



Universitat Autònoma de Barcelona

**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR DE LA
FACULTAT DE VETERINÀRIA**

CENTRE DE BIOTECNOLOGIA ANIMAL I TERÀPIA GÈNICA

**ESTUDI DE LA REPROGRAMACIÓ DE
CÈL·LULES ACINARS A CÈL·LULES
BETA MITJANÇANT FACTORS DE
TRANSCRIPCIÓ**

JOAN TEICHENNÉ JANÉ

Aquesta Tesi Doctoral ha estat realitzada sota la direcció del Dr. Eduard Ayuso López i la tutoria de la Dra. Alba Casellas Comallonga al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Veterinària i en el Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG).

JOAN TEICHENNÉ JANÉ

EDUARD AYUSO LÓPEZ

Bellaterra, Maig del 2015

Al David, perquè mai t'oblidaré.

Tot i que encara em costi de creure, estic arribant al final d'aquesta etapa. I no voldria acabar-la sense recordar tota la gent que m'ha ajudat a arribar fins aquí i que m'ha acompanyat durant el camí.

En primer lloc, vull agrair al Dr. Eduard Ayuso haver confiat en mi i haver-me donat l'oportunitat de realitzar aquesta tesi doctoral amb ell. M'ha ajudat moltíssim a desenvolupar el pensament crític i m'ha ensenyat el que suposa treballar dins el món de la ciència. També vull agrair a la Dra. Fàtima Bosch tot el seu suport durant aquests anys, sense el qual no hagués estat possible realitzar aquesta tesi. Gràcies també pel seu temps i consells en les comissions de seguiment, i per la seva ajuda en la redacció de l'article.

Moltes gràcies Alba per tot, pels consells, per compartir amb mi el teu coneixement sobre el pàncrees, pels teus ànims en els moments més frustrants, per estar sempre disponible amb un somriure. Has sigut la millor tutora possible.

També vull agrair a tots els companys de laboratori amb els que he compartit aquests anys. A la Meritxell, gràcies per la seva dedicació en aquest projecte i per haver estat sempre disponible per donar un cop de mà. Al Miquel, la Vero, la Vicky i la Laia per tots els consells i discussions científiques. A la Maria, gràcies per deixar que t'envaís constantment el laboratori de cultius cel·lulars, i també per estar sempre a punt per explicar-me alguna història interessant. Al Sergio, per ser un dels pocs habitants restants del laboratori de la 4a planta! I a la Tami, per donar vida a aquesta planta mentre vas estar al CBATEG.

A totes i tots els habitants del laboratori de la 3a planta: Estefania, Clàudia, Víctor "adipós", Jordi, Albert Rivera, Sara, Sandra, Víctor "MPS", Joan, Xavi Sánchez i Marisa. Sou gent genial i feu que es respiri un gran ambient, m'hagués agradat poder compartir més poiata amb vosaltres! I també a tots els que esteu escampats pel món: Iris, David i Pilar.

Als membres de la banda del CBATEG! Carles, Xavi i Luca, gràcies per tots els bons moments que hem passat fora del laboratori fent soroll amb un instrument!

Gràcies al Dr. Ruberte pel temps dedicat a les comissions de seguiment. A la Tura i la Sylvie, així com a la resta de companys de la 4a i la 5a planta. Gràcies també a tot l'equip tècnic: a la Marta, per tots els seus consells per les immunos; i a les cuineres de totes les solucions, la Lídia i la Jenny.

Gràcies també a les noies de la UAT, tot i no haver tingut el plaer d'haver treballat amb elles: Anna Pujol, Anna Arbós i Sandra. Gràcies a la Montse i a la Rosmi per donar sempre un cop de mà amb la paperassa.

També vull agrair de manera molt especial tot el suport rebut de part dels meus pares durant tota la meva vida. Sempre heu confiat en mi i m'heu deixat prendre les meves pròpies decisions. Als meus germans: a la Candi, perquè si no fos per tu probablement no hagués descobert mai el meu interès per la ciència; al Marc, per ser un dels meus referents per a tantes coses; i al David, perquè encara que ja no estiguis aquí formes part de mi i dels meus pensaments, i no deixaré mai d'estimar-te.

Finalment, vull donar les gràcies a la meva companya de viatge, la Mireia. Ets el meu pilar i sento que amb tu puc compartir-ho tot, els moments bons, els dolents i qualsevol tonteria que em passi pel cap. No em sé imaginar el camí recorregut i per recórrer sense tu. T'estimo.

Aquesta tesi doctoral ha estat possible, en primer lloc, gràcies a una beca predoctoral del programa FI-DGR 2012 de l'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) de la Generalitat de Catalunya, de la qual n'he sigut beneficiari durant tres anys. Les investigacions s'han realitzat gràcies a la financiació rebuda del Ministerio de Economía y Competitividad, Plan Nacional I+D+I (SAF2011-24698), de la Generalitat de Catalunya (2009 SGR-224) i del projecte europeu EFSD/JDRF/ROCHE: *Young Investigator Award in Innovative Therapy for Type 1 Diabetes*.

aa	Aminoàcids
AAV	Virus adenoassociat
Ad	Adenovirus
ADP	Adenosina difosfat
Arx	<i>Aristaless related homeobox</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfat
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Ca²⁺	Calci
CBATEG	Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica
cDNA	DNA complementari
Cela1	<i>chymotrypsin-like elastase family, member 1</i>
CMV	Citomegalovirus
Cpa1	Carboxipeptidasa A1
Cpe	Carboxipeptidasa E
CsCl	Clorur de Cesi
DEPC	Dietilpirocarbonat
DNA	Àcid desoxirribonucleïc
dNTP	Deoxinucleòtid trifosfat
EEUU	Estats Units
EMT	Transició epitelial-mesenquimal
ESC	Cèl·lula mare embrionària
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E1	Gen primerenc 1 (<i>Early gene 1</i>)
E2	Gen primerenc 2 (<i>Early gene 2</i>)
E4	Gen primerenc 4 (<i>Early gene 4</i>)
E-Cad	<i>E-Cadherin</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FG-Ad	Vector adenoviral de primera generació
Gcg	Glucagó
Gck	Glucocinasa
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GLP-1	<i>Glucagon like peptide-1</i>
GLUT2	Transportador de glucosa 2
h	Hora
Hd-Ad	Vector adenoviral depenent de <i>helper</i>
Hes1	<i>Hairy and enhancer of split-1</i>
HGF	Factor de creixement d'hepatòcits
hMSC	Cèl·lules mesenquimals embrionàries humanes
Iapp	<i>Islet amyloid polypeptide</i>
IGF2	Factor de creixement similar a la insulina 2
Ins1	Gen de la Insulina 1

Ins2	Gen de la Insulina 2
iPSC	Cèl·lula mare pluripotent induïda
ITR	<i>Inverted Terminal Repeats</i>
kb	Kilobases
MafA	<i>V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein A</i>
MafB	<i>V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B</i>
miRNA	MicroRNA
MODY	<i>Maturity-onset diabetes of the Young</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
mg	Mil·ligram
ml	Mil·lilitre
mM	Mil·limolar
mRNA	RNA missatger
NeuroD1	<i>Neurogenic differentiation 1</i>
ng	Nanogram
Ngn3	<i>Neurogenin 3</i>
Nkx2.2	<i>NK2 homeobox 2</i>
Nkx6.1	<i>NK6 homeobox 1</i>
Nkx6.2	<i>NK6 homeobox 2</i>
nm	Nanòmetre
o/n	<i>Overnight</i>
Pax 4	<i>Paired box 4</i>
Pax 6	<i>Paired box 6</i>
pb	Parells de bases
PBS	Tampó fosfat-salí
PCA	Anàlisi de component principal
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Pcsk1	<i>Proprotein convertase subtilisin/kexin type 1</i>
Pcsk2	<i>Proprotein convertase subtilisin/kexin type 2</i>
Pdx1	<i>Pancreatic duodenal homeobox 1 gene</i>
PNM	Factors de transcripció <i>Pdx1</i> , <i>Neurog3</i> i <i>MafA</i>
PP	Polipèptid pancreàtic
Ptf1a	<i>Pancreas specific transcription factor, 1a</i>
pv	Partícules virals
qPCR	PCR quantitativa
RIP-1	Promotor del gen de la insulina I de rata
RLU	Unitats Relatives de Llum
RNA	Àcid ribonucleic
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revolucions per minut
SDS	Dodecilsulfat sòdic
SeAP	<i>Secreted Alkaline Phosphatase</i>
SEM	Error estàndard de la mitjana

Sox9	<i>SRY (sex determining region Y)-box 9</i>
T1D	Diabetis tipus 1
T2D	Diabetis tipus 2
TE	Tampó tris-EDTA
Treg	Limfòcits T reguladors
UAB	Universitat Autònoma de Barcelona
UTR	<i>Untranslated region</i>
V	Volts
VIP	<i>Vasoactive Intestinal Peptide</i>
WPRE	<i>Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element</i>
ZEB1	<i>Zinc finger E-box binding homeobox 1</i>
ZEB2	<i>Zinc finger E-box binding homeobox 2</i>
µg	Microgram
µl	Microlitre
µm	Micròmetre
°C	Graus Celcius

I. PRESENTACIÓ	1
II. INTRODUCCIÓ	5
1. EL PÀNCREES	5
1.1. Estructura i funció del pàncrees.....	5
1.1.1. <i>El pàncrees exocrí</i>	6
1.1.2. <i>El pàncrees endocrí</i>	7
1.2. Desenvolupament embrionari del pàncrees.....	10
1.2.1. <i>Desenvolupament del llinatge acinar</i>	12
1.2.2. <i>Desenvolupament dels llinatges endocrí i ductal</i>	13
1.3. Funcionalitat de la cèl·lula beta.....	14
1.3.1. <i>Regulació de l'expressió del gen de la insulina</i>	15
1.3.2. <i>Regulació de la secreció de la insulina</i>	17
2. DIABETIS MELLITUS	19
2.1. Diabetis tipus 1	20
2.2. Teràpies actuals per a la diabetis tipus 1	22
2.3. Teràpies avançades per a la diabetis tipus 1	23
3. TERÀPIA GÈNICA	25
3.1. Introducció a la teràpia gènica.....	25
3.2. Vectors adenovirals	28
3.2.1. <i>Biologia dels vectors adenovirals</i>	28
3.2.2. <i>Vectors adenovirals de primera generació</i>	29
3.3. Teràpia gènica per a la diabetis tipus 1.....	30
3.3.1. <i>Generació de noves cèl·lules beta mitjançant reprogramació cel·lular</i>	30

4. microRNAs.....	34
4.1. Biogènesi i mecanismes d'acció dels microRNAs	34
4.2. Paper dels microRNAs en el manteniment de la pluripotencialitat i la diferenciació	36
4.3. Paper dels microRNAs en el desenvolupament pancreàtic.....	38
III. OBJECTIUS.....	43
IV. RESULTATS.....	47
1. Estudi dels efectes de l'expressió de factors de transcripció endocrins en cèl·lules acinars de ratolí: 266-6	47
1.1. Generació dels constructes	47
1.2. Transfeccions de factors de transcripció i anàlisi de l'activació de RIP-1.....	48
1.3. Anàlisi de l'expressió de marcadors endocrins en cèl·lules 266-6 transfectades amb PNM.....	51
1.4. Estudi dels efectes de la transducció amb Ad-PNM en cèl·lules 266.6 ..	52
2. Estudi de la reprogramació a cèl·lula β en les línies cel·lulars acinars de rata AR42J i AR42J-B13	55
2.1. Estudi dels efectes de la transducció amb Ad-PNM en les cèl·lules AR42J i B13	55
2.2. Caracterització de la funcionalitat de les cèl·lules B13 reprogramades ..	58
2.3. Estudi de l'efecte dels vectors adenovirals en la reprogramació per Ad-PNM	61
3. Cribeig de microRNAs implicats en la reprogramació de cèl·lules acinars a cèl·lules β	65
3.1. Anàlisi bioinformàtic dels perfils d'expressió de microRNAs.....	65

3.2. Efectes biològics de la sobreexpressió de la família miR-200 en AR42J respecte B13	71
V. DISCUSSIÓ.....	75
VI. CONCLUSIONS	87
VII. MATERIALS I MÈTODES	91
1. MATERIALS	91
1.1. Soques bacterianes.....	91
1.2. Anticossos.....	91
1.3. Plasmidis.....	91
1.4. Reactius	92
2. MÈTODES.....	93
2.1. Tècniques bàsiques de DNA.....	93
2.1.1. Preparació del DNA plasmídic	93
2.1.2. Digestió del DNA amb enzims de restricció	93
2.1.3. Purificació i resolució del DNA.....	94
2.1.4. Desfosforilació de fragments de DNA	95
2.1.5. Generació d'extrems roms de fragments de DNA	95
2.1.6. Transformació en cèl·lules competents.....	95
2.1.7. Construcció de molècules híbrides de DNA: lligació.....	96
2.1.8. Construcció de plasmidis.....	96
2.2. Línies cel·lulars eucariotes en cultiu	97
2.2.1. Cèl·lules 266-6.....	97
2.2.2. Cèl·lules AR42J.....	97
2.2.3. Cèl·lules AR42J-B13	98
2.2.4. Cèl·lules HEK-293	98
2.3. Transfecció de cèl·lules 266-6 amb DNA plasmídic.....	98

2.4. Producció, purificació i quantificació dels vectors adenovirals	99
2.4.1. Producció i purificació dels vectors adenovirals	99
2.4.2. Quantificació dels vectors adenovirals.....	100
2.5. Transducció de les cèl·lules en cultiu amb vectors adenovirals.....	101
2.6. Anàlisi de l'expressió de mRNA per qPCR	101
2.6.1. Extracció de l'RNA total.....	101
2.6.2. Síntesi de cDNA	102
2.6.3. PCR quantitativa.....	102
2.7. Test de secreció i contingut cel·lular d'insulina.....	104
2.8. Anàlisi immunocitoquímica de la insulina	105
2.9. Determinació de la fosfatasa alcalina secretada (seAP).....	106
2.10. Anàlisi de l'expressió de microRNAs per qPCR.....	106
2.10.1. Extracció de l'RNA total.....	107
2.10.2. Síntesi de cDNA	107
2.10.3. PCR quantitativa.....	107
2.10.4. Anàlisi bioinformàtic de les dades obtingudes per qPCR de <i>microRNAs</i>	108
2.11. Anàlisi estadístic.....	108
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	111

I. PRESENTACIÓ

La diabetis tipus 1 (T1D) és una malaltia autoimmunitària causada per la destrucció de les cèl·lules productores d'insulina del pàncrees, les cèl·lules β , la qual provoca una insuficiència en la producció d'insulina i consegüentment hiperglucèmia. Aquesta malaltia esdevé clínicament aparent quan la majoria (>70-80%) de les cèl·lules β han estat destruïdes. Per tant, restablir la massa de cèl·lules β per tal de mantenir una homeòstasi adequada de la glucosa és un dels principals reptes de la medicina regenerativa pel tractament de la T1D. En aquest sentit, la generació de noves cèl·lules β a partir de la reprogramació d'altres tipus cel·lulars no afectats per la malaltia, com per exemple les cèl·lules acinars, és una nova estratègia terapèutica amb un gran potencial, ja que es podria dur a terme en el propi pacient. A més, la reprogramació de cèl·lules acinars comporta certs avantatges respecte la reprogramació d'altres tipus cel·lulars diferenciats, ja que n'hi ha una gran abundància al pàncrees (representen més del 80% del pàncrees), aquestes comparteixen un origen comú amb les cèl·lules β durant l'embriogènesi, resideixen al mateix òrgan que les cèl·lules β i a més disposen de maquinària secretora.

Diversos estudis han descrit que l'expressió mitjançant vectors adenovirals de primera generació (FG-Ad) de *Pdx1*, *Ngn3* i *Mafa* (PNM), tres factors de transcripció específics de cèl·lula β , en cèl·lules acinars aconsegueix reprogramar aquestes cèl·lules cap a cèl·lules productores d'insulina. Tot i això, aquests estudis indiquen que la transducció amb vectors FG-Ad és necessària pel procés de reprogramació, i la funcionalitat d'aquestes cèl·lules no és exactament igual a la de les cèl·lules β .

Amb la finalitat d'aprofundir en els mecanismes moleculars implicats en la reprogramació, en aquest estudi s'ha analitzat la capacitat de reprogramació de tres línies cel·lulars acinars (266-6, AR42J i AR42J-B13) al ser transduïdes amb un vector FG-Ad codificant per PNM. Els resultats obtinguts han mostrat que les tres línies cel·lulars responien de manera molt diferent a la sobreexpressió de PNM, i que la línia cel·lular AR42J-B13 (B13) presentava una eficiència de reprogramació major a les demés línies cel·lulars, evidenciada per una major activació de l'expressió de marcadors de cèl·lula β . Aquests resultats suggereixen que les condicions intrínseques de les cèl·lules acinars juguen un paper clau en el procés de reprogramació cap a cèl·lula β .

En una caracterització més detallada del fenotip de les cèl·lules B13 reprogramades, s'ha pogut observar que aquestes presentaven moltes de les característiques de les cèl·lules β diferenciades adultes, com l'expressió de gens processadors de la pro-insulina, l'expressió dels sensors de la glucosa i la producció de la proteïna de la insulina. No obstant, la insulina produïda per aquestes cèl·lules no era secretada al medi a nivells detectables.

D'altra banda, s'ha estudiat el paper dels vectors adenovirals en el procés de reprogramació, i s'ha demostrat que la transducció adenoviral *per se* regula negativament l'expressió de gens exocrins, suggerint que aquests vectors produeixen un efecte de desdiferenciació sobre el fenotip acinar de les cèl·lules B13, facilitant-ne així la reprogramació.

Amb l'objectiu d'identificar microRNAs involucrats en el procés de reprogramació de cèl·lules acinars cap a cèl·lules β , s'ha realitzat un estudi del perfil d'expressió de microRNAs. S'ha observat que les cèl·lules AR42J i B13 sense transduir per adenovirus tenien perfils d'expressió de microRNAs molt diferenciats, identificant-se fins a 60 microRNAs diferentment expressats entre les dues línies cel·lulars. La línia cel·lular B13 presentava alguns signes de trobar-se en un estat més indiferenciat que la línia AR42J, com per exemple la supressió de l'expressió de la família de miR-200, fet que podria facilitar la seva reprogramació cap a cèl·lules β . També s'han identificat 11 microRNAs involucrats en la transducció adenoviral i 8 microRNAs associats a la sobreexpressió de PNM.

En resum, en aquest treball s'ha aprofundit en els mecanismes involucrats en la reprogramació de cèl·lules acinars cap a cèl·lules β , i s'han identificat microRNAs involucrats en aquest procés. Aquests microRNAs podrien ser utilitzats en un futur per millorar l'eficiència de reprogramació de cèl·lules acinars cap a cèl·lules β pel tractament de la diabetis mellitus.

II. INTRODUCCIÓ

1. EL PÀNCREES

El pàncrees és alhora una glàndula exocrina i endocrina, productora de diverses hormones, incloses la insulina i el glucagó, essencials en la regulació de l'homeòstasi de la glucosa. De la mateixa manera, el pàncrees també és un òrgan digestiu, ja que secreta el suc pancreàtic, que conté enzims digestius que ajuden a l'absorció de nutrients i a la digestió a l'intestí prim.

1.1. Estructura i funció del pàncrees

El pàncrees és una glàndula composta on es poden diferenciar, histològica i funcionalment, dues parts: el **pàncrees exocrí**, format pels acinis i els ductes, que participen en la secreció d'enzims digestius al duodè; i el **pàncrees endocrí**, format pels illots de Langerhans, que secreten hormones al torrent circulatori (Figura 1) (Shih et al., 2013).

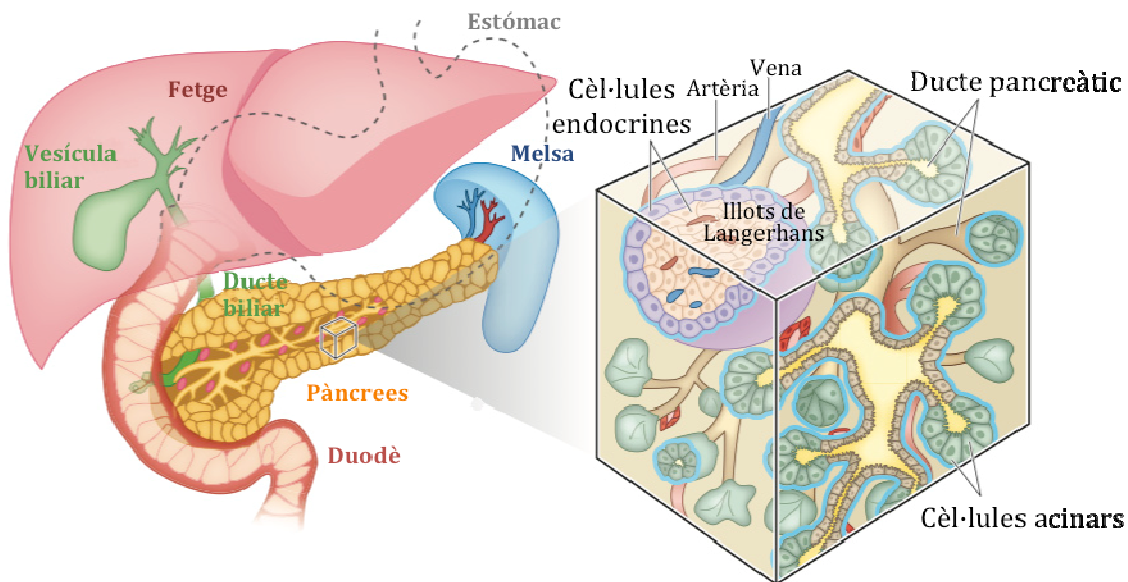


Figura 1. Localització i estructura del pàncrees. El pàncrees es troba de forma adjacent al duodè i a prop de l'estómac. El pàncrees exocrí constitueix la major part de la glàndula i es compon principalment de les cèl·lules acinars i la xarxa ramificada dels ductes. El pàncrees endocrí està format pels illots de Langerhans, que es troben per tot el parènquima exocrí. Els illots contenen diferents tipus de cèl·lules endocrines. Imatge adaptada de (Shih et al., 2013).

1.1.1. El pàncrees exocrí

El pàncrees exocrí constitueix aproximadament el 80-85% del total de cèl·lules pancreàtiques, formant agrupacions de cèl·lules epitelials, anomenades cèl·lules acinars, orientades en sentit radial i formant una llum, el lumen, que comunica amb els ductes pancreàtics. Aquests formen una xarxa de comunicació entre els acinis i la llum del duodè (Figura 1).

Les **cèl·lules acinars** són les unitats funcionals del pàncrees exocrí. Tenen una forma piramidal arrodonida i estan altament polaritzades, amb dos dominis de membrana plasmàtica diferents. La membrana basolateral és gran i està localitzada a la perifèria acinar, mentre que la membrana apical (que correspon a menys del 10% de la superfície de la cèl·lula) està encarada al lumen.

La funció principal de les cèl·lules acinars és la de síntesi, reservori i secreció d'enzims digestius pancreàtics com les proteases, lipases, ribonucleases, amilases i hidrolases (Whitcomb and Lowe, 2007). Aquests enzims es sintetitzen i secreten generalment de forma inactiva (proenzims), per tal d'evitar l'autodigestió de l'òrgan, i s'emmagatzemen en els anomenats grànuls de zimogen, on s'han identificat fins a 371 proteïnes diferents (Rindler et al., 2007). La cascada enzimàtica pancreàtica comença al duodè, amb l'activació del tripsinogen per les enteropeptidases, i la tripsina funcional activa els altres proenzims. Per tal d'evitar l'activació intrapancreàtica de les proteases, les cèl·lules acinars també secreten inhibidors de la tripsina, com el PSTI (*pancreatic secretory trypsin inhibitor*) (Kazal et al., 1948). La secreció de les cèl·lules acinars està induïda principalment per la ingesta de menjar, la qual inicia múltiples rutes endocrines, neurocrines i paracrines que regulen l'alliberació de les quantitats apropiades d'enzims digestius. D'entre els reguladors neurohormonals secretats en resposta a la ingesta i que promouen la secreció acinar hi toben la colecistoquinina, l'acetilcolina, la secretina o l'angiotensina II (Leung and Ip, 2006).

Les **cèl·lules ductals** formen la xarxa ramificada de ductes pancreàtics, que convergeix en el ducte pancreàtic principal, el qual transporta els enzims digestius a l'intestí. L'últim fragment del ducte pancreàtic està compartit amb el conducte de la vesícula biliar, que transporta la bilis alcalina des del fetge. A més de donar estructura

als ductes pancreàtics, les cèl·lules ductals també secreten grans volums d'un fluid ric en clor i bicarbonat, el qual es barreja amb els enzims secretats per les cèl·lules acinars per formar el suc pancreàtic. Aquest fluid alcalí i ric en enzims arriba fins el duodè, on els ions de biocarbonat neutralitzen el quim acídic provinent de l'estómac i on s'activen els enzims pancreàtics (Hegyí and Petersen, 2013; Logsdon and Ji, 2013).

1.1.2. El pàncrees endocrí

La fracció endocrina del pàncrees constitueix només un 1-2% de la massa total del pàncrees adult i està format pels illots de Langerhans, tot i que també es poden trobar cèl·lules endocrines aïllades (Rahier et al., 1981). Els illots estan dispersos irregularment per tot el parènquima exocrí, amb major densitat a la zona de la cua del pàncrees (Figura 1), i es troben envoltats per una càpsula de teixit connectiu característica, que els aïlla del teixit exocrí i els ajuda a mantenir la seva integritat estructural. Aproximadament, hi ha un milió d'illots repartits en un pàncrees humà, entre 1000 i 2000 en el de rates i uns 500 en el de ratolí. Cada illot conté aproximadament 2000 cèl·lules productores d'hormones (Dor et al., 2004).

Els illots de Langerhans presenten cinc tipus cel·lulars diferents, cadascun dels quals secreta una hormona diferent i presenta una distribució característica dins de l'illot (Figura 2).

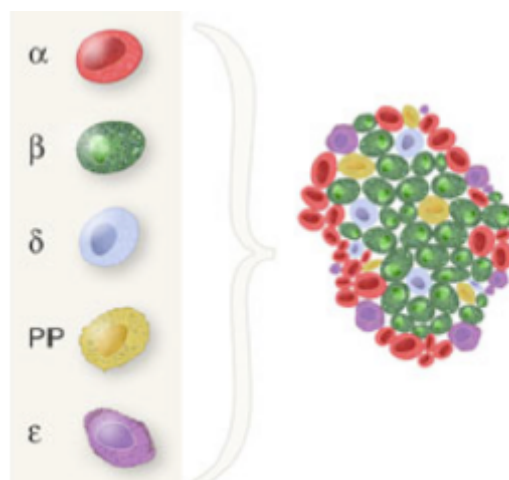


Figura 2. Estructura de l'illot pancreàtic. Patró de distribució dels diferents tipus cel·lulars que componen l'illot de Langerhans. (Imatge adaptada de JP Cartailleur, *Beta Cell Biology Consortium*).

Les **cèl·lules α** alliberen glucagó i es localitzen a la perifèria de l'illot, constituint entre el 15 i el 20% del total de cèl·lules endocrines en ratolí. En canvi, en humans representen el 40% del total de cèl·lules endocrines (Stefan et al., 1982; Brissova et al., 2005). Per a la inducció de la glucogenòlisi i la gluconeogènesi, durant el dejuni, l'hormona del glucagó produïda per la cèl·lula α manté els nivells de glucosa en sang constants (60-175 mg/dl en ratolins i 80-120 mg/dl en humans).

Les **cèl·lules β** , secretores d'insulina, es troben agrupades al centre de l'illot i són les més abundants. En ratolins representen el 60-70% del total de cèl·lules endocrines i en humans el 50% (Stefan et al., 1982; Brissova et al., 2005).

El glucagó i la insulina actuen antagònicament segons l'estat de l'individu (en dejuni i en alimentació), augmentant o disminuint els nivells de glucosa en sang, respectivament. La insulina és l'única hormona capaç de disminuir els nivells de glucosa en sang i induir l'absorció postprandial de la glucosa a les cèl·lules.

Les **cèl·lules δ** representen el 10% de les cèl·lules dels illots humans i alliberen la hormona somatostatina. Aquesta és una hormona important que regula la producció i alliberament d'altres hormones i inhibeix la secreció del glucagó i la insulina, entre d'altres. Aquestes cèl·lules estan situades a la perifèria i a prop dels capil·lars de l'illot.

Les **cèl·lules PP** constitueixen el 5% de les cèl·lules de l'illot humà i produeixen el polipèptid pancreàtic (PP), que té efectes reguladors en l'activitat secretora del pàncrees i d'altres glàndules. L'hormona s'allibera en resposta a l'alimentació i s'ha demostrat que actua a nivell del sistema nerviós central per reduir la gana i la ingesta d'aliments (Batterham et al., 2003). Són cèl·lules situades a la perifèria i a prop dels capil·lars dels illots.

Les **cèl·lules ϵ** representen <1% de les cèl·lules de l'illot i es troben distribuïdes a l'atzar a l'interior de l'illot. Aquestes cèl·lules produeixen l'hormona grelina, la qual és estimuladora de la ingesta (Prado et al., 2004). A més, s'ha demostrat que la grelina té un paper central en la regulació de l'homeòstasi de la glucosa, ja que afecta negativament a l'alliberament d'insulina (Broglio et al., 2001, 2003; Yada et al., 2008;

Tong et al., 2010) i positivament a l'alliberament de glucagó, així com reduint la somatostatina i el PP (Qader et al., 2005, 2008; Chuang et al., 2011).

La descripció anterior correspon a l'estructura dels illots dels rosegadors (Figura 2) i es basa en el tipus d'illot prototípic, descrit en molts llibres de text, però existeix una gran variabilitat entre espècies pel que fa a la composició de les cèl·lules i l'estructura de l'illot. En illots humans i de primats no humans (Figura 3A i B), les cèl·lules β no estan agrupades en el nucli i tenen més cèl·lules productores de glucagó que en els rosegadors (Bosco et al., 2010). D'altra banda, els illots de porc estan formats per diverses subunitats més petites que s'assemblen als illots de ratolí (Cabrera et al., 2006).

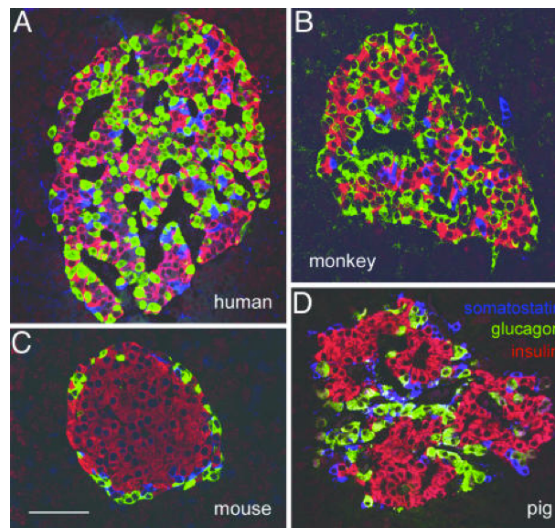


Figura 3. Illots de Langerhans de diferents espècies. Fotografies de microscopi confocal (seccions òptiques 1 μ m), que mostren seccions pancreàtiques representatives amb illots de Langerhans d'humà (A), primat no humà (B), ratolí (C) i porc (D) (Adaptat de Cabrera et al. 2006).

Tot i que les cèl·lules endocrines són el principal component cel·lular de l'illot, també s'hi troben altres tipus cel·lulars no endocrins, que configuren la innervació i la irrigació sanguínia de l'illot. Les terminacions nervioses que arriben als illots estan formades pels axons de neurones i per cèl·lules astroglials anomenades **cèl·lules de Schwann**. Aquestes cèl·lules formen una xarxa al voltant dels illots que els embolcalla i separa les cèl·lules endocrines del teixit connectiu i del teixit exocrí (Sunami et al., 2001). Les cèl·lules que configuren la vascularització de l'illot són les cèl·lules de l'**endoteli vascular** i constitueixen una part important del volum dels illots. Es tracta de cèl·lules fenestrades fortament unides entre elles per unions estretes o oclusives que

permeten l'accés directe de les cèl·lules endocrines al torrent sanguini (Olsson and Carlsson, 2006; Ballian and Brunnicardi, 2007).

1.2. Desenvolupament embrionari del pàncrees

Les cèl·lules pancreàtiques exocrines i endocrines tenen com a origen comú un grup de cèl·lules progenitores de l'**endoderm intestinal** (Gu et al., 2002). En els ratolins, el desenvolupament del pàncrees esdevé morfològicament evident al voltant del dia 8.5 de l'estadi embrionari (e), amb la formació de les regions prepancreàtiques dorsal i ventral. Durant aquesta fase primerenca del desenvolupament pancreàtic, la qual s'anomena *transició primària* (Pictet et al., 1972), l'epiteli pancreàtic, encara indiferenciat, està estretament envoltat de **cèl·lules mesenquimals**, les quals no tenen polaritat i es troben en un estat més indeferenciat, podent així donar lloc a diferents tipus de teixits. Durant la *transició secundària*, del dia 12.5e fins al naixement, l'**epiteli del pàncrees** continua expandint-se i es ramifica en una xarxa tubular altament ordenada i complexa. Aquests canvis morfològics són paral·lels a la diferenciació de les cèl·lules endocrines, acinars i ductals. Al final de la transició secundària, el pàncrees del ratolí ha adquirit en gran mesura l'organització topològica de l'òrgan madur, amb grups de cèl·lules acinars al voltant de la xarxa de conductes i els agregats de les cèl·lules endocrines disperses per tot l'òrgan.

Les **cèl·lules endodèrmiques pancreàtiques**, a diferència de la majoria de cèl·lules de l'endoderm intestinal, no expressen el gen *Shh* (*Sonic hedgehog*) (Hebrok et al., 1998; Kim and Melton, 1998). D'altra banda, l'àcid retinoic (RA) indueix el programa pancreàtic dorsal, ja que l'absència d'aquest provoca la falta de pàncrees dorsal en ratolí (Martín et al., 2005). La regió ventral de l'intestí anterior durant el desenvolupament embrionari dóna lloc tant al pàncrees ventral com al fetge, i les senyalitzacions del factor de creixement de fibroblasts (FGF) i la proteïna morfogenètica de l'os (BMP) són claus per a la deriva hepàtica (Deutsch et al., 2001; Rossi et al., 2001).

Un cop els dominis prepancreàtics ventral i dorsal han sigut especificats, determinats factors de transcripció comencen a ser expressats específicament en

aquestes **cèl·lules progenitores pancreàtiques**. Així, entre aquests factors de transcripció primerencs s'hi troben *Pdx1* (*Pancreatic and duodenal homeobox 1*), *Ptf1a* (*Pancreas specific transcription factor, 1a*), *Sox9* i *Hes1* (*Hairy enhancer of split-1*) entre d'altres (Zhou et al., 2007; Seymour et al., 2008; Bonal and Herrera, 2008; Mansouri, 2012; Shih et al., 2013) (Figura 4). L'expressió d'aquests factors de transcripció està altament regulada i relacionada entre ells, ja que l'eliminació d'un d'ells afecta a múltiples components durant el desenvolupament del pàncrees (Seymour et al., 2008; Thompson et al., 2012). En aquest estadi, el pàncrees encara no té l'estructura macroscòpica del pàncrees madur i els diferents tipus cel·lulars que proporcionen la funcionalitat a l'òrgan no s'han diferenciat, ja que la majoria de cèl·lules són cèl·lules progenitores multipotents (MPCs).

El primer pas de diferenciació d'aquestes MPCs cap als diferents tipus cel·lulars del pàncrees és la separació de dos dominis: el domini *tip* i el domini *trunk*. El domini *tip* donarà lloc a les cèl·lules acinars i es caracteritza per l'expressió dels marcadors *Ptf1a*, *c-Myc* i *Cpa*. El domini *trunk*, en canvi, donarà lloc al pàncrees endocrí i als ductes, i es caracteritza per l'expressió de *Nkx6.1/6.2*, *Sox9*, *Tcf2*, *Onecut-1*, *Prox1* i *Hes1* (Jacquemin et al., 2000; Wang et al., 2005; Vanhorenbeeck et al., 2007; Zhou et al., 2007; Solar et al., 2009; Schaffer et al., 2010; Klinck et al., 2011; Kopinke et al., 2011; Kopp et al., 2011). Nivells elevats del sistema de senyalització **Notch** prevé de la formació del domini *tip* i promou la formació del domini *trunk* (Esni et al., 2004; Schaffer et al., 2010; Afelik et al., 2012) (Figura 4).

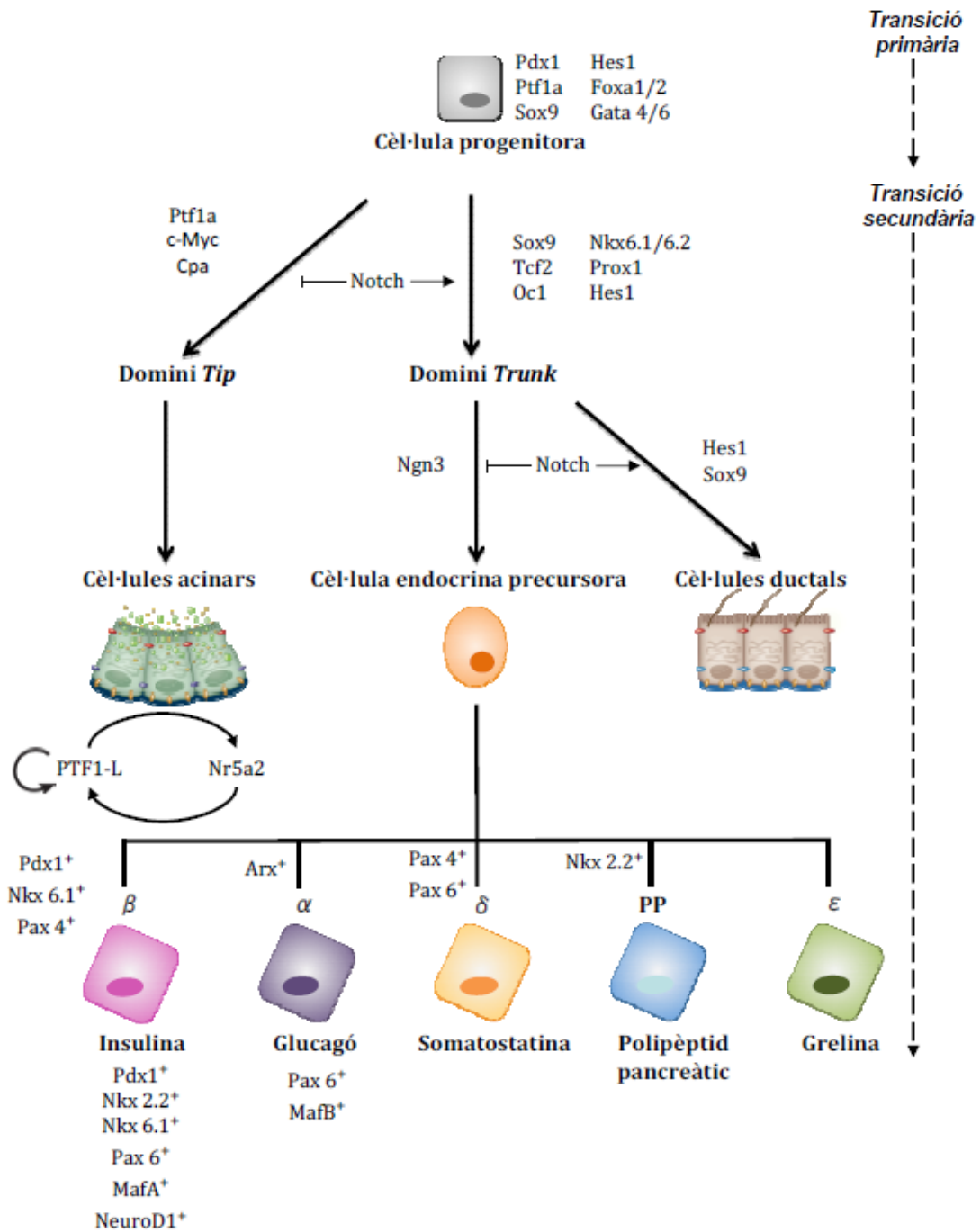


Figura 4. Desenvolupament i diferenciació del pàncrees. Les cèl·lules progenitores de l'endoderm, a través de l'expressió de determinats factors de transcripció, s'acabaran diferenciant en una cèl·lula precursora endocrina, acinar o ductal.

