

# Diabetes mellitus: Zelluläre Plastizität und Perspektiven für die regenerative Therapie

**Dr. Elke Schlüssel<sup>2</sup>, Dr. Adriana Migliorini<sup>1,2</sup>, Erik Bader<sup>1,2,3</sup>, Prof. Dr. Heiko Lickert<sup>1,2,4</sup>**

<sup>1</sup> Institut für Stammzellforschung | Helmholtz Zentrum München | Ingolstädter Landstraße 1 | 85764 Neuherberg

<sup>2</sup> Institut für Diabetes und Regenerationsforschung | Helmholtz Zentrum München | Parkring 11 | 85748 Garching

<sup>3</sup> Forschungszentrum für Molekulare Epidemiologie | Institut für Epidemiologie II  
Helmholtz Zentrum München | Ingolstädter Landstraße 1 | 85764 Neuherberg

<sup>4</sup> Deutsches Zentrum für Diabetesforschung (DZD)

Beim Diabetes mellitus handelt es sich um eine multifaktorielle Erkrankung, die durch den Verlust oder die mangelnde Funktion von Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen charakterisiert ist. Dies führt zur Störung des Stoffwechsels. Diabetes vom Typ 1 (T1D) und vom Typ 2 (T2D) unterscheiden sich in ihrer Pathogenese. T1D ist eine Autoimmunkrankheit, bei der die  $\beta$ -Zellen zerstört werden, wobei beim T2D meist durch eine periphere Insulinresistenz die  $\beta$ -Zellen durch Erschöpfung ihre Funktion verlieren und durch programmierten Zelltod verloren gehen. Das wichtigste Ziel für eine verbesserte Therapie beider Erkrankungen ist die Wiederherstellung der  $\beta$ -Zellmasse und -funktion. Hierfür kann entweder die verlorene  $\beta$ -Zellmasse durch Zellersatztherapie erneuert werden. Alternativ könnte die  $\beta$ -Zellmasse und/oder -funktion durch die Aktivierung intrinsischer Regenerationsmechanismen wiederhergestellt werden. Für T1D kann man sich als kurative Therapie eine Kombination aus  $\beta$ -Zell-Ersatz und Immunmodulation vorstellen. Bei T2D könnte eine Stärkung der endogenen Mechanismen der  $\beta$ -Zell-Regeneration zu einer Verbesserung der Blutglukosekontrolle führen. Wir stellen hier aktuelle Forschungsschwerpunkte im Bereich der  $\beta$ -Zell-Regeneration vor. Die vielversprechendsten Ansätze sind a) eine Erhöhung der Selbstreplikation der  $\beta$ -Zellen oder deren Neogenese aus fakultativen Stammzellen des Pankreas und b) die Umwandlung von  $\alpha$ -Zellen in  $\beta$ -Zellen.

### Degeneration und Regeneration von $\beta$ -Zellen

Beim Diabetes mellitus handelt es sich um eine Stoffwechselerkrankung, die durch den progressiven Verlust oder die mangelnde Funktion von Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen im Pankreas charakterisiert ist. Dies führt zu Hyperglykämie und in der Folge zu multiplen Komplikationen und Schädigungen von Organen. Diabetes ist zwar gut behandelbar, aber das Versagen von  $\beta$ -Zellen ist ein progressiver Vorgang und für keine der beiden Erkrankungsformen gibt es derzeit eine kurative Therapie.

Beim T1D entsteht durch die Zerstörung von  $\beta$ -Zellen im Zuge einer Autoimmunreaktion ein Insulinmangel. Die einzig mögliche kurative Therapie besteht in einem Ersatz der verlorenen  $\beta$ -Zell-Masse durch Transplantation von Inseln

aus verstorbenen Spendern [1]. Aufgrund der Knappheit transplantierbaren Materials werden alternative Ansätze verfolgt, wie zum Beispiel die in vitro Erzeugung von  $\beta$ -Zellen aus der unbeschränkten Quelle sich selbst erneuernder Stammzellen, wie zum Beispiel embryonaler Stammzellen [2]. Bisher ist es allerdings noch nicht gelungen, in effizienter Art und Weise aus Stammzellen funktionell reife  $\beta$ -Zellen zu erzeugen. Deshalb liegt ein Schwerpunkt der Forschung auf der Entwicklung verbesserter Protokolle für die Zelldifferenzierung, um mehr transplantierbares Material zu gewinnen und zukünftig erfolgreiche Zellersatz-Therapien zu ermöglichen. Dies wird zum Beispiel in einem europäischen Konsortium von sechs akademischen und drei industriellen Partnern vorangetrieben ([www.hum-en.eu](http://www.hum-en.eu)).

