl·lules cultivades sense inhibidor. **(B)** L'enriquiment de H3K27me3 i **(C)** l'enriquiment de H3K27ac sobre promotors específics es van estudiar mitjançant ChIP. Promotors proximals dels gens *B-Actina* i *MyoD* són inclosos com controls d'activació i inactivació constitutiva, respectivament. Els valors són Mitjana±S.E.M, 4 experiment independents *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$ relatiu al control.

En la Fig.26A-B, s'observa que EI-1 provoca un increment significatiu dels nivells de mRNA dels gens estudiats i activats per Ngn3, però no porta a l'activació d'aquests mateixos gens en situació basal (sense Ngn3), excepte pel gen bivalent *Atoh8* que ja es troba expressat endògenament en absència de Ngn3.



L'augment d'activació dels gens diana de Ngn3 en presència de l'inhibidor d'EI-1 és corroborat a nivell de cromatina amb l'increment de la marca activadora H3K27ac en les regions promotores analitzades (Fig.27).

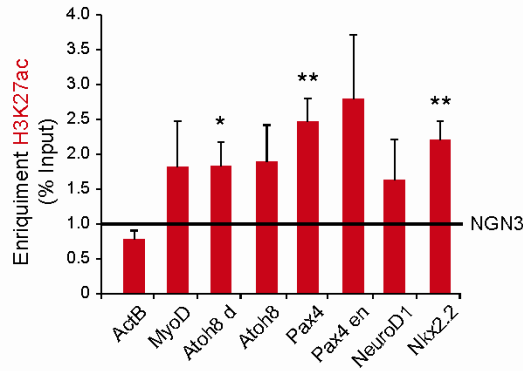


Figura 27. Efectes d'EI-1 juntament amb l'activitat transactivadora de NGN3 sobre els nivells de la marca activadora H3K27ac a les cèl·lules mPAC. Les cèl·lules mPAC van ser infectades amb l'adenovirus Ad-NGN3 i posteriorment tractades amb 5µM d'EI-1 durant 48h. L'enriquiment de H3K27ac sobre promotors específics es van estudiar mitjançant ChIP. Els valors són Mitjana±S.E.M, 3 experiment independents *, p < 0,05, ** p < 0,01 relatiu a les cèl·lules infectades amb Ad-NGN3 (valor de 1).

Vist els resultats obtinguts amb la inhibició d'Ezh2 mitjançant l'inhibidor químic EI-1, vam voler corroborar els resultats amb un altre inhibidor d'Ezh2 anomenat GSK-126. En la Fig.28 s'observa que l'inhibidor GSK-126 baixa els nivells totals de la marca repressiva H3K27me3 (Fig.28A) i que provoca un increment dels nivells d'expressió dels gens activats gràcies a l'expressió ectòpica de Ngn3 (Fig.28B).

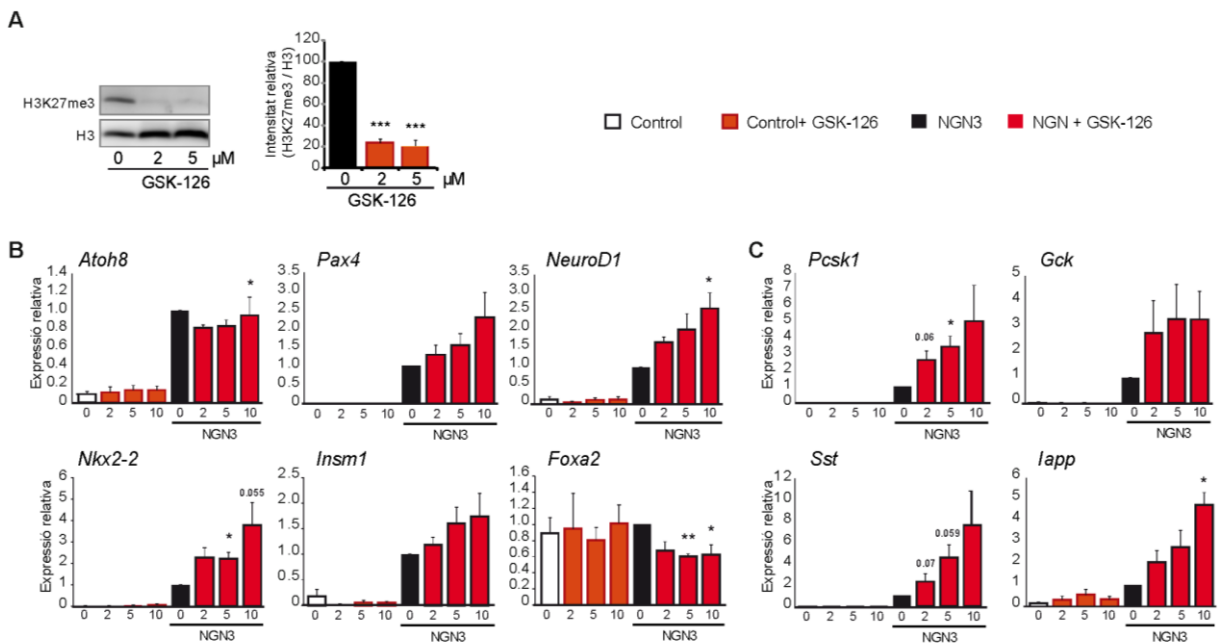


Figura 28. Efectes de l'inhibidor químic GSK-126 sobre l'activitat transactivadora de Ngn3 a les cèl·lules mPAC. (A) Les cèl·lules mPAC van ser

tractades amb les concentracions de GSK-126 indicades durant 48h. Els nivells totals de H3K27me3 van ser determinats per l'anàlisi d'immunoblot. Les dades són Mitjanes \pm SEM per 3 experiments independents; ***p<0.001 relatiu a les cèl·lules cultivades sense l'inhibidor. **(B-C)** Les cèl·lules mPAC van ser infectades amb l'adenovirus Ad-NGN3 i cultivades durant 48h amb la presència de l'inhibidor GSK-126 a les concentracions indicades. El RNA total va ser extret i l'expressió gènica va ser analitzada per qPCR. Els nivells de mRNA són expressats respecte a la condició tractada amb l'adenovirus que codifica per NGN3 sense inhibidor (valor de 1). Foxa2 és expressat endogenament i no és diana de Ngn3. Les dades són Mitjanes \pm SEM per 4 experiments independents; *, p<0.05, **, p<0.01 relatiu a NGN3 sense l'inhibidor. (nd = no detectable).

Doncs podem afirmar que la inhibició d'Ezh2 baixa els nivells totals de la marca H3K27me3 i permet una millora dels efectes de la sobreexpressió de Ngn3 sobre els seus gens diana en les cèl·lules mPAC.

Els inhibidors químics no afecten l'expressió del transgèn Ngn3

Vist els resultats obtinguts fins el moment, ens vam plantejar si la manipulació de l'activitat demetilasa i metiltransferasa mitjançant els inhibidors GSK-J4 i EI-1 podria haver afectat l'expressió de la pròpia Ngn3 codificada per l'adenovirus recombinant i, per tant els canvis observats en les activacions dels gens diana d'aquest factor fossin conseqüència de diferents nivells de transgèn. Per aquest motiu vam analitzar els nivells proteics de Ngn3 mitjançant la utilització d'un adenovirus recombinant que codificava per Ngn3 i marcada amb l'epítot HA. Curiosament, el tractament amb l'inhibidor de les demetilases GSK-J4 provoca un increment dels nivells proteics del transgèn. En canvi, la inhibició de Ezh2 mitjançant l'inhibidor EI-1 no presenta canvis en els nivells de proteïna. Aquests resultats demostren que els efectes observats pels inhibidors químics no són deguts a canvis en els nivells de proteïna de Ngn3.

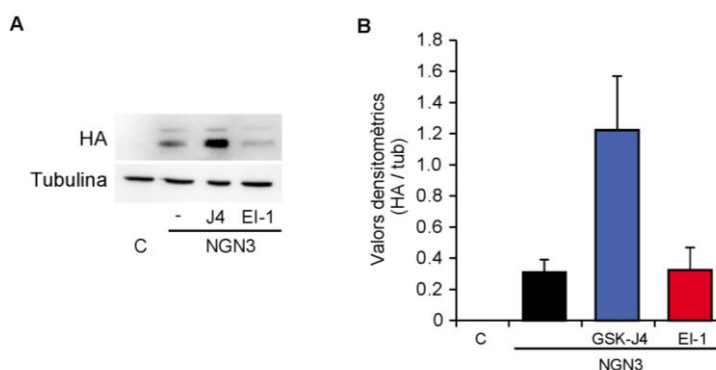


Figura 29. Efectes dels inhibidors químics GSK-J4 i EI-1 sobre l'expressió a nivell proteic del transgèn Ngn3. Les cèl·lules mPAC van ser infectades amb un

adenovirus que codifica per NGN3 amb epítot HA a l'extrem N-t durant 2 hores i van ser cultivades amb l'inhibidor GSK-J4 a 3 μ M o amb l'inhibidor EI-1 a 10 μ M durant 48h. Al final d'aquest període, s'obté l'extracte proteic i es realitza el Western Blot. Les membranes s'incuben amb l'anticós HA i α -Tubulina (control). **(A)** Imatge representativa i **(B)** quantificacions densitomètriques. Les dades representen la Mitjana \pm SEM per 4 experiments independents.

Efecte del moment d'inhibició d'Ezh2 sobre l'activitat transactivadora de Ngn3

Vam voler aprofundir en l'efecte potenciador de la inhibició d'Ezh2 sobre l'activitat de Ngn3 i vam analitzar l'efecte de l'inhibidor EI-1 afegit abans i/o després de la introducció de Ngn3. Els resultats obtinguts mostren que la inhibició prèvia a la introducció de Ngn3 provoca una menor expressió dels gens que són activats per Ngn3 excepte per *Atoh8*. Aquest efecte deleteri és contrari al que observem quan tractem les cèl·lules amb l'inhibidor després de tractar amb l'adenovirus que codifica per Ngn3 (Fig.30).

D'aquests resultats, cal destacar que el pre-tractament amb l'inhibidor no és suficient per causar un impacte en la funció activadora de Ngn3, suggerint l'existència d'una relació funcional entre Ezh2 i Ngn3. Doncs, és necessària la inhibició d'Ezh2 simultània a la presència de Ngn3 per obtenir una millora en la inducció de gens endocrins en les cèl·lules mPAC.

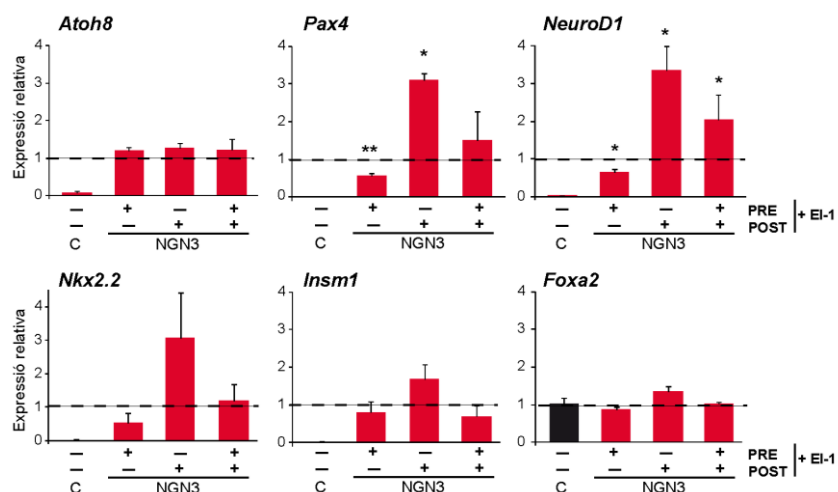


Figura 30. Efecte del moment d'addició del inhibidor EI-1 sobre l'activitat transactivadora de Ngn3 a les cèl·lules mPAC. Les cèl·lules mPAC van ser infectades amb Ad-NGN3 durant 2h i tractades amb 10 μ M d'EI-1 abans (PRE), després (POST) o els dos. El RNA total es va extreure i es va analitzar mitjançant

qPCR. Se li dóna valor de 1 a les cèl·lules infectades amb Ad-NGN3 i no tractades amb l'inhibidor EI-1 (línia discontinua). Els valors són Mitjanes±S.E.M per 3-4 experiments independents. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ relatiu a NGN3 sense inhibidor.

El conjunt d'aquests resultats demostren que la inhibició de Ezh2 millora l'activitat transactivadora de Ngn3 a les cèl·lules mPAC.

EFFECTES DE LA INHIBICIÓ DE EZH2 EN UN MODEL DE DIFERENCIACIÓ ENDOCRINA EX-VIVO

Els experiments anteriors demostren que la modulació de la marca H3K27m3 pot impactar en l'activació del programa endocrí en resposta a Ngn3 en un model cel·lular de transdiferenciació depenent d'aquest factor. Aquí vam investigar si la modulació d'aquesta marca també podia influir en l'activació endògena del programa endocrí en primordis pancreàtics de ratolí cultivats *ex-vivo*. Així, es van obtenir primordis pancreàtics a dia embrionari E12.5, ja que és el moment que s'inicia l'expressió de Ngn3. Unes 20h després (\pm E13.5), quan tenim el màxim pic d'expressió de Ngn3 (Villasenor et al., 2008), els primordis es van tractar amb l'inhibidor d'Ezh2 (EI-1) durant 48h addicionals (Fig.31A). Els resultats obtinguts mostren com la presència d'EI-1 provoca una tendència a incrementar els nivells de mRNA d'hormones com *Glucagó* i *Somatostatina* i gens endocrins com *NeuroD1*, *Pax4*, *Ngn3*, *Insm1* i més accentuat en l'expressió d'*Insulina* i *Nkx6-1* (Fig.31B-C). Juntament amb l'increment en l'expressió gènica s'observa un increment significatiu del nombre de cèl·lules insulino-positives (Fig.31D-E).

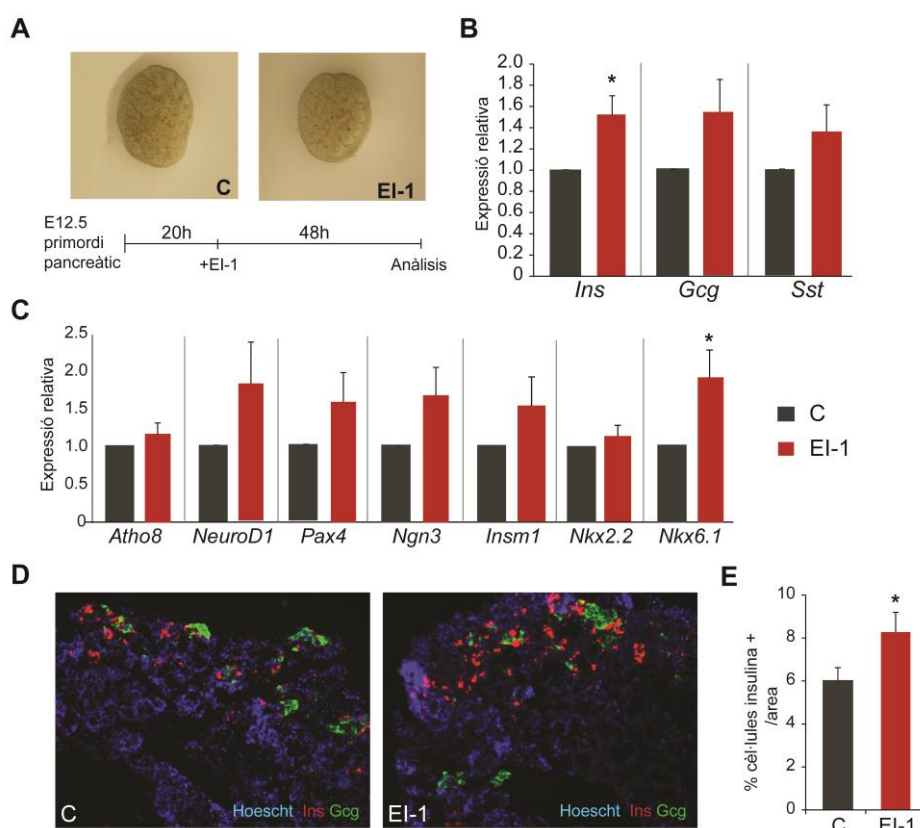


Figura 31. Efecte de la inhibició d'Ezh2 en la diferenciació endocrina de primordis pancreàtics cultivats *ex-vivo*. Els primordis pancreàtics de ratolí van

ser obtinguts a dia embrionari E12.5 i cultivats durant 48h amb 10 μ M de l'inhibidor EI-1. **(A)** Imatge representativa de primordis cultivats i del disseny experimental. **(B-C)** Els nivells de mRNA dels gens indicats van ser analitzats mitjançant real time PCR. L'expressió va ser normalitzada per β -actina (hormones: apartat B) i *Tbp* (factors de transcripció: apartat C) i es va donar el valor de 1 als valors dels primordis pancreàtics no tractats. Els valors són Mitjana \pm S.E.M de 4 experiments independents. *, $p < 0.05$ relatiu a la condició control. **(D)** Immunofluorescència resrepresentativa d'insulina (vermell) i glucagó (verd) en tall de primordis control i primordis tractats amb l'inhibidor EI-1. **(E)** Es va comptar el nombre de cèl·lules insulina-positives respecte l'àrea total analitzada (mm²). Els valors són Mitjana de 3 primordis independents.

Aquests resultats mostren que la inhibició de la metiltransferasa d'Ezh2 en primordis pancreàtics de E13.5 cultivats *ex vivo* provoca una potenciació de la diferenciació cap el destí de la cèl·lula β .

EFFECTES DE LA INHIBICIÓ DE EZH2 EN LA TRANSDIFERENCIACIÓ ENDOCRINA DE FIBROBLASTS EMBRIONARIS DE RATOLÍ

La millora de l'activació del programa de diferenciació endocrina promogut per Ngn3 en les cèl·lules mPAC en presència de l'inhibidor d'Ezh2 juntament amb els resultats obtinguts en els primordis pancreàtics, dona suport a la idea de que la inhibició de l'activitat enzimàtica d'Ezh2 podria utilitzar-se per optimitzar la transdiferenciació de cèl·lules somàtiques, allunyades embriològicament (i que, per tant, presentarien més barreres a nivell de l'estructura de la cromatina), cap a cèl·lules insulino-positives.

Efecte de la inhibició d'Ezh2 en l'activitat transactivadora de Ngn3 als fibroblasts embrionaris

Per abordar aquesta qüestió, vam obtenir fibroblasts embrionaris de ratolí (MEFs) a dia embrionari E12.5. Per tal d'avaluar l'efecte de la manipulació conjunta de Ngn3 i de l'inhibidor de la metiltransferasa d'Ezh2 en les MEFs, vam estudiar l'expressió dels gens dianes de Ngn3 i gens específics de la cèl·lula β . Els resultats mostren que la introducció de Ngn3 dona lloc a una inducció de l'expressió dels gens endocrins *NeuroD1*, *Nkx2-2*, *Insm1*, *Pax6*, *ChromA* i *MafA* (Fig.32A) i aquesta es veu potenciada amb la posterior inhibició química d'Ezh2 per EI-1 i GSK-126 (Fig.32B). No obstant, Ngn3 no activa gens claus i marcadors de la diferenciació endocrino-pancreàtica com *Nkx6-1*, *Pax4*, *Iapp*, *Pcsk1*, *Sst*, *Gck*, *Gcg* i *Ins* a les MEFs (dades no mostrades).

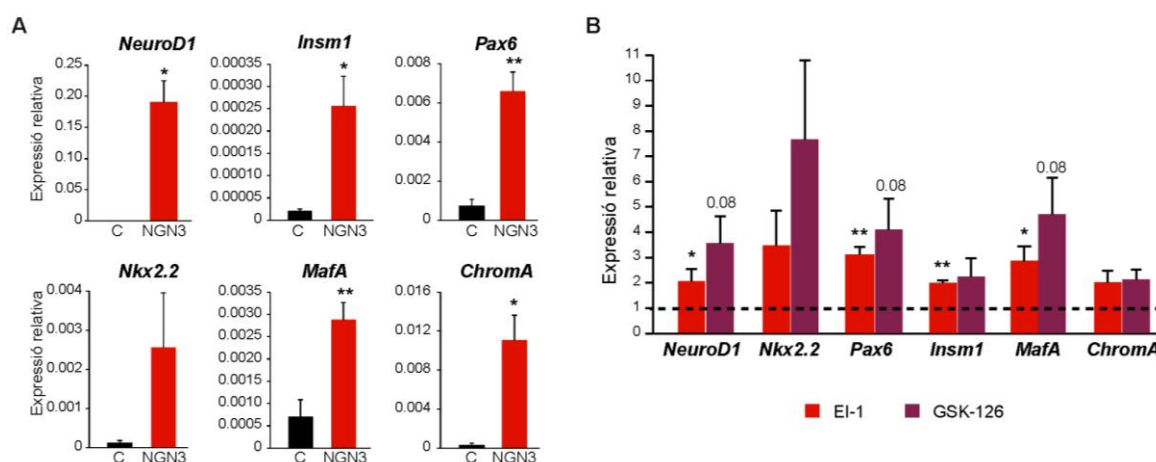


Figura 32. Efectes dels inhibidors químics d'Ezh2 sobre l'activitat transactivadora de Ngn3 a les cèl·lules MEFs. Els fibroblasts embrionaris de ratolí

(MEFs) van ser infectades amb Ad.NGN3 durant 3h i tractades amb 10 μ M de EI-1 o 10 μ M de GSK-126 durant 48h. Els nivells totals de RNA van ser extrets i es van analitzar l'expressió gènica mitjançant qPCR. **(A)** Expressió dels gens diana de Ngn3 en cèl·lules MEFs controls i amb Ngn3. **(B)** Efecte dels inhibidors químics d'Ezh2: EI-1 i GSK-126 sobre els gens indicats. L'expressió dels nivells gènics són relatius a *Tbp*. Els valors són representats mitjançant *fold change* respecte les cèl·lules tractades amb Ad.NGN3 sense inhibidor químic (Valor de 1 i representat per una línia discontinua). Els valors són Mitjana \pm S.E.M per 4 experiments independents, *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, relatiu a control MEFs **(A)** o NGN3 sense inhibidor **(B)**.

Efecte de la inhibició d'Ezh2 en l'activitat transactivadora Pdx1+Ngn3+MafA als fibroblasts embrionaris

Els resultats anteriors mostren que la inducció de Ngn3 juntament amb la inhibició d'Ezh2 a les MEFs no dona lloc a l'activació del gen de la insulina. Per aquest motiu vam decidir afegir altres factors de transcripció claus en el desenvolupament i l'especificació de la cèl·lula β .

Com s'ha explicat en la Introducció, la combinació de factors de transcripció Pdx1, Ngn3 i MafA pot transdiferenciar diferents tipus cel·lulars com cèl·lules ductals i acinars pancreàtiques, cèl·lules hepàtiques o cèl·lules gastrointestinals cap a cèl·lules productores d'insulina. Aquí, vam voler investigar quin era l'efecte en cèl·lules més allunyades embriològicament com els fibroblasts. Així, les cèl·lules MEFs s'han infectat amb un adenovirus que codifica per Pdx1-Ngn3-MafA (Ad-PNM) durant 2 hores. Posteriorment, s'ha afegit els inhibidors EI-1 i GSK-126 durant les 48 hores següents.

La presència conjunta de Pdx1, Ngn3 i MafA (PNM) dona lloc a un increment significatiu de l'expressió dels gens endocrins com *Insm1*, *Pax6*, *Nkx2-2* i *MafA* respecte les cèl·lules que només havien introduït Ngn3 (Fig.33A). Al contrari del que s'havia descrit anteriorment, en les nostres mans la introducció de PNM en les MEFs dona lloc a la activació del gen de la insulina (Fig.33B). En experiments preliminars on vam introduir Ngn3 juntament amb Pdx1 però no MafA no vam observar activació de l'expressió de *insulina* indicant que calen els tres factors per induir aquest gen (dades no mostrades). També es va analitzar l'impacte dels inhibidors epigenètics EI-1 i GSK-126 després de la introducció de PNM en les cèl·lules MEFs. Es va observar un increment significatiu de l'expressió de *NeuroD1* i una tendència a incrementar els nivells de mRNA dels gens *Nkx2-2* i *Insm1* amb l'inhibidor GSK-126. Per contra, s'observa una baixada significativa de l'expressió del gen de la *insulina* (*Ins*) quan

tractem les cèl·lules reprogramades amb l'inhibidor GSK-126 mentre que el tractament amb EI-1 dona valors similars als obtinguts amb els factors PNM (Fig.33C).

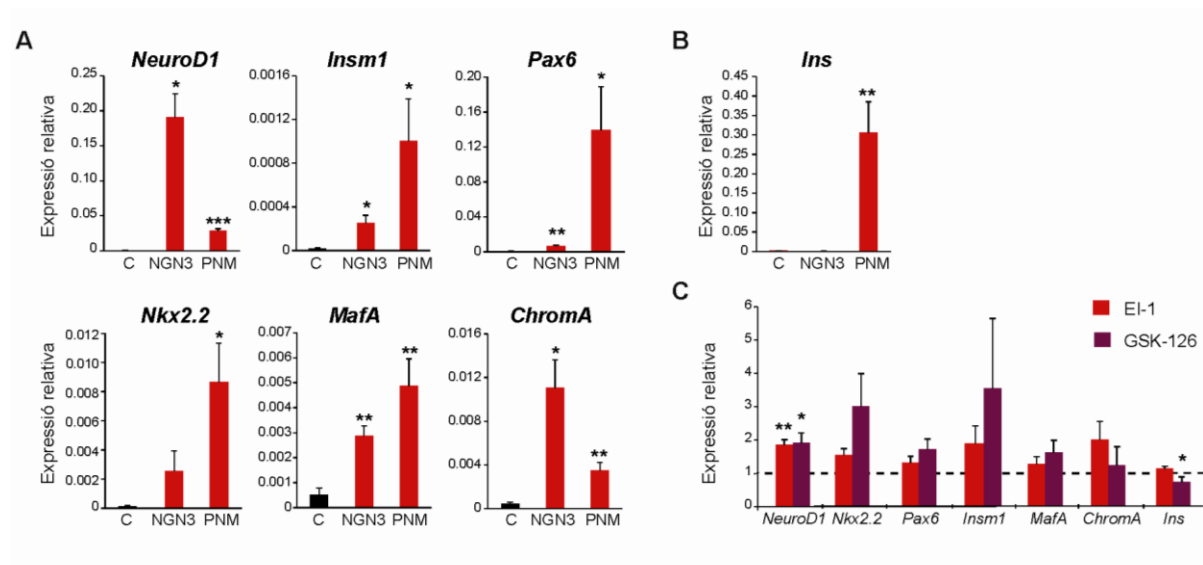


Figura 33. Efectes dels inhibidors químics d'Ezh2 sobre l'activació gènica en resposta a PNM a les cèl·lules MEFs. Els fibroblasts embrionaris de ratolí (MEFs) van ser infectats amb l'adenovirus Ad-PNM que codifica per Pdx1-Ngn3-MafA durant 3h i tractades amb 10 μ M d'EI-1 i 10 μ M de GSK-126 durant 48h. Els nivells totals de RNA van ser extrets i es van avaluar l'expressió gènica mitjançant qPCR. **(A-B)** Expressió dels gens diana de Ngn3 en cèl·lules MEFs control i tractades amb Ad-NGN3 (NGN3) i Ad-PNM (PNM). L'expressió dels nivells gènics són relatius a *Tbp*. **(C)** Efecte dels inhibidors químics EI-1 i GSK-126 sobre els gens indicats. Els valors són representats mitjançant *fold change* respecte les cèl·lules infectades amb Ad-PNM sense inhibidor químic (Valor de 1 i representat per una línia discontinua). Els valors són Mitjana \pm S.E.M per 4 experiments independents, *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.01$ relatiu a les MEFs control **(A-B)** o relatiu a les MEFs tractades amb Ad-PNM sense inhibidor **(B)**.

En conjunt, aquests resultats donen suport a la idea que la combinació simultània de factors de transcripció claus en la diferenciació de cèl·lula β i d'inhibidors químics d'Ezh2 pot millorar l'activació de certs gens del programa de diferenciació endocrino-pancreàtica en cèl·lules allunyades embriològicament de la cèl·lula β .

EFFECTE DE LA INHIBICIÓ DE EZH2 EN LA DIFERENCIACIÓ DIRIGIDA DE CÈL·LULES PLURIPOTENTS INDUÏDES CAP A CÈL·LULA β

En els darrers anys, són múltiples els estudis que demostren que és possible obtenir cèl·lules β a partir de cèl·lules iPSC (Lu, Xia, & Zhou, 2017). Però, els resultats encara no són del tot prometedors ja que els protocols de diferenciació dirigida no són prou eficients i les cèl·lules β generades són funcionalment immadures.

Els nostres resultats descrits en els apartats anteriors suggereixen que la manipulació de la metiltransferasa Ezh2 podria esdevenir una estratègia pausable per millorar l'expressió dels gens endocrins en protocols de diferenciació dirigida de iPSC cap a cèl·lules β madures.

Caracterització del protocol de diferenciació dirigida a partir de iPSC

A la literatura s'han descrit diversos protocols de diferenciació dirigida mitjançant els quals es poden generar cèl·lules productores d'insulina a partir de cèl·lules pluripotents tant ESC com iPSC. En col·laboració amb el CMRB de Barcelona, vam utilitzar un protocol que havia estat dissenyat i validat pel Dr. Sergio Mora, investigador postdoctoral de la Univesitat de California a San Diego, basat en el protocol descrit per Cho et al., 2012 amb modificacions (pendent de publicació). Aquest protocol parteix de cèl·lules iPSC (procedents de fibroblast humà) i segueix cinc estadis seqüencials amb una duració total de 21 dies. En la Fig34A, podem observar les diferents etapes que componen el protocol i a la Fig.34B l'expressió dels diferents marcadors endocrins claus en les diferents etapes del protocol (*NGN3-PDX1-NKX6-1-INS*). Com podem observar l'expressió de *NGN3* i *PDX1* tenen el seu pic màxim al dia 9, posteriorment a dia 12 baixa la seva expressió, i finalment torna a incrementar lleugerament a dia 21 del protocol. També podem observar l'activació del factor *NKX6-1*, important per la maduració de la cèl·lula β , als últims dies del protocol que va acompanyat de l'expressió del gen de la *INS*.

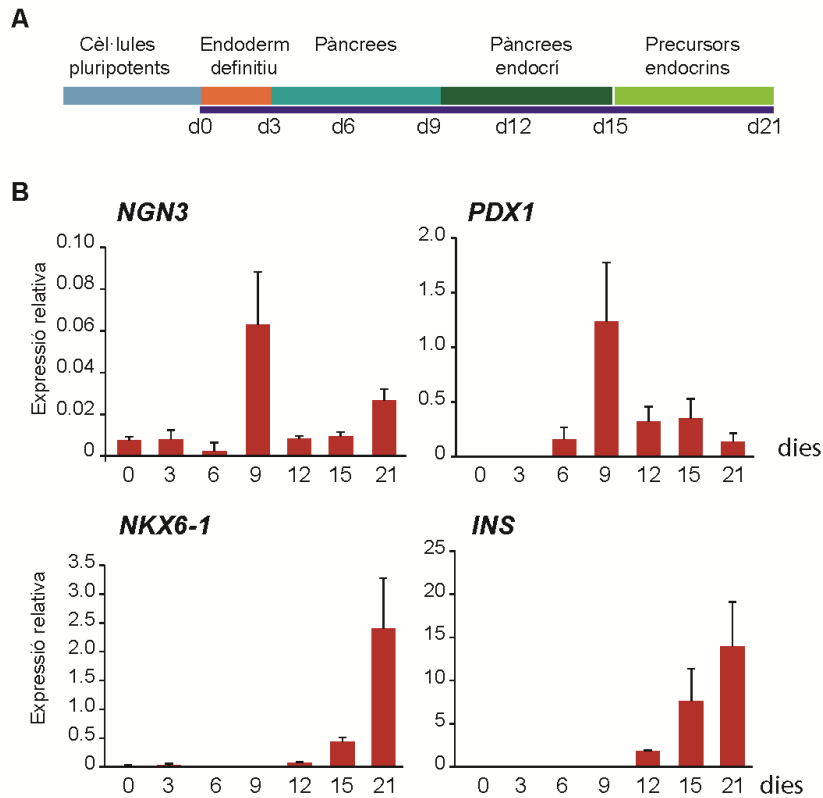


Figura 34. Activació de gens endocrins en el protocol de diferenciació directa a partir de cèl·lules iPSC cap a cèl·lula β . Les cèl·lules iPSC són diferenciades cap a cèl·lula β durant 21 dies. **(A)** Esquema del protocol de diferenciació indicant les majors etapes de diferenciació. **(B)** Expressió gènica de marcadors endocrins i específics de cèl·lula β en les iPSC humanes en els dies indicats. Es va extreure el RNA i es va avaluar l'expressió gènica dels diferents marcadors mitjançant qPCR. Es va calcular els nivells de mRNA relatius a l'expressió de *TBP*. Els valors són Mitjana \pm S.E.M de 3-4 experiments independents.

Estudi de l'efecte de la inhibició de *Ezh2* en el protocol de diferenciació dirigida a partir de IPSC

A continuació, vam estudiar l'efecte de l'addició de l'inhibidor EI-1 (20 μ M) en 3 moments diferents durant el protocol de diferenciació triats en base als perfils d'expressió de gens de diferenciació endocrina mostrats a la Fig.34. En la Fig.35A s'observa l'esquema experimental on la *condició1* (C1) s'introdueix l'inhibidor quan s'arriba a l'estadi de progenitor pancreàtic (d6-d9); en la *condició2* (C2), l'inhibidor s'introdueix en l'estadi de pàncrees endocrí (d9-d12) i en la *condició3* (C3) introdueix en l'últim moment que correspon a l'estadi de cèl·lules endocrines (d12-d15). En la Fig.35B s'observa que l'expressió d'*INS* incrementa significativament a dia 12 i a dia 21 quan es tracten les cèl·lules amb l'inhibidor d'EI-1 durant

els dies 6-9. En canvi, si s'introdueix l'inhibidor en els estadis posteriors s'observa una baixada de l'expressió d'*INS* a dia 15 i a dia 21. Aquests resultats es recolzen amb el comptatge de les cèl·lules que expressen *INS*, on es veu un increment significatiu de cèl·lules insulino-positives, quan es realitza el tractament amb la condició C1 (Fig.35C-D).

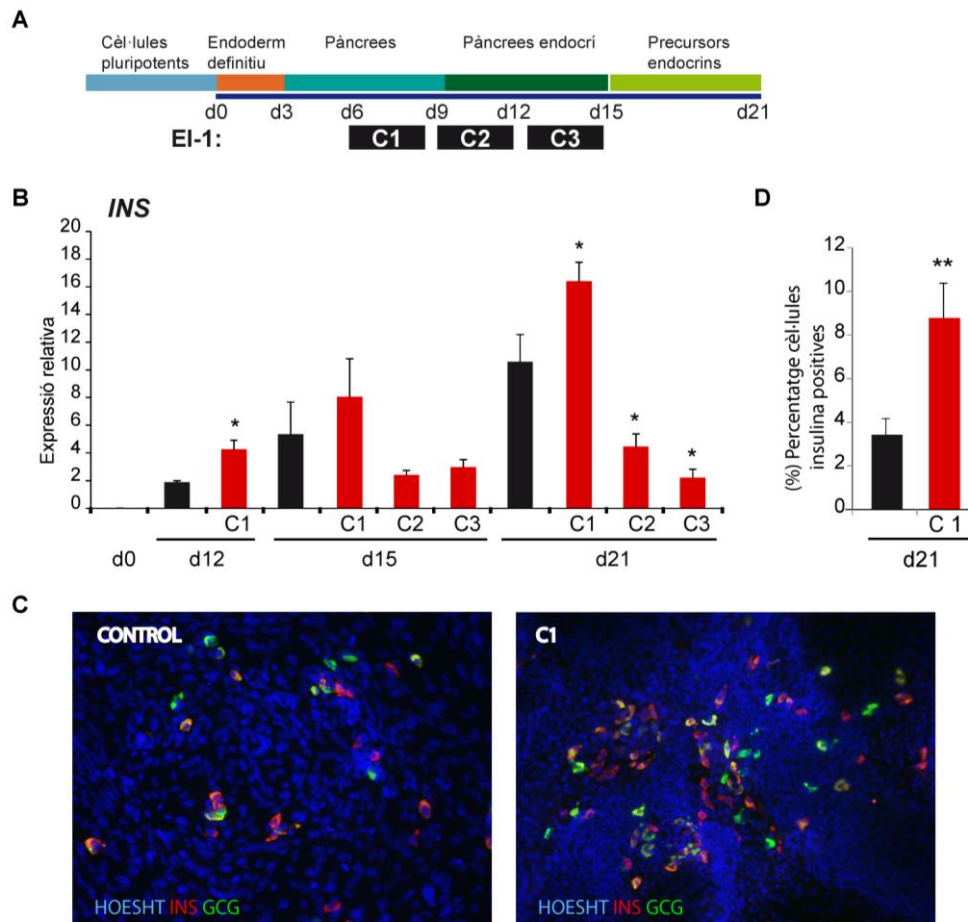


Figura 35. Efecte de la inhibició d'Ezh2 en la diferenciació dirigida de cèl·lules humanes iPSC cap a cèl·lules β . (A) Esquema experimental del protocol de diferenciació dirigida de 21 dies amb els moments de tractament amb 20 μ M de l'inhibidor químic EI-1 (barra anomenada C1-C2-C3). (B) Les cèl·lules van ser recollides i analitzades en els dies del protocol indicats. Es va obtenir el RNA total i es va analitzar l'expressió d'insulina mitjançant qPCR. Els valors són expressats relatius a *TBP*. Les barres negres indiquen l'expressió gènica d'insulina en les cèl·lules control sense el tractament d'EI-1. Els valors són Mitjana \pm S.E.M, 2-3 experiments independents, cada un amb 2-3 replicats. *, $p < 0.05$ relatiu a les cèl·lules control de cada temps indicat (barres negres). (C) Imatge representativa de les cèl·lules obtingudes amb el protocol estàndard (panell superior) o amb el protocol que inclou el tractament amb l'inhibidor EI-1 (20 μ M) per la condició C1 (panell inferior). Al dia 21 del protocol, les cèl·lules són fixades i tenyides amb l'anticòs específic d'insulina (vermell) i glucagó (verd). Els nuclis són visualitzats amb Hoescht 33258 (blau). (D) Quantificació mitjançant un percentatge de les cèl·lules insulino-positives sobre el total dels nuclis analitzats. Els valors són Mitjana \pm S.E.M. **, $p < 0.01$ relatiu al protocol estàndard.

Vist els resultats anteriors, ens vam centrar en la condició C1 per examinar l'estat d'activació del programa transcripcional endocrí. A dia 12, molts gens analitzats són regulats a l'alça de manera significativa al comparar-ho amb les cèl·lules control com *NGN3*, *PAX4*, *SST*, *NEUROD1* i *NKX2-2* (Fig.36), sent tots ells gens diana de Ngn3. De manera interessant, gens com *PAX6*, *NKX6-1* i *MAFA*, s'expressen més tardanament cap el dia 15 i el tractament amb EI-1 provoca una millora en la seva expressió. Contràriament l'expressió de *SOX9* no varia en la condició C1 durant el dia 12 i 15.

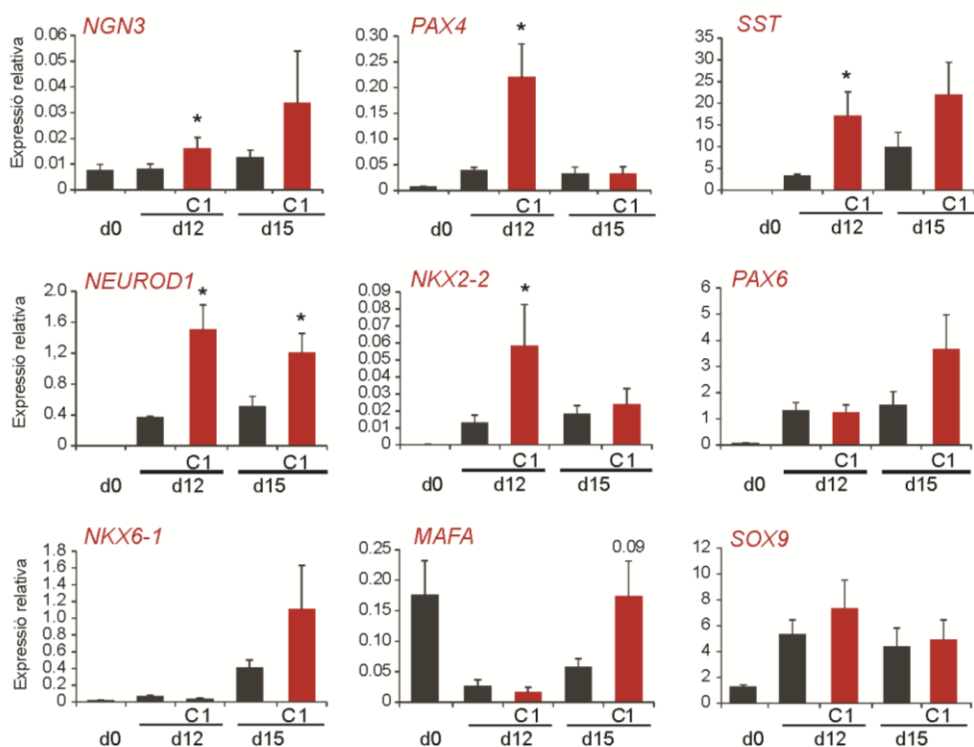


Figura 36. Efecte de la inhibició d'Ezh2 sobre l'expressió de marcadors endocrins en la diferenciació dirigida de cèl·lules humanes iPSC cap a cèl·lules β . Les cèl·lules iPSC són tractades amb 20 μ M de l'inhibidor químic EI-1 (C1) durant el protocol de diferenciació de 21 dies. Les cèl·lules van ser recollides i analitzades en les dies del protocol indicades. Es va obtenir el RNA total i es va analitzar l'expressió d'insulina mitjançant qPCR. Els valors són expressats relatius a *TBP*. Les barres negres indiquen l'expressió gènica dels gens indicats en les cèl·lules control sense el tractament d'EI-1. Els valors són Mitjana \pm S.E.M, 2-3 experiments independents, cada un amb 2-3 replicats. *, $p < 0.05$ relatiu a les cèl·lules control de cada temps indicat (barres negres).

Tots aquests resultats demostren que la inhibició de l'activitat d'Ezh2 durant el període de formació de progenitors pancreàtics pot ser utilitzat per millorar el programa transcripcional endocrí en un protocol de diferenciació dirigida a partir de cèl·lules iPSC humanes.