1.2.1. Desenvolupament del llinatge acinar

Les cèl·lules acinars provenen de les cèl·lules precursors del domini *tip* (Zhou et al., 2007). Cap el dia 15.5e, la majoria de les cèl·lules *tip* han estat sotmeses a la

diferenciació acinar, i l'expansió posterior del domini acinar està conduïda en gran part per la proliferació cel·lular.

La diferenciació acinar està conduïda sinèrgicament pels factors de transcripció *Ptf1a*, *Rbp-jl* i *Nr5a2/LRH-1*, els quals s'expressen específicament primer en cèl·lules *tip* i després en cèl·lules acinars (Masui et al., 2007; Zhou et al., 2007; Masui et al., 2010; Holmstrom et al., 2011). Durant la transició secundària, el factor *Rbp-jl* s'uneix a *Ptf1a* per formar el complex **PTF1-L**, el qual estableix el fenotip acinar mitjançant l'activació de gens acinars essencials, així com també dels mateixos *Ptf1a* i *Rbp-jl*, constituint així un *loop* d'autoactivació que manté l'expressió alta de gens acinars (Rose et al., 2001; Masui et al., 2007, 2010).

De manera similar, el factor *Nr5a2*, que és diana directa de *Ptf1a*, també és necessari per a la diferenciació acinar, mitjançant la unió i regulació d'un grup similar de gens a aquells regulats per *Ptf1a*. Així, *Nr5a2* i *Ptf1a* actuen de manera conjunta en la regulació de gens específics de cèl·lula acinar (Holmstrom et al., 2011; Thompson et al., 2012) (Figura 4).

Tot i que *Ptf1a* és un coordinador indispensable pel desenvolupament de la cèl·lula acinar, la seva sobreexpressió no és suficient per sí sola per induir diferenciació acinar (Schaffer et al., 2010). Sembla que la iniciació d'aquesta diferenciació requereix d'altres factors de transcripció que actuïn en paral·lel a *Ptf1a*. Un factor de transcripció candidat per aquesta funció és *Mist1*, que està fortament expressat en cèl·lules acinars i l'expressió del qual no depèn del complex PTF1-L (Yoshida et al., 2001; Masui et al., 2010)

1.2.2. Desenvolupament dels llinatges endocrí i ductal

Dins del domini *trunk*, un conjunt de cèl·lules progenitores pancreàtiques expressaran el factor de transcripció ***Ngn3*** (*Neurogenin 3*), el qual marca l'inici de la diferenciació cap als diferents tipus cel·lulars endocrins (Gradwohl et al., 2000; Gu et al., 2002; Johansson et al., 2007). En canvi, les cèl·lules *trunk* que no expressin *Ngn3*, contribuiran a la formació dels ductes (Beucher et al., 2012; S. Wang et al., 2010). S'ha

observat que una elevada senyalització de la via Notch promou l'expressió dels marcadors *Hes1* (un repressor de *Ngn3*) i *Sox9* (un activador de *Ngn3*), els quals provoquen la diferenciació cap a cèl·lules ductals. Si hi ha una activitat baixa de Notch, només s'activa *Sox9*, permetent l'activació de *Ngn3* i portant les cèl·lules a la diferenciació endocrina (Shih et al., 2012) (Figura 4).

Les cèl·lules endocrines progenitores, cèl·lules *Ngn3*⁺, es diferenciaran cap als 5 tipus cel·lulars endocrins característics segons l'expressió de diferents factors de transcripció. Els factors de transcripció *Pdx1*, *Pax4* i *Nkx6.1* determinaran les cèl·lules β , mentre que *Arx* (*Aristaless related homeobox*) determinarà les cèl·lules α . Quan en les cèl·lules endocrines progenitores s'expressi la combinació de *Pax4* i *Pax6* donarà lloc a les cèl·lules δ productores de somatostatina, i quan expressin *Nkx2.2* es diferenciaran en les cèl·lules PP. Finalment, un percentatge molt petit es diferenciaran en les cèl·lules ϵ productores de grelina (Bonal and Herrera, 2008; Mansouri, 2012; Shih et al., 2013; Ziv et al., 2013) (Figura 4).

1.3. Funcionalitat de la cèl·lula β

En els últims anys, l'estudi dels factors de transcripció que s'expressen en les cèl·lules β ha portat a concloure que aquestes proteïnes poden tenir un doble paper per a l'organisme: 1) durant l'embriogènesi determinen la diferenciació de les cèl·lules epitelials a progenitores endocrines fins a cèl·lules β madures; i 2) en l'adult, mantenen el fenotip de les cèl·lules β madures i asseguren la regulació específica de les hormones en cada una de les cèl·lules endocrines. Per tant, els mateixos factors de transcripció que regulen la transcripció dels gens i el bon funcionament de les cèl·lules β d'un individu adult, estan també implicats en la diferenciació d'aquestes cèl·lules durant el desenvolupament embrionari del pàncrees. (Mansouri, 2012; Shih et al., 2013; Ziv et al., 2013).

Les cèl·lules β són les principals responsables del control de l'homeòstasi de la glucosa per mitjà de la síntesi i secreció d'insulina. Després de la secreció d'insulina al torrent sanguini es produeix l'estimulació de la utilització de glucosa en els teixits

perifèrics, múscul i teixit adipós, i la inhibició de la producció de glucosa hepàtica en conjunció amb l'activació de la síntesi de glicogen en aquest teixit. Per tant, aquesta hormona és la que permet contrarestar la hiperglucèmia (Kulkarni, 2004).

1.3.1. Regulació de l'expressió del gen de la insulina

En individus adults, el gen de la insulina s'expressa de forma específica en les cèl·lules β dels illots de Langerhans, tot i que també se n'han detectat nivells d'expressió molt baixos en cervell, retina i timus (Fan et al., 2009; Mehran et al., 2012).

La seqüència del gen de la insulina està altament conservada entre espècies. Així, la insulina dels vertebrats més primitius i la insulina humana difereixen únicament en unes poques bases. En la majoria d'espècies, es presenta com un gen d'una sola còpia. En el cas dels humans es localitza al cromosoma 11, entre els gens de la *tirosina hidroxilasa* i del *factor de creixement similar a la insulina 2 (IGF2)*. Els rosegadors, en canvi, tenen dues còpies del gen de la insulina: la *insulina 1 (Ins1)*, que seria el resultat d'una duplicació gènica del gen original de la insulina i es localitza al cromosoma 19; i la *insulina 2 (Ins2)*, que seria el gen homòleg a la insulina humana i es localitza al cromosoma 7 (Wentworth et al., 1986). Tot i codificar per la mateixa proteïna, aquests dos gens presenten diferents patrons d'expressió: *Ins2* es detecta a partir del dia 8.5e i s'expressa a nivell de pàncrees, fetge, timus i cervell; en canvi, el gen *Ins1* inicia la seva expressió al dia 9.5e i en adults només s'expressa a nivell de pàncrees i retina (Budd et al., 1993; Deltour et al., 1993).

L'especificitat d'expressió del gen *Ins1* està controlada per múltiples seqüències reguladores majoritàriament localitzades en el seu promotor, on s'hi uneixen factors de transcripció (Wilson et al., 2003). De les múltiples regions del promotor importants per l'activació i control del gen de la insulina en destaquen quatre d'especial rellevància: les regions C2, A3, C1 i E1 (Figura 5). El factor *Pdx1* s'uneix a les regions riques en AT de la regió promotora A3 i n'activa la transcripció (Petersen et al., 1994). *Pdx1* també interacciona amb *NeuroD1*, el qual s'uneix a la regió E1 del promotor (Peyton et al., 1994). Aquestes dues regions, A3 i E1, juntament amb la regió C1, són els elements més importants de regulació de l'expressió en resposta a la glucosa. *MafA* ha estat

identificat com el factor de transcripció activador de la regió C1 (Olbrot et al., 2002), mentre que a la regió C2 s'hi uneixen els factors *Pax4* i *Pax6* (Sander et al., 1997). El promotor d'*Ins1* també conté elements CRE de resposta a AMPc. Tots aquests factors interaccionen entre ells i amb diferents cofactors, que són a la vegada regulats per múltiples paràmetres. Un dels reguladors més importants és la pròpia glucosa (Figura 5).

Promotor de la Insulina I de ratolí

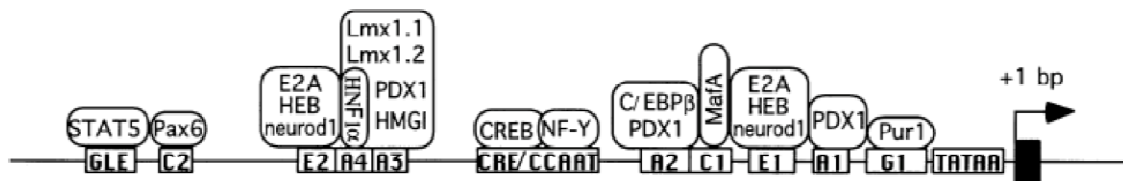


Figura 5. Esquema de la regió promotora/reguladora del gen de la insulina I de ratolí. Seqüències reguladores i factors de transcripció més importants que s'hi uneixen. Els requadres representen les seqüències reguladores característiques mentre que els factors de transcripció dels illots que s'uneixen a cada regió estan envoltats a sobre de les respectives regions. Figura adaptada de (Wilson *et al.*, 2003).

La síntesi de la insulina és un procés complex que involucra la formació de dues molècules precursors, la preproinsulina i la proinsulina. Un cop transcrita, la preproinsulina passa del ribosoma al reticle endoplasmàtic, on es degrada per proteases específiques que separen el pèptid senyal i d'aquesta manera és transformada a proinsulina. Aquesta és processada a insulina dins dels grànuls que provenen de l'aparell de Golgi. En aquests grànuls, les convertases de proproteïnes (principalment **PCSK1/2/3**) i la **carboxipeptidasa E** (CPE), activades per un pH àcid, trenquen el pèptid de connexió anomenat pèptid C, que uneix les cadenes A i B de la insulina, alliberant-se així la insulina madura, la qual té activitat biològica. Aquesta insulina madura està constituïda per 51 aminoàcids (aa), repartits en les cadenes polipeptídiques A (21 aa) i B (30 aa), les quals estan unides per dos ponts disulfur intercatenaris (Steiner et al., 2009).

La glucosa actua com a regulador de la síntesi i secreció de la insulina principalment a través de tres mecanismes: 1) mitjançant l'increment selectiu de la transcripció del gen de la insulina i alterant l'expressió i la localització intracel·lular dels diferents factors de transcripció; 2) estabilitzant de forma selectiva els mRNAs de

la insulina i 3) estimulant la traducció dels mRNA de la insulina de forma ràpida i selectiva.

La cèl·lula β actua com un sensor dels canvis en la concentració de glucosa dins d'un rang fisiològic. A més de la glucosa, existeixen altres factors reguladors: els nutrients (com la manosa o els aminoàcids leucina i arginina), els neurotransmissors (acetilcolina i *Vasoactive Intestinal Peptide* (VIP)) i les hormones (glucagó i *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1)). Així doncs, d'una banda, la funció dels illots està controlada per molècules que es troben en el sistema circulatori i que actuen de forma paracrina (com el glucagó) o endocrina (com els nutrients) a través de la circulació sanguínia de l'illot. I, per l'altra, per fibres del nervi vague (parasimpàtic) i pel nervi esplènic (simpàtic) (Begg and Woods, 2013; Caicedo, 2013).

1.3.2. Regulació de la secreció de la insulina

Està molt ben caracteritzat el mecanisme pel qual els nivells de glucosa en sang estimulen la secreció d'insulina (Figura 6). La glucosa entra dins de la cèl·lula β a través del transportador de glucosa **GLUT-2**. Un cop dins de la cèl·lula β , la glucosa és fosforilada per l'enzim **glucoquinasa** (GCK) donant glucosa-6-P, la qual entra a la glucòlisi. L'enzim GCK o Hexoquinasa IV es caracteritza per una elevada *K_m* per la glucosa (de 5 a 8 mM), de manera que té la màxima activitat a concentracions postprandials i no pot ser inhibida pel producte de la seva acció, la glucosa-6-P (Printz et al., 1993). Així doncs, el transportador GLUT-2 i la GCK actuen conjuntament com a sensors de la glucosa, modulant la secreció d'insulina enfront els canvis de concentració de glucosa circulants.

La metabolització de la glucosa dins la cèl·lula β , a través de la glucòlisi i del cicle de Krebs, genera ATP, i és precisament l'increment del ràtio ATP/ADP el que activa la secreció d'insulina. L'augment d'ATP intracel·lular provoca la despol·larització de la membrana, que indueix l'obertura dels canals de calci (Ca^{2+}) dependents de voltatge i provoca l'entrada de Ca^{2+} i el conseqüent increment de la seva concentració a l'interior de la cèl·lula. Finalment, tota aquesta cascada de senyals dóna lloc a la fusió dels

grànuls de secreció amb la membrana plasmàtica i la secreció d'insulina (Pagliuca and Melton, 2013) (Figura 6).

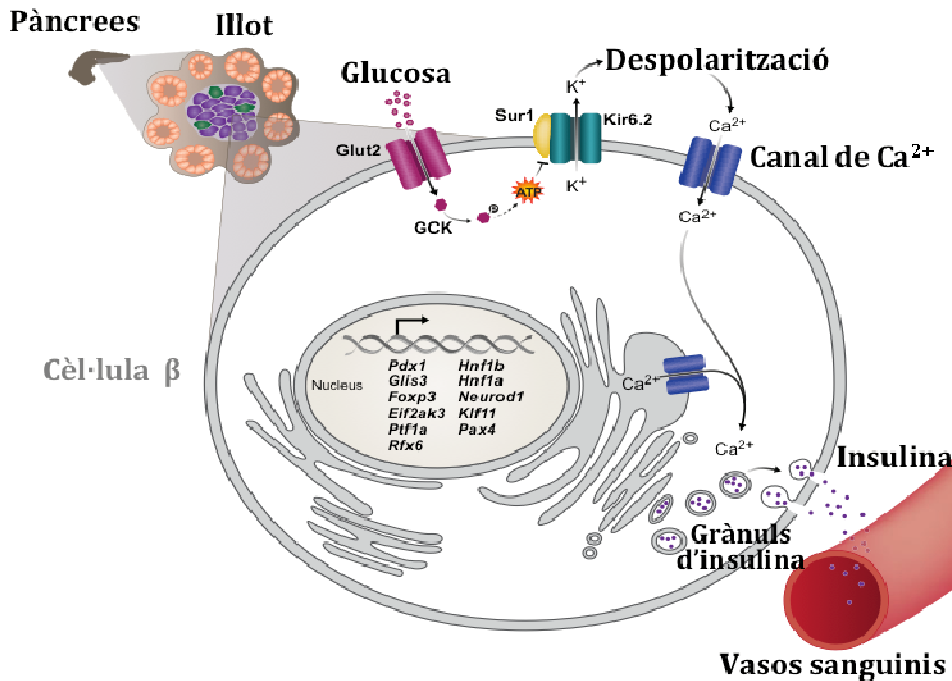


Figura 6. Secreció de la insulina en resposta a la glucosa. La glucosa entra a la cèl·lula β a través del transportador GLUT-2 i és fosforilada per l'enzim glucoquinasa (GCK). La glucosa-6-P entra a la glucòlisi i al cicle de Krebs, augmentant els nivells d'ATP. Com a conseqüència de la pujada del ràtio ATP/ADP, els canals de K^+ ATP-dependents es tanquen i es dona una despolarització de la membrana plasmàtica. Aleshores, els canals de Ca^{2+} s'obren i entren ions Ca^{2+} a la cèl·lula β . L'increment en la concentració de Ca^{2+} induïx la fusió dels grànuls d'insulina amb la membrana plasmàtica. Figura adaptada de (Pagliuca and Melton, 2013).

L'increment ràpid dels nivells de glucosa en sang comporta una resposta bifàsica en la secreció d'insulina. La primera fase té una important funció fisiològica d'eliminació ràpida de glucosa circulant (Kahn, 2001), la qual es dona als pocs minuts (3-5 minuts) i correspon a l'exocitosi de la insulina acumulada en els grànuls de secreció dins de les cèl·lules β , tal i com s'ha descrit anteriorment. La segona fase d'alliberament d'insulina, més sostinguda i persistent durant tota la hiperglucèmia, és deguda a la síntesi i posterior secreció d'insulina sintetitzada *de novo* (Rorsman and Renström, 2003).

2. DIABETIS MELLITUS

La diabetis és un grup de malalties metabòliques caracteritzades per la presència d'hiperglucèmia com a conseqüència dels defectes en la secreció d'insulina, en la seva acció, o bé d'ambdues. La hiperglucèmia crònica de la diabetis s'associa a danys a llarg termini, com la disfunció i insuficiència de diversos òrgans, especialment els ulls, ronyons, nervis, cor i vasos sanguinis (American Diabetes Association, 2015). Segons la Federació Internacional de la Diabetis, s'estima que el 8.3% dels adults al món (uns 382 milions de persones) tenen diabetis, i es preveu que aquesta xifra es veurà incrementada fins als 592 milions a l'any 2035.

La majoria dels casos de diabetis es poden classificar en dues àmplies categories: la **diabetis tipus 1** i la **diabetis tipus 2**. La diabetis tipus 1 (T1D) és causada per la destrucció autoimmune de les cèl·lules β del pàncrees. En canvi, la diabetis tipus 2 (T2D) és causada per la resistència a la insulina en els teixits perifèrics (principalment en músculs, teixit adipós i fetge) i la seva secreció inadequada. Els defectes en la secreció de la insulina observada en la T2D són probablement causats per la combinació tant de la disfunció cel·lular com de la reducció en la massa de cèl·lules β (Butler et al., 2003).

A més de la diabetis tipus 1 i 2, la classificació actual de la malaltia inclou altres malalties amb menys prevalença, com ara la **diabetis gestacional**, que es defineix com qualsevol grau d'intolerància a la glucosa amb inici o primer reconeixement durant l'embaràs (Catalano, 2014); i altres tipus de diabetis causades per **defectes monogènics** que afecten a la funció de les cèl·lules β (Ashcroft and Rorsman, 2012). Aquestes formes monogèniques de la diabetis es caracteritzen sovint per l'aparició d'hiperglucèmia en una edat primerenca, generalment abans dels 25 anys, i se'ls coneix com **MODY** (*Madurity Onset Diabetes of the Young*). Les MODY es caracteritzen per la secreció d'insulina alterada o per l'absència de la seva acció. Aquest grup de malalties s'hereten seguint un patró autosòmic dominant i s'han identificat fins a 14 anomalies en *loci* genètics de diferents cromosomes. La forma més comuna s'associa a mutacions en un factor de transcripció hepàtic, el factor nuclear d'hepatòcits (HNF)-1 α (MODY 3). Una segona forma està associada a mutacions en el gen de la glucoquinasa (MODY 2).

Les formes menys comunes són el resultat de mutacions en altres factors de transcripció, com HNF-4 α , HNF-1 β , el factor promotor d'insulina (IPF-1) i NeuroD1 (Fajans et al., 2001; American Diabetes Association, 2015).

2.1. Diabetis tipus 1

La T1D representa entre el 5 i el 10% dels pacients diabètics i, en general, es desenvolupa durant la infància i l'adolescència, per la qual cosa també s'anomena diabetis juvenil, tot i que es pot desenvolupar a qualsevol edat, fins i tot en edat avançada (American Diabetes Association, 2015). La T1D és el resultat d'un atac autoimmune contra les cèl·lules β del pàncrees, el qual les destrueix o danya suficientment per disminuir i eventualment eliminar la producció d'insulina (van Belle et al., 2011). L'absència d'insulina redueix la captació i utilització de glucosa pel fetge i pels teixits perifèrics, com ara el múscul i el teixit adipós, situació que condueix a la hiperglucèmia (Saltiel and Kahn, 2001). A més, el fetge activa les vies glucogenolítica i gluconeogènica, que empitjoren l'estat hiperglucèmic. D'altra banda, la manca d'insulina endògena causa una degradació significativa dels triglicèrids del teixit adipós, i els àcids grassos alliberats són convertits en cossos cetònics al fetge (Cotter et al., 2013). Per tant, la manca d'insulina dóna lloc a la hiperglucèmia i la cetoacidosi, que pot acabar provocant un estat de coma i, en ocasions, la mort del pacient (Chiasson et al., 2003).

Durant el procés autoimmune de la T1D es poden diferenciar clarament dues etapes: una fase clínicament oculta (Figura 7A-E), caracteritzada per autoanticossos dirigits contra una àmplia gamma d'antígens de les cèl·lules β i una elevada infiltració de limfòcits T autoreactius i altres cèl·lules inflamatòries en els illots anomenada **insulitis**; i una fase de diabetis oberta (Figura 7F), on es fa extensa la destrucció de les cèl·lules β (70-80%) provocant així una deficiència en la producció de la insulina i, com a conseqüència, una hiperglucèmia (Chen et al., 2005). El període de temps entre l'aparició de biomarcadors de la T1D i l'inici dels símptomes clínics és molt variable i poden passar diversos anys fins que es produeix la malaltia clínica (Harrison, 2001). Fins que la massa de cèl·lula β no es redueix en un 70-80% no serà diagnosticada clínicament pels nivells de glucèmia en sang elevats.

En alguns casos es pot detectar una fase temporal anomenada *Honeymoon* on les cèl·lules β restants compensen la hiperglucèmia a través d'un augment en la seva proliferació i un increment en la secreció dels nivells d'insulina. Finalment, aquestes cèl·lules no tindran prou capacitat i acabaran morint, donant lloc així a una hiperglucèmia crònica (Figura 7) (van Belle et al., 2011; Zhou and Jensen, 2013).

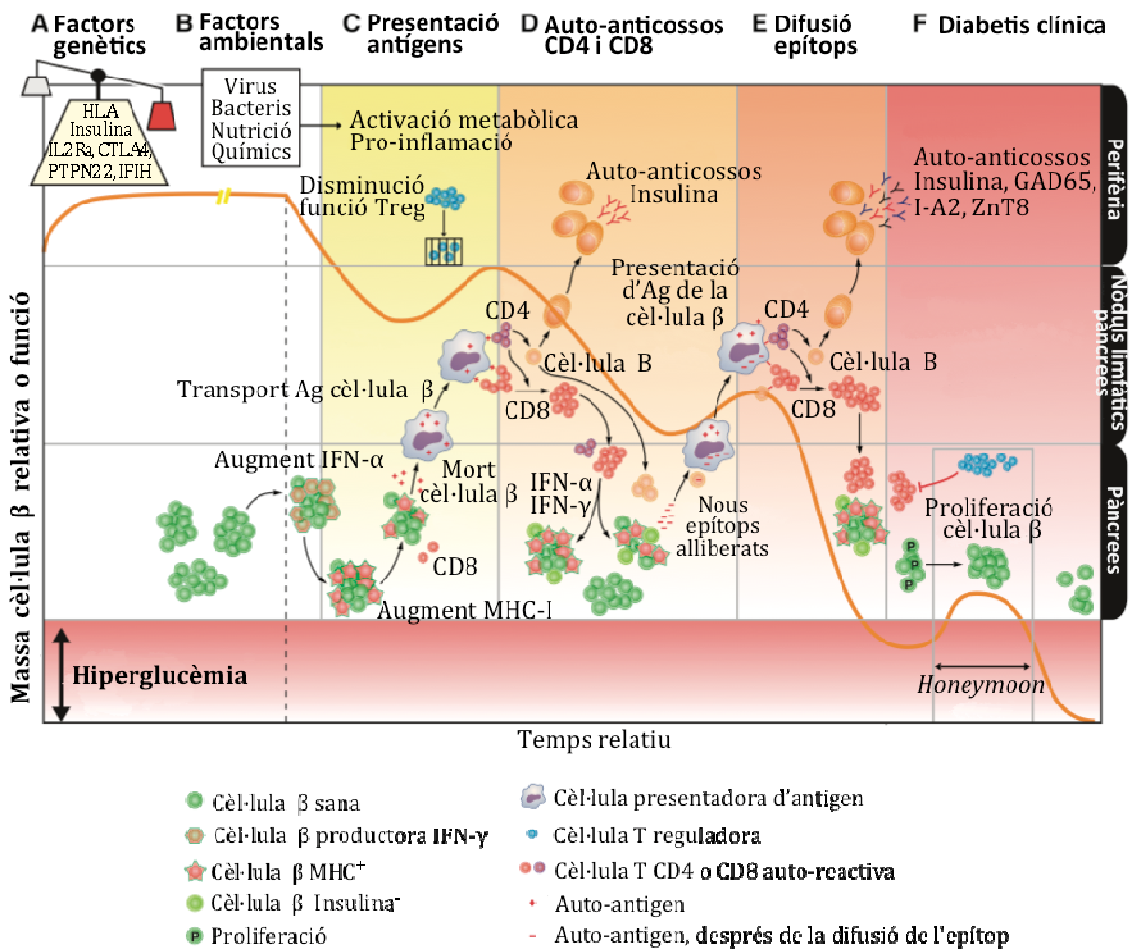


Figura 7. Patogènia de la diabetis tipus 1. Representació esquemàtica de les diferents fases immunològiques (columnes a la part superior) que es produeixen en els llocs anatòmics rellevants (files a la dreta) així com la massa de les cèl·lules β o la funció (representat per la línia taronja). Quan la massa de cèl·lules β cau fins a valors ubicats a la zona vermella, l'individu és diagnosticat clínicament amb T1D. Treg: limfòcits T reguladors; Ag: antigen (Adaptat de van Belle et al., 2011).

2.2. Teràpies actuals per a la diabetis tipus 1

Els tractaments actuals per a pacients amb diabetis tipus 1 inclouen teràpies de **reemplaçament d'insulina** convencional per injecció de l'hormona o mitjançant l'ús de bombes que alliberen insulina per reduir la glucosa en sang. Aquests tractaments no prevenen el desenvolupament de complicacions secundàries a llarg termini derivades de la hiperglucèmia crònica. A més, els pacients també estan exposats a episodis d'hipoglucèmia, potencialment mortals, ja que amb aquestes teràpies no s'arriba a assolir el sofisticat nivell de regulació fisiològic. Per tal de superar aquests inconvenients, s'ha posat molta atenció a la millora dels sistemes tancats, anomenats "pàncrees artificials" (Keenan et al., 2010), on un sensor col·locat subcutàniament mesura contínuament els nivells de glucosa en sang i, a través d'una bomba d'insulina amb una agulla fina implantada sota la pell, allibera la quantitat d'insulina necessària (Dolgin, 2012).

Per altra banda, donada l'etiologia de la T1D, existeixen teràpies basades en **immunomoduladors**, els quals retardarien l'inici de la malaltia i/o protegirien a les cèl·lules β residuals de l'atac autoimmune per així mantenir la producció d'insulina endògena. La limitada eficàcia dels primers immunomoduladors va estimular als investigadors a buscar noves estratègies més específiques que afectessin als mecanismes precisos de la destrucció de les cèl·lules β . Per exemple, existeixen anticossos anti-CD3, els quals redueixen el nombre de limfòcits T circulants. Tot i això, els assaigs clínics en fase III d'aquests anticossos monoclonals no van obtenir els objectius inicials esperats (Sherry et al., 2011; Herold et al., 2013). Un altre anticòs anti-CD20, anticòs contra els limfòcits B, va ser provat en individus diabètics. Després de dos anys del tractament amb anti-CD20, tot i que els pacients tractats presentaven nivells de pèptid C lleugerament superiors, seguien requerint de la mateixes dosis d'insulina per mantenir la normoglicèmia (Pescovitz et al., 2014).

El **transplantament de pàncrees** és una aproximació que ha donat bons resultats per tractar la T1D, ja que proporciona una restauració fiable i duradora de la hiperglucèmia. Actualment, la supervivència dels injerts en els transplantaments de pàncrees és del 82% al cap d'un any i del 58% al cap de cinc anys. Aquesta supervivència augmenta quan es realitzen transplantaments simultanis de pàncrees i

ronyó, arribant al 89% de supervivència al cap d'un any i al 71% al cap de cinc anys (Gruessner and Gruessner, 2013). Tot i això, es tracta d'una cirurgia complicada, i els pacients requereixen d'immunosupressió de per vida, per tant només es practica en casos extrems de diabetis làbil o en pacients que també requereixen un transplantament de ronyó.

Per tal d'evitar la necessitat d'una cirurgia complicada, en els darrers anys s'ha desenvolupat el **transplantament o infusió d'illots**. En aquesta tècnica, generalment es transplanten illots aïllats a la vena portal hepàtica. Un cop transplantats, els illots viatgen fins el fetge, on són altament vascularitzats i comencen a produir insulina. Gràcies a la implementació del protocol d'Edmonton, establert per Shapiro i col·laboradors (Shapiro et al., 2000), es va poder reduir l'autoimmunitat del procediment i millorar la supervivència dels illots transplantats. Combinant el transplantament d'illots amb tècniques immunomoduladores, ara per ara és possible arribar a una supervivència de 5 anys dels illots transplantats (Shapiro, 2011; Bellin et al., 2012). Tot i els beneficis que comporta el transplantament d'illots a l'hora de prevenir complicacions a llarg termini de la T1D, els riscos associats a la immunosupressió de per vida són massa importants per poder implementar aquesta teràpia a la majoria de pacients. A més, l'escassetat de donants també representa un gran inconvenient per aquest tipus de teràpies.

2.3. Teràpies avançades per a la diabetis tipus 1

Les limitacions associades a les teràpies actuals per a la T1D, com ara l'escassetat de donants de pàncrees i la necessitat de teràpies immunosupressores, han portat als investigadors a buscar noves teràpies alternatives. En aquest sentit, s'ha posat molt d'èmfasi en la recerca de noves **teràpies cel·lulars**, com ara la xenotransplantació o l'ús de cèl·lules mare embrionàries.

El transplantament d'illots provinents d'animals a humans (**xenotransplantació**) és una possible alternativa a l'hora de proveir noves cèl·lules β a pacients de T1D. Dins d'aquest camp s'ha posat molt d'interès en l'ús d'illots porcins, degut a l'alta similitud entre la insulina humana i la porcina (només difereixen en un aminoàcid) (Lakey et al.,

2006) i la facilitat de cria dels porcs. S'han dut a terme assajos clínics per tal de comprovar la seguretat i l'eficàcia del transplantament sense immunosupressió en humans d'illots porcins encapsulats en microcàpsules d'alginat, i els resultats inicials van mostrar que no hi havia signes d'inflamació ni de fibrosis, així com tampoc infecció per retrovirus porcins endògens. També es va aconseguir una reducció de la dosi diària d'insulina en els pacients transplantats. A més, les microcàpsules que es van recuperar 9 anys i mig després del transplantament contenien cèl·lules encara viables i que secretaven insulina en resposta a glucosa (Elliott et al., 2007).

Un altre camp en desenvolupament és l'estudi de les **cèl·lules mare embrionàries** (ESCs, *embryonic stem cells*), les quals a partir de diferents estratègies es poden diferenciar o reprogramar cap a cèl·lules productores d'insulina i, en un futur, podrien ser una possible teràpia cel·lular per a la T1D. La generació de **cèl·lules mare pluripotents induïdes** (iPSCs, *induced pluripotent stem cells*) a partir de cèl·lules diferenciades, descrita per primer cop en ratolins el 2006 (Takahashi and Yamanaka, 2006) i en humans el 2007 (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007), rebaixa les controvèrsies ètiques entorn a l'ús de les ESCs, les quals s'han d'obtenir a partir d'embrions. Les ESCs i les iPSCs tenen les mateixes característiques i poden diferenciar cap a tots els tipus de teixits. A més, l'ús d'iPSCs també reduiria el risc immunològic del posterior transplantament de les cèl·lules, ja que aquestes poden derivar de cèl·lules diferenciades del mateix pacient. En aquest sentit, recentment s'ha descrit un protocol seqüencial de diferenciació mitjançant el qual es poden generar *in vitro* grans quantitats de cèl·lules β funcionals a partir tant d'ESCs com de iPSCs humanes (Pagliuca et al., 2014). Aquestes cèl·lules expressen marcadors de cèl·lula β madura, empaqueten insulina dins de grànuls secretables i secreten quantitats d'insulina comparables als de les cèl·lules β en resposta a diferents nivells de glucosa *in vitro*. No obstant, encara falten estudis per avaluar els riscos immunes del transplantament de cèl·lules β derivades de ESCs i iPSCs, i la possibilitat de generació de tumors derivada d'aquestes teràpies és una preocupació important.

Per altra banda, la **teràpia gènica** també ofereix múltiples alternatives pel tractament de la T1D. Existeixen diferents aproximacions de teràpia gènica per curar o millorar la situació dels pacients diabètics i, en alguns casos, es poden combinar estratègies de teràpia gènica i teràpia cel·lular.

3. TERÀPIA GÈNICA

3.1. Introducció a la teràpia gènica

La teràpia gènica es basa en la transferència de material genètic exogen (DNA o RNA) a les cèl·lules o teixits diana mitjançant un vector, amb la finalitat de corregir o alleujar els símptomes d'una malaltia. Aquestes cèl·lules transduïdes sintetitzaran la proteïna terapèutica. A través d'aquesta metodologia es poden aconseguir nivells estables de la proteïna terapèutica mitjançant una única injecció del vector que conté el gen terapèutic d'interès.

Inicialment, es va considerar la teràpia gènica com una eina bàsica per al tractament de malalties hereditàries monogèniques amb l'objectiu de tornar a administrar a la cèl·lula la capacitat de produir la proteïna del gen mutat, sent actualment una estratègia àmpliament validada per aquest tipus de malalties. Tot i així, la majoria de les aplicacions en teràpia gènica s'estan desenvolupant per a malalties d'una elevada prevalença, tant poligèniques com hereditàries. Així doncs, la T1D pot ser considerada com a una bona candidata per a ser tractada amb estratègies de teràpia gènica.

Es poden diferenciar dues aproximacions de teràpia gènica: la **teràpia gènica *ex vivo***, on les cèl·lules del teixit diana s'obtenen mitjançant una biòpsia, es cultiven i es modifiquen genèticament *in vitro*, transferint-se finalment al pacient; i la **teràpia gènica *in vivo***, on les cèl·lules són modificades genèticament *in situ* en l'individu (Anderson, 1998).

Un dels factors clau en l'èxit de la teràpia gènica és el desenvolupament de vehicles de transferència gènica, anomenats **vectors**, que siguin eficients i segurs a l'hora de transferir el material genètic exogen al teixit diana. En els últims anys s'ha desenvolupat una àmplia gamma de vectors amb l'objectiu d'aconseguir aquesta finalitat. En general, aquests vectors es classifiquen en dues grans categories: els **vectors virals** i els **vectors no virals**. Els sistemes de transferència basats en vectors no virals inclouen la injecció directa de DNA mitjançant mètodes físics (electroporació, sonicació) o bé

l'empaquetament del DNA en liposomes (lípid o polímers catiónics) per introduir el material genètic a la cèl·lula diana. Els vectors virals utilitzen la capacitat infectiva natural dels virus per entrar a la cèl·lula i transferir així el material genètic d'interès (Kay, 2011).

Els vectors virals són virus modificats per tal que no puguin induir una infecció productiva a la cèl·lula hoste. En aquest cas, la càpside vírica conté un genoma al qual se li han eliminat gens virals, per tal que mantingui la capacitat d'introduir el material genètic a la cèl·lula però sense poder-se replicar i produir nous virus recombinants. A més, l'eliminació d'aquests gens virals al genoma permet una major capacitat de clonatge pel casset terapèutic (Kay et al., 2001). En teràpia gènica, la introducció de material genètic exogen a la cèl·lula diana es coneix com a **transducció**, a diferència del terme infecció, utilitzat en virologia per descriure l'entrada del virus salvatge a la cèl·lula i la inherent replicació del mateix.

A la Taula 1 es presenta un resum de les principals característiques dels vectors virals més utilitzats en teràpia gènica.

Vector	Avantatges	Desavantatges
Adenovirus (Ad)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Elevada capacitat de clonatge ▪ Infecta cèl·lules quiescents i en divisió ▪ El DNA roman episomal ▪ Elevats nivells d'expressió del transgen <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> ▪ Útils en experiments de curta durada 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Provoquen resposta inflamatòria ▪ Tropicisme inespecífic ▪ Alta toxicitat hepàtica
Virus adenoassociats (AAV)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Elevada estabilitat en cèl·lules específiques ▪ Infecta cèl·lules quiescents i en divisió ▪ El DNA roman episomal ▪ Producció amb elevats títols ▪ Baixa immunogenicitat ▪ No patogènic ▪ Àmplia varietat de serotips amb diferents tropismes específics de teixits ▪ Elevada estabilitat en línies cel·lulars 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Baixa capacitat de clonatge (4.8 kb)
Retrovirus (RT)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Expressió estable en cèl·lules en divisió ▪ Producció amb elevats títols ▪ Possible readministració 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Integració a l'atzar al genoma de l'hoste amb el risc de mutagènesi insercional ▪ Baixa capacitat de clonatge (8 kb) ▪ Infecta només cèl·lules en divisió
Lentivirus (LV)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Infecta cèl·lules quiescents i en divisió ▪ Expressió estable a llarg termini ▪ No immunogènic 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Integració a l'atzar al genoma de l'hoste amb el risc de mutagènesi insercional ▪ Es necessiten més estudis per avaluar la manca de patogenicitat
Virus Herpes símplex (HSV)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Infecta cèl·lules quiescents i en divisió ▪ El DNA roman episomal ▪ Elevada capacitat de clonatge (50 kb) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Expressió transitòria ▪ Neurotoxicitat poc caracteritzada

Taula1. Característiques generals dels vectors virals. Adaptació de (Verma and Weitzman, 2005; Kay, 2011).

3.2. Vectors adenovirals

Els adenovirus es van aïllar per primer cop a partir de cèl·lules adenoides fa més de 60 anys (Rowe et al., 1953). Des de llavors, s'han identificat més de 100 espècies diferents d'adenovirus a partir de mamífers, ocells i rèptils. Els adenovirus humans són els responsables d'un 5-10% de les malalties respiratòries agudes en els nens i un nombre variable de conjuntivitis i gastroenteritis.

3.2.1. Biologia dels adenovirus

Es poden distingir més de 50 serotips capaços d'infectar als éssers humans, els quals estan classificats en 6 subgrups (A-F). La majoria dels vectors utilitzats en teràpia gènica deriven dels serotips 2 i 5 (Ad2 i Ad5) del subgrup C (Kay, 2011; Giacca and Zacchigna, 2012). Els virions adenovirals són partícules icosaèdriques d'uns 60-90 nm de diàmetre amb un embolcall proteic i un genoma a l'interior de doble cadena lineal (dsDNA) de 36 kb. Al genoma dels adenovirus es poden diferenciar a cada extrem les seqüències anomenades ITR (*Inverted Terminal Repeat*), d'unes 100-140 pb i una senyal d'empaquetament (Ψ) formada per set repeticions situades a l'extrem 5' del genoma. Aquest genoma codifica per dos tipus de gens: els gens primerencs (*Early gens*, E), els quals són necessaris per a la síntesi de proteïnes que intervenen en la replicació del DNA i, en segon lloc, els gens tardans (*Late gens*, L), necessaris per a l'encapsidació, ja que codifiquen per proteïnes estructurals i altres proteïnes implicades en l'ensamblatge del virió (Figura 8). La primera unitat de transcripció viral que s'expressa és E1A. Com en quasi totes les unitats de transcripció, E1A produeix múltiples mRNAs i proteïnes mitjançant un processament diferencial de l'mRNA. Durant la infecció, les proteïnes resultants d'E1A *trans*-activen la resta de gens primerencs (E1B, E2A, E2B, E3 i E4). Els gens tardans es transcriuen a partir d'un sol promotor, l'MLP (*major late promoter*). La lisi cel·lular i l'alliberament dels virions succeeix aproximadament 30 hores després de la infecció (Tollefson et al., 1996; Alba et al., 2005).