Beim Typ-2-Diabetes (T2D) entsteht durch Insulin-Resistenz peripherer Gewebe ein erhöhter Insulin-Bedarf. Dieser wiederum führt zu einer Vergrößerung der  $\beta$ -Zell-Masse und zu Hyperinsulinämie. Allerdings erschöpft sich nach und nach der Bestand an  $\beta$ -Zellen, und Dysfunktion (Defekte in der Insulinsekretion) setzt ein. Letztendlich geht die Masse an  $\beta$ -Zellen durch Apoptose verloren [3-7]. Aktuell wurde zudem von einem neuartigen Mechanismus des Versagens der  $\beta$ -Zellen beim T2D berichtet, nach welchem reife, Insulin-produzierende  $\beta$ -Zellen zu einem „naiven“ Status dedifferenzieren [8]. Der einzige Weg zu einer verbesserten Behandlung von Patienten mit T2D scheint also der Ersatz oder die Regeneration der verlorenen oder funktionslosen Masse an  $\beta$ -Zellen zu sein. Dies kann dadurch erreicht werden, dass die Proliferation von  $\beta$ -Zellen oder deren Neogenese angeregt wird, dass die Dedifferenzierung von  $\beta$ -Zellen rückgängig gemacht oder ihre Apoptose blockiert wird [9-12].

### Architektur der Langerhans'schen Inseln

Adulte murine Inseln im Pankreas bestehen zu 70-90% aus Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen und sind umgeben von  $\alpha$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ - und PP-Zellen, welche jeweils Glukagon, Somatostatin, Ghrelin und Polypeptide segregieren [13,14]. Diese unterschiedlichen endokrinen Zelltypen stellen die Hauptregulatoren des Nährstoffmetabolismus und der Glukose-Homöostase dar. Bemerkenswert ist, dass von Spezies zu Spezies die Archi-

tektur der Inseln in hohem Maß variiert [15]. In Nagern, zum Beispiel, sind die  $\beta$ -Zellen im Inneren der Inseln lokalisiert, während sie beim Menschen mit anderen endokrinen Zelltypen vergesellschaftet sind [16,17]. In Mäusen sind die  $\beta$ -Zellen in polarisierten, Rosetten-ähnlichen Strukturen um die Inselkapillaren herum organisiert. Letztere stellen Sauerstoff und Nährstoffe zur Verfügung und nehmen die Hormone, die von den endokrinen Zellen der Inseln abgesondert werden, in den Blutstrom auf [18-20]. In frühen Entwicklungsphasen findet ein Austausch zwischen Blutgefäßen und Vorläuferzellen des Pankreas statt. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Differenzierung von Organen [21]. Im Erwachsenenalter sondern endotheliale Zellen in den Inseln verschiedene Wachstumsfaktoren ab, wie zum Beispiel den Hepatozyten-Wachstumsfaktor (hepatocyte growth factor HGF) und den Bindegewebe-Wachstumsfaktor (connective tissue growth factor CTGF). Zusammen mit einer speziellen extrazellulären Matrix (extracellular matrix ECM) kontrollieren sie Funktion und Proliferation von  $\beta$ -Zellen [22]. Das Zusammenspiel von ECM, Zell-Zell-Adhäsion und Gap Junctions hält  $\beta$ -Zellen in einer dreidimensionalen (3D) Struktur und stellt die Koordination ihrer Funktion sicher [14]. Der Verlust des Gap-Junction-Proteins Connexin-36, beispielsweise, führt in Mäusen zu einer gestörten Glukose-Sensitivität und im Menschen zu einem erhöhten Risiko für T2D [23,24].

### $\beta$ -Zell-Nische

Die 3D Architektur der Inselzellen und ihrer benachbarten Zelltypen und die Interaktion mit der ECM legt die Vermutung nahe, dass die Insel eine wichtige Nische für die Funktion, das Wachstum und die Homöostase der  $\beta$ -Zelle darstellt. Apikal-basale (AB) und planare Polarität (planar cell polarity „PCP“) der verschiedenen Inselzelltypen sind die Voraussetzung für die übergeordnete 3D Organisation und für die Funktion der Inseln. Die Liver Kinase B1 (Lkb1) ist ein Protein, welches die AB-Polarität und den Energiestoffwechsel in verschiedenen Organen reguliert. Lkb1 ist eine Serin-Threonin-Kinase und hochkonserviert über verschiedene Spezies [25,26]. Nach konditioneller Ausschaltung von Lkb1 in Pankreasgewebe beobachtet man histologische Veränderungen in der polarisierten Anordnung der  $\beta$ -Zellen um die In-

selkapillaren. Dies legt den Schluss nahe, dass Lkb1 und seine Zielmoleküle eine Rolle in der Polarität der  $\beta$ -Zellen spielen [27]. Außerdem führt der Verlust von Lkb1 zu einem erhöhten Volumen der  $\beta$ -Zellen, verbesserter Glukosetoleranz bei Mäusen unter hoch fettthaltiger Diät sowie zu einer erhöhten Proliferation Insulinproduzierender Zellen [28]. Dass für eine geordnete Ausrichtung von Zellen in einer 3D-Struktur ebenso PCP unerlässlich ist, belegt die Tatsache, dass schon im Embryo an Tag 11.5 nach der Befruchtung in epithelialen Vorläuferzellen im Pankreas PCP-Proteine gefunden werden. Celsr2 und Celsr3 sind wichtige Komponenten des PCP-Komplexes und deren Funktionsverlust führt während der Fötalphase zu einer gestörten Differenzierung der  $\beta$ -Zellen aus endokrinen Vorläuferzellen [29]. Ein weiterer Hinweis auf die Relevanz der PCP in reifen Inseln ergab sich aus einer Studie mit Schwerpunkt auf dem aktivierenden Transkriptionsfaktor 2 (Activating Transcription Factor 2 ATF2). Hand und Kollegen konnten zeigen, dass ATF2, welches während der Morphogenese am WNT/PCP-Signalweg beteiligt ist [30], eine wichtige Rolle bei der Regulation der Expression des Insulin-Gens in reifen Inseln spielt. ATF2 interagiert mit wichtigen Transkriptionsfaktoren für  $\beta$ -Zellen, wie MAFA, PDX1 und BETA2 [31].