DISCUSSIÓ

En els darrers anys hi ha hagut una clara aposta per la medicina regenerativa com a possible via de curació de la diabetes tipus 1. En el marc d'aquesta disciplina s'ha proposat l'obtenció de cèl·lules productores d'insulina funcionals per substituir les cèl·lules β malmeses o perdudes en els pacients diabètics. Una de les aproximacions en les quals s'ha estat treballant des de fa uns anys és la generació de cèl·lules β substituïdes a partir de cèl·lules pluripotents induïdes (iPSC) o cèl·lules somàtiques. Fins el dia d'avui, els protocols de diferenciació dirigida i de transdiferenciació descrits encara són ineficients i el nombre de cèl·lules productores d'insulina obtingudes és baix i no arriben a la maduresa funcional. En aquest sentit, el principal propòsit d'aquesta tesi ha estat estudiar noves estratègies encaminades a l'obtenció de cèl·lules productores d'insulina a partir de fibroblasts que inclouen la modulació de l'estat de la cromatina i/o la introducció de FT claus.

En la primera part de la tesi, hem volgut investigar si els mecanismes epigenètics poden ser un avenç per millorar els protocols de reprogramació directa, via la introducció de FT específics, i de protocols de diferenciació dirigida de cèl·lules pluripotents cap a cèl·lula β . Es coneix que la conformació de la cromatina influeix en l'expressió gènica i, que pot esdevenir una barrera per processos de reprogramació cel·lular quan el seu estat és compacte i doncs "no permissiu". De fet, s'ha descrit que les cèl·lules β produïdes *in vitro* mitjançant protocols de diferenciació, no eliminen completament la marca repressiva H3K27me3 en gens endocrins específics, fet que s'ha postulat que pot contribuir al mal funcionament de les cèl·lules productores d'insulina generades *in vitro* (Xie et al 2013). En aquesta tesi hem avaluat si la manipulació de l'activitat enzimàtica dels reguladors de la marca repressiva H3K27me3 pot ser una estratègia útil per millorar els protocols de reprogramació endocrina basats en la introducció de factors de transcripció. Concretament hem estudiat l'impacte de la modulació química dels reguladors H3K27me3 en la capacitat transactivadora del factor de transcripció Ngn3. Es coneix relativament poc sobre l'impacte de la marca H3K27me3 sobre la xarxa transcripcional activada per Ngn3 i els seu efecte sobre la diferenciació cap a cèl·lula β pancreàtica. Ngn3 és un factor de transcripció clau que inicia la cascada transcripcional endocrina en els progenitors pancreàtics durant l'embriogènesis (G. Gu et al., 2002). A més, el factor Ngn3, sol o en combinació amb altres factors de transcripció, s'ha utilitzat com a factor de reprogramació cel·lular per promoure la diferenciació endocrina en diversos contextos cel·lulars tant *in vivo* com *in vitro* (Heremans et al., 2002, Gasa et al., 2008, Zhou et al., 2008, Yechoor et al., 2009, Y. J. Chen et al., 2014, Ariyachet et al., 2016). Per tant, ens vam plantejar

si la modulació de l'enriquiment d'aquesta marca en gens endocrins concrets podria facilitar la diferenciació endocrina promoguda per aquest factor.

En general, la majoria dels enzims modificadors de la cromatina s'expressen de forma ubíqua i es creu que els patrons d'expressió gènics característics d'un tipus cel·lular estan mediat per la interacció dels modificadors de cromatina amb factors de transcripció específics de llinatge durant el desenvolupament (Seenundun et al., 2010, Y. Wang et al., 2018). Inicialment la nostra proposta sobre la participació de H3K27me3 en esdeveniments de transactivació dependents de Ngn3 neix de descobriments previs on es va observar que l'expressió forçada d'aquest factor promou la pèrdua de les marques H3K27me3 de les regions promotores dels gens diana de Ngn3 (Pujadas et al., 2011). No obstant, la pèrdua de H3K27me3 observada en aquest primer estudi podria ser una conseqüència o precedir l'activació transcripcional d'aquests gens. En aquest treball hem demostrat que la inhibició de les demetilases H3K27me3 dificulta la capacitat de Ngn3 de transactivar les seves dianes gèniques. No sabem si la demetilasa implicada és Utx, JmjD3 o ambdues, ja que l'inhibidor químic GSK-J4 i altres compostos disponibles inhibeixen les dues demetilases alhora. A més, és possible que la demetilasa específica implicada pugui variar depenent del context cel·lular en qual s'introdueixi Ngn3.

A diferència de l'inhibidor de la demetilasa H3K27me3, la inhibició química de la metilasa de H3K27 Ezh2 dona com a resultat una millora de l'expressió de gens activats per Ngn3 en les cèl·lules mPAC. A més, es posa en valor que el moment d'inhibició d'Ezh2 és clau per veure una millora en la diferenciació endocrina ja que si la inhibició és anterior a l'expressió de Ngn3 no s'observa aquest efecte positiu. Aquests fets es recolzen en els resultats obtinguts *ex vivo*, on observem que la inhibició d'Ezh2 en primordis pancreàtics de E12.5-E13.5 afavoreix la formació de cèl·lules insulino-positives.

Adicionalment, els nostres resultats revelen que la manipulació de l'activitat d'Ezh2 també es pot utilitzar per influir en la funció de Ngn3. És interessant que l'expressió ectòpica de Ngn3 disminueixi l'expressió gènica d'Ezh2 en cèl·lules mPAC, una observació que podem relacionar amb dades publicades del nostre grup on mostrem que l'expressió gènica d'Ezh2 es més reduïda en els progenitors pancreàtics endocrins en comparació amb les cèl·lules pancreàtiques no endocrines a E15.5 *in vivo* (Cervantes et al., 2017). La importància de la marca H3K27me3 en la regulació dels gens durant el desenvolupament és rellevant però no

sempre està associat a canvis en l'enriquiment de H3K27me3 (Vanhove et al., 2016). En aquest context, cal destacar que la inducció tardana de *NeuroD1* en resposta a Ngn3 es produeix sense canvis detectables en l'enriquiment H3K27me3 en el seu promotor en les cèl·lules mPAC. Malgrat això, la inducció de *NeuroD1* és suprimida dràsticament per l'inhibidor de JmjD3/Utx i millorada per l'inhibidor d'Ezh2. Per tant, no podem descartar que aquests efectes siguin secundaris als canvis en l'expressió de gen/s intermediaris que es requereixen per a la inducció de *NeuroD1* pel factor de Ngn3.

Fins el moment, s'han descrit diversos exemples exitosos de reprogramació directa cap a les cèl·lules β , utilitzant fonts cel·lulars properes a nivell d'origen embriològic, incloses les cèl·lules pancreàtiques ductals i exocrines, intestinals, hepàtiques o estomacals (Heremans et al., 2002, Gasa et al., 2008, Zhou et al., 2008, Yechoor et al., 2009, Y. J. Chen et al., 2014, Ariyachet et al., 2016). No obstant això, per a aplicacions mèdiques potencials, els protocols de reprogramació de cèl·lules somàtiques han d'utilitzar teixits o fonts cel·lulars fàcilment accessibles. En aquest sentit, els fibroblasts poden ser una font cel·lular valuosa pels avantatges que ofereix on es destaca la fàcil obtenció, el ràpid creixement i el fàcil manteniment en un laboratori. La literatura prèvia mostra que és possible convertir fibroblasts cap a diferents llinatges cel·lulars, com neurones, cardiomiòcits o hepatòcits usant conjunts específics de FT, però semblen poc susceptibles a la transdiferenciació cap a les cèl·lules β (Zhou et al., 2008, Akinci et al., 2013; Katz, et al., 2013). En canvi, estudis recents han demostrat que l'ús simultani d'agents modificadors de la cromatina, que afecten àmpliament la metilació de l'ADN o l'acetilació d'histones, juntament amb FT importants en el desenvolupament de la cèl·lula β indueixen l'expressió de gens endocrins en fibroblastos dèrmics (Katz et al., 2013) o altres tipus cel·lulars (Akinci et al., 2013).

Aquí mostrem que la introducció de Ngn3 a cèl·lules embrionàries de fibroblasts (MEFs) poden induir l'expressió de gens involucrats en la diferenciació endocrina, però no de gens que codifiquen les hormones endocrines, i que juntament amb la inhibició d'Ezh2 millora la capacitat de transactivadora d'aquest FT. En canvi, cal destacar que la manipulació per sí sola dels reguladors epigenètics no pot activar transcripcionalment els gens de factors de transcripció silenciats ni en les cèl·lules mPAC ni en les MEFs. Doncs, en base als resultats obtinguts podem dir que és necessari Ngn3 per promoure canvis en l'activació gènica juntament amb els reguladors de la marca H3K27me3.

Per altra banda, la introducció dels factors PNM en les cèl·lules MEFs, porta a l'activació de més gens que solament Ngn3, entre els quals hi ha el gen d'insulina. No obstant, la inhibició de la metiltransferasa Ezh2 té efectes heterogenis sobre els gens induïts per PNM. Desconeixem la raó mecànica d'aquests resultats però és pausable que els diferents factors de transcripció tinguin requeriments i/o efectes diferents quant a les marques H3K27me3. Caldria establir si Pdx1 o MafA comparteixen amb Ngn3 la capacitat de promoure la pèrdua de H3K27me3 dels seus gens diana. Tampoc sabem si l'expressió simultània dels 3 factors pot haver interferit amb la funció transactivadora de Ngn3 o pot haver influït en l'activitat d'Ezh2.

En protocols de diferenciació dirigida, s'ha descrit que l'expressió ectòpica de Jmjd3 juntament amb l'expressió forçada de factors de transcripció específics de llinatge en cèl·lules iPSC millora l'obtenció de cèl·lules hepàtiques i cèl·lules musculars esquelètiques (Akiyama et al., 2016). Nosaltres, hem volgut analitzar si la inhibició d'Ezh2 també és efectiva en la millora de la diferenciació endocrina en un protocol de diferenciació dirigida utilitzant cèl·lules iPSC. Els nostres resultats demostren que la inhibició de la metiltransferasa Ezh2 en un determinat moment del protocol millora l'obtenció de cèl·lules productores d'insulina. És important destacar que el temps d'exposició a l'inhibidor químic d'Ezh2 és fonamental per influir activament en el gen *INS* de forma positiva o negativa en aquest sistema. El motiu mecanicista d'aquesta observació no està clar. L'etapa entre els dies 6 i 9 coincideix amb la inducció dràstica del gen *NGN3* i, per tant, amb el naixement de les cèl·lules Ngn3-positives (progenitors endocrins). En suport a la millora de l'activació del programa endocrí, es van trobar nivells de transcripció de gens activats aigües avall de Ngn3 augmentats en els dies 12 i/o 15 en cèl·lules tractades amb l'inhibidor durant els dies 6 a 9. Per contra, la inhibició d'Ezh2 després del dia 9, quan els nivells d'expressió de *NGN3* i, per tant, l'activitat de Ngn3 estan disminuint, és perjudicial per a la diferenciació endocrina. Una possibilitat és que la inhibició d'Ezh2 en progenitors endocrins tardans o la diferenciació de cèl·lules endocrines podria interferir en silenciar conjunts específics de gens (Van Arensbergen et al., 2010) i obstaculitzar l'establiment correcte del programa endocrí. Xu et al. va demostrar que la inhibició d'Ezh2 durant l'especificació endocrina, però no abans de la formació del progenitor pancreàtic, dóna lloc a un major percentatge de cèl·lules d'insulino-positives *in vitro* (C.R. Xu et al., 2014). Aquest fet es corrobora amb els nostres resultats obtinguts on observem una millora de cèl·lules insulino-positives en els primordis pancreàtics de dia embrionari E12.5, on tenim el pic d'expressió de *NGN3* i comença l'especificació endocrina, tractats amb l'inhibidor d'Ezh2. Per tant, la finestra de temps per maniobrar els nivells d'H3K27me3 i la millora de la

diferenciació endocrina sembla limitar-se a l'etapa durant la qual neixen les cèl·lules Ngn3-positives. Caldria realitzar estudis futurs per establir la funcionalitat de les cèl·lules productores d'insulina generades amb aquesta manipulació epigenètica.

En resum, aquest estudi demostra que la manipulació de la marca repressiva H3K27me3 pot ser utilitzada per influir en la capacitat transactivadora de Ngn3 en protocols de reprogramació cel·lular *in vitro* i en protocols de diferenciació dirigida a partir de cèl·lules pluripotents. Aquests resultats són encoratjadors i recolzen la idea que els modificadors de cromatina poden ser dianes vàlides per tal de millorar la capacitat de transdiferenciació dels factors de reprogramació específics de llinatge.

PART 2:

Transdiferenciació de fibroblasts humans cap a cèl·lules productores d'insulina

Recentment, importants estudis han descrit com l'expressió forçada de factors de transcripció específics de llinatge poden convertir una cèl·lula especialitzada en una altra, sense tenir que passar per un estat pluripotent. Aquest procés s'anomena transdiferenciació. En la recerca en diabetis, el Dr. Melton va ser el primer en veure com la introducció de 3 factors de transcripció claus en el desenvolupament de la cèl·lula β , Pdx1, Ngn3 i MafA (PNM) en les cèl·lules exocrines, dona lloc a cèl·lules productores d'insulina. A partir d'aquest moment, altres investigadors van aconseguir obtenir cèl·lules productores d'insulina a partir d'altres tipus cel·lulars, com cèl·lules ductals, hepàtiques, intestinals o estomacals mitjançant la mateixa combinació de factors de transcripció (veure introducció). En tots els casos descrits, la conversió cap a cèl·lula β , no ha sigut del tot completa. Fins a l'actualitat no s'ha descrit una transdiferenciació de cèl·lules de la pell (fibroblasts) cap a cèl·lules β mitjançant factors de transcripció, sent aquest l'objectiu del nostre projecte. Els resultats obtinguts amb les MEFs en la primera part d'aquesta tesi, on demostrem l'activació del gen de la insulina amb els factors PNM, ens van encoratjar a investigar la possibilitat de convertir fibroblasts humans en cèl·lules productores d'insulina. Hem escollit aquest tipus cel·lular tenint en compte una potencial traslació a la clínica dels nostres resultats, ja que els fibroblasts es poden obtenir de manera ràpida i fàcil mitjançant una biòpsia de pell poc invasiva i creixen molt bé al laboratori.

Per establir el protocol de reprogramació hem utilitzat fibroblasts humans procedents de prepuci de nen amablement cedits per la Dr. Montserrat (HFF10.3). Per la confirmació dels resultats principals s'han utilitzat fibroblasts HFF comprats a ATCC (HFF) i fibroblasts procedents de la pell de l'avantbraç d'un pacient diabètic (HDF13.1; utilitzats per fer cèl·lules iPSC en el marc d'un projecte de la Fundació Marató TV3 del nostre grup).

DISSENY DEL PROTOCOL DE TRANSDIFERENCIACIÓ DE FIBROBLASTS CAP A CÈL·LULES PRODUCTORES D'INSULINA

Vam utilitzar l'adenovirus recombinant Ad-PNM descrit pel grup del Dr. Zhou i utilitzat amb les MEFs en la primera part d'aquesta tesi. Es tracta d'un adenovirus policistrònic que codifica per Pdx1+Ngn3+MafA+Cherry.

L'eficiència d'infecció de fibroblasts humans amb adenovirus és molt baixa, en els primers intents només podíem detectar la proteïna Cherry en un 10-20% de fibroblasts. Per tal de

millorar l'eficiència, vam combinar diversos mètodes de transfecció clàssics (liposomes, policones, PEI, etc.) amb l'adenovirus recombinant Ad-PNM. Gràcies a aquestes proves vam veure que l'addició del reactiu Superfect (invitrogen) en el moment de la infecció amb l'adenovirus millorava substancialment l'eficiència arribant a un 70-80%, de fibroblasts positius per Cherry 3 dies després de la infecció.

Es va monitoritzar la infecció vírica dels fibroblasts humans mitjançant la visualització de la proteïna fluorescent Cherry i els nivells d'expressió dels transgens (Fig.37A-B) mesurats a dia 3 i 7 després de la infecció. Pel que fa al gen de la *INSULINA (INS)* (Fig.37C), s'observa una inducció dramàtica dels nivells de mRNA que incrementa en el temps passant de 2.500 a 20.000 vegades sobre els nivells control en 4 dies. Aquests canvis en expressió gènica van acompanyats de canvis en la forma i en l'aspecte cel·lular, passant d'una forma allargada típica de fibroblast, a una forma més arrodonida característica de cèl·lules β , 7 dies després de la infecció amb Ad-PNM (Fig.37A).

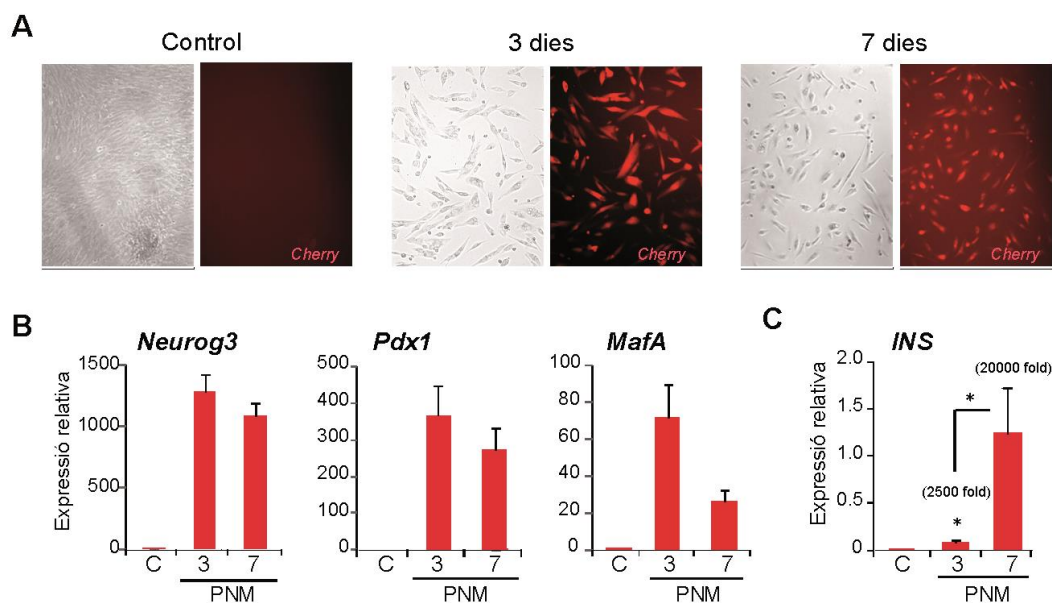


Figura 37. Disseny experimental i avaluació de l'eficiència de la reprogramació en les cèl·lules HFF10.3. Els fibroblasts HFF10.3 van ser infectat amb l'adenovirus que codifica per Pdx1-Ngn3-MafA (Ad-PNM) i una proteïna fluorescent Cherry com a reporter durant 24h i després es van cultivar durant 3 o 7 dies en medi DMEM-10% FBS (mateix medi de cultiu que els fibroblasts). Es va comprovar la infecció de l'adenovirus mitjançant (A) la fluorescència de la proteïna cherry, (B) els nivells d'expressió de mRNA dels transgens i (C) de la insulina mitjançant qRT-PCR. L'expressió dels nivells gènics són relatius a *TBP*. Valors són Mitjanes \pm S.E.M de 8-10 experiments independents, *, $p < 0.05$, relatiu a control (s'expressa el *fold-change* entre parèntesis).

Un cop demostrat que l'expressió ectòpica dels 3 factors de transcripció PNM en els fibroblasts té la capacitat d'activar el gen *INS*, es va voler optimitzar les condicions de cultiu per millorar l'eficiència del protocol de transdiferenciació. Per aquesta raó, es van fer proves simples, combinant diferents medis de cultiu (DMEM-RPMI-CMRL) amb diferents percentatge, 3-6-10%, de sèrum boví fetal (FBS) i/o concentracions de glucosa, just després de la infecció amb Ad-PNM. A la Fig.38, s'observa els resultats obtinguts en l'expressió d'*INS* després de les múltiples combinacions amb els diferents tipus de medi utilitzats. Veiem que la utilització de RPMI-6%FBS augmenta dramàticament els nivells de mRNA d'*INS* i, per tant, tots els experiments fets a partir d'aquest moment s'han fet amb aquest medi.

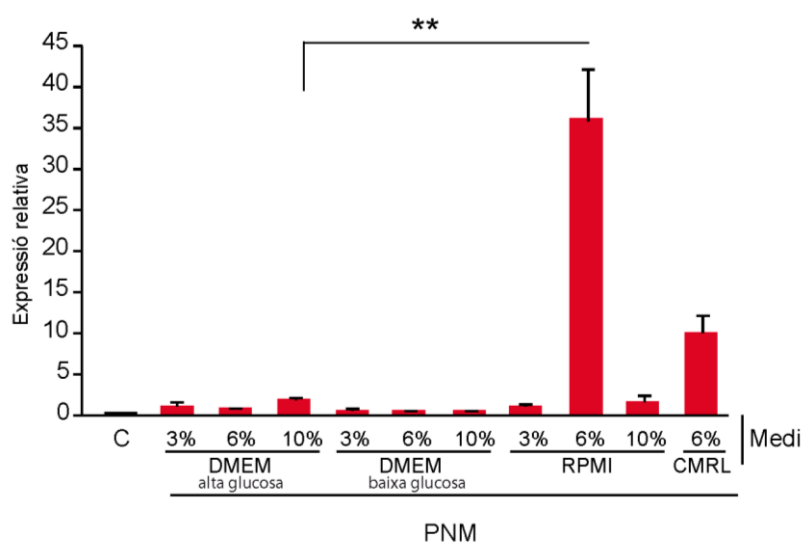


Figura 38. Activació del gen de la *INSULINA* en resposta a PNM a les cèl·lules HFF10.3 cultivades en diferents medis de cultiu. Els fibroblasts HFF10.3 van ser infectats amb Ad-PNM. 24h després de la infecció, les cèl·lules van ser cultivades amb els medis indicats: DMEM (DMEMF12 1000mg/L glucosa (baixa) i 4500mg/L glucosa (alta)), RPMI i CMRL amb les concentracions de FBS indicades. S'extreu el RNA total i s'analitza els nivells de mRNA d'*INS* mitjançant qRT-PCR. L'expressió dels nivells gènics són relatius a *TBP*. Valors són Mitjanes±S.E.M de 2-8 experiments independents. **p0.01 respecte PNM (DMEM 4500 mg/L glucosa al 10% FBS).

Efecte del PNM sobre l'expressió dels gens endocrins en fibroblasts

A continuació es van analitzar els nivells de mRNA dels marcadors endocrins després de 7 dies de la introducció de PNM. Juntament amb l'activació de l'expressió d'*INS*, es va veure l'expressió de les hormones glucagó (*GCG*) i somatostatina (*SST*), a més de gens endocrins

importants com *NEUROD1*, *PAX4*, *MAFB*, *INSM1*, *NKX2-2* i *ARX* i gens involucrats en la funció de la cèl·lula β com *GLP1R*, *PSCK1* i *PSCK2* (Fig.39A-B).

No obstant, altres gens importants en el desenvolupament i la funció de la cèl·lula β com per exemple *NKX6-1* o *PAX6* no són activats per PNM en els fibroblasts humans (dades no mostrades).

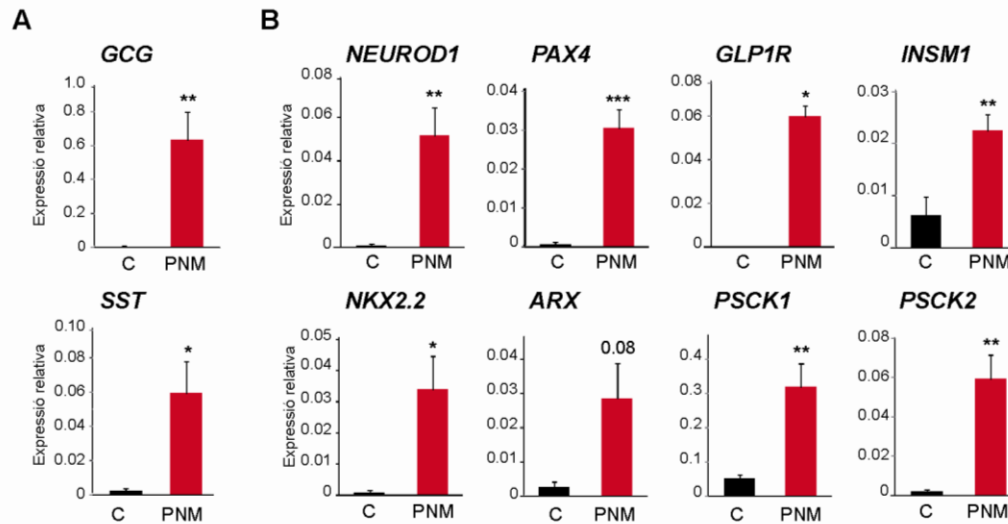


Figura 39. Efecte de PNM sobre l'expressió de marcadors endocrins a les cèl·lules HFF10.3. Les cèl·lules HFF10.3 van ser tractades amb l'adenovirus Ad-PNM durant 24h i es van cultivar durant 10 dies. **(A-B)** Es van analitzar els nivells de mRNA dels gens indicats mitjançant qRT-PCR. L'expressió dels nivells gènics són relatius a *TBP*. Mitjana \pm S.E.M de 5-12 experiments independents. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ i ***, $p < 0.001$ respecte les cèl·lules control.

Efecte del PNM sobre l'expressió dels gens específics de fibroblasts

El procés de transdiferenciació es caracteritza per la pèrdua d'expressió de gens característics de la cèl·lula original i l'activació de gens característics de la cèl·lula destí. Un cop vista l'activació de gens endocrins en resposta a PNM, vam estudiar l'expressió de marcadors fibroblàstics. Vam analitzar gens involucrats en la xarxa transcripcional fibroblàstica com *TWIST2*, *PRRX1*, *LXH9*, *FOXF2* i gens involucrats amb l'obtenció i el processament del col·lagen com *CD49a*, *CD29*, *P4H* i *COL1A1*. Com es pot observar a la Fig.40, la presència del PNM dona lloc a una baixada significativa de tots els marcadors de fibroblasts analitzats, més marcada a dia 7.

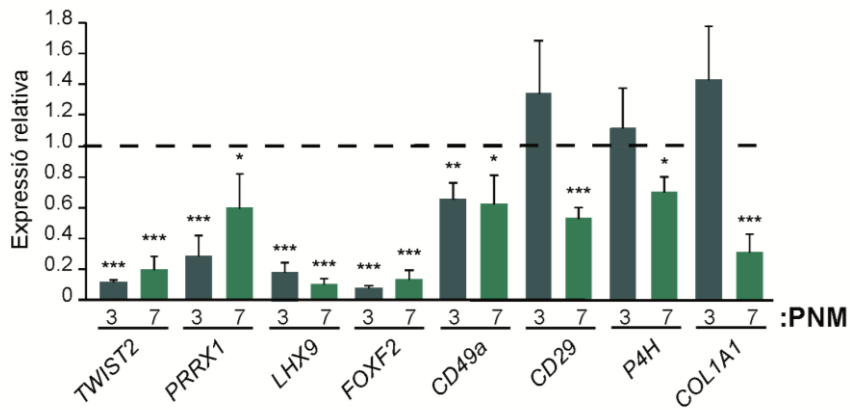


Figura 40. Efecte de PNM sobre l'expressió de gens característics de fibroblasts a les cèl·lules HFF10.3. Les cèl·lules HFF10.3 van ser infectades amb el Ad-PNM durant 24h. Als 3r o 7è dia després de la infecció es van analitzar els marcadors de fibroblasts indicats. Els nivells totals de RNA van ser extrets i es van analitzar l'expressió gènica mitjançant qPCR. L'expressió dels nivells gènics són relatius a *TBP*. Mitjanes±S.E.M de 8-10 experiments independents. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ i ***, $p < 0.001$ relatiu al control. Els valors van ser representats respecte a les cèl·lules HFF10.3 sense infectar (valor de 1 i representades per una línia discontinua).

Juntament amb aquests resultats es mostra una immunofluorescència on s'observa marcatge per la insulina (vermell) en fibroblasts infectats amb Ad-PNM juntament amb una baixada de marcatge de vimentina característic de fibroblasts (verd). Es poden identificar cèl·lules en les quals la presència d'insulina coincideix amb la disminució de vimentina. En conjunt, aquests resultats corroboren la pèrdua de trets fibroblàstics en resposta a la introducció de PNM en fibroblasts humans.

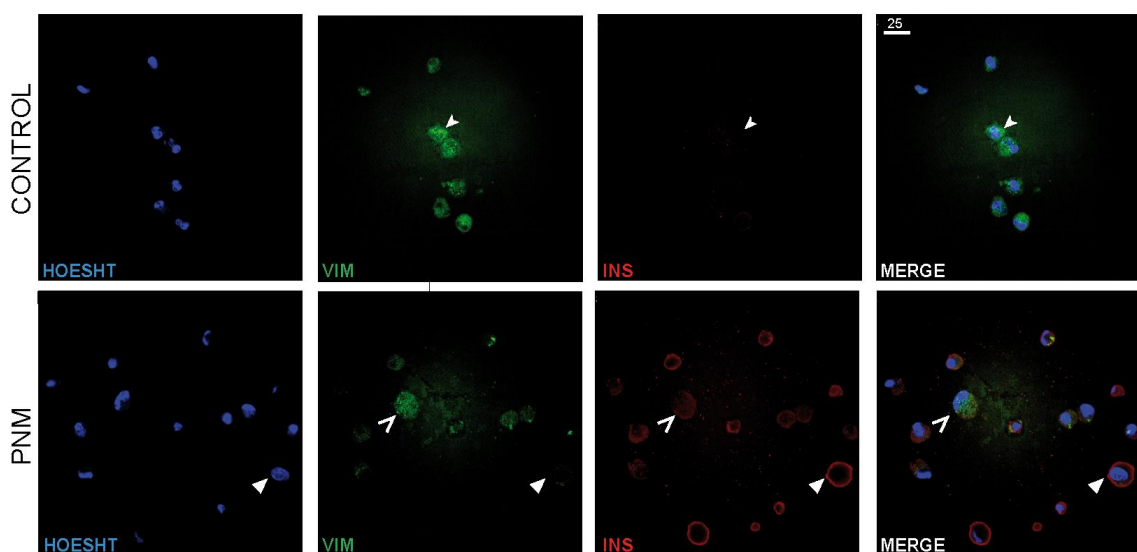


Figura 41. Anàlisi immunocitoquímica dels efectes de PNM sobre l'expressió de vimentina i insulina a les cèl·lules HFF10.3. Les cèl·lules HF10.3 van ser

infectades amb el Ad-PNM durant 24h. Als 7 dies, es va mesurar l'expressió de la vimentina (verd) i insulina (vermell) mitjançant la tinció amb anticossos específics per vimentina (VIM) i insulina (INS). Els nuclis estan tenyits amb el Hoescht (Blau). Barra d'escala: 25um

Incorporació de nous factors de transcripció en el protocol de transdiferenciació

La combinació de Pdx1, Ngn3 i MafA es va descriure inicialment com la millor combinació per promoure la transdiferenciació de cèl·lules acinars cap a la cèl·lula β *in vivo*. Posteriorment, aquesta combinació s'ha demostrat ser efectiva per convertir altres llinatges propers embriològicament cap a cèl·lula β . En canvi, a les nostres mans hem vist que aquests factors no són capaços d'activar alguns gens importants per la maduració i funció de la cèl·lula β com Nkx6-1 i Pax6 en fibroblasts humans. Ademés, el PNM dona lloc a la estimulació de gens endocrins característics de cèl·lula α (GCG+, ARX+) i cèl·lula δ (SST+) en fibroblasts. Aleshores, ens vam plantejar que, al ser un tipus cel·lular més distant, la conversió de fibroblasts cap a cèl·lula β probablement requeria l'addició de més factors de transcripció. Centrats en aquesta idea, hem investigat si l'addició de Nkx6-1, NeuroD1, Pax4 i Nkx2-2, claus en el desenvolupament de la cèl·lula β podrien millorar aquesta conversió.

Inicialment vam estudiar l'efecte d'introduir els FT Nkx6-1 i NeuroD1 a continuació de PNM. Vam observar que ambdós factors bloquejaven significativament l'activació de l'expressió d'INS en resposta a PNM en els fibroblasts humans, malgrat que aquests dos gens estan implicats tant en la diferenciació de la cèl·lula β i en el manteniment de la seva identitat (Fig.42). En el cas de Nkx6-1, hi ha una impediment pràcticament total de l'expressió d'INS que té probablement a veure amb el fet que la introducció de Nkx6-1 via adenovirus als fibroblasts provoca una alt percentatge de mort cel·lular (dades no mostrades).

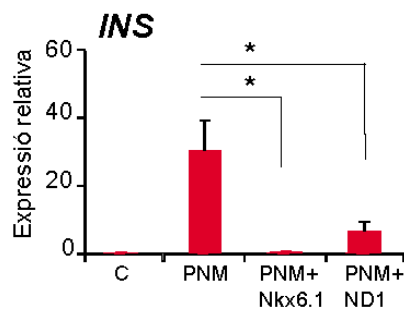


Figura 42. Efecte de la combinació de factors de transcripció sobre els nivells de mRNA d'INSULINA a les cèl·lules HFF10.3. Els fibroblasts són infectats amb adenovirus que expressen els factors de transcripció PNM, NeuroD1 i Nkx6-1. 10 dies després es recullen i s'extreu el RNA total. El mRNA es analitza per qRT-PCR. Es va expressar respecte el *TBP*. Dades obtingudes són Mitjana±S.E.M de 2-6 experiments independents. *, p<0.05; **, p<0.01 i ***,p<0.001 relatiu al PNM.

Pax4 és un gen imprescindible per la diferenciació i maduració de la cèl·lula β , i que té un paper important en promoure el destí β versus el destí α . Els resultats mostren que l'addició del factor Pax4 dos dies després d'incorporar PNM porta a un augment important dels nivells de mRNA del gen de la *INS* respecte nivells obtinguts només al incorporar PNM (Fig.43).

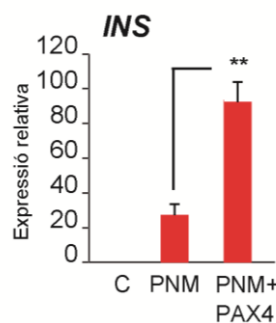


Figura 43. Estudi de l'efecte de la introducció de PNM juntament amb Pax4 a les cèl·lules HFF10.3. Les cèl·lules HFF10.3 van ser tractades amb l'adenovirus Ad-PNM durant 24h, 3 dies després es van tractar amb un adenovirus que codifica per Pax4 (Ad-Pax4) durant 8h. Passat 10 dies de cultiu van ser analitzats els nivells de mRNA dels gens indicats mitjançant qRT-PCR. L'expressió dels nivells gènics són relatius a *TBP*. Mitjana±S.E.M de 5-6 experiments independents, **, p<0.01 respecte les cèl·lules PNM.

Nkx2-2 és un factor necessari per la diferenciació endocrina i a més a més és un activador directe del gen Nkx6-1. A diferència de Nkx6-1, la introducció d'aquest FT no afectava la supervivència dels fibroblasts. En aquest cas, vam estudiar l'efecte de la seva introducció a diferents moments després de PNM. En la Fig.44 s'observen els resultats obtinguts a l'introduir el transgèn NKX2-2 en el primer, tercer i sisè dia després d'haver infectat amb l'adenovirus PNM els nostres fibroblasts. En el cas del gen de la *INS*, s'observa que NKX2-2 disminueix la seva inducció si s'afegeix el dia següent de PNM, mentre que no altera els efectes de PNM si s'introdueix al tercer i sisè dia després de PNM. D'altra banda, la presència del factor NKX2-2 dona lloc a l'activació de *NKX6-1* i de *PAX6*, a més d'un increment en l'expressió de *NEUROD1*, *MAFB* i *INSM1* i una disminució dràstica de l'expressió del *GCG*.

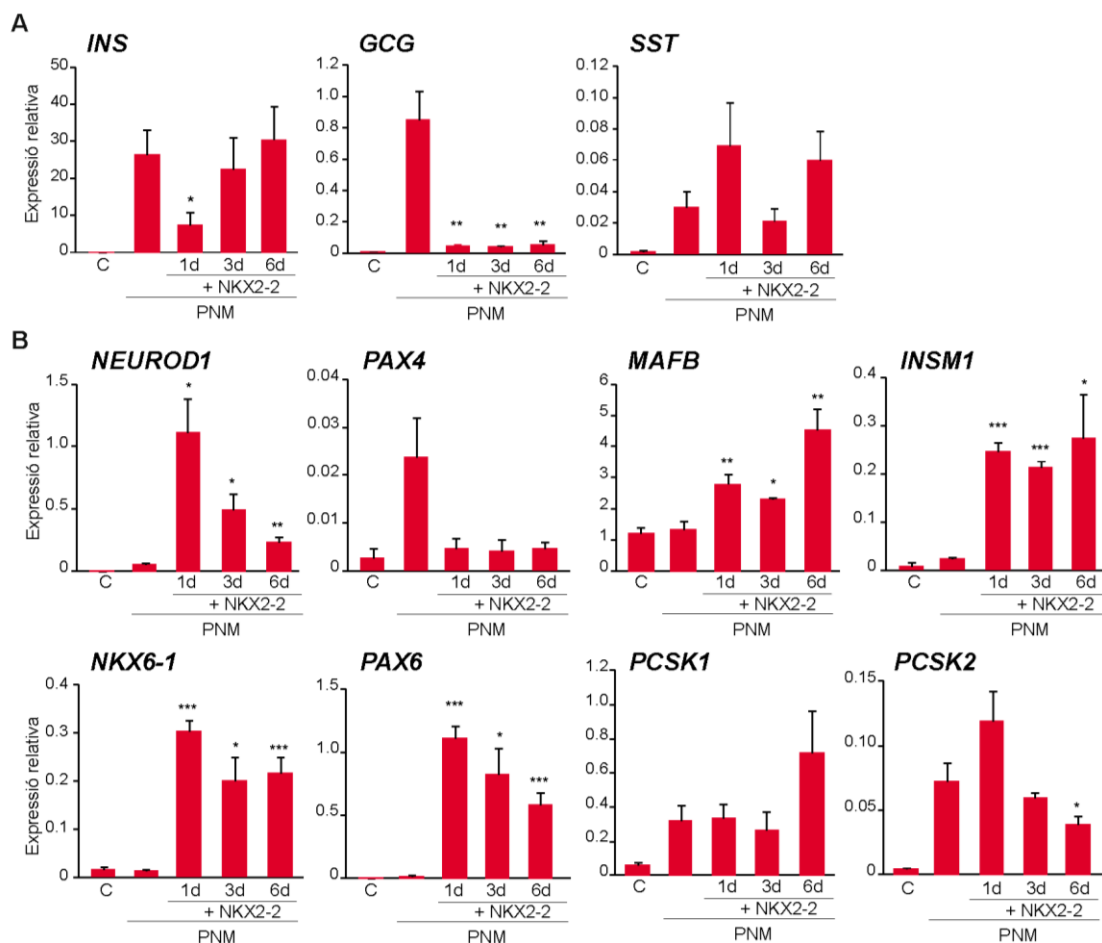


Figura 44. Estudi de l'efecte de la introducció de PNM i de NKX2-2 a diferents moments del cultiu a les cèl·lules HFF10.3. Les cèl·lules HFF10.3 són infectades, mitjançant Ad-PNM durant 24h i posteriorment són infectades mitjançant un adenovirus que codifica per NKX2-2 (NKX2-2) en els dies indicats (1-3-6 dies després de PNM). **(A-B)** Un cop passat el temps de cultiu s'extreu el RNA total i s'analitza l'expressió gènica dels marcadors endocrins mitjançant qRT-PCR. L'expressió dels nivells gènics són relatius a *TBP*. Dades obtingudes de la Mitjana±S.E.M de 6-8 experiments independents. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ i ***, $p < 0.001$ relatiu a les cèl·lules infectades amb Ad-PNM.

En conjunt, els resultats obtinguts fins el moment mostren com la introducció de Pax4 al tercer dia després d'introduir el PNM incrementa els nivells d'expressió d'*INS*, i la introducció de NKX2-2 al tercer i sisè dia dona lloc a una baixada de l'expressió del gen *GCG*, l'activació dels factors *PAX6* i *NKX6-1* i manté els nivells d'expressió d'*INS*.

En base als resultats anteriors, es va decidir utilitzar la combinació de 5 factors: PNM+Pax4+NKX2-2 en ordre seqüencial. En la Fig.45 es mostra l'expressió d'*INS*, *GCG*, *NKX6-1* i *PAX6*. Podem observar que la presència de PNM, juntament amb el factor Pax4,

millora l'expressió de les hormones *GCG* i *INS*, contràriament als resultats obtinguts amb la incorporació de *NKX2-2* després de PNM. La combinació dels 5 factors de transcripció PNM+Pax4+NKX2-2 (5FT), en aquest ordre, permet obtenir un increment de l'expressió d'*INS*, una baixada significativa de *GCG* i l'activació de factors de transcripció importants per la maduració de la cèl·lula β com *NKX6-1* i *PAX6*.

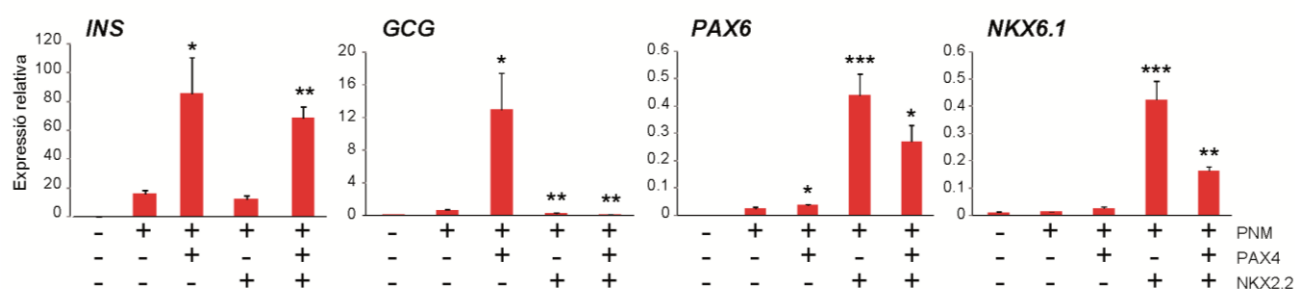


Figura 45. Efecte de la combinació dels factors PNM, Pax4 i NKX2-2 a les cèl·lules HFF10.3. Les cèl·lules HFF10.3 es van infectar amb l'adenovirus Ad-PNM durant 24h, el 3è i el 6è dia, es van tractar amb els adenovirus que codifiquen per Pax4 (PAX4) i per NKX2-2 (NKX2-2) respectivament. Als 10 dies de l'inici del protocol s'analitzen els nivells de mRNA dels gens indicats mitjançant qRT-PCR. L'expressió dels nivells gènics són relatius a *TBP*. Dades obtingudes de la Mitjana±S.E.M de 5-12 experiments independents. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ i ***, $p < 0.001$ relatiu a les cèl·lules PNM.

Finalment es va voler determinar l'efecte d'introduir els factors PNM via adenovirus independents (Fig.46). Curiosament, els resultats mostren que l'expressió d'*INS* només s'indueix quan s'introdueix Pdx1+Ngn3+MafA amb l'adenovirus que codifica alhora per aquests 3 factors de transcripció (PNM) i no si s'introdueixen els 3 factors en 3 adenovirus independents cada 24h (Pdx1+NGN3+MAFA) encara que els valors dels transgens són pràcticament iguals (valors no mostrats).