3.2.2. Vectors adenovirals de primera generació

El genoma dels adenovirus ha estat manipulat genèticament per tal de ser poder utilitzar-los com a vectors en teràpia gènica. L'estratègia dels vectors **adenovirals de primera generació** (FG-Ad, *first generation adenoviral vector*) és el reemplaçament de la regió E1 pel transgèn d'interès, provocant una capacitat aproximada de clonatge de 5.1 kb (Russell, 2009), i evitant així que l'adenovirus es pugui replicar (Danthinne and Imperiale, 2000). Per tal de poder produir aquests vectors s'utilitzen línies cel·lulars que expressen el gen E1. La línia cel·lular més utilitzada per aquesta finalitat són les cèl·lules HEK-293, una línia embrionària humana derivada del ronyó que va ser transformada amb la regió E1 adenoviral (Graham et al., 1977). A més de l'eliminació de la regió E1, molts dels vectors FG-Ad també tenen eliminada la regió E3, la qual no és essencial per la producció de vectors, obtenint així una capacitat de clonatge de fins a 8.2 kb (Figura 8).

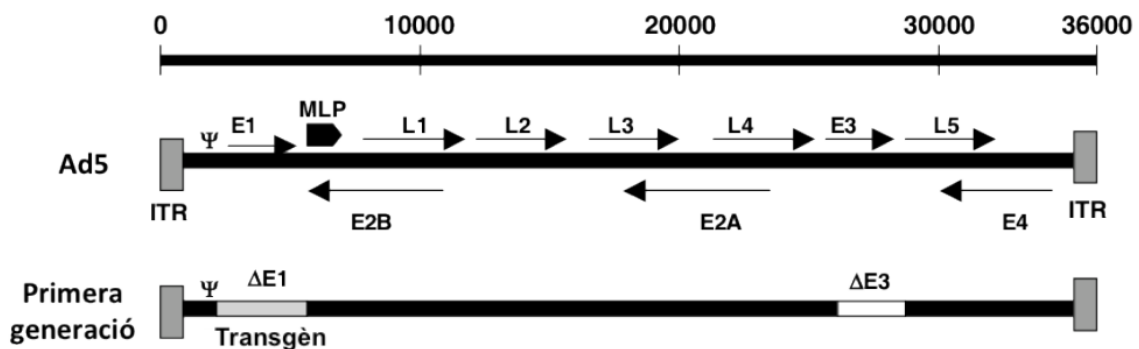


Figura 8. Mapa del genoma de l'Ad5 i les vectors adenovirals de primera generació. Les regions dels gens primerencs són representats per E1-E4 i els gens tardans per L1-L5. Ad5: Adenovirus 5; MLP: *Major late promoter*; (Ψ) senyal d'empaquetament. Les fletxes indiquen la direcció de transcripció. Els requadres en blanc indiquen gens adenovirals que han estat eliminats. Figura adaptada de (Alba et al., 2005).

El principal inconvenient dels FG-Ad és l'estimulació del sistema immune per l'activació dels limfòcits T citotòxics degut a que mantenen en el seu genoma la majoria dels gens virals. Com a conseqüència, la seva expressió en animals immunocompetents és temporal (Yang et al., 1994; Bessis et al., 2004)

3.3. Teràpia gènica per a la diabetis tipus 1

Les limitacions dels tractaments actuals per a la T1D, com ara les injeccions periòdiques d'insulina i el transplantament de pàncrees o illots, fan necessària la recerca de noves teràpies alternatives que n'evitin els efectes secundaris. En aquest sentit, la teràpia gènica és una alternativa a les teràpies actuals i ofereix diferents estratègies per tal d'intentar curar la malaltia o millorar la situació del pacient. Les estratègies actuals de teràpia gènica per a la T1D poden ser *ex vivo* o *in vivo*. La manipulació genètica de les cèl·lules *ex vivo* permet combinar una teràpia cel·lular (per exemple utilitzant cèl·lules β autòlogues) amb una modificació genètica mediada per vectors de transferència. Les teràpies *in vivo* es poden classificar en quatre grans categories: les **teràpies preventives**, enfocades a reduir o eliminar la resposta immunitària contra les cèl·lules β (Goudy et al., 2003; Harnaha et al., 2006; Han et al., 2008; Park et al., 2008; Anguela et al., 2013); les **teràpies substitutives**, les quals pretenen augmentar la captació de glucosa als teixits perifèrics gràcies a l'expressió del gen de la insulina en teixits extrapancreàtics (Thulé and Liu, 2000; Park et al., 2005; Mas et al., 2006; Callejas et al., 2013); les **teràpies pal·liatives**, enfocades a prevenir o contrarestar complicacions secundàries de la T1D com la retinopatia, la nefropatia o la neuropatia diabètica (Cruzado et al., 2004; Chattopadhyay et al., 2005; Ropper et al., 2009; Haurigot et al., 2012); i les **teràpies curatives**, les quals pretenen regenerar la massa de cèl·lules β del pàncrees mitjançant la replicació de les cèl·lules β remanents o bé induint la generació de noves cèl·lules β mitjançant reprogramació cel·lular.

3.3.1. Generació de noves cèl·lules β mitjançant reprogramació cel·lular

Durant els últims anys, hi ha hagut diverses aproximacions per generar cèl·lules β "artificials" que produeixin insulina d'una manera regulada en resposta a la glucosa. Les estratègies per aconseguir aquest objectiu estan a cavall de la teràpia gènica i la teràpia cel·lular, i es poden dividir en tres categories: la **diferenciació de cèl·lules pluripotents** (ESC i iPSC) (veure apartat 2.3); la inducció de la **replicació de les cèl·lules β** ja existents en el teixit pancreàtic; i la **reprogramació directa** o **transdiferenciació** d'una

cèl·lula adulta diferenciada (pancreàtica o extrapancreàtica) cap a cèl·lula β o productora d'insulina (Figura 9).

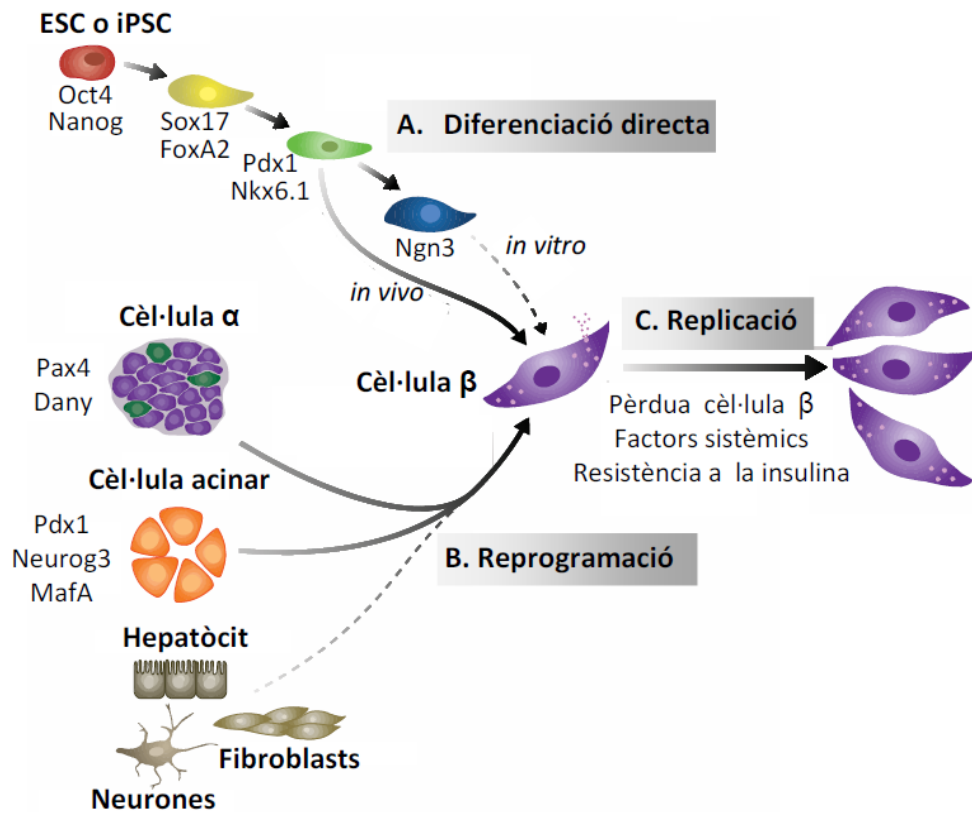


Figura 9. Estratègies per a la generació de noves cèl·lules β . (A) La diferenciació directa a partir de ESC o iPSC es realitza a partir de factors de creixement i molècules que dirigeixen la cèl·lula mare pluripotent per les diferents etapes de la diferenciació pancreàtica imitant el desenvolupament normal. (B) La reprogramació de cèl·lules madures diferenciades, com les cèl·lules acinars, cèl·lules α o cèl·lules hepàtiques, poden donar lloc a cèl·lules β a partir de la sobreexpressió de determinats factors de transcripció o a partir d'un dany extrem al pàncrees. (C) La inducció de la replicació de les cèl·lules β ja existents es pot dur a terme tant *in vitro* com *in vivo* per inducció amb noves molècules o proteïnes. Figura adaptada de (Pagliuca and Melton, 2013).

La replicació de cèl·lules β ja existents presenta un gran inconvenient, ja que en la majoria dels casos la massa de cèl·lula β és absent o està molt reduïda en pacients de T1D a causa de la destrucció autoimmune. A més, la inducció a la replicació pot comportar un augment del risc de generació de tumors, sobretot si la inducció de replicació no és específica per les cèl·lules β (Pagliuca and Melton, 2013). La reprogramació d'una cèl·lula adulta diferenciada, tot i que a priori pot ser una estratègia més complicada ja que generalment requereix que la cèl·lula diana es desdiferencii, presenta avantatges respecte a l'estratègia de diferenciació de cèl·lules pluripotents,

com ara que les cèl·lules són autòlogues en origen i resideixen al seu teixit natiu, reduint així el risc de generar tumors (Zhou and Melton, 2008; Gerace et al., 2014).

Els teixits diferenciats amb més potencial per a ser utilitzats per a reprogramar cap a cèl·lula β són el pàncrees i el fetge, ja que ambdós teixits tenen un origen comú durant l'embriogènesi (Zorn and Wells, 2009). En els darrers anys s'ha aconseguit reprogramar *in vivo* cèl·lules hepàtiques i acinars mitjançant la sobreexpressió de tres factors de transcripció implicats en la embriogènesi de la cèl·lula β (*Pdx1*, *Ngn3* i *MafA* (la combinació dels quals s'anomena **PNM**)) amb vectors FG-Ad en ratolins immunodeprimits (Zhou et al., 2008; Banga et al., 2012, 2014; Li et al., 2014). Tot i que la reprogramació d'hepatòcits i cèl·lules ductals del fetge millora la hiperglucèmia dels ratolins diabètics, no s'ha aconseguit que aquestes cèl·lules reprogramades siguin fenotípica i morfològicament iguals a les cèl·lules β funcionals (Banga et al., 2012, 2014). En canvi, un estudi recent mostra que les cèl·lules exocrines reprogramades mitjançant un sol vector FG-Ad que codifica per PNM en ratolins immunodeficients tenen un alt grau de semblança fenotípica i morfològica a les cèl·lules β reals, arribant a formar estructures semblants als illots al cap de set mesos post-transducció (Li et al., 2014). De manera similar, també s'ha descrit la reprogramació *in vitro* d'una línia cel·lular acinar de rata, la línia AR42J-B13 (B13), cap a cèl·lules productores d'insulina mitjançant la sobreexpressió de PNM amb un vector FG-Ad (Akinci et al., 2012). Aquests resultats, juntament amb el fet que hi ha una gran abundància de cèl·lules acinars i que aquestes es troben situades al mateix òrgan que els illots, fan que el teixit exocrí del pàncrees sigui un teixit diana més atractiu que el fetge per a futures teràpies de reprogramació cel·lular.

Aquests tres factors de transcripció (*Pdx1*, *Ngn3* i *MafA*) estan implicats en la diferenciació de les cèl·lules β a partir de les cèl·lules progenitores (Mansouri, 2012; Shih et al., 2013; Ziv et al., 2013) i, a més, regulen l'expressió de la insulina (excepte en el cas de *Ngn3*) a través de la unió al seu promotor (Figura 5). *Pdx1* (*pancreatic and duodenal homeobox 1*) és un dels principals factors de transcripció tant en el desenvolupament embrionari del pàncrees com en la diferenciació de les cèl·lules endocrines progenitores cap a cèl·lules β . Durant l'embriogènesi s'expressa per primer cop el dia 8.5e al lòbul pancreàtic primigeni. En l'adult s'expressa a les cèl·lules β i δ

dels illots, al duodè i a l'estòmac. En les cèl·lules β adultes, quan els nivells de glucosa augmenten Pdx1 és fosforilat i translocat al nucli on promou la transcripció i expressió del gen de la insulina (Habener et al., 2005; Andrali et al., 2008; Al-Quobaili and Montenarh, 2008; Puri and Hebrok, 2010). A més, Pdx1 actua regulant la transcripció d'altres gens involucrats en el metabolisme de la glucosa, com el transportador de glucosa *Glut2*, *IAPP* (*islet amyloid polypeptide*), la glucoquinasa (*Gck*) i el factor de transcripció *Nkx6.1*. El factor de transcripció *Ngn3* (*neurogenin 3*) és essencial pel desenvolupament del pàncrees ja que marca l'inici de la diferenciació cap als diferents tipus cel·lulars endocrins (Gradwohl et al., 2000; Gu et al., 2002; Johansson et al., 2007). S'expressa a partir del dia 8.5e i disminueix a partir del naixement, amb molt baixa o nul·la expressió en el pàncrees adult (Rukstalis and Habener, 2009; Shih et al., 2012). *MafA* (*v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein A*) juga un paper important en la regulació del gen de la insulina, a més de regular gens com l'adiponectina, *Glut2*, *Nkx6.1*, *Pdx1*, la piruvat carboxilasa, la prohormona convertasa 1/3 i *CHOP* (*C/EBP homologous protein*). La seva expressió s'inicia en els últims estadis del desenvolupament de la cèl·lula β , al voltant del dia 13.5e, suggerint que *MafA* exerceix un rol important en el manteniment de la funcionalitat de la cèl·lula β (Matsuoka et al., 2007; Andrali et al., 2008; Hang and Stein, 2011).

No obstant, la sobreexpressió de PNM en animals transgènics o mitjançant vectors no adenovirals no ha aconseguit els mateixos efectes de reprogramació observats amb la sobreexpressió mitjançant FG-Ad en ratolins immunodeprimits (Wang et al., 2007; Chen et al., 2014). Degut a l'alta immunogenicitat dels vectors FG-Ad, les cèl·lules transduïdes amb els FG-Ad són majoritàriament destruïdes pel sistema immune i, conseqüentment, l'expressió del transgèn és transitòria. Per tant, és necessària una millor comprensió dels mecanismes implicats amb la reprogramació de cèl·lules acinars a cèl·lula β per tal de poder millorar l'efectivitat d'aquestes teràpies i evitar l'ús de vectors adenovirals. En aquest sentit, mecanismes epigenètics de control d'expressió cel·lulars com els microRNAs hi poden jugar un paper important.

4. microRNAs

Els microRNAs, també anomenats miRNAs o miRs, són petites molècules d'RNA no codificants, d'uns 22 nucleòtids, que actuen com a reguladors post-transcripcionals de l'expressió de gens (Ambros, 2004; Bartel, 2004). El primer microRNA es va descobrir en *C. elegans* el 1993 per Lee i col·laboradors (Lee et al., 1993). Des d'aleshores i fins l'actualitat s'han descrit fins a 35828 microRNAs madurs en 223 espècies diferents, segons miRBase (www.mirbase.org, v21) (Kozomara and Griffiths-Jones, 2014), i s'estima que, en humans, més del 60% dels gens codificants tenen l'expressió regulada per microRNAs (Friedman et al., 2009). La majoria de microRNAs actuen promovent la degradació o la inhibició translacional de mRNAs (Bartel, 2004). No obstant, s'ha observat que en alguns casos els microRNAs també poden regular positivament l'expressió de certs gens (Vasudevan et al., 2007; Place et al., 2008; Ørom et al., 2008).

4.1. Biogènesi i mecanismes d'acció dels microRNAs

Les seqüències de microRNAs estan distribuïdes per tot el genoma, i es poden trobar tant en exons com en introns, així com també en *loci* intergènics (Altuvia et al., 2005). La biogènesi dels microRNAs comença amb la seva transcripció mitjançant la RNA polimerasa II o la RNA polimerasa III (Lee et al., 2004; Borchert et al., 2006), donant lloc a un transcrit primari, conegut com a pri-miRNA, format per un braç en forma *stem-loop* d'uns 80 nucleòtids i flanquejat per seqüències d'RNA de cadena simple de centenars o fins i tot milers de bases. El pri-miRNA es manté al nucli i segueix un procés mediat pel complex microprocessador, format per la RNasa Droscha i el cofactor *DGCR8*, en el qual es tallen els extrems de cadena simple, quedant així només l'estructura *stem-loop* anomenada pre-miRNA. Seguidament, el pre-miRNA és transportat al citoplasma mitjançant l'exportina-5 (EXP-5). Un cop al citoplasma, el pre-miRNA madurarà cap a miRNA a través d'una reacció catalitzada per l'enzim **Dicer**, en conjunció amb les proteïnes TRBP i PACT. L'enzim Dicer talla el *loop* del pre-miRNA i produeix un dúplex miRNA/miRNA*, on la cadena passatgera (miRNA*) s'acaba eliminant, deixant només la cadena guia o microRNA madur, que s'incorpora a

la família de proteïnes Argonautes (Ago), un procés que dóna lloc al **RISC** (*RNA-induced silencing complex*) (Wahid et al., 2010; Gargalionis and Basdra, 2013). A part de la via de processament de microRNAs canònica, s'ha descrit que existeixen diverses diferències de processament específiques de microRNAs. Un exemple n'és la generació de mirtrons, els quals representen microRNAs derivats d'introns produïts després de l'*splicing* (Winter et al., 2009) (Figura 10).

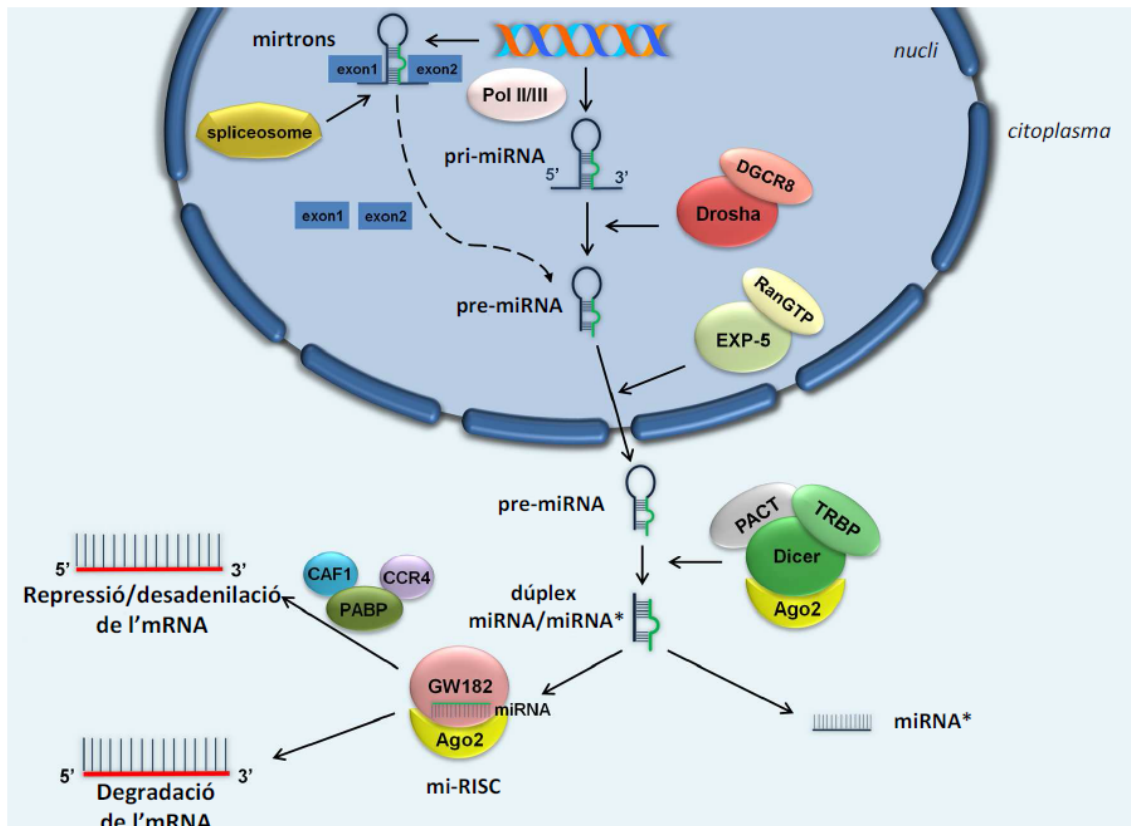


Figura 10. Biogènesi i funció dels microRNAs. Al nucli, en la via de processament canònica, la RNA polimerasa II o II transcriu els gens de miRNAs en pri-miRNAs. El complex microprocessador (Drosha, DGCR8) transforma el pri-miRNA en pre-miRNA, el qual es transporta al citoplasma mitjançant la proteïna RAN-GTP EXP-5. Els mirtrons produeixen directament pre-miRNAs com a resultat de l'*splicing* de transcrits. La Dicer, juntament amb PACT o TRBP, genera el dúplex miRNA/miRNA*. La cadena passatgera miRNA* es degrada i el miRNA o cadena guia forma el complex miRISC, juntament amb les proteïnes AGO2 i GW182. El miRISC fa diana al mRNA, portant a la repressió/desadenilació mitjançant CAF1, CCR4 i PABP o a la degradació de l'mRNA. Figura adaptada de (Gargalionis and Basdra, 2013).

El microRNA madur incorporat al RISC constitueix l'estructura mitjançant la qual el miRNA exerceix les seves funcions. Els microRNAs fan diana a seqüències complementàries en les regions 3' UTR dels mRNAs mitjançant un aparellament clàssic de bases. La desregulació del mRNA es dóna principalment mitjançant dues vies: per

repressió translacional o bé per **degradació del mRNA**. Sembla que una baixa complementarietat entre el microRNA i el mRNA dona lloc a la repressió translacional, mentre que una alta complementarietat porta a la degradació del mRNA (Wahid et al., 2010). La proteïna GW182 (*Glycine-tryptophan protein of 182 kDa*) i els grups Ago són factors claus durant tot el procés, facilitant la funció dels microRNAs. Les regions terminals de GW182 també participen en la desadenilació del mRNA a través d'interaccions amb la proteïna PABP i les desadenilases CCR4 i CAF1 (Eulalio et al., 2009; Krol et al., 2010) (Figura 10).

Els microRNAs estan involucrats en quasi tots els processos biològics, incloent desenvolupament, metabolisme i envelliment, així com també en moltes malalties. Tot i que el nombre de microRNAs descrits fins al moment és relativament petit en comparació amb el nombre de mRNAs coneguts, un sol microRNA pot tenir com a diana a múltiples mRNAs, permetent que cada microRNA controli diferents components d'una xarxa transcripcional a la vegada. Per tant, els microRNAs poden tenir un impacte considerable en un control eficient i ràpid de l'expressió de gens (Francis et al., 2014).

Concretament, els microRNAs també representen eines interessants per millorar processos de reprogramació. Per exemple, s'ha aconseguit reprogramar fibroblasts cap a iPSCs mitjançant només la sobreexpressió del clúster miR-302/367 (Anokye-Danso et al., 2011). També s'ha aconseguit reprogramar, tant *in vivo* com *in vitro*, fibroblasts cardíacs cap a cardiomiòcits (Jayawardena et al., 2012).

4.2. Paper dels microRNAs en el manteniment de la pluripotencialitat i la diferenciació

Els microRNAs participen com a reguladors clau en una gran varietat de processos de desenvolupament a l'organisme (Sayed and Abdellatif, 2011). Per exemple, s'ha demostrat la importància d'un petit grup de microRNAs en el manteniment de la pluripotencialitat de cèl·lules embrionàries. Aquests microRNAs estan altament conservats entre ratolins i humans, i la seva expressió baixa ràpidament durant la diferenciació (Houbaviy et al., 2003; Suh et al., 2004; Ren et al., 2009). El canvi per

passar de la pluripotencialitat a la diferenciació requereix la repressió de gens associats a la pluripotencialitat de la cèl·lula, com ara *Nanog*, *Oct4*, *Sox2* i *Klf4*. La repressió d'aquests gens pot ser mitjançant microRNAs, com ara let-7, miR-34, miR-134, miR-145, miR-296 i miR-470 (Tay et al., 2008; Xu et al., 2009; Melton et al., 2010; Choi et al., 2011).

Un event primerenc que és crític durant la diferenciació de les cèl·lules embrionàries cap als diferents llinatges germinals és la **transició epitelial-mesenquimal (EMT)**. L'EMT és el procés biològic mitjançant el qual cèl·lules epitelials diferenciades perden la seva polaritat cel·lular i adquireixen propietats migratòries i invasives per convertir-se en cèl·lules mesenquimals, les quals tenen propietats multipotents i poden diferenciar cap a diferents tipus cel·lulars (Kalluri and Weinberg, 2009). Durant passos específics de l'embriogènesi i el desenvolupament dels òrgans, les cèl·lules de certs epitelis són plàstiques i poden passar d'estats epitelials a mesenquimals i viceversa mitjançant l'EMT i el seu procés invers, la transició mesenquimal-epitelial (MET) (Lee et al., 2006). A més, s'ha observat que l'EMT també es pot produir en algunes cèl·lules adultes, en processos com la curació de ferides, permetent que cèl·lules epitelials diferenciades desdiferenciïn per convertir-se en cèl·lules mesenquimals (Kalluri and Weinberg, 2009). Membres de la **família miR-200**, composta per miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141-3p, miR-141-5p i miR-429, estan expressats en teixits epitelials diferenciats i reprimits en cèl·lules mesenquimals (Choi et al., 2008; Darnell et al., 2006; Yi et al., 2006), i s'han identificat com a repressors de l'EMT, mitjançant la repressió dels factors *ZEB1* i *ZEB2*, que actuen com a promotors de l'EMT i inhibidors de l'E-Cadherina (*E-Cad*) (Comijn et al., 2001; Christoffersen et al., 2007; Hurteau et al., 2007; Gregory et al., 2008) (Figura 11).

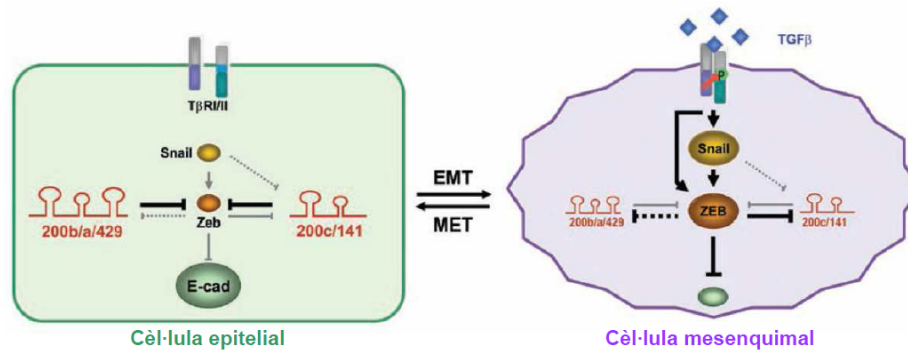


Figura 11. Esquema de la funció de la família miR-200 en la transició epitelial-mesenquimal. Les cèl·lules epitelials presenten nivells baixos d'expressió de *Snail* i els factors de transcripció *ZEB*, i alts nivells d'expressió dels membres de la família miR-200. La família miR-200 redueix l'expressió dels factors *ZEB*. Nivells baixos d'expressió de *ZEB1/2* resulten en una major expressió del factor epitelial *E-cad*. A la inversa, en cèl·lules mesenquimals, nivells alts dels factors *ZEB* reprimeixen l'expressió de la família miR-200 i de la *E-cad*. Figura adaptada de (Korpal and Kang, 2008).

4.3. Paper dels microRNAs en el desenvolupament pancreàtic

L'anàlisi de ratolins amb una deleció específica del gen *Dicer1* en cèl·lules β va aportar la primera evidència que els microRNAs són essencials pel desenvolupament del pàncrees endocrí (Lynn et al., 2007). *Dicer1* s'eliminava del pàncrees endocrí en desenvolupament al dia 10.5e utilitzant ratolins *Pdx1-Cre*. Aquests ratolins presentaven tots els llinatges pancreàtics defectuosos, una pèrdua important de cèl·lules β i morien al dia 3 després de néixer. L'estructura dels seus illots estava alterada i presentaven una reducció significativa del nombre de progenitors endocrins *Ngn3* positius. Tot i que un *knock-out* total de *Dicer1* resulta en mortalitat embrionària (Bernstein et al., 2003), s'ha descrit que ratolins hipomòrfics en *Dicer1*, els quals presenten un 20% de l'expressió normal de *Dicer1* en tots els teixits, són viables. Aquests ratolins hipomòrfics en *Dicer1* van revelar que tots els teixits de ratolins de 8 a 10 setmanes d'edat eren histològicament normals, excepte el pàncrees (Morita et al., 2009).

A la Taula 2 es presenta una llista de microRNAs dels quals se n'ha descrit la seva implicació en el desenvolupament pancreàtic.

microRNA	Gens diana	Paper del microRNA en el desenvolupament pancreàtic
let-7e	<i>Hdac9</i>	La seva sobreexpressió en ESCs de ratolí resultava en una sobreexpressió de <i>Sox17</i> i <i>Foxa2</i> mitjançant un increment de l'acetilació d'histones (Fu et al., 2011).
miR-124a	<i>NeuroD1</i> , <i>Foxa2</i> , <i>Hes1</i>	Pot estar involucrat en l'especificació endocrina mitjançant el control del número de cèl·lules NGN3+ a través de la regulació de <i>Hes1</i> (C. Wang et al., 2010). Regula negativament factors de transcripció importants pel desenvolupament pancreàtic (Baroukh et al., 2007).
miR-15a	<i>Ngn3</i>	La inhibició de NGN3 per aquest miRNA resulta en una capacitat reduïda de regeneració del pàncrees després d'una lesió (Joglekar et al., 2007).
miR-15b	<i>Ngn3</i>	La inhibició de NGN3 per aquest miRNA resulta en una capacitat reduïda de regeneració del pàncrees després d'una lesió (Joglekar et al., 2007).
miR-16	<i>Ngn3</i>	La inhibició de NGN3 per aquest miRNA resulta en una capacitat reduïda de regeneració del pàncrees després d'una lesió (Joglekar et al., 2007).
miR-181c	<i>Hdac9</i>	La seva sobreexpressió en ESCs de ratolí resultava en una sobreexpressió de <i>Sox17</i> i <i>Foxa2</i> mitjançant un increment de l'acetilació d'histones (Fu et al., 2011).
miR-195a	<i>Ngn3</i>	La inhibició de NGN3 per aquest miRNA resulta en una capacitat reduïda de regeneració del pàncrees després d'una lesió (Joglekar et al., 2007).
miR-196a	<i>Hdac9</i>	La seva sobreexpressió en ESCs de ratolí resultava en una sobreexpressió de <i>Sox17</i> i <i>Foxa2</i> mitjançant un increment de l'acetilació d'histones (Fu et al., 2011).
miR-19b	<i>NeuroD1</i>	Regula negativament factors de transcripció importants pel desenvolupament pancreàtic (Zhang et al., 2011).
miR-200a	<i>Zeb2</i> , <i>Sox17</i>	Regulat negativament durant etapes primerenques de la diferenciació de l'endoderm i sobreexpressat en etapes posteriors. Regula negativament la formació d'endoderm definitiu (Liao et al., 2013).
miR-200c	<i>Sip1</i>	Promou la formació de mesendoderm durant la diferenciació <i>in vitro</i> de ESC humanes (Chng et al., 2010).
miR-218	<i>Hnf-6</i> , <i>Oc-2</i>	Involucrat en la morfogènesi primerenca del pàncrees i en l'especificació endocrina mitjançant la repressió de factors de transcripció pancreàtics (Simion et al., 2010).
miR-222	<i>Hdac9</i>	La seva sobreexpressió en ESCs de ratolí resultava en una sobreexpressió de <i>Sox17</i> i <i>Foxa2</i> mitjançant un increment de l'acetilació d'histones (Fu et al., 2011).
miR-23a miR-23b	<i>Hes1</i>	Poden estar involucrats en l'especificació endocrina mitjançant el control del número de cèl·lules NGN3+ a través de la regulació de <i>Hes1</i> (C. Wang et al., 2010).
miR-26a	<i>Tet1</i> , <i>Tet2</i> , <i>Tet3</i> , <i>Tdg</i>	La seva sobreexpressió en ratolins durant el desenvolupament embrionari del pàncrees augmenta el número d'illots, l'expressió de gens endocrins i la proliferació cel·lular (Fu et al., 2013).
miR-302a	<i>Lefty1</i> , <i>Lefty2</i>	La seva sobreexpressió en ESC humanes promou la formació de mesendoderma a expenses de neuroectoderm (Rosa and Brivanlou, 2011). Facilita el procés de reprogramació d'hepatòcits a cèl·lula β (Lu et al., 2014).
miR-338-5p	<i>Hdac9</i>	La seva sobreexpressió en ESCs de ratolí resultava en una sobreexpressió de <i>Sox17</i> i <i>Foxa2</i> mitjançant un increment de l'acetilació d'histones (Fu et al., 2011).
miR-375	<i>Timm8a</i> , <i>Hnf1β</i> , <i>Aifm1</i> , <i>Rasd1</i> , <i>Eef1e1</i> , <i>Gphn</i> , <i>Hud</i> , <i>Cadm1</i>	Involucrat en la formació d'endoderm definitiu durant la diferenciació <i>in vitro</i> de ESC humanes (Hinton et al., 2010). Essencial pel desenvolupament pancreàtic (Kloosterman et al., 2007). El seu <i>knock-out</i> en ratolins resulta en una proliferació de cèl·lules β reduïda (Poy et al., 2009). La seva sobreexpressió en ESCs i iPSCs humanes va ser suficient per induir diferenciació cap a cèl·lules que expressaven insulina (Lahmy et al., 2013, 2014).
miR-495	<i>Hnf-6</i> , <i>Oc-2</i>	Involucrat en la morfogènesi primerenca del pàncrees i en l'especificació endocrina mitjançant la repressió de factors de transcripció pancreàtics (Simion et al., 2010).
miR-7	<i>Pax6</i>	Essencial pel desenvolupament normal dels illots. El seu <i>knock-out</i> en ratolins resulta en una regulació negativa dels gens de la insulina, menys cèl·lules β i intolerància a la glucosa (Nieto et al., 2012).

Taula 2. Resum dels microRNAs involucrats en el desenvolupament pancreàtic. Adaptació de (Francis et al., 2014).

miR-375 va ser un dels primers microRNAs identificats al pàncrees (Poy et al., 2004) i és un dels més ben caracteritzats. S'expressa a nivells creixents durant el desenvolupament pancreàtic i és essencial per l'establiment d'una massa cel·lular pancreàtica normal (Kloosterman et al., 2007; Poy et al., 2009). L'expressió de miR-375 està controlada per diversos factors de transcripció importants pel desenvolupament del pàncrees, com ara *Hnf6*, *Insm1*, *Ngn3*, *NeuroD1* i *Pdx1* (Keller et al., 2007). Un altre microRNA important pel desenvolupament de la cèl·lula β i amb un patró similar al de miR-375 és **miR-124a**, el qual té com a dianes factors de transcripció com *NeuroD1* i *Foxa2* (Baroukh et al., 2007). S'ha observat que miR-124a, juntament amb miR-23a i miR-23b, està involucrat en la regulació de *Hes1* durant la diferenciació neuronal, i podria jugar un paper similar en el desenvolupament pancreàtic (C. Wang et al., 2010). Un altre microRNA, **miR-7**, s'expressa en cèl·lules que expressen *Ngn3*. Un *knock-down* de miR-7 permet un augment de l'expressió de *Pax6*, que comporta una inducció d'*Arx*, *Pax4* i *MafB*. Això comporta un augment del número de cèl·lules α i β , i una disminució de les cèl·lules ϵ , demostrant la importància de miR-7 a l'hora de mantenir valors normals de cèl·lules endocrines (Kredo-Russo et al., 2012). Altres microRNAs també es troben expressats durant el desenvolupament pancreàtic: miR-495 i miR-218 estan involucrats en la morfogènesi primerenca del pàncrees i l'especificació del pàncrees (Simion et al., 2010); miR-19b s'expressa a nivells molt alts en cèl·lules pancreàtiques progenitores i regula *NeuroD1* (Zhang et al., 2011); la sobreexpressió de miR-26a durant el desenvolupament pancreàtic augmentava el nombre d'illots, l'expressió de gens endocrins i la proliferació cel·lular (Fu et al., 2013); i miR-15a, miR-15b, miR-16 i miR-196a regulen l'expressió d'*Ngn3* durant la regeneració del pàncrees (Joglekar et al., 2007), i podrien tenir un paper similar durant el desenvolupament.

Per tant, diversos estudis demostren que els microRNAs juguen un paper clau en el desenvolupament i manteniment del pàncrees endocrí. Tot i això, es tracta d'un camp en desenvolupament i són necessaris més estudis per tal d'adquirir un millor coneixement dels microRNAs que juguen papers importants en el procés de diferenciació cap als diferents llinatges endocrins, i que podrien ser útils en el camp de la teràpia gènica, concretament en la reprogramació de cèl·lules acinars cap a cèl·lules β .

II. OBJECTIUS

La diabetis tipus 1 és el resultat d'un atac autoimmune contra les cèl·lules β del pàncrees, causant-ne la destrucció. Una estratègia per a la generació de noves cèl·lules β és la reprogramació d'altres tipus cel·lulars, com per exemple les cèl·lules acinars, cap a cèl·lules β . S'ha descrit que l'expressió forçada de *Pdx1*, *Ngn3* i *Mafa* (PNM), tres factors de transcripció específics de cèl·lula β , en cèl·lules acinars aconseguix reprogramar aquestes cèl·lules cap a cèl·lules productores d'insulina. La reprogramació de cèl·lules acinars *in vivo* tindria l'avantatge de formar noves cèl·lules β al pàncrees, que és el la localització natural per aquestes cèl·lules, a diferència d'altres estratègies que intenten diferenciar cèl·lules hepàtiques cap a cel.lules β .

El procés de reprogramació de cèl·lules acinars cap a cèl·lules productores d'insulina mitjançant PNM s'ha descrit *in vitro* en una línia cel·lular acinar (AR42J-B13) i també *in vivo* utilitzant ratolins immunodeprimits, i sembla que la transducció amb vectors adenovirals és necessària pel procés de reprogramació. No obstant, la utilització d'aquests vectors es una limitació pel desenvolupament clínic d'aquesta nova teràpia, ja que els vectors adenovirals són immunogènics i tòxics en animals immunocompetents. D'altra banda, l'expressió dels factors PNM en ratolins transgènics és insuficient per reprogramar les cèl·lules, posant en evidència que els mecanismes per aconseguir una reprogramació eficaç i segura no són coneguts.

Per tant, l'objectiu general d'aquest treball va ser estudiar **els mecanismes de la reprogramació de cèl·lules acinars cap a cèl·lules β** mitjançant els factors de transcripció PNM i identificar noves oportunitats terapèutiques per optimitzar aquesta nova teràpia per la diabetis tipus 1. Aquest objectiu general es va dividir en els següents objectius específics:

- 1. Estudiar l'habilitat de reprogramació cap a cèl·lula β de diferents línies acinars en cultiu transduïdes per un vectors adenoviral codificant per PNM, i caracteritzar la funcionalitat de les cèl·lules reprogramades.**
- 2. Estudiar l'efecte de la transducció adenoviral en el procés de reprogramació.**
- 3. Identificar microRNAs involucrats en el procés de reprogramació de cèl·lules acinars cap a cèl·lules β .**

IV. RESULTATS

1. Estudi dels efectes de l'expressió de factors de transcripció endocrins en cèl·lules acinars de ratolí: 266-6

Amb l'objectiu d'analitzar la capacitat de certs factors de transcripció o combinacions de factors de transcripció d'activar el promotor del gen de la insulina en un model de cèl·lules acinars, es va realitzar un disseny experimental utilitzant la línia cel·lular acinar de ratolí 266-6. Aquesta línia cel·lular va ser derivada d'un carcinoma pancreàtic acinar extirpat d'un ratolí transgènic que expressava l'antigen del virus 40 T selectivament al pàncrees exocrí (Ornitz et al., 1985) i, fins al moment, no s'han publicat estudis de reprogramació cap a cèl·lula β utilitzant aquesta línia cel·lular.

Per a aquest estudi es van realitzar diferents co-transfeccions en aquestes cèl·lules amb un plasmidi anomenat pAAV-RIP1-seAP, que codifica pel gen de la fosfatasa alcalina secretable (seAP) sota el control del promotor del gen de la insulina 1 de rata (RIP-1), juntament amb diferents combinacions de plasmidis codificants per factors de transcripció específics de cèl·lula β (*Pdx1*, *Ngn3* o *MafA*) sota el control del promotor del gen de l'Elastasa, específic de cèl·lules acinars (Kruse et al., 1995, 1993). Així doncs, si el promotor de la insulina resultava activat degut a l'expressió de certes combinacions de factors de transcripció, es produiria una secreció de seAP al medi, la qual es pot detectar fàcilment mitjançant un assaig luminomètric.

1.1. Generació dels constructes

Per tal d'expressar els factors de transcripció específics de cèl·lula β (*Pdx1*, *Ngn3* i *MafA*) en una línia cel·lular acinar, es van generar tres plasmidis que codifiquen per aquests gens sota el control d'un promotor específic de les cèl·lules acinars, el promotor del gen de l'Elastasa (-205/+8) (Figura 1A). També es va utilitzar el plasmidi pAAV-Elastasa-null, obtingut anteriorment al nostre laboratori i que no codifica per cap gen (Figura 1B), i el plasmidi pAAV-RIP1-seAP, que codifica pel gen seAP sota el control del promotor RIP-1, específic de cèl·lula β i també generat anteriorment al nostre laboratori (Figura 1C).

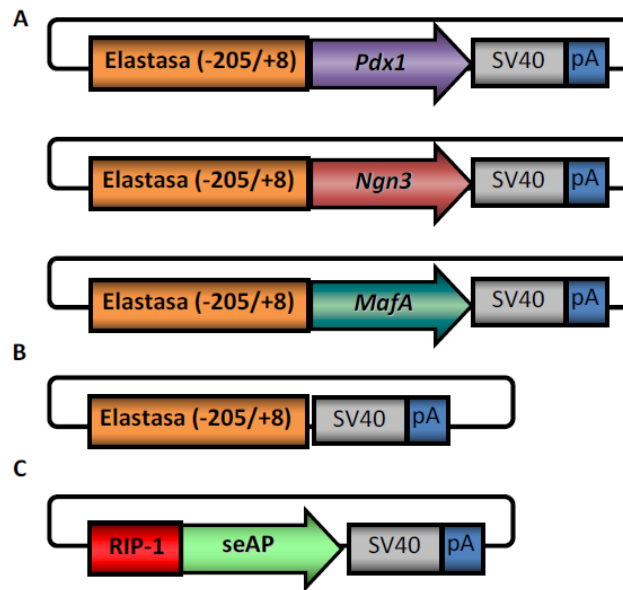


Figura 1. Representació esquemàtica dels plasmidis generats i utilitzats en l'estudi del cribeig de FTs capaços d'activar el promotor de l'insulina. (A) Plasmidis codificants per *Pdx1*, *Ngn3* i *MafA* sota el control del promotor de l'Elastasa, amb els elements reguladors SV40. (B) pAAV-Elastasa-null: el promotor Elastasa (-205/+8) amb els elements reguladors SV40. (C) pAAV-RIP1-seAP: plasmidi codificant pel gen de la fosfatasa alcalina secretable (seAP) sota el control del promotor RIP-1, amb els elements reguladors SV40. La representació esquemàtica no és a escala. pA: poliA.

L'estratègia utilitzada per a la construcció de cada un dels vectors i el protocol seguit estan detallats a *Materials i Mètodes*.

1.2. Transfeccions de factors de transcripció i anàlisi de l'activació de RIP-1

Per dur a terme l'anàlisi de l'activació del promotor exogen RIP-1 en cèl·lules acinars de ratolí, es van co-transfectar les cèl·lules 266-6 amb diferents combinacions dels plasmidis pAAV-Elastasa-Pdx1, pAAV-Elastasa-Ngn3 i pAAV-Elastasa-MafA conjuntament amb el plasmidi pAAV-RIP1-seAP. Tenint en compte que en la co-transfecció en la que es van utilitzar més factors de transcripció hi havia un total de 4 plasmidis, en totes les co-transfeccions els plasmidis estaven a una ràtio 1:4 sobre el DNA total (2 µg/rèplica). Per tant, per cada transfecció es van utilitzar 0.5 µg de cada plasmidi per mostra i es completava la barreja de DNA amb pAAV-Elastasa-null fins arribar als 2 µg. Tots els plasmidis codificants pels factors de transcripció tenien una mida molt similar, entre 5.7 i 6 kb.

A la taula següent es mostren la quantitats afegides de cada plasmidi per a les co-transfeccions de cada mostra:

Mostra	Plasmidis afegits (μg)/mostra					DNA total
	RIP1-SeAP	elastasa-Pdx1	elastasa-Ngn3	elastasa-MafA	elastasa-null	
Null RIP-SeAP	0.5				1.5	2
Pdx1	0.5	0.5			1	2
MafA	0.5			0.5	1	2
Ngn3	0.5		0.5		1	2
Pdx1+Ngn3	0.5	0.5	0.5		0.5	2
Pdx1+MafA	0.5	0.5		0.5	0.5	2
Ngn3+MafA	0.5		0.5	0.5	0.5	2
Pdx1+Ngn3+MafA	0.5	0.5	0.5	0.5		2

Passades 48 h de la transfecció, es van recollir els medis de cultiu i es va mesurar la fosfatasa alcalina secretada al medi mitjançant un assaig luminomètric (Figura 2). Es va poder observar que les cèl·lules 266-6 tenien una activitat quasi indetectable del promotor exogen RIP-1 quan eren transfectades amb AAV-RIP1-seAP sense cap factor de transcripció. Pel que fa als efectes de l'expressió dels diferents factors de transcripció individualment, es va observar una tendència a l'activació del promotor RIP-1 quan les cèl·lules expressaven *MafA* i *Ngn3*, tot i que en cap dels casos aquests augments van resultar ser significatius. Pel que fa a les combinacions de factors de transcripció, es va detectar una activació de RIP-1 quan les cèl·lules 266-6 expressaven *Pdx1* i *Ngn3* conjuntament (235 vegades més seAP que sense factors de transcripció), i quan aquestes eren co-transfectades amb *Ngn3* i *MafA* o amb *Pdx1*, *Ngn3* i *MafA* (PNM) l'activació arribava a ser de 1280 i 1277 vegades més que sense factors de transcripció, respectivament.

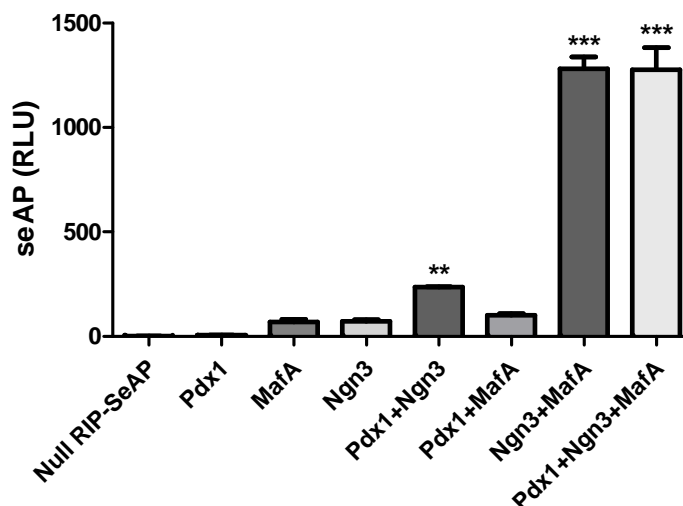


Figura 2. Activació del promotor exogen RIP-1 després de la transfecció amb diferents combinacions de factors de transcripció. Mesura de la seAP al medi de cultiu de les cèl·lules 266-6, 48 h després de co-transfectar-les amb pAAV-RIP1-seAP i diferents combinacions de plasmidis codificants per Pdx1, Ngn3 i MafA. RLU: unitats de llum relatives, directament proporcionals a la quantitat de seAP. Les barres representen la mitjana \pm SEM. n=3. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ determinat per una ANOVA d'un factor seguida d'un test post-hoc de Dunnett.

Sorprenentment, l'efecte de la transfecció amb Ngn3 i MafA era igual al de la transfecció amb PNM, fet que contrasta amb els resultats obtinguts per Zhou i col·laboradors (Zhou et al., 2008), on es va observar que els tres factors eren necessaris per aconseguir la màxima inducció de cèl·lules productores d'insulina. Tot i això, aquest efecte es podria explicar pel fet que les cèl·lules 266-6 expressen *Pdx1* basalment, tal com es va poder observar quan es van analitzar els nivells d'expressió de PNM en cèl·lules 266-6 sense transfectar i transfectades amb els factors (Figura 3).

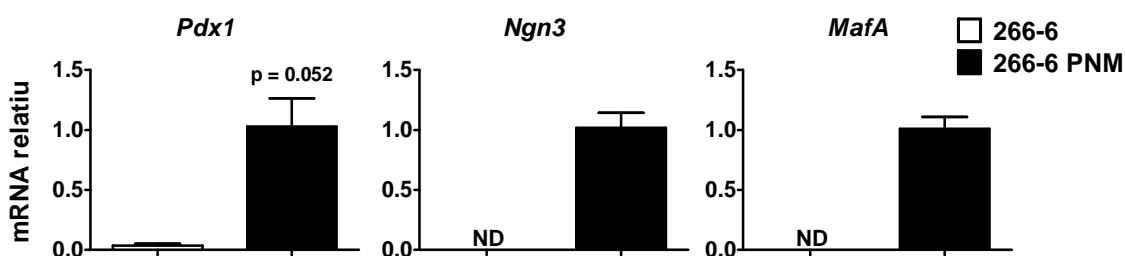


Figura 3. Nivells d'expressió de *Pdx1*, *Ngn3* i *MafA* en cèl·lules 266-6 transfectades amb PNM. Expressió relativa de *Pdx1*, *Ngn3* i *MafA* al cap de 48 h post-transfecció amb pAAV-Elastasa-Pdx1, pAAV-Elastasa-MafA i pAAV-Elastasa-Ngn3. Les barres representen la mitjana \pm SEM. n=3 (excepte per *Pdx1*, amb una n=2). ND: no detectat.

1.3. Anàlisi de l'expressió de marcadors endocrins en cèl·lules 266-6 transfectades amb PNM

La co-transfecció dels tres factors de transcripció específics de cèl·lula β (PNM) en la línia cel·lular acinar de ratolí 266-6 produïa una activació del promotor exogen RIP-1 (Figura 2). Per tal de comprovar si aquestes cèl·lules realment passaven per un procés de reprogramació i es convertien en cèl·lules amb un fenotip semblant al de les cèl·lules productores d'insulina (fenotip *β -cell like*), es va analitzar l'expressió de diversos marcadors endocrins (*Ins1*, *Ins2*, *Pax4* i *IAPP*) en cèl·lules 266-6 transfectades amb PNM i sense transfectar.

Tal i com es pot observar a la Figura 4, la transfecció de les cèl·lules 266-6 amb la combinació dels tres factors de transcripció no va causar l'activació de cap dels marcadors endocrins analitzats.

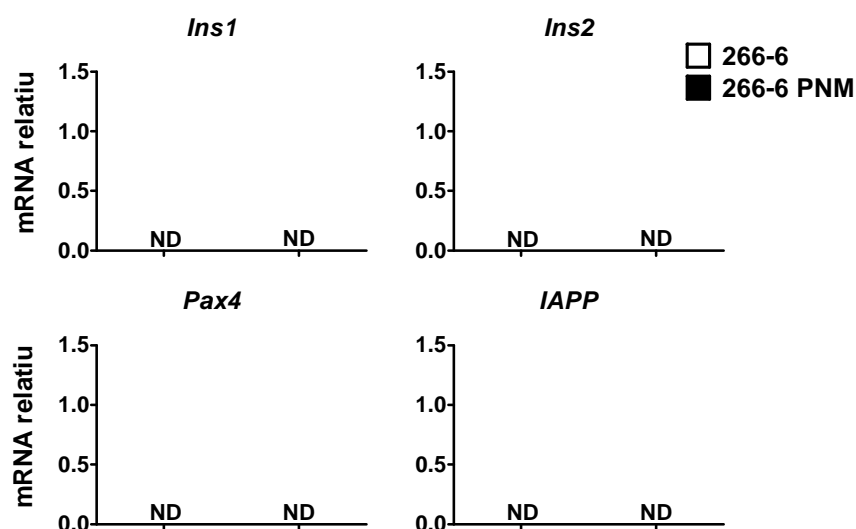


Figura 4. Anàlisi de l'expressió de gens endocrins en 266-6 transfectades amb PNM. Expressió relativa dels marcadors endocrins *Ins1*, *Ins2*, *Pax4* i *IAPP* al cap de 48 h post-transfecció amb pAAV-Elastasa-Pdx1, pAAV-Elastasa-MafA i pAAV-Elastasa-Ngn3. n=3. ND: no detectat.

Per tant, amb aquests resultats vam concloure que, per una banda, l'expressió de PNM en la línia acinar 266-6 mitjançant una **transfecció** dels tres factors és capaç d'induir una activació d'un promotor exogen de la insulina com RIP-1, però, per altra banda, és incapaç de promoure un canvi fenotípic real a les cèl·lules acinars, ja que no

s'induïa l'expressió dels gens endògens de la insulina *Ins1* i *Ins2*, així com d'altres marcadors de cèl·lula β com ara *Pax4* i *IAPP*.

1.4. Estudi dels efectes de la transducció amb Ad-PNM en cèl·lules 266-6

Diversos estudis apunten a la importància dels vectors adenovirals en els processos de reprogramació cap a cèl·lula β (Wang et al., 2007; Zaldumbide et al., 2012; Chen et al., 2014). Per aquest motiu, es va decidir expressar PNM en les cèl·lules 266-6 mitjançant vectors adenovirals, per tal de comprovar si la transducció adenoviral promovia la diferenciació cap a cèl·lula β . Es van transduir les cèl·lules amb un únic vector adenoviral de primera generació anomenat Ad-PNM, que codificava per *Pdx1*, *Ngn3* i *MafA* de manera equimolar conjuntament amb la proteïna fluorescent GFP (*green fluorescence protein*) sota el control del promotor ubic CAG (Banga et al., 2012) (Figura 5). D'aquesta manera, totes les cèl·lules transduïdes expressaven els tres factors de transcripció i, a més, les cèl·lules transduïdes podien ser identificades gràcies a la fluorescència de la GFP. Aquest vector va ser cedit pel doctor Jonathan Slack (University of Minnesota, EEUU).



Figura 5. Representació esquemàtica de la seqüència del vector adenoviral codificant per *eGFP*, *Pdx1*, *Ngn3* i *MafA* (Ad-PNM). El vector codifica un únic transcrit que conté els gens de *eGFP*, *Pdx1*, *Ngn3* i *MafA*, separats entre ells per seqüències 2A, les quals provoquen el trencament del polipèptid generant així les quatre proteïnes d'interès. Els cDNAs de *Pdx1*, *Ngn3* i *MafA* són de ratolí. La representació esquemàtica no és a escala. pA: poliA.

La transducció es va dur a terme amb una multiplicitat d'infecció (MOI) de 2000 partícules víriques (pv) per cèl·lula, ja que amb aquesta MOI es va observar una toxicitat relativament baixa, amb poca mortalitat cel·lular, i que la gran majoria de les cèl·lules expressaven GFP. Al cap de tres dies post-infecció, es va poder observar una transducció generalitzada de les cèl·lules 266-6, evidenciada per la presència de GFP en la majoria de cèl·lules (Figura 6A). Tal com era d'esperar, també es va poder detectar una elevada expressió de *Pdx1*, *Ngn3* i *MafA* en les cèl·lules transduïdes amb Ad-PNM (Figura 6B).

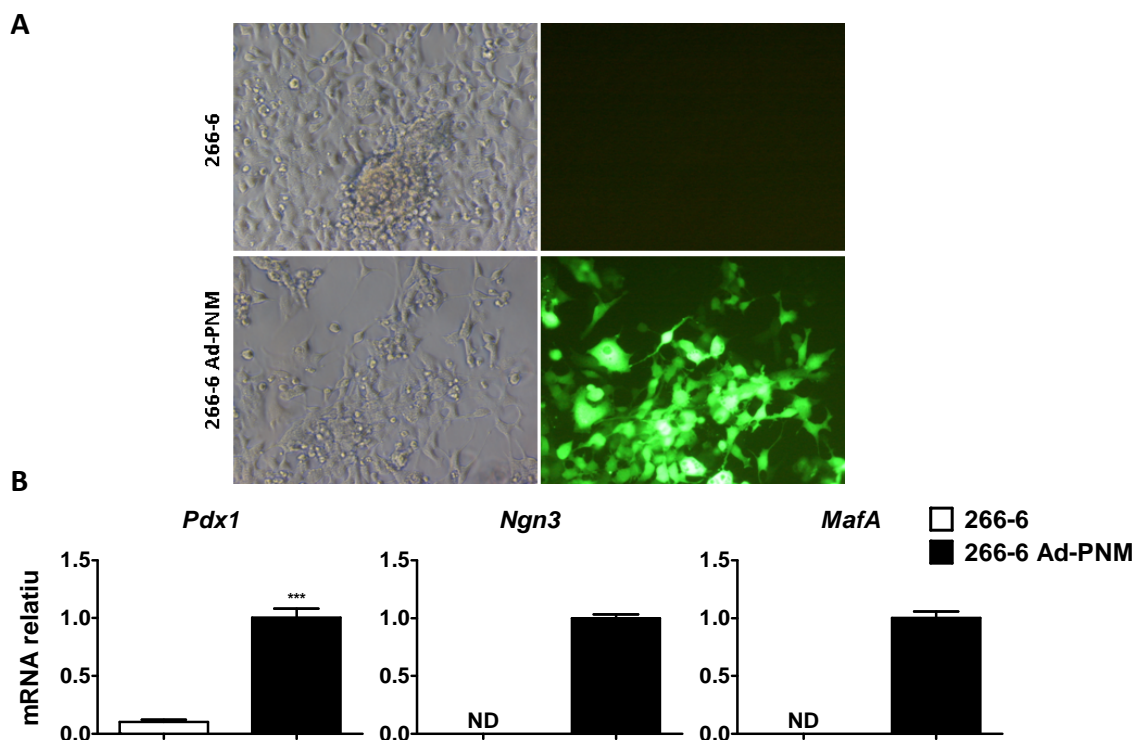


Figura 6. Transducció de les cèl·lules 266-6 amb Ad-PNM. (A) Imatges en camp clar i de fluorescència de cèl·lules 266-6 sense transduir i transduïdes amb Ad-PNM al cap de 3 dies post-transducció. Fotografies a 200X. (B) Expressió relativa de *Pdx1*, *Ngn3* i *MafA* als 4 dies post-transducció. Les barres representen la mitjana \pm SEM. n=3. ND: no detectat. *** $p < 0.001$ determinat per *t* de Student.

Tot i l'elevada expressió dels tres factors de transcripció, quan es va estudiar si hi havia reprogramació de les cèl·lules acinars cap a cèl·lula β mitjançant l'anàlisi de l'expressió de diferents marcadors específics de cèl·lula β (*Ins1*, *Ins2*, *IAPP* i *NeuroD1*), no es va detectar una activació de l'expressió en cap d'ells, excepte en el cas de *NeuroD1*, que ja s'expressava basalment en les cèl·lules 266-6 i que augmentava significativament la seva expressió 1.67 vegades en cèl·lules 266-6 transduïdes amb Ad-PNM (Figura 7).

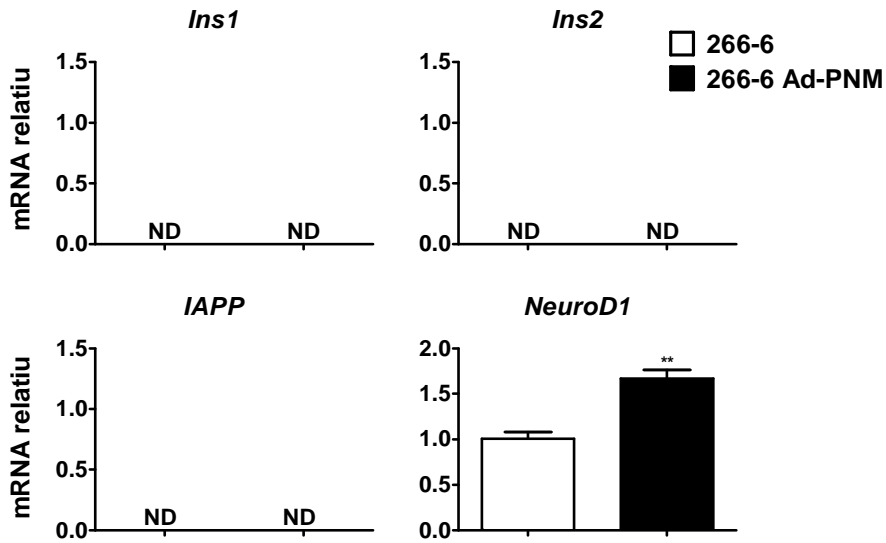


Figura 7. Anàlisi de l'expressió de gens endocrins en 266-6 transduïdes amb Ad-PNM. Expressió relativa dels marcadors endocrins *Ins1*, *Ins2*, *IAPP* i *NeuroD1* als 4 dies post-transducció amb Ad-PNM. Les barres representen la mitjana \pm SEM. n=3. ND: no detectat. ** $p < 0.01$ determinat per *t* de Student.

Així doncs, amb aquestes dades vam concloure que l'expressió de PNM mitjançant un vector adenoviral no era capaç de reprogramar les cèl·lules acinars 266-6 cap a un fenotip de cèl·lula β , tot i expressar alts nivells de mRNA dels tres factors de transcripció.

2. Estudi de la reprogramació a cèl·lula β en les línies cel·lulars acinars de rata AR42J i AR42J-B13

S'ha descrit prèviament que la línia acinar de rata AR42J-B13 (B13) pot reprogramar cap a un fenotip de cèl·lula productora d'insulina quan és transduïda amb un vector adenoviral que codifica per PNM (Akinci et al., 2012). No obstant, l'habilitat de reprogramació en les mateixes condicions de la línia cel·lular de la qual provenen les B13, la línia AR42J, no ha estat mai analitzada.

Per tal d'investigar si hi ha diferències basals entre diferents línies cel·lulars que facilitin o bloquegin el procés de reprogramació de cèl·lula acinar cap a cèl·lula β , en aquesta part del treball es va voler avaluar l'eficiència de reprogramació de les dues línies cel·lulars acinars de rata, AR42J i B13, al ser transduïdes amb el vector adenoviral codificant per PNM.

2.1. Estudi dels efectes de la transducció amb Ad-PNM en les cèl·lules AR42J i B13

Per tal d'analitzar els efectes de l'expressió de PNM mitjançant vectors adenovirals en les cèl·lules AR42J i B13, es va utilitzar el vector adenoviral Ad-PNM a una MOI de 2000 pv/cèl·lula. Tal i com es pot observar a la Figura 8A, i de la mateixa manera que s'havia observat en la línia cel·lular 266-6 (Figura 6A), la majoria de les cèl·lules AR42J i B13 van ser transduïdes eficientment i expressaven GFP. També es van detectar nivells molt elevats d'expressió dels factors de transcripció endocrins de ratolí *Pdx1*, *Ngn3* i *MafA* en les dues línies cel·lulars transduïdes amb Ad-PNM, sent aquests nivells d'expressió similars entre els dos clons (Figura 8B).

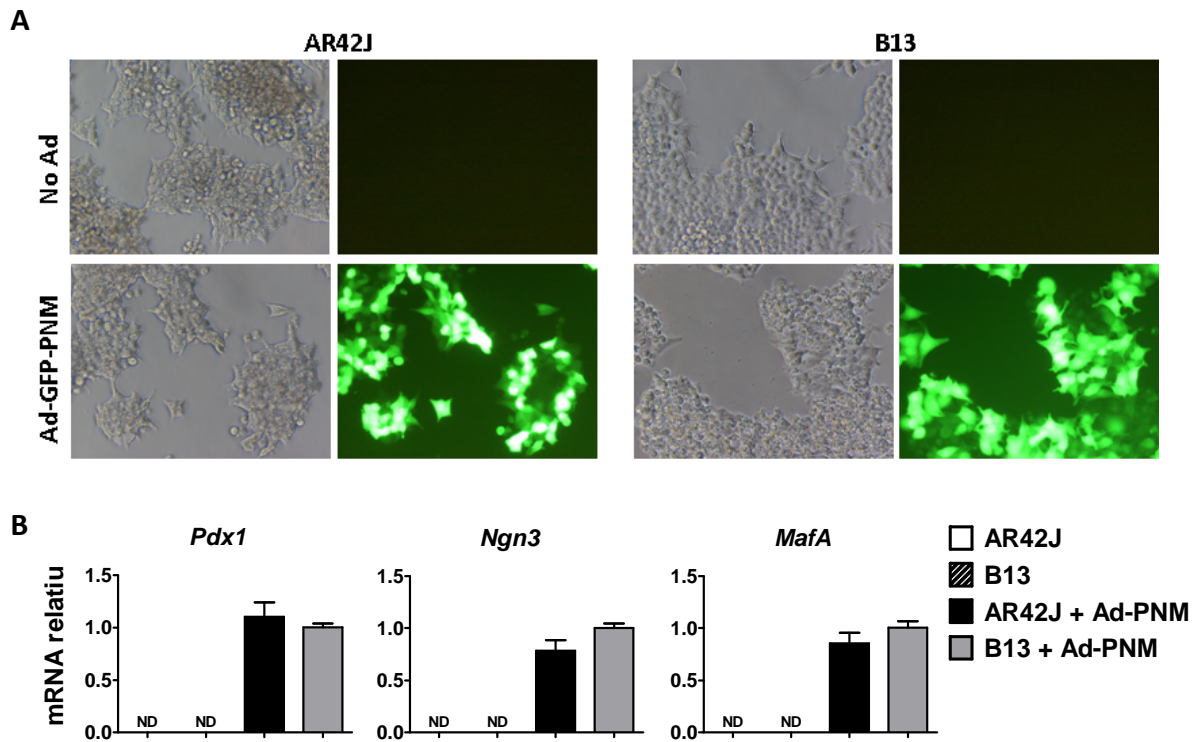


Figura 8. Transducció eficient de les cèl·lules AR42J i B13 amb Ad-PNM. (A) Imatges en camp clar i de fluorescència de cèl·lules AR42J i B13 sense transduir i transduïdes amb Ad-PNM. Fotografies a 200X. (B) Expressió relativa dels factors de transcripció de ratolí *Pdx1*, *Ngn3* i *MafA* als 4 dies post-transducció. Les barres representen la mitjana \pm SEM. n=3. ND: no detectat.

Pel que fa als efectes de la transducció Ad-PNM sobre el fenotip de les línies cel·lulars acinars AR42J i B13, en les cèl·lules AR42J es va detectar una activació de l'expressió de *Ins2*, *IAPP* i *NeuroD1*, però, en canvi, la transducció amb Ad-PNM no aconseguia induir l'expressió d'*Ins1* (Figura 9). En canvi, en les cèl·lules B13 es va poder detectar una clara inducció de l'expressió dels quatre marcadors endocrins, inclòs *Ins1*, deguda a Ad-PNM. A més, en tots els casos l'expressió dels marcadors endocrins activats era més alta en les cèl·lules B13 que en la seva línia parental AR42J (Figura 9).

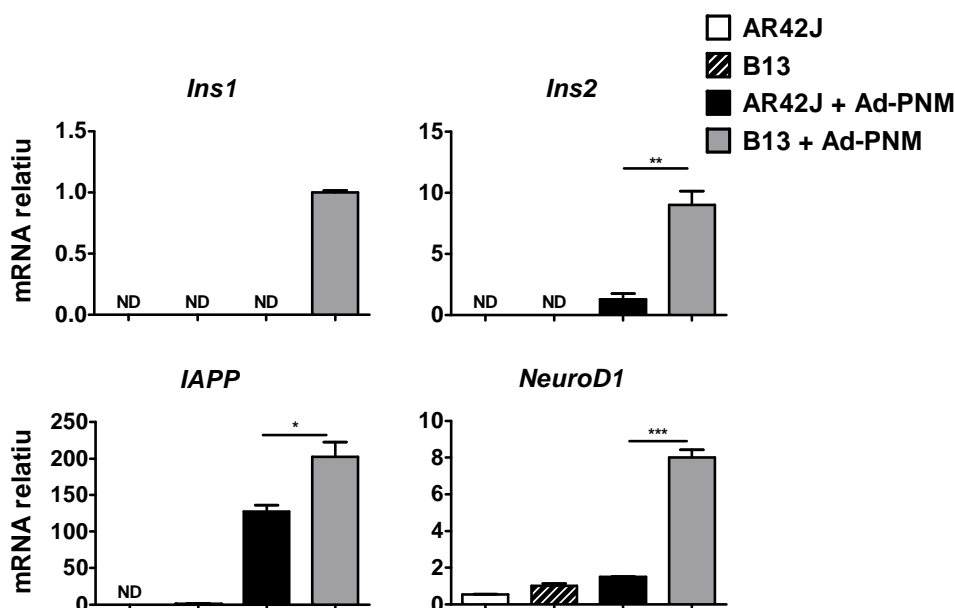


Figura 9. Anàlisi de l'expressió de marcadors endocrins en AR42J i B13 transduïdes amb Ad-PNM. Expressió relativa dels marcadors de cèl·lula β *Ins1*, *Ins2*, *IAPP* i *NeuroD1* en les cèl·lules AR42J i B13 als 4 dies post-transducció amb Ad-PNM. Les barres representen la mitjana \pm SEM. $n=3$. ND: no detectat. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ determinat per *t* de Student.

Com que es va observar una activació de l'expressió de marcadors endocrins en les dues línies cel·lulars, tot i que a diferents nivells, es va voler aprofundir en el grau de reprogramació d'aquestes, analitzant així l'expressió de dos marcadors endocrins més: *Pax4* i *Gcg* (glucagó) (Figura 10). En el cas del *Gcg*, es tracta d'un marcador de cèl·lula α .

En el cas de *Pax4* es va detectar una inducció de l'expressió en les dues línies cel·lulars, tot i que en el cas de les cèl·lules B13 transduïdes amb Ad-PNM l'expressió era 30 vegades superior a les AR42J transduïdes. En canvi, en cap de les condicions es va detectar expressió de glucagó, suggerint que la reprogramació era cap a cèl·lula β i no cap a altres tipus cel·lulars endocrins, com per exemple les cèl·lules α .

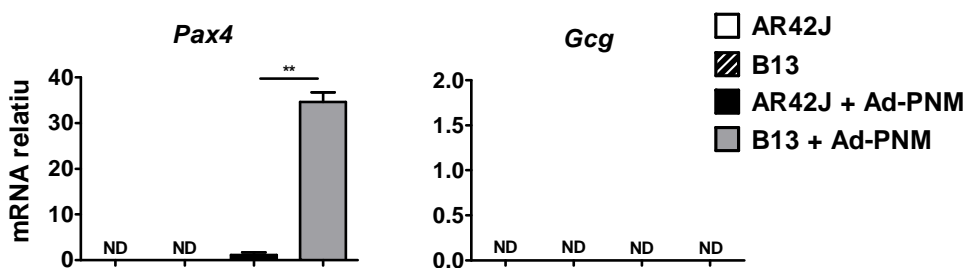


Figura 10. Anàlisi de l'expressió de marcadors endocrins en AR42J i B13 transduïdes amb Ad-PNM. Expressió relativa dels marcadors endocrins *Pax4* i *Gcg* en les cèl·lules AR42J i B13 als 4 dies post-transducció amb Ad-PNM. Les barres representen la mitjana \pm SEM. $n=3$. ND: no detectat. $**p<0.01$, determinat per *t* de Student.

Així doncs, vam concloure que el subclon B13 es reprogramava més eficientment cap a un fenotip de cèl·lula β mitjançant Ad-PNM que la seva línia parental AR42J, ja que l'activació de l'expressió de tots els marcadors analitzats era superior en el cas del subclon. Aquestes diferències semblaven ser degudes a diferències intrínseques entre les línies cel·lulars, ja que els nivells d'expressió de PNM eren similars en ambdues línies (Figura 8B).

2.2. Caracterització de la funcionalitat de les cèl·lules B13 reprogramades

Per tal de caracteritzar més detalladament el fenotip de les cèl·lules B13 reprogramades mitjançant Ad-PNM, vam estudiar-ne l'expressió de gens codificants per proteïnes processadores de la insulina (convertases), l'expressió del transportador de glucosa *Glut2* i de la *Gck*, els quals actuen conjuntament com a sensors de la glucosa, la síntesi de la proteïna de la insulina i la seva habilitat per secretar-la al medi en presència de diferents concentracions de glucosa.

Tal com s'observa a la Figura 11, després de la transducció amb Ad-PNM, es va detectar una inducció de l'expressió dels enzims processadors de la insulina (*Pcsk1*, *Pcsk2* i *Cpe*) en les cèl·lules B13. L'activació d'aquestes convertases suggeria que les cèl·lules B13 reprogramades eren capaces de sintetitzar i processar correctament la insulina.

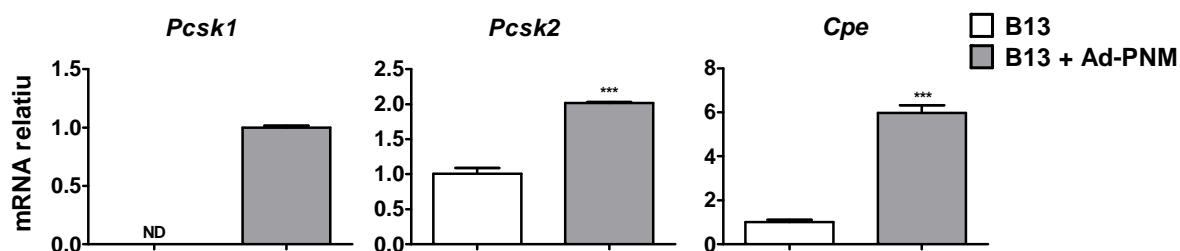


Figura 11. Activació de l'expressió d'enzims processadors d'insulina en cèl·lules B13 reprogramades. Expressió relativa de *Pcsk1*, *Pcsk2* i *Cpe* en cèl·lules B13 als 4 dies post-transducció amb Ad-PNM. Les barres representen la mitjana \pm SEM. $n=3$. ND: no detectat. *** $p<0.001$, determinat per *t* de Student.

De la mateixa manera, també es va detectar una activació dels sensors de la glucosa *Glut2* i *Gck* en les cèl·lules B13 transduïdes amb Ad-PNM (Figura 12), suggerint que les cèl·lules B13 reprogramades podrien ser sensibles a canvis de glucosa en el medi.

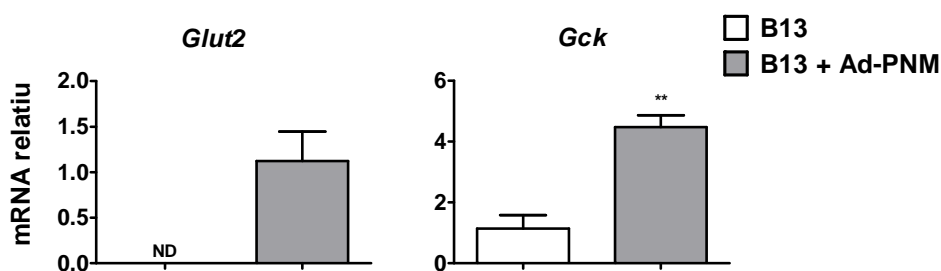


Figura 12. Activació de l'expressió dels sensors de glucosa *Glut2* i *Gck* en cèl·lules B13 reprogramades. Expressió relativa de *Glut2*, i *Gck* en cèl·lules B13 als 4 dies post-transducció amb Ad-PNM. Les barres representen la mitjana \pm SEM. $n=3$. ND: no detectat. ** $p<0.001$, determinat per *t* de Student.

Quan es va analitzar per immunocitoquímica la presència d'insulina en aquestes cèl·lules, es van detectar cèl·lules insulina positives en les B13 transduïdes amb Ad-PNM (Figura 13), que en tots els casos també eren positives per GFP, i per tant estaven transduïdes pel vector adenoviral i expressaven PNM.

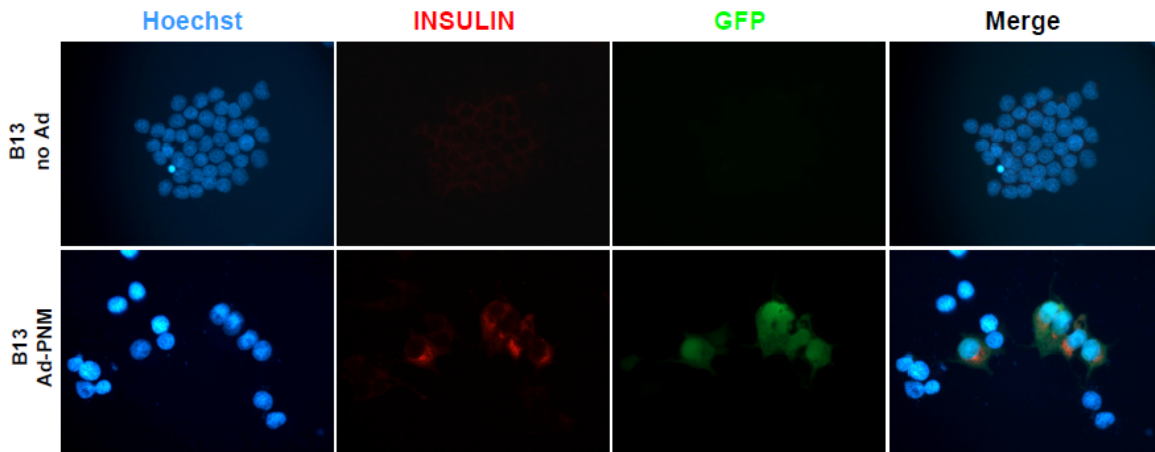


Figura 13. Anàlisi immunocitoquímica de la insulina en cèl·lules B13 reprogramades. Immunotinció de la insulina (vermell) en cèl·lules B13 al cap de 4 dies post-transducció amb Ad-PNM. La GFP es va visualitzar per la seva fluorescència i no va requerir tinció.

A més, també es van mesurar els nivells d'insulina intracel·lular i secretada al medi en cèl·lules B13 transduïdes amb Ad-PNM i sense transduir en presència de diferents concentracions de glucosa (fisiològica (2.8 mM glucosa) o elevada (20 mM glucosa)). Es va observar un augment dels nivells d'insulina intracel·lular en les cèl·lules transduïdes amb Ad-PNM, tot i que d'una manera no dependent de glucosa (Figura 14). En canvi, no es va detectar insulina secretada al medi en cap de les condicions.