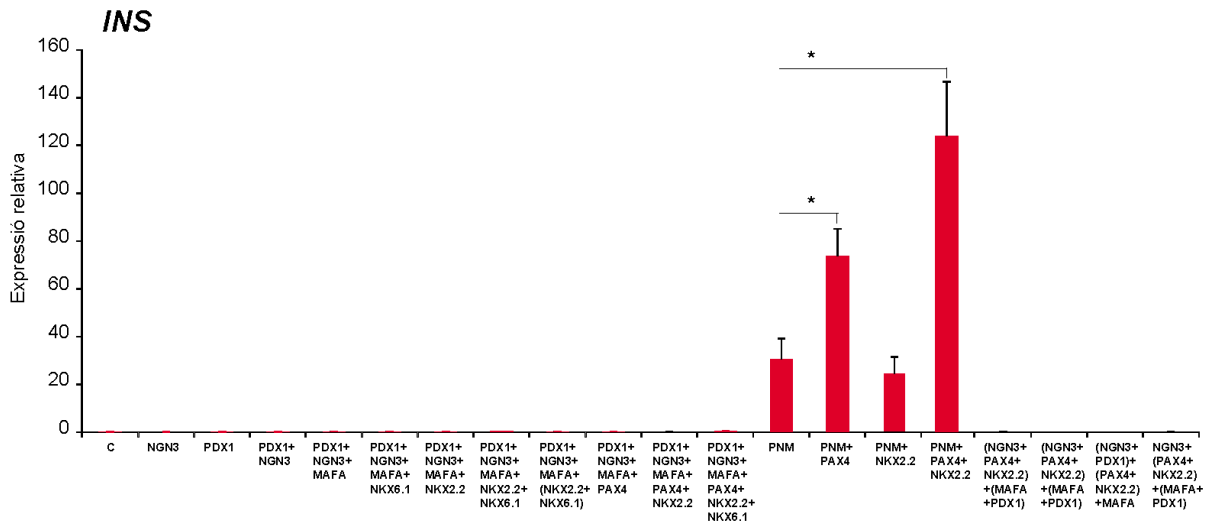
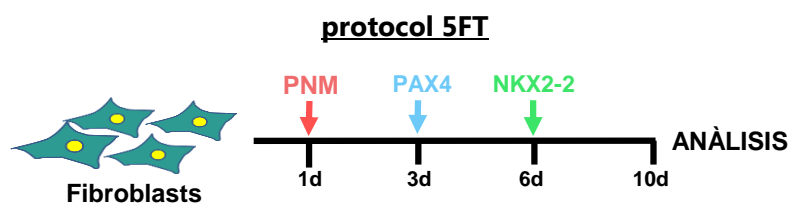


Figura 46. Efecte de la combinació de factors de transcripció sobre els nivells de mRNA d'INSULINA en les cèl·lules HFF10.3. Els fibroblasts són infectades amb els adenovirus que expressen els diferents factors de transcripció (Pdx1, NGN3, MAFA, NeuroD1, Pax4, Atoh8, NKX2-2, Nkx6-1). Els adenovirus son afegits amb un dia de diferència, excepte pels que estan afegits al mateix moment (es posen entre parèntesis). 10 dies després es recullen i s'extreu el RNA total. El mRNA es analitzat per qRT-PCR. Es va expressar respecte el *TBP*. Dades obtingudes de la Mitjana±S.E.M de 2-6 experiments independents. *, p<0.05; **, p<0.01 i ***, p<0.001 relatiu al PNM.

En base a tots els resultats anteriors s'ha optat pel protocol de transdiferenciació que consisteix en introduir PNM, al cap de tres dies Pax4 i al sisè dia NKX2-2:



Expressió de gens endocrins en fibroblasts transdiferenciats amb el protocol 5FT

Hem analitzat altres gens clau de diferenciació i característics de la cèl·lula β en les cèl·lules amb PNM i amb la combinació dels factors PNM+Pax4+NKX2-2 (5FT). S'observa un increment significatiu de l'expressió gènica de *NEUROD1*, *INSM1*, *HNFB1β*, dels receptors de

les incretines GLP1 (*GLP1R*) i GIP (*GIPR*), dels components dels canals de potassi SUR1 (*ABBC8*) i KIR6.2 (*KCNJ11*) en les cèl·lules 5FT respecte a les cèl·lules PNM (Fig.47). També es van analitzar els nivells d'expressió dels sensors de glucosa; els transportadors *GLUT1* (*SLC2A1*), *GLUT2* (*SLC2A2*) i la glucoquinasa *GCK*. En els fibroblasts s'expressa tant la *GCK* i el *GLUT1* però no el transportador *GLUT2*. En canvi, en les cèl·lules reprogramades amb PNM i els 5FT es mantenen els nivells d'expressió de la *GCK*, es veu disminuïda l'expressió de *GLUT1* respecte els fibroblasts, però no observem expressió del transportador *GLUT2* (dada no mostrada) que pot ser degut a que el transportador *GLUT2* s'expressa molt poc en cèl·lula β humana (McCulloch et al., 2011). Per altra banda, alguns dels gens activats per PNM no van exhibir diferències en les cèl·lules 5FT com *ARX* o els gen de la convertasa *PCSK1*. En canvi pel gen *PCSK2* s'observa una baixada significativa.

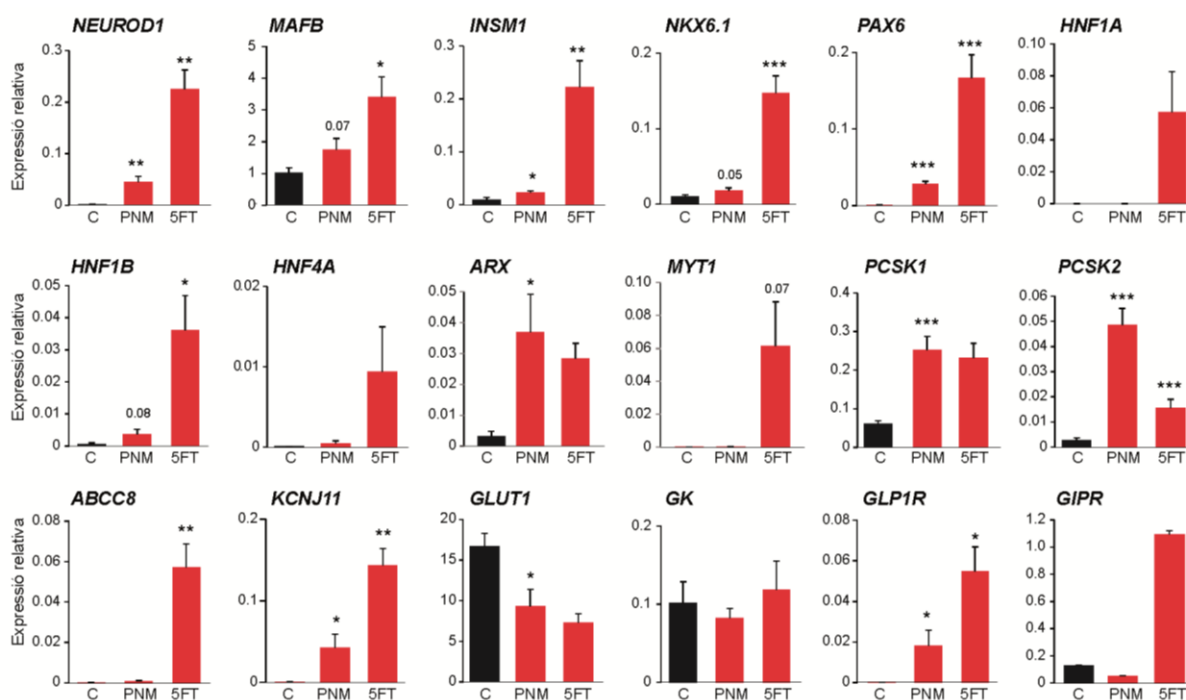


Figura 47. Efecte de la introducció de PNM, Pax4 i NKX2-2 sobre l'expressió de marcadors endocrins i específics de la cèl·lula β a les cèl·lules HFF10.3. Les cèl·lules HFF10.3 són infectades amb el Ad-PNM i els adenovirus Ad-PNM+Ad-Pax4+Ad-NKX2-2 (5FT). Un cop passat el temps de cultiu s'extreu el RNA total i s'analitza l'expressió gènica dels marcadors endocrins mitjançant qRT-PCR. Dades obtingudes de la Mitjana \pm S.E.M de 5-12 experiments independents. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ i ***, $p < 0.001$, 3FT relatiu a les cèl·lules control i les cèl·lules 5FT relatiu al 3FT.

També, es van analitzar l'expressió dels gens endògens dels transgens codificats en els adenovirus recombinats emprats per portar a terme la reprogramació. A la Fig.48 s'observa

una activació significativa dels gens *PDX1*, *NGN3*, *PAX4* i *NKX2-2* en les cèl·lules reprogramades amb el PNM i amb els 5FT. L'expressió endògena del gen *MAFA* ha sigut impossible de determinar ja que no s'ha pogut dissenyar encebadors que funcionin i ens permetin distingir entre el transcript endògen i el transgèn.

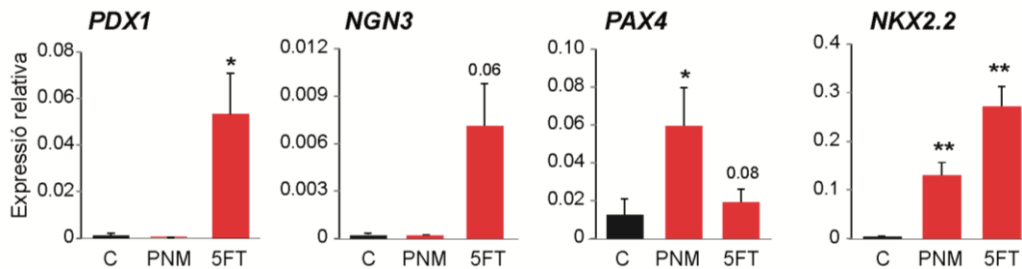


Figura 48. Efecte de la introducció de PNM, Pax4 i NKX2-2 sobre l'expressió de marcadors endocrins endògens a les cèl·lules HFF10.3. Les cèl·lules HFF10.3 són infectades amb Ad-PNM i amb els adenovirus Ad-PNM+Ad-Pax4+Ad-NKX2-2 (5FT). Un cop passat el temps de cultiu s'extreu el RNA total i s'analitza l'expressió gènica dels marcadors endògens mitjançant qRT-PCR. Dades obtingudes de la Mitjana±S.E.M de 3-5 experiments independents. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, 3FT relatiu a les cèl·lules control i les cèl·lules 5FT relatiu al 3FT.

Expressió de gens fibroblàstics en fibroblasts transdiferenciats amb el protocol 5FT

A la Fig.49 confirmem que la presència dels 5 factors de transcripció (5FT) en els fibroblasts provoca una baixada significativa de factors de transcripció de la xarxa de fibroblasts *LHX9*, *TWIST2* i *PRRX1*, com ja havíem vist anteriorment en les cèl·lules PNM.

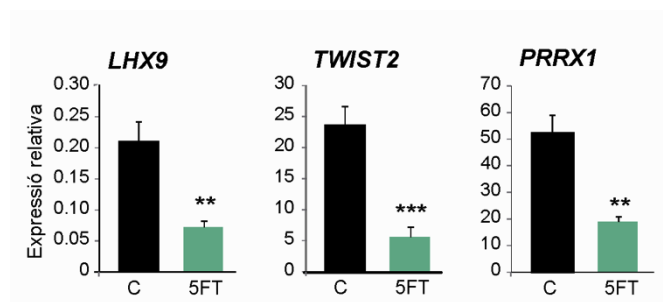


Figura 49. Efecte de la introducció de PNM, Pax4 i NKX2-2 sobre l'expressió de marcadors específics de fibroblasts a les cèl·lules HFF10.3. Les cèl·lules HFF10.3 són infectades amb Ad-PNM i amb els adenovirus Ad-PNM+Ad-Pax4+Ad-NKX2-2 (5FT). Un cop passat el temps de cultiu s'extreu el RNA total i s'analitza l'expressió gènica dels marcadors endògens mitjançant qRT-PCR. Dades

obtingudes de la Mitjana±S.E.M de 3 experiments independents. **, p<0.01 i ***, p<0.001 relatiu a les cèl·lules control.

Detecció d'insulina i de pèptid C en fibroblasts transdiferenciats amb el protocol 5FT

Abans hem vist que la incorporació dels 5 factors de transcripció PNM, Pax4 i NKX2-2 activen la màquina gènica de la cèl·lula β en els fibroblasts. Aquí hem investigat si a més a més d'induir-se el gen *INS*, el seu mRNA es tradueix a proteïna. Les cèl·lules β pancreàtiques sintetitzen la insulina en forma de preproinsulina i la processen fins a obtenir insulina i pèptid C. Per tant, també hem volgut estudiar si hi ha processament de la proinsulina. Per aquesta raó, hem realitzat immunofluorescències indirectes amb anticossos específics per insulina i per pèptid C.

A la Fig.50A s'observa el marcatge d'insulina (panell superior) i pèptid C (panell inferior) en vermell en fibroblasts (control), en cèl·lules PNM i en cèl·lules PNM+Pax4+NKX2-2 (5FT). Com és d'esperar, no observem marcatge ni de insulina ni de pèptid C en les cèl·lules control. En canvi, en les cèl·lules PNM s'observa ja un marcatge d'INS+ i PÈPTID C+ en algunes cèl·lules del cultiu i aquest es veu incrementat en les cèl·lules on s'ha introduït PNM+Pax4+NKX2-2. La insulina i el pèptid C tenen un perfil d'expressió similar que concorda, ja que s'alliberen de manera equitativa. També vam quantificar el contingut d'insulina i de pèptid C mitjançant ELISA (Fig.50B).

Finalment, vam calcular el percentatge de cèl·lules insulino-positives generades amb el protocol dels 5FT. Així vam procedir al comptatge manual de cèl·lules marcades amb l'anticòs d'insulina mitjançant immunofluorescència (Fig.50C). Els resultats mostren que el 68% de cèl·lules són INS+ respecte del total de les cèl·lules analitzades.

A

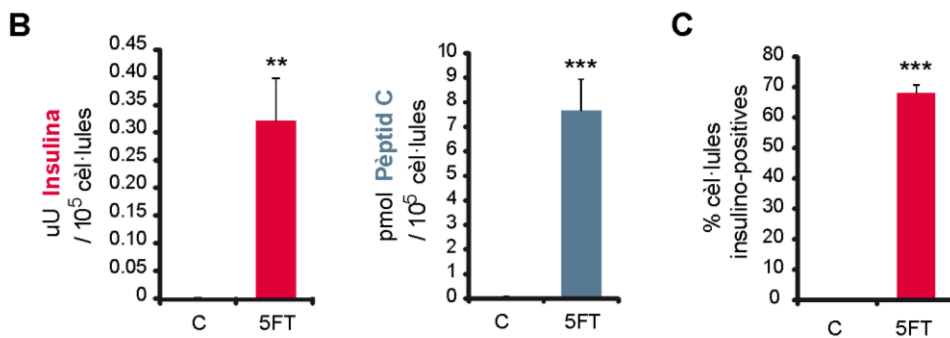
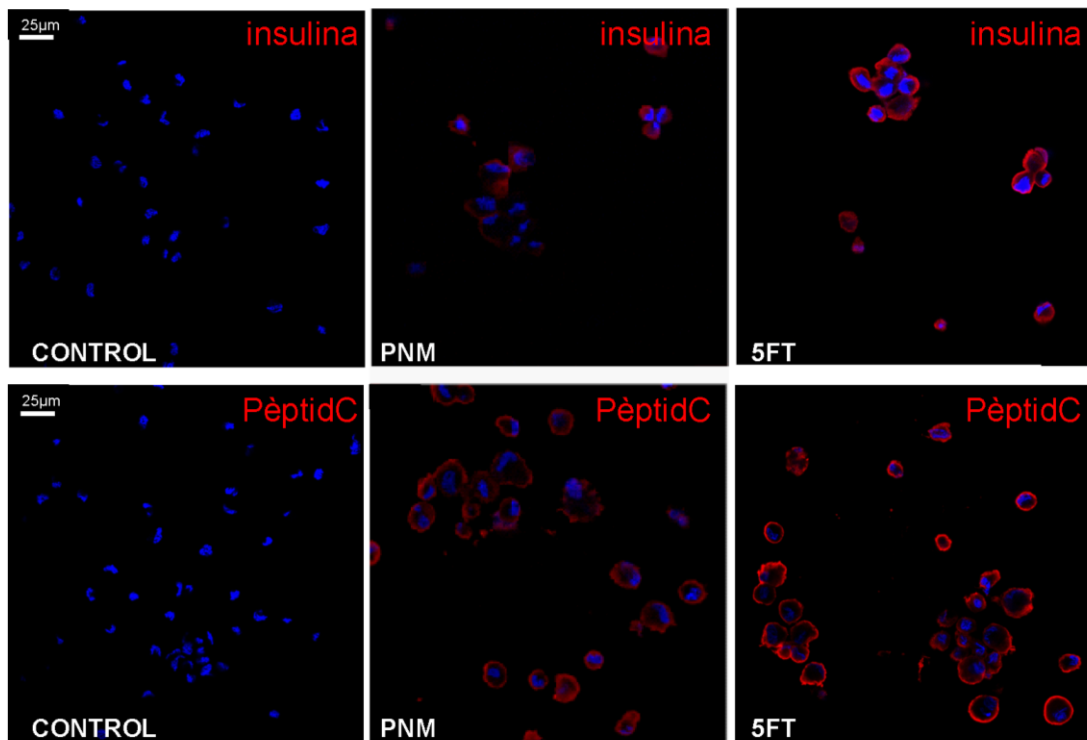


Figura 50. Anàlisi de l'expressió d'insulina i pèptid C a les cèl·lules reprogramades amb els 5FT. Les cèl·lules HFF10.3 són infectades amb els adenovirus que codifiquen per PNM i per Pax4 i NKX2-2 (5FT). **(A)** Tinció amb anticossos específics per insulina i pèptid C (vermell) i els nuclis es van tenir amb el Hoescht (blau). Barra d'escala: 25 μm. **(B)** Es determina el contingut d'insulina i pèptid C de les cèl·lules Fibro-β *in vitro*. Mitjana±S.E.M de 6-7 experiments, 2-3 replicats, cada replicat normalitzat per 100.000 cells. L'anàlisi es va realitzar amb el kit d'ELISA Insulina humana (Crystal Chem) i amb el kit d'ELISA pèptid C humana (Mercodia). **(C)** Percentatge de cèl·lules insulino-positives en les cèl·lules reprogramades amb els 5FT. Es va fer el comptatge de les cèl·lules marcades per insulina i es va calcular respecte del total de cèl·lules contades. Mitjana del comptatge de 1.500 cèl·lules en 3 experiments, 2 replicats per cada experiment.

VALIDACIÓ DEL PROTOCOL 5FT EN FIBROBLASTS DE DIFERENTS ORIGENS

A continuació, vam comprovar si el protocol de transdiferenciació posat a punt amb els fibroblasts HFF10.3 funcionava també en una segona línia de fibroblasts primaris HFF (ATCC) (Fig.51). Els resultats mostren que la introducció dels 5FTs activa el gen de la *INS*, els gens de *NKX6-1* i *PAX6* i s'observa una baixada en l'expressió de *GCG* com s'havia vist anteriorment.

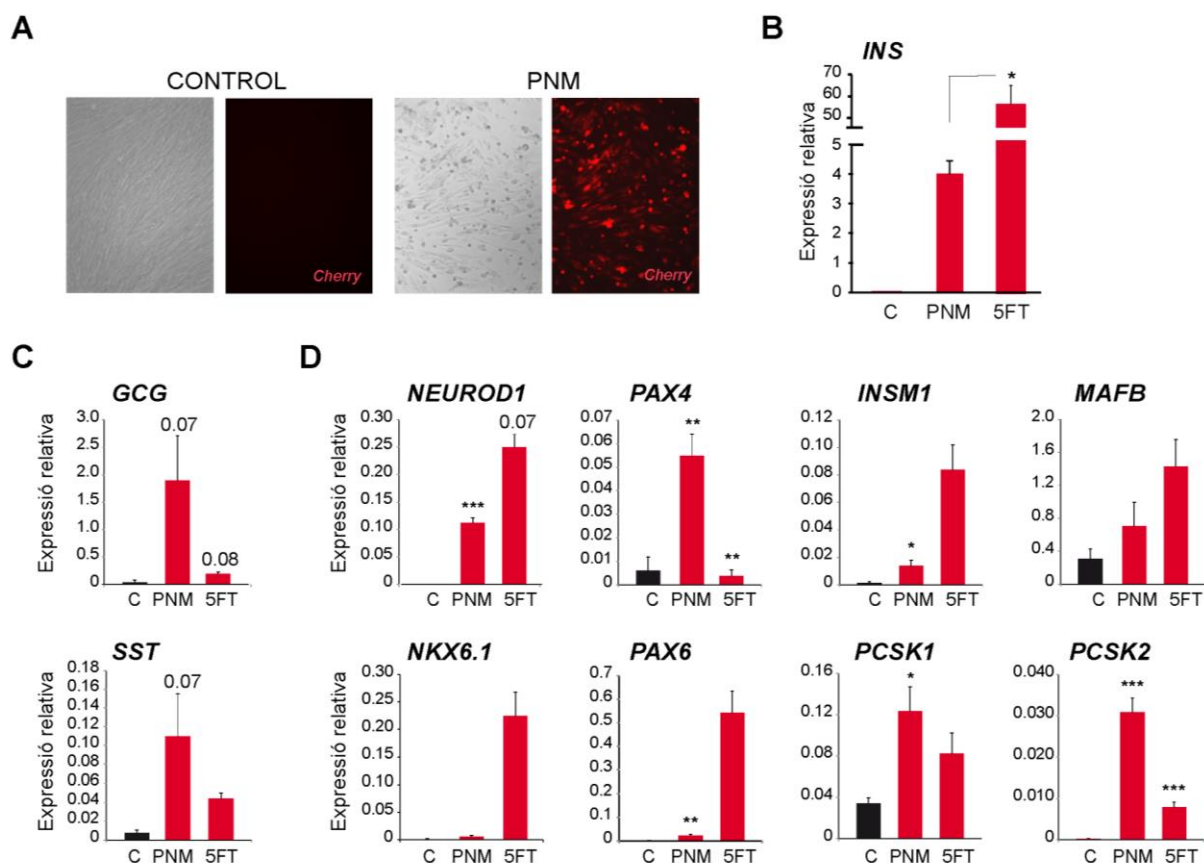


Figura 51. Efectes de la introducció de PNM, Pax4 i NKX2-2 en fibroblasts control. (A) Les cèl·lules HFF-ATCC són infectades amb els adenovirus que codifiquen per PNM o/i per Pax4 i NKX2-2 (5FT). (A) Es visualitza la proteïna cherry mitjançant microscòpia de fluorescència. (B-D) Anàlisi de l'expressió de marcadors endocrins. El RNA total va ser extret i l'expressió gènica va ser analitzada per qPCR. Els nivells de mRNA són expressats respecte TBP. Les dades són Mitjanes±SEM per 2-6 experiments independents; *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$ relatiu a les cèl·lules control per les cèl·lules PNM i relatiu a les cèl·lules PNM per les cèl·lules PNM+Pax4+NKX2-2 (5FT).

De la mateixa manera, vam comprovar el protocol en fibroblasts HDF13.1 obtinguts a partir d'una biòpsia de pell de l'avantbraç d'un pacient diabètic (Fig.52). En la Fig.52B s'observa el marcatge d'insulina i de peptid C en les cèl·lules reprogramades amb el PNM.

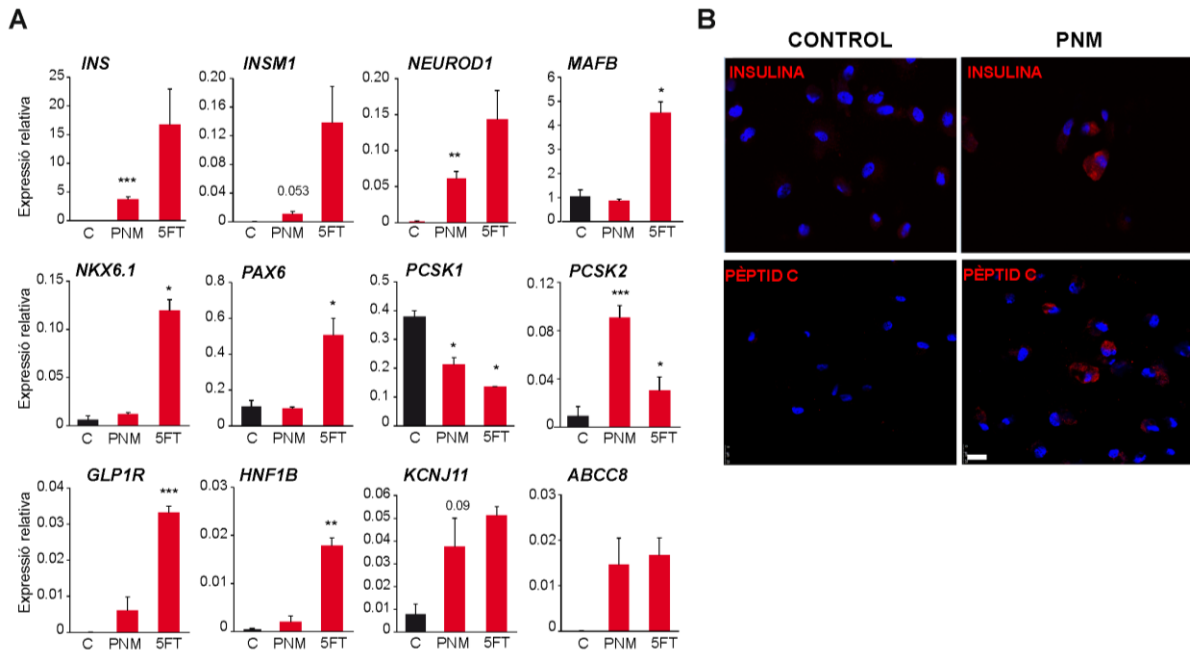


Figura 52. Efectes de la introducció de PNM, Pax4 i NKX2-2 en les cèl·lules procedents de pacient diabètic HDF1.13. Els fibroblasts van ser infectades amb Ad-PNM i amb dos adenovirus que codifiquen per Pax4 i NKX2-2 (5FT) independentment i van ser cultivades durant 10 dies. **(A)** Anàlisi de l'expressió de marcadors endocrins i específics de cèl·lula β . El RNA total va ser extret i l'expressió gènica va ser analitzada per qPCR. Els nivells de mRNA són expressats respecte TBP. Les dades són Mitjanes \pm SEM per 3-7 experiments independents; *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$ relatiu a les cèl·lules control per les cèl·lules PNM i relatiu a les cèl·lules PNM per les cèl·lules PNM+Pax4+NKX2-2. **(B)** S'analitza el marcatge d'insulina i pèptid C per immunofluorescència. Hoescht marca els nuclis cel·lulars. Barra 25 μ m.

Per tal de facilitar la lectura, en la resta de la tesi ens referirem als fibroblasts transdiferenciats amb els 5 FTs com a cèl·lules Fibro- β .

VIABILITAT DE LES CELULES FIBRO- β

Els processos de diferenciació i de proliferació cel·lular són sovint excloients. En aquest sentit, s'ha descrit que una alta proliferació implica una baixa eficiència de protocols de reprogramació i el contrari (Ruijtenberg et al., 2016). Hem estudiat la proliferació mitjançant assajos d'incorporació del BrDU i observem una davallada molt significativa ja a dia 1 del protocol (24h després de la introducció de PNM) en fibroblasts reprogramats en comparació amb fibroblasts control sense tractar (Fig.53D). Aquests resultats són esperables doncs se sap

que Ngn3 actua com a promotor de la sortida del cicle cel·lular en progenitors endocrins (Krentz et al., 2017; Miyatsuka et al., 2011).

També hem realitzat assajos colorimètrics de MTT que ens permeten mesurar l'activitat metabòlica cel·lular i són indicatius de la viabilitat cel·lular. Veiem que a dia 1, hi ha una reducció molt modesta però significativa però que no és fins a dia 10 del protocol on veiem els canvis més importants (Fig.53C). Un valor baix en un assaig MTT pot representar una menor viabilitat cel·lular i/o un menor nombre de cèl·lules. L'observació prèvia de disminució de proliferació ens fa pensar que a dia 10 el valor obtingut a l'assaig MTT tingui a veure sobretot amb la segona possibilitat. Hem determinat les corbes de creixement dels fibroblasts i corroborem que un cop iniciat el protocol de reprogramació aquests deixen de créixer i, de fet, el nombre de cèl·lules al final del protocol (10 dies) és menor que a dia 0 (Fig.53A).

Els resultats de creixement cel·lular suggereixen l'existència de mort cel·lular en els cultius de fibroblasts reprogramats. Hem analitzat marcadors gènics de l'estrès del reticle endoplasmàtic com *CHOP*, *PERK* i *ATF6* (Fig.45A), un marcador pro-apoptòtic *BAX* i un marcador anti-apoptòtic com *BCL2* en el dia 10 (Fig.53E-F). En la realització d'aquests experiments vam utilitzar un activador de l'estrès del reticle endoplasmàtic, Thapsigargin (TGH), com a control positiu. No s'observen canvis significatius d'estrès ni del marcador pro-apoptòtic Bax entre els fibroblasts i les cèl·lules reprogramades. En canvi, podem veure una tendència a disminuir del marcador anti-apoptòtic *BCL2*. En conjunt, no es veuen alteracions gèniques molts evidents a dia 10. Per aquesta raó, vam decidir estudiar l'apoptosi cel·lular en dies anteriors. Així, vam assajar l'activació de la via extrínseca iniciada per la caspasa8 (Fig.53B) i corroborem un augment significatiu a dia 3. En canvi, a dia 10, no s'observa aquest increment.

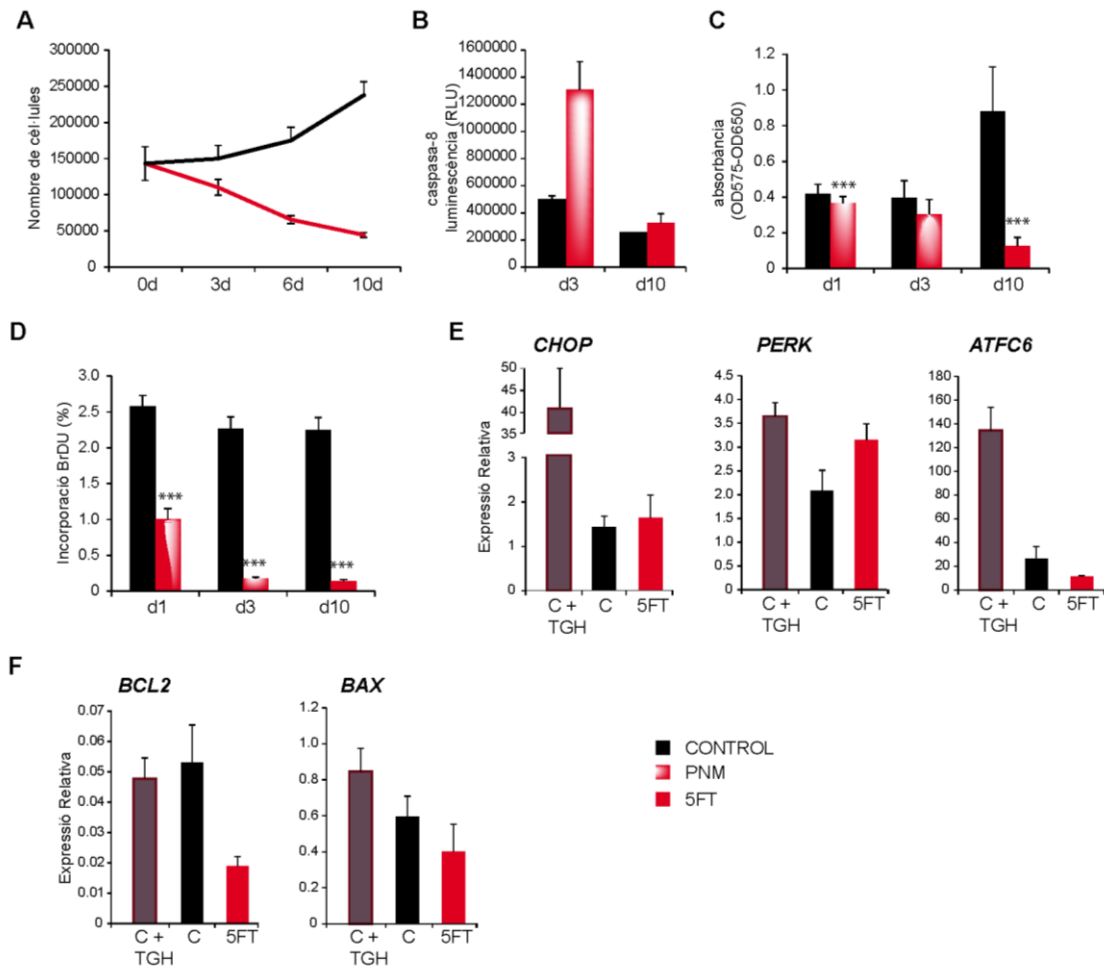


Figura 53. Estudi de la viabilitat de les cèl·lules Fibro- β . Les cèl·lules HFF10.3 són infectades amb els adenovirus que codifiquen pel PNM o pels 5FT (PNM+Pax4+NKX2-2) i es mantenen en cultiu durant 10 dies. **(A)** les cèl·lules van ser comptades emprant l'aparell Countess d'invitrogen (n=3 exp. independents, 6 replicats per exp). Es realitzen assajos de mort cel·lular mitjançant **(B)** la detecció de Caspasa8 per Luciferasa (n=2 exp diferents). Es realitzen estudis de proliferació i viabilitat cel·lular mitjançant **(C)** assaig de BrdU i **(D)** de MTT realitzat els dies indicats. Valors obtingut de la mitjana de 3-4 experiments independents amb 8 replicats cada un. **(E-F)** Anàlisi de l'expressió gènica dels marcadors d'estrès i d'apoptosi. Un cop passat el temps de cultiu s'extreu el RNA total i es realitza una qRT-PCR. Dades obtingudes de la Mitjana \pm S.E.M de 3-5 experiments independents. Control positiu d'estrès del reticle endoplasmàtic: tapsigargin (Tgh) a una concentració de 1 μ mol/L.

CARIOTIP DE LES CÈL·LULES FIBRO- β

Per tal de fer un anàlisi de possibles aberracions cromosòmiques de les cèl·lules Fibro- β com a conseqüència del protocol de transdiferenciació, es va estudiar el seu patró cromosòmic. El cariotip obtingut confirma que el protocol dissenyat, on s'utilitzen diferents adenovirus

recombinants per introduir els factors de transcripció, no altera l'estructura dels cromosomes en les cèl·lules Fibro- β generades com s'observa en la Fig.54.

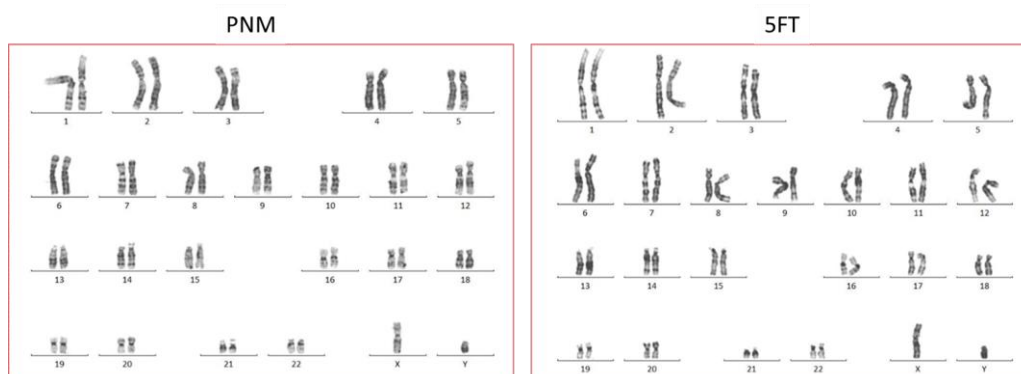


Figura 54. Representació del cariotip obtingut en els fibroblasts transdiferenciats. Les cèl·lules HFF10.3 són infectades amb els adenovirus que codifiquen pel PNM o pels 5FT (PNM+Pax4+NKX2-2) i es mantenen en cultiu durant 10 dies. El cariotip és realitzat per Anna Soler (Centre de Diagnòstic Biomèdic-Hospital Clínic).

EXPRESSIÓ DE GENS ENDOCRINS A LES CÈL·LULES FIBRO- β A LLARG TERMINI

La utilització d'adenovirus recombinants com a vehicles de reprogramació implica que l'expressió dels transgens és transitòria. Hem analitzat si l'expressió dels transgens Pdx1, Ngn3 i MafA es manté 21 dies després de l'inici del protocol i, sorprenentment, hi ha expressió romanent dels tres gens malgrat ser una mica més baixa que a dia 10 (Fig.55A). També, es va analitzar els marcadors específics de fibroblasts (*TWIST2*, *LHX9* i *PPRX1*) i s'observa en la Fig.55B com els nivells d'expressió de *LHX9* incrementa en el dia 21 respecte el dia 10 de cultiu fet que no s'observa en els marcadors *TWIST* i *PPRX1*. Quant a gens endocrins, es veu una tendència a una modesta davallada de l'expressió d'alguns d'ells com la *INS*, *NEUROD1* i *INSM1*. En canvi l'expressió gènica d'altres gens com *NKX6-1*, *PAX6*, *PCSK1* i *PCSK2* es manté i fins i tot té una tendència a incrementar. Un cas a part és el gen del GCG l'expressió del qual pràcticament és indetectable a dia 21.

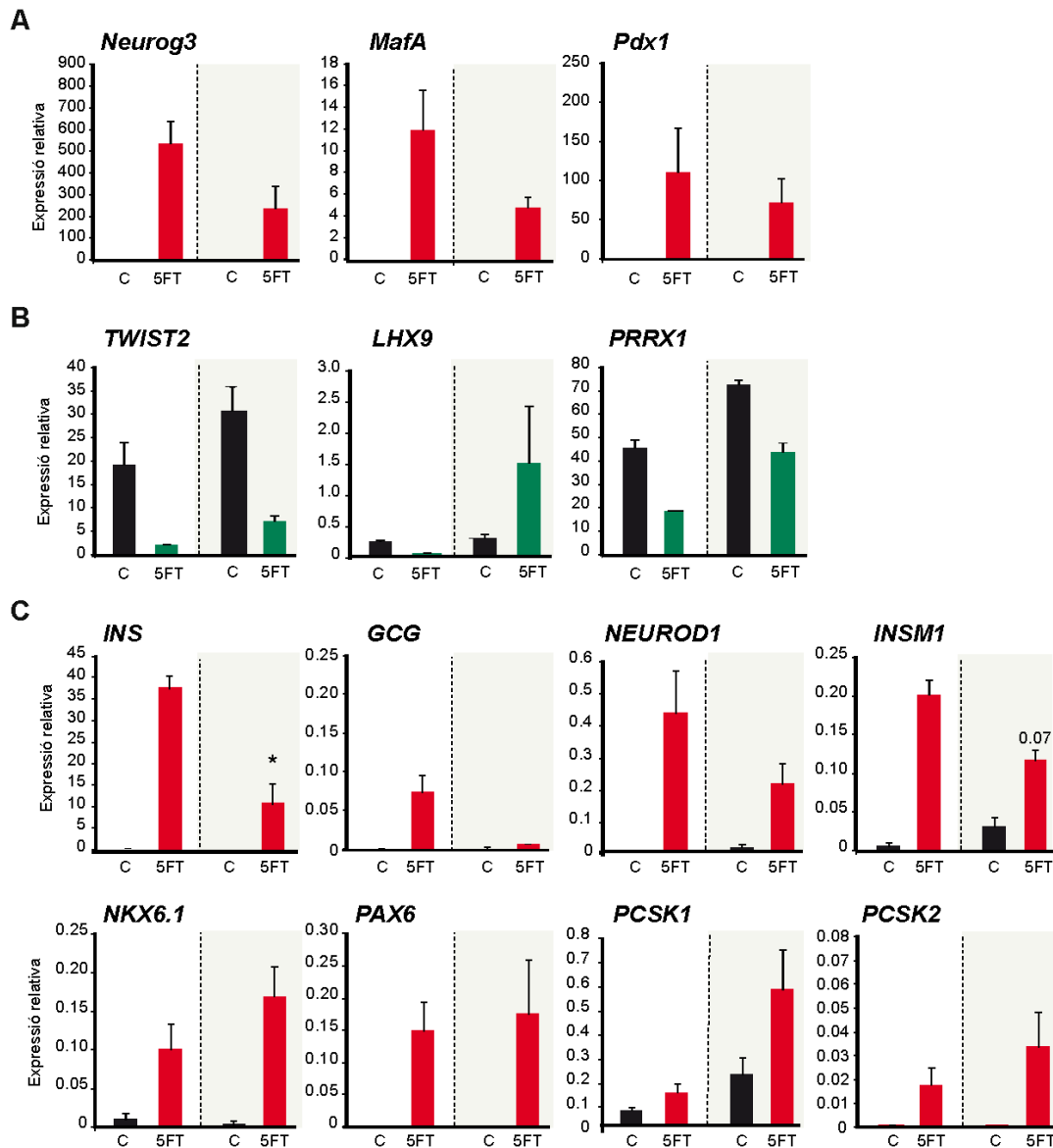


Figura 55. Efectes de la introducció de PNM, Pax4 i NKX2-2 als 21 de cultiu a les cèl·lules HFF10.3. Les cèl·lules HFF10.3 són infectades amb els adenovirus que codifiquen per PNM i per Pax4 i NKX2-2 (5FT) i es mantenen en cultiu durant 10 dies i 21 dies (panell verdos). Un cop passat el temps de cultiu es recullen i s'extreu el RNA total. El mRNA és analitzat per real time PCR. Dades obtingudes de la Mitjana±S.E.M de 3-5 experiments independents. *, p < 0.05; **, p < 0.01 i ***, p < 0.001 relatiu a les cèl·lules control amb la mateixa condició a dia 10.

SECRECIÓ D'INSULINA DE LES CÈL·LULES FIBRO-β

La funció principal d'una cèl·lula β és secretar insulina de manera regulada enfront als canvis de glucosa en sang. Per aquest motiu, després de l'anàlisi molecular, vam voler investigar la capacitat insulino-secretora de les cèl·lules Fibro-β. Per una banda, vam quantificar la secreció

d'insulina i de pèptid C en presència de 2mM glucosa, que és una concentració no estimuladora, i vam detectar secreció d'ambdós al medi (Fig.56A-B). Després vam analitzar la resposta a 20mM de glucosa. A la Fig.56C, es mostra la mitja i els valors individuals del quocient de resposta secretora (20 mM glucosa/2 mM glucosa). En general, veiem que la resposta és molt modesta a excepció de 3 experiments on és igual o superior a 2. Desconeixem la causa de la variabilitat de resposta entre reprogramacions doncs no la podem associar a cap factor tècnic clar (Fig.56C).