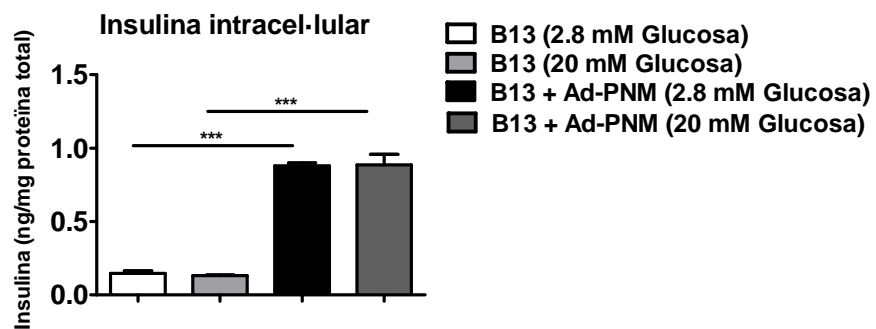


Figura 14. Contingut d'insulina intracel·lular en cèl·lules B13 reprogramades. Contingut d'insulina detectada per RIA en cèl·lules B13 transduïdes amb Ad-PNM i sense transduir en presència de diferents concentracions de glucosa als 3 dies post-transducció. Els resultats van ser normalitzats pels mg de proteïna total. Les barres representen la mitjana \pm SEM. $n=4$. *** $p<0.001$, determinat per una ANOVA d'un factor seguida d'un test post-hoc de Tukey.

Aquestes dades indicaven que les cèl·lules B13 transduïdes amb Ad-PNM posseïen moltes de les característiques de les cèl·lules β , com ara l'expressió de factors de transcripció específics de cèl·lula β , l'expressió dels sensors de la glucosa i la producció i el processament de la insulina. Tot i això, no estaven completament diferenciades, tal com evidenciava la incapacitat de secretar insulina al medi i la falta de resposta als nivells de glucosa.

2.3. Estudi de l'efecte dels vectors adenovirals en la reprogramació per Ad-PNM

Un cop comprovat l'efecte de reprogramació cap a un fenotip *β -cell like* que produeix la transducció amb Ad-PNM en les cèl·lules B13, es va voler estudiar si la transducció adenoviral *per se* juga un paper important en aquest procés, tal com semblen indicar alguns estudis (Wang et al., 2007; Zaldumbide et al., 2012).

Per una banda, es va analitzar si la transducció amb un vector adenoviral control (Ad-GFP) induïa l'expressió de marcadors endocrins en les cèl·lules B13 (*Ins1*, *Ins2*, *IAPP*, *NeuroD1*, *Pax4*, *Glut2*, *Gck*, *Pcsk1*, *Pcsk2* i *Cpe*). Tal com s'observa a la Figura 15, es va comprovar que la transducció amb Ad-GFP no era capaç d'activar l'expressió de cap dels marcadors endocrins analitzats.

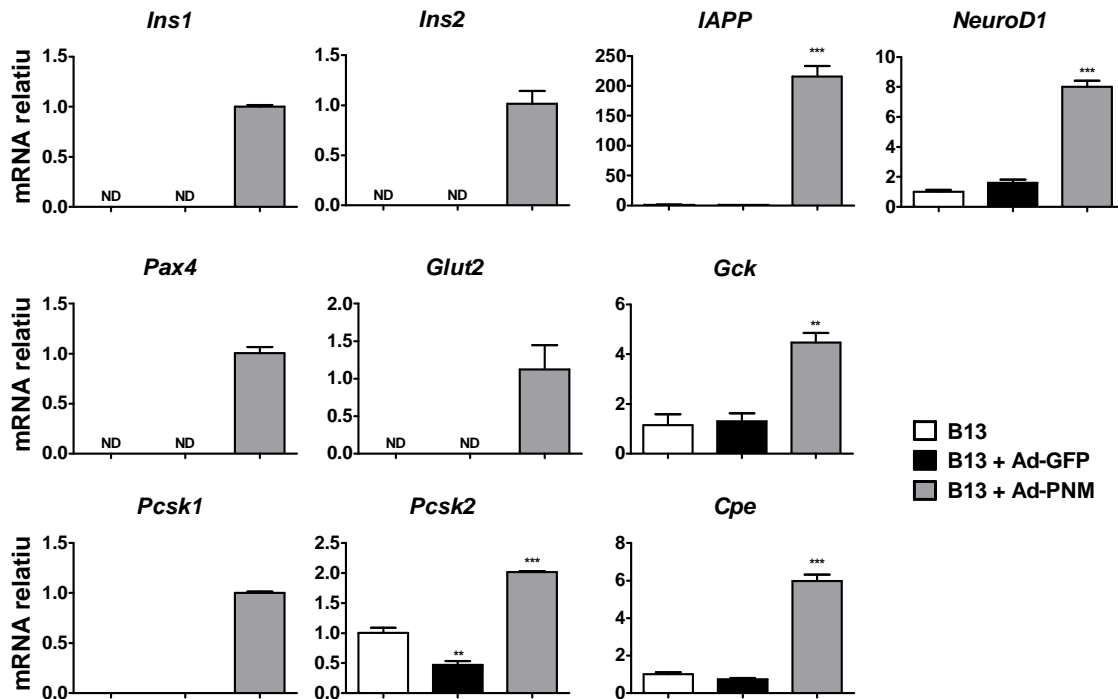


Figura 15. Anàlisi de l'efecte de la transducció adenoviral sobre l'expressió de marcadors endocrins. Expressió relativa dels marcadors d'*Ins1*, *Ins2*, *IAPP*, *NeuroD1*, *Pax4*, *Glut2*, *Gck*, *Pcsk1*, *Pcsk2* i *Cpe* en cèl·lules B13 4 dies post-transducció amb Ad-GFP o Ad-PNM. Les barres representen la mitjana \pm SEM. n=3. ND: no detectat. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, determinat per una ANOVA d'un factor seguida d'un test post-hoc de Dunnett.

Per altra banda, també es va analitzar l'efecte de la transducció adenoviral en l'expressió de gens exocrins (amilasa, *Cela1*, *Cpa1* i *Ptf1a*) en cèl·lules B13. En aquest cas, es va detectar una disminució en l'expressió de tres d'aquests gens marcadors (*Cela1*, *Cpa1* i *Ptf1a*) en les cèl·lules B13 transduïdes per Ad-PNM. Sorprenentment, es va observar un efecte similar en les cèl·lules B13 transduïdes amb el vector adenoviral control (Ad-GFP) (Figura 16), suggerint que aquest efecte era independent de l'expressió de PNM.

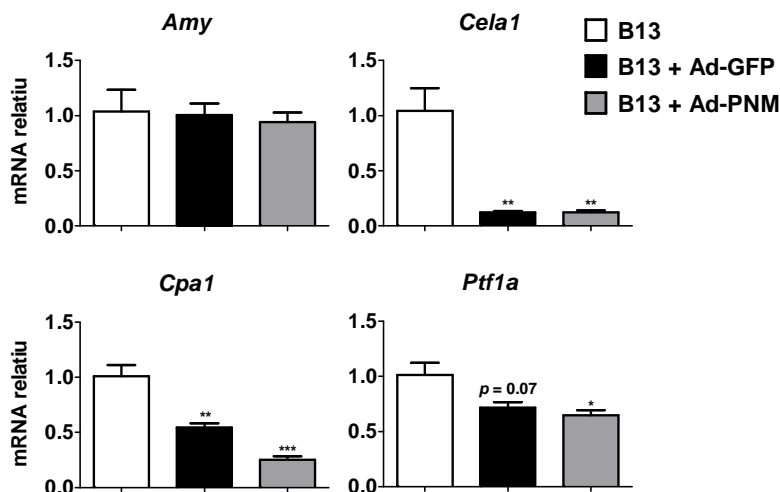


Figura 16. Disminució de l'expressió de marcadors exocrins en cèl·lules B13 transduïdes amb vectors adenovirals. Expressió relativa dels gens exocrins de l'amilasa, *Cela1*, *Cpa1* i *Ptf1a* en cèl·lules B13 transduïdes amb Ad-GFP o Ad-PNM als 4 dies post-transducció. Les barres representen la mitjana \pm SEM. $n=3$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, determinat per una ANOVA d'un factor seguida d'un test post-hoc de Dunnett.

Per tal d'estudiar si aquesta desregulació era causada per l'expressió de la proteïna GFP (ja que aquesta era present tant en els Ad-GFP com en els Ad-PNM), es va realitzar el mateix experiment transduint les cèl·lules B13 amb un vector adenoviral no codificant per cap transgèn (Ad-null), i es va poder observar el mateix efecte de disminució de l'expressió dels marcadors exocrins *Cela1*, *Cpa1*, *Ptf1a* (Figura 17).

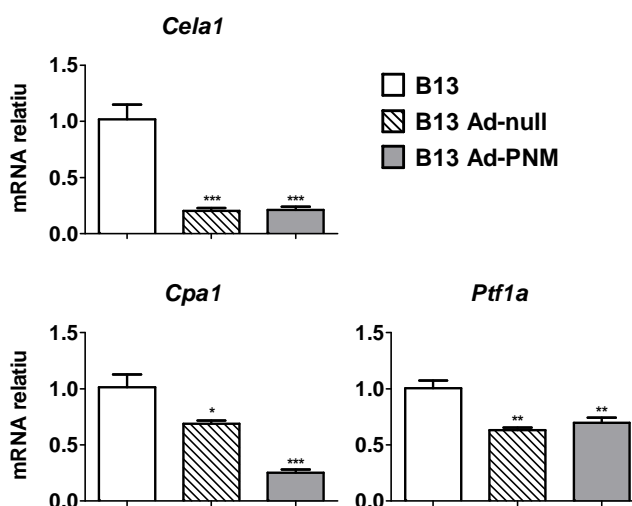


Figura 17. Disminució de l'expressió de marcadors exocrins en cèl·lules B13 transduïdes amb Ad-null. Expressió relativa dels gens exocrins *Cela1*, *Cpa1* i *Ptf1a* en cèl·lules B13 transduïdes amb Ad-null o Ad-PNM als 4 dies post-transducció. Les barres representen la mitjana \pm SEM. $n=3$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, determinat per una ANOVA d'un factor seguida d'un test post-hoc de Dunnett.

Aquests resultats indicaven que la transducció adenoviral en la línia cel·lular B13 produïa un efecte de desregulació de certs marcadors exocrins. Aquest fet suggereix que el mecanisme pel qual els vectors adenovirals juguen un paper clau en la reprogramació per Ad-PNM podria ser la desdiferenciació del fenotip exocrí de les cèl·lules acinars, facilitant així la reprogramació cap a altres tipus cel·lulars.

3. Cribeig de microRNAs implicats en la reprogramació de cèl·lules acinars a cèl·lules β

Amb la finalitat d'aprofundir en els mecanismes que regulen el procés de reprogramació, es va decidir estudiar el paper dels microRNAs en diferents condicions experimentals, ja que està descrit que els microRNAs juguen un paper clau en el procés de desenvolupament de les cèl·lules β (Lynn et al., 2007; Kanji et al., 2013).

Per a realitzar aquest estudi es va utilitzar la tecnologia *miRCURY LNATM Universal RT microRNA PCR* (Exiqon), consistent en panells de qPCR, on cada pou conté oligonucleòtids per un microRNA concret. D'aquesta manera es va poder analitzar l'expressió de fins a 752 microRNAs murins per cada mostra. Les condicions experimentals analitzades van ser les següents:

- (i) cèl·lules AR42J no transduïdes.
- (ii) cèl·lules B13 no transduïdes.
- (iii) cèl·lules B13 transduïdes amb Ad-GFP.
- (iv) cèl·lules B13 transduïdes amb Ad-PNM.

L'objectiu d'aquest disseny experimental va ser el d'identificar microRNAs diferencialment expressats en les dues línies cel·lulars i que podrien tenir un paper important a l'hora facilitar el procés de reprogramació (AR42J *vs* B13). A més, d'aquesta manera també podríem distingir quins microRNAs estaven activats o reprimits per l'efecte de la transducció adenoviral (B13 *vs* B13 Ad-GFP) i quins microRNAs ho estaven per l'expressió de PNM (B13 Ad-GFP *vs* B13 Ad-PNM).

3.1. Anàlisi bioinformàtic dels perfils d'expressió de microRNAs

L'expressió de microRNAs va resultar ser altament reproduïble entre rèpliques biològiques, sobretot pel que fa a les mostres sense transduir, tal com s'observa al *heat-map* de la Figura 18. Sorprenentment, el cribeig va mostrar que la major variabilitat provenia de la comparació entre les línies cel·lulars AR42J i B13, les quals presentaven

perfils d'expressió de microRNAs molt diferenciats. Tot i que en menor mesura, també es van detectar grups de microRNAs diferencialment expressats entre les cèl·lules B13 sense transduir, transduïdes amb Ad-GFP i transduïdes amb Ad-PNM.

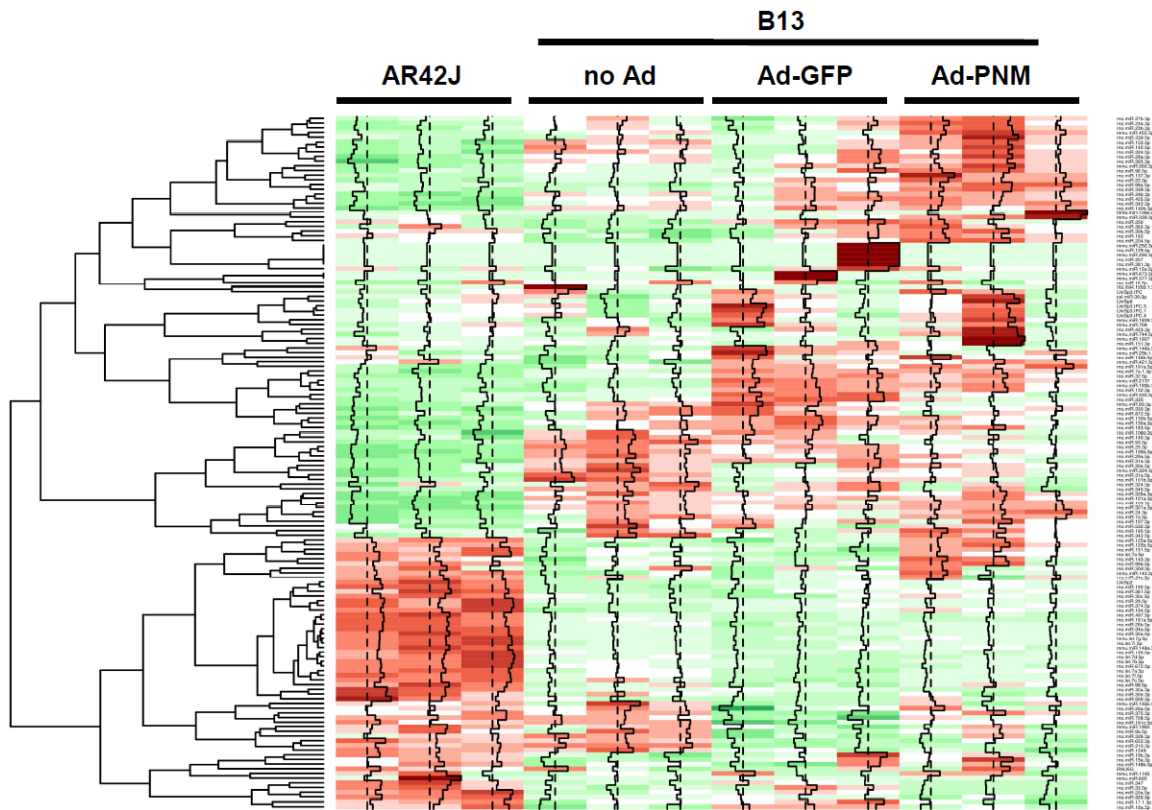


Figura 18. Perfils d'expressió de microRNAs de cèl·lules AR42J i cèl·lules B13 transduïdes o no amb vectors adenovirals. Heat-map per tots els microRNAs vàlids detectats, calculat a partir de distàncies Pearson per parelles. Verd: Cts baixes, Vermell: Cts altes.

Per tal d'obtenir una altra representació de les diferències detectades en els perfils de microRNAs de les diferents condicions analitzades, es va realitzar una Anàlisi de Component Principal (PCA). Una PCA és un procediment estadístic que permet reduir la dimensionalitat d'un conjunt de dades per tal de poder-les reproduir. En el nostre cas, el conjunt de dades contenia 752 dimensions o components, corresponents als microRNAs analitzats. Com que és materialment impossible reproduir més de tres dimensions, la PCA agrupa diferents variables (en aquest cas microRNAs) en dimensions o components. Així, la primera component captura la major font de variabilitat, la segona màxima variança és capturada per la segona component i així successivament. Finalment, la PCA ens dona una representació en dues o tres dimensions que ens permet saber com s'assemblen dues mostres entre sí i quines són les variables (microRNAs) que fan que les mostres es diferenciïn.

Quan es van representar totes les condicions en una PCA de dues dimensions (Figura 19), es va poder observar que les cèl·lules AR42J i B13 sense transduir quedaven clarament separades per la primera component, que és la que agrupa les fonts més grans de variabilitat (42.14% de la variabilitat total). Les cèl·lules B13 transduïdes amb Ad-GFP o Ad-PNM es separaven de les B13 sense transduir per la segona component (14.79% de la variabilitat), fent visible l'efecte de la transducció adenoviral sobre el perfil de microRNAs del subclon B13.

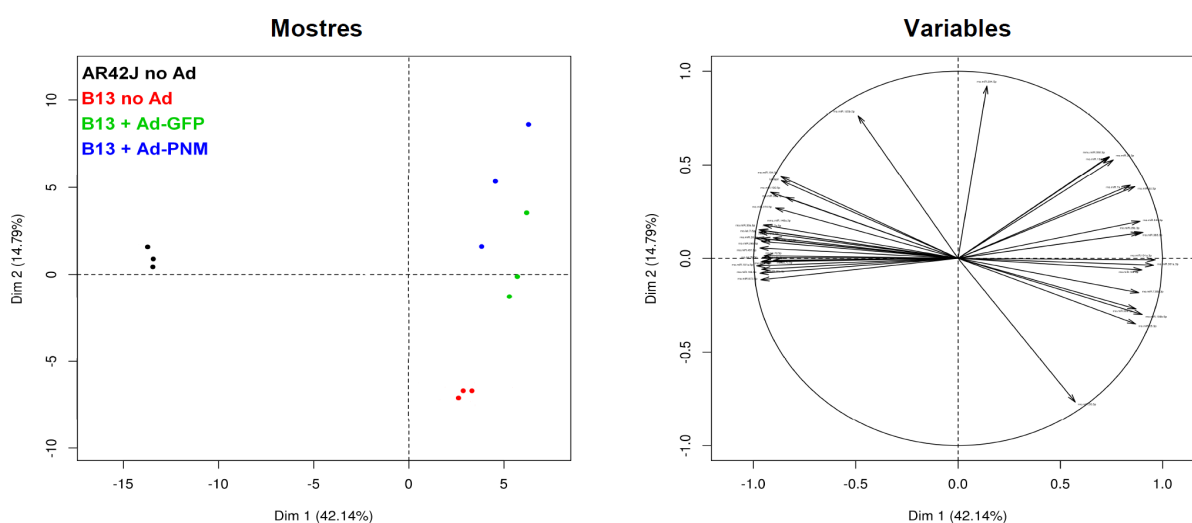


Figura 19. PCA de dues dimensions a partir de la projecció de totes les mostres. Primer pla d'una PCA a partir de dades reduïdes, centrades i classificades a partir d'una anàlisi d'agrupació jeràrquica. El gràfic de l'esquerra representa una projecció en l'espai individual (mostres), mentre que el gràfic de la dreta és una projecció en l'espai de les variables (microRNAs).

Les cèl·lules B13 transduïdes amb Ad-GFP i Ad-PNM no quedaven clarament separades quan es representaven tots els grups, probablement perquè les grans diferències entre les cèl·lules AR42J i B13 emmascaraven les diferències menys notables causades per l'expressió de PNM. Tot i això, quan es van representar aquests dos grups experimentals sols, es va poder observar que quedaven separats per la primera component (36.64% de la variabilitat), evidenciant així l'efecte de la sobreexpressió de PNM sobre el perfil de microRNAs (Figura 20).

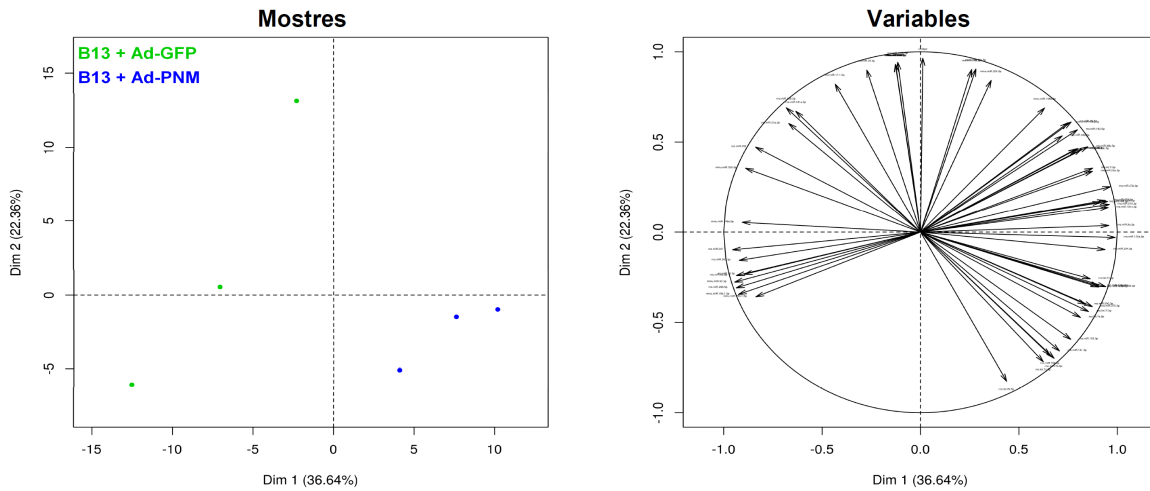


Figura 20. PCA de dues dimensions a partir de la projecció de cèl·lules B13 transduïdes amb Ad-GFP o Ad-PNM. Primer pla d'una PCA a partir de dades reduïdes, centrades i classificades a partir d'un anàlisi d'agrupació jeràrquica. El gràfic de l'esquerra representa una projecció en l'espai individual (mostres), mentre que el gràfic de la dreta és una projecció en l'espai de les variables (microRNAs).

Amb l'objectiu d'identificar i representar els microRNAs més diferencialment expressats, vam classificar aquells microRNAs que estaven com a mínim 2 vegades sobreexpressats en una condició respecte una altra i aquells que estaven detectats en una condició i no detectats en l'altra. D'aquesta manera, comparant les cèl·lules AR42J sense transduir respecte les cèl·lules B13 sense transduir, vam identificar 37 microRNAs sobreexpressats en les cèl·lules AR42J i 23 microRNAs sobreexpressats en les cèl·lules B13, dels quals 12 van ser detectats en AR42J i no detectats en B13, i 6 van ser detectats en B13 i no detectats en AR42J (Taula 1). Entre els microRNAs més diferencialment expressats, destaca l'expressió de tots els membres de la família miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141-3p, miR-141-5p i miR-429) en AR42J, mentre que cap d'aquests microRNAs va ser detectat en les cèl·lules B13.

AR42J vs B13		B13 vs AR42J	
microRNA	Ràtio	microRNA	Ràtio
miR-200c-3p	Detectat vs ND	miR-325-3p	Detectat vs ND
miR-141-3p	Detectat vs ND	miR-325-5p	Detectat vs ND
miR-141-5p	Detectat vs ND	miR-92b-3p	Detectat vs ND
miR-378a-3p	Detectat vs ND	miR-142-3p	Detectat vs ND
miR-205-5p	Detectat vs ND	miR-137-3p	Detectat vs ND
miR-149-5p	Detectat vs ND	miR-27a-5p	Detectat vs ND
miR-28-5p	Detectat vs ND	miR-330-3p	6,80
miR-200b-3p	Detectat vs ND	miR-101a-3p	3,75
miR-181b-5p	Detectat vs ND	miR-301a-5p	3,55
miR-200c-5p	Detectat vs ND	miR-328a-3p	3,52
miR-429	Detectat vs ND	miR-301a-3p	3,31
miR-200a-3p	Detectat vs ND	miR-455-3p	3,07
miR-483-3p	21,84	miR-31a-3p	2,81
miR-28-3p	8,48	miR-193-5p	2,57
miR-34a-5p	4,80	miR-2137	2,57
let-7i-5p	4,57	miR-1839-5p	2,55
miR-181a-5p	4,21	miR-106b-5p	2,53
let-7i-3p	4,17	miR-7a-5p	2,30
miR-195a-3p	3,18	miR-153-3p	2,25
miR-192-5p	3,09	miR-365-3p	2,19
miR-30a-5p	2,89	miR-25-3p	2,15
miR-194-5p	2,86	miR-29a-5p	2,09
miR-347	2,79	miR-31a-5p	2,07
miR-122-5p	2,69		
miR-374-5p	2,54		
miR-30a-3p	2,47		
let-7b-5p	2,42		
let-7g-5p	2,34		
miR-361-5p	2,32		
miR-204-5p	2,32		
miR-497-5p	2,22		
let-7d-5p	2,18		
miR-500-3p	2,13		
miR-125b-5p	2,08		
miR-181d-5p	2,06		
miR-26b-5p	2,03		
miR-421-3p	2,02		

Taula 1. Llista de microRNAs diferencialment expressats comparant les cèl·lules AR42J i les cèl·lules B13 sense transduir. ND: no detectat.

Pel que fa a l'efecte de la transducció adenoviral en les cèl·lules B13, aquest va resultar ser menys extensiu. Es van detectar 7 microRNAs sobreexpressats i 4 microRNAs amb l'expressió disminuïda en les B13 transduïdes amb Ad-GFP respecte a les B13 sense transduir (Taula 2).

B13+Ad-GFP vs B13		B13 vs B13+Ad-GFP	
microRNA	Ràtio	microRNA	Ràtio
miR-2137	9,10	miR-210-3p	8,71
miR-335-3p	3,23	miR-181a-5p	2,65
miR-148a-5p	2,74	miR-483-3p	2,36
miR-421-3p	2,50	miR-181c-5p	2,10
miR-350	2,48		
miR-204-5p	2,23		
miR-132-3p	2,17		

Taula 2. Llista de microRNAs diferencialment expressats comparant les cèl·lules B13 sense transduir i B13 transduïdes amb Ad-GFP. ND: no detectat.

Finalment, l'efecte de la sobreexpressió de PNM es va avaluar mitjançant la comparació B13+Ad-GFP vs B13+Ad-PNM. L'expressió de PNM va induir un augment en l'expressió de 6 microRNAs (miR-134-5p, miR-455-3p, miR-384-5p, miR-137-3p, miR-135a-5p i miR-22-5p) i una reducció en l'expressió de només 2 microRNAs (miR-335-3p i miR-148a-5p) (Taula 3).

"B13 Ad-PNM" vs "B13 Ad-GFP"		"B13 Ad-GFP" vs "B13 Ad-PNM"	
microRNA	Ratio	microRNA	Ratio
miR-134-5p	Detected vs ND	miR-335-3p	3,26
miR-455-3p	3,78	miR-148a-5p	2,24
miR-384-5p	3,17		
miR-137-3p	2,88		
miR-135a-5p	2,85		
miR-22-5p	2,09		

Taula 3. Llista de microRNAs diferencialment expressats comparant les cèl·lules B13 transduïdes amb Ad-GFP i B13 transduïdes amb Ad-PNM. ND: no detectat.

D'altra banda, es va detectar un augment de 1.35 vegades en l'expressió de miR-375, un microRNA clau per l'especificació i morfogènesi del pàncrees, en les cèl·lules B13 transduïdes amb Ad-PNM respecte a les cèl·lules B13 sense transduir.

En conjunt, aquests resultats suggerien que el perfil basal de microRNAs d'una línia cel·lular pot jugar un paper important per facilitar el procés de reprogramació cap a un fenotip de cèl·lula productora d'insulina, ja que línies cel·lulars amb perfils

d'expressió de microRNAs molt diferenciats presenten respostes molt diferents quan són transduïdes amb Ad-PNM. També s'han identificat 6 microRNAs que augmentaven la seva expressió a causa de l'expressió de PNM, suggerint que aquests microRNAs podrien jugar un paper clau en el procés de reprogramació cap a cèl·lula β .

3.2. Efectes biològics de la sobreexpressió de la família miR-200 en AR42J respecte B13

La Taula 1 mostra que tots els membres de la família miR-200 s'expressaven en la línia cel·lular AR42J, mentre que cap dels microRNAs d'aquesta família va ser detectat en el subclon B13. Hi ha evidències que demostren que aquesta família de microRNAs es troba enriquida en teixits epitelials diferenciats i no detectada en teixits com el mesoderm, el qual té característiques multipotents (Darnell et al., 2006; Yi et al., 2006; Choi et al., 2008). A més, membres de la família miR-200 tenen com a dianes els factors ZEB1 i ZEB2, i conseqüentment bloquegen la transició epitelial-mesenquimal (EMT), mantenint així l'estat epitelial de la cèl·lula, per tant, un estat més diferenciats (Figura 11 de l'apartat 4.2 de la Introducció) (Christoffersen et al., 2007; Hurteau et al., 2007; Gregory et al., 2008).

Així doncs, en aquesta part de l'estudi, es va voler comprovar l'efecte biològic de l'expressió de la família miR-200 en la línia cel·lular AR42J i l'absència d'expressió d'aquests microRNAs en el subclon B13. Amb aquest objectiu es va avaluar l'expressió de *Zeb1* i *Zeb2*, i de *E-cad*, marcador de cèl·lules epitelials que es troben més diferenciades, i que és diana dels factors ZEB.

Tal com s'observa a la Figura 21, *Zeb1* i *Zeb2* presentaven expressions significativament més elevades (2.78 i 57.48 vegades més, respectivament) en les cèl·lules B13 respecte a la línia parental AR42J, la qual presentava expressió de la família miR-200. També es va poder comprovar que *E-cad* s'expressava 52.66 vegades més en AR42J que en B13.

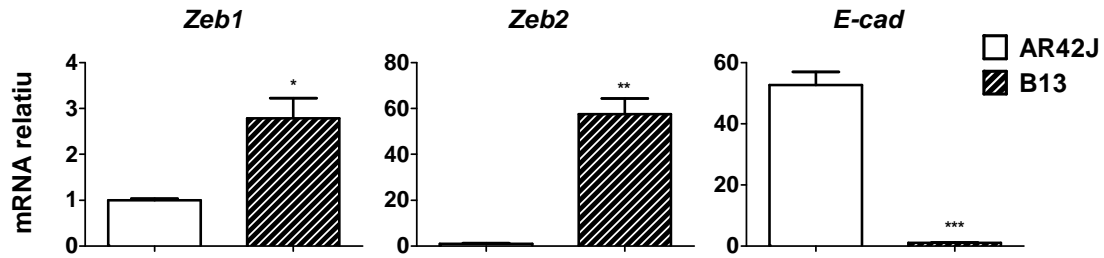


Figura 21. Expressió diferenciada de factors epitelials-mesenquimals en AR42J i B13. Expressió relativa dels gens *Zeb1*, *Zeb2* i *E-cad* en cèl·lules AR42J i B13 sense transduir al cap de 7 dies d'haver estat sembrades. Les barres representen la mitjana \pm SEM. $n=3$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, determinat per *t* de Student.

Aquests resultats concorden amb els resultats observats en l'estudi del perfil d'expressió de microRNAs, i ens indicarien que la línia parental AR42J té un fenotip més diferenciada que el seu subclon B13, el qual es troba en un estat més desdiferenciat i per tant presenta una major plasticitat per reprogramar.

V. DISCUSSIÓ

Actualment, la diabetis mellitus és una de les malalties més comunes arreu del món. Entre un 5 i un 10% dels pacients diabètics presenten diabetis tipus 1 (T1D), la qual és deguda a la deficiència d'insulina causada per la destrucció autoimmunitària de les cèl·lules β del pàncrees. Quan se'n presenten els símptomes, més del 70-80% de les cèl·lules β ja han estat destruïdes (Harrison, 2001). Les teràpies actuals per tractar aquesta malaltia es centren principalment en el reemplaçament d'insulina o en el transplantament d'illots o del pàncrees sencer. Tot i això, el reemplaçament d'insulina mitjançant injeccions diàries no aconsegueix un control de la glucèmia tan precís com el dels propis illots, i els pacients poden patir episodis d'hipo i hiperglucèmia que condueixen a complicacions a llarg termini com ara malalties del cor, fallada renal, ceguera, coma o fins i tot la mort (Nathan and DCCT/EDIC Research Group, 2014). Els transplantaments de pàncrees i d'illots han aportat beneficis terapèutics importants, però l'escassetat de donants cadavèrics en limita la seva aplicació a uns pocs pacients.

Per tal de superar aquestes limitacions, durant els últims anys s'han centrat esforços en la recerca de noves fonts de cèl·lules productores d'insulina mitjançant teràpies cel·lulars i genètiques. S'han realitzat diverses aproximacions per tal de diferenciar cèl·lules pluripotents (ESC o iPSC) cap a cèl·lules β , aconseguint en alguns casos un grau molt alt de semblança amb les cèl·lules β (D'Amour et al., 2006; Kroon et al., 2008; Pagliuca et al., 2014; Rezania et al., 2014). No obstant, els possibles riscos immunològics associats al transplantament al·logènic de cèl·lules β derivades de cèl·lules embrionàries, la possibilitat de generació de tumors derivada del transplantament de cèl·lules pluripotents, així com el lloc on s'han de transplantar aquestes (fetge o ronyó) són preocupacions importants per a un futur ús d'aquestes teràpies. La reprogramació directa de cèl·lules adultes diferenciades és una alternativa que presenta avantatges respecte a la diferenciació de cèl·lules pluripotents, ja que no requereix transplantament, reduint així el riscs immunològics i derivats de la cirurgia. D'entre els possibles teixits diferenciats candidats per a ser reprogramats a cèl·lules β , les cèl·lules acinars representen una de les opcions més atractives, ja que durant l'embriogènesi comparteixen un origen comú amb les cèl·lules β (Zorn and Wells, 2009), resideixen al mateix òrgan que les cèl·lules β , n'hi ha una gran quantitat al pàncrees i disposen de maquinària secretora. En aquest sentit, Zhou i col·laboradors van demostrar que la sobreexpressió de tres factors de transcripció específics de cèl·lula β , *Pdx1*, *Ngn3* i *MafA* (PNM), mitjançant vectors adenovirals de primera generació (FG-

Ad) era capaç de reprogramar les cèl·lules acinars cap a cèl·lules β i restaurar la normoglicèmia en ratolins diabètics immunodeprimits (Zhou et al., 2008). Posteriorment, es va descriure que la co-expressió de PNM en quantitats equimolars, gràcies a un vector adenoviral monocistrònic, millorava considerablement el procés de reprogramació, aconseguint-se un alt grau de semblança entre les cèl·lules reprogramades i les cèl·lules β reals (Li et al., 2014). No obstant, en aquest estudi també es van utilitzar ratolins immunodeprimits per evitar una resposta immune contra els vectors FG-Ad. De manera similar, també s'ha aconseguit reprogramar una línia cel·lular acinar de rata, AR42J-B13, cap a un fenotip β gràcies a la sobreexpressió de PNM de manera equimolar mitjançant un vector FG-Ad monocistrònic (Akinci et al., 2012).

Per tal d'aprofundir en els mecanismes de la reprogramació de cèl·lules acinars cap a un fenotip β , en la primera part d'aquesta tesi es va voler avaluar la capacitat de reprogramació d'una línia cel·lular acinar de ratolí, les cèl·lules 266-6, mitjançant la sobreexpressió de PNM amb vectors no virals. Es va observar que la co-transfecció dels tres factors activava el promotor exogen de la insulina de rata (RIP-1) en les cèl·lules 266-6, però no aconseguia reprogramar aquestes cèl·lules cap a un fenotip β funcional, ja que no s'activava l'expressió de cap dels marcadors endocrins analitzats. Amb aquests resultats, i davant de la possibilitat que la transducció adenoviral fos necessària pel procés de reprogramació, es va decidir transduir les cèl·lules 266-6 amb un vector FG-Ad codificant per PNM. Tot i detectar expressió dels tres factors de transcripció, la transducció adenoviral de PNM tampoc aconseguia canviar el fenotip de les cèl·lules acinars cap a un fenotip β .

Aquesta incapacitat de reprogramació de les cèl·lules acinars 266-6 podria ser deguda a factors epigenètics. Els mecanismes de control epigenètics tenen un paper fonamental en la regulació de la transcripció i són importants per a l'especificitat i la proliferació de les cèl·lules (Bernstein et al., 2007). Entre aquests mecanismes s'hi troben la metilació del DNA, la metilació de cues d'histones, l'estructura de la cromatina o els RNAs no codificants, com els microRNAs. Així, per exemple, en el genoma hi ha gens que es troben en zones més compactes i inaccessibles de la cromatina (zones transcripcionalment inactives), i gens que estan localitzats en zones menys compactes i més accessibles de la cromatina (transcripcionalment actives). En les

zones més relaxades, els factors de transcripció i la maquinària de transcripció poden accedir més fàcilment als seus gens diana i iniciar-ne la transcripció. Per tant, una possibilitat seria que en el cas de la línia cel·lular 266-6 els gens associats a un fenotip β es trobin en zones inaccessibles de la cromatina (eucromatina) i, com a conseqüència, la combinació dels tres factors de transcripció no seria capaç d'induir-ne la transcripció. Això explicaria el fet que l'expressió forçada de PNM no aconseguia activar l'expressió de gens endocrins com *Ins1*, però en canvi aconseguia una forta activació d'un promotor exogen de la insulina com RIP-1, el qual era accessible a la maquinària de transcripció i als factors transfectats al trobar-se en un estat episomal i no estar integrat dins del genoma de les cèl·lules. Una altra possibilitat seria que els gens específics de cèl·lula β estiguin reprimits en les cèl·lules 266-6 degut a la metilació dels seus promotors, la qual n'evitaria la transcripció. En canvi, el promotor exogen RIP-1, al ser produït en bacteris, no estaria igualment metilat, fet que en permetria l'activació per part dels factors de transcripció.

També es va poder observar que *Ngn3*, tot i no tenir com a diana el promotor del gen *Ins1*, contribuïa a augmentar l'activitat de RIP-1. Està descrit que *Ngn3* activa l'expressió de *NeuroD1*, el qual té com a diana el promotor de la insulina 1 (Huang et al., 2000). Per tant, *Ngn3* induiria l'activitat de RIP-1 indirectament. Així, aquests resultats semblen indicar que la reprogramació de cèl·lules acinars cap a cèl·lules β mitjançant PNM requereix unes condicions específiques de les cèl·lules que es volen reprogramar, ja que la reprogramació no es produeix en totes les condicions.

Així, amb l'objectiu d'aprofundir en els mecanismes de reprogramació de les cèl·lules acinars, en la segona part d'aquesta tesi es va estudiar l'habilitat de reprogramació de dues línies cel·lulars acinars de rata emparentades: AR42J i AR42J-B13 (B13). Tot i que un estudi previ va descriure la reprogramació de les cèl·lules B13 cap a un fenotip *β -like* mitjançant la transducció amb un vector FG-Ad codificant per PNM (Akinci et al., 2012), l'habilitat de reprogramació en les mateixes condicions de la seva línia parental, AR42J no havia estat analitzada.

Es va poder observar que les cèl·lules B13 reprogramaven més eficientment cap a un fenotip *β -like* que les cèl·lules AR42J, les quals no aconseguien activar l'expressió d'*Ins1* i presentaven una activació més feble de tots els altres marcadors de cèl·lula β

analitzats en comparació amb el seu subclon B13. Les cèl·lules B13 van ser aïllades el 1996 com un subclon de la línia cel·lular acinar de rata AR42J que presentava una major proporció de cèl·lules convertides en productores d'insulina després de ser tractades amb HGF i activina A (Mashima et al., 1996). Des del seu aïllament, les cèl·lules B13 han estat àmpliament utilitzades com a model experimental en l'estudi de la reprogramació de cèl·lules acinars cap a cèl·lules β o hepàtiques (Shen et al., 2000; Matsuoka et al., 2007; Nagaoka et al., 2008; Ogihara et al., 2008; Wallace et al., 2010; Akinci et al., 2012; Lima et al., 2012; Probert et al., 2014). Un estudi recent descriu que les cèl·lules B13 presenten expressió de quatre factors de transcripció típicament pluripotencials: *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* i *Klf4* (Fairhall et al., 2013). Per tant, sembla que el subclon B13 presenta certes característiques pluripotencials, fet que explicaria la major eficiència respecte a la seva línia parental per reprogramar cap a cèl·lula β .

Tot i que les cèl·lules B13 reprogramades posseïen moltes de les característiques de les cèl·lules β pancreàtiques adultes, com la producció d'insulina i l'expressió dels gens involucrats en el seu processament i dels sensors de la glucosa, la seva producció d'insulina no estava regulada pels nivells de glucosa al medi i la insulina no era secretada d'una manera eficaç. Tot i que en altres estudis sí que s'han detectat certs nivells d'insulina secretada al medi per cèl·lules B13 reprogramades, aquesta tampoc era secretada de manera regulada en resposta a la glucosa (Akinci et al., 2012; Lima et al., 2012). És possible que en el nostre cas també hi hagués una certa secreció d'insulina al medi de les cèl·lules reprogramades, però que els nivells d'aquesta estiguessin per sota del límit de detecció del *kit* de radioimmunoassaig (0.313 ng/ml).

Fins a l'actualitat, els estudis publicats indiquen que la utilització de vectors adenovirals és necessària per a la reprogramació de certs teixits cap a un fenotip endocrí. Així, Zaldumbide i col·laboradors van descriure com l'expressió de PNM mitjançant vectors lentivirals en cèl·lules embrionàries derivades de medul·la òssia (hMSC) no activava l'expressió de cap marcador endocrí, però quan s'afegia un FG-Ad irrellevant a la combinació s'activava l'expressió de glucagó (Zaldumbide et al., 2012). De manera similar, un altre estudi mostrava que la sobreexpressió de *Pdx1* o *Ngn3* al fetge mitjançant AAV no aconseguia reprogramar els hepatòcits de ratolins diabètics cap a cèl·lules productores d'insulina, mentre que si s'afegia un vector adenoviral a la combinació s'aconseguia retornar els animals a la normoglicèmia, gràcies a la

producció d'insulina per part de cèl·lules reprogramades (Wang et al., 2007). Pel que fa a la reprogramació de cèl·lules acinars *in vivo*, s'ha demostrat que l'administració intrapancreàtica de PNM mitjançant vectors FG-Ad en ratolins immunodeprimits produeix una reprogramació de cèl·lules acinars cap a un fenotip β i la formació d'estructures semblants als illots (Zhou et al., 2008; Li et al., 2014). No obstant, en estudis realitzats al nostre laboratori es va poder observar que la sobreexpressió de PNM específicament en cèl·lules acinars mitjançant vectors AAV no aconseguia els mateixos efectes de reprogramació (Morró et al., dades no publicades, tesi doctoral 2014). A més, ratolins transgènics que sobreexpressaven PNM de manera ubíqua a tot l'organisme, inclòs el pàncrees exocrí, no aconseguien convertir cèl·lules acinars cap a cèl·lules productores d'insulina (Chen et al., 2014). Per tant, sembla que els vectors adenovirals juguen un paper clau en la reprogramació de cèl·lules acinars cap a un fenotip β .

Wang i col·laboradors van plantejar la hipòtesi que els vectors adenovirals provoquen una elevada resposta immune, desencadenant l'expressió d'una gran cascada de molècules implicades en el procés, de les quals alguna d'elles podria estar involucrada directa o indirectament en el procés de reprogramació. Ratolins RAG-1 immunodeficients tractats amb STZ no recuperaven la normoglucèmia a l'utilitzar la combinació de *Pdx1* o *Ngn3* i un vector adenoviral, suggerint que una resposta immune era necessària per a la correcció de la glucèmia (Wang et al., 2007). Estudis de *microarrays* realitzats a ratolins tractats amb vectors AAV i Ad mostren una gran diferència en el perfil d'expressió de gens, molts dels quals implicats en la resposta immune, en comparació amb l'ús de AAV sols (Wang *et al.*, 2007). Tot i això, altres estudis on s'aconsegueix una reprogramació en ratolins immunodeprimits i en línies cel·lulars, com en el nostre cas, apunten cap a una altra direcció.

Per altra banda, la hipòtesi de Zaldumbide i col·laboradors seria que l'efecte dels adenovirus es deu a modificacions a nivell de cromatina. La co-administració dels vectors adenovirals i lentivirals amb el factor de transcripció *Pdx1* era necessària per a la producció de glucagó a les cèl·lules hMSC (Zaldumbide *et al.*, 2012). En aquests cas els vectors adenovirals induïen la formació d'eucromatina i interfereixen directa o indirectament amb el complex Histona deacetilases (HDACs)/*Pdx1* (Zaldumbide *et al.*, 2012), de manera que els gens que estan normalment en regions d'heterocromatina

(cromatina compactada i més inaccessible) a la cèl·lula diferenciada, gràcies a l'ús d'un vector adenoviral podrien ser accessibles.

Els nostres resultats demostren per primer cop que la transducció adenoviral, independentment dels transgens codificants pel vectors, regula negativament l'expressió de marcadors acinars, fet que suggereix que els vectors adenovirals produïrien un efecte de desdiferenciació sobre el fenotip exocrí de la cèl·lula, facilitant-ne així la reprogramació cap a un altre tipus cel·lular. És possible que aquest fenomen estigui relacionat amb l'efecte de modificació de la cromatina produït pels vectors adenovirals descrit per Zaldumbide i col·laboradors (Zaldumbide *et al.*, 2012), ja que les cèl·lules pluripotents tendeixen a tenir una estructura més relaxada de la cromatina que les cèl·lules diferenciades (Gifford *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2013). Per tant, de cara al futur seria interessant estudiar els canvis a nivell de cromatina causats per la transducció adenoviral en les cèl·lules B13, per tal de comprovar si l'efecte de desdiferenciació observat és degut a un canvi en la configuració de la cromatina. També seria interessant estudiar si l'expressió forçada de PNM mitjançant vectors no adenovirals, com la transfecció de plasmidis o la transducció amb AAVs, és capaç de produir algun efecte de reprogramació sobre la línia cel·lular B13. En el nostre laboratori hem intentat utilitzar vectors alternatius als FG-Ad per aportar els gens PNM a les cèl·lules B13. En particular, hem utilitzat la transfecció de plasmidis i la transducció mitjançant vectors AAV de diferents serotips. Malauradament, les eficiències de transducció i transfecció eren molt baixes i no permetien expressar PNM a nivells acceptables per dur a terme aquests experiments.

Degut a l'alta immunogenicitat dels vectors FG-Ad, les cèl·lules transduïdes amb els FG-Ad són majoritàriament destruïdes pel sistema immune i, conseqüentment, l'expressió del transgèn és transitòria. De fet, l'utilització d'elevades dosis de vectors adenovirals poden causar greus complicacions secundàries en humans i fins i tot causar la mort (Raper *et al.*, 2003; Zaiss *et al.*, 2009; Sheridan, 2011). A més, s'ha descrit que les cèl·lules β induïdes per PNM adquireixen funcionalitat amb el temps i necessiten fins a set mesos per ser completament funcionals (Li *et al.*, 2014). Per tant, des d'un punt de vista de medicina translacional i una aplicació en humans, és necessària una millor comprensió dels mecanismes implicats en la reprogramació de cèl·lular per tal de

poder millorar l'efectivitat d'aquestes teràpies i evitar l'ús de vectors adenovirals de primera generació.

Els microRNAs són petites molècules d'RNA no codificant d'aproximadament 22 nucleòtids que regulen l'expressió gènica a nivell post-transcripcional. S'ha descrit que els microRNAs tenen un paper clau en el desenvolupament pancreàtic i l'especificació cap als diferents llinatges endocrins. Per exemple, la deleció específica de *Dicer1*, un enzim essencial per a la biogènesi dels microRNAs, en cèl·lules endocrines progenitores resulta en defectes en tots els llinatges endocrins (Lynn et al., 2007; Kanji et al., 2013). A més, els microRNAs són eines de gran interès per a la millora i desenvolupament de nous processos de reprogramació. S'ha aconseguit reprogramar fibroblasts a iPSCs mitjançant la sobreexpressió de només un clúster de microRNAs (miR302/367) (Anokye-Danso et al., 2011), i la combinació de miR-1, miR-133, miR-208 i miR-499 és capaç de reprogramar fibroblasts cap a cardiomiòcits (Jayawardena et al., 2012). Pel que fa a la reprogramació cap a cèl·lules β , la co-transfecció de miR-302 i PNM facilitava la reprogramació d'hepatòcits humans cap a cèl·lules pancreàtiques progenitores (Lu et al., 2014), i l'expressió de miR-375 mitjançant vectors lentivirals en iPSCs humanes promovia la diferenciació d'aquestes cèl·lules cap a clústers productors d'insulina similars als illots (Lahmy et al., 2014).

Per tant, l'objectiu de la tercera part d'aquesta tesi va ser identificar microRNAs involucrats en el procés de reprogramació de cèl·lules acinars cap a cèl·lules β . Mitjançant la comparació del perfil d'expressió de microRNAs (miRNoma) de les línies cel·lulars AR42J i B13 es van voler identificar microRNAs que puguin jugar un paper important a l'hora de facilitar el procés de reprogramació. Un descobriment interessant va ser el fet que la línia AR42J presentava expressió de tots els membres de la família miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141-3p, miR-141-5p i miR-429), mentre cap d'aquests microRNAs es trobava expressat en el seu subclon, B13. Hi ha evidències que demostren que l'expressió de la família miR-200 es troba enriquida en cèl·lules terminalment diferenciades, tals com els teixits epitelials, i en canvi és indetectable en cèl·lules pluripotents, com les cèl·lules mesenquimals (Darnell et al., 2006; Yi et al., 2006; Choi et al., 2008). A més, la família miR-200 té com a dianes els factors ZEB1 i ZEB2, inhibint-ne la transcripció, bloquejant la transició epitelial-mesenquimal (EMT) i mantenint així l'estat epitelial de la cèl·lula (Christoffersen et al.,

2007; Hurteau et al., 2007; Gregory et al., 2008). L'EMT és un procés mitjançant el qual les cèl·lules epitelials perden la seva polaritat i adhesió cel·lular, i guanyen propietats migratòries i invasives per convertir-se en cèl·lules mesenquimals. Les cèl·lules mesenquimals són cèl·lules multipotents que poden diferenciar cap a diversos tipus cel·lulars. Un dels canvis bioquímics més comuns que marquen l'EMT és la pèrdua d'expressió de E-cadherina (*E-cad*) (Medici et al., 2008; Kalluri and Weinberg, 2009). En el nostre cas, l'absència de la família miR-200 en la línia cel·lular B13 correlacionava amb l'expressió 52 cops més baixa de *E-cad* en relació amb la seva línia parental, AR42J, la qual expressava la família miR-200. De manera similar, els nivells d'expressió dels factors ZEB també concordaven amb la presència/absència de la família miR-200, ja que *Zeb1* i *Zeb2* s'expressaven >2.7 i >57 vegades més, respectivament, en les cèl·lules B13 respecte les cèl·lules AR42J.

Paral·lelament, també es va detectar un major nombre de microRNAs sobreexpressats en la línia AR42J respecte a la línia B13. Durant la diferenciació cel·lular, hi ha una tendència a augmentar la complexitat de l'expressió de microRNAs, que va acompanyada d'una reducció de l'expressió de gens codificants per proteïna (Strauss et al., 2006). Per tant, una cèl·lula completament diferenciada expressa més microRNAs que una cèl·lula pluripotent o multipotent. A més, s'ha descrit que les cèl·lules B13 presenten expressió de *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* i *Sox2* (Fairhall et al., 2013), factors de transcripció els quals són capaços de reprogramar cèl·lules adultes cap a iPSCs (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007). En conjunt, tots aquests resultats semblen indicar que la línia cel·lular B13 es troba en un estat menys diferenciat que la seva línia parental, AR42J, i que per tant presenta una major plasticitat cel·lular.

L'estudi dels efectes de la transducció adenoviral sobre el miRNoma de les cèl·lules B13 va mostrar que la transducció amb un vector adenoviral control augmentava l'expressió de 7 microRNAs i disminuïa l'expressió de 4 microRNAs. D'entre els 7 microRNAs sobreexpressats, s'ha descrit que almenys 4 d'ells estaven sobreexpressats en cèl·lules β respecte a cèl·lules α (Klein et al., 2013), suggerint per tant que la transducció adenoviral ajuda en el procés de reprogramació cap a un llinatge de cèl·lula β . De cara al futur, seria interessant estudiar si l'expressió forçada d'algun d'aquests microRNAs mitjançant vectors que no siguin FG-Ad és capaç d'induir

l'efecte de desdiferenciació produït per la transducció adenoviral. En el nostre laboratori s'ha demostrat que és possible aconseguir una transducció eficient i persistent del pàncrees de ratolins immunocompetents utilitzant vectors AAV i Hd-Ad (Jimenez et al., 2011; Morro et al., 2014), els quals són menys tòxics i immunogènics, ja que les seqüències d'aquests vectors, a diferència dels vectors FG-Ad, no contenen cap gen codificant per proteïnes virals (Kay, 2011).

Així, una possible aplicació dels nostres resultats seria l'expressió d'alguns d'aquests microRNAs mitjançant vectors AAV o vectors Hd-Ad, per tal d'evitar l'ús de vectors FG-Ad. D'aquesta manera podríem co-expressar PNM i els microRNAs d'interès (en aquest cas els activats per la transducció adenoviral) utilitzant aquests vectors *in vivo*, permetent així l'aplicació de la teràpia en animals immunocompetents i augmentant la seguretat d'aquest tractament en perspectives d'una aplicació en pacients diabètics.

Pel que fa a l'efecte de la sobreexpressió de PNM en el miRNoma de les cèl·lules B13, es va detectar un augment de l'expressió de 6 microRNAs i una disminució en 2 microRNAs. D'entre els sobreexpressats, miR-134 i miR-22 s'han trobat també sobreexpressats en cèl·lules β respecte a cèl·lules α (Klein et al., 2013). A més, està descrit que miR-134 també reprimeix components que controlen la pluripotencialitat, ja que té com a dianes *Nanog*, *Oct4* i *Sox2* (Tay et al., 2008). Fins a l'actualitat, no coneixem altres estudis que mostrin una relació entre funcionalitat o desenvolupament en cèl·lula β i els altres microRNAs que s'han detectat sobreexpressats en aquest estudi (miR-455-3p, miR-384-5p, miR-137-3p i miR-135a-5p), així que aquests microRNAs podrien obrir noves vies d'investigació en aquest camp. Donat el petit nombre de microRNAs associats a l'expressió de PNM, és possible que aquests microRNAs juguin un paper important en el procés de reprogramació. Per tant, és necessari aprofundir en la funcionalitat d'aquests microRNAs i identificar els seus gens dianes. De la mateixa manera que els microRNAs sobreexpressats per la transducció adenoviral, seria interessant sobreexpressar aquests microRNAs en cèl·lules acinars de forma individual, en combinació o conjuntament amb PNM, ja que podrien ajudar a fer més efectiva la reprogramació cap a cèl·lules productores d'insulina madures.

En resum, en aquesta tesi s'ha estudiat el procés de reprogramació de cèl·lules acinars cap a un fenotip β mitjançant l'expressió de tres factors de transcripció específicament endocrins: *Pdx1*, *Ngn3* i *MafA*. S'ha demostrat que la transducció adenoviral disminuïa l'expressió de marcadors exocrins en la línia cel·lular B13, suggerint que el mecanisme pel qual els vectors adenovirals afavoreixen el procés de reprogramació és la desdiferenciació del fenotip acinar de les cèl·lules. Mitjançant l'estudi del perfil d'expressió de microRNAs, hem descrit que les línies cel·lulars AR42J i el seu subclon B13 tenien perfils d'expressió completament diferenciats, fet que podria influir en les diferents eficiències de reprogramació observades i que s'hauria de tenir en compte per a futurs estudis amb aquestes línies cel·lulars, especificant clarament quina de les dues línies cel·lulars s'utilitza. A més, aquest estudi ha proporcionat una llista de microRNAs que es trobaven activats o bé per la transducció adenoviral o bé per l'expressió de PNM, sent aquests microRNAs potencials candidats per a ser analitzats en protocols de reprogramació cap a cèl·lules productores d'insulina.

La reprogramació de cèl·lules acinars cap a cèl·lules β *in vivo* ofereix noves possibilitats de teràpia pels pacients diabètics i presenta nombroses avantatges respecte les teràpies actuals. No obstant, els mecanismes involucrats en el procés de reprogramació no són totalment coneguts. Els nostres estudis aporten informació sobre el paper dels vectors adenovirals i dels microRNAs en aquest procés, i obren la porta a estudiar en un futur el paper concret d'aquests microRNAs, així com analitzar si combinacions d'alguns microRNAs i factors de transcripció poden millorar el procés de reprogramació de cèl·lules acinars cap a cèl·lules β pel tractament de la diabetis mellitus.

VI. CONCLUSIONS

1. La transfecció dels factors de transcripció *Pdx1*, *Ngn3* i *MafA* (PNM) en la línia cel·lular acinar de ratolí 266-6 indueix l'activació del promotor exogen de la insulina de rata 1 (RIP-1), però no és capaç de reprogramar aquestes cèl·lules cap a un fenotip de cèl·lula β , ja que no indueix l'expressió dels gens endògens de la insulina de ratolí ni d'altres marcadors de cèl·lula β .
2. L'expressió de PNM mitjançant un vector adenoviral (Ad-PNM) tampoc indueix la reprogramació de la línia cel·lular 266-6 cap a un fenotip de cèl·lula β .
3. Les línies cel·lulars acinars de rata AR42J i AR42J-B13 transduïdes amb Ad-PNM reprogramen cap a un fenotip semblant al de les cèl·lules β . No obstant, el subclon B13 mostra una major eficiència de reprogramació en comparació a la seva línia parental AR42J, ja que presentava una major expressió de tots els marcadors de cèl·lula β analitzats.
4. Les cèl·lules B13 reprogramades presentaven expressió de gens codificants per proteïnes processadores de la insulina (*Pcsk1*, *Pcsk2* i *Cpe*) i els sensors de la glucosa *Glut2* i *Gck*, i es va detectar insulina mitjançant immunocitoquímica i radioimmunoassaig. Tot i això, aquestes cèl·lules no secretaven insulina al medi a nivells detectables. Per tant, tot i que aquestes cèl·lules presentaven moltes de les característiques de les cèl·lules β , no eren completament funcionals.
5. La transducció adenoviral regula negativament l'expressió de gens exocrins en les cèl·lules B13, suggerint que aquests vectors produeixen un efecte de desdiferenciació sobre el fenotip acinar de les cèl·lules B13, facilitant-ne així la seva reprogramació.
6. L'estudi del perfil d'expressió de microRNAs de les cèl·lules AR42J i B13 ha mostrat que aquestes dues línies cel·lulars presentaven perfils d'expressió completament diferenciats, identificant-se fins a 60 microRNAs diferentment expressats.
7. Les cèl·lules B13, a diferència de la línia parental AR42J, no expressen cap dels membres de la família miR-200, els quals són inhibidors de la transició epitelial-

mesenquimal (EMT), essent aquest un procés associat a la desdiferenciació cel·lular.

- 8.** S'han identificat 11 microRNAs l'expressió dels quals està associada a la transducció adenoviral en les cèl·lules B13.
- 9.** S'han identificat 8 microRNAs amb un perfil d'expressió associat a la sobreexpressió de PNM en cèl·lules B13.
- 10.** Els microRNAs identificats podrien ajudar a millorar l'eficiència de reprogramació cap a cèl·lules β pel tractament de la diabetis mellitus.

VII. MATERIALS I MÈTODES

1. MATERIALS

1.1. Soques bacterianes

La soca *E. coli XL2Bue* (Stratagene-Agilent tecnologies, Santa Clara, CA, EEUU) es va utilitzar per amplificar els diferents constructes plasmídics utilitzats en aquest treball. Els plasmidis contenen els gens de resistència a l'ampicil·lina o a la kanamicina per a la seva selecció, per tant, els cultius bacterians es van fer créixer en medi de cultiu LB (Miller's LB Broth, Conda, Madrid, Espanya) suplementat amb 50 µg/ml de l'antibiòtic corresponent. Quan les condicions experimentals van requerir de medi de cultiu sòlid, es va afegir un 2 % d'agar al medi.

1.2. Anticossos

L'anticòs primari utilitzat per a la detecció d'insulina per immunohistoquímica va ser el *Guinea Pig Anti-insulin* (I-8510, Sigma, St. Louis, MO, EEUU). Com a anticòs secundari es va utilitzar el següent anticòs: *Alexa Fluor[®] 568 Goat anti-Guinea Pig IgG* (A-11075, Molecular Probes, San Diego, CA, EEUU), de fluorescència vermella.

1.3. Plasmidis

Els plasmidis utilitzats en aquest treball es resumeixen en la següent taula:

Nom	Promotor	Gen d'interès	WPRE	PolyA
pAAV-RIP1-seAP	RIP-1	seAP	sí	SV40
pGG2-Elastasa-Pdx1	Elastasa (-205/+8)	Pdx1	no	SV40
pGG2-Elastasa-Ngn3	Elastasa (-205/+8)	Ngn3	no	SV40
pGG2-Elastasa-MafA	Elastasa (-205/+8)	MafA	no	SV40
pGG2-Elastasa-null	Elastasa (-205/+8)	-	no	SV40

El promotor RIP-1 (*Rat Insulin Promoter 1*) s'expressa exclusivament a les cèl·lules β del pàncrees. Per altra banda, el promotor Elastasa (-205/+8) és un promotor específic de les cèl·lules acinars i la seva expressió és mínima en les cèl·lules β (Kruse et al., 1993, 1995).

L'element WPRE (*woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element*) és una seqüència de l'Hepadnavirus molt utilitzada com a regulador de l'expressió a nivell *cis* de diferents tipus de plasmidis o de gens en vectors virals. Quan es troba a l'extrem 3'UTR del casset d'expressió, el WPRE augmenta l'expressió del transgen incrementant els nivells de mRNA tant al citoplasma com al nucli (Zanta-Boussif et al., 2009).

1.4. Reactius

Els reactius de biologia molecular es van obtenir de les cases comercials Roche (Roche Diagnostics Corp., IN, EEUU), Invitrogen Corporation (actualment Life Technologies) (San Diego, CA, EEUU), Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EEUU), Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, EEUU), Sigma (St. Louis, MO, EEUU), Molecular Probes (actualment Life Technologies), Promega Corporation (Madison, WI, EEUU), BASF (Barcelona, Espanya), Qiagen (Hilden, Alemanya), QBIOgen (actualment MP Biomedicals) (Irvine, CA, EEUU), Exiqon (Woburn, MA, EEUU), New England Biolabs (Ipswich, MA, EEUU), Millipore (Billerica, MA, EEUU) i Fermentas (St. Leon-Rot, Alemanya). Els medis de cultiu i els antibiòtics es van obtenir de PAA (Pasching, Austria) i el sèrum (FBS) de Gibco (Carlsbad, CA, EUU).

2. MÈTODES

2.1. Tècniques bàsiques de DNA

2.1.1. Preparació del DNA plasmídic

Per a l'obtenció de petites quantitats de DNA plasmídic (3-4 µg) es van realitzar minipreparacions (*minipreps*) mitjançant un protocol basat en la lisi alcalina prèviament descrit (Birnboim and Doly, 1979). Breument, a partir de 1-2 ml de medi de cultiu (LB amb l'antibiòtic corresponent) es degrada la paret bacteriana per acció de l'enzim lisozim, seguida d'una lisi alcalina i de la precipitació selectiva del DNA genòmic i proteïnes desnaturalitzants amb una solució d'acetat de potassi a pH àcid. L'RNA bacterià és degradat per l'addició de l'enzim RNasa A.

D'altra banda, l'obtenció de grans quantitats de DNA es va realitzar mitjançant maxipreparacions (*maxipreps*), a partir de les quals s'obté com a màxim 1 mg de plasmidi de DNA, o megapreparacions (*megapreps*) per a obtenir un màxim de 2.5 mg de plasmidi de DNA, a partir de 250 o 500 ml de medi de cultiu, respectivament. El mètode està basat igualment en la lisi alcalina, però la purificació de DNA, en aquest cas, es va realitzar mitjançant columnes d'adsorció *PureYield™ Plasmid MaxiPrep System* (Promega Corporation) per les *maxipreps*, o *EndoFree Plasmid Mega Kit* (Qiagen) per a les *megapreps*. La puresa i concentració de DNA obtinguda es va determinar mitjançant l'ús d'un espectrofotòmetre (*Nanodrop 1000 spectrophotometer*, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, EEUU).

2.1.2. Digestió del DNA amb enzims de restricció

Cada enzim de restricció requereix unes condicions de reacció específiques de pH, força iònica i temperatura. Per tant, en cada cas específic es van seguir les instruccions dels proveïdors (New England Biolabs, Roche, Promega o Fermentas). En general, el DNA va ser digerit amb 0.5 unitats d'enzim per µg de DNA en el tampó subministrat

pel fabricant durant 1-2 hores a la temperatura òptima de cada enzim. Quan el DNA havia de ser digerit amb dos o més enzims de restricció, les digestions es van dur a terme conjuntament sempre que les condicions del tampó i temperatura fossin compatibles. Si els enzims tenien diferents requeriments, o bé si s'havia de generar un extrem rom, després de la primera digestió el DNA va ser purificat de les sals i de l'enzim mitjançant el *GeneClean*[®] kit (QBIogene, Irvine, CA, EEUU) segons les instruccions del fabricant. Posteriorment, el DNA era eluït en 30 µl amb el tampó d'elució administrat pel fabricant per a tot seguit realitzar la segona digestió o generació d'extrems roms.

2.1.3. Purificació i resolució del DNA

Per a la separació i purificació dels fragments de DNA es van realitzar electroforesis en gels d'agarosa a l'1%. La mida relativa dels fragments de DNA va ser determinada per tinció del gel amb concentracions baixes de bromur d'etidi (BrEt), un agent intercalant de la doble cadena de DNA que permet la visualització dels fragments de DNA sota llum ultraviolada de baixa longitud d'ona (320 nm). La visualització es va realitzar mitjançant una càmera integrada en un transil·luminador (*Syngene*, Synoptics Ltd.). Com a marcadors de pes molecular es van utilitzar els marcadors comercials *DNA ladder 1 kb* i *DNA ladder 100 bp* (Invitrogen).

Els gels d'agarosa es van preparar dissolvent 2 g d'agarosa en 200 ml de tampó d'electroforesi 1x TAE (Tris-acetat pH 8.3, 40 mM i EDTA 1mM) amb 0.5 µg/ml de Bromur d'Etidi. Les mostres es van carregar al gel amb 1x tampó de càrrega (Fermentas) i van córrer amb el tampó d'electroforesi 1x TAE a 80-120 V.

L'extracció i purificació dels fragments de DNA d'interès per a clonatge es va realitzar utilitzant el kit comercial *GeneJET*[™] *Gel Extraction kit* (Fermentas). La quantificació dels fragments de DNA purificats es va dur a terme en un espectrofotòmetre (*Nanodrop 1000 spectrophotometer*, Thermo Fisher Scientific Inc.).

2.1.4. Desfosforilació de fragments de DNA

El DNA plasmídic, un cop digerit, pot tornar a relligar en una reacció de lligació. Aquest procés es pot evitar mitjançant l'eliminació dels residus fosfats de l'extrem 5' del vector. Per a la desfosforilació es va utilitzar 1 unitat de fosfatasa alcalina per µg de DNA (Shrimp Alkaline Phosphatase, Promega) en el tampó comercial 1x. La reacció de desfosforilació es va realitzar durant 30 min a 37 °C. Posteriorment, es va inactivar l'enzim a 65 °C durant 15 min per evitar qualsevol interacció de la fosfatasa en la reacció de la lligació.

2.1.5. Generació d'extrems roms de fragments de DNA

En els casos on l'acció de l'enzim de restricció va deixar els extrems cohesius i es necessitaven extrems roms pel clonatge, el fragment digerit va ser tractat amb l'enzim *Klenow DNA polimerasa I* (New England Biolabs). En presència de la doble cadena de DNA i deoxinucleòsids trifosfats (dNTPs), la DNA polimerasa reomple l'extrem generat per l'enzim de restricció protuberant (activitat polimerasa 5'→3' o 3'→5'). En absència de dNTPs l'enzim elimina l'extrem 3' protuberant mitjançant la seva acció exonucleasa (3'→5') i, en canvi, no té activitat exonucleasa 5'→3'. La reacció es va dur a terme seguint les instruccions de la casa comercial. Després de la reacció el DNA era purificat de les sals i de l'enzim a través del *GeneClean*[®] kit (QBIogene) segons les instruccions del fabricant.

2.1.6. Transformació de cèl·lules competents

El plasmidi de DNA pot ser introduït en cèl·lules bacterianes competents a través de la transformació. En aquest estudi, l'electroporació va ser el mètode escollit per a dur a terme la transformació de les cèl·lules *E. coli* de la soca XL2-blue (Stratagene-Agilent technologies). 40 µl de cèl·lules electrocompetents (2×10^{10} cèl·lules/ml) van ser descongelades en gel fins a la seva utilització. 1 µl (aproximadament 10 ng) de la reacció de lligació del DNA o de DNA control va ser afegit directament a les cèl·lules

competents. Després de la incubació en gel durant 5 min, les cèl·lules van ser electroporades a 2500 V amb un electroporador (Bio-Rad). Posteriorment, es van diluir en 200 µl de LB, es van sembrar en plaques amb LB amb l'antibiòtic corresponent i van ser incubades a 37 °C o/n. Al matí següent es va extreure el DNA de les colònies recombinants obtingudes mitjançant minipreps o maxipreps. Mitjançant l'ús d'enzims de restricció es va analitzar la presència de les molècules híbrides de DNA.

2.1.7. Construcció de molècules híbrides de DNA: lligació

Per a les reaccions de lligació, es va utilitzar *T4 DNA ligase* (New England Biolabs) segons les instruccions de la casa comercial. Breument, els fragments de DNA d'interès es van barrejar a diferents ràtios molars vector/insert (1:2 i 1:5) amb l'enzim *T4 DNA ligase* i el tampó corresponent. Les reaccions es van incubar o/n a T ambient. Els productes resultants de la lligació van ser transformats en cèl·lules competents *E. coli* de la soca XL2-blue.

2.1.8. Construcció de plasmidis

Les estratègies de clonatge utilitzades per a la generació dels diferents plasmidis utilitzats en aquest estudi es resumeixen en la taula següent:

Plasmidi	Estratègia de clonatge	
pAAV-RIP1-seAP	vector	pAAV-RIP1-VEGF-WPRE (CBATEG) digerit amb HindII i NotI
	insert	pGG2-elastasa-seAP (CBATEG) digerit amb HindII i MfeI (fet rom)
pGG2-Elastasa-Pdx1	vector	pGG2-Elastasa-GFP (CBATEG) digerit amb EagI
	insert	pCR-Blunt-TOPO-Pdx1 (OpenBiosystems) digerit amb EagI
pGG2-Elastasa-Ngn3	vector	pGG2-Elastasa-GFP (CBATEG) digerit amb MluI (fet rom) i HindIII
	insert	pCR-Blunt-TOPO-Ngn3 (OpenBiosystems) digerit amb EcoRV i HindIII
pGG2-Elastasa-MafA	vector	pGG2-Elastasa-GFP (CBATEG) digerit amb EagI
	insert	pCMV6-Kan/Neo-MafA (OriGene Technologies) digerit amb EagI
pGG2-Elastasa-null	vector	pGG2-Elastasa-GFP (CBATEG) digerit amb EagI
	insert	Cap (eliminació del gen GFP)

2.2. Línies cel·lulars eucariotes en cultiu

2.2.1. Cèl·lules 266-6

La línia cel·lular acinar de ratolí 266-6 es va obtenir de l'ATCC (*American Type Culture Collection*) (CRL-2151). Es tracta d'una línia cel·lular derivada d'un carcinoma pancreàtic acinar extirpat d'un ratolí transgènic que expressava l'antigen del virus 40 T selectivament al pàncrees exocrí (Ornitz et al., 1985). Van ser mantingudes en flascons de 75 cm² amb medi de cultiu DMEM 1 g/L de D-glucosa (Gibco), subministrat amb L-glutamina i piruvat, i complementat amb FBS (*Fetal Bovine Serum*) (Gibco) al 10% i 1x Penicilina/Estreptomicina. Els flascons i plaques on es feien créixer les cèl·lules es tractaven prèviament amb gelatina de pell de porc al 0.1% durant almenys 15 minuts a 37 °C per tal d'evitar l'aglutinació de les cèl·lules. Les cèl·lules es tripsinitzaven i sembraven en un altre flascó a una dilució 1:10 o 1:15 dos cops per setmana, quan la confluència estava al voltant del 70%. Les cèl·lules van ser incubades a 37 °C i 8.5% de CO₂.

2.2.2. Cèl·lules AR42J

La línia cel·lular acinar de rata AR42J es va obtenir de l'ATCC (CRL-1492). És una línia cel·lular derivada originalment d'un carcinoma pancreàtic acinar induït (Longnecker et al., 1979). Van ser mantingudes en flascons de 75 cm² amb medi de cultiu DMEM 1 g/L de D-glucosa (Gibco), subministrat amb L-glutamina i piruvat, i complementat amb FBS (Gibco) al 10% i 1x Penicilina/Estreptomicina. Les cèl·lules es tripsinitzaven i sembraven en un altre flascó a una dilució 1:4 o 1:5 dos cops per setmana, quan la confluència estava al voltant del 70%. Les cèl·lules van ser incubades a 37 °C i 8.5% de CO₂.

2.2.3. Cèl·lules AR42J-B13

El subclon B13 de la línia cel·lular AR42J es va obtenir gràcies a la col·laboració amb el doctor Matthew Wright (Newcastle University), ja que no és una línia cel·lular disponible a l'ATCC. Van ser mantingudes en flascons de 75 cm² amb medi de cultiu DMEM 1 g/L de D-glucosa (Gibco), subministrat amb L-glutamina i piruvat, i complementat amb FBS (Gibco) al 10% i 1x Penicilina/Estreptomicina. Les cèl·lules es tripsinitzaven i sembraven en un altre flascó a una dilució 1:10 o 1:15 dos cops per setmana, quan la confluència estava al voltant del 70%. Les cèl·lules van ser incubades a 37 °C i 8.5% de CO₂.

2.2.4. Cèl·lules HEK-293

Les cèl·lules HEK-293 ó 293 (CRL-1573, ATCC) són cèl·lules embrionàries de ronyó humà que presenten el gen adenoviral E1 de l'Ad5 integrat de forma estable en el genoma cel·lular. Aquestes cèl·lules van ser utilitzades per a l'amplificació dels vectors adenovirals. Es van mantenir en medi de cultiu DMEM (PAA) amb 2 mM de Glutamina, suplementat amb FBS al 10% (inactivat per calor) en un incubador ajustat al 8.5% de CO₂ i a 37°C. Quan tenien una confluència del 70%, les cèl·lules van ser tripsinitzades i plaquejades a diferents dilucions.

2.3. Transfecció de cèl·lules 266-6 amb DNA plasmídic

Per dur a terme els experiments de transfecció de diferents combinacions de plasmidis codificants per factors de transcripció juntament amb el plasmidi pGG2-RIP-SeAP, es va utilitzar el kit de transfecció X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche), el qual és un reactiu multi-component que forma un complex amb el DNA per tal que aquest pugui ser transportat a dins de cèl·lules d'animals o d'insectes. Les transfeccions es van realitzar en plaques de 12 pous sembrades el dia abans a una dilució 1:2 a partir d'un flascó amb una confluència del 80%. Abans de la transfecció es va substituir el medi per 1 ml de medi DMEM sense FBS. Per cada mostra es van utilitzar 3 µl d'X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent, que es van afegir a 100

µl de medi Opti-MEM[®] (PAA) que contenen 2 µg de DNA plasmídic total. Es va incubar la mix a T ambient durant 25 minuts i es van administrar els 103 µl de la barreja a cada pou. Al cap de 5 hores post-transfecció, es va canviar el medi per 1 ml de medi complet (especificat a l'apartat 2.2 de Materials i Mètodes).

2.4. Producció, purificació i quantificació dels vectors adenovirals

En aquest estudi, tots els vectors adenovirals utilitzats van ser de primera generació. El vector adenoviral Ad5-CAG-eGFP-PNM (Ad-PNM) va ser cedit del doctor Jonathan Slack (University of Minnesota, EEUU). Aquest vector codifica un únic transcrit sota el control del promotor ubicu *Chicken β-actin* (CAG). Aquest transcrit conté els gens de *eGFP*, *Pdx1*, *Ngn3* i *MafA*, separats entre ells per seqüències 2A, les quals provoquen el trencament del polipèptid generant així les quatre proteïnes d'interès. El vectors Ad5-CMV-GFP (Ad-GFP) codifica pel gen *eGFP* sota el control del promotor ubic del citomegalovirus (CMV) i Ad5-null no codifica per cap proteïna. Ad5-CMV-GFP i Ad5-null havien estat produïts prèviament al nostre laboratori.

2.4.1. Producció i purificació dels vectors adenovirals

Per tal d'obtenir preparacions de vectors adenovirals d'alta concentració en partícules víriques, es van infectar 30 plaques de 15 cm de diàmetre de cèl·lules HEK-293 per cada vector adenoviral. Tenint en compte que a cada placa en el moment de la infecció hi havia unes $9 \cdot 10^6$ cèl·lules, es van transduir amb una MOI de 1000 pv/cell (partícules víriques per cèl·lula). Al cap de 40 h, es va recollir el medi de cultiu i les cèl·lules i es van centrifugar a 3000 rpm durant 10 min. Es va descartar el sobrenedant, es van ressuspèndre les cèl·lules amb 10 ml de PBS i es van congelar a -80 °C per a la posterior purificació.

Els vectors adenovirals van ser purificats mitjançant ultracentrifugació en dos gradients de clorur de cesi (CsCl). Primer, es van aplicar 3 cicles de congelació-descongelació mitjançant N₂ líquid i un bany d'aigua a 37 °C per tal de lisar les cèl·lules i alliberar les partícules víriques. Es van eliminar les restes cel·lulars mitjançant una

centrifugació a 3000 rpm durant 10 min. Es va preparar el primer gradient, en aquest cas un gradient discontinu de CsCl en tubs ultra clear (Beckman Coulter, Brea, CA, EUU) a unes densitats de 1.41 g/ml i 1.27 g/ml, on es va afegir el sobrenedant de la centrifugació anterior, i es va ultracentrifugar durant 2 h a 32000 rpm a 18 °C en un rotor Sw40Ti (Beckman). Com que els adenovirus tenen una densitat aproximada d'1.34 g/ml, després de la ultracentrifugació els vectors es localitzaven en una banda blanca on hi havia la separació entre els dos gradients. La banda dels vectors va ser recollida amb una xeringa de 10 ml i una agulla de 18G i es va transferir a un segon gradient de CsCl, en aquest cas continu, de 1.34 g/ml de densitat. Es va ultracentrifugar durant 20 h a 32000 rpm a 18 °C en un rotor Sw40Ti (Beckman). La banda resultant, corresponent als adenovirus, va ser recollida amb una xeringa de 10 ml i una agulla de 18G en un volum màxim de 2.5 ml per a posteriorment purificar-los en una columna d'exclusió molecular PD-10 (GE Healthcare, Little Chalfond, Regne Unit). Un cop rentada la columna amb 25 ml de PBS, es van afegir els adenovirus a la columna. Els primers 2 ml es van descartar ja que contenien les proteïnes i els lípids. Es van tornar a afegir 5 ml de PBS a la columna i es van recollir fraccions d'1 ml de volum, sent la segona i la tercera les que contenien la major part de partícules víriques. Es van barrejar les fraccions 2 i 3, i s'hi va afegir 200 µl de glicerol estèril (10% sobre el volum total de la preparació). Aquestes preparacions es van guardar congelades a -80 °C fins el moment de la seva utilització.