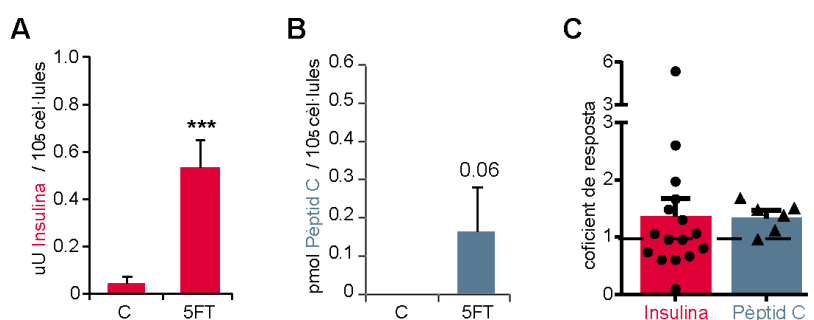


Figura 56. Determinació de la secreció d'insulina i pèptid C de les cèl·lules Fibro- β *in vitro*. Les cèl·lules HFF10.3 són infectades amb els adenovirus que codifiquen per PNM, Pax4 i NKX2-2 (5FT) i es mantenen en cultiu durant 10 dies. Es va determinar la secreció d'insulina i pèptid C estimulada per glucosa en les cèl·lules control i les cèl·lules 5FT per una incubació seqüencial de concentració de glucosa baixa (2mM) i alta (22mM) *in vitro*. Secreció basal **(A)** d'insulina i **(B)** de pèptid C de les cèl·lules Fibro- β *in vitro* (2 mM de glucosa). **(C)** Coeficient de resposta de les cèl·lules Fibro- β en resposta a 20mM de glucosa *in vitro*. Mitjana \pm S.E.M de 6-7 experiments, 2-3 replicats, cada replicat normalitzat per 100.000 cèl·lules. El anàlisi es va realitzar amb el kit d'ELISA Insulina humana (Crystal Chem) i amb el kit d'ELISA pèptid C humana (Mercodia).

FLUX DE CALCI EN LES CÈL·LULES FIBRO- β

Els canvis en les concentracions de glucosa en el medi provoquen la despolarització de la membrana, que condueix a l'entrada de ions de calci a la cèl·lula β , fet que desencadena la exocitosi d'insulina. En canvi, els fibroblasts són cèl·lules no elèctricament excitable.

En la Fig.57A, es mostren el perfil de flux de calci en una cèl·lula β humana (extret i modificat de Gwiazda, Yang, Lin, & Johnson, 2009). Com es pot observar, hi ha un augment de calci citosòlic en resposta a glucosa, el despolaritzador de la membrana KCl. En la Fig. 57B, vam monitoritzar el flux de calci utilitzant un fluorocrom permeable que s'uneix a aquest ió (Fluor4-AM) a temps real mitjançant microscòpia confocal. En primer lloc, vam monitoritzar

cèl·lules Min6 (línia cèl·lular β pancreàtica). Un cop les cèl·lules Min6 estaven carregades amb aquest fluoròfor, es va estudiar els canvis en fluorescència en resposta a 22mM de glucosa i a 30mM de KCl. Aquest mètode ens va permetre analitzar el flux de calci de la població i més concretament de cèl·lules aïllades. Podem observar, diferents respostes de flux de calci en cèl·lula individuals.

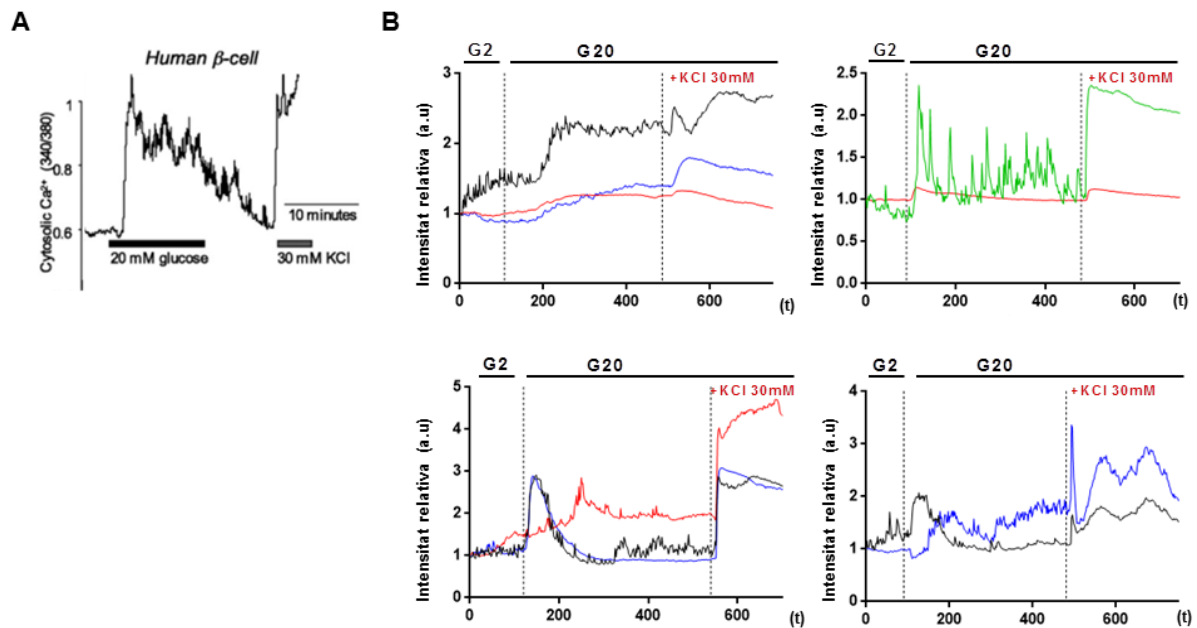


Figura 57. Perfils del flux de calci en cèl·lules β . Es va determinar el flux de calci mitjançant el fluorocrom Fluor4AM. Imatges representatives del flux de calci **(A)** de cèl·lula β humana (extret i modificat de Gwiazda, Yang, Lin, & Johnson, 2009) i **(B)** de cèl·lules Min6 (cada color correspon a una cèl·lula analitzada).

Amb la mateixa tècnica vam monitoritzar el flux de calci a les cèl·lules fibroblàstiques i les cèl·lules Fibro- β . En la gràfica següent s'observa en el panell A perfils de flux de calci de 6 cèl·lules Fibro- β . En el panell B es mostra, el perfil del flux de calci de 6 fibroblasts. Com podem observar, el perfil de flux de calci en un fibroblast és manté constant durant l'experiment. En canvi, en les cèl·lules Fibro- β generades, obtenim diferents perfils cel·lulars de flux de calci. Sorprenentment, l'anàlisi individuals demostren que existeixen diferents respostes a la captació de glucosa a la cèl·lula. Aquesta dada demostra que la població de cèl·lules Fibro- β obtingudes té diferents perfils cel·lulars, dels quals hi ha un 35% de les cèl·lules analitzades que no responen a glucosa ni a KCl. En canvi, la resta de cèl·lules Fibro- β respon a glucosa i a KCl (35%), només a glucosa (3%) o només a KCl (27%).

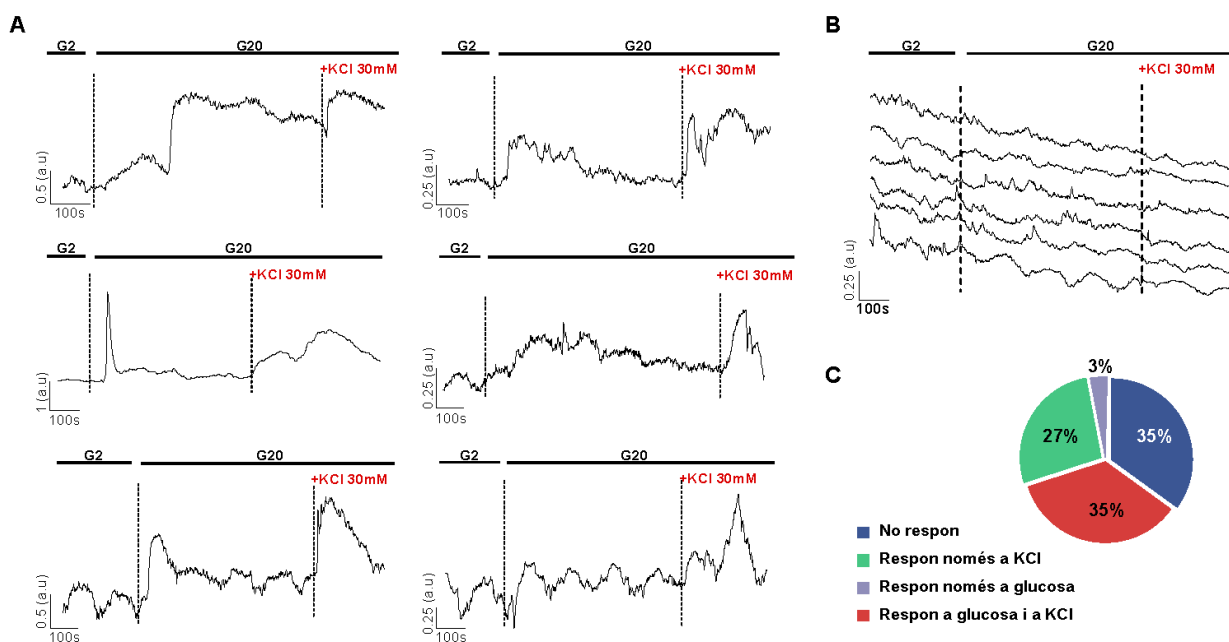


Figura 58. Determinació del flux de calci en les cèl·lules Fibro- β . Es va determinar el flux de calci mitjançant el fluorocrom Fluor4AM. Imatges representatives del flux de calci de **(A)** 6 cèl·lules Fibro- β i de **(B)** 6 cèl·lules fibroblastiques. **(C)** Imatge representativa del percentatge de cèl·lules amb els diferents nivells de resposta. S'han analitzat unes 400 cèl·lules de 6 experiments diferents.

SECRECIÓ D'INSULINA DE LES CÈL·LULES FIBRO- β *IN VIVO*

L'objectiu final d'obtenir cèl·lules productores d'insulina en el laboratori és que aquestes puguin funcionar en un organisme viu. Per aquest motiu, el següent abordatge experimental és el trasplantament de les cèl·lules Fibro- β en ratolins. Com a soca receptora hem fet servir ratolins immunodeprimits Nude, de 8 a 14 setmanes, els quals no tenen timus i, per tant, no tenen limfòcits T. La nostra primera aproximació va ser trasplantar entre 4 i 5 milions de cèl·lules sota la càpsula renal com havien fet Pegliuca i col·laboradors (Pegliuca et al., 2014). Dues setmanes després, se'ls va administrar intraperitonealment un bolus de glucosa i es va recollir sang de la vena safena en el temps 0 (t0) i 30 (t30) minuts després. Es va determinar la insulina humana circulant i es va recuperar l'empelt dels últims trasplantaments. Es detecta insulina humana en el plasma de 3 dels 9 animals trasplantats (33%). I en aquests animals, aquesta detecció és únicament als 30 minuts de la càrrega de glucosa, suggerint que les cèl·lules Fibro- β trasplantades en aquests tres animals responen als canvis de glucosa en sang.

Curiosament, l'anàlisi d'immunofluorescència dels empelts HU12G i HU12H, s'aprecia detecció d'insulina en cèl·lules amb distribució dispersa en el teixit analitzat. En canvi, aquests empelts provenen de ratolins on no s'ha observat insulina humana circulant després del bolus de glucosa. Per contra, en l'empelt HU12E no s'ha detectat insulina.

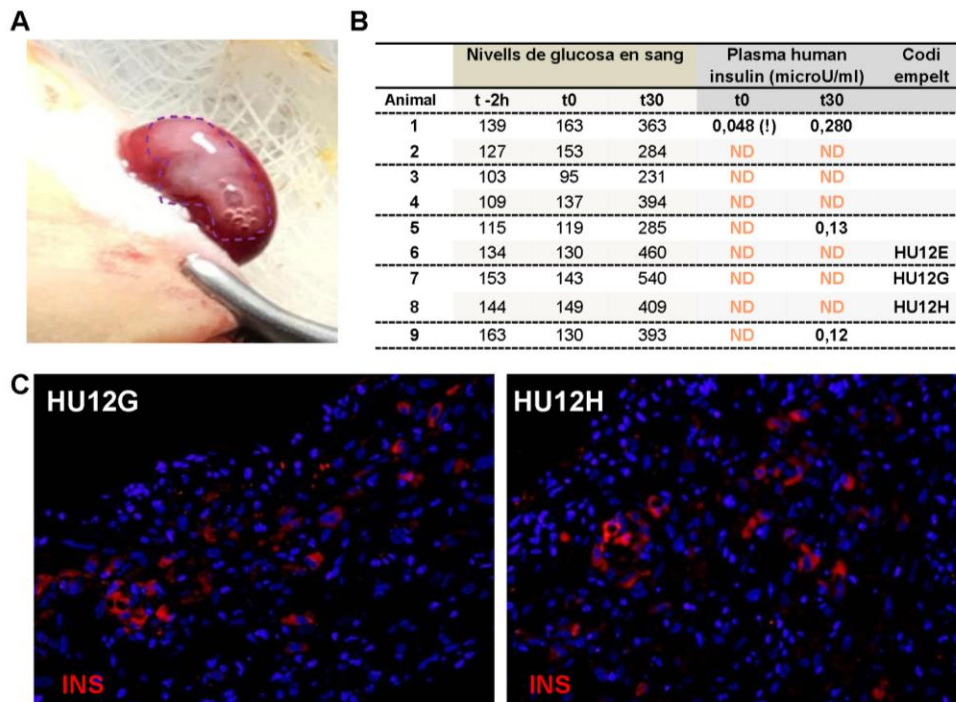


Figura 59. Determinació de la secreció de les cèl·lules Fibro- β *in vivo*. Es van trasplantar aproximadament 5 milions de cèl·lules Fibro- β en ratolins NUDE de 8-14 setmanes. **(A)** Imatge de les cèl·lules Fibro- β trasplantades sota la càpside renal el dia del trasplant. **(B)** 2 setmanes després del trasplantament, es sotmeten els animals a un bolus de glucosa, es recull sang a temps 0 i 30 minuts i es determina la insulina humana en plasma (Kit Ultrasensitive Human Insulin ELISA-Mercodia). Es recupera l'empelt d'alguns trasplantaments. **(C)** Es realitza un marcatge d'insulina mitjançant una immunofluorescència.

ESTRATÈGIES PER MILLORAR LA TRANSDIFERENCIACIÓ DE FIBROBLASTS HUMANS

El protocol de transdiferenciació utilitzat en tots els experiments anteriors està basat en la introducció seqüencial de 5 factors de transcripció. Aquí hem volgut avaluar estratègies addicionals que ens permetin optimitzar aquest protocol. Per aquesta raó, hem estudiat si l'addició d'inhibidors epigenètics (inhibidors d'Ezh2), molècules solubles implicades en

nombroses vies de senyalització o la formació d'estructures tridimensionals poden millorar els resultats obtinguts fins el moment.

Addició d'inhibidors epigenètics

Els resultats obtinguts en la primera part de la tesi ens van portar a investigar si la inhibició de la metiltransferasa Ezh2, mitjançant l'inhibidor EI-1, pot millorar la transdiferenciació de les cèl·lules generades fins el moment. En primer lloc vam estudiar el millor moment per fer el tractament amb l'inhibidor EI-1, i millorar l'expressió d'*INS*. Els resultats mostren que la inhibició de la metiltransferasa Ezh2 el sisè dia, després d'introduir PNM als fibroblasts dóna lloc a una millora significativa de l'expressió d'insulina que no succeeix si es realitza l'inhibició abans (Fig. 60A).

Quan comparem els dos protocols realitzats amb el PNM o els 5FT de transcripció incorporant l'inhibidor el 6è dia de protocol observem que hi ha un increment significatiu de l'expressió d'*INS* (Fig. 60D).

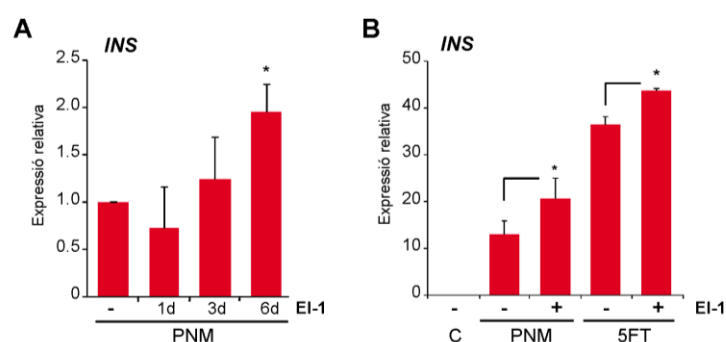


Figura 60. Efectes de la inhibició d'Ezh2 sobre la introducció del PNM, Pax4 i NKX2-2 en els fibroblasts. (A) Les cèl·lules HFF10.3 són infectades amb Ad-PNM i posteriorment tractades amb 25µM d'EI-1 en els dies indicats. **(B)** Les cèl·lules HFF10.3 són infectades amb els adenovirus recombinants indicats i posteriorment tractades amb 25µM d'EI-1. Un cop passat el temps de cultiu es van recollir i es van extreure el RNA total. El mRNA es va analitzar per real time PCR. Dades obtingudes de la Mitjana±S.E.M de 3-5 experiments independents. *, p<0.05; relatiu al PNM no tractat amb l'inhibidor.

Addició de reguladors de vies de senyalització intracel·lular

Se sap que certes molècules solubles que modulen vies de senyalització cel·lulars milloren la formació i/o maduració de les cèl·lules productores d'insulina en protocols de diferenciació dirigida a partir de cèl·lules pluripotents. Vam voler estudiar l'efecte d'algunes d'aquestes

molècules en el nostre protocol de reprogramació directa. Concretament hem utilitzat: GABA (Ben-Othman et al., 2017), Exendina-4 (Bai, 2005; Khorsandi et al., 2016), Forskolina (Kunisada et al., 2012) i Nicotinamida (Kunisada et al., 2012; Yang et al., 2015).

Després de moltes combinacions de tractaments (dades no mostrades) els millors resultats i que són els que presentem en aquesta tesi és l'addició de Forskolina i Nicotinamida després de la introducció de NKX2-2. La incorporació d'aquestes dues molècules solubles ha permès millorar l'expressió del gen de la *INS* i de gens funcionals de la cèl·lula β com *SUR1*, *KIR6.2*, *PCSK1* i *PCSK2* (Fig.61A). El contingut de pèptid C es veu incrementat quan es fa el tractament amb Forskolina i Nicotinamida (Fig.61B). Finalment es veu un augment de la secreció basal de pèptid C però sense millora en la resposta a glucosa (Fig.61C).

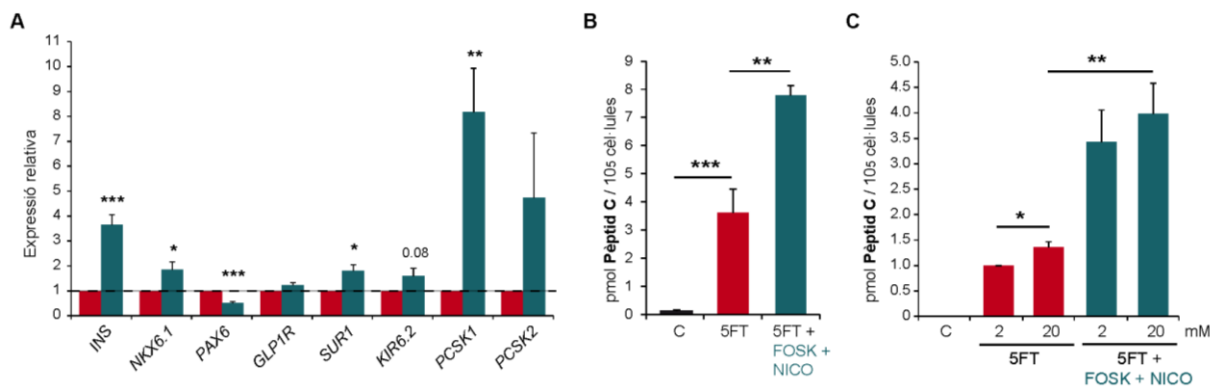


Figura 61. Efecte de l'addició de Forskolina i de Nicotinamida en el protocol de transdiferenciació. Les cèl·lules HFF10.3 són infectades amb Ad-PNM, Ad-Pax4 i Ad-NKX2-2 (5FT) i posteriorment tractades amb 10 μ M de Forskolina i 10 μ M de Nicotinamida després de la incorporació de NKX2-2. **(A)** Un cop passat el temps de cultiu es van recollir i es va extreure el RNA total. El mRNA es va analitzar per real time PCR. Dades obtingudes de la Mitjana \pm S.E.M de 3-5 experiments independents. *, p < 0.05; **, p < 0.01 i ***, p < 0.001 relatiu al PNM. **(B)** Es va determinar el contingut i **(C)** la secreció de pèptid C estimulada per glucosa en les cèl·lules control i reprogramades amb els 5FT cultivades en 2D per una incubació seqüencial de concentració de glucosa baixa (2mM) i alta (20mM). Mitjana \pm S.E.M de 6 experiments independents, 1-2 replicats, cada replicat normalitzat per 100.000 cells. El anàlisi es va realitzar amb el kit d'ELISA Pèptid C (Mercodia).

Cultiu tridimensional (3D)

Les cèl·lules es presenten en els teixits envoltats de matriu extracel·lular donant lloc a un complex tridimensional (3D) que defineix la biologia i el funcionament de cada tipus cel·lular. Cada cop són més els estudis que suggereixen que la reprogramació cel·lular millora substancialment si es fa en estructures tridimensionals.

El dia després a la infecció amb l'adenovirus que codifica per NKX2-2, vam tripsinitzar les cèl·lules i les vam transferir a plaques de 96-pouets especials per fer estructures tridimensionals (2000 cèl·lules/pouet). Dos dies després, vam recollir les esferes (Fibro- β 3D) i vam procedir a estudiar expressió gènica, fer immunofluorescència i determinar la seva funció insulino-secretora.

Els resultats obtingut mostren que l'estructura 3D millora l'expressió d'*INS* en les cèl·lules reprogramades amb el PNM i amb els 5FT en comparació al cultiu 2D. Igualment, el cultiu 3D millora l'expressió de diversos gens endocrins com *INSM1*, *NEUROD1*, *MAFB*, *NKX6-1*, *PAX6*, *PCSK1*, *GLP1R*, *KCNJ11* i *ABCC8*. (Fig.62A). La Fig. 62B mostra imatges d'immunofluorescència amb un anticòs específic per pèptid C de tres esferes de cèl·lules Fibro- β 3D.

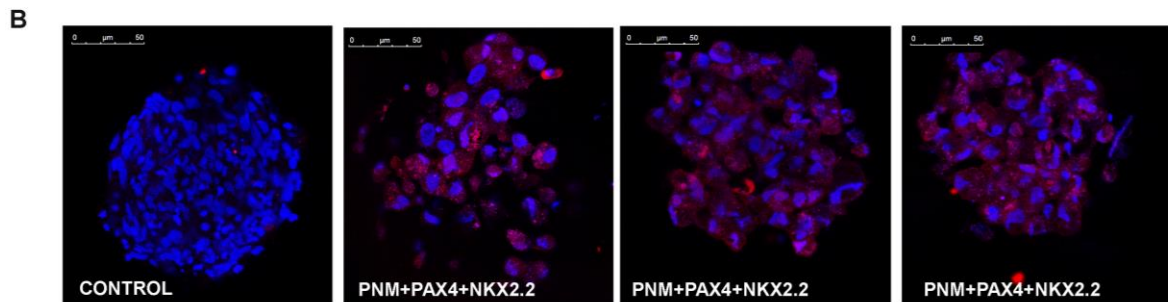
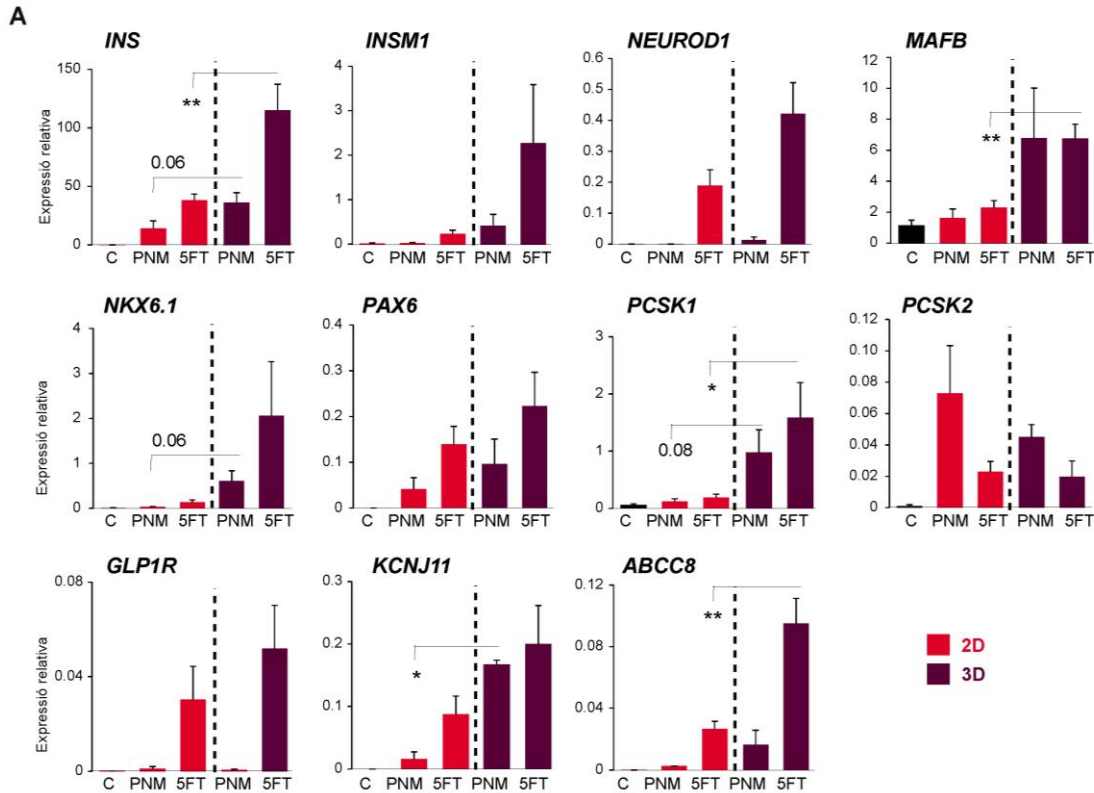


Figura 62. Efecte del cultiu tridimensional en el protocol de transdiferenciació de fibroblasts cap a cèl·lules productores d'insulina. Les cèl·lules HFF10.3 són infectades amb els adenovirus que codifiquen per PNM i Pax4 i NKX2-2 (5FT). Després de la introducció de NKX2-2 es cultiven les cèl·lules en plaques Nunclon* per la formació de esferes (2000 cèl·lules/well). **(A)** Les cèl·lules van ser recollides i analitzades en les dies del protocol indicades. Es va obtenir el RNA total i es va analitzar l'expressió d'insulina mitjançant qPCR. Els valors són expressats relatius a *TBP*. Els valors són Mitjana±S.E.M, 6-8 experiments independents, *, $p < 0.05$ i **, $p < 0.01$ relatiu a les mateixes condicions en cultiu 2D. **(B)** Al dia 10 del protocol, les cèl·lules indicades són fixades i tenyides amb l'anticòs específic de **pèptid C**. Els nuclis són visualitzats amb **Hoescht 33258**. Barra d'escala: 50 μ m.

Secreció d'insulina de les cèl·lules Fibro- β 3D

A continuació s'ha estudiat si l'estructura 3D millora la secreció d'insulina *in vitro*. En la Fig.65 es mostren els nivells d'insulina secretats en resposta a la glucosa (2 i 20mM). Es pot constatar que les cèl·lules Fibro- β mantingudes en un cultiu 3D responen a la glucosa, a diferència de les cèl·lules Fibro- β en cultiu 2D (dades mostrades prèviament en la Secció: Secreció d'insulina de les cèl·lules Fibro- β). També podem observar que els valors de secreció d'insulina són significativament més elevats en un cultiu tridimensional que en un cultiu bidimensional.

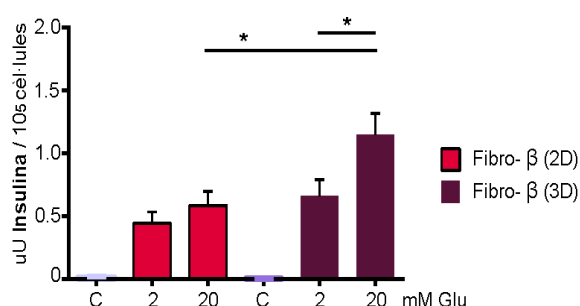


Figura 63. Determinació de la secreció d'insulina en les cèl·lules Fibro- β cultivades en 2D i 3D. Es va determinar la secreció d'insulina estimulada per glucosa en les cèl·lules control i reprogramades amb els 5FT cultivades en monocapa (2D) i tridimensionalment (3D) per una incubació seqüencial de concentració de glucosa baixa (2mM) i alta (20mM). Mitjana \pm S.E.M de 6-7 experiments, 2-3 replicats, cada replicat normalitzat per 100.000 cells. L'anàlisi es va realitzar amb el kit d'ELISA Insulina humana (Crystal Chem).

Secreció d'insulina de les cèl·lules Fibro- β 3D *in vivo*

Tenint en compte les millores a nivells d'expressió gènica i de secreció *in vitro* de les cèl·lules Fibro- β en cultius 3D, vam trasplantar 200-300 esferes dintre de l'ull de ratolins C57Black6 (Fig.66A). Un cop passat 10 dies, es va subministrar un bolus de glucosa intraperitoneal als ratolins i en el temps 30 (t30) minuts després de la càrrega, es va recollir la sang i el líquid intraocular. Es va determinar la insulina humana en els dos fluids. En la Fig.66B, tenim representat cada animal amb un color. En plasma a temps 0 només es detecta nivells baixos d'insulina circulant en 2 dels 7 animals trasplantats amb esferes de Fibro- β 3D. En canvi, als 30 minuts del bolus de glucosa la insulina es detectable en tots els animals trasplantats. A més, podem observar que 5 dels 7 animals responen a glucosa (Fig.66B). Per altra banda,

detectem insulina humana en el líquid ocular de tots els animals trasplantats als 30 minuts del bolus de glucosa.

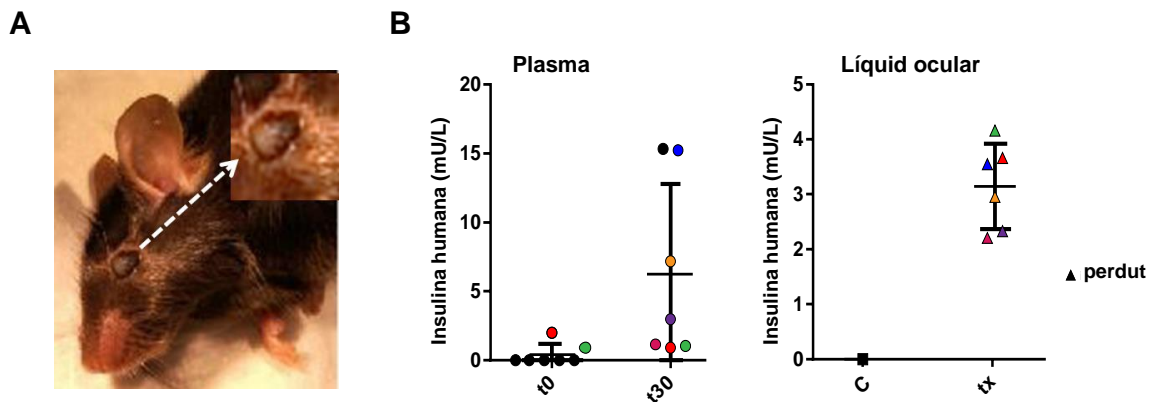


Figura 64. Determinació de la funcionalitat de les esferes Fibro- β *in vivo*. Es van trasplantar aproximadament 250 esferes Fibro- β (2000 cèl·lules/esfera) en ratolins C57Black6 de 8-14 setmanes. **(A)** Imatge de les esferes Fibro- β trasplantats dintre de l'ull del ratolí. **(B)** 10 dies després del trasplantament, es sotmeten els animals a un bolus de glucosa (2g D-glucose/Kg pes animal), es determina la insulina humana en plasma al temps 0 i 30 minuts i en el líquid ocular als 30 minuts. Mitjana \pm S.E.M de 7 animals. Determinacions mitjançant Kit Elisa Christal Chem.

COMPARACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA DE LES CÈL·LULES FIBRO- β AMB ILLOTS PANCREÀTICS HUMANS

Si volem generar cèl·lules amb potencial de traslació a la clínica, una pregunta rellevant és com de properes són aquestes cèl·lules a una cèl·lula β primària. Per aquesta raó, hem comparat els nivells gènics d'alguns dels gens endocrins entre cèl·lules Fibro- β generades amb 2D o amb 3D, amb cèl·lules β generades a partir de iPSC (part 1 de la tesi) i amb illots humans. Pel que fa a la insulina, els resultats mostren que les cèl·lules Fibro- β tenen nivells de mRNA d'*INS* 200 vegades inferiors als de l'illot humà. És interessant que aquests nivells són superiors als presentats per les cèl·lules β obtingudes amb el protocol de diferenciació de iPSC realitzat a la primera part d'aquesta tesi.

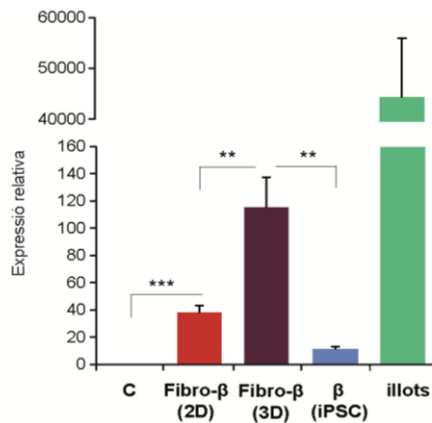


Figura 65. Comparació de l'expressió d'INSULINA en les cèl·lules Fibro-β, en de les cèl·lules β (generades a partir de iPSC) i en illots pancreàtics humans. S'extreu el RNA total de les cèl·lules Fibro-β i dels illots pancreàtics humans i s'analitza l'expressió gènica d'INS mitjançant qRT-PCR. Mitjana±S.E.M de 7-10 de cèl·lules Fibro-β, cèl·lules β generades a partir de iPSC (Part 1) i 3 extraccions d'illots humans independents.

En la gràfica següent es mostren els nivells d'expressió de gens importants pel desenvolupament, la funció i la maduració de la cèl·lula β expressats en les cèl·lules Fibro-β, cultivades tant en monocapa com en estructura tridimensional, i en illots pancreàtics humans. Veiem que tenim expressió de tots els marcadors endocrins analitzats i en alguns casos els nivells s'apropen amb els de l'illot com per exemple pel gen *NKX6-1* i *PCSK1*.

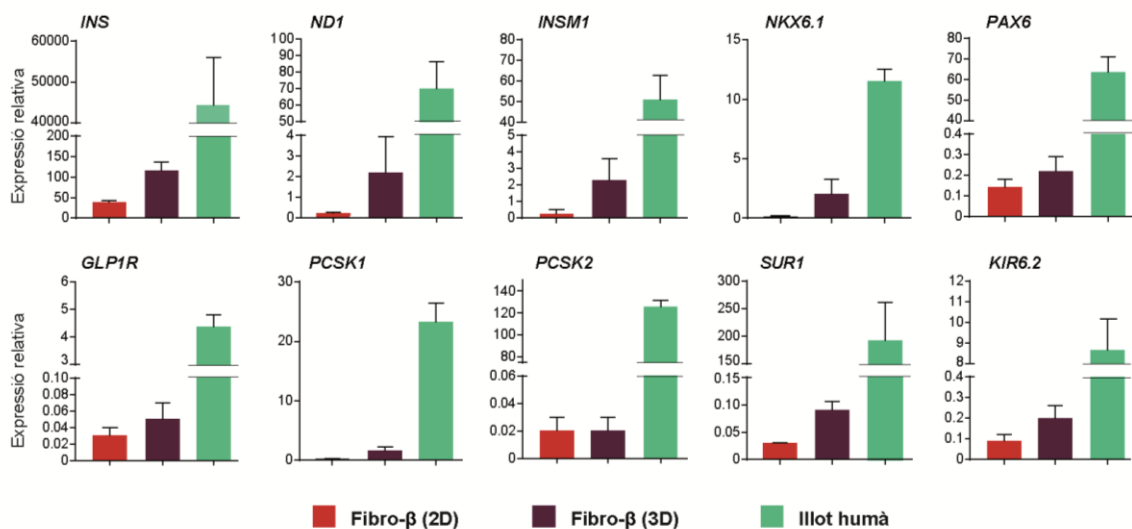


Figura 66. Comparació de l'expressió de gens endocrins en les cèl·lules Fibro-β i en els illots pancreàtics humans. S'extreu el RNA total de les cèl·lules Fibro-β i dels illots pancreàtics humans i s'analitza l'expressió gènica dels marcadors endocrins mitjançant qRT-PCR. Mitjana±S.E.M de 7-10 de cèl·lules Fibro-β i 3 extraccions d'illots humans independents.

DISCUSSIÓ

Des de fa uns anys són molts els estudis que demostren la capacitat de les cèl·lules pluripotents i somàtiques per modificar el seu fenotip i genotip. La introducció de factors de transcripció específics de llinatge en diferents tipus cel·lulars mitjançant protocols de transdiferenciació ha evidenciat que és possible convertir un tipus cel·lular en un altre. Fins a l'actualitat, diversos protocols de transdiferenciació més o menys exitosos han aconseguit generar noves cèl·lules productores d'insulina a partir d'altres cèl·lules somàtiques. Concretament, es coneix tres FTs claus, Pdx1, Ngn3 i MafA, necessaris per la generació de noves cèl·lules β pancreàtiques a partir de diferents tipus cel·lulars amb un origen embrionari proper, com cèl·lules intestinals, estomacals, hepàtiques, exocrines i ductals del pàncrees (Ariyachet et al., 2016; Chen et al., 2014; Ham et al., 2011; Zhou et al., 2008). En canvi, les publicacions existents no han pogut demostrar la conversió de fibroblasts embrionaris (Akinci et al., 2013; Zhou et al., 2008) o fibroblasts adults de ratolí (Akinci et al., 2013) cap a cèl·lula β . En aquesta tesi descrivim per primera vegada un protocol de transdiferenciació on aconseguim obtenir cèl·lules productores d'insulina funcionals *in vitro* a partir de cèl·lules de la pell humanes. El nostre protocol es basa en la introducció seqüencial de 5 factors de transcripció, Pdx1, Ngn3, MafA, Pax4 i Nkx2-2.

Se sap que el moment i la dosi de material genètic que codifica per factors de transcripció introduït en la cèl·lula d'origen estan íntimament relacionats amb l'èxit de la reprogramació cel·lular (Miyashita et al., 2014). Els nostres resultats recolzen aquest fet i demostren la importància d'introduir els FTs a la cèl·lula mitjançant un sol adenovirus i no en adenovirus independents. Hem constatat que la introducció de Pdx1, Ngn3 i MafA (PNM) en adenovirus separats i espaiats en el temps no indueix el gen de la insulina comparat amb la introducció dels FTs en un sol adenovirus, encara que els nivells d'expressió dels transgens siguin similars. La presència dels 3 FTs PNM en els fibroblasts dona lloc a una activació de gens endocrins i gens específics de cèl·lula β . Aquesta activació ve acompanyada d'una baixada en l'expressió de gens específics de la xarxa transcripcional de la cèl·lula d'origen com per exemple *TWIST2*, *PRRX1* i *LHX9* (Tomaru et al., 2014) a més de gens específics per la producció de col·lagen i vimentina. Juntament amb canvis en l'expressió gènica, cal remarcar un canvi morfològic passant per un fenotip clar d'una cèl·lula fibroblàstica, allargat, a un fenotip arrodonit, ja visualitzat al tercer dia de protocol. Doncs podem deduir l'existència d'un canvi de llinatge cel·lular.

L'expressió de gens endocrins entre els quals es troben glucagó i somatostatina, amb la introducció de PNM en els fibroblasts, pot estar indicant l'obtenció d'una cèl·lula polihormonal i doncs no madura. Els nostres resultats no mostren si la mateixa cèl·lula expressa els diferents tipus d'hormones. Una opció que hem intentat sense èxit ha estat la detecció proteïca d'aquestes hormones, només hem detectat insulina en les cèl·lules reprogramades. Creiem que l'expressió de glucagó i somatostatina és casi indetectable en les cèl·lules reprogramades, que pot estar relacionat amb els baixos nivells de mRNA, que són 50 i 500 vegades inferiors als nivells d'insulina en el protocol de PNM, respectivament.

Contràriament a lo que succeeix en ratolins, en humans la majoria de cèl·lules endocrines primerenques són polihormonals i no és fins a finals de desenvolupament endocrí que no esdevenen cèl·lules monohormonals. El factor Nkx2-2 s'activa en etapes tardanes en el procés d'especificació de la cèl·lula β on esdevé monohormonal (Jennings et al., 2013). Aquest fet concorda amb els nostres resultats on la presència de gens característics d'altres cèl·lules endocrines i la falta d'activació de gens específics i necessaris per la cèl·lula β com Nkx6-1 remarca que la introducció de PNM no és suficient per activar tota la màquina transcripcional i és necessari la presència de Pax4 i en últim lloc Nkx2-2 per millorar la transdiferenciació dels fibroblasts cap a cèl·lula β . Resultats com l'activació de gens específics en l'identitat i la funció de la cèl·lula β com són el gen *NKX6-1* i els gens que codifiquen pels components del canal de potassi *SUR1* i *KIR6.2*, en són una prova. A més, l'expressió de *GCG* disminueix dràsticament amb el protocol de 5FT, observació que podria indicar l'obtenció de cèl·lules monohormonals, i doncs cèl·lules β .