2.4.2. Quantificació dels vectors adenovirals

Les partícules virals (pv) es van quantificar per espectofotometria a 260 nm, segons mètode descrit per Mittereder (Mittereder et al., 1996). Es van barrejar 10-50 µl de la preparació adenoviral en 450-490 µl de tampó de lisi (tampó TE i 0.1% SDS) i es van incubar 10 min a 56 °C. Es va vortexar durant 1 min i es va mesurar l'absorbància a 260 nm.

La fórmula aplicada va ser la següent:

$$\text{pv en 1 ml} = \text{OD}_{260} \times \text{FD} \times \text{K} / (36 - \text{Y})$$

On FD és el factor de dilució, K és una constant per un adenovirus *wild-type* (Ad5) a 260 nm ($1.1 \cdot 10^{12}$ virions/OD₂₆₀) i Y és la mida en kb del genoma del nostre vector viral. Les preparacions adenovirals utilitzades durant aquesta tesi i les seves respectives titulacions es poden observar a la taula següent.

Vector adenoviral	Nom de la preparació	Títulació
Ad-PNM	FG-8	2.137×10^{12} pv/ml
Ad-GFP	FG-10	2.413×10^{12} pv/ml
Ad-null	CBATEG-573	2.36×10^{12} pv/ml

2.5. Transducció de les cèl·lules en cultiu amb vectors adenovirals

Per a la transducció de les diferents línies cel·lulars (266-6, AR42J i B13) amb vectors adenovirals, es van sembrar les cèl·lules tres dies abans de la transducció en plaques de 12 pous (150628, Thermo Scientific™ Nunc™) per tal que el dia de la transducció estiguessin aproximadament al 70% de confluència. El dia de la transducció es van comptar les cèl·lules de tres pous mitjançant un comptador cel·lular (Scepter™, Millipore) per tal de poder calcular la dosi de vectors adenovirals per cada pou. Abans de la transducció, es va substituir el medi de cultiu de les cèl·lules per 1 ml de medi DMEM 1 g/L de D-glucosa (Gibco), subministrat amb L-glutamina i piruvat, i complementat amb FBS (Gibco) al 2%. Es va transduir cada pou amb la dosi de vectors adenovirals indicada diluïda en 50 µl de PBS Ca/Mg (PAA). A les 16 h post-transducció, es va substituir el medi pel medi complet corresponent a cada línia cel·lular (especificat a l'apartat 2.2 de Materials i Mètodes). Les cèl·lules es van incubar a 37° C i 8.5% de CO₂ fins el moment de recollir-les.

2.6. Anàlisi de l'expressió de mRNA per qPCR

2.6.1. Extracció de l'RNA total

Per a l'extracció d'RNA total de les cèl·lules en cultiu, es va rentar cada pou amb 1 ml de PBS. Seguidament es van recollir les cèl·lules de cada pou en 800 µl de la solució

TriPure Isolation Reagent (Roche) i, seguint el protocol comercial de purificació de RNA en columna de *RNeasy Mini Kit* de Qiagen (Cat.No.74104, Qiagen, Invitrogen), es va obtenir l'RNA total. Aquest mètode es basa en l'extracció amb fenol-cloroform utilitzant Tiocianat com a inhibidor de ribonucleases.

Totes les mostres van ser tractades en les columnes de purificació amb DNaseI (RNase-Free DNase Set proporcionat amb les columnes, Qiagen) i, després d'eliminar l'enzim amb el tampó subministrat pel fabricant, es va eluir l'RNA en 30 µl d'aigua destil·lada lliure d'RNases (DEPC). Finalment, la concentració d'RNA obtingut es va determinar mitjançant un espectofotòmetre (*Nanodrop 1000 spectrophotometer*, Thermo Fisher Scientific Inc.).

2.6.2. Síntesi de cDNA

Per tal de convertir el mRNA a DNA de doble cadena i així poder-lo quantificar mitjançant qPCR, 1 µg d'RNA total va ser retrotranscrit a cDNA utilitzant el *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche) seguint les instruccions del fabricant. Oligo-dT i oligonucleòtids d'hexàmers aleatoris van ser utilitzats com a *primers* en la reacció juntament amb la presència d'un inhibidor de RNases.

2.6.3. PCR quantitativa

La PCR quantitativa (qPCR) o *real-time PCR* ha esdevingut molt útil en l'anàlisi de l'expressió del mRNA de diversos gens. La qPCR es va realitzar en el *LightCycler® 480* (Roche) utilitzant *LightCycler® 480 SYBR Green I Master* (Roche). En la següent taula es mostren els diferents *primers* de ratolí (mm) o de rata (rn) utilitzats en la qPCR:

Gen	NCBI accession no.	Seqüència Forward (5'-3')	Seqüència Reverse (5'-3')
<i>rnIns1</i>	NM_019129.3	AATCATAGACCATCAGCAAGCA	CCACAAAGGTGCTGTTTGAC
<i>rnIns2</i>	NM_019130.2	TGTGGGGAGCGTGGATTCTT	AGTGCCAAGGTCTGAAGGTCA
<i>rnIAPP</i>	NM_012586.2	TGAGAGCTACACCTGTCCGA	ACATTGGTTGGTGGGAGGAC
<i>rnNeuroD1</i>	NM_019218.2	TCAACCCCCGGACTTTCTTG	GGGACTGGTAGGAGTAGGG
<i>rnPax4</i>	NM_031799.1	TTTGTACCCAGGACAAGGCTC	GGAAGAGCTGGAGCCAAAAC
<i>rnGlut2</i>	NM_012879.2	GCCTGTGTATGCAACCATCG	ACGGCACAGAAAAACATGCC
<i>rnPcsk1</i>	NM_017091.2	ATCCTGTAGGCACCTGGACA	ACGAGGCTGCTTCATGTGTT
<i>rnPcsk2</i>	NM_012746.1	CTCTACGTTACGCAACGGGA	CAAAGCCAATGCAAACACGC
<i>rnCpe</i>	NM_013128.1	CCGAGACCAAGGCTGTCATT	GTACCACTCCGCGTCTCATC
<i>rnGcg</i>	NM_012707.2	CAAATACCTGGACTCCCCGC	GTCCCTTCAGCATGCCTCTC
<i>rnAmy</i>	NM_031502.1	AGAGTAATGTCAAGTTACCGAAGGA	TGCCACAAGTAGTGTCTGGAT
<i>rnCela1</i>	NM_012552.3	TGAGCGTGCAGAAGATCGTG	TTGTTAGCCAGGATGGTTCCC
<i>rnCpa1</i>	NM_016998.3	TCCAGATCGGCAACACCTTT	AAACCAGACCCCACTAGCCT
<i>rnPtfla</i>	NM_053964.1	TAACCAGGCCAGAAGGTCAT	GAGCTGTTTTTTCATCAGCCCAG
<i>rnGck</i>	NM_001270850.1	ACTGCCGAGATGATGAAGCAC	ACGATGTTGTTCCCTTCTGCT
<i>rnZeb1</i>	NM_013164.1	GAGCCACCAGTGAAGGTGAT	GTCATTCTGGTCCCTCCACGG
<i>rnZeb2</i>	NM_001033701.1	AAAAGCAGTTCCCTTCTGCGA	AGTGCTCGATAAGGTGGTGT
<i>rnE-Cad</i>	NM_031334.1	GCGAGAGCCAGACACATTCA	TCAGCCCGAGTGGAAATGAC
<i>rnRplp0</i>	NM_022402.2	GTTGAACATCTCCCCCTTCTCC	CAGTCGGGTAGCCAATCTGC
<i>mmPdx1</i>	NM_008814.3	GAAATCCACCAAAGCTCACG	CGGGTCCGCTGTGTAAG
<i>mmNgn3</i>	NM_009719.6	CGCAAGAAGGCCAATGATCG	CCAGATGTAGTTGTGGGCGA
<i>mmMafA</i>	NM_194350.1	CTCCAGAGCCAGGTGGAG	GTACAGGTCCCGCTCCCTTG
<i>mmIns1</i>	NM_008386.3	AGTAACCCCCAGCCCTTAGT	AAAAGCCTGGGTGGGTTTGG
<i>mmIns2</i>	NM_001185083.1	ACCTTTGTGGTTCCACCTG	GGTCTGAAGGTCACCTGCTC
<i>mmIAPP</i>	NM_010491.2	GATGTGCATCTCCAACTGC	TGTCCATCTGAGGGTTGCTA
<i>mmNeuroD1</i>	NM_010894.2	CGCAGAAGGCAAGGTGTC	TTTGGTCATGTTCCACTTCC
<i>mmPax4</i>	NM_001159926.1	CCTGGAATTCCACCTTTTT	ACGGAGAGCTCCTTCTGGA
<i>mmRplp0</i>	NM_007475.5	GGCCCTGCACTCTCGCTTT	TGCCAGGACGCGCTTGT

Cada reacció de qPCR contenia 10 µl de volum total:

Reacció SYBR Green	Volum
<i>SYBR Green LightCycler® 480 Probe Master</i>	5 µl
<i>Primer forward</i> (10 µM)	0.2 µl
<i>Primer reverse</i> (10 µM)	0.2 µl
H ₂ O Milli-Q	2.6 µl
cDNA (dil.1/10)	2 µl

La reacció va consistir en 5 min a 95 °C per a una desnaturalització inicial i 45 cicles de 4 etapes: desnaturalització (10 segons a 95 °C), alineament (10 segons a 60 °C), elongació (10 segons a 72 °C) i 30 segons a 60 °C. Abans de refredar la reacció a 4°C, es va deixar 5 segons a 95°C i 1 min a 65°C per determinar la temperatura de fusió.

Per quantificar l'expressió relativa dels gens d'interès es va utilitzar el mètode *delta-delta-Ct* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) descrit per Pfaffl (Pfaffl, 2001). En aquest mètode àmpliament utilitzat, s'assumeix una duplicació òptima de cada cicle de qPCR amb una taxa d'amplificació del 100%. Les Ct (indicatives del nombre de cicles al qual la quantitat del gen diana d'interès és amplificat) del gen d'interès són ajustades en relació a les Cts del gen pel qual es normalitza (*housekeeping*), en aquest cas *Rplp0*. El valor resultant serveix per determinar la diferència d'expressió. La fórmula següent ens mostra un exemple, en aquest cas, per conèixer la diferència d'expressió del gen de la insulina entre una mostra (A), i una altra (B).

$$\text{Ràtio A/B} = \left(2^{\text{Ct(A)Rplp0}} / 2^{\text{Ct(A)Ins1}} \right) / \left(2^{\text{Ct(B)Rplp0}} / 2^{\text{Ct(B)Ins1}} \right)$$

2.7. Test de secreció i contingut cel·lular d'insulina

Per al test de secreció d'insulina i contingut cel·lular d'insulina, es van sembrar les cèl·lules en plaques de 6 pous tres dies abans de la transducció amb vectors adenovirals. Tres dies després de la transducció, es va realitzar el test de secreció d'insulina. Breument, les cèl·lules es van rentar i es van pre-incubar durant 2 h amb 1 ml de *Krebs Buffer* (complementat amb 10 mM HEPES i 0.1 % de BSA) a concentració basal de glucosa (2.8 mM). Seguidament es van incubar les cèl·lules durant 2 h amb 1 ml de *Krebs Buffer* a concentració basal de glucosa o amb *Krebs Buffer* a concentració alta de glucosa (20 mM). Els sobrenedants es van guardar per mesurar la insulina secretada al medi i les cèl·lules es van resuspendre en 400 µl de tampó d'homogeneïtzació de proteïnes RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Na-deoxycholate, 5 mM EDTA, 0.1% SDS, 2 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 10 mM Na₄P₂O₇). Immediatament abans d'utilitzar el tampó d'homogeneïtzació RIPA s'hi va afegir

ortovanadat (1 mM) i els inhibidors de proteases (una pastilla d'inhibidors per cada 10 ml de tampó; *Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets*, Roche). Un cop resuspesos els extractes cel·lulars, es van homogeneïtzar amb 15 pulsacions a 40 V mitjançant un ultrasonicador (VC-130PB, Sonics&Materials).

La concentració d'insulina en medi i extractes cel·lulars es va determinar per radioimmunoassaig (RIA) mitjançant el kit *Rat Insulin RIA* (Millipore) seguint les instruccions del fabricant. Aquest mètode té uns límits de sensibilitat de 0.313 ng/ml a 10 ng/ml i una variació intra-assaig màxima del 10%.

A partir dels extractes cel·lulars, també es va determinar la concentració de proteïnes mitjançant el mètode BCA (Pierce, Rockford, IL, EUA), per tal de poder normalitzar els valors d'insulina pel pes total de proteïnes.

2.8. Anàlisi immunocitoquímica de la insulina

Per a l'anàlisi immunocitoquímic de la insulina en cèl·lules B13, es van sembrar les cèl·lules tres dies abans de la transducció adenoviral en plaques de 24 pous que contenien cobreobjectes rodons (0111520, Marienfield, Lauda-Königshofen, Alemanya). Els pous amb cobreobjectes van ser tractats amb gelatina 0.1% durant 1 h a 37 °C abans de sembrar les cèl·lules. La transducció adenoviral es va realitzar tal com està descrit a l'apartat 2.5 de Materials i Mètodes, amb una dosi de 2000 pv/cèl·lula. Quatre dies post-transducció, es va rentar els pous dues vegades amb PBS i es van fixar amb una solució fixadora de formaldehid (2% de formaldehid en PBS) durant 20 min. Es van rentar els pous dues vegades amb PBS i es van deixar en solució de rentat (0.1% de BSA en PBS) a 4 °C fins a la tinció immunocitoquímica.

Per a la tinció fluorescent de la insulina, es van tractar les cèl·lules fixades amb solució de blocatge (5% sèrum de cavall i 0.2% *Triton* en PBS) durant 45 min a temperatura ambient. Tot seguit, es van incubar les cèl·lules amb l'anticòs primari anti-insulina diluït 1:500 en solució de dilució (1% BSA, 1% sèrum de cavall, 0.2% *Triton* en PBS) a temperatura ambient durant 1 h. Es van rentar els pous tres cops amb solució de rentat i es van incubar amb l'anticòs secundari diluït 1:300 i *Hoescht* (Sigma

Aldrich) diluït 1:100 en solució de dilució. Es van rentar els pous tres cops (5 min cada rentat) amb solució de rentat, un cop amb PBS durant 5 min i un cop amb aigua miliQ durant 5 min. Es van retirar els cobreobjectes, que contenien les cèl·lules fixades i marcades, i es van muntar a sobre un portaobjectes amb les cèl·lules de cara al portaobjectes. Les imatges de fluorescència es van obtenir amb un microscopi òptic Eclipse E800 (Nikon Instruments Inc., Tòquio, Japó) connectat a una càmera i un analitzador d'imatges (analySIS 3.0; Soft Imaging System GmbH).

2.9. Determinació de la Fosfatasa Alcalina secretada (seAP)

Els valors de Fosfatasa Alcalina secretada (seAP) al medi de cultiu es van determinar a partir de 50 µl de medi mitjançant un mètode luminomètric, Topix® Phospha-Light™ System (Applied Biosystems, Inc). La seAP utilitzada en aquest estudi és la forma truncada de la fosfatasa alcalina placentària humana (PALP), la qual pot ser discriminada de la seAP endògena del ratolí per temperatura, incubant el sèrum a 65 °C durant 30 min. Aquest pre-tractament assegura una inactivació de la seAP endògena i no de la seAP placentària derivada del nostre transgen, ja que aquesta última és termoresistent. Per a la determinació dels nivells de seAP es van seguir les indicacions del fabricant.

2.10. Anàlisi d'expressió de microRNAs per qPCR

L'anàlisi d'expressió de microRNAs per qPCR es va realitzar mitjançant la tecnologia *miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR* (Exiqon). Aquesta tecnologia es basa en una retrotranscripció universal (RT), seguida per una amplificació per qPCR en dues plaques de 384 pous, on cada pou conté oligonucleòtids específics per un microRNA a més de calibradors inter-plaques, controls negatius i *spike-ins*, que són RNAs o cDNAs de mida petita que s'utilitzen com a controls de la qualitat de l'RNA extret, de la reacció de retrotranscripció i de la qPCR. Així, per a cada mostra es pot analitzar l'expressió de 752 microRNAs diferents. Tots els protocols es van dur a terme seguint les instruccions del fabricant.

2.10.1. Extracció de l'RNA total

Per a l'extracció de l'RNA total de les mostres, es va utilitzar el *miRCURYTM Isolation Kit – Cell & Plant* (Exiqon), el qual assegura una bona extracció dels RNAs de mida petita, a diferència del mètode d'extracció detallat a l'apartat 2.6.1 de Materials i Mètodes. Breument, les cèl·lules, sembrades en plaques de 12 pous, es van recollir a quatre dies post-transducció amb 350 µl de *Lysis Solution* a la que prèviament s'hi havia afegit 10 µl/ml de β-mercaptoethanol i 1 µl d'*RNA isolation spike-in mix* (UniSp2, UniSp4, UniSp5). L'RNA total de les mostres es va aïllar i purificar per columna seguint les instruccions del fabricant, i se'n va comprovar la concentració i qualitat mitjançant un espectofotòmetre *Nanodrop 1000 spectrophotometer*, Thermo Fisher Scientific Inc.).

2.10.2. Síntesi de cDNA

Per a la síntesi de cDNA o retrotranscripció dels microRNAs, es va utilitzar el *Universal cDNA synthesis kit II* (Exiqon), seguint les instruccions del fabricant. Per cada mostra es van retrotranscriure 40 ng d'RNA total i 2 µl de *cDNA synthesis RNA spike-in mix* (cel-miR-39-3p and UniSp6), en un volum total de 40 µl.

2.10.3. PCR quantitativa

Per a realitzar l'anàlisi d'expressió dels microRNAs en les diferents mostres, es van utilitzar dues plaques de 384 pous amb oligonucleòtids únics en cada pou (*Mouse&Rat miRNome Panels I+II V3*, Exiqon) per cada rèplica biològica. La qPCR es va realitzar en un *LightCycler® 480* (Roche Applied Science) utilitzant ExiLENT SYBR[®] Green Master Kit (Exiqon), segons les instruccions del fabricant. Breument, els 40 µl de cDNA, obtinguts en el pas descrit anteriorment, es van barrejar amb 4 ml de *2x master mix* i 3.96 ml d'aigua, i es van dispensar 10 µl de la barreja a cada un dels 768 pous totals de les dues plaques.

2.10.4. Anàlisi bioinformàtic de les dades obtingudes per qPCR de microRNAs

Per a l'anàlisi de la gran quantitat de dades obtingudes a partir de les qPCR de microRNAs, en primer lloc es van calibrar les Cts obtingudes mitjançant el factor de calibració, valor obtingut a partir de les Cts de tres pous en cada placa que contenien calibradors inter-plaques. Els valors RQ (obtingut a partir de la fórmula 2^{Ct}) de cada microRNA van ser normalitzats pel valor RQ del miR-16-5p, que va resultar ser el més estable entre les diferents mostres segons el *NormFinder Software* (Andersen et al., 2004). Abans de l'anàlisi, les dades van ser processades manualment. Per tal de reduir l'estocasticitat a altes Cts, els valors per sobre de 35 es van considerar no detectats. A més, els microRNAs que presentaven alguna variació per sobre de 2 *fold-change* intra-rèpliques es van eliminar de l'anàlisi. Per a realitzar les taules dels microRNAs més diferencialment expressats, es van requerir 3 valors detectats contra 2 o més valors no detectats (ND) per tal de considerar Detectat vs ND. L'anàlisi de component principal (PCA) i el *heat-map* es van realitzar amb un *script* R de codi obert disponible a <http://a-slide.github.io/MirStat/> amb informació detallada.

2.11. Anàlisi estadístic

Tots els resultats es van expressar com la mitjana \pm error estàndard de la mitjana (SEM). La comparació dels resultats es va realitzar mitjançant el test *t* de *Student* de dades no aparellades o a través d'una taula ANOVA d'un factor seguida d'un test post-hoc de Dunnett (per a comparacions entre el grup control i diferents tractaments) o Tukey (per a comparacions entre diferents grups). Les diferències es van considerar estadísticament significatives amb * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ i *** $p < 0.001$.

VIII. BIBLIOGRAFIA

Afelik, S., Qu, X., Hasrouni, E., Bukys, M.A., Deering, T., Nieuwoudt, S., Rogers, W., Macdonald, R.J., Jensen, J., 2012. Notch-mediated patterning and cell fate allocation of pancreatic progenitor cells. *Dev. Camb. Engl.* 139, 1744–1753. doi:10.1242/dev.075804

Akinci, E., Banga, A., Greder, L.V., Dutton, J.R., Slack, J.M.W., 2012. Reprogramming of pancreatic exocrine cells towards a beta (β) cell character using *Pdx1*, *Ngn3* and *MafA*. *Biochem. J.* 442, 539–550. doi:10.1042/BJ20111678

Alba, R., Bosch, A., Chillon, M., 2005. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther.* 12 Suppl 1, S18–27. doi:10.1038/sj.gt.3302612

Al-Quobaili, F., Montenarh, M., 2008. Pancreatic duodenal homeobox factor-1 and diabetes mellitus type 2 (review). *Int. J. Mol. Med.* 21, 399–404.

Altuvia, Y., Landgraf, P., Lithwick, G., Elefant, N., Pfeffer, S., Aravin, A., Brownstein, M.J., Tuschl, T., Margalit, H., 2005. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res.* 33, 2697–2706. doi:10.1093/nar/gki567

Ambros, V., 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350–355. doi:10.1038/nature02871

American Diabetes Association, 2015. (2) Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 38 Suppl, S8–S16. doi:10.2337/dc15-S005

Andersen, C.L., Jensen, J.L., Ørntoft, T.F., 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 64, 5245–5250. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0496

Anderson, W.F., 1998. Human gene therapy. *Nature* 392, 25–30. doi:10.1038/32058

Andrali, S.S., Sampley, M.L., Vanderford, N.L., Ozcan, S., 2008. Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic beta-cells. *Biochem. J.* 415, 1–10. doi:10.1042/BJ20081029

Anguela, X.M., Tafuro, S., Roca, C., Callejas, D., Agudo, J., Obach, M., Ribera, A., Ruzo, A., Mann, C.J., Casellas, A., Bosch, F., 2013. Nonviral-mediated hepatic expression of IGF-I increases Treg levels and suppresses autoimmune diabetes in mice. *Diabetes* 62, 551–560. doi:10.2337/db11-1776

Anokye-Danso, F., Trivedi, C.M., Juhr, D., Gupta, M., Cui, Z., Tian, Y., Zhang, Y., Yang, W., Gruber, P.J., Epstein, J.A., Morrisey, E.E., 2011. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 8, 376–388. doi:10.1016/j.stem.2011.03.001

Ashcroft, F.M., Rorsman, P., 2012. Diabetes mellitus and the β cell: the last ten years. *Cell* 148, 1160–1171. doi:10.1016/j.cell.2012.02.010

Ballian, N., Brunicardi, F.C., 2007. Islet vasculature as a regulator of endocrine pancreas function. *World J. Surg.* 31, 705–714. doi:10.1007/s00268-006-0719-8

Banga, A., Akinci, E., Greder, L.V., Dutton, J.R., Slack, J.M.W., 2012. In vivo reprogramming of Sox9+ cells in the liver to insulin-secreting ducts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 15336–15341. doi:10.1073/pnas.1201701109

Banga, A., Greder, L.V., Dutton, J.R., Slack, J.M.W., 2014. Stable insulin-secreting ducts formed by reprogramming of cells in the liver using a three-gene cocktail and a PPAR agonist. *Gene Ther.* 21, 19–27. doi:10.1038/gt.2013.50

Baroukh, N., Ravier, M.A., Loder, M.K., Hill, E.V., Bounacer, A., Scharfmann, R., Rutter, G.A., Van Obberghen, E., 2007. MicroRNA-124a regulates Foxa2 expression and intracellular signaling in pancreatic beta-cell lines. *J. Biol. Chem.* 282, 19575–19588. doi:10.1074/jbc.M611841200

Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297.

Batterham, R.L., Le Roux, C.W., Cohen, M.A., Park, A.J., Ellis, S.M., Patterson, M., Frost, G.S., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 2003. Pancreatic polypeptide reduces appetite and food intake in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 3989–3992. doi:10.1210/jc.2003-030630

Begg, D.P., Woods, S.C., 2013. Interactions between the central nervous system and pancreatic islet secretions: a historical perspective. *Adv. Physiol. Educ.* 37, 53–60. doi:10.1152/advan.00167.2012

Bellin, M.D., Barton, F.B., Heitman, A., Harmon, J.V., Kandaswamy, R., Balamurugan, A.N., Sutherland, D.E.R., Alejandro, R., Hering, B.J., 2012. Potent induction immunotherapy promotes long-term insulin independence after islet transplantation in type 1 diabetes. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 12, 1576–1583. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03977.x

Bernstein, B.E., Meissner, A., Lander, E.S., 2007. The mammalian epigenome. *Cell* 128, 669–681. doi:10.1016/j.cell.2007.01.033

Bernstein, E., Kim, S.Y., Carmell, M.A., Murchison, E.P., Alcorn, H., Li, M.Z., Mills, A.A., Elledge, S.J., Anderson, K.V., Hannon, G.J., 2003. Dicer is essential for mouse development. *Nat. Genet.* 35, 215–217. doi:10.1038/ng1253

Bessis, N., GarciaCozar, F.J., Boissier, M.-C., 2004. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther.* 11 Suppl 1, S10–17. doi:10.1038/sj.gt.3302364

Beucher, A., Martín, M., Spenle, C., Poulet, M., Collin, C., Gradwohl, G., 2012. Competence of failed endocrine progenitors to give rise to acinar but not ductal cells is restricted to early pancreas development. *Dev. Biol.* 361, 277–285. doi:10.1016/j.ydbio.2011.10.025

Birnboim, H.C., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513–1523.

Bonal, C., Herrera, P.L., 2008. Genes controlling pancreas ontogeny. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 823–835. doi:10.1387/ijdb.072444cb

Borchert, G.M., Lanier, W., Davidson, B.L., 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 1097–1101. doi:10.1038/nsmb1167

Bosco, D., Armanet, M., Morel, P., Niclauss, N., Sgroi, A., Muller, Y.D., Giovannoni, L., Parnaud, G., Berney, T., 2010. Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans. *Diabetes* 59, 1202–1210. doi:10.2337/db09-1177

Brissova, M., Fowler, M.J., Nicholson, W.E., Chu, A., Hirshberg, B., Harlan, D.M., Powers, A.C., 2005. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 53, 1087–1097. doi:10.1369/jhc.5C6684.2005

Broglio, F., Arvat, E., Benso, A., Gottero, C., Muccioli, G., Papotti, M., van der Lely, A.J., Deghenghi, R., Ghigo, E., 2001. Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 5083–5086. doi:10.1210/jcem.86.10.8098

Broglio, F., Gottero, C., Benso, A., Prodam, F., Volante, M., Destefanis, S., Gauna, C., Muccioli, G., Papotti, M., van der Lely, A.J., Ghigo, E., 2003. Ghrelin and the endocrine pancreas. *Endocrine* 22, 19–24. doi:10.1385/ENDO:22:1:19

Budd, G.C., Pansky, B., Glatzer, L., 1993. Preproinsulin mRNA in the rat eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34, 463–469.

Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., Butler, P.C., 2003. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 102–110.

Cabrera, O., Berman, D.M., Kenyon, N.S., Ricordi, C., Berggren, P.-O., Caicedo, A., 2006. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2334–2339. doi:10.1073/pnas.0510790103

Caicedo, A., 2013. Paracrine and autocrine interactions in the human islet: more than meets the eye. *Semin. Cell Dev. Biol.* 24, 11–21. doi:10.1016/j.semcd.2012.09.007

Callejas, D., Mann, C.J., Ayuso, E., Lage, R., Grifoll, I., Roca, C., Andaluz, A., Ruiz-de Gopegui, R., Montané, J., Muñoz, S., Ferre, T., Haurigot, V., Zhou, S., Ruberte, J., Mingozi, F., High, K.A., Garcia, F., Bosch, F., 2013. Treatment of diabetes and long-term survival after insulin and glucokinase gene therapy. *Diabetes* 62, 1718–1729. doi:10.2337/db12-1113

Catalano, P.M., 2014. Trying to understand gestational diabetes. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* 31, 273–281. doi:10.1111/dme.12381

Chattopadhyay, M., Krisky, D., Wolfe, D., Glorioso, J.C., Mata, M., Fink, D.J., 2005. HSV-mediated gene transfer of vascular endothelial growth factor to dorsal root ganglia prevents diabetic neuropathy. *Gene Ther.* 12, 1377–1384. doi:10.1038/sj.gt.3302533

Chen, Y.-J., Finkbeiner, S.R., Weinblatt, D., Emmett, M.J., Tameire, F., Yousefi, M., Yang, C., Maehr, R., Zhou, Q., Shemer, R., Dor, Y., Li, C., Spence, J.R., Stanger, B.Z., 2014. De Novo Formation of Insulin-Producing “Neo- β Cell Islets” from Intestinal Crypts. *Cell Rep.* 6, 1046–1058. doi:10.1016/j.celrep.2014.02.013

Chen, Z., Herman, A.E., Matos, M., Mathis, D., Benoist, C., 2005. Where CD4+CD25+ T reg cells impinge on autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.* 202, 1387–1397. doi:10.1084/jem.20051409

Chiasson, J.-L., Aris-Jilwan, N., Bélanger, R., Bertrand, S., Beaugard, H., Ekoé, J.-M., Fournier, H., Havrankova, J., 2003. Diagnosis and treatment of diabetic ketoacidosis and the hyperglycemic hyperosmolar state. *CMAJ Can. Med. Assoc. J. J. Assoc. Medicale Can.* 168, 859–866.

Chng, Z., Teo, A., Pedersen, R.A., Vallier, L., 2010. SIP1 Mediates Cell-Fate Decisions between Neuroectoderm and Mesendoderm in Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 6, 59–70. doi:10.1016/j.stem.2009.11.015

Choi, P.S., Zakhary, L., Choi, W.-Y., Caron, S., Alvarez-Saavedra, E., Miska, E.A., McManus, M., Harfe, B., Giraldez, A.J., Horvitz, H.R., Schier, A.F., Dulac, C., 2008. Members of the miRNA-200 family regulate olfactory neurogenesis. *Neuron* 57, 41–55. doi:10.1016/j.neuron.2007.11.018

Choi, Y.J., Lin, C.-P., Ho, J.J., He, X., Okada, N., Bu, P., Zhong, Y., Kim, S.Y., Bennett, M.J., Chen, C., Ozturk, A., Hicks, G.G., Hannon, G.J., He, L., 2011. miR-34 miRNAs provide a barrier for somatic cell reprogramming. *Nat. Cell Biol.* 13, 1353–1360. doi:10.1038/ncb2366

Christoffersen, N.R., Silahtaroglu, A., Orom, U.A., Kauppinen, S., Lund, A.H., 2007. miR-200b mediates post-transcriptional repression of ZFX1B. *RNA N. Y. N* 13, 1172–1178. doi:10.1261/rna.586807

Chuang, J.-C., Sakata, I., Kohno, D., Perello, M., Osborne-Lawrence, S., Repa, J.J., Zigman, J.M., 2011. Ghrelin directly stimulates glucagon secretion from pancreatic alpha-cells. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 25, 1600–1611. doi:10.1210/me.2011-1001

Comijn, J., Berx, G., Vermassen, P., Verschueren, K., van Grunsven, L., Bruyneel, E., Mareel, M., Huylebroeck, D., van Roy, F., 2001. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol. Cell* 7, 1267–1278.

Cotter, D.G., Schugar, R.C., Crawford, P.A., 2013. Ketone body metabolism and cardiovascular disease. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 304, H1060–1076. doi:10.1152/ajpheart.00646.2012

Cruzado, J.M., Lloberas, N., Torras, J., Riera, M., Fillat, C., Herrero-Fresneda, I., Aran, J.M., Alperovich, G., Vidal, A., Grinyó, J.M., 2004. Regression of advanced diabetic nephropathy by hepatocyte growth factor gene therapy in rats. *Diabetes* 53, 1119–1127.

D'Amour, K.A., Bang, A.G., Eliazer, S., Kelly, O.G., Agulnick, A.D., Smart, N.G., Moorman, M.A., Kroon, E., Carpenter, M.K., Baetge, E.E., 2006. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 24, 1392–1401. doi:10.1038/nbt1259

Danthinne, X., Imperiale, M.J., 2000. Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther.* 7, 1707–1714. doi:10.1038/sj.gt.3301301

Darnell, D.K., Kaur, S., Stanislaw, S., Konieczka, J.H., Konieczka, J.K., Yatskievych, T.A., Antin, P.B., 2006. MicroRNA expression during chick embryo development. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 235, 3156–3165. doi:10.1002/dvdy.20956

Deltour, L., Leduque, P., Blume, N., Madsen, O., Dubois, P., Jami, J., Bucchini, D., 1993. Differential expression of the two nonallelic proinsulin genes in the developing mouse embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 527–531.

Deutsch, G., Jung, J., Zheng, M., Lóra, J., Zaret, K.S., 2001. A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Dev. Camb. Engl.* 128, 871–881.

Dolgin, E., 2012. Medical devices: Managed by machine. *Nature* 485, S6–8.

Dor, Y., Brown, J., Martinez, O.I., Melton, D.A., 2004. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429, 41–46. doi:10.1038/nature02520

Elliott, R.B., Escobar, L., Tan, P.L.J., Muzina, M., Zwain, S., Buchanan, C., 2007. Live encapsulated porcine islets from a type 1 diabetic patient 9.5 yr after xenotransplantation. *Xenotransplantation* 14, 157–161. doi:10.1111/j.1399-3089.2007.00384.x

Esni, F., Ghosh, B., Biankin, A.V., Lin, J.W., Albert, M.A., Yu, X., MacDonald, R.J., Civin, C.I., Real, F.X., Pack, M.A., Ball, D.W., Leach, S.D., 2004. Notch inhibits Ptf1 function and acinar cell differentiation in developing mouse and zebrafish pancreas. *Dev. Camb. Engl.* 131, 4213–4224. doi:10.1242/dev.01280

Eulalio, A., Triteschler, F., Izaurralde, E., 2009. The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. *RNA N. Y. N* 15, 1433–1442. doi:10.1261/rna.1703809

Fairhall, E.A., Charles, M.A., Wallace, K., Schwab, C.J., Harrison, C.J., Richter, M., Hoffmann, S.A., Charlton, K.A., Zeilinger, K., Wright, M.C., 2013. The B-13 hepatocyte progenitor cell resists pluripotency induction and differentiation to non-hepatocyte cells. *Toxicol. Res.* 2, 308. doi:10.1039/c3tx50030f

Fajans, S.S., Bell, G.I., Polonsky, K.S., 2001. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N. Engl. J. Med.* 345, 971–980. doi:10.1056/NEJMra002168

Fan, Y., Rudert, W.A., Grupillo, M., He, J., Sisino, G., Trucco, M., 2009. Thymus-specific deletion of insulin induces autoimmune diabetes. *EMBO J.* 28, 2812–2824. doi:10.1038/emboj.2009.212

Francis, N., Moore, M., A Rutter, G., Burns, C., 2014. The Role of MicroRNAs in the Pancreatic Differentiation of Pluripotent Stem Cells. *MicroRNA* 3, 54–63.

Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., Bartel, D.P., 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92–105. doi:10.1101/gr.082701.108

Fu, S., Fei, Q., Jiang, H., Chuai, S., Shi, S., Xiong, W., Jiang, L., Lu, C., Atadja, P., Li, E., Shou, J., 2011. Involvement of histone acetylation of Sox17 and Foxa2 promoters during mouse definitive endoderm differentiation revealed by microRNA profiling. *PloS One* 6, e27965. doi:10.1371/journal.pone.0027965

Fu, X., Jin, L., Wang, X., Luo, A., Hu, J., Zheng, X., Tsark, W.M., Riggs, A.D., Ku, H.T., Huang, W., 2013. MicroRNA-26a targets ten eleven translocation enzymes and is regulated during pancreatic cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 17892–17897. doi:10.1073/pnas.1317397110

Gargalionis, A.N., Basdra, E.K., 2013. Insights in microRNAs biology. *Curr. Top. Med. Chem.* 13, 1493–1502.

Gerace, D., Martiniello-Wilks, R., O'Brien, B.A., Simpson, A.M., 2014. The use of β -cell transcription factors in engineering artificial β cells from non-pancreatic tissue. *Gene Ther.* doi:10.1038/gt.2014.93

Giacca, M., Zacchigna, S., 2012. Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 161, 377–388. doi:10.1016/j.jconrel.2012.04.008

Gifford, C.A., Ziller, M.J., Gu, H., Trapnell, C., Donaghey, J., Tsankov, A., Shalek, A.K., Kelley, D.R., Shishkin, A.A., Issner, R., Zhang, X., Coyne, M., Fostel, J.L., Holmes, L., Meldrim, J., Guttman, M., Epstein, C., Park, H., Kohlbacher, O., Rinn, J., Gnirke, A., Lander, E.S., Bernstein, B.E., Meissner, A., 2013. Transcriptional and Epigenetic Dynamics during Specification of Human Embryonic Stem Cells. *Cell* 153, 1149–1163. doi:10.1016/j.cell.2013.04.037

Goudy, K.S., Burkhardt, B.R., Wasserfall, C., Song, S., Campbell-Thompson, M.L., Brusko, T., Powers, M.A., Clare-Salzler, M.J., Sobel, E.S., Ellis, T.M., Flotte, T.R., Atkinson, M.A., 2003. Systemic overexpression of IL-10 induces CD4+CD25+ cell populations in vivo and ameliorates type 1 diabetes in nonobese diabetic mice in a dose-dependent fashion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 171, 2270–2278.

Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M., Guillemot, F., 2000. neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 1607–1611.

Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., Nairn, R., 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59–74.

Gregory, P.A., Bracken, C.P., Bert, A.G., Goodall, G.J., 2008. MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle Georget. Tex* 7, 3112–3118.

Gruessner, R.W.G., Gruessner, A.C., 2013. The current state of pancreas transplantation. *Nat. Rev. Endocrinol.* 9, 555–562. doi:10.1038/nrendo.2013.138

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. *Dev. Camb. Engl.* 129, 2447–2457.

Habener, J.F., Kemp, D.M., Thomas, M.K., 2005. Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology* 146, 1025–1034. doi:10.1210/en.2004-1576

Han, G., Wang, R., Chen, G., Wang, J., Xu, R., Feng, J., Yu, M., Wu, X., Qian, J., Shen, B., Li, Y., 2008. Gene delivery GAD 500 autoantigen by AAV serotype 1 prevented diabetes in NOD mice: transduction efficiency do not play important roles. *Immunol. Lett.* 115, 110–116. doi:10.1016/j.imlet.2007.10.004

Hang, Y., Stein, R., 2011. MafA and MafB activity in pancreatic β cells. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 22, 364–373. doi:10.1016/j.tem.2011.05.003

Harnaha, J., Machen, J., Wright, M., Lakomy, R., Styche, A., Trucco, M., Makaroun, S., Giannoukakis, N., 2006. Interleukin-7 is a survival factor for CD4⁺ CD25⁺ T-cells and is expressed by diabetes-suppressive dendritic cells. *Diabetes* 55, 158–170.