La funció principal de les cèl·lules β pancreàtiques és la producció i l'alliberament regulat d'insulina. Sota condicions de concentracions elevades de glucosa, la insulina emmagatzemada és alliberada per restablir els nivells normals de glucosa en sang. Amb l'objectiu de determinar la funcionalitat de les cèl·lules reprogramades obtingudes, en primer lloc vam voler analitzar si hi havia una bona producció d'insulina. En aquest sentit, un cop comprovat el processament de proinsulina a insulina i pèptid C mitjançant immunofluorescència i ELISA, vam verificar que les cèl·lules generades, batejades amb el nom de cèl·lules Fibro- β , tenen la capacitat de secretar ambdós si bé amb una resposta a la glucosa inexistente *in vitro*. Per altra banda, els assajos de calci van demostrar que el 35% de cèl·lules reprogramades tenen la capacitat d'augmentar el calci intracel·lular en resposta a

glucosa i a l'agent despolaritzant KCl. En canvi, un 35% de cèl·lules no té cap resposta de flux de calci. Aquest darrer percentatge podria correspondre a cèl·lules no reprogramades o parcialment reprogramades. Té sentit si considerem que el percentatge obtingut de cèl·lules insulino-positives (per tinció) és d'aproximadament el 70%. Per tal de comprovar la capacitat funcional *in vivo* de les cèl·lules Fibro- β generades *in vitro*, vam trasplantar les cèl·lules Fibro- β sota la càpsula renal d'un animal immunodeficient. Observem que la insulina circulant en el serum dels animals trasplantats és detecta en el 33% dels casos. Aquest baix percentatge evidencia possibles limitacions en el trasplantament com baixa revascularització de l'empelt, la dispersió o la pèrdua de les cèl·lules trasplantades i/o la poca funcionalitat de les mateixes.

El protocol descrit en aquesta tesi ha de ser millorat per tal d'aconseguir cèl·lules Fibro- β amb una millor capacitat insulino-secretora. Amb aquesta finalitat, a la part final d'aquest treball hem assajat els efectes de molècules solubles que actuen a nivell epigenètic (en relació a la primera part de la tesis) i que regulen vies de senyalització intracel·lular, que ja s'han descrit com imprescindibles en protocols de diferenciació dirigida a partir de cèl·lules mare. Els nostres resultats mostren una millora de l'expressió d'insulina i de factors de transcripció importants pel funcionament de la cèl·lula β , a més d'un increment en la secreció d'insulina i de pèptid C a l'incorporar en el medi, molècules solubles com Nicotinamida i Forskolina. Aquest fet es corrobora amb els estudis que han demostrat que la Forskolina i la Nicotinamida tenen un paper potenciador en la generació de cèl·lules β en diferents protocols de reprogramació (Kunisada et al., 2012; Zhu et al., 2016, Yang et al 2015).

Però els resultats més prometedors són els obtinguts quan s'introdueix en el últim pas del protocol una reorganització cel·lular tridimensional. Com ja se sap, el cultiu de dos dimensions (2D), causa limitacions essencials, que les cèl·lules en un entorn natural no es troben, com la impossibilitat de reproduir la morfologia i les propietats bioquímiques de la cèl·lula (Yabe et al., 2017). Per aquest motiu, des de fa relativament poc temps, s'ha posat de manifest la importància de cultivar les cèl·lules en un entorn lo més similar possible al del teixit del que formen part (cultius tridimensionals-3D). Diferents estudis han demostrat que el cultiu 3D millora els protocols de diferenciació cap cèl·lula β (Kim et al., 2016; Takeuchi et al., 2014; Toyoda et al., 2015). Per aquesta raó, vam incorporar el cultiu 3D en el nostre protocol de transdiferenciació i hem corroborat que millora els resultats obtinguts en el cultiu monocapa. És important destactar que les cèl·lules generades tridimensionalment, a

diferència del cultiu monocapa, tenen la capacitat de secretar insulina en resposta a glucosa en un cultiu *in vitro*.

També hem comprovat la capacitat funcional de les esferes dels Fibro- β *in vivo* trasplantant-los als ulls de ratolins C57Black6. L'ull és un lloc immunoprivilegiat (Benhar, et al., 2012) i s'ha descrit com una tècnica poc invasiva comparada amb el trasplant de cèl·lules a altres regions de l'organisme de l'animal. Aquesta tècnica permet preservar l'estructura dels illots, millorar la seva viabilitat i la seva funcionalitat, durant curts períodes de temps, ja que permet una revascularització temprana de l'empelt (Speier et al., 2008). Els illots pancreàtics trasplantats en els ulls estan revascularitzats als 10 dies (Vajkoczy et al., 1995, Menger et al., 1989, Jansson & Carlsson, 2002), doncs podem pensar que les nostres esferes trasplantats estan revascularitzades en el moment de l'anàlisi, la qual cosa no hem confirmat encara. Hem vist que les esferes de cèl·lules Fibro- β trasplantats als ulls secreten insulina, després d'un bolus de glucosa, a l'humor vitri amb valors similars en tots els animals. També detectem insulina circulant en plasma, tot i que amb més variacions entre animal i amb nivells a vegades molt baixos. Cal dir que quan realitzem els trasplantament en els ulls posem aproximadament 10 cops menys de cèl·lules que en el trasplantament en la càpsula renal, la qual cosa ens fa pensar que si s'incrementa el nombre d'esferes en el trasplantament segurament podríem detectar millor la insulina humana circulant. A la pràctica, incrementar el nombre d'esferes en els trasplantament dels ulls és una limitació. Finalment, una dada destacable és que els valors de secreció d'aquestes esferes de cèl·lules Fibro- β són similars als obtinguts de trasplantament d'illots de donadors cadavèrics humans en ratolins (Pagliuca et al., 2014) i, són 10-20 vegades superiors en relació amb els trasplantaments realitzats sota la càpsula renal. Resta per estudiar aquests empelts a temps més llargs. Se sap que les cèl·lules β derivades de cèl·lules mare exhibeixen una maduració funcional lenta un cop trasplantades en ratolí. Serà interessant estudiar si això també és cert per les cèl·lules Fibro- β . Malgrat que l'ull és un lloc immunoprivilegiat, si volem allargar el temps de manteniment dels empelts en els ratolins serà necessari emprar animals immunodeprimits.

Les cèl·lules Fibro- β poden ser el primer pas en el desenvolupament d'una nova estratègia de teràpia cel·lular pel tractament de la diabetis. Fins ara, la falta de donants cadavèrics d'illots pancreàtics o de pàncrees i el baix percentatge de replicació cel·lular *in vitro* han estat limitants a l'hora d'establir una teràpia real per la cura de la diabetis. L'estratègia descrita en aquesta tesi pot suplementar aquestes limitacions, on s'ha utilitzat les pròpies cèl·lules de la

pell humanes per generar noves cèl·lules que produeixen insulina. Gràcies a que els fibroblasts són de fàcil obtenció, el seu ràpid creixement i el manteniment en el laboratori fan que sigui una font òptima per l'estudi. Cal destacar que el protocol descrit permet l'obtenció de casi el 70% de cèl·lules insulino-positives només en 10 dies. Si comparem amb altres protocols de diferenciació dirigida o transdiferenciació *in vitro* i *in vivo* tenen una eficiència al voltant del 30% en l'obtenció de cèl·lules productores d'insulina (Wei & Hong, 2016).

El protocol de transdiferenciació funciona en fibroblasts provinents de prepuci de nen (cèl·lules utilitzades per l'establiment del protocol) i també en fibroblasts dèrmics (d'una biòpsia de pell de l'avantbraç) d'un pacient diabètic. Serà interessant provar-lo amb altres fonts cel·lulars, com per exemple queratinòcits que s'extreuen de l'arrel del cabell, evitant encara més les molèsties d'una biòpsia de pell, sobretot si cal obtenir-los de nens.

La transdiferenciació de cèl·lules de la pell cap a cèl·lules productores d'insulina ofereix una nova oportunitat de curar la diabetis. No obstant, seria interessant estudiar si noves molècules solubles, descrites ja en protocols de diferenciació dirigida, ofereixen una millora en el nostre protocol. A més, són necessaris nous trasplantaments de les esferes de Fibro- β en animals immunodeprimits i diabètics per tal de veure si aquestes cèl·lules poden revertir la hiperglicèmia.

RESUM

PART 1

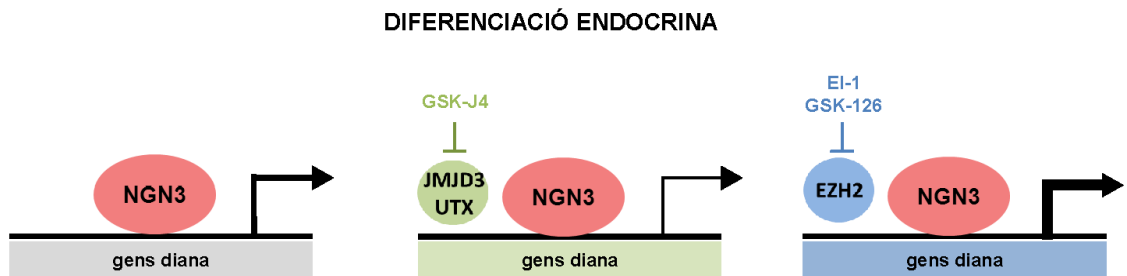
- La inhibició de les demetilases Jmjd3 i Utx impedeix l'activació gènica induïda per Ngn3 en les cèl·lules mPAC.
- La inhibició de la metiltransferasa Ezh2 millora l'activació gènica induïda per Ngn3 en les cèl·lules mPAC.
- La inhibició de la metiltransferasa Ezh2 millora l'expressió d'insulina i del nombre de cèl·lules insulino-positives en primordis pancreàtics de ratolí cultivats *ex vivo*.
- La inhibició de la metiltransferasa Ezh2 potencia l'activació gènica en resposta a Ngn3 i PNM en fibroblasts embrionaris de ratolí.
- La inhibició de la metiltransferasa Ezh2 en estadis de progenitor pancreàtic potencia l'activació de la xarxa transcripcional endocrina i la formació de cèl·lules positives per insulina en un protocol de diferenciació dirigida a partir de iPSC humanes.

PART 2

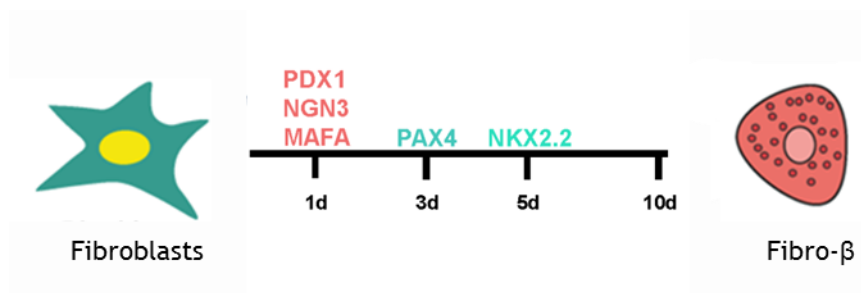
- La introducció seqüencial de PNM+Pax4+NKX2-2 activa el programa transcripcional β pancreàtic i reprimeix el programa fibroblàstic en fibroblasts humans.
- Les cèl·lules Fibro- β processen PROINSULINA per generar i secretar INSULINA i PÈPTID C.
- Les cèl·lules Fibro- β que es cultiven en monocapa secreten INSULINA de forma constitutiva.
- Un 65% de les cèl·lules Fibro- β exhibeixen flux de calci intracel·lular en resposta a glucosa i/o KCl.
- El cultiu en estructura tridimensional de les cèl·lules Fibro- β millora l'activació del programa transcripcional de la cèl·lula β , augmenta el contingut i la secreció basal d'insulina i la resposta insulino-secretora a l'estímul de glucosa.
- Les cèl·lules Fibro- β trasplantades en ratolins secreten insulina en resposta a l'estímul de glucosa *in vivo*.

CONCLUSIONS

La manipulació de l'activitat dels reguladors epigenètics de la marca H3K27me3 juntament amb la introducció del factor Ngn3 pot ser una eina per tal de millorar l'eficiència de la formació de noves cèl·lules β en reprogramacions directes de cèl·lules somàtiques i en diferenciacions dirigides a partir de cèl·lules pluripotents.



És possible promoure la transdiferenciació de fibroblasts humans cap a cèl·lules que produeixen i secreten insulina mitjançant la introducció seqüencial dels factors de transcripció PNM (Pdx1+Ngn3+Mafa)+Pax4+Nkx2-2.



MATERIALS I MÈTODES

LÍNIES CEL·LULARS

Protocol i obtenció de línies cel·lulars

NORMES DE MANIPULACIÓ

S'han seguit les normes de manipulació establertes pel laboratori de Diabetis i Obesitat de l'IDIBAPs, situat al Center Esther Koplowitz.

Totes les línies cel·lulars utilitzades són adherents i creixen en monocapa. Normalment es passen un o dues vegades a la setmana.

PROTOCOL DE DIVISIÓ O SUBCULTIU

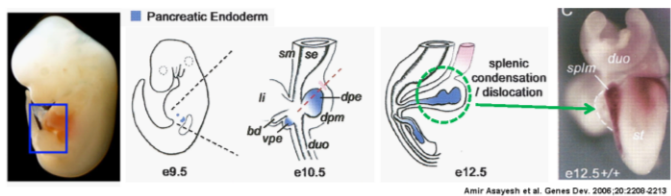
Rentar amb PBS dos cops
Afegir tripsina 5 minuts aprox
Afegir 9ml de medi i barrejar
Ressuspendre 1ml amb 10ml de medi i sembrar en un flask de 75cm

PROTOCOL DE CONGELACIÓ

Rentar amb PBS dos cops
Afegir tripsina 5 minuts aprox
Afegir x ml de medi amb 10% DMSO, barrejar i aliquotar (depen del nombre de cèl·lules)
Introduir en un criobox i a -80°C

PROTOCOL DE DESCONGELACIÓ

Treiem el vial de -80C, descongelant a poc a poc i introduir en 6ml de medi en un flask de 25cm

CÈL·LULES	CARACTERÍSTIQUES	MEDI DE CULTIU
mPAC L20	Linia cel·lular pancreàtica ductal de ratolí	DMEM 4500 mg/l + 10% FBS + 5% S/P
MEFs	Linia primària procedent de biopsia de pell ratolí C57BL/6 a dia embrionari E12.5. Es realitza una isolació i disgregació enzimàtica: col·lagenasa P al 0.25% 90 minuts 37°C. S'elimina la part no disgregada i es cultiva	DMEM 4500 mg/l + 10% FBS + 5% S/P
Primordis pancreàtics	Primordis pancreàtics de ratolí C57BL/6 a dia embrionari E12.5.* Es realitza la isolació i es cultiva sobre filtres (MILLICELL)	RPMI 1660 + 10% FBS + 5% S/P
	 <p>Amir Asayesh et al. Genes Dev. 2006;20:2209-2213</p>	
Min6	Linia cel·lular beta pancreàtica	DMEM 4500 mg/l + 10% FBS + 5% S/P + B-Mercapto 50uM
Fibroblasts HFF10.3 HFF ATCC HDF1.13	Linies primàries humanes procedents de: - de pell de prepuci, cedides per la Dra Montserrat - de pell de prepuci, comprades a ATCC - biopsia de pell de pacient diabètic, cedides per la Dra Novials.	DMEM 4500 mg/l + 10% FBS+ 5% S/P + 5% Glutamax

* S'ha obtingut només la part dorsal del pàncrees per l'estudi. La part ventral del pàncrees és de difícil accés i s'ha descartat.

Els mètodes de transfecció utilitzats en aquesta tesi van ser diferents segons les cèl·lules emprades i l'experiment.

PROTOCOL DE TRANSFECCIÓ

Incubar cèl·lules amb adenovirus a les MOI indicades durant el temps indicat a la taula
 Canviar el medi que conté adenovirus i posar el medi corresponent
 Deixar el temps indicat per cada experiment.

Transfeccions en les cèl·lules mPAC i MEFs - plaques de 6 wells
 Transfeccions en les cèl·lules fibroblastiques - plaques de 12 wells

TIPUS CEL·LULARS	ADENOVIRUS (Ad)		
	Ad-NEUROG3 *	Ad-PNM **	ALTRES
mPAC L20	40 MOI (2-3 h)		
MEFs	40 MOI (2-3 h)	100 MOI (2-3 h)	
Fibroblasts humans	40 MOI (8 h)	100 MOI (ON)	Ad-PAX4 (5 MOIs) Ad-NKX2.2 (10 MOIs) Ad-PDX1, Ad-NEUROD1 Ad-MAFA, Ad-NKX6.1 Ad-MATH6 (10-500 MOIs)

Un cop passat el temps de transfecció, es reemplaça el medi que conté l' adenovirus i es posa medi nou.

En les cèl·lules fibroblastiques, és necessari utilitzar SuperFect (Invitrogen) perquè entri l' adenovirus a les cèl·lules. En els nostres experiments afegim 2ul Superfect/ 600ul de medi+ adenovirus.

* En l'estudi de proteïna, hem emprat un adenovirus que codifica per Neurog3 i té un epítip HA.

** L'adenovirus que codifica per Pdx1+Ngn3+MafA també codifica per la proteïna fluorescent Cherry

Característiques dels adenovirus recombinants utilitzats en aquesta tesi:

Els adenovirus són utilitzats des de fa molts anys com a vehicles de transferència de material genètic ja sigui per sobreexpressar o silenciar gens en cèl·lules de mamífer. La utilització d'adenovirus té grans avantatges:

- els adenovirus infecten cèl·lules que no estan en fase de divisió de forma eficaç,
- els adenovirus són altament estables sense integrar-se en el material genètic de la cèl·lula diana,
- és fàcil de produir grans quantitats de virus amb títol alt,
- els adenovirus permet inserir gens de tamany gran, fins a 8 Kb aproximadament, en les construccions.

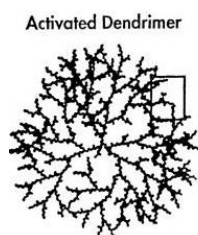
Per contra té un desavantatge depenen de l'experiment que es vulgui realitzar: expressió transitòria del gen inserit.

Els adenovirus utilitzats en aquesta tesi ens han permès sobreexpressar gens en les diferents cèl·lules d'estudi. Els adenovirus utilitzats s'han obtingut al propi laboratori o s'han comprat. Per cada infecció realitzada s'ha de tenir en compte la multicopicitat d'infecció (MOI). La MOI relaciona les partícules infeccioses i el nombre de cèl·lules que infecten. Es determina: $MOI = \frac{\text{ml medi} * \text{PFU/ml}}$

Al moment de treballar amb adenovirus, s'han d'incrementar les mesures de seguretat (doble guant i bata de màniga llarga), treballar en una cabina de flux laminar de bioseguretat II i descontaminar la zona i els productes en contacte amb l'adenovirus mitjançant lleixiu al 25%.

Característiques del Superfect utilitzats per les infeccions en les cèl·lules fibroblastiques humanes:

El reactiu Superfect (invitrogen) consisteix en molècules de dendrímer activats amb arquitectura esfèrica definida, que actuen com agents de infecció en teràpia gènica. El reactiu Superfect ensambla l'ADN en estructures compactes, s'uneixen a la superfície de la cèl·lula i es transporten a l'interior mitjançant endocitosis.



El reactiu de transfecció SuperFect es proporciona com una solució preparada on s'afegeix directament al medi de cultiu juntament amb l'adenovirus que es vol introduir a les cèl·lules. Es barreja i s'incuba durant 15 minuts per permetre que es formin complexos d'ADN-SuperFect. Aquesta mix s'afegeix directament a les cèl·lules. Un cop ha passat el temps d'incubació, en el nostre cas varia en funció del adenovirus que introduïm, es realitza el canvi de medi.

Protocol de viabilitat i mort cel·lular

Per determinar la viabilitat i la mort cel·lular s'han realitzar diferents proves.

- 1 L'assaig de MTT es basa en la reducció metabòlica de les sals de tetrazoli (bromur de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli) per part de l'enzim mitocondrial succinat

deshidrogenasa donant lloc a la formació de cristalls de formazà. Permet valorar la viabilitat (en nombre de cèl·lules) o la proliferació cel·lular.

- 2 L'assaig de BrDU es basa en incorporar la bromodeoxiuridina (BrDU), un nucleòsid sintètic anàleg de timidina, a l'ADN. L'anticòs específic de BrDU es pot utilitzar per detectar la substància química incorporada, indicant les cèl·lules que repliquen activament el seu ADN. Permet detectar les cèl·lules proliferants en cèl·lules vives.
- 3 La detecció de caspasa8 és un assaig homogeni i luminescent que mesura l'activitat enzimàtica de la caspasa8. La caspasa8 juga un paper iniciador de la via apoptòtica extrínseca de cèl·lules de mamífers. L'assaig proporciona una senyal de llum (RLU) i aquesta senyal generada és proporcional a l'activitat de la caspasa present. La magnitud de l'activitat de la caspasa8 depèn del tipus cel·lular i de l'estímul apoptòtic.

Els protocols es descriuen a continuació:

PROTOCOL DE VIABILITAT CEL·LULAR (MTT)

- preparació de la solució de MTT: 100ul medi + 15ul MTT (stock: 5mg/ml)
- eliminar el medi
- afegir 115ul de la solució MTT
- incubació 37°C durant 4h
- afegir 115ul de (isopropanol+0.04N HCl)
- barrejar bé per dissoldre els cristalls formats
- llegim la placa a OD de 575 i 650 nm
- $\% \text{ Viabilitat} = (\text{OD}575 - \text{OD}650) / (\text{OD}575 - \text{OD}650) \text{ medi control}$

PROTOCOL DE PROLIFERACIÓ CEL·LULAR (ELISA - BrDU) Roche

- Afegir 10% de la solució de BrDU en el medi durant 24h a 37°C
- eliminar el medi
- Incubar 30min a RT amb 200ul /well FixDenat
- eliminar el medi
- incubar 90min a RT amb 100ul de solució anti-BrDU
- rentar amb solució de rentat 3 cops
- incubar 30min amb 100ul de solució subtrat
- afegir 25ul 1M H2SO4 durnat 1min a 300rpm
- llegim la placa a 450nm

PROTOCOL DE APOPTOSI (Caspase- GLO 8) Promega

- Afegir el mateix volum del reactiu Caspase-GLO8
- incubar 1h
- llegim la placa a 490nm

IMMUNOPRECIPITACIÓ DE CROMATINA (CHIP)

La immunoprecipitació de la cromatina és un tipus de tècnica experimental d'immunoprecipitació utilitzada per investigar la interacció entre proteïnes i l'ADN a la cèl·lula. El seu objectiu és determinar si proteïnes específiques estan associades a regions

genòmiques específiques, com ara factors de transcripció en promotors o altres llocs d'unió a l'ADN. Aquesta tècnica també permet determinar les modificacions d'histones específiques en les diferents regions del genoma. Consta bàsicament de dos passos, el primer és fixació de les interaccions proteïna-proteïna i les interaccions proteïna-ADN i el segon pas és la immunoprecipitació del complex proteïna-ADN amb anticossos específics. Les seqüències específiques immunoprecipitades de l'ADN són amplificades per PCR per determinar si han estat o no enriquides en les mostres corresponents per cada anticòs.

CROSSLINKING	Rentar les cèl·lules amb PBS Afegir 9 ml de 1% Formadehid Incubar 15 minuts amb moviment Aturar crosslinking amb 1ml de glicina 1.25M Incubar 5 minuts amb moviment Rentar amb PBS
EXTRACCIÓ DE CROMATINA	Resuspendre pellet 300 ul de SDS Lisis Buffer
FRAGMENTACIÓ DE CROMATINA	Sonicar la cromatina 3 cicles de 5 minuts Centrifugar a 20 minuts a 14000 rpm a 4°C Recollir el sobrenadant i quantificar al nanodrop
	Per comprovar sonicació: 20 ul de cromatina + 1.5ul NaCl 5M a 65°C ON i córrer gel d' agarosa 1%
IMMUNO- PRECIPITACIÓ	Diluir la cromatina amb el SDS dilution buffer 1:10 Afegir anticòs 2-5 ug durant tota la nit a 4°C en rotació (Guardar INPUT 10% a 4°C) Afegir 15ul de dynabeads /IP (prèviament rentats amb PBS) Incubar 1 hora a temperatura ambient Afegir 1 ml de Low Wash Buffer 5 minuts en rotació Afegir 1 ml de High Wash Buffer 5 minuts en rotació Afegir 1 ml de LiCl Wash Buffer 5 minuts en rotació Afegir 1 ml de TE (x2)
REVERSE CROSS-LINKING	Precipitar les boles magnetiques amb un imàn Eliminar el sobrenadant Afegir 100ul de Elution Buffer (preparat al moment) Agafar els INPUTS i afegir fins a un volum de 200ul de Elution Buffer Incubar durant 3-4 hores a 62°C a 1000 rpm Inactivar proteinase K 10 minuts a 95°C
DNA PURIFICATION (Columnes Qiagen)	Afegir 5 volums del PB Buffer per tub Posem les mostres en una columna i centrifuguem Rentem un cop amb 750ul de PE Buffer Fem una extracentrifugació per eliminar restes de PE Buffer Eluïm en 50 ul de EB

SDS LYSIS buffer: 50mM Tris pH8.1, 10mM EDTA, 1% SDS, protease inhibitor, PMSF 2mM i H2O

SDS LYSIS dilution buffer: 16.7mM Tris pH8.1, 1.2mM EDTA, 167mM NaCl, 0.01% SDS, 1.1% triton 100X, PMSF 2mM, aprotinin i H2O

LOW SALT WASH buffer: 20mM Tris - HCL pH8.0, 150mM NaCl, 2.0mM EDTA, 1% TRITÓ 100X, 0.1% SDS i H2O

LiCL SALT WASH buffer: 10mM Tris - HCL pH8.0, 0.25M LiCL, 1.0 mM EDTA, 1%NP40 /IGEPAL, 1% deoxycholate sodium i H2O

HIGH SALT WASH buffer: 20mM Tris- HCL pH8.0, 2.0mM EDTA, 500mM NaCl, 1% TRITÓ 100X, 0.1% SDS i H2O

ELUTION buffer: NaHCO3 1M, 10% SDS, Proteinase K (20 mg/ml) i H2O

TE buffer: 10mM Tris- HCL pH8.0, 1.0mM EDTA i H2O

PROTOCOL EXTRACCIÓ RNA I QRT-PCR

Per l'estudi de l'expressió gènica, hem realitzat una extracció del RNA, seguida d'una retrotranscripció de RNA a cDNA (RT) i posteriorment un anàlisi mitjançant la tècnica de PCR a Temps Real.

NORMES DE MANIPULACIÓ

Per l'extracció de RNA tot el material emprat ha d'estar lliure de ribonucleases (RNases). S'utilitza RnaseZAP (Sigma) per assegurar que el material, guans, pipetes i superfícies estiguin lliures de RNases.

PREPARACIÓ MOSTRA

S'elimina el medi de les cèl·lules i es renten 2 cops amb PBS
Es tripsinitzen i es col·loquen en un eppendorf
S'elimina tot el sobrenadant i congelem el pellet de manera ràpida (neu carbonica + etanol) fins a la extracció de RNA

KITS D'EXTRACCIÓ DE RNA

S'ha seguit els protocols dels diferents KITS d'extracció de RNA:

- **ROCHE** quantitats entre $2,5 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^8$ cèl·lules (ex: mPAC, iPSC)
- **MACHERY NAGEL** quantitats entre 15.000-200.000 cèl·lules (ex: fibroblasts)
- **QIAGEN mini** quantitats molt petites (ex: primordis pancreàtics)

QUANTIFICACIÓ

S'utilitzen 1.5 ul per quantificar amb el Nanodrop

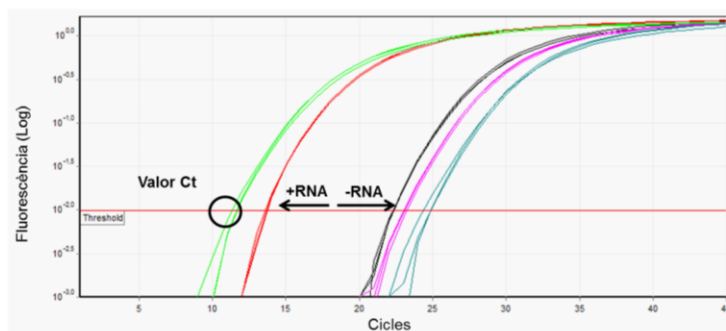
TRANSCRIPTASA REVERSA (RT)

Es va emprar la retrotranscriptasa d'Invitrogen SuperScript III.
S'introdueix en un tub de 0.2ml:
Random primers (0.5ug) + RNA (0.5-5ug) + H₂O lliure de RNases.
S'incuba a 70°C durant 10 minuts i refredar en gel.
Afegir posteriorment mix:
First strand buffer (5x) + DTT (0.1M) + dNTPs (10mM) + RnaseOUT (40U/ul) + SuperScript III (200U/ul) + H₂O lliure de RNases.
S'incuba a un termociclador en el següent programa:
1. 25°C durant 5 minuts
2. 42°C durant 15 minuts (alineament)
3. 50°C durant 90 minuts (elongació)
4. 55°C durant 10 minuts
5. 70°C durant 15 minuts (inactivació)
4°C fins la retirada del tub (cDNA).

La tècnica de PCR a temps real o quantitativa ens permet mesurar l'expressió gènica de les mostres que es volen analitzar. En la tesi hem emprat un fluoròfor SYBRgreen. Aquest fluoròfor s'uneix al DNA de tal manera que quant més amplifiquem del transcrit hi ha major la fluorescència detectada.

PCR a TEMPS REAL

Es va emprar el Kit GoTaq DNA polymerase (PROMEGA)
5ul GoTaq Reaction buffer (5x) + 0.25ul primers (10mM) + 2.75ul aigua lliure de RNases + 2ul cDNA (<0.5ug/50ul)
Es segueixen les indicacions del fabricant per la amplifiquem de PCR.



Per la quantificació dels resultats, s'analitza un gen control que s'expressa de forma homogènia en les diferents mostres utilitzades. Això ens permet normalitzar els resultats, que s'expressen com a rati entre el valor del gen que estudiem respecte el valor del gen control. Com a gens controls hem utilitzat per mesurar els FT el gen TBP (TATA-binding protein) i per analitzar les hormones el gen ActinaB. Per l'anàlisi es va utilitzar el mètode de la $\Delta\Delta Ct$.

PROTOCOL D'IMMUNOFLUORESCÈNCIA

En el cas de primordis pancreàtics, es realitza la parafinització del teixit:

FIXACIÓ	3-5h PFA4% a 4°C
DESHIDRATACIÓ	10' PBS 30' EtOH 50% 30' EtOH 70% (x2) 30' EtOH 96% (x2) 30' EtOH 100% (x2) 1h Xilè Montatge en bloc de parafina

Per detectar la presència de hormones pancreàtiques i de factors de transcripció vam utilitzar tècniques de detecció per immunofluorescència. Les mostres que provenen de blocs de parafina seguiran el protocol següent:

DESPARAFINITZACIÓ i REHIDRATACIÓ	5' amb xilè 5' amb EtOH 100% (x2) 5' amb EtOH 95% (x2) 5' amb EtOH 70% (x2) 5' amb EtOH 50% (x2) 5' amb H ₂ O (x2)
DESMASCARAMENT DE L'ANTIGEN	10-12' amb CITRAT 1X Rentat amb H ₂ O i PBS
PERMEABILITZACIÓ	30' amb PBS 1X 0.1% tritó Rentat amb PBS 3 cops de 5'
BLOQUEIG	60' en 3% donkey serum en PBS 1x - 0.1% tritó Rentats amb PBS 1x
ANTICÓS PRIMARI	Anticós primari en 3% donkey serum en PBS 1x ON a 4°C Rentats amb PBS 1x 3 cops de 5'
ANTICÓS SECUNDARI	60' d'Anticós secundari en 3% donkey serum en PBS 1x Rentats amb PBS 1x 3 cops de 5'
TINCIÓ NUCLIS	3 minuts de Hoechst en PBS 1x Rentats amb PBS 1x 3 cops de 5'
MONTATGE	Posem una gota de DAKO diluent i posem un cubre.

Les immunofluorescència realitzada en fibroblasts control i reprogramats, que provenen de portes on s'han col·locat directament les cèl·lules, s'han deixat secar i s'han guardat fins a la realització de la immunofluorescència a 4°C, realitzarem el protocol següent:

FIXACIÓ	10-15' amb PFA 4% a temperatura ambient (RT) Rentat 3 x TBS 1x 5'
PERMEABILITZACIÓ i BLOQUEIG	60' en 6% donkey serum en TBS 1x - 0.5% tritó Rentats amb TBS 1x
ANTICÓS PRIMARI	Anticós primari en 6% donkey serum en TBS 1x-0.1% tritó ON a 4°C Rentats amb TBS 1x 3 cops de 5'
ANTICÓS SECUNDARI	2 h d'anticós secundari en 6% donkey serum en TBS 1x-0.1% tritó Rentats amb TBS 1x 3 cops de 5'
TINCIÓ NUCLIS	10' de Hoechst en TBS 1x Rentat 3 x TBS 1x 5'
MONTATGE	Posem una gota de DAKO diluent i el cubre.

PROTOCOL DE WESTERN BLOT

La tècnica de Western Blot permet detectar les proteïnes que es troben en una mostra. En aquesta tesi, hem realitzat dos tipus d'extracció de proteïna i de gel. La extracció àcida de proteïna ha estat utilitzada per determinar l'enriquiment de marques epigenètiques i s'ha utilitzat un tipus de gel Tris-Tricine. Per altres tipus de proteïnes s'utilitza la extracció proteica normal i gel SDS-PAGE.

PREPARACIÓ MOSTRA

- EXTRACCIÓ ÀCIDA DE PROTEÏNES

Rentar cèl lules amb PBS
Scrape les cèl lules en 1 ml de PBS
Centrifugar a 1500 rpm 5 minuts a 4°C
Descartem el sobrenadant
Resuspenem en pellet en Lysis Buffer (10mM HEPES pH7.9, 1.5mg MgCl₂, 10mM KCL, 0.5 mM DTT, 1,5mM PMSF i H₂O)
Afegir HCl per obtenir una concentració final de 0.2N.
Incubar en gel durant 30 minuts
centrifugar a 11000 rpm durant 10 minuts a 4°C
Quantifiquem i guardem a -80°C

- EXTRACCIÓ PROTEÏNA

Rentar cèl lules amb PBS
Scrape les cèl lules en 1 ml de PBS
Centrifugar a 1500 rpm 5 minuts a 4°C
Descartem el sobrenadant
Resuspenem en pellet en TDLB Buffer
Soniquem 30"ON-10"OFF *6 cicles, centrifuguem i recullim sobrenadant
Quantifiquem i guardem a -80°C

La quantificació es realitza mitjançant el mètode d'assaig de proteïnes de Bio-Rad DC (modificació del mètode de LOWRY).

CARGA DEL GEL I ELECTROFORESIS

Les proteïnes es separen pel seu pes molecular mitjançant la tècnica d'electroforesis.

Agafarem la quantitat de mostra que ens interessi
Afegirem la proporció de Laemmli 4x
Desnaturalitzarem la mostra calentantla a 95°C durant 5'
Carreguem les mostres i el marcador de pes molecular en el gel Tris Tricine (16% running i 4% stacking)
Es corren les mostres durant 4-5 hores a 120V.

Agafarem la quantitat de mostra que ens interessi
Afegirem la proporció de Laemmli 4x
Desnaturalitzarem la mostra calentantla a 95°C durant 5'
Carreguem les mostres i el marcador de pes molecular en el gel
Es corren les mostres durant 1-2 hores a 120V.

TRANFERÈNCIA

Transferim la mostra en una membrana PVDF
Es transfereix durant 1h 30 minuts a 90V a temperatura ambient.

BLOQUEIG, ANTICÓS PRIMARI, I SECUNDARI

Bloquem la membrana amb TBS tween 5% llet o 5% BSA (depenen de l'anticós) durant 1h, per evitar unions inespecífiques.
Incubem l'anticós primari durant tota la nit a 4°C
Es renta 3 cops amb TBS tween durant 10 minuts cada un
Incubem l'anticós secundari durant 1h a temperatura ambient

REVELAT

Afegim reactiu ECL (*enhanced chemiluminescence*)
Revelem en el equip LASS 4000

PROTOCOL DE SECRECIÓ I CONTINGUT D'INSULINA

Els estudis de secreció d'insulina es van realitzar en cèl·lules fibroblàstiques control i reprogramades i cultivades en cultius 2D i 3D. Es van determinar la secreció i el contingut d'Insulina i de Pèptid C

PROTOCOL	Eliminar medi Rentar amb PBS Afegir 1ml de buffer de secreció suplementat amb 2mM de glucosa Incubar durant 1h Eliminar el buffer de secreció suplementat amb 2mM Afegir 0.5ml de buffer de secreció suplementat amb: - 2mM glucosa - 20mM glucosa - 2mM glucosa +30mMKCL Incubar durant 2-3h
SECRECIÓ	Recullir el buffer centrifugar a màx velocitat 14000rpm recullir sobrenadant i guardar a -20°C fins a la quantificació amb Kit ELISA específic
CONTINGUT	Tripsinitzar les cèl·lules recullir-les en 50ul de solució Àcid - Alcohol Sonicar mostres (10 sec ON - 30 sec OFF) centrifugar a màx velocitat durant 25min a 4°C neutralitzar amb 50ul de TRIS pH 7.5 guardar a -20°C fins a la quantificació amb el Kit ELISA específic

Els Kits utilitzats per l'estudi d' Insulina i Pèptid C són:

- detecció d'insulina: Kit ELISA de Chrystal Chem (90095) i Kit ELISA de Mercodia (10-1132-01)

- detecció de Pèptid C: Kit ELISA de Mercodia (10-1141-01)

SOLUCIÓ I NaCl (460mM) + H₂O

SOLUCIÓ II NaHCO₃ (96mM) + KCL (20mM) + MgCl₂·6H₂O (4mM) + H₂O

SOLUCIÓ III CaCl₂·2H₂O (4mM) + H₂O

HEPES 1M 26.03g Hepes + H₂O

GLUCOSA 1M D-(+) glucosa-H₂O 1.981g + H₂O

ÀCID-ALCOHOL Etanol absolut 75ml + HCl 37% 1.5ml + H₂O 23.5ml

Buffer de secreció: 6.25ml de SOLUCIÓ I + 6.25ml de SOLUCIÓ II + 6.25ml de SOLUCIÓ III + 0.5ml HEPES 1M + 0.125g BSA + 5.75ml H₂O, Ajustar a pH 7.4. SUPLEMENTAR AMB GLUCOSA

PROTOCOL DE DETECCIÓ FLUX DE CALCI

La tècnica de detecció de flux de calci, utilitzen molècules fluorescents que s'uneixen al calci i dona lloc a un increment de l'excitació de fluorescència a 488nm que es pot detectar mitjançant microscopia confocal.

PREPARACIÓ MOSTRA

Rentar les cèl·lules amb PBS
Afegir 100ul de solució Fluor 4-AM (Invitrogen)
Incubar a les fosques durant 60' a RT
Rentar les cèl·lules amb PBS
Afegir Buffer Secreció d'insulina-suplementat amb 2mM de glucosa
Mantenir a les fosques fins l'adquisició d'imatges.

ADQUISICIÓ IMATGES

El Fluor 4-AM es detecta a 488nm. Es recullen imatges cada 1s. Les cèl·lules es cultiven en Buffer de secreció d'insulina (2mM de glucosa) i s'afegeix glucosa i KCl en el medi:

- les cèl·lules amb el Buffer de Secreció d'insulina suplementat amb 2 mM
- 5' més tard s'afegeix la glucosa (1M) per obtenir una concentració final de 20mM
- Posteriorment s'afegeix KCl (1M) per obtenir una concentració final de 30mM

ANÀLISIS DE RESULTATS

S'analitza l'intensitat del Fluor 4-AM durant tot el temps de l'experiment
Es realitza un video amb Image J

TRASPLANTAMENT DE CÈL·LULES FIBRO- β EN RATOLINS

Trasplantament de cèl·lules Fibro- β sota la càpsula renal d'animal immunodeprimit

Es segueix la guia i les recomenacions de FELASA per l'ús d'animals d'experimentació de laboratori.

El procediment de trasplantament és aprovat per el comitè de recerca amb animals de L'IDIBELL, és aprovat per el comitè de recerca amb animals de L'IDIBELL, on es realitzen els experiments de trasplantament de cèl·lules Fibro-B sota la càpsula renal.

Ratolí NUDE (Harlan), tenen entre 8-14 setmanes d'edat.

Les cèl·lules reprogramades són tripsinitzades, netejades amb PBS i introduïdes dintre d' un catèter per ser trasplantades sota la càpsula renal.

Realitzat per la Dra Noèlia Tellez.

bolus glucosa	14 dies després del trasplant de les cèl·lules sota la càpsula renal, els animals es deixen en dejú 5 h i s'introdueix un bolus de glucosa (2g de D glucosa/Kg de pes de l'animal). Es determina la glucosa en sang mitjançant un glucòmetre (Accu-check, Roche). Els nivells de insulina humana són determinats, en sang recollida desde la vena safena, a temps 0 i 30 després de la càrrega intraperitoneal de glucosa.
ANÀLISIS DE RESULTATS	La insulina humana es determina mitjançant el kit ELISA d'insulina (Mercodia 10-1132-01). S'extreu l'empelt després del bolus de glucosa, es fixa amb 4% de PFA i es realitza la parafinització. Es realitzen les tincions amb l'anticòs d'insulina (1:50, Dako)

Trasplantament de cèl·lules Fibro- β a l'ull d'un ratolí C57black6

Es segueix la guia i les recomenacions de FELASA per l'ús d'animals d'experimentació de laboratori.

El procediment de trasplantament a l'ull és aprovat per el comitè de recerca amb animals de L'IDIBAPS.

Ratolí utilitzats tenen entre 8-14 setmanes d'edat. Les cèl·lules reprogramades són introduïdes dintre d' un catèter per ser trasplantades a l'ull de l'animal.

Realitzat per Hugo Figueredo.

Bolus glucosa	10 dies després del trasplant de les cèl·lules a l'ull, els animals es deixen en dejú 5h s'introdueix un bolus de glucosa (2g de D glucosa/Kg de pes de l'animal) Es determina la glucosa en sang mitjançant un glucòmetre (Accu-check, Roche). Els nivells d'insulina humana són determinats en l'humor vitri de l'ull i de la sang recollida de la cua del animal a temps 0 i 30' després de la càrrega intraperitoneal de glucosa.
ANÀLISIS DE RESULTATS	La insulina humana es determina mitjançant el kit ELISA d'insulina humana de Crystal Chem i Mercodia.

Inhibidors i molècules solubles utilitzats pels tractaments:

- **GSK-J4:** Inhibidor la demetilasa Jmjd3/Utx. TOCRIS
- **GSK-126:** Inhibidor la metiltransferasa EZH2. ACTIVE BIOCHEMICALS
- **EI-1:** Inhibidor la metiltransferasa EZH2. MERCK
- **Forskolina:** molècula activadora de l'adenilat ciclasa que incrementa els nivells d'AMP cíclic activant la via de la proteïna Kinasa A (PKA) involucrada en la estimulació de la secreció d'insulina. La forskolina s'ha utilitzat en protocols d'obtenció de cèl·lules productores d'insulina. SIGMA
- **Nicotinamida adenina dinucleòtid (NAD)** és un coenzim metabòlic que participen en la biosíntesis i com a molécula senyalitzadora. SIGMA
- **GABA:** L'àcid gamma-aminobutíric és un aminoàcid produït per les pròpies cèl·lules β . SIGMA
- **Exendin4:** Anàleg de GLP-1, agonista del receptor GLP-1R. SIGMA
- **Tapsigargina:** inhibidor no-competitiu de la Ca^{2+} -ATPasa del reticle sarcoendoplàsmic SERCA. Augmenta la concertació de calci intracel·lular del citosol bloquejant la capacitat de la cèl·lula de bombejar el calci cap a l'interior del reticle sarcoplasmàtic i endoplasmàtic. Inhibeix específicament la fusió dels autofagomes amb els lisosomes: últim pas del procés autofàgic. Aquesta inhibició induïx estrès del reticle endoplasmàtic. SIGMA

Estadística: Els valors són presentats Mitjana \pm S.E.M. La significança estadística es va provar usant T-Student.

Aparells utilitzats per la quantificació:

Quantificació marcatge IF: Imatges captades per el microscopi *Leica DMI 6000B* i el microscopi confocal *Leica TCS SPE*. Quantificació marcatge IF per *Image J*.

Quantificació Proteïna: Imatges captades per *LASS4000* i quantificades per *Image Studio Lite Ver 5.0* i *Image J*.

Quantificació expressió gènica: Real time PCR a temps real per *7900HT Fast Real Time PCR System* (Applied BioSystem) i quantificació mitjançant el programa informàtic *SDS 2.4*.

llista encebadors

A Encebadors de ratolí usats per anàlisi ChIP

	Seqüències (5'-3' i 3'-5')
mNeuroD1 prox	CCACAAAGGGTTAATCTCTCC ACAGTACCTCGCCCTG
mAtoh8 prox	CAACAAGGCTGGCAATGAAG CGCTTTAAGAACAAGAAAGC
mAtoh8 dist	CTCCAAAGCAAGAACCTCATCA GGGCAACACACTCACTACCTCTA
mNeurog3 enh	GACCTCGCTCGCGAGAT TGCTGGGGTTCTTTGAGGA
mNeurog3 prox	CCACCTAGCCCACTCATACC CGCCGGCTCTTGGTGTTT
mPax4 prox	ACACGAATCCCACCCACTCT TCCCTCTGTGATTCCTTGACTGA
mPax4 enh	GTGCACAAGACRRTGAG CAGCGGTTTGGGCTAAT
mMyoD	CATTGTCCCGTAGCCTTGAG GCCACCGCGGTAGCACTTG
mBeta Actin	AACAAGAGGCCACAAATAGG ACCTCTGGGTGGATGTC
mNkx2.2 prox	TTGGCTTCGATGGCTCTTT CCACGGAGAAATCCCACCTC

B Encebadors de ratolí i hamster usats per expressió gència

	Seqüències (5'-3' i 3'-5')
mTBP	ACCCCTCACCAATGACTCCTATG ATGAGACTCGCAGCAATCCG
mNeuroD1	GGATCAATCTCTCTCCGGTG TCCGAATGGTATCGAAAGAC
mAtoh8	AAGAAGTGAACGGCTCAAGAAGC GATCGGAAAGGTTGTGTCC
mPax4	GAGTACCTCGCTCTTTTGGC ACTCGATTGATAGAGCACACT
mNkx2.2	GGCTCCAATACTCCTGGAC GTCAATGTCCGGTGAATCGT
mInsm1	AAAGATGCAATCTCCGGC TAGCACGTTTCGATCCGCC
mNeurog3	TTCTCATCGTAGCCTTGTG GCAGACTCACAGGAAGTATGG
mFoxa2	CCCTACCCAACTGAACCTCG GTTCTCCGGTAGAAAGGGA
mPax6	TACCAGTGTACAGCCCAAT TGCACGATGAGAGGCTCT
mPck1/3	AGTTGGACATAGAATGCTG GCCTCTGGGCTAGTCTGC

Seqüències (5'-3' i 3'-5')

ACCOCAGACTCGTCAAGTTTC
ATCATTCTGTCTGGTTGGGG
CTCCAAATGCCAGCTGTCC
TCCGTTTGCATCTGAGGG
AGGGACACCAAGGTGATGA
AGCAGATTTGGTGTCCGAG
CCTGTAGAGGAAGCCGAGGAA
CTCCCCAGTCCAGTATAGC
CCCCAGTTTCAAGCTCGCT
CTCGTTCATTCGGAAAGG
CCCATCAGGAGGCCAGTGA
TCACCAGCATCCCCCTGAAG

mSst
mIapp
mChromA
mMafA
mPdx1
mGck
hNkx6.1

AACACAGAGACCCACGTTT
TCTCTGGCCAGCCCAAGTA

D Encebadors humans usats per expressió gència

	Seqüències (5'-3' i 3'-5')
hCD49a	GGTGGCTCCTACTGTTGTT CTCCATTTGGTTGGTACT
hCD29	CAAAGGACAGCAGAAAGC ATTGATGAACAGGTTCCATAAGG
hCD109	GTGGGAGTCTAAAGCGAAG GGTGCAGGATCAGAAAGTT
hCDKN2c	GGGACCTAGAGCACTTACT GGCAATCTCGGGATTTCCAG
hFOXF2	CTACTTGCACCAAGACCTC CGCAGGCCTAATATCTGACA
hITGA4	CCCAGGATCATCTACTGGA TATGCTGGTCCGAAATGAC
hCOL1A1	CTCGAGTGGACACACCCCT CAGTGGATGGCCACATCGG
hP4H	TCGAGTCCACAGCAGACA GAACAGAGGATGTGATCTTGA
hTWIST2	CGCAAGTGAATTTGGATGC CGATGACTGCTGTCCCTT
hLHX9	TGCCAAGGACGGTAGCAATT GGAGCTCAGGTGGTAGACAG
hPRRX1	CGAGAGTCCAGGTGTGGTTT GAGCAGACCGAGGTACGATG

Seqüències (5'-3' i 3'-5')

ATCCCTCCCCATGACTCCCATG
ATGATTACCGCAGAAACCCG
AGGAAGAAGGAGAGGAGGATG
TTGGTGGTGGGTTGGATAAG
AGCAGAGGACTCCAGTAAAGATT
CAGTGCATTTCCCACTTGAAGTT
CTTCTAGACAGGAGCAGAACCCG
CCTTGGAAAGACACTGGCCGTTT
TTTTGAAACCCCACTTTTAC
CGAGACAGACCGCATTT
GGTCCCTACTCCCAAGTCTCC
CTCAGCAGCGGAAAGGTGG

Seqüències (5'-3' i 3'-5')

AACTTTGTCTGGGGCACAC
GGACCTCTCGTCTCTCTCT
AAGCAAAACCAATTCACCTGGC
TCACCATCAAGCCTGTCCATTTCT
CCGGTTCCTCTCTGTGTC
AGCAAGGGAAGCTTTCCGA
ACAAAACGCAAAACCCAGT
AAAGACCAATTCAGATTAGGA
ACAACCCCTCTCCCGATTG
TGAATGGTGGAGAGATGGA
AGTGTCTGCCAGGTGCTTT
GACAGCAATAGCTGTGGGA
ATCCAACTGGAAGAAACCC
CATGTGCCACTCACAAA
GCAAGAGGTTGTCTAAAGG
GGAATGTGCTGGTCTCTGT
GAGGGAAGTCCACTCTCGGG
TGTGAGGACGCTGAAAGTGG
CTTCCCTCAGTTTTCCGGTGG
TTGATTCACAGAGAAAGGTG
CTCTGCCCTCAGTCAACCT
CTGGAGAAATGGTGTGCTC
CCACAGGTCACATCCACG
CTGGGAAATCTGGCCCTCC
ACCAAGCCGCTTCTCCATCTC
GGTGTGTCATAGTCTCGCC

Seqüències (5'-3' i 3'-5')

GAGCGCTGCTGATCTCCTGATT
ATGCAGAAAAGCAGCTCTGACG
AGACCTCATGAACCCGACAG
GGCTGTGGCTTTTCTCTC
TGTGCACAGCATCCACTC
CACTTGCACCTCAATGGAGAA
CTTCAGCAAGGAGGAGTCA
TTGTACAGGTCCTCCCTCTTT
TTTGTGGTGGAG GAGCAGG
AGCCAAAGATGGCCACGATGCTC
TCAGCAAGGAGGAGGTCAT
CTCTGGAGTTGGCACCTC
GACTTCAGCCACCCCATC
CTTGACCATCTTCCACAC
GGCTGTCTCTCATAGT
GCAGCTCAAGAAATGCTTC
GTGGACGACGGAATTTG
GGAGTTACAGCCGAGTCA
AGCAAGCCACATCAAGAC
CTGTAGCCGATCTGTGGGG
TGGGCTCGAAGAGGATGTG
GCATAGTCTGCTTGTATCG
AACTTTGCTTGGGGCACAC
GGGACCTCTGGTTCTCTCT
GGGAGCGGTGAAGATGGA
TCATGTTGCTCAGGAGGAGTA

hSCL30A8
hSUR1
hKIR6.2
hMafA
hGLUT1
hMAFA CDS
hHNF1A
hHNF4A
hSOX17
hSOX9
hOCT4
hMAFB
hFOXA2

hMAFB
hPCSK1
hPCSK2
hSL1
hGLIS3
hMYT1
hSLC22A2
hARX
hUCN3
hGK
hRFK6
hGCG
hHNF1B

173

A Anticossos primaris

ANTICOSSOS	MARQUES COMERCIALS / REACTIVITAT		
	MOUSE	RABBIT	GUINEA PIG
H3K27ME3	ABCAM 1:500	MILLIPORE 2.5ug	DAKO 1:1000
H3K27AC		ABCAM 2.5ug	
H3K4ME3		MILLIPORE 2.5ug	
HISTONA 3	ABCAM 1:1000		
HA	SIGMA 1:1000		
TUBULINA	SIGMA 1:1000		
INSULINA			
GLUCAGON	SIGMA 1:250		
PEPTID C	ABCAM (8297) 1:200		
VIMENTINA	SIGMA 1:200		
HOECHST	SIGMA 1:1000		

ChIP W.B IF

B Anticossos secundaris

ANTICOSSOS	MARQUES COMERCIALS / REACTIVITAT		
	MOUSE	RABBIT	GUINEA PIG
IgG peroxidase	GE healthcare	GE healthcare	MOL. PROBES
ALEXA FLUOR 555			
AMCA	JACKSON I.R		
CY2	JACKSON I.R	JACKSON I.R	
CY3	JACKSON I.R	JACKSON I.R	

1:1000 - W.B 1:250 - IF

C Adenovirus utilitzats

ADENOVIRUS	ESPÈCIE
Ad- CMV- NeuroD1	Ratolí
Ad- CMV- NEUROG3 -flag	Humà
Ad- CMV- NEUROG3 -HA	Humà
Ad- CMV- Pdx1	Ratolí
Ad- CMV- PNM	Ratolí
Ad- CMV- MAFA	Humà
Ad- CMV- NKX2.2	Humà
Ad- CMV- NKX6-1	Hàmster
Ad- CMV- Pax4	Ratolí
Ad- CMV- shAtoh8	Ratolí
Ad- CMV- shscrambled	Ratolí

BIBLIOGRAFIA

- A.M. James Shapiro., Jonathan R.T. Lakey., Edmond A. Ryan., Gregory S. Korbitt., Ellen Toth., Garth Warnock., N. M. K. and R. V. (2000). Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes is let transplantation in patients with diabetes using glucocorticoid - free immunosuppressive regime. *The New England Journal of Medicine*, 343.
- Abdulreda MH, Caicedo A, B. P. (2013). A Natural Body Window to Study Human Pancreatic Islet Cell Function and Survival - *Cell*4, 1(2), 111–122.
- Ahlgren, U., Jonsson, J., & Edlund, H. (1996). The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice. *Development (Cambridge, England)*, 122(5), 1409–1416. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90391-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90391-1)
- Ahlgren, U., Jonsson, J., Jonsson, L., Simu, K., & Edlund, H. (1998). beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipf1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes & Development*, 12(12), 1763–1768. <https://doi.org/10.1101/gad.12.12.1763>
- Ahmad, Z., Rafeeq, M., Collombat, P., & Mansouri, A. (2015). Pax6 inactivation in the adult pancreas reveals ghrelin as endocrine cell maturation marker. *PLoS ONE*, 10(12), 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144597>
- Akinci, E., Banga, A., Tungatt, K., Segal, J., Eberhard, D., Dutton, J. R., & Slack, J. M. W. (2013). Reprogramming of various cell types to a beta-like state by Pdx1, Ngn3 and MafA. *PLoS ONE*, 8(11), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082424>
- Akiyama, T., Wakabayashi, S., Soma, A., Sato, S., Nakatake, Y., Oda, M., ... Ko, M. S. H. (2016). Transient ectopic expression of the histone demethylase JMJD3 accelerates the differentiation of human pluripotent stem cells. *Development (Cambridge, England)*, 143(20), 3674–3685. <https://doi.org/10.1242/dev.139360>
- Anderson, K. R., Torres, C. A., Solomon, K., Becker, T. C., Newgard, C. B., Wright, C. V., ... Sussel, L. (2009). Cooperative transcriptional regulation of the essential pancreatic islet gene *neuroD1* (*Beta2*) by *Nkx2.2* and *neurogenin 3*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(45), 31236–31248. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.048694>
- Ariyachet, C., Tovaglieri, A., Xiang, G., Lu, J., Shah, M. S., Richmond, C. A., ... Zhou, Q. (2016). Reprogrammed Stomach Tissue as a Renewable Source of Functional β Cells for Blood Glucose Regulation. *Cell Stem Cell*, 18(3), 410–421. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.01.003>
- Arnes, L., Leclerc, K., Friel, J. M., Hipkens, S. B., Magnuson, M. A., & Sussel, L. (2012). Generation of *Nkx2.2:lacZ* mice using recombination-mediated cassette exchange technology. *Genesis*, 50(8), 612–624. <https://doi.org/10.1002/dvg.22037>
- Arnes, L., & Sussel, L. (2015). Epigenetic modifications and long noncoding RNAs influence pancreas development and function. *Trends in Genetics*, 31(6), 290–299. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.02.008>
- Bai, L. (2005). Glucagon-like peptide-1 enhances production of insulin in insulin-producing cells derived from mouse embryonic stem cells. *Journal of Endocrinology*, 186(2), 343–352. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06078>
- Bastidas-Ponce, A., Scheibner, K., Lickert, H., & Bakhti, M. (2017). Cellular and molecular mechanisms coordinating pancreas development. *Development*, 144(16), 2873–2888. <https://doi.org/10.1242/dev.140756>
- Ben-Othman, N., Vieira, A., Courtney, M., Record, F., Gjernes, E., Avolio, F., ... Collombat, P. (2017). Long-Term GABA Administration Induces Alpha Cell-Mediated Beta-like Cell Neogenesis. *Cell*, 168(1–2), 73–85.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.002>
- Benhar, I., London, A., & Schwartz, M. (2012). The privileged immunity of immune privileged organs: The case of the eye. *Frontiers in Immunology*, 3(SEP), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00296>
- Benthuyssen, J. R., Carrano, A. C., Sander, M., Talchai, C., Xuan, S., Lin, H., ... Rong, Z. (2016). Advances in β cell replacement and regeneration strategies for treating diabetes. *Journal of*

- Clinical Investigation*, 126(10), 3651–3660. <https://doi.org/10.1172/JCI87439>
- Bruin, J. E., Erenner, S., Vela, J., Hu, X., Johnson, J. D., Kurata, H. T., ... Kieffer, T. J. (2014). Characterization of polyhormonal insulin-producing cells derived in vitro from human embryonic stem cells. *Stem Cell Research*, 12(1), 194–208. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.10.003>
- Bruin, J. E., Rezania, A., Xu, J., Narayan, K., Fox, J. K., O'Neil, J. J., & Kieffer, T. J. (2013). Maturation and function of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors in macroencapsulation devices following transplant into mice. *Diabetologia*, 56(9), 1987–1998. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2955-4>
- Cano, D. A., Soria, B., Martín, F., & Rojas, A. (2014). Transcriptional control of mammalian pancreas organogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(13), 2383–2402. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1510-2>
- Cerf, M. E. (2006). Transcription factors regulating β -cell function. *European Journal of Endocrinology*, 155(5), 671–679. <https://doi.org/10.1530/eje.1.02277>
- Cervantes, S., Fontcuberta-Pisunyer, M., Servitja, J.-M., Fernandez-Ruiz, R., Garcíá, A., Sanchez, L., ... Gasa, R. (2017). Late-stage differentiation of embryonic pancreatic β -cells requires Jarid2. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11691-2>
- Chen, Y. J., Finkbeiner, S. R., Weinblatt, D., Emmett, M. J., Tameire, F., Yousefi, M., ... Stanger, B. Z. (2014). De Novo Formation of Insulin-Producing “Neo- β Cell Islets” from Intestinal Crypts. *Cell Reports*, 6(6), 1046–1058. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.02.013>
- Cho, C. H. H., Hannan, N. R. F., Docherty, F. M., Docherty, H. M., Lima, M. J., Trotter, M. W. B., ... Vallier, L. (2012). Inhibition of activin/nodal signalling is necessary for pancreatic differentiation of human pluripotent stem cells. *Diabetologia*, 55(12), 3284–3295. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2687-x>
- Churchill, A. J., Gutiérrez, G. D., Singer, R. A., Lorberbaum, D. S., Fischer, K. A., & Sussel, L. (2017). Genetic evidence that Nkx2.2 acts primarily downstream of Neurog3 in pancreatic endocrine lineage development. *eLife*, 6, 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.20010>
- Collombat, P., Mansouri, A., Hecksher-sørensen, J., Serup, P., Krull, J., Gradwohl, G., & Gruss, P. (2003). Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development, 4, 2591–2603. <https://doi.org/10.1101/gad.269003>
- Collombat, P., Xu, X., Ravassard, P., Sosa-Pineda, B., Dussaud, S., Billestrup, N., ... Mansouri, A. (2009). The Ectopic Expression of Pax4 in the Mouse Pancreas Converts Progenitor Cells into α and Subsequently β Cells. *Cell*, 138(3), 449–462. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.035>
- Courtney, M., Gjernes, E., Druelle, N., Ravaud, C., Vieira, A., Ben-Othman, N., ... Collombat, P. (2013). The Inactivation of Arx in Pancreatic α -Cells Triggers Their Neogenesis and Conversion into Functional β -Like Cells. *PLoS Genetics*, 9(10), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003934>
- D'Amour, K. A., Agulnick, A. D., Eliazer, S., Kelly, O. G., Kroon, E., & Baetge, E. E. (2005). Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nature Biotechnology*, 23(12), 1534–1541. <https://doi.org/10.1038/nbt1163>
- D'Amour, K. a, Bang, A. G., Eliazer, S., Kelly, O. G., Agulnick, A. D., Smart, N. G., ... Baetge, E. E. (2006). Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 24(11), 1392–1401. <https://doi.org/10.1038/nbt1259>
- Dolensek, J., Rupnik, M. S., & Stozer, A. (2015). Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets*, 7(1), 2–9. <https://doi.org/10.1080/19382014.2015.1024405>
- Domínguez-Bendala, J., Lanzoni, G., Klein, D., Álvarez-Cubela, S., & Pastori, R. L. (2016). The Human Endocrine Pancreas: New Insights on Replacement and Regeneration. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 27(3), 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.12.003>

- Dong, S., & Wu, H. (2017). Regenerating β cells of the pancreas – potential developments in diabetes treatment. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 0(0), 1–11. <https://doi.org/10.1080/14712598.2018.1402885>
- Doyle, M. J., & Sussel, L. (2007). Nkx2.2 Regulates B- Cell Function in the Mature Islet. *Diabetes*, 56(August), 1999–2007. <https://doi.org/10.2337/db06-1766>.
- Ejarque, M., Altirriba, J., Gomis, R., & Gasa, R. (2013). Characterization of the transcriptional activity of the basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor Atoh8. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(11), 1175–1183. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.08.003>
- Ejarque, M., Mir-Coll, J., Gomis, R., German, M. S., Lynn, F. C., & Gasa, R. (2016). Generation of a conditional allele of the transcription factor Atonal Homolog 8 (Atoh8). *PLoS ONE*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146273>
- Gao, T., McKenna, B., Li, C., Reichert, M., Nguyen, J., Singh, T., ... Stanger, B. Z. (2014). Pdx1 maintains β cell identity and function by repressing an α cell program. *Cell Metabolism*, 19(2), 259–271. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.12.002>
- Gasa, R., Mrejen, C., Leachman, N., Otten, M., Barnes, M., Wang, J., ... German, M. (2004). Proendocrine genes coordinate the pancreatic islet differentiation program in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(36), 13245–13250. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405301101>
- Gasa, R., Mrejen, C., Lynn, F. C., Skewes-Cox, P., Sanchez, L., Yang, K. Y., ... German, M. S. (2008). Induction of pancreatic islet cell differentiation by the neurogenin-neuroD cascade. *Differentiation*, 76(4), 381–391. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2007.00228.x>
- Gierl, M. S., Karoulias, N., Wende, H., Strehle, M., & Birchmeier, C. (2006). The Zinc-finger factor Insm1 (IA-1) is essential for the development of pancreatic β cells and intestinal endocrine cells. *Genes and Development*, 20(17), 2465–2478. <https://doi.org/10.1101/gad.381806>
- Gittes, G. K. (2009). Developmental biology of the pancreas: A comprehensive review. *Developmental Biology*, 326(1), 4–35. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.10.024>
- Gradwohl, G., Dierich, a, LeMeur, M., & Guillemot, F. (2000). Neurogenin3 Is Required for the Development of the Four Endocrine Cell Lineages of the Pancreas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(4), 1607–1611. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.4.1607>
- Gomis R, Rovira, A., Feliu, J.E., Oyarzabal, M. 2007. Tratado SED de diabetes mellitus. Bases moleculares, clínicas y tratamiento. Editorial medica Panamericana.
- Gu, C., Stein, G. H., Pan, N., Goebbels, S., Hörnberg, H., Nave, K. A., ... Lee, J. E. (2010). Pancreatic β Cells Require NeuroD to Achieve and Maintain Functional Maturity. *Cell Metabolism*, 11(4), 298–310. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.03.006>
- Gu, G., Dubauskaite, J., & Melton, D. A. (2002). Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development (Cambridge, England)*, 129(10), 2447–2457. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.012103.094648>
- Guz, Y., Montminy, M. R., Stein, R., Leonard, J., Gamer, L. W., Wright, C. V., & Teitelman, G. (1995). Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development (Cambridge, England)*, 121(1), 11–18.
- Gwiazda, K. S., Yang, T.-L. B., Lin, Y., & Johnson, J. D. (2009). Effects of palmitate on ER and cytosolic Ca²⁺ homeostasis in β -cells. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 296(4), E690–E701. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90525.2008>
- Habener, J. F., & Stanojevic, V. (2012). α -cell role in β -cell generation and regeneration © 2012 Landes Bioscience. Do not distribute. *Diabetes*, 4(3), 188–198.
- Ham, D., Kim, J., Park, H., Sun, C., Lee, S., Cho, J., ... Yoon, K. (2011). | Original Article | Generation of Insulin Producing Cells from the Mouse Primary Hepatocytes, 8(6), 564–573.
- Haumaitre, C., Lenoir, O., & Scharfmann, R. (2008). Histone Deacetylase Inhibitors Modify

- Pancreatic Cell Fate Determination and Amplify Endocrine Progenitors. *Molecular and Cellular Biology*, 28(20), 6373–6383. <https://doi.org/10.1128/MCB.00413-08>
- Heremans, Y., Van De Castele, M., in't Veld, P., Gradwohl, G., Serup, P., Madsen, O., ... Heimberg, H. (2002). Recapitulation of embryonic neuroendocrine differentiation in adult human pancreatic duct cells expressing neurogenin 3. *The Journal of Cell Biology*, 159(2), 303–312. <https://doi.org/10.1083/jcb.200203074>
- Hong, S., Cho, Y., Yu, L., Yu, H., Veenstra, T. D., & Ge, K. (2007). Identification of JmjC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases. *104(47)*, 18439–18444.
- Huang, H. P., Liu, M., El-Hodiri, H. M., Chu, K., Jamrich, M., & Tsai, M. J. (2000). Regulation of the pancreatic islet-specific gene BETA2 (neuroD) by neurogenin 3. *Mol Cell Biol*, 20(9), 3292–3307. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.9.3292-3307.2000>
- Inoue, C., Bae, S. K., Takatsuka, K., Inoue, T., Bessho, Y., & Kageyama, R. (2001). Math6, a bHLH gene expressed in the developing nervous system, regulates neuronal versus glial differentiation. *Genes to Cells*, 6(11), 977–986. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2001.00476.x>
- Jansson, L., & Carlsson, P. (2002). Graft vascular function after transplantation of pancreatic islets. 749–763. <https://doi.org/10.1007/s00125-002-0827-4>
- Jennings, R. E., Berry, A. A., Kirkwood-Wilson, R., Roberts, N. A., Hearn, T., Salisbury, R. J., ... Hanley, N. A. (2013). Development of the human pancreas from foregut to endocrine commitment. *Diabetes*, 62(10), 3514–3522. <https://doi.org/10.2337/db12-1479>
- Jensen, J., Pedersen, E. E., Galante, P., Hald, J., Heller, R. S., Ishibashi, M., ... Madsen, O. D. (2000). Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nature Genetics*, 24(1), 36–44. <https://doi.org/10.1038/71657>
- Johansson, K. A., Dursun, U., Jordan, N., Gu, G., Beermann, F., Gradwohl, G., & Grapin-Botton, A. (2007). Temporal Control of Neurogenin3 Activity in Pancreas Progenitors Reveals Competence Windows for the Generation of Different Endocrine Cell Types. *Developmental Cell*, 12(3), 457–465. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.02.010>
- Jonsson J., C. L. E. T. E. H. (1994). Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature*, 371(6498), 606–609.
- Kaneto, H., & Matsuoka, T. A. (2015). Role of pancreatic transcription factors in maintenance of mature β -cell function. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 6281–6297. <https://doi.org/10.3390/ijms16036281>
- Kartikasari, A. E. R., Zhou, J. X., Kanji, M. S., Chan, D. N., Sinha, A., Grapin-Botton, A., ... Bhushan, A. (2013). The histone demethylase Jmjd3 sequentially associates with the transcription factors Tbx3 and Eomes to drive endoderm differentiation. *The EMBO Journal*, 32(10), 1393–1408. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.78>
- Katz, L. S., Geras-Raaka, E., & Gershengorn, M. C. (2013). Reprogramming adult human dermal fibroblasts to islet-like cells by epigenetic modification coupled to transcription factor modulation. *Stem Cells and Development*, 22(18), 2551–2560. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0134>
- Keirstead, H. S. (2005). Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cell Transplants Remyelinate and Restore Locomotion after Spinal Cord Injury. *Journal of Neuroscience*, 25(19), 4694–4705. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0311-05.2005>
- Keller, G. (2005). New Insights into Early Human Development: Lessons for Stem Cell Derivation and Differentiation. *Genes & Development*, 19, 1129–1155. <https://doi.org/10.1101/gad.1303605>
- Khorsandi, L., Saremy, S., Khodadadi, A., & Dehbashi, F. (2016). Effects of exendin-4 on the differentiation of insulin producing cells from rat adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cell Journal*, 17(4), 720–729.
- Kim, Y., Kim, H., Ko, U. H., Oh, Y., Lim, A., Sohn, J.-W., ... Han, Y.-M. (2016). Islet-like organoids derived from human pluripotent stem cells efficiently function in the glucose responsiveness in vitro and in vivo. *Scientific Reports*, 6(May), 35145.

- <https://doi.org/10.1038/srep35145>
- Kimura, H. (2013). Histone modifications for human epigenome analysis. *Journal of Human Genetics*, 58(7), 439–445. <https://doi.org/10.1038/jhg.2013.66>
- Kirk, K., Hao, E., Lahmy, R., & Itkin-Ansari, P. (2014). Human embryonic stem cell derived islet progenitors mature inside an encapsulation device without evidence of increased biomass or cell escape. *Stem Cell Research*, 12(3), 807–814. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2014.03.003>
- Koblas, T., Leontovyc, I., Loukotova, S., Kosinova, L., & Saudek, F. (2016). Reprogramming of Pancreatic Exocrine Cells AR42J Into Insulin-producing Cells Using mRNAs for Pdx1, Ngn3, and MafA Transcription Factors. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 5(May), e320. <https://doi.org/10.1038/mtna.2016.33>
- Krapp, A., Knöfler, M., Ledermann, B., Bürki, K., Berney, C., Zoerkler, N., ... Wellauer, P. K. (1998). The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes and Development*, 12(23), 3752–3763. <https://doi.org/10.1101/gad.12.23.3752>
- Krentz, N. A. J., van Hoof, D., Li, Z., Watanabe, A., Tang, M., Nian, C., ... Lynn, F. C. (2017). Phosphorylation of NEUROG3 Links Endocrine Differentiation to the Cell Cycle in Pancreatic Progenitors. *Developmental Cell*, 41(2), 129–142.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.02.006>
- Kroon, E., Martinson, L. A., Kadoya, K., Bang, A. G., Kelly, O. G., Eliazar, S., ... Baetge, E. E. (2008). Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nature Biotechnology*, 26(4), 443–452. <https://doi.org/10.1038/nbt1393>
- Kunisada, Y., Tsubooka-Yamazoe, N., Shoji, M., & Hosoya, M. (2012). Small molecules induce efficient differentiation into insulin-producing cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research*, 8(2), 274–284. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2011.10.002>
- Larsen, H. L., & Grapin-Botton, A. (2017). The molecular and morphogenetic basis of pancreas organogenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 66, 51–68. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.01.005>
- Lee, J., Sugiyama, T., Liu, Y., Wang, J., Gu, X., Lei, J., ... Kim, S. K. (2013). Expansion and conversion of human pancreatic ductal cells into insulin-secreting endocrine cells. *eLife*, 2013(2), 1–22. <https://doi.org/10.7554/eLife.00940>
- Li, W., Nakanishi, M., Zumsteg, A., Shear, M., Wright, C., Melton, D. A., & Zhou, Q. (2014). In vivo reprogramming of pancreatic acinar cells to three islet endocrine.pdf, 1–20. <https://doi.org/10.7554/eLife.01846>
- Lu, J., Xia, Q., & Zhou, Q. (2017). How to make insulin-producing pancreatic β cells for diabetes treatment. *Science China Life Sciences*, 60(3), 239–248. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-0211-3>
- Lynn, F. C., Sanchez, L., Gomis, R., German, M. S., & Gasa, R. (2008). Identification of the bHLH factor Math6 as a novel component of the Embryonic Pancreas Transcriptional Network. *PLoS ONE*, 3(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002430>
- Lyttle, B. M., Li, J., Krishnamurthy, M., Fellows, F., Wheeler, M. B., Goodyer, C. G., & Wang, R. (2008). Transcription factor expression in the developing human fetal endocrine pancreas. *Diabetologia*, 51(7), 1169–1180. <https://doi.org/10.1007/s00125-008-1006-z>
- Mastracci, T. L., & Sussel, L. (2012). The endocrine pancreas: Insights into development, differentiation, and diabetes. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1(5), 609–628. <https://doi.org/10.1002/wdev.44>
- Matsuoka, T., Artner, I., Henderson, E., Means, A., Sander, M., & Stein, R. (2004). The MafA transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 2930–2933. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306233101>
- Matsuoka, T., Zhao, L., Artner, I., Harry, W., Friedman, D., Means, A., ... Jarrett, H. W. (2003). Members of the Large Maf Transcription Family Regulate Insulin Gene Transcription in Islet

- β Cells Members of the Large Maf Transcription Family Regulate Insulin Gene Transcription in Islet Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 23(17), 6049–6062. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.17.6049>
- Mellitzer, G., Bonn e, S., Luco, R. F., Van De Castele, M., Lenne-Samuel, N., Collombat, P., ... Heimberg, H. (2006). IA1 is NGN3-dependent and essential for differentiation of the endocrine pancreas. *The EMBO Journal*, 25(6), 1344–1352. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601011>
- Millman, J. R., & Pagliuca, F. W. (2017). Autologous pluripotent stem cell-derived β -like cells for diabetes cellular therapy. *Diabetes*, 66(5), 1111–1120. <https://doi.org/10.2337/db16-1406>
- Millman, J. R., Xie, C., Van Dervort, A., G rtler, M., Pagliuca, F. W., & Melton, D. A. (2016). Generation of stem cell-derived β -cells from patients with type 1 diabetes. *Nature Communications*, 7(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms11463>
- Mitchell, R. K., Nguyen-Tu, M. S., Chabosseau, P., Callingham, R. M., Pullen, T. J., Cheung, R., ... Rutter, G. A. (2017). The transcription factor Pax6 is required for pancreatic β cell identity, glucose-regulated ATP synthesis, and Ca²⁺ dynamics in adult mice. *Journal of Biological Chemistry*, 292(21), 8892–8906. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.784629>
- Miyashita, K., Miyatsuka, T., Matsuoka, T. A., Sasaki, S., Takebe, S., Yasuda, T., ... Shimomura, I. (2014). Sequential introduction and dosage balance of defined transcription factors affect reprogramming efficiency from pancreatic duct cells into insulin-producing cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 444(4), 514–519. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.083>
- Miyatsuka, T., Kosaka, Y., Kim, H., & German, M. S. (2011). Neurogenin3 inhibits proliferation in endocrine progenitors by inducing Cdkn1a. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(1), 185–190. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004842108>
- Murry, C. E., & Keller, G. (2008). Differentiation of Embryonic Stem Cells to Clinically Relevant Populations: Lessons from Embryonic Development. *Cell*, 132(4), 661–680. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.008>
- Naya, F. J., Huang, H. P., Qiu, Y., Mutoh, H., DeMayo, F. J., Leiter, A. B., & Tsai, M. J. (1997). Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/NeuroD-deficient mice. *Genes and Development*, 11(18), 2323–2334. <https://doi.org/10.1101/gad.11.18.2323>
- Nepton, S. (2013). Beta-Cell Function and Failure. *Type 1 Diabetes*. <https://doi.org/10.5772/52153>
- Nishimura, W., Takahashi, S., & Yasuda, K. (2014). MafA is critical for maintenance of the mature beta cell phenotype in mice. *Diabetologia*, 58(3), 566–574. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3464-9>
- Ohlsson, H., Karlsson, K., & Edlund, T. (1993). IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *The EMBO Journal*, 12(11), 4251–4259. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7901001> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC413720>
- Pagliuca, F. W., Millman, J. R., G rtler, M., Segel, M., Van Dervort, A., Ryu, J. H., ... Melton, D. A. (2014). Generation of functional human pancreatic β cells in vitro. *Cell*, 159(2), 428–439. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.040>
- Park, D. H., Hong, S. J., Salinas, R. D., Liu, S. J., Sun, S. W., Sgualdino, J., ... Lim, D. A. (2014). Activation of Neuronal Gene Expression by the JMJD3 Demethylase Is Required for Postnatal and Adult Brain Neurogenesis. *Cell Reports*, 8(5), 1290–1299. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.060>
- Pasini, D., Bracken, A. P., Jensen, M. R., Denchi, E. L., & Helin, K. (2004). Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *The EMBO Journal*, 23(20), 4061–4071. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600402>
- Pennarossa, G., Maffei, S., Campagnol, M., Tarantini, L., Gandolfi, F., & Brevini, T. A. L. (2013). Brief demethylation step allows the conversion of adult human skin fibroblasts into insulin-secreting cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(22), 8948–8953.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.1220637110>
- Pin, C. L., Michael Rukstalis, J., Johnson, C., & Konieczny, S. F. (2001). The bHLH transcription factor Mist1 is required to maintain exocrine pancreas cell organization and acinar cell identity. *Journal of Cell Biology*, *155*(4), 519–530. <https://doi.org/10.1083/jcb.200105060>
- Pujadas, G., Felipe, F., Ejarque, M., Sanchez, L., Cervantes, S., Lynn, F. C., ... Gasa, R. (2011). Sequence and epigenetic determinants in the regulation of the Math6 gene by Neurogenin3. *Differentiation*, *82*(2), 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2011.05.006>
- Rezania, A., Bruin, J. E., Arora, P., Rubin, A., Batushansky, I., Asadi, A., ... Kieffer, T. J. (2014). Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, *32*(11), 1121–1133. <https://doi.org/10.1038/nbt.3033>
- Rezania, A., Bruin, J. E., Riedel, M. J., Mojibian, M., Asadi, A., Xu, J., ... Kieffer, T. J. (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. <https://doi.org/10.2337/db11-1711>
- Ross, M. D., Martinka, S., Mukherjee, A., Sedor, J. R., Vinson, C., & Bruggeman, L. A. (2006). Math6 expression during kidney development and altered expression in a mouse model of glomerulosclerosis. *Developmental Dynamics*, *235*(11), 3102–3109. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20934>
- Rovira & Gasa. SpringerBook_438122_Stem Cell Genetics for Biomedical Research || Chapter [9]
- Ruijtenberg, S., & van den Heuvel, S. (2016). Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression. *Cell Cycle*, *15*(2), 196–212. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1120925>
- Rukstalis, J. M., & Habener, J. F. (2009). Neurogenin3: a master regulator of pancreatic islet differentiation and regeneration. *Islets*, *1*(3), 177–184. <https://doi.org/10.4161/isl.1.3.9877>
- Russ, H. A., Parent, A. V., Ringler, J. J., Hennings, T. G., Nair, G. G., Shveygert, M., ... Hebrok, M. (2015). Controlled induction of human pancreatic progenitors produces functional beta-like cells in vitro. *The EMBO Journal*, *34*(13), 1759–1772. <https://doi.org/10.15252/embj.201591058>
- Sander, M., Neubüser, A., Kalamaras, J., Ee, H. C., Martin, G. R., & German, M. S. (1997). Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes and Development*, *11*(13), 1662–1673. <https://doi.org/10.1101/gad.11.13.1662>
- Sander, M., Sussel, L., Conners, J., Scheel, D., Kalamaras, J., Dela Cruz, F., ... German, M. (2000). Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. *Development*, *127*(24), 5533–5540. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11076772%5Cnhttp://dev.biologists.org/content/127/24/5533.full.pdf
- Savides, T. J., Gress, F. G., Zaidi, S. A., Ikenberry, S. O., & Hawes, R. H. (1996). Detection of embryologic ventral pancreatic parenchyma with endoscopic ultrasound, *43*(1).
- Schwitzgebel, V. M., Scheel, D. W., Conners, J. R., Kalamaras, J., Lee, J. E., Anderson, D. J., ... German, M. S. (2000). Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development*, *127*(16), 3533–3542.
- Seenundun, S., Liu, Q., Aziz, A., Pali, C., Hong, S., Blais, A., ... Dilworth, F. J. (2010). UTX mediates demethylation of H3K27me3 at muscle-specific genes during myogenesis. *The EMBO Journal*, (February), 1401–1411. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.37>
- Shiba, Y., Fernandes, S., Zhu, W. Z., Filice, D., Muskheli, V., Kim, J., ... Laflamme, M. A. (2012). Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. *Nature*, *489*(7415), 322–325. <https://doi.org/10.1038/nature11317>
- Shih, H. P., Wang, A., & Sander, M. (2013). Pancreas Organogenesis: From Lineage Determination to Morphogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122405>
- Smith, S. B., Watada, H., & German, M. S. (2004). Neurogenin3 activates the islet differentiation

- program while repressing its own expression. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 18(1), 142–149. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0037>
- Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Torres, M., Oliver, G., & Gruss, P. (1997). The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing β cells in the mammalian pancreas. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/386399a0>
- Speier, S., Nyqvist, D., Cabrera, O., Yu, J., Molano, R. D., Pileggi, A., ... Berggren, P.-O. (2008). Noninvasive in vivo imaging of pancreatic islet cell biology. *Nature Medicine*, 14(5), 574–578. <https://doi.org/10.1038/nm1701>
- Squires, P. E., Jones, P. M., Younis, M. Y. G., & Hills, C. E. (2014). *The calcium-sensing receptor and β -cell function*. *Vitamins and Hormones* (1st ed., Vol. 95). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800174-5.00010-7>
- St-Onge, L., Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Mansouri, A., & Gruss, P. (1997). Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing α -cells in mouse pancreas. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/387406a0>
- Sussel, L., Kalamaras, J., Hartigan-O'Connor, D. J., Meneses, J. J., Pedersen, R. A., Rubenstein, J. L., & German, M. S. (1998). Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. *Development (Cambridge, England)*, 125(12), 2213–2221. <https://doi.org/9584121>
- Swigut, T., & Wysocka, J. (2007). H3K27 Demethylases, at Long Last. *Cell*, 131(1), 29–32. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.026>
- Swisa, A., Avrahami, D., Eden, N., Zhang, J., Feleke, E., Cohen-Tayar, Y., ... Dor, Y. (2016). Pax6 maintains pancreatic beta-cell identity by repressing alternative islet cell genes. *Journal of Clinical Investigation*, 127(1), 230–243. <https://doi.org/10.1172/JCI88015>
- Takeuchi, H., Nakatsuji, N., & Suemori, H. (2014). Endodermal differentiation of human pluripotent stem cells to insulin-producing cells in 3D culture. *Scientific Reports*, 4, 4488. <https://doi.org/10.1038/srep04488>
- Taylor, B., Liu, F. F., & Sander, M. (2013). Nkx6.1 Is Essential for Maintaining the Functional State of Pancreatic Beta Cells. *Cell Reports*, 4(6), 1262–1275. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.010>
- Tollervey, J. R., & Lunnyak, V. V. (2012). Judge, jury and executioner of stem cell fate. *Epigenetics*, 7(8), 823–840. <https://doi.org/10.4161/epi.21141>
- Tomaru, Y., Hasegawa, R., Suzuki, T., Sato, T., Kubosaki, A., Suzuki, M., ... Suzuki, H. (2014). A transient disruption of fibroblastic transcriptional regulatory network facilitates trans-differentiation. *Nucleic Acids Research*, 42(14), 8905–8913. <https://doi.org/10.1093/nar/gku567>
- Toyoda, T., Mae, S. I., Tanaka, H., Kondo, Y., Funato, M., Hosokawa, Y., ... Osafune, K. (2015). Cell aggregation optimizes the differentiation of human ESCs and iPSCs into pancreatic bud-like progenitor cells. *Stem Cell Research*, 14(2), 185–197. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2015.01.007>
- Van Arensbergen, J., García-Hurtado, J., Moran, I., Maestro, M. A., Xu, X., Van De Castele, M., ... Ferrer, J. (2010). Derepression of polycomb targets during pancreatic organogenesis allows insulin-producing beta-cells to adopt a neural gene activity program. *Genome Research*, 20(6), 722–732. <https://doi.org/10.1101/gr.101709.109>
- Vanhove, J., Pistoni, M., Welters, M., Eggermont, K., Vanslebrouck, V., Helsen, N., ... Verfaillie, C. M. (2016). Stem Cell Reports. *Stem Cell Reports*, 7(2), 192–206. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.06.013>
- Vegas, A. J., Veisoh, O., Gürtler, M., Millman, J. R., Pagliuca, F. W., Bader, A. R., ... Anderson, D. G. (2016). Long-term glycemic control using polymer-encapsulated human stem cell-derived beta cells in immune-competent mice. *Nature Medicine*, 22(3), 306–311. <https://doi.org/10.1038/nm.4030>
- Voigt, P., Tee, W. W., & Reinberg, D. (2013). A double take on bivalent promoters. *Genes and Development*, 27(12), 1318–1338. <https://doi.org/10.1101/gad.219626.113>

- Wang, H., Muguira, M., Liu, W., Zhang, T., Chen, C., Breslin, M. B., & Lan, M. S. (2009). NIH Public Access. *Sciences-New York*, 198(1), 29–39. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0001.Identification>
- Wang, J., Elghazi, L., Parker, S. E., Kizilocak, H., Asano, M., Sussel, L., & Sosa-Pineda, B. (2004). The concerted activities of Pax4 and Nkx2.2 are essential to initiate pancreatic β -cell differentiation. *Developmental Biology*, 266(1), 178–189. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.10.018>
- Wang, S., Yan, J., Anderson, D. A., Xu, Y., Kanak, M. C., Cao, Z., ... Gu, G. (2010). Neurog3 gene dosage regulates allocation of endocrine and exocrine cell fates in the developing mouse pancreas. *Developmental Biology*, 339(1), 26–37. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.12.009>
- Wang, Y., Li, Y., Guo, C., Lu, Q., Wang, W., Jia, Z., ... Zhou, C. (2018). ISL1 and JMJD3 synergistically control cardiac differentiation of embryonic stem cells, 44(14), 6741–6755. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw301>
- Watada, H., Scheel, D. W., Leung, J., & German, M. S. (2003). Distinct gene expression programs function in progenitor and mature islet cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(19), 17130–17140. <https://doi.org/10.1074/jbc.M213196200>
- Wei, R., & Hong, T. (2016). Lineage Reprogramming: A Promising Road for Pancreatic β Cell Regeneration. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 27(3), 163–176. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.01.002>
- Xie, R., Carrano, A. C., & Sander, M. (2015). A systems view of epigenetic networks regulating pancreas development and β -cell function. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1287>
- Xie, R., Everett, L. J., Lim, H. W., Patel, N. A., Schug, J., Kroon, E., ... Sander, M. (2013). Dynamic chromatin remodeling mediated by polycomb proteins orchestrates pancreatic differentiation of human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 12(2), 224–237. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.11.023>
- Xu, C.-R., Li, L.-C., Donahue, G., Ying, L., Zhang, Y.-W., Gadue, P., & Zaret, K. S. (2014). Dynamics of genomic H3K27me3 domains and role of EZH2 during pancreatic endocrine specification. *The EMBO Journal*, 33(19), 2157–2170. <https://doi.org/10.15252/embj.201488671>
- Xu, C. R. (2011). Chromatin “Prepattern” and Histone Modifiers in a Fate Choice for Liver and Pancreas. *SCIENCE*, 332(20 May), 963–967.
- Xu, C. R., Li, L. C., Donahue, G., Ying, L., Zhang, Y. W., Gadue, P., & Zaret, K. S. (2014). Dynamics of genomic H3K27me3 domains and role of EZH2 during pancreatic endocrine specification. *EMBO Journal*, 33(19), 2157–2170. <https://doi.org/10.15252/embj.201488671>
- Yabe, S. G., Fukuda, S., Takeda, F., Nashiro, K., Shimoda, M., & Okochi, H. (2017). Efficient generation of functional pancreatic β -cells from human induced pluripotent stem cells. *Journal of Diabetes*, 9(2), 168–179. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12400>
- Yang, S. F., Xue, W. J., Duan, Y. F., Xie, L. Y., Lu, W. H., Zheng, J., & Yin, A. P. (2015). Nicotinamide Facilitates Mesenchymal Stem Cell Differentiation into Insulin-Producing Cells and Homing to Pancreas in Diabetic Mice. *Transplantation Proceedings*, 47(6), 2041–2049. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2015.05.019>
- Yang, Y., Thorel, F., Boyer, D. F., Herrera, P. L., & Wright, C. V. E. (2011). Context-specific α -to- β -cell reprogramming by forced Pdx1 expression service re programming by forced Pdx1 expression. *Genes and Development*, (25), 1680–1685. <https://doi.org/10.1101/gad.16875711>
- Yao, J., Zhou, J., Liu, Q., Lu, D., Wang, L., Qiao, X., & Jia, W. (2010). Atoh8, a bHLH transcription factor, is required for the development of retina and skeletal muscle in zebrafish. *PLoS ONE*, 5(6), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010945>
- Yechoor, V., Liu, V., Espiritu, C., Paul, A., Oka, K., Kojima, H., & Chan, L. (2009). Neurogenin3 Is Sufficient for Transdetermination of Hepatic Progenitor Cells into Neo-Islets In Vivo but

- Not Transdifferentiation of Hepatocytes. *Developmental Cell*, 16(3), 358–373. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.01.012>
- Yoo, K. H., & Hennighausen, L. (2011). EZH2 methyltransferase and H3K27 methylation in breast cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 8(1), 59–65. <https://doi.org/10.7150/ijbs.8.59>
- Yoshida, T., & Hanahan, D. (1994). Murine pancreatic ductal adenocarcinoma produced by in vitro transduction of polyoma middle T oncogene into the islets of Langerhans. *The American Journal of Pathology*, 145(3), 671–684. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1890334&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Zhang, C., Moriguchi, T., Kajihara, M., Harada, A., Shimohata, H., Oishi, H., ... Takahashi, S. (2005). MafA Is a Key Regulator of Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Molecular and Cellular Biology*, 25(12), 4969–4976. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.12.4969>
- Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., & Melton, D. A. (2008). In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells. *Nature*, 455(7213), 627–632. <https://doi.org/10.1038/nature07314>
- Zhu, S., Russ, H. A., Wang, X., Zhang, M., Ma, T., Xu, T., ... Ding, S. (2016). Human pancreatic beta-like cells converted from fibroblasts. *Nature Communications*, 7, 10080. <https://doi.org/10.1038/ncomms10080>
- Zhu, Z., Li, Q. V., Lee, K., Rosen, B. P., González, F., Soh, C. L., & Huangfu, D. (2016). Genome Editing of Lineage Determinants in Human Pluripotent Stem Cells Reveals Mechanisms of Pancreatic Development and Diabetes. *Cell Stem Cell*, 18(6), 755–768. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.03.015>
- Zhuo Fu, Elizabeth R. Gilbert, and D. L. (2013). Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. *Curr Diabetes Rev*, 9(1), 25–53.



Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Gene Regulatory Mechanisms

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbagrm

Modulation of the endocrine transcriptional program by targeting histone modifiers of the H3K27me3 mark

Marta Fontcuberta-PiSunyer^{a,b}, Sara Cervantes^{a,c}, Eulàlia Miquel^d, Sergio Mora-Castilla^e, Louise C. Laurent^e, Angel Raya^{d,f,g}, Ramon Gomis^{a,b,c,h}, Rosa Gasa^{a,c,*}

^a Diabetes and Obesity Research Laboratory, August Pi i Sunyer Biomedical Research Institute (IDIBAPS), Rosselló 149-153, 08036 Barcelona, Spain

^b University of Barcelona, Barcelona, Spain

^c Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Spain

^d Center of Regenerative Medicine in Barcelona (CMRB), Hospital Duran i Reynals, Hospitalet del Llobregat, Barcelona, Spain

^e Department of Reproductive Medicine, University of California, San Diego, La Jolla 92093, CA, USA

^f Center for Networked Biomedical Research on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Spain

^g Institutió Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Spain

^h Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Clinic of Barcelona, Barcelona, Spain

A B S T R A C T

Posttranscriptional modifications of histones constitute an epigenetic mechanism that is closely linked to both gene silencing and activation events. Trimethylation of Histone3 at lysine 27 (H3K27me3) is a repressive mark that associates with developmental gene regulation during differentiation programs. In the developing pancreas, expression of the transcription factor Neurogenin3 in multipotent progenitors initiates endocrine differentiation that culminates in the generation of all pancreatic islet cell lineages, including insulin-producing beta cells. Previously, we showed that Neurogenin3 promoted the removal of H3K27me3 marks at target gene promoters *in vitro*, suggesting a functional connection between this factor and regulators of this chromatin mark. In the present study, we aimed to specifically evaluate whether targeting the activity of these histone modifiers can be used to modulate pancreatic endocrine differentiation. Our data show that chemical inhibition of the H3K27me3 demethylases Jmjd3/Utx blunts Neurogenin3-dependent gene activation *in vitro*. Conversely, inhibition of the H3K27me3 methyltransferase Ezh2 enhances both the transactivation ability of Neurogenin3 in cultured cells and the formation of insulin-producing cells during directed differentiation from pluripotent cells. These results can help improve current protocols aimed at generating insulin-producing cells for beta cell replacement therapy in diabetes.

1. Introduction

Diabetes mellitus is characterized by absolute or relative insulin deficiency, which leads to hyperglycemia. The central role of insulin-producing pancreatic β -cells in the pathogenesis of diabetes makes this disease an ideal candidate for the application of regenerative medicine approaches. The generation of replacement β -cells from pluripotent stem cells through stepwise directed differentiation protocols, or from fully-differentiated somatic cells through direct reprogramming strategies are contemplated as promising developments with great potential in therapeutical applications for diabetes.

Site-specific covalent modification of histones constitutes a chromatin remodeling mechanism that plays a crucial role in the activation of cell-specific transcriptional programs during development.

Trimethylation of histone3 at lysine 27 (H3K27me3) is a histone mark that is associated with transcriptional repression of a subset of genes that classically encode for developmental regulators. In embryonic stem cells, many developmental genes are concomitantly enriched in trimethylation at H3K27 and H3K4 (an active mark), creating a bivalent state in which genes are poised for activation but remain inactive until the repressive mark is removed. In the pancreas, H3K27me3 enrichment patterns dynamically change in the course of formation of β -cells from progenitors [2]. Remarkably, inadequate changes in H3K27me3 modification patterns have been associated with impaired endocrine gene activation during *in vitro* differentiation, which may partly underlie the immaturity of the β -cells generated *ex vivo* following these protocols [3].

Ezh2, a component of the Polycomb Repressive complex 2 (PRC2) is

* Corresponding author at: Diabetes and Obesity Research Laboratory, August Pi i Sunyer Biomedical Research Institute (IDIBAPS), Rosselló 149-153, 08036 Barcelona, Spain.
E-mail address: rgasa@clinic.cat (R. Gasa).

<https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2018.03.003>

Received 21 September 2017; Received in revised form 6 March 2018; Accepted 7 March 2018
1874-9399/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

a methyltransferase for H3K27me3. Conditional deletion of the *Ezh2* gene in mice has revealed that *Ezh2* restrains the formation of pancreatic progenitors from endoderm [4] and of endocrine progenitors from pancreatic progenitors [5]. Conversely, H3K27me3 marks are removed by the Jumonji domain-containing demethylases *Jmjd3* (*Kdm6b*) and *Utx* (*Kdm6a*) [6]. Knockdown of *Jmjd3* in directed differentiation protocols from stem cells has been shown to result in abnormal definite endodermal formation [3]. Particular roles of these demethylases in the formation of pancreatic endocrine cells are unknown.

The generation of endocrine progenitors during pancreatic development entails expression of the transcription factor *Neurogenin3* (*NEUROG3*) that functions as a transcriptional activator of the endocrine program. We previously showed that ectopic expression of *NEUROG3* in cultured cells promotes loss of H3K27me3 marks at the proximal promoters of key downstream target genes [7], pointing to the engagement of this transcription factor with chromatin modulators of H3K27me3. In the current study, we have aimed at investigating the role of H3K27me3 marks in the initiation of endocrine differentiation by *NEUROG3*. We show that the activity of H3K27me3 demethylases is required for *NEUROG3*-dependent gene transactivation and that pharmacological manipulation of H3K27me3 levels can be used to modulate *NEUROG3* activity *in vitro*. Additionally, we show that by blocking the action of H3K27me3 methyltransferases we can enhance insulin expression during directed endocrine differentiation from iPSCs. These results support the idea that the use of small molecule modulators of chromatin-modifying enzymes may serve to improve transcription factor (TF) based-cellular direct reprogramming protocols for generation of surrogate β -cells.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and viral transfection

Mouse pancreatic cells mPAC L20 were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum and antibiotics. Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) were isolated from prenatal mouse embryos between day E12.5-E14.5 following previously established protocols (<https://ki.mit.edu/sbc/escell/methods/isolating> with modifications). MEFs were maintained in high-glucose DMEM supplied with 10% (v/v) FCS, 2 mM L-glutamine (Gibco) and antibiotics. The human induced pluripotent stem cell line FiPS-4F-7 was obtained from the National Stem Cell Bank (BNLC) and maintained on Corning [8] Matrigel (BD) in mTeSR1 media (StemCell Technologies). Medium was changed every other day. The chemical inhibitors used were: EI-1 (Millipore), GSK-126 (Active Biochemicals) and GSK-J4 (Tocris Bioscience). They were added to the culture medium after viral transduction unless otherwise stated.

For adenoviral treatment, cells were seeded onto 6-well plates (Western blot and gene expression analyses) or 10 cm dishes (ChIP) one day before adenoviral treatment. At 70–80% confluence, cells were incubated with adenoviruses encoding *NEUROG3*, HA-*Neurog3* or β -galactosidase at a multiplicity of infection (MOI) of 40 for 2–3 h at 37 °C in complete culture medium. Then, virus-containing medium was replaced and cells were maintained in culture for 48 h unless otherwise stated. Production of the recombinant adenoviruses was described previously [9,10].

2.2. Directed differentiation protocol

Pancreatic differentiation was induced in FiPS-4F-7 cells following a previously described protocol [11] with some modifications. Epigenetic inhibitors were added during the time intervals indicated in the Results section.

2.3. Western blot

For histone immunoblots, proteins were obtained by acid extraction in lysis buffer containing 0.2 N HCl. For determination of transgene expression, whole cell extracts were prepared with triple detergent lysis buffer (TrisHCl pH 8 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, Igepal CA-630 1%, Na deoxycholate 0.5%). Proteins (25 μ g) were separated in a 16%Tris-Tricine (histones) or 12% Tris-Glycine (whole extracts) PAGE-SDS gel, transferred to PVDF membranes and incubated overnight at 4 °C with rabbit anti-mouse H3K27me3 (Abcam,1:500), rabbit anti-mouse Histone3 (H3) (Abcam,1:1000), mouse anti-HA (Sigma, 1:1000) and mouse anti- α Tubulin (Sigma, 1:1000). Bands were visualized with ECL (Termo Scientific). Band quantification was performed using software Image Studio Lite (Li-COR, Biosciences).

2.4. RNA isolation and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was isolated using the High pure RNA Isolation Kit (Roche) following the manufacturer's manual. First-strand cDNA was prepared using Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) and random hexamers in a total volume of 20 μ l. 1/40 to 1/200 of the resulting cDNA was used as a template for real time PCR reactions. Real time PCR was performed on an ABI Prism 7900 detection system using Gotaq master mix (Promega). Expression relative to a housekeeping gene was calculated using the deltaCt method. The primer sequences and amplicon lengths are provided in Supplementary Table S1.

2.5. Quantitative chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

Cells were fixed with 1% formaldehyde for 7 min and cross-linking was quenched by addition of 0.125 mM glycine. Cell pellets were lysed in SDS buffer (EDTA 10 mM, Tris.HCl 50 mM pH 8.1, SDS 1%). Chromatin was sheared between 0.3–0.5 kb by sonication and then cleared by centrifugation and diluted 1:10 in buffer containing 0.01% SDS, 1,1% triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl pH 8.1, 16.7 mM NaCl. Antibody binding was carried overnight at 4 °C using a 2.5 μ g of anti-H3K27me3 (Millipore), anti-H3K4me3 (Millipore), anti-H3K27ac (Abcam) or normal rabbit IgG as control (Sigma). Protein G magnetic beads (Millipore) were used to precipitate the antibody-bound complexes. Immunoprecipitates were washed and were eluted from the beads in 50 mM NaHCO₃ containing 1% SDS, crosslinking was reversed by incubation at 62 °C for 3 h and DNA was purified using Qiaquick columns (Qiagen) and eluted in water. Immunoprecipitated DNA was assayed by real time PCR. Primers used are listed in Supplementary Table S1.

2.6. Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard error of the mean (S.E.M). Statistical significance was tested using Student's *t*-test for independent samples and indicated in the figure legends.

3. Results

3.1. Temporal correlation between *NEUROG3*-induced transcriptional activation and changes in histone marks

Introduction of *NEUROG3* induces the endocrine transcriptional program in mPAC cells [9]. We previously showed that gene activation in response to *NEUROG3* correlated with loss of repressive H3K27me3 marks on the activated genes [7]. Here we have studied the temporal correlation between these two processes using as example a subset of genes known to be directly bound by *NEUROG3* [7,10,12,13]. As shown in Fig. 1A–B, loss of H3K27me3 marks and increased transcript levels of *Atoh8* and *Insm1*, which display a bivalent (enriched in both H3K27me3

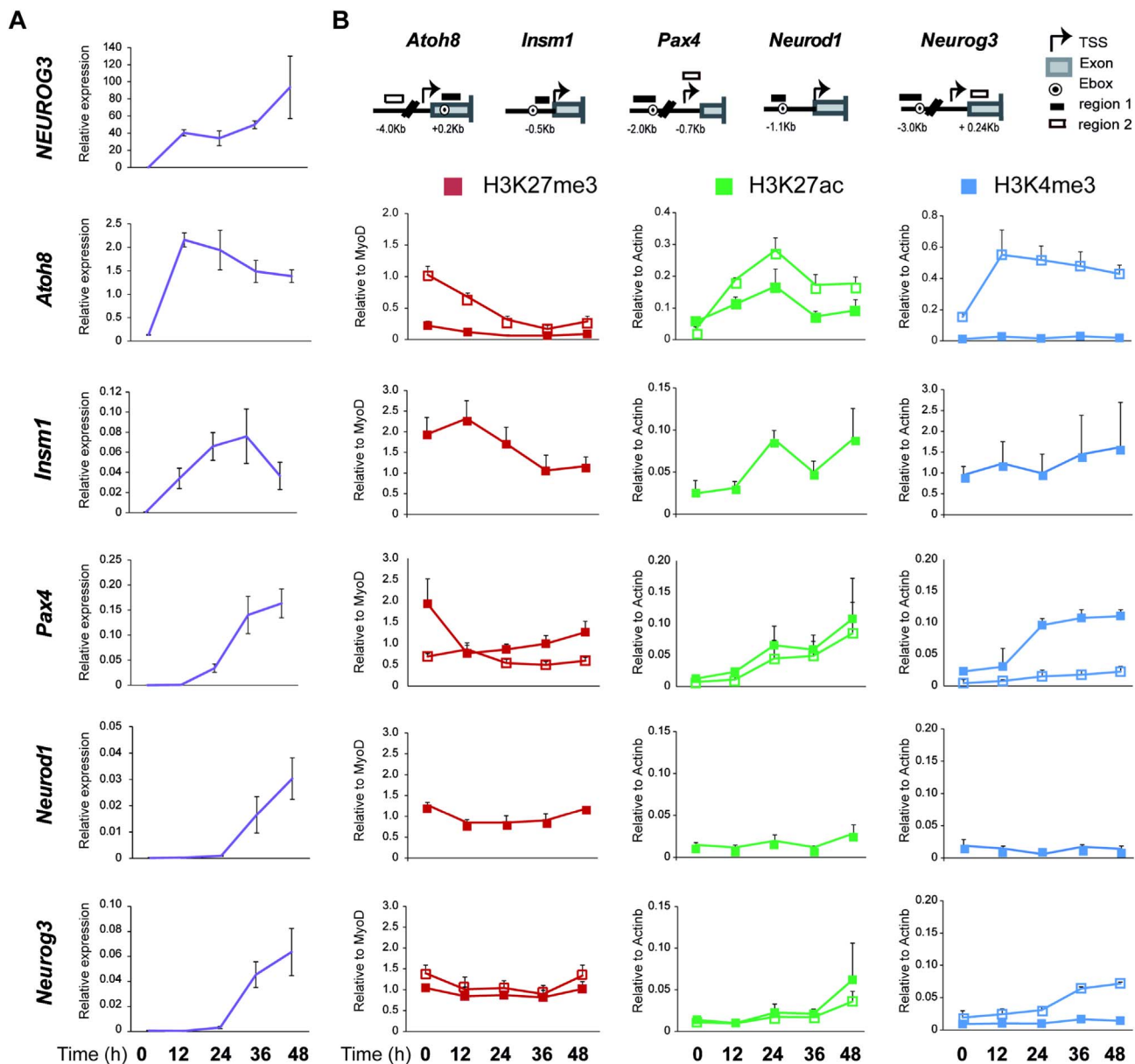


Fig. 1. Time-dependent changes in H3K27me3, H3K27ac and H3K4me3 enrichments and mRNA levels upon NEUROG3 expression in mPAC cells. mPAC cells were treated with a recombinant adenovirus encoding NEUROG3 and cultured for 48 h. (A) Total RNA was extracted and transcript levels for the transgene and the indicated endogenous genes were determined by real time PCR and expressed relative to *Tbp*. Results represent mean \pm SE for 4 independent experiments (B) Chromatin was immunoprecipitated with tri-methylated H3K27 (H3K27me3), acetylated H3K27 (H3K27ac) and tri-methylated H3K4 (H3K4me3) specific antibodies and associated DNA was analyzed by real time PCR. Regions amplified are depicted as segments in gene diagram. Filled squares correspond to regions where target E box is located (region 1). Enrichment was calculated relative to MyoD (H3K27me3) or Actinb (H3K27ac and H3K4me3) at each time point. ChIP results are mean \pm SE for 4–6 independent experiments.

and H3K4me3) status, were observed within 24 h of the transduction with the adenovirus, 12 h after detection of *NEUROG3* transgene expression. Seemingly, early responsive non-bivalent *Pax4* exhibited rapid loss of this mark at the upstream region containing the NEUROG3-binding site. By contrast, late targets *NeuroD1* and *Neurog3* showed almost no change in H3K27me3 during the 48 h period studied (Fig. 1A–B). Because these values represent an average over a cell population, within which not all cells are equally responsive to NEUROG3 [9,10], the high basal H3K27me3 levels at these promoters might have hindered the detection of decreases of this mark in a fraction of cells. To overcome this limitation, we studied H3K27 acetylation (H3K27ac), an antagonistic mark of H3K27me3, which is associated with active transcription and thus not found in these promoters in control (no NEUROG3) cells. With the exception of *Neurod1*, all genes exhibited deposition of H3K27ac (Fig. 1B). Likewise, H3K4me3 was deposited in

close correlation with changes in H3K27 marks and transcriptional activation of these genes (Fig. 1B). Together, these data support the temporal association between removal of H3K27me3 marks and transactivation events elicited by NEUROG3.

3.2. Chemical inhibition of H3K27 demethylases *Jmjd3* and *Utx* blocks NEUROG3-induced gene activation

Next, we asked whether loss of H3K27me3 was required for transcriptional activation of NEUROG3 target genes. The H3K27me3 demethylases *Jmjd3* and *Utx* are both expressed endogenously in mPAC cells and their transcript levels are not modified upon NEUROG3 expression, thus indicating that changes in their expression are not responsible for changes in H3K27me3 levels in response to NEUROG3 (Fig. 2A). To evaluate the role of *Jmjd3*/*Utx* activity in NEUROG3

function we used a chemical inhibitor of both demethylases, GSK-J4. Treatment with GSK-J4 caused a small increase in total cellular levels of H3K27me3 (Fig. 2B), without significant changes in basal H3K27me3 enrichment at specific promoters (Fig. 2C). Nonetheless, GSK-J4 inhibited NEUROG3 gene transactivation events, which correlated with decreased H3K27ac deposition at target promoter sequences (Fig. S1). By contrast, expression of *Sox9*, which is endogenously expressed and not targeted by NEUROG3, was not changed (Fig. 2D). Further, reduced NEUROG3 activity in the presence of GSK-J4 was not due to decreased transgene expression levels as shown by immunoblot analysis (Fig. S2). Together, these results reveal that NEUROG3 requires the activity of H3K27me3 demethylases to activate genes enriched in this repressive mark.

3.3. Chemical inhibition of *Ezh2* improves NEUROG3 transactivation activity

Given our findings with GSK-J4 we hypothesized that inhibition of the methyltransferase *Ezh2* might improve NEUROG3-dependent endocrine differentiation. mPAC cells endogenously express *Ezh2* and, interestingly, introduction of NEUROG3 decreases *Ezh2* transcript levels in these cells (Fig. 3A). Incubation with the *Ezh2* inhibitor EI-1 reduced both cellular H3K27me3 levels and enrichment for this mark at specific promoters, which was accompanied by increased deposition of active H3K27ac (Fig. 3B–D). In the absence of NEUROG3, the switch in

postranslational marks of H3K27 elicited by EI-1 had not impact on gene expression of silent genes, although it increased transcript levels of *Atoh8*, which is already transcribed under control (no NEUROG3) conditions. In contrast, upon NEUROG3 introduction, addition of EI-1 resulted in an additional increment in H3K27ac deposition at target promoters (Fig. S1), which was accompanied by higher NEUROG3-induced gene transactivation of these genes (Fig. 3E–F). The potentiation of NEUROG3-induced gene activation elicited by EI-1 was not related to transgene expression changes as revealed by immunoblot analysis (Fig. S2). Lastly, enhancement of NEUROG3 action was validated with another *Ezh2* inhibitor, GSK-126 (Fig. S3).

We then examined the temporal requirements for the potentiatory effects of *Ezh2* inhibition and found that addition of the inhibitor prior to introduction of NEUROG3 had deleterious effects in the activation of most of the NEUROG3 target genes studied except *Atoh8* (Fig. 4). Therefore, *Ezh2* inhibition and NEUROG3 activity need to occur simultaneously to have a positive impact on the transactivation ability of this transcription factor. Overall, these results support the idea that inhibition of *Ezh2* could help boost the activity of NEUROG3 in cellular reprogramming protocols.

In view of the prior results we decided to examine whether *Ezh2* inhibition could enhance the gene transactivation ability of NEUROG3 in less receptive cellular contexts; for instance, in distant cell lineages such as mouse embryonic fibroblasts (MEF). We found that NEUROG3 alone was able to induce expression of several endocrine genes in

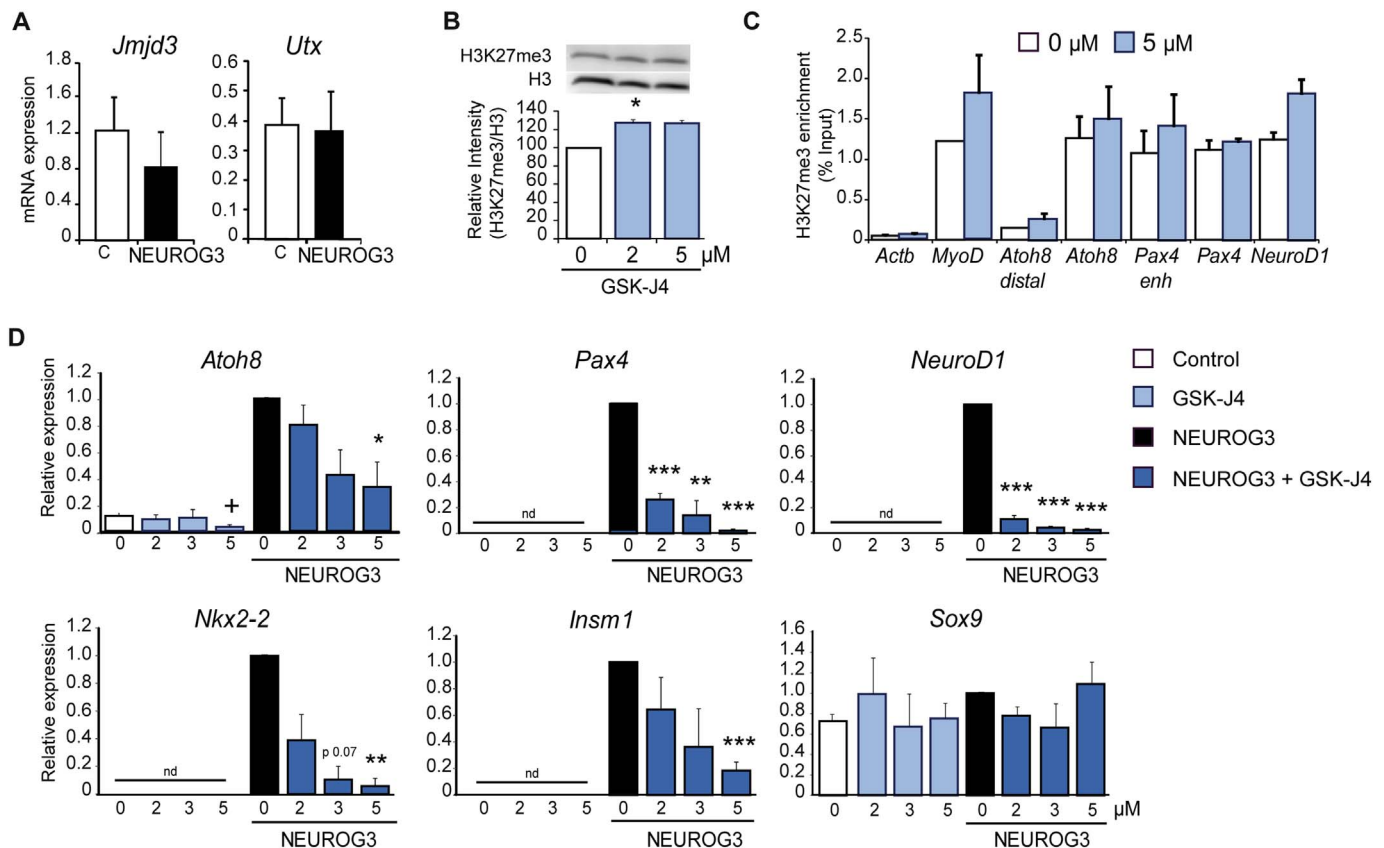


Fig. 2. Effects of chemical inhibition of the H3K27me3 demethylases *Jmjd3*/*Utx* in the transactivation ability of NEUROG3 in mPAC cells (A) mPAC cells were transduced with an adenovirus encoding NEUROG3 and collected 48 h after viral treatment. Gene expression levels of *Jmjd3* and *Utx* were studied by qPCR and are shown relative to *Tbp*. Data are mean \pm SE for 3–4 independent experiments. (B–D) mPAC cells were treated with the indicated concentrations of GSKJ4 for 48 h. (B) Total H3K27me3 levels were determined by immunoblot analysis. Data are mean \pm SE for 3 independent experiments; * p < 0.05 relative to cells cultured without inhibitor. (C) H3K27me3 enrichment at specific promoters was studied by ChIP. Proximal promoters of the *Actinb* and *MyoD* genes were included as control for non-target constitutively active and inactive gene, respectively. Data are mean \pm SE from 4 independent experiments * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 relative to control. (D) mPAC cells were transduced with an adenovirus encoding NEUROG3 and cultured for 48 h in the presence of the indicated concentrations of GSKJ4. Total RNA was extracted and gene expression was evaluated by qPCR. Values are expressed relative to mRNA levels in cells treated with the NEUROG3-encoding adenovirus without inhibitor (value of 1). *Sox9* is expressed in mPAC cells and is not a NEUROG3 target. Of the NEUROG3 gene targets studied, only *Atoh8* is endogenously expressed in mPAC cells (nd: non detectable). Data is mean \pm SE for 4–5 independent experiments. + p < 0.05 relative to control; * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 relative to NEUROG3 without inhibitor (black bar).

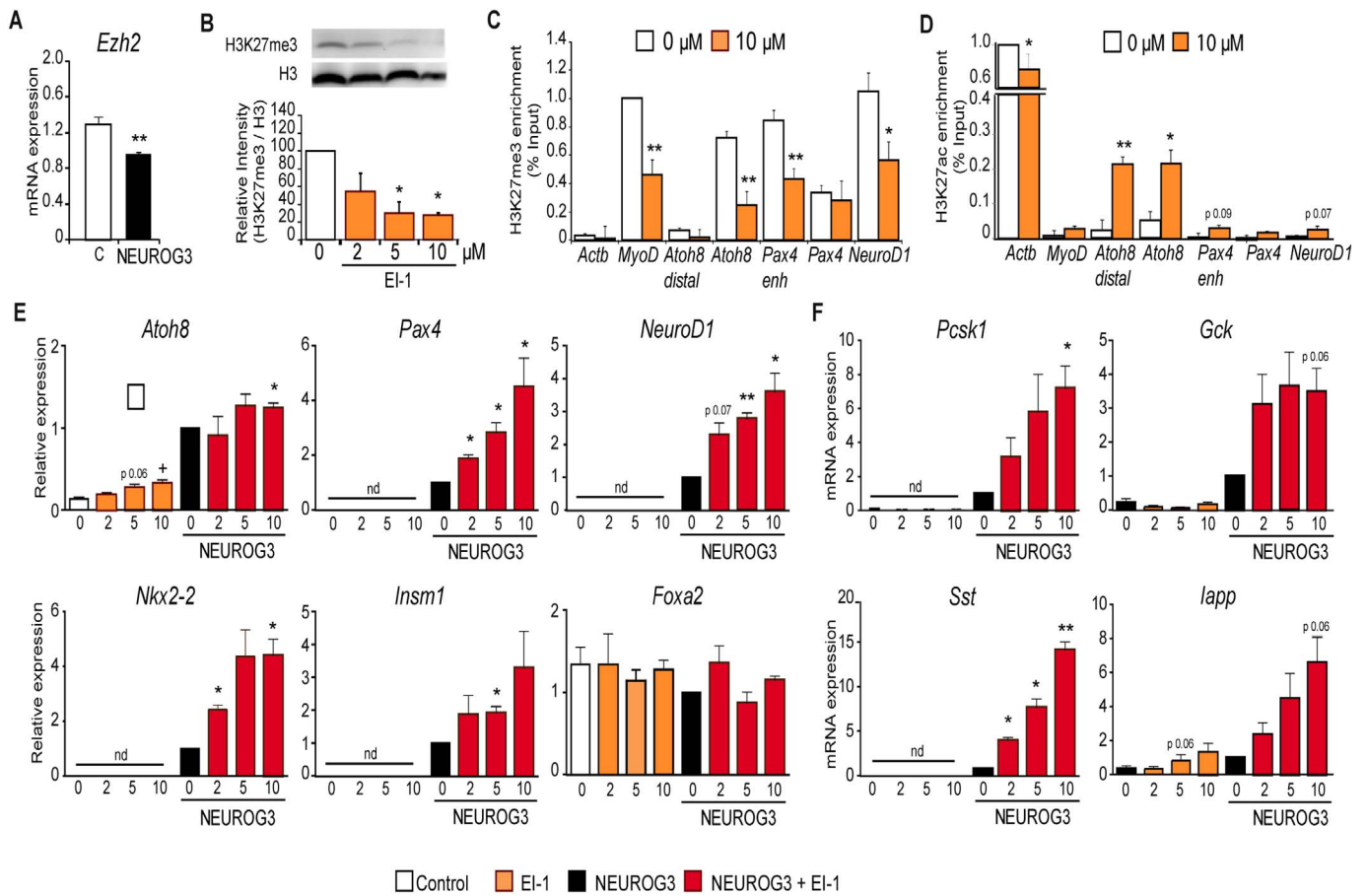


Fig. 3. Effects of chemical inhibition of the H3K27me3 methylase Ezh2 in the transactivation ability of NEUROG3 in mPAC cells (A) mPAC cells were transduced with an adenovirus encoding NEUROG3 and collected 48 h after viral treatment. Gene expression levels of *Ezh2* were studied by qPCR and are shown relative to *Tbp*. Data are mean \pm SE for 4 independent experiments; ** $p < 0.01$ (B–D) mPAC cells were treated with the indicated concentrations of EI-1 for 48 h. (B) Total H3K27me3 levels were determined by immunoblot analysis. Data are mean \pm SE for 3 independent experiments; * $p < 0.05$ relative to cells cultured without inhibitor. (C) H3K27me3 and (D) H3K27ac enrichment at specific promoters was studied by ChIP. Associated DNA was analyzed by qPCR. Proximal promoters of the *Actinb* and *MyoD* genes were included as control for non-target constitutively active and inactive genes, respectively. Data are mean \pm SE from 4 independent experiments * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ relative to cells not treated with the inhibitor. (E–F) mPAC cells were transduced with an adenovirus encoding NEUROG3 and cultured for an additional 48 h in the presence of EI-1 at the indicated concentrations. Total RNA was extracted and gene expression was evaluated by qPCR. Values are expressed relative to mRNA levels in cells treated with the NEUROG3-encoding adenovirus without inhibitor (value of 1). *Foxa2* is endogenously expressed and is not a NEUROG3 target. (nd: non detectable). Data are mean \pm SE for 4–5 independent experiments. + $p < 0.05$ relative to control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ relative to NEUROG3 without inhibitor (black bar).

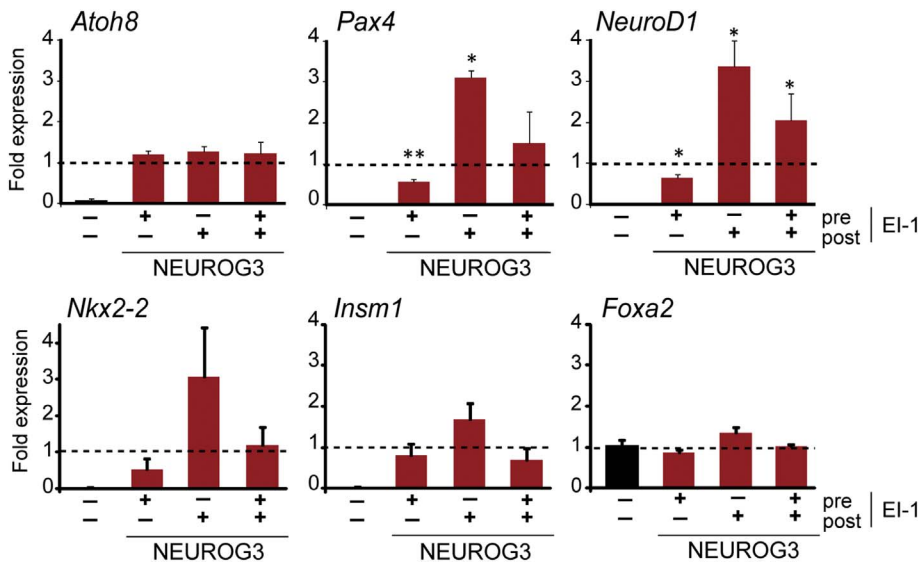


Fig. 4. Effects of time of addition of the Ezh2 inhibitor in the transactivation ability of NEUROG3 in mPAC cells. mPAC cells were cultured in the presence of 10 μ M EI-1 for 24 h before adenoviral treatment (pre) or cultured in the presence of 10 μ M EI-1 for 48 h after viral treatment [1], or both. Then, total RNA was extracted and gene expression was studied by qPCR. Values are expressed as fold relative to mRNA levels in cells treated with the NEUROG3-encoding adenovirus without inhibitor (value of 1 and represented by the broken line). Data are mean \pm SE for 3–4 independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ relative to NEUROG3 without inhibitor.

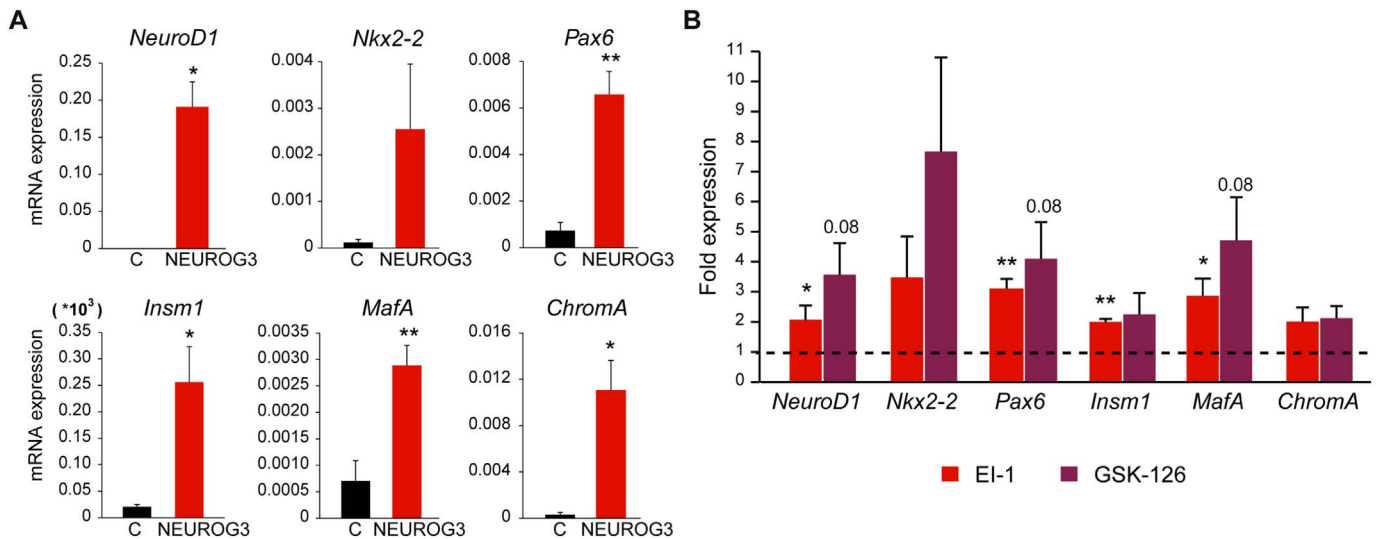


Fig. 5. Effects of chemical inhibition of Ezh2 in the transactivation ability of NEUROG3 in MEFs. Mouse embryonic fibroblasts were transduced with the NEUROG3-encoding adenovirus and cultured for additional 48 h after viral treatment in the presence of 10 μ M EI-1 or 10 μ M GSK126. Total RNA was extracted and gene expression was studied by qPCR (A) Gene expression of Neurog3 gene targets in untreated MEFs (C) or NEUROG3-expressing MEFs. Levels are expressed relative to *Tbp*. (B) Effects of the Ezh2 inhibitors on the indicated genes. Values represent fold-expression relative to mRNA levels in cells treated with the NEUROG3-encoding adenovirus without inhibitor (value of 1 and represented by the broken line). Data are mean \pm SE for 4 independent experiments. * p < 0.05; ** p < 0.01 relative to controls MEFs (A) or NEUROG3 without inhibitor (B).