Harrison, L.C., 2001. Risk assessment, prediction and prevention of type 1 diabetes. *Pediatr. Diabetes* 2, 71–82. doi:10.1034/j.1399-5448.2001.002002071.x

Haurigot, V., Villacampa, P., Ribera, A., Bosch, A., Ramos, D., Ruberte, J., Bosch, F., 2012. Long-term retinal PEDF overexpression prevents neovascularization in a murine adult model of retinopathy. *PLoS One* 7, e41511. doi:10.1371/journal.pone.0041511

Hebrok, M., Kim, S.K., Melton, D.A., 1998. Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev.* 12, 1705–1713.

Hegyí, P., Petersen, O.H., 2013. The exocrine pancreas: the acinar-ductal tango in physiology and pathophysiology. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 165, 1–30. doi:10.1007/112_2013_14

Herold, K.C., Gitelman, S.E., Willi, S.M., Gottlieb, P.A., Waldron-Lynch, F., Devine, L., Sherr, J., Rosenthal, S.M., Adi, S., Jalaludin, M.Y., Michels, A.W., Dziura, J., Bluestone, J.A., 2013. Teplizumab treatment may improve C-peptide responses in participants with type 1 diabetes after the new-onset period: a randomised controlled trial. *Diabetologia* 56, 391–400. doi:10.1007/s00125-012-2753-4

Hinton, A., Afrikanova, I., Wilson, M., King, C.C., Maurer, B., Yeo, G.W., Hayek, A., Pasquinelli, A.E., 2010. A distinct microRNA signature for definitive endoderm derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 19, 797–807. doi:10.1089/scd.2009.0224

Holmstrom, S.R., Deering, T., Swift, G.H., Poelwijk, F.J., Mangelsdorf, D.J., Klierer, S.A., MacDonald, R.J., 2011. LRH-1 and PTF1-L coregulate an exocrine pancreas-specific transcriptional network for digestive function. *Genes Dev.* 25, 1674–1679. doi:10.1101/gad.16860911

Houbaviy, H.B., Murray, M.F., Sharp, P.A., 2003. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev. Cell* 5, 351–358.

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, 3292–3307.

Hurteau, G.J., Carlson, J.A., Spivack, S.D., Brock, G.J., 2007. Overexpression of the microRNA hsa-miR-200c leads to reduced expression of transcription factor 8 and increased expression of E-cadherin. *Cancer Res.* 67, 7972–7976. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1058

Jacquemin, P., Durviaux, S.M., Jensen, J., Godfraind, C., Gradwohl, G., Guillemot, F., Madsen, O.D., Carmeliet, P., Dewerchin, M., Collen, D., Rousseau, G.G., Lemaigre, F.P., 2000. Transcription factor hepatocyte nuclear factor 6 regulates pancreatic endocrine cell differentiation and controls expression of the proendocrine gene *ngn3*. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4445–4454.

Jayawardena, T.M., Egemnazarov, B., Finch, E.A., Zhang, L., Payne, J.A., Pandya, K., Zhang, Z., Rosenberg, P., Mirotsov, M., Dzau, V.J., 2012. MicroRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ. Res.* 110, 1465–1473. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.269035

Jimenez, V., Ayuso, E., Mallol, C., Agudo, J., Casellas, A., Obach, M., Muñoz, S., Salavert, A., Bosch, F., 2011. In vivo genetic engineering of murine pancreatic beta cells mediated by single-stranded adeno-associated viral vectors of serotypes 6, 8 and 9. *Diabetologia* 54, 1075–1086. doi:10.1007/s00125-011-2070-3

Joglekar, M.V., Parekh, V.S., Mehta, S., Bhonde, R.R., Hardikar, A.A., 2007. MicroRNA profiling of developing and regenerating pancreas reveal post-transcriptional regulation of neurogenin3. *Dev. Biol.* 311, 603–612. doi:10.1016/j.ydbio.2007.09.008

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. *Dev. Cell* 12, 457–465. doi:10.1016/j.devcel.2007.02.010

Kahn, S.E., 2001. Clinical review 135: The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 4047–4058. doi:10.1210/jcem.86.9.7713

Kalluri, R., Weinberg, R.A., 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119, 1420–1428. doi:10.1172/JCI39104

Kanji, M.S., Martin, M.G., Bhushan, A., 2013. Dicer1 Is Required to Repress Neuronal Fate During Endocrine Cell Maturation. *Diabetes* 62, 1602–1611. doi:10.2337/db12-0841

Kay, M.A., 2011. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nat. Rev. Genet.* 12, 316–328. doi:10.1038/nrg2971

Kay, M.A., Glorioso, J.C., Naldini, L., 2001. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat. Med.* 7, 33–40. doi:10.1038/83324

Kazal, L.A., Spicer, D.S., Brahinsky, R.A., 1948. Isolation of a crystalline trypsin inhibitor-anticoagulant protein from pancreas. *J. Am. Chem. Soc.* 70, 3034–3040.

Keenan, D.B., Cartaya, R., Mastrototaro, J.J., 2010. The pathway to the closed-loop artificial pancreas: research and commercial perspectives. *Pediatr. Endocrinol. Rev. PER* 7 Suppl 3, 445–451.

Keller, D.M., McWeeney, S., Arsenlis, A., Drouin, J., Wright, C.V.E., Wang, H., Wollheim, C.B., White, P., Kaestner, K.H., Goodman, R.H., 2007. Characterization of pancreatic transcription factor Pdx-1 binding sites using promoter microarray and serial analysis of chromatin occupancy. *J. Biol. Chem.* 282, 32084–32092. doi:10.1074/jbc.M700899200

Kim, S.K., Melton, D.A., 1998. Pancreas development is promoted by cyclopamine, a hedgehog signaling inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13036–13041.

Klein, D., Misawa, R., Bravo-Egana, V., Vargas, N., Rosero, S., Piroso, J., Ichii, H., Umland, O., Zhijie, J., Tsinoremas, N., Ricordi, C., Inverardi, L., Domínguez-Bendala, J., Pastori, R.L., 2013. MicroRNA Expression in Alpha and Beta Cells of Human Pancreatic Islets. *PLoS ONE* 8, e55064. doi:10.1371/journal.pone.0055064

Klinck, R., Füchtbauer, E.-M., Ahnfelt-Rønne, J., Serup, P., Jensen, J.N., Jørgensen, M.C., 2011. A BAC transgenic Hes1-EGFP reporter reveals novel expression domains in mouse embryos. *Gene Expr. Patterns GEP* 11, 415–426. doi:10.1016/j.gep.2011.06.004

Kloosterman, W.P., Lagendijk, A.K., Ketting, R.F., Moulton, J.D., Plasterk, R.H.A., 2007. Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS Biol.* 5, e203. doi:10.1371/journal.pbio.0050203

Kopinke, D., Brailsford, M., Shea, J.E., Leavitt, R., Scaife, C.L., Murtaugh, L.C., 2011. Lineage tracing reveals the dynamic contribution of Hes1+ cells to the developing and adult pancreas. *Dev. Camb. Engl.* 138, 431–441. doi:10.1242/dev.053843

Kopp, J.L., Dubois, C.L., Schaffer, A.E., Hao, E., Shih, H.P., Seymour, P.A., Ma, J., Sander, M., 2011. Sox9+ ductal cells are multipotent progenitors throughout development but do not produce new endocrine cells in the normal or injured adult pancreas. *Dev. Camb. Engl.* 138, 653–665. doi:10.1242/dev.056499

Korpál, M., Kang, Y., 2008. The emerging role of miR-200 family of microRNAs in epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. *RNA Biol* 5, 115–119.

Kozomara, A., Griffiths-Jones, S., 2014. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 42, D68–73. doi:10.1093/nar/gkt1181

Kredo-Russo, S., Ness, A., Mandelbaum, A.D., Walker, M.D., Hornstein, E., 2012. Regulation of pancreatic microRNA-7 expression. *Exp. Diabetes Res.* 2012, 695214. doi:10.1155/2012/695214

Krol, J., Loedige, I., Filipowicz, W., 2010. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.* 11, 597–610. doi:10.1038/nrg2843

Kroon, E., Martinson, L.A., Kadoya, K., Bang, A.G., Kelly, O.G., Eliazar, S., Young, H., Richardson, M., Smart, N.G., Cunningham, J., Agulnick, A.D., D'Amour, K.A., Carpenter, M.K., Baetge, E.E., 2008. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat. Biotechnol.* 26, 443–452. doi:10.1038/nbt1393

Kruse, F., Rose, S.D., Swift, G.H., Hammer, R.E., MacDonald, R.J., 1995. Cooperation between elements of an organ-specific transcriptional enhancer in animals. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4385–4394.

Kruse, F., Rose, S.D., Swift, G.H., Hammer, R.E., MacDonald, R.J., 1993. An endocrine-specific element is an integral component of an exocrine-specific pancreatic enhancer. *Genes Dev.* 7, 774–786.

Kulkarni, R.N., 2004. The islet beta-cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 365–371.

Lahmy, R., Soleimani, M., Sanati, M.H., Behmanesh, M., Kouhkan, F., Mobarra, N., 2014. MiRNA-375 promotes beta pancreatic differentiation in human induced pluripotent stem (hiPS) cells. *Mol. Biol. Rep.* 41, 2055–2066. doi:10.1007/s11033-014-3054-4

Lahmy, R., Soleimani, M., Sanati, M.H., Behmanesh, M., Kouhkan, F., Mobarra, N., 2013. Pancreatic islet differentiation of human embryonic stem cells by microRNA overexpression. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* doi:10.1002/term.1787

Lakey, J.R.T., Mirbolooki, M., Shapiro, A.M.J., 2006. Current status of clinical islet cell transplantation. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 333, 47–104. doi:10.1385/1-59745-049-9:47

Lee, J.M., Dedhar, S., Kalluri, R., Thompson, E.W., 2006. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J. Cell Biol.* 172, 973–981. doi:10.1083/jcb.200601018

Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., Kim, V.N., 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23, 4051–4060. doi:10.1038/sj.emboj.7600385

Leung, P.S., Ip, S.P., 2006. Pancreatic acinar cell: Its role in acute pancreatitis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 1024–1030. doi:10.1016/j.biocel.2005.12.001

Liao, X., Xue, H., Wang, Y.-C., Nazor, K.L., Guo, S., Trivedi, N., Peterson, S.E., Liu, Y., Loring, J.F., Laurent, L.C., 2013. Matched miRNA and mRNA signatures from an hESC-based in vitro model of pancreatic differentiation reveal novel regulatory interactions. *J. Cell Sci.* 126, 3848–3861. doi:10.1242/jcs.123570

Lima, M.J., Docherty, H.M., Chen, Y., Docherty, K., 2012. Efficient differentiation of AR42J cells towards insulin-producing cells using pancreatic transcription factors in combination with growth factors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 358, 69–80. doi:10.1016/j.mce.2012.02.024

Li, W., Cavelti-Weder, C., Zhang, Y., Clement, K., Donovan, S., Gonzalez, G., Zhu, J., Stemann, M., Xu, K., Hashimoto, T., Yamada, T., Nakanishi, M., Zhang, Y., Zeng, S., Gifford, D., Meissner, A., Weir, G., Zhou, Q., 2014. Long-term persistence and development of induced pancreatic beta cells generated by lineage conversion of acinar cells. *Nat. Biotechnol.* 32, 1223–1230. doi:10.1038/nbt.3082

Logsdon, C.D., Ji, B., 2013. The role of protein synthesis and digestive enzymes in acinar cell injury. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 362–370. doi:10.1038/nrgastro.2013.36

Longnecker, D.S., Lilja, H.S., French, J., Kuhlmann, E., Noll, W., 1979. Transplantation of azaserine-induced carcinomas of pancreas in rats. *Cancer Lett.* 7, 197–202.

Lu, J., Dong, H., Lin, L., Wang, Q., Huang, L., Tan, J., 2014. miRNA-302 facilitates reprogramming of human adult hepatocytes into pancreatic islets-like cells in combination with a chemical defined media. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 453, 405–410. doi:10.1016/j.bbrc.2014.09.095

Lynn, F.C., Skewes-Cox, P., Kosaka, Y., McManus, M.T., Harfe, B.D., German, M.S., 2007. MicroRNA expression is required for pancreatic islet cell genesis in the mouse. *Diabetes* 56, 2938–2945. doi:10.2337/db07-0175

Mansouri, A., 2012. Development and regeneration in the endocrine pancreas. *ISRN Endocrinol.* 2012, 640956. doi:10.5402/2012/640956

Martín, M., Gallego-Llamas, J., Ribes, V., Kedinger, M., Niederreither, K., Chambon, P., Dollé, P., Gradwohl, G., 2005. Dorsal pancreas agenesis in retinoic acid-deficient *Raldh2* mutant mice. *Dev. Biol.* 284, 399–411. doi:10.1016/j.ydbio.2005.05.035

Mas, A., Montané, J., Anguela, X.M., Muñoz, S., Douar, A.M., Riu, E., Otaegui, P., Bosch, F., 2006. Reversal of type 1 diabetes by engineering a glucose sensor in skeletal muscle. *Diabetes* 55, 1546–1553. doi:10.2337/db05-1615

Mashima, H., Ohnishi, H., Wakabayashi, K., Mine, T., Miyagawa, J., Hanafusa, T., Seno, M., Yamada, H., Kojima, I., 1996. Betacellulin and activin A coordinately

convert amylase-secreting pancreatic AR42J cells into insulin-secreting cells. *J. Clin. Invest.* 97, 1647–1654. doi:10.1172/JCI118591

Masui, T., Long, Q., Beres, T.M., Magnuson, M.A., MacDonald, R.J., 2007. Early pancreatic development requires the vertebrate Suppressor of Hairless (RBPJ) in the PTF1 bHLH complex. *Genes Dev.* 21, 2629–2643. doi:10.1101/gad.1575207

Masui, T., Swift, G.H., Deering, T., Shen, C., Coats, W.S., Long, Q., Elsässer, H.-P., Magnuson, M.A., MacDonald, R.J., 2010. Replacement of Rbpj with Rbpjl in the PTF1 complex controls the final maturation of pancreatic acinar cells. *Gastroenterology* 139, 270–280. doi:10.1053/j.gastro.2010.04.003

Matsuoka, T., Kaneto, H., Stein, R., Miyatsuka, T., Kawamori, D., Henderson, E., Kojima, I., Matsuhisa, M., Hori, M., Yamasaki, Y., 2007. MafA regulates expression of genes important to islet beta-cell function. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 21, 2764–2774. doi:10.1210/me.2007-0028

Medici, D., Hay, E.D., Olsen, B.R., 2008. Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3. *Mol. Biol. Cell* 19, 4875–4887. doi:10.1091/mbc.E08-05-0506

Mehran, A.E., Templeman, N.M., Brigidi, G.S., Lim, G.E., Chu, K.-Y., Hu, X., Botezelli, J.D., Asadi, A., Hoffman, B.G., Kieffer, T.J., Bamji, S.X., Clee, S.M., Johnson, J.D., 2012. Hyperinsulinemia drives diet-induced obesity independently of brain insulin production. *Cell Metab.* 16, 723–737. doi:10.1016/j.cmet.2012.10.019

Melton, C., Judson, R.L., Billewicz, R., 2010. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature* 463, 621–626. doi:10.1038/nature08725

Mittereder, N., March, K.L., Trapnell, B.C., 1996. Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J. Virol.* 70, 7498–7509.

Morita, S., Hara, A., Kojima, I., Horii, T., Kimura, M., Kitamura, T., Ochiya, T., Nakanishi, K., Matoba, R., Matsubara, K., Hatada, I., 2009. Dicer is required for maintaining adult pancreas. *PloS One* 4, e4212. doi:10.1371/journal.pone.0004212

Morró, M., Teichenne, J., Jimenez, V., Kratzer, R., Marletta, S., Maggioni, L., Mallol, C., Ruberte, J., Kochanek, S., Bosch, F., Ayuso, E., 2014. Pancreatic transduction by helper-dependent adenoviral vectors via intraductal delivery. *Hum. Gene Ther.* 25, 824–836. doi:10.1089/hum.2013.182

Nagaoka, T., Fukuda, T., Hashizume, T., Nishiyama, T., Tada, H., Yamada, H., Salomon, D.S., Yamada, S., Kojima, I., Seno, M., 2008. A betacellulin mutant promotes differentiation of pancreatic acinar AR42J cells into insulin-producing cells with low affinity of binding to ErbB1. *J. Mol. Biol.* 380, 83–94. doi:10.1016/j.jmb.2008.03.054

Nathan, D.M., DCCT/EDIC Research Group, 2014. The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: overview. *Diabetes Care* 37, 9–16. doi:10.2337/dc13-2112

Nieto, M., Hevia, P., Garcia, E., Klein, D., Alvarez-Cubela, S., Bravo-Egana, V., Rosero, S., Damaris Molano, R., Vargas, N., Ricordi, C., Pileggi, A., Diez, J., Domínguez-Bendala, J., Pastori, R.L., 2012. Antisense miR-7 impairs insulin expression in developing pancreas and in cultured pancreatic buds. *Cell Transplant.* 21, 1761–1774. doi:10.3727/096368911X612521

Ogihara, T., Fujitani, Y., Uchida, T., Kanno, R., Choi, J.B., Hirose, T., Kawamori, R., Watada, H., 2008. Combined expression of transcription factors induces AR42J-B13 cells to differentiate into insulin-producing cells. *Endocr. J.* 55, 691–698.

Olbrot, M., Rud, J., Moss, L.G., Sharma, A., 2002. Identification of beta-cell-specific insulin gene transcription factor RIPE3b1 as mammalian MafA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6737–6742. doi:10.1073/pnas.102168499

Olsson, R., Carlsson, P.-O., 2006. The pancreatic islet endothelial cell: emerging roles in islet function and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 492–497. doi:10.1016/j.biocel.2005.06.021

Ornitz, D.M., Palmiter, R.D., Hammer, R.E., Brinster, R.L., Swift, G.H., MacDonald, R.J., 1985. Specific expression of an elastase-human growth hormone fusion gene in pancreatic acinar cells of transgenic mice. *Nature* 313, 600–602.

Ørom, U.A., Nielsen, F.C., Lund, A.H., 2008. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol. Cell* 30, 460–471. doi:10.1016/j.molcel.2008.05.001

Pagliuca, F.W., Melton, D.A., 2013. How to make a functional β -cell. *Dev. Camb. Engl.* 140, 2472–2483. doi:10.1242/dev.093187

Pagliuca, F.W., Millman, J.R., Gürtler, M., Segel, M., Van Dervort, A., Ryu, J.H., Peterson, Q.P., Greiner, D., Melton, D.A., 2014. Generation of Functional Human Pancreatic β Cells In Vitro. *Cell* 159, 428–439. doi:10.1016/j.cell.2014.09.040

Park, L., Lee, E., Lee, S., Lim, M., Hong, H., Shin, G., Park, Y., 2008. TGF β plasmid construction and delivery for the prevention of type 1 diabetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1150, 177–182. doi:10.1196/annals.1447.017

Park, Y.M., Woo, S., Lee, G.T., Ko, J.-Y., Lee, Y., Zhao, Z.-S., Kim, H.J., Ahn, C.W., Cha, B.S., Kim, K.-S., Park, C.W., Lee, H.C., 2005. Safety and efficacy of adeno-associated viral vector-mediated insulin gene transfer via portal vein to the livers of streptozotocin-induced diabetic Sprague-Dawley rats. *J. Gene Med.* 7, 621–629. doi:10.1002/jgm.708

Pescovitz, M.D., Greenbaum, C.J., Bundy, B., Becker, D.J., Gitelman, S.E., Goland, R., Gottlieb, P.A., Marks, J.B., Moran, A., Raskin, P., Rodriguez, H., Schatz, D.A., Wherrett, D.K., Wilson, D.M., Krischer, J.P., Skyler, J.S., Type 1 Diabetes TrialNet Anti-CD20 Study Group, 2014. B-lymphocyte depletion with rituximab and β -cell function: two-year results. *Diabetes Care* 37, 453–459. doi:10.2337/dc13-0626

Petersen, H.V., Serup, P., Leonard, J., Michelsen, B.K., Madsen, O.D., 1994. Transcriptional regulation of the human insulin gene is dependent on the homeodomain protein STF1/IPF1 acting through the CT boxes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10465–10469.

Peyton, M., Moss, L.G., Tsai, M.J., 1994. Two distinct class A helix-loop-helix transcription factors, E2A and BETA1, form separate DNA binding complexes on the insulin gene E box. *J. Biol. Chem.* 269, 25936–25941.

Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.

Pictet, R.L., Clark, W.R., Williams, R.H., Rutter, W.J., 1972. An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. *Dev. Biol.* 29, 436–467.

Place, R.F., Li, L.-C., Pookot, D., Noonan, E.J., Dahiya, R., 2008. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 1608–1613. doi:10.1073/pnas.0707594105

Poy, M.N., Eliasson, L., Krutzfeldt, J., Kuwajima, S., Ma, X., Macdonald, P.E., Pfeffer, S., Tuschl, T., Rajewsky, N., Rorsman, P., Stoffel, M., 2004. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 432, 226–230. doi:10.1038/nature03076

Poy, M.N., Hausser, J., Trajkovski, M., Braun, M., Collins, S., Rorsman, P., Zavolan, M., Stoffel, M., 2009. miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 5813–5818. doi:10.1073/pnas.0810550106

Prado, C.L., Pugh-Bernard, A.E., Elghazi, L., Sosa-Pineda, B., Sussel, L., 2004. Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2924–2929. doi:10.1073/pnas.0308604100

Printz, R.L., Magnuson, M.A., Granner, D.K., 1993. Mammalian glucokinase. *Annu. Rev. Nutr.* 13, 463–496. doi:10.1146/annurev.nu.13.070193.002335

Probert, P.M.E., Chung, G.W., Cockell, S.J., Agius, L., Mosesso, P., White, S.A., Oakley, F., Brown, C.D.A., Wright, M.C., 2014. Utility of B-13 progenitor-derived hepatocytes in hepatotoxicity and genotoxicity studies. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 137, 350–370. doi:10.1093/toxsci/kft258

Puri, S., Hebrok, M., 2010. Cellular plasticity within the pancreas--lessons learned from development. *Dev. Cell* 18, 342–356. doi:10.1016/j.devcel.2010.02.005

Qader, S.S., Håkanson, R., Rehfeld, J.F., Lundquist, I., Salehi, A., 2008. Proghrelin-derived peptides influence the secretion of insulin, glucagon, pancreatic polypeptide and somatostatin: a study on isolated islets from mouse and rat pancreas. *Regul. Pept.* 146, 230–237. doi:10.1016/j.regpep.2007.09.017

Qader, S.S., Lundquist, I., Ekelund, M., Håkanson, R., Salehi, A., 2005. Ghrelin activates neuronal constitutive nitric oxide synthase in pancreatic islet cells while inhibiting insulin release and stimulating glucagon release. *Regul. Pept.* 128, 51–56. doi:10.1016/j.regpep.2004.12.018

Rahier, J., Wallon, J., Henquin, J.C., 1981. Cell populations in the endocrine pancreas of human neonates and infants. *Diabetologia* 20, 540–546.

Raper, S.E., Chirmule, N., Lee, F.S., Wivel, N.A., Bagg, A., Gao, G., Wilson, J.M., Batshaw, M.L., 2003. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol. Genet. Metab.* 80, 148–158.

Ren, J., Jin, P., Wang, E., Marincola, F.M., Stroncek, D.F., 2009. MicroRNA and gene expression patterns in the differentiation of human embryonic stem cells. *J. Transl. Med.* 7, 20. doi:10.1186/1479-5876-7-20

Rezania, A., Bruin, J.E., Arora, P., Rubin, A., Batushansky, I., Asadi, A., O'Dwyer, S., Quiskamp, N., Mojibian, M., Albrecht, T., Yang, Y.H.C., Johnson, J.D., Kieffer, T.J., 2014. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 32, 1121–1133. doi:10.1038/nbt.3033

Rindler, M.J., Xu, C.-F., Gumper, I., Smith, N.N., Neubert, T.A., 2007. Proteomic analysis of pancreatic zymogen granules: identification of new granule proteins. *J. Proteome Res.* 6, 2978–2992. doi:10.1021/pr0607029

Ropper, A.H., Gorson, K.C., Gooch, C.L., Weinberg, D.H., Pieczek, A., Ware, J.H., Kershen, J., Rogers, A., Simovic, D., Schratzberger, P., Kirchmair, R., Losordo, D., 2009. Vascular endothelial growth factor gene transfer for diabetic polyneuropathy: a randomized, double-blinded trial. *Ann. Neurol.* 65, 386–393. doi:10.1002/ana.21675

Rorsman, P., Renström, E., 2003. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46, 1029–1045. doi:10.1007/s00125-003-1153-1

Rosa, A., Brivanlou, A.H., 2011. A regulatory circuitry comprised of miR-302 and the transcription factors OCT4 and NR2F2 regulates human embryonic stem cell differentiation. *EMBO J.* 30, 237–248. doi:10.1038/emboj.2010.319

Rose, S.D., Swift, G.H., Peyton, M.J., Hammer, R.E., MacDonald, R.J., 2001. The role of PTF1-P48 in pancreatic acinar gene expression. *J. Biol. Chem.* 276, 44018–44026. doi:10.1074/jbc.M106264200

Rossi, J.M., Dunn, N.R., Hogan, B.L., Zaret, K.S., 2001. Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev.* 15, 1998–2009. doi:10.1101/gad.904601

Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrott, R.H., Ward, T.G., 1953. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.* N 84, 570–573.

Rukstalis, J.M., Habener, J.F., 2009. Neurogenin3: a master regulator of pancreatic islet differentiation and regeneration. *Islets* 1, 177–184. doi:10.4161/isl.1.3.9877

Russell, W.C., 2009. Adenoviruses: update on structure and function. *J. Gen. Virol.* 90, 1–20. doi:10.1099/vir.0.003087-0

Saltiel, A.R., Kahn, C.R., 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799–806. doi:10.1038/414799a

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 Dev.* 11, 1662–1673.

Sayed, D., Abdellatif, M., 2011. MicroRNAs in development and disease. *Physiol. Rev.* 91, 827–887. doi:10.1152/physrev.00006.2010

Schaffer, A.E., Freude, K.K., Nelson, S.B., Sander, M., 2010. Nkx6 transcription factors and Ptf1a function as antagonistic lineage determinants in multipotent pancreatic progenitors. *Dev. Cell* 18, 1022–1029. doi:10.1016/j.devcel.2010.05.015

Seymour, P.A., Freude, K.K., Dubois, C.L., Shih, H.-P., Patel, N.A., Sander, M., 2008. A dosage-dependent requirement for Sox9 in pancreatic endocrine cell formation. *Dev. Biol.* 323, 19–30. doi:10.1016/j.ydbio.2008.07.034

Shapiro, A.M.J., 2011. State of the art of clinical islet transplantation and novel protocols of immunosuppression. *Curr. Diab. Rep.* 11, 345–354. doi:10.1007/s11892-011-0217-8

Shapiro, A.M., Lakey, J.R., Ryan, E.A., Korbitt, G.S., Toth, E., Warnock, G.L., Kneteman, N.M., Rajotte, R.V., 2000. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N. Engl. J. Med.* 343, 230–238. doi:10.1056/NEJM200007273430401

Shen, C.-N., Slack, J.M., Tosh, D., 2000. Molecular basis of transdifferentiation of pancreas to liver. *Nat. Cell Biol.* 2, 879–887.

Sheridan, C., 2011. Gene therapy finds its niche. *Nat. Biotechnol.* 29, 121–128. doi:10.1038/nbt.1769

Sherry, N., Hagopian, W., Ludvigsson, J., Jain, S.M., Wahlen, J., Ferry, R.J., Bode, B., Aronoff, S., Holland, C., Carlin, D., King, K.L., Wilder, R.L., Pillemer, S., Bonvini, E., Johnson, S., Stein, K.E., Koenig, S., Herold, K.C., Daifotis, A.G., Protégé Trial Investigators, 2011. Teplizumab for treatment of type 1 diabetes (Protégé study): 1-year results from a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 378, 487–497. doi:10.1016/S0140-6736(11)60931-8

Shih, H.P., Kopp, J.L., Sandhu, M., Dubois, C.L., Seymour, P.A., Grapin-Botton, A., Sander, M., 2012. A Notch-dependent molecular circuitry initiates pancreatic endocrine and ductal cell differentiation. *Dev. Camb. Engl.* 139, 2488–2499. doi:10.1242/dev.078634

Shih, H.P., Wang, A., Sander, M., 2013. Pancreas organogenesis: from lineage determination to morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29, 81–105. doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122405

Simion, A., Laudadio, I., Prévot, P.-P., Raynaud, P., Lemaigre, F.P., Jacquemin, P., 2010. MiR-495 and miR-218 regulate the expression of the Onecut transcription factors HNF-6 and OC-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 293–298. doi:10.1016/j.bbrc.2009.11.052

Solar, M., Cardalda, C., Houbracken, I., Martín, M., Maestro, M.A., De Medts, N., Xu, X., Grau, V., Heimberg, H., Bouwens, L., Ferrer, J., 2009. Pancreatic exocrine duct cells give rise to insulin-producing beta cells during embryogenesis but not after birth. *Dev. Cell* 17, 849–860. doi:10.1016/j.devcel.2009.11.003

Stefan, Y., Grasso, S., Perrelet, A., Orci, L., 1982. The pancreatic polypeptide-rich lobe of the human pancreas: definitive identification of its derivation from the ventral pancreatic primordium. *Diabetologia* 23, 141–142.

Steiner, D.F., Park, S.-Y., Støy, J., Philipson, L.H., Bell, G.I., 2009. A brief perspective on insulin production. *Diabetes Obes. Metab.* 11 Suppl 4, 189–196. doi:10.1111/j.1463-1326.2009.01106.x

Strauss, W.M., Chen, C., Lee, C.-T., Ridzon, D., 2006. Nonrestrictive developmental regulation of microRNA gene expression. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* 17, 833–840. doi:10.1007/s00335-006-0025-7

Suh, M.-R., Lee, Y., Kim, J.Y., Kim, S.-K., Moon, S.-H., Lee, J.Y., Cha, K.-Y., Chung, H.M., Yoon, H.S., Moon, S.Y., Kim, V.N., Kim, K.-S., 2004. Human embryonic stem

cells express a unique set of microRNAs. *Dev. Biol.* 270, 488–498. doi:10.1016/j.ydbio.2004.02.019

Sunami, E., Kanazawa, H., Hashizume, H., Takeda, M., Hatakeyama, K., Ushiki, T., 2001. Morphological characteristics of Schwann cells in the islets of Langerhans of the murine pancreas. *Arch. Histol. Cytol.* 64, 191–201.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019

Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024

Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A.M., Lim, B., Rigoutsos, I., 2008. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* 455, 1124–1128. doi:10.1038/nature07299

Thompson, N., Gésina, E., Scheinert, P., Bucher, P., Grapin-Botton, A., 2012. RNA profiling and chromatin immunoprecipitation-sequencing reveal that PTF1a stabilizes pancreas progenitor identity via the control of MNX1/HLXB9 and a network of other transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* 32, 1189–1199. doi:10.1128/MCB.06318-11

Thulé, P.M., Liu, J.M., 2000. Regulated hepatic insulin gene therapy of STZ-diabetic rats. *Gene Ther.* 7, 1744–1752. doi:10.1038/sj.gt.3301297

Tollefson, A.E., Ryerse, J.S., Scaria, A., Hermiston, T.W., Wold, W.S., 1996. The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants. *Virology* 220, 152–162. doi:10.1006/viro.1996.0295

Tong, J., Prigeon, R.L., Davis, H.W., Bidlingmaier, M., Kahn, S.E., Cummings, D.E., Tschöp, M.H., D'Alessio, D., 2010. Ghrelin suppresses glucose-stimulated insulin secretion and deteriorates glucose tolerance in healthy humans. *Diabetes* 59, 2145–2151. doi:10.2337/db10-0504

Van Belle, T.L., Coppieters, K.T., von Herrath, M.G., 2011. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol. Rev.* 91, 79–118. doi:10.1152/physrev.00003.2010

Vanhorenbeeck, V., Jenny, M., Cornut, J.-F., Gradwohl, G., Lemaigre, F.P., Rousseau, G.G., Jacquemin, P., 2007. Role of the Onecut transcription factors in pancreas morphogenesis and in pancreatic and enteric endocrine differentiation. *Dev. Biol.* 305, 685–694. doi:10.1016/j.ydbio.2007.02.027

Vasudevan, S., Tong, Y., Steitz, J.A., 2007. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318, 1931–1934. doi:10.1126/science.1149460

Verma, I.M., Weitzman, M.D., 2005. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 711–738. doi:10.1146/annurev.biochem.74.050304.091637

Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T., Kim, Y.Y., 2010. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 1231–1243. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.06.013

Wallace, K., Fairhall, E.A., Charlton, K.A., Wright, M.C., 2010. AR42J-B-13 cell: An expandable progenitor to generate an unlimited supply of functional hepatocytes. *Toxicology* 278, 277–287. doi:10.1016/j.tox.2010.05.008

Wang, A.Y., Ehrhardt, A., Xu, H., Kay, M.A., 2007. Adenovirus transduction is required for the correction of diabetes using Pdx-1 or Neurogenin-3 in the liver. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 15, 255–263. doi:10.1038/sj.mt.6300032

Wang, C., Yao, N., Lu, C.-L., Li, D., Ma, X., 2010. Mouse microRNA-124 regulates the expression of Hes1 in P19 cells. *Front. Biosci. Elite Ed.* 2, 127–132.

Wang, J., Kilic, G., Aydin, M., Burke, Z., Oliver, G., Sosa-Pineda, B., 2005. Prox1 activity controls pancreas morphogenesis and participates in the production of “secondary transition” pancreatic endocrine cells. *Dev. Biol.* 286, 182–194. doi:10.1016/j.ydbio.2005.07.021

Wang, S., Yan, J., Anderson, D.A., Xu, Y., Kanal, M.C., Cao, Z., Wright, C.V.E., Gu, G., 2010. Neurog3 gene dosage regulates allocation of endocrine and exocrine cell fates in the developing mouse pancreas. *Dev. Biol.* 339, 26–37. doi:10.1016/j.ydbio.2009.12.009

Wentworth, B.M., Schaefer, I.M., Villa-Komaroff, L., Chirgwin, J.M., 1986. Characterization of the two nonallelic genes encoding mouse preproinsulin. *J. Mol. Evol.* 23, 305–312.

Whitcomb, D.C., Lowe, M.E., 2007. Human pancreatic digestive enzymes. *Dig. Dis. Sci.* 52, 1–17. doi:10.1007/s10620-006-9589-z

Wilson, M.E., Scheel, D., German, M.S., 2003. Gene expression cascades in pancreatic development. *Mech. Dev.* 120, 65–80.

Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., Diederichs, S., 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* 11, 228–234. doi:10.1038/ncb0309-228

Xie, W., Schultz, M.D., Lister, R., Hou, Z., Rajagopal, N., Ray, P., Whitaker, J.W., Tian, S., Hawkins, R.D., Leung, D., Yang, H., Wang, T., Lee, A.Y., Swanson, S.A., Zhang, J., Zhu, Y., Kim, A., Nery, J.R., Urich, M.A., Kuan, S., Yen, C., Klugman, S., Yu, P., Suknuntha, K., Propson, N.E., Chen, H., Edsall, L.E., Wagner, U., Li, Y., Ye, Z., Kulkarni, A., Xuan, Z., Chung, W.-Y., Chi, N.C., Antosiewicz-Bourget, J.E., Slukvin, I., Stewart, R., Zhang, M.Q., Wang, W., Thomson, J.A., Ecker, J.R., Ren, B., 2013. Epigenomic Analysis of Multilineage Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *Cell* 153, 1134–1148. doi:10.1016/j.cell.2013.04.022

Xu, N., Papagiannakopoulos, T., Pan, G., Thomson, J.A., Kosik, K.S., 2009. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell* 137, 647–658. doi:10.1016/j.cell.2009.02.038

Yada, T., Dezaki, K., Sone, H., Koizumi, M., Damdindorj, B., Nakata, M., Kakei, M., 2008. Ghrelin regulates insulin release and glycemia: physiological role and therapeutic potential. *Curr. Diabetes Rev.* 4, 18–23.

Yang, Y., Nunes, F.A., Berencsi, K., Furth, E.E., Gönczöl, E., Wilson, J.M., 1994. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 4407–4411.

Yi, R., O'Carroll, D., Pasolli, H.A., Zhang, Z., Dietrich, F.S., Tarakhovskiy, A., Fuchs, E., 2006. Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs. *Nat. Genet.* 38, 356–362. doi:10.1038/ng1744

Yoshida, S., Ohbo, K., Takakura, A., Takebayashi, H., Okada, T., Abe, K., Nabeshima, Y., 2001. Sgn1, a basic helix-loop-helix transcription factor delineates the salivary gland duct cell lineage in mice. *Dev. Biol.* 240, 517–530. doi:10.1006/dbio.2001.0473

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I.I., Thomson, J.A., 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917–1920. doi:10.1126/science.1151526

Zaiss, A.K., Machado, H.B., Herschman, H.R., 2009. The influence of innate and pre-existing immunity on adenovirus therapy. *J. Cell. Biochem.* 108, 778–790. doi:10.1002/jcb.22328

Zaldumbide, A., Carlotti, F., Gonçalves, M.A., Knaän-Shanzer, S., Cramer, S.J., Roep, B.O., Wiertz, E.J.H.J., Hoeben, R.C., 2012. Adenoviral Vectors Stimulate Glucagon Transcription in Human Mesenchymal Stem Cells Expressing Pancreatic Transcription Factors. *PLoS ONE* 7, e48093. doi:10.1371/journal.pone.0048093

Zanta-Boussif, M.A., Charrier, S., Brice-Ouzet, A., Martin, S., Opolon, P., Thrasher, A.J., Hope, T.J., Galy, A., 2009. Validation of a mutated PRE sequence allowing high and sustained transgene expression while abrogating WHV-X protein synthesis:

application to the gene therapy of WAS. *Gene Ther.* 16, 605–619. doi:10.1038/gt.2009.3

Zhang, Z.-W., Zhang, L.-Q., Ding, L., Wang, F., Sun, Y.-J., An, Y., Zhao, Y., Li, Y.-H., Teng, C.-B., 2011. MicroRNA-19b downregulates insulin 1 through targeting transcription factor NeuroD1. *FEBS Lett.* 585, 2592–2598. doi:10.1016/j.febslet.2011.06.039

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, 627–632. doi:10.1038/nature07314

Zhou, Q., Law, A.C., Rajagopal, J., Anderson, W.J., Gray, P.A., Melton, D.A., 2007. A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis. *Dev. Cell* 13, 103–114. doi:10.1016/j.devcel.2007.06.001

Zhou, Q., Melton, D.A., 2008. Extreme makeover: converting one cell into another. *Cell Stem Cell* 3, 382–388. doi:10.1016/j.stem.2008.09.015

Zhou, Z., Jensen, P.E., 2013. Structural Characteristics of HLA-DQ that May Impact DM Editing and Susceptibility to Type-1 Diabetes. *Front. Immunol.* 4, 262. doi:10.3389/fimmu.2013.00262

Zhu, J., Adli, M., Zou, J.Y., Verstappen, G., Coyne, M., Zhang, X., Durham, T., Miri, M., Deshpande, V., De Jager, P.L., Bennett, D.A., Houmard, J.A., Muoio, D.M., Onder, T.T., Camahort, R., Cowan, C.A., Meissner, A., Epstein, C.B., Shores, N., Bernstein, B.E., 2013. Genome-wide Chromatin State Transitions Associated with Developmental and Environmental Cues. *Cell* 152, 642–654. doi:10.1016/j.cell.2012.12.033

Ziv, O., Glaser, B., Dor, Y., 2013. The plastic pancreas. *Dev. Cell* 26, 3–7. doi:10.1016/j.devcel.2013.06.013

Zorn, A.M., Wells, J.M., 2009. Vertebrate endoderm development and organ formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25, 221–251. doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113344