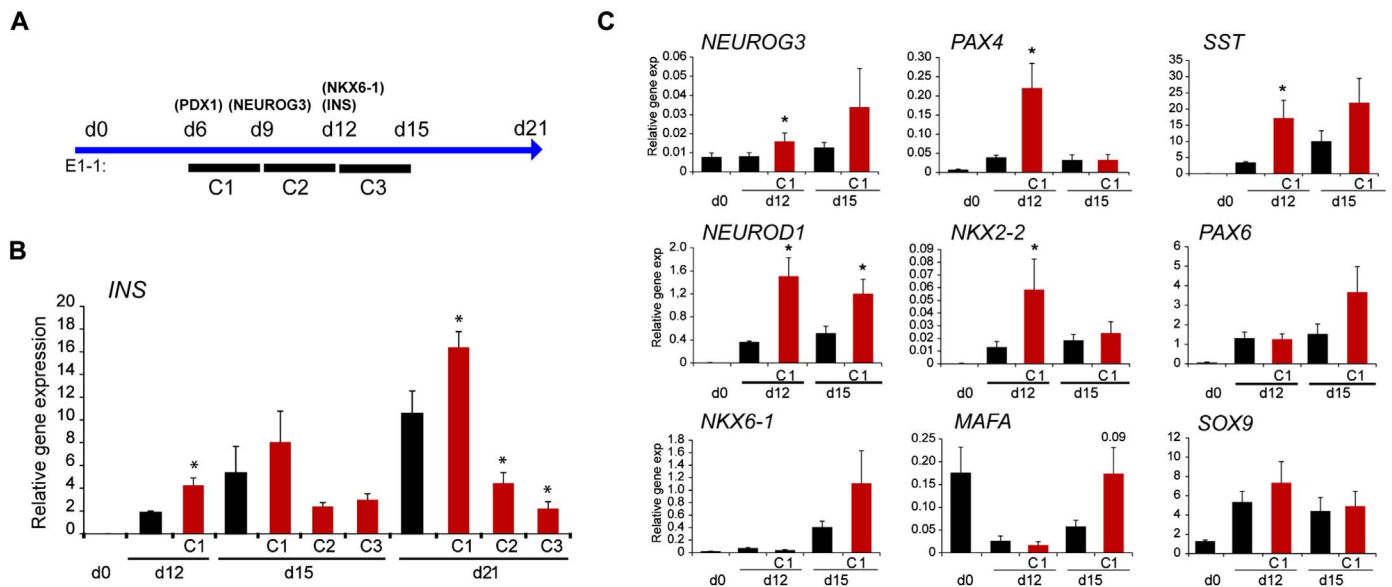


Fig. 6. Effects of EZH2 inhibition in the directed differentiation of human iPSC towards islet cells. (A) Experimental scheme of the 21-day directed differentiation protocol showing the times of EI-1 (20 μ M) treatment (bars named C1, C2 and C3). In parenthesis, genes whose transcripts are first detected at the indicated day (B–C). Cells were collected and the indicated days of the protocol. Total RNA was extracted and transcript levels for the indicated genes were quantified by qPCR and expressed relative to *TBP*. Black bars indicate gene expression levels in control cells not treated with the inhibitor. Data are mean \pm SE for 2–3 independent differentiation experiments, each in duplicate or triplicate. * p < 0.05 relative to control cells collected the same day of the protocol (black bars).

fibroblasts (Fig. 5A). Furthermore, concomitant inhibition of Ezh2 resulted in significant higher mRNA levels for some of the genes including *NeuroD1*, *Pax6*, *Nkx2.2* and *MafA* (Fig. 5B). All together, these results suggest that the use of chemical inhibitors of Ezh2 may be advantageous in transcription factor-based reprogramming protocols towards endocrine/ β -cells.

3.4. Effects of chemical inhibition of Ezh2 in directed differentiation of pluripotent cells towards beta cells

The positive results obtained in transcription factor-based transdifferentiation experiments prompted us to test the effect of inhibiting Ezh2 in directed differentiation protocols using pluripotent cells.

Chemical inhibition of Ezh2 has been shown to increase formation of insulin-producing cells by promoting *NEUROG3* expression in a human endodermal differentiation system *in vitro* [5]. Here we aimed at assessing if Ezh2 inhibition enhanced β -cell formation from human iPSC using a directed differentiation protocol. To determine the timing of endocrine differentiation following our protocol and better select when to add the inhibitor, we initially assessed the temporal expression profile of *NEUROG3* mRNA and found that it peaked at day 9, declined by day 12 and modestly increased again at day 21 (Fig. S4). On the other hand, *PDX1*, an early pancreas specification marker, was first detected at day 6 and both the β -cell genes *INS* and *NKX6.1* were initially detected at day 12 and increased prominently by day 21 (Fig. S4). Based on these findings, we added EI-1 on days 6–9 (birth of

endocrine progenitors) and on days 9–12 or 12–15 (during active endocrine differentiation) as depicted in Fig. 6A. RNA was collected at days 0, 12, 15 and 21 and gene expression was analyzed by qRT-PCR. As shown in Fig. 6B, treatment of EI-1 during days 6–9 (C1) resulted in higher *INS* gene expression at the end of the protocol, which is in agreement with previous findings [5]. Immunostaining and counting of INS+ cells demonstrated that the higher levels of *INS* gene expression corresponded to increased numbers of insulin-expressing cells (Fig. S5). On the contrary, inhibition of EZH2 at later stages during active endocrine cell genesis (C2 and C3) resulted in significantly lower *INS* transcript levels as compared to cells following the standard protocol (Fig. 6B). Based on these results, we focused on the C1 condition to examine the status of the endocrine transcriptional program. At day 12, several genes were found significantly upregulated as compared to control cells including *NEUROG3*, *PAX4*, *NEUROD1*, *SST* and *NKX2-2* (Fig. 6C), which would be compatible with enhanced *NEUROG3* activity as all of these genes are known *NEUROG3* targets [9]. Interestingly, another set of genes including *PAX6*, *NKX6-1* and *MAFA*, which are expressed in developing and differentiated β -cells, remained similar at day 12 whilst they tended to be more expressed at day 15 relative to control cells. By contrast, expression of *SOX9* was unchanged in the C1 condition at either day 12 or 15. Taken together, these results demonstrate that inhibition of EZH2 activity prior to the peak of *NEUROG3* expression (day 9 in our protocol) can be used to enhance the endocrine transcriptional program and positively influence the number of insulin-expressing cells generated in directed differentiation protocols using pluripotent cells.

4. Discussion

The chromatin conformation is known to influence gene expression and, when in a “non-permissive” compact state, can represent a barrier for successful cell reprogramming. Here, we aimed at assessing if manipulation of the activity of chromatin-modifying enzymes might be a useful strategy to enhance TF-based and directed endocrine differentiation protocols. Specifically, we have studied the impact of chemically-modulating the activity of H3K27me3 regulators on the transactivation ability of *NEUROG3*. *NEUROG3* is the key transcription factor that initiates the endocrine transcriptional cascade in pancreatic progenitors during embryogenesis [14]. Further, *NEUROG3*, alone or in combination with other TFs, has been used as a cell reprogramming factor to promote endocrine differentiation in several cellular contexts both *in vivo* and *in vitro* [9,15–19].

Dosage and activity of H3K27me3 demethylases have been correlated with the ability of several TFs to regulate gene expression programs [20]. We initially proposed the involvement of H3K27me3 in *NEUROG3*-dependent transactivation events based on our findings that forced expression of this factor promoted release of H3K27me3 marks at target promoter regions [7], but loss of H3K27me3 could either be a consequence or precede transcriptional activation of these genes [23,24]. Here we show that inhibition of H3K27me3 demethylases impairs the ability of *NEUROG3* to transactivate genes. Whether it is Utx, Jmjd3, or both, that are involved in this effect cannot be disclosed from our data as GSK-J4 and other available chemical compounds inhibit both demethylases. Furthermore, it is conceivable that the specific demethylase involved may vary depending on the cellular context in which *NEUROG3* is introduced.

As opposed to the H3K27me3 demethylase inhibitor, chemical inhibition of Ezh2 resulted in enhanced *NEUROG3*-dependent gene expression. Previous reports had implicated Ezh2 in restricting the progression from pancreatic to endocrine progenitors through negative regulation of the *Neurog3* gene [5]. Our present findings reveal that manipulation of Ezh2 activity can also be used to influence the function of *NEUROG3*. It is interesting that ectopic *NEUROG3* decreases *Ezh2* gene expression in mPAC cells, an observation that relates with findings from our group showing that, *in vivo*, *Ezh2* gene expression is reduced in

pancreatic endocrine progenitors compared to non-endocrine pancreatic cells [25]. Despite the known relevance of H3K27me3 marks in the regulation of developmental genes, it has been reported that changes in gene expression are not always associated with widespread changes in H3K27me3 deposition [26]. In this line, it is noteworthy that induction of the late target *Neurod1* in response to *NEUROG3* occurred without detectable changes in H3K27me3 enrichment at the *Neurod1* promoter in mPAC cells. Despite this, *Neurod1* induction was drastically suppressed by the Jmjd3/Utx inhibitor and enhanced by the Ezh2 inhibitor. Thus, we cannot rule out that these effects are secondary to changes in the expression of intermediary gene/s that are required for *NEUROG3*-triggered *Neurod1* gene induction.

In general, most chromatin-modifying enzymes are expressed ubiquitously and specific gene expression patterns are thought to be mediated by their interaction with lineage specific factors in a context-dependent manner [21,22]. In this regard, it should be noted that our attempts to demonstrate physical association between adenovirally-expressed *NEUROG3* and endogenous Jmjd3/Utx or Ezh2 using co-immunoprecipitation with commercially-available antibodies have been unsuccessful (data not shown). Nonetheless, the observation that changes in histone marks occur in the same gene regions where E boxes bound by *NEUROG3* are located [7,10,12,13] indirectly supports that these chromatin modifiers and *NEUROG3* are neighbors.

In addition to *NEUROG3*-mediated transdifferentiation, we show that inhibition of EZH2 is also effective in promoting endocrine differentiation in directed differentiation protocols using human iPSC. Importantly, the timing of exposure to the chemical inhibitor of EZH2 is critical to influence *INS* gene activation either positively or negatively in this system. The mechanistic reason for this observation is unclear. The stage between days 6 and 9 coincides with drastic induction of the *NEUROG3* gene and hence with birth of *NEUROG3*+ cells. We speculate that these early-born endocrine progenitors that express high levels of *NEUROG3* will be most responsive to EZH2 inhibition in terms of *NEUROG3* transactivation ability. In support of enhanced activation of the endocrine program, transcript levels for genes activated downstream of *NEUROG3* were found increased at days 12 and/or 15 in cells treated with the inhibitor during days 6–9. In contrast, inhibition of EZH2 after day 9, when *NEUROG3* transcripts and thus *NEUROG3* activity are decaying, is detrimental to endocrine differentiation. One possibility is that inhibition of EZH2 in late endocrine progenitors or differentiating endocrine cells might interfere with silencing of specific sets of genes [2] and hamper correct establishment of the endocrine program. Similar to our present findings, Xu et al. showed that inhibition of EZH2 during endocrine specification, but not earlier during pancreatic progenitor formation, resulted in a higher percentage of insulin positive cells in a human endodermal progenitor differentiation system *in vitro* [5]. Therefore, the time window for maneuver of H3K27me3 levels and improvement of endocrine differentiation appears to be limited to the stage during which *NEUROG3*+ cells are born. Future studies should be conducted to establish the functionality of the insulin-producing cells generated using this epigenetic manipulation.

To date, several examples of successful direct reprogramming towards beta cells have been reported using developmentally close cell types, including pancreatic ductal, pancreatic exocrine, intestinal, hepatic or stomach cells [9,15–19]. Simultaneous use of chromatin-modifying agents and TF has been reported to improve endocrine gene activation in response to endocrine reprogramming transcription factors [27]. However, for potential medical applications, somatic cell reprogramming protocols should use readily accessible tissue such as skin. Fibroblasts have been successfully converted into different lineages including neurons, cardiomyocytes or hepatocytes using specific sets of TFs, but they appear to be poorly susceptible to TF-based transdifferentiation towards β -cells [19,27,28]. Here we show that introduction of *NEUROG3* in MEFs can induce expression of endocrine differentiation genes but not of genes encoding the islet hormones, and that

concomitant inhibition of Ezh2 enhances the trans-activation ability of this TF. Epigenetic agents that broadly affect DNA methylation or histone acetylation were reported to induce expression of endocrine genes from dermal fibroblasts [28]. By contrast, our results show that inhibition of Ezh2 alone does not promote induction of silent endocrine genes in the absence of NEUROG3, either in MEFs or in mPAC cells. This difference may be explained by the more restricted enrichment pattern of the H3K27me3 mark as compared to the broader presence of acetylated histones at gene promoters. However, it is also possible that combining inhibition of a ubiquitous chromatin regulator together with a differentiation transcription factor provides some gene-specificity to the former.

In summary, this study demonstrates that manipulation of the repressive mark H3K27me3 can be used to influence the transactivation ability of NEUROG3 in cell-based assays and in directed differentiation protocols from pluripotent cells. These results are encouraging and support the idea that targeting specific chromatin modifiers may be a valid tactic to improve the transdifferentiation ability of β -cell reprogramming factors.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.03.003>.

Transparency document

The Transparency document associated this article can be found, in online version.

Acknowledgments

We are indebted to Lidia Sanchez and Yaiza Esteban for excellent technical assistance, and to Mercè Martí for help with the study design of IPS experiments. This work has been supported by project 120230 (to RGa) from Fundació Marató de TV3, PI13/01500 and PI16/00774 (to RGa) integrated in the Plan Estatal de I + D + I and cofinanced by ISCIII-Subdirección General de Evaluación and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER-“A way to build Europe”), and grant 2014 SGR659 (to RGo) from the Generalitat de Catalunya. The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2009-2013) under the grant agreement n°229673 (SC); ISCIII/FEDER (FIS PI14/01682; Red de Terapia Celular - TerCel RD16/0011/0024), Generalitat de Catalunya-AGAUR (2014-SGR-1460), and CERCA Programme/Generalitat de Catalunya. CIBERDEM (Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas) is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III. MF has been funded by Generalitat de Catalunya (2014 SGR659).

Author contributions

Conceived and designed the experiments: MF, RGa. Performed the experiments: MF, SC, EM. Analyzed the data: MF, RGa. Discussed the data: MF, SC, RGo, RGa, SM, LC, AR. Wrote the manuscript: MF, RGa.

References

[1] C. Postic, M. Shiota, K.D. Niswender, T.L. Jetton, Y. Chen, J.M. Moates, et al., Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase, *J. Biol. Chem.* 274 (1) (1999) 305–315.

[2] J. van Arensbergen, J. Garcia-Hurtado, I. Moran, M.A. Maestro, X. Xu, M. Van de Castele, et al., Derepression of Polycomb targets during pancreatic organogenesis

allows insulin-producing beta-cells to adopt a neural gene activity program, *Genome Res.* 20 (6) (2010) 722–732.

[3] R. Xie, L.J. Everett, H.W. Lim, N.A. Patel, J. Schug, E. Kroon, et al., Dynamic chromatin remodeling mediated by polycomb proteins orchestrates pancreatic differentiation of human embryonic stem cells, *Cell Stem Cell* 12 (2) (2013) 224–237.

[4] C.R. Xu, P.A. Cole, D.J. Meyers, J. Kormish, S. Dent, K.S. Zaret, Chromatin “pre-pattern” and histone modifiers in a fate choice for liver and pancreas, *Science* 332 (6032) (2011) 963–966.

[5] C.R. Xu, L.C. Li, G. Donahue, L. Ying, Y.W. Zhang, P. Gadue, et al., Dynamics of genomic H3K27me3 domains and role of EZH2 during pancreatic endocrine specification, *EMBO J.* 33 (19) (2014) 2157–2170.

[6] M.R. Hubner, D.L. Spector, Role of H3K27 demethylases Jmjd3 and UTX in transcriptional regulation, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 75 (2010) 43–49.

[7] G. Pujadas, F. Felipe, M. Ejarque, L. Sanchez, S. Cervantes, F.C. Lynn, et al., Sequence and epigenetic determinants in the regulation of the Math6 gene by Neurogenin3, *Differentiation* 82 (2) (2011) 66–76.

[8] G. Pujadas, S. Cervantes, A. Tutusaus, M. Ejarque, L. Sanchez, A. Garcia, et al., Wnt9a deficiency discloses a repressive role of Tcf712 on endocrine differentiation in the embryonic pancreas, *Sci. Rep.* 6 (2016) 19223.

[9] R. Gasa, C. Mrejen, F.C. Lynn, P. Skewes-Cox, L. Sanchez, K.Y. Yang, et al., Induction of pancreatic islet cell differentiation by the neurogenin-neuroD cascade, *Differentiation* 76 (4) (2008) 381–391.

[10] M. Ejarque, S. Cervantes, G. Pujadas, A. Tutusaus, L. Sanchez, R. Gasa, Neurogenin3 cooperates with Foxa2 to autoactivate its own expression, *J. Biol. Chem.* 288 (17) (2013) 11705–11717.

[11] C.H. Cho, N.R. Hannan, F.M. Docherty, H.M. Docherty, M. Joao Lima, M.W. Trotter, et al., Inhibition of activin/nodal signalling is necessary for pancreatic differentiation of human pluripotent stem cells, *Diabetologia* 55 (12) (2012) 3284–3295.

[12] G. Mellitzer, S. Bonne, R.F. Luco, M. Van De Castele, N. Lenne-Samuel, P. Collombat, et al., IAI is NGN3-dependent and essential for differentiation of the endocrine pancreas, *EMBO J.* 25 (6) (2006) 1344–1352.

[13] S.B. Smith, R. Gasa, H. Watada, J. Wang, S.C. Griffen, M.S. German, Neurogenin3 and hepatic nuclear factor 1 cooperate in activating pancreatic expression of Pax4, *J. Biol. Chem.* 278 (40) (2003) 38254–38259.

[14] G. Gu, J. Dubauskaite, D.A. Melton, Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors, *Development* 129 (10) (2002) 2447–2457.

[15] C. Ariyachet, A. Tovaglieri, G. Xiang, J. Lu, M.S. Shah, C.A. Richmond, et al., Reprogrammed stomach tissue as a renewable source of functional beta cells for blood glucose regulation, *Cell Stem Cell* 18 (3) (2016) 410–421.

[16] Y.J. Chen, S.R. Finkbeiner, D. Weinblatt, M.J. Emmett, F. Tameire, M. Yousefi, et al., De novo formation of insulin-producing “neo-beta cell islets” from intestinal crypts, *Cell Rep.* 6 (6) (2014) 1046–1058.

[17] Y. Heremans, M. Van De Castele, P. in't Veld, G. Gradwohl, P. Serup, O. Madsen, et al., Recapitulation of embryonic neuroendocrine differentiation in adult human pancreatic duct cells expressing neurogenin 3, *J. Cell Biol.* 159 (2) (2002) 303–312.

[18] V. Yechoor, V. Liu, C. Espiritu, A. Paul, K. Oka, H. Kojima, et al., Neurogenin3 is sufficient for transdetermination of hepatic progenitor cells into neo-islets in vivo but not transdifferentiation of hepatocytes, *Dev. Cell* 16 (3) (2009) 358–373.

[19] Q. Zhou, J. Brown, A. Kanarek, J. Rajagopal, D.A. Melton, In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells, *Nature* 455 (7213) (2008) 627–632.

[20] A. Benyoucef, C.G. Pali, C. Wang, C.J. Porter, A. Chu, F. Dai, et al., UTX inhibition as selective epigenetic therapy against TAL1-driven T-cell acute lymphoblastic leukemia, *Genes Dev.* 30 (5) (2016) 508–521.

[21] S. Seenundun, S. Rampalli, Q.C. Liu, A. Aziz, C. Pali, S. Hong, et al., UTX mediates demethylation of H3K27me3 at muscle-specific genes during myogenesis, *EMBO J.* 29 (8) (2010) 1401–1411.

[22] Y. Wang, Y. Li, C. Guo, Q. Lu, W. Wang, Z. Jia, et al., ISL1 and JMJD3 synergistically control cardiac differentiation of embryonic stem cells, *Nucleic Acids Res.* 44 (14) (2016) 6741–6755.

[23] M. Hosogane, R. Funayama, M. Shirota, K. Nakayama, Lack of transcription triggers H3K27me3 accumulation in the gene body, *Cell Rep.* 16 (3) (2016) 696–706.

[24] M. Hosogane, R. Funayama, Y. Nishida, T. Nagashima, K. Nakayama, Ras-induced changes in H3K27me3 occur after those in transcriptional activity, *PLoS Genet.* 9 (8) (2013) e1003698.

[25] S. Cervantes, M. Fontcuberta-PiSunyer, J.M. Servitja, R. Fernandez-Ruiz, A. Garcia, L. Sanchez, et al., Late-stage differentiation of embryonic pancreatic beta-cells requires Jarid2, *Sci. Rep.* 7 (1) (2017) 11643.

[26] J. Vanhove, M. Pistoni, M. Welters, K. Eggermont, V. Vanslebrouck, N. Helsen, et al., H3K27me3 does not orchestrate the expression of lineage-specific markers in hESC-derived hepatocytes in vitro, *Stem Cell Rep.* 7 (2) (2016) 192–206.

[27] E. Akinci, A. Banga, K. Tungatt, J. Segal, D. Eberhard, J.R. Dutton, et al., Reprogramming of various cell types to a beta-like state by Pdx1, Ngn3 and MafA, *PLoS One* 8 (11) (2013) e82424.

[28] L.S. Katz, E. Geras-Raaka, M.C. Gershengorn, Reprogramming adult human dermal fibroblasts to islet-like cells by epigenetic modification coupled to transcription factor modulation, *Stem Cells Dev.* 22 (18) (2013) 2551–2560.

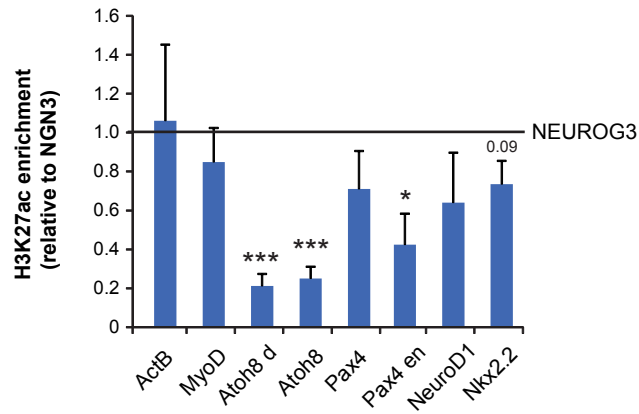
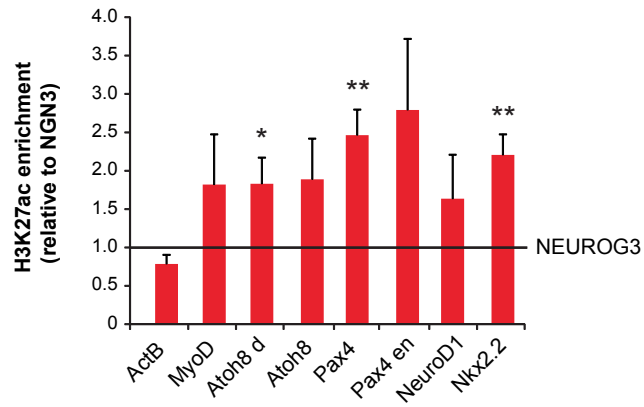
A**B**

Figure S1. Effects of chemical inhibition of Jmjd3/Utx (A) and Ezh2 (B) on H3K27ac deposition in response to NEUROG3 in mPAC cells. mPAC cells were infected with an adenovirus encoding NEUROG3 for 2 h and cultured for additional 48h in the presence of 3µM GSK-J4 (A) or 10µM EI-1 (B). H3K27ac enrichment at the indicated promoters was evaluated by ChIP. Values are expressed relative to enrichment in NEUROG3-expressing cells cultured without the inhibitor (given the value of 1). Data are mean± SE for 3 independent experiments. *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001

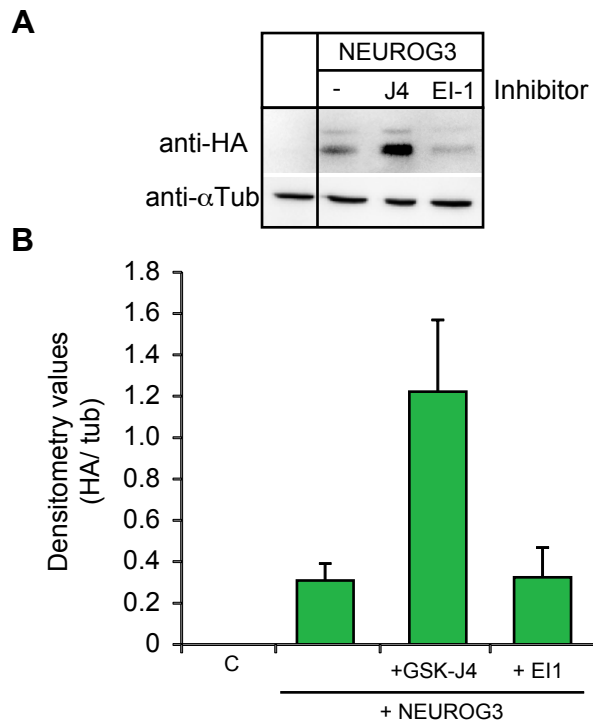


Figure S2. Effects of the chemical inhibitors GSK-J4 and EI-1 on transgene protein levels.

mPAC cells were infected with an adenovirus encoding an HA-tagged version of NEUROG3 for 2 h and then cultured in the presence of 3 μ M GSK-J4 or 10 μ M EI-1 for 48h. At the end of this period, whole cell extracts were prepared. Proteins were separated on a 12% PAGE-SDS gel, transferred to PVDF membranes and incubated with antibodies against HA and α Tubulin (as loading control). Representative image (A) and densitometric quantification (B). Values in bars represent mean \pm SE for 4 independent experiments.

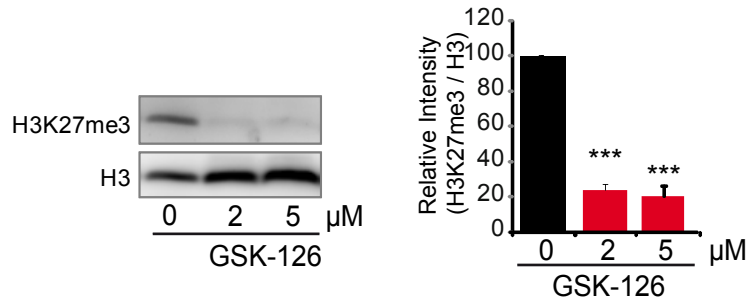
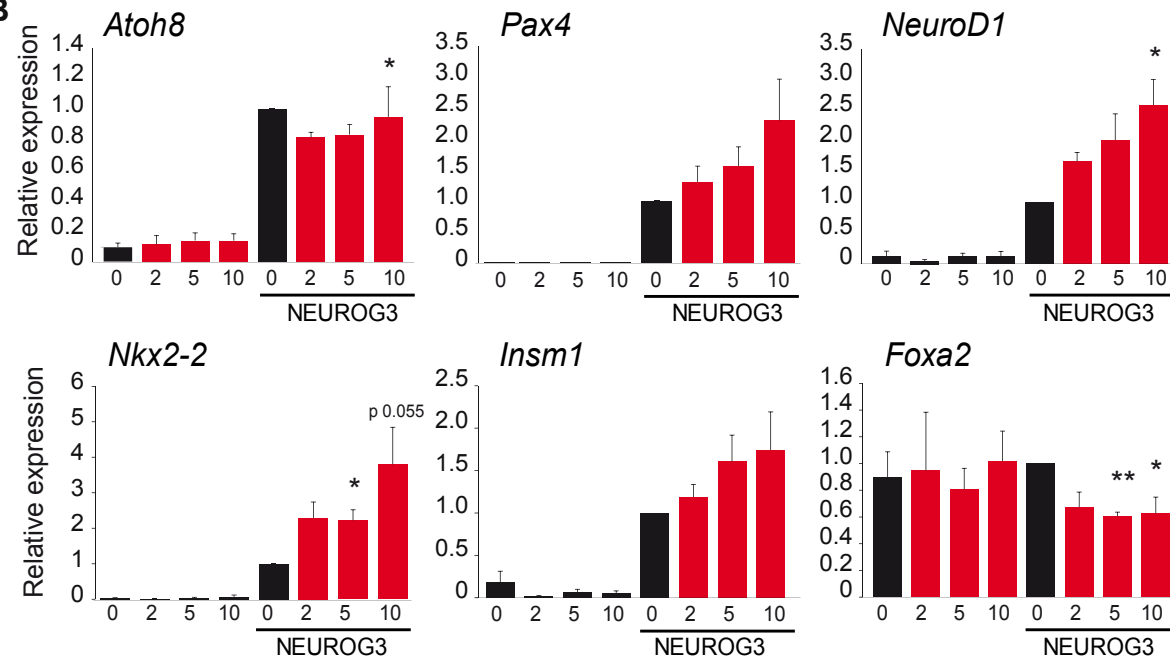
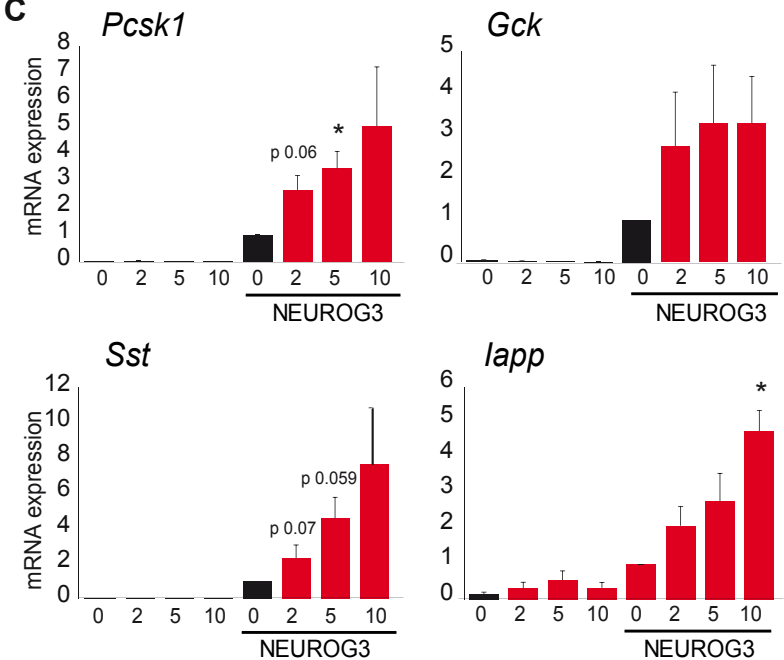
A**B****C**

Figure S3. Effects of chemical inhibition of the H3K27me3 methylase Ezh2 in the transactivation ability of NEUROG3 in mPAC cells. (A) mPAC cells were treated with the indicated concentrations of GSK-126 for 48h. Total H3K27me3 levels were determined by immunoblot analysis. Data are mean± SE for 3 independent experiments; ***p < 0.0001 relative to cells cultured without inhibitor. (B-C) mPAC cells were transduced with an adenovirus encoding NEUROG3 and cultured for an additional 48h in the presence of GSK-126 at the indicated concentrations. Total RNA was extracted and gene expression was evaluated by qPCR. Values are expressed relative to mRNA levels in cells treated with the NEUROG3-encoding adenovirus without inhibitor (value of 1). *Foxa2* is endogenously expressed and is not a NEUROG3 target. (nd: non detectable). Data are mean± SE for 4 independent experiments; *, p < 0.05, **, p < 0.01 relative to NGN3 without inhibitor.

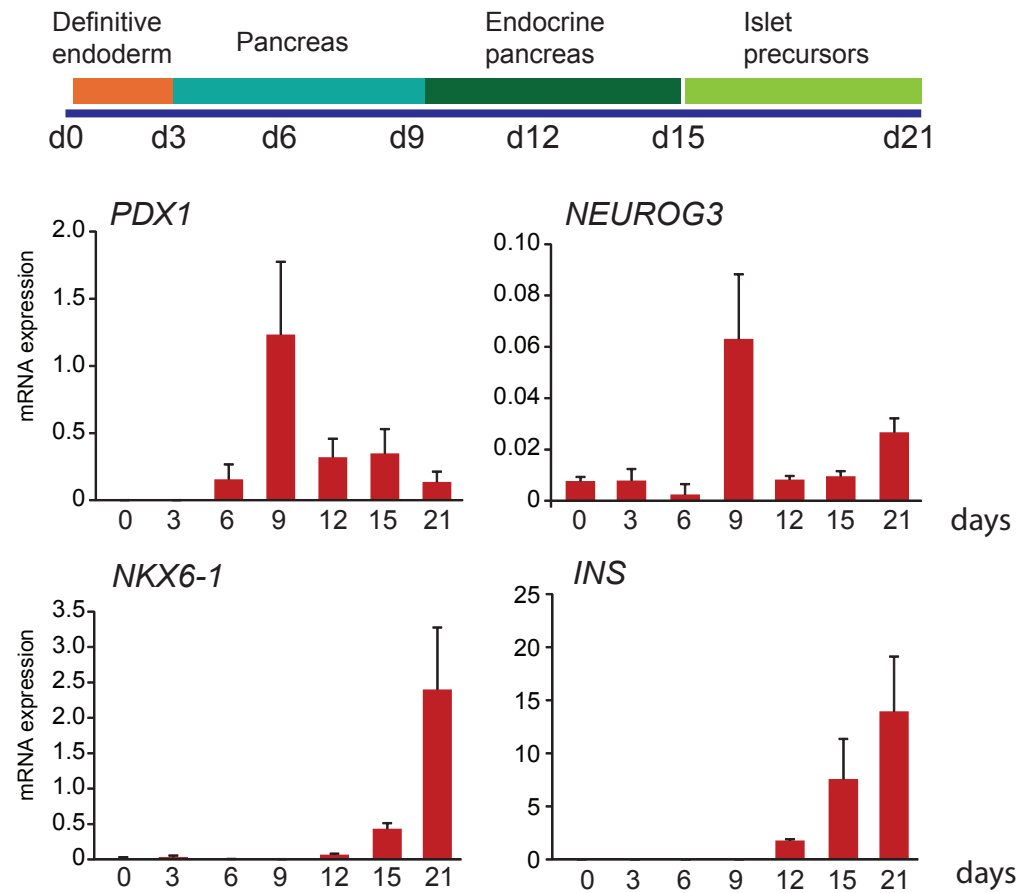


Figure S4. (A) Overview of differentiation protocol indicating the four major differentiation stages. **(B)** Gene expression of key differentiation markers in human FiPS at different days of the protocol. Values are expressed relative to *TBP* used as an internal control. Data are mean \pm SE for 3-4 independent experiments.

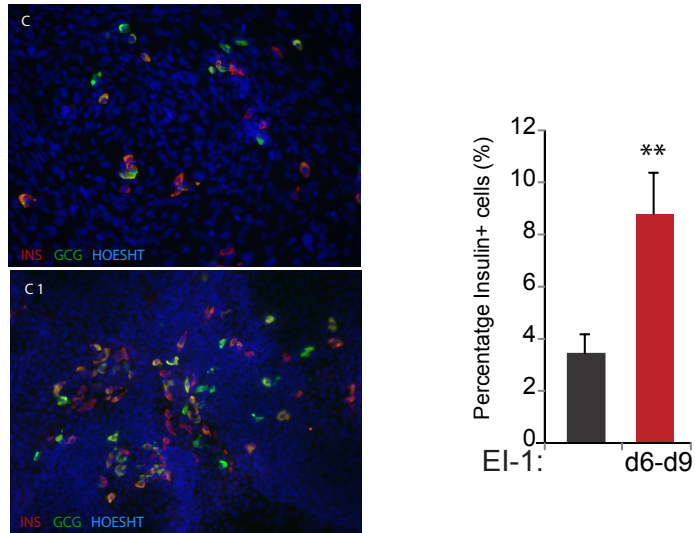


Figure S5. Chemical inhibition of EZH2 results in increased beta cell differentiation from human iPSC. Human iPSC were differentiated towards islet cells following a 21-day 4-stage directed differentiation protocol. At day 21, cells were fixed and immunostained for insulin (red) and glucagon (green). Nuclei were visualized with Hoescht 33258. Representative images of cells obtained following standard protocol (upper panel) or protocol that included the EZH2 inhibitor EI-1 (20 μ M) during days 6-9 (lower panel). Bars represent quantification of Insulin+ cells relative to total nuclei and are mean \pm SE. ** $p < 0.001$ relative to standard protocol.

Supplementary Table S1 Primer sequences (5'-3')

Used for ChIP analysis

NeuroD1 prox CCACAAAGGGTTAATCTCTCC
ACAGTACCTCCGCCCCTG
Atoh8 prox CAACAAGGCTGGGCAATGAAG
CGCCTTTAAAGAAACAGGAAGC
Atoh8 dist CTCCAACAGCAAGAACCTCATCA
GGGGCACCACACTCACTACCTCTA
Pax4 prox ACACGAATCCCACCCACTCCT
TCCTCCTGTTGATTCTTGACTGA
Pax4 enh GTGCGACAAGACCRCTGAG
CACCGGGTTTGGGGCTAAT
MyoD CATTGTCCCGTAGCCTTGAG
GCCACACGCGGTAGCACTTG
Beta Actin AACAAAGAGGCCACACAAATAGG
ACCCTCTGGGTGTGGATGTC
Nkx2.2 prox TTGGGCTTCGATGGCTCTTT
CCACGGAGAAATCCCACCTC

Used for expression analysis

TBP	ACCCTTCACCAATGACTCCTATG ATGATGACTGCAGCAAATCGC	h TBP	ATCCCTCCCCCATGACTCCCATG ATGATTACCGCAGGAAACCGC
NeuroD1	GGATCAATCTTCTCTTCCGGTG TGCGAATGGCTATCGAAAGAC	h NeuroD1	AGGAAGAAGAGGAAGAGGAGGATG TTGGTGGTGGGTTGGGATAAG
Atoh8	AAGAACTGAACGGCCTCAAGAAGC GATCGGGAACGGTTGTGTCC	h Pax4	AGCAGAGGCACTGGAGAAAGAGTT CAGCTGCATTTCCCACTTGAGCTT
Pax4	GAGTACCCTGCTCTTTTTGCC ACTCGATTGATAGAGGACACACT	h Nkx2.2	CTTCTACGACAGCAGCGACAACCCG CCTTGGAGAAAAGCACTCGCCGCTTT
Nkx2.2	GCCTCCAATACTCCCTGCAC GTCATTGTCCGGTGACTCGT	h Neurog3	GGGTCCCTCTACTCCCCAGTCTCC CTCAAGCAGGCGGAAAAGGTGG
Insm1	AAAGATGCCAATCCTCCGGC TAGCACGTTTTCGATCGCCC	h Pax6	AGACACAGCCCTCACAAACA ATCATAACTCCGCCATTCA
Neurog3	TTCTCATCGGTACCCTTGCTG GCAGACTCACCAGGAAGTATGG	h Nkx6.1	ACACGAGACCCACTTTTTCCG GCCCCGCCAAGTATTTTTGTT
Foxa2	CCCTACGCCAACATGAACTCG GTTCTGCCGGTAGAAAGGGA	h Sst	CAGTTTCTGCAGAAGTCCCTG AATTCTTGACGCCAGCTTTGC
Pax6	TACCAGTGTCTACCAGCCAAT TGCACGAGTATGAGGAGGTCT	h Ins	GCAGCCTTTGTGAACCAACA TTCCCCGCACACTAGGTAGAGA
Pck1/3	AGTTGGAGGCATAAGAATGCTG GCCTTCTGGGCTAGTCTGC	h MafA	CTTCAGCAAGGAGGAGGTCA TTGTACAGGTCCCGCTCTTT
Gck	CCCATCAGGAGGCCAGTGTA TCACCAGCATCACCCCTGAAG	h Sox9	AGCGAACGCACATCAAGAC CTGTAGGCGATCTGTTGGGG
Sst	ACCCCAGACTCCGTCACTTTT ATCATTCTCTGTCTGGTTGGGC		
lapp	CTCCAAACTGCCAGCTGTCC TCCGTTTGTCCATCTGAGGG		
ChromA	AGGGGACACCAAGGTGATGA AGCAGATTCTGGTGTGCGCAG		
MafA	CCTGTAGAGGAAGCCGAGGAA CCTCCCCAGTCGAGTATAGC		

AGRAÏMENTS

Sempre sembla impossible fins que es fa (Nelson Mandela). Doncs sí, el fet és que han passat 5 anys i per fi ja la tenim aquí! I ha sigut possible gràcies a gent fantàstica que m'he trobat a l'inici, al mig i al final del camí.

Primer de tot, vull agrair-te **Ramon** la oportunitat que m'has donat. M'ha agradat molt poder treballar al teu gran grup. Gràcies per impulsar la recerca en el món de la medicina, falten més metges com tu. Gràcies per tot!

En segon lloc, però per això no menys important, gràcies **Rosa** per tot el que m'has ensenyat i ajudat durant aquesta etapa. Ets una científica de primer nivell, bona persona, sempre intentant ajudar a tothom i aportant solucions. Desitjo que tinguis un gran futur!

Sara i **Lídia**, gràcies per tota l'ajuda que m'heu donat, no podia tenir millors companyes en el grup de la Rosa!. **Diana!** Què faria sense tu, l'alegria del laboratori! gràcies per tants bons moments i espero tenir molts més en el futur. Ets una gran nutricionista i ho demostres cada dia. **Rita, Elena, Liz** gracias por estar en el laboratorio los primeros años, he disfrutado mucho con vosotras y me habéis hecho reír en muchos momentos. Espero que tengáis un futuro brillante fuera del laboratorio. **Joan!** vas ser la primera persona que vaig conèixer en el laboratori. Que hagués fet jo sense tu durant tota la meva tesi? Sempre disposat a ajudar-me, ets un gran company. Et trobaré a faltar en el lab, espero que siguis molt feliç en la teva nova etapa!. **Ainhoa** gracias por todo! Eres increíble, siempre estas para todo lo que necesitamos y siempre positiva. Vales mucho! **Rebeca** i **Berta**, sempre contentes i disposades a ajudar en qualsevol moment, gràcies!! Gràcies a tots els que heu estat durant aquests anys i que heu aportat alguna cosa en la meva vida de doctoranda: **Hugo, Ana Lu, Mariona** i **Yaiza**.



Julia R.! Gràcies per fer-me riure tant cops! Gràcies per tot els moments i per totes les teves aportacions científiques! Ets una gran persona, amb moltes bones idees i amb un gran futur. Pensa que et queda poc a tu també. Ànims!!!

Gràcies a tota la gent que està en el laboratori i que ha aportat el seu gra de sorra per la realització d'aquesta tesi: **Marta Julià, Kim, Belén, Anna Novials, Joan Marc, Carlos, Sara,**

Valeria, Gema, Juan, Marce, Marc Claret, Alicia, Iñigo, Sara i Maca. Altres persones que han passat per el laboratori i que vull recordar en aquesta tesi: **Gemma P., Mercè O, Joel, Montse i Lisa.**

Per altra banda agrair a la gent que m'ha ajudat en algun moment i a la que tinc especial carinyu: **Noèlia T., Laia, Nawelle i Sahar.**

Fora de l'àmbit científic, no em vull oblidar al meu gran amic **Àlex**, i a les meves fantàstiques amigues que han estat presents durant tota aquesta etapa i m'han ajudat en tot el que he necessitat: **Belén, Sandra, Marta i Adri.**

Família gràcies per tot!! Gràcies **papa, mama, Ester, Júlia, Vicky, Xevi**, àvia **Valentina** i **M. Rosa**, per aquest recolzament incondicional i estar sempre presents, sou fantàstics. Us estimo molt.



Agrair a la meva altra família que sempre està quan els necessites. Estic molt contenta de tenir-vos al meu costat: **Mayte, Coke, Mire, Àlex, Guille, Pol i Heli.**

Per últim agrair a la meva fantàstica parella. Gràcies carinyu per tot el suport que m'has donat, sempre animant-me i ajudant-me quan més ho he necessitat! He après molt de tu! Comencem amb il·lusió una nova etapa, amb noves aventures, a disfrutar-ho! T'estimo