Neben den klassischen Signalwegen und Wachstumsfaktoren wie Wnt, Hedgehog, Notch usw., welche bekanntermaßen die  $\beta$ -Zell-Homöostase kontrollieren, ergibt sich aus den oben beschriebenen, neuen Befunden deutlich eine Rolle der Inselarchitektur und deren Komponenten in der Regulation der  $\beta$ -Zell-Funktion. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die 3D-Architektur der Insel-Nische aktiv dazu beiträgt, die  $\beta$ -Zell-Funktion aufrechtzuerhalten und bei einer Störung kompensatorische Mechanismen auslöst.

### Zelluläre Plastizität im Pankreas: Können wir Mechanismen der zellulären Plastizität für die Regeneration nutzbar machen?

Untersucht man endokrine und exokrine Zellen des Pankreas auf genetischer Ebene, fällt unter pathologischen oder experimentellen Bedingungen ein gewisses Ausmaß an zellulärer Plastizität auf (Abbildung 1). Zelluläre Plastizität bezeichnet die Kapazität eines spezialisierten Zelltyps, sich in einen anderen Zelltyp umzuwandeln,

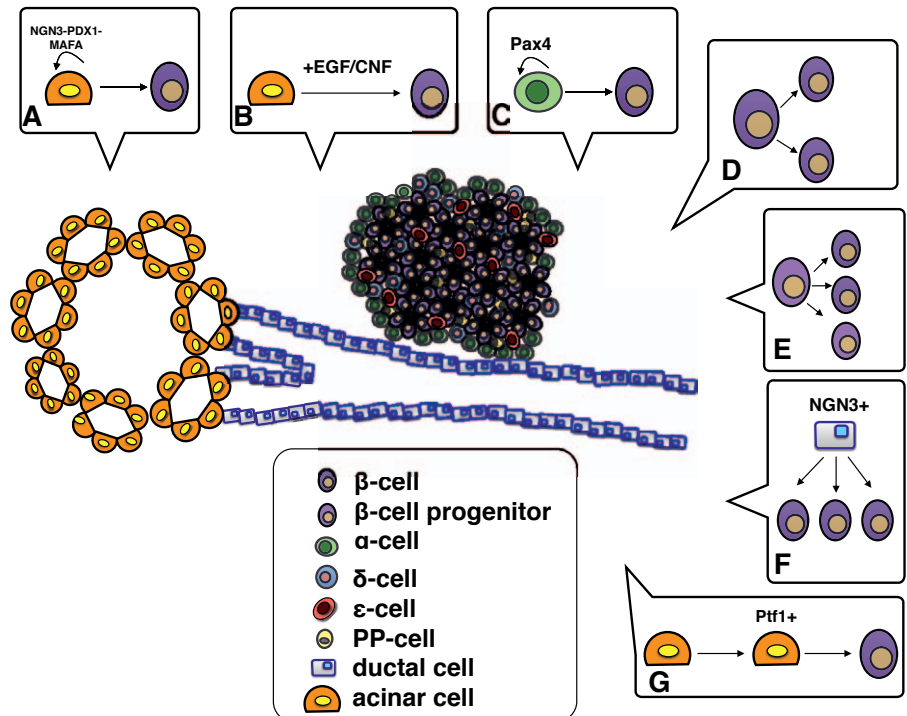


Abb. 1

**Mögliche Wege der  $\beta$ -Zell-Regeneration.** (A) Ektopische Expression von NGN3, PDX1 und MAFA in Azinus-Zellen löst die Bildung neuer  $\beta$ -Zell-ähnlicher Zellen aus. (B) Die Behandlung mit EGF und CNF löst die Umwandlung von Azinus-Zellen zu  $\beta$ -Zell-ähnlichen Zellen aus. (C) Ektopische Expression von Pax4 in  $\alpha$ -Zellen löst die Umwandlung in  $\beta$ -Zellen aus. (D) Proliferation existierender reifer  $\beta$ -Zellen. (E) Regeneration von  $\beta$ -Zellen aus multipotenten pankreatischen Vorläuferzellen in den Inseln. (F) Neogenese von  $\beta$ -Zellen aus NGN3-positiven duktaalen Vorläuferzellen. (G) Regeneration von  $\beta$ -Zellen aus Ptf1-positiven endokrinen Vorläuferzellen von Azinus-Zellen.

um den Verlust zellulärer oder systemischer Funktion zu kompensieren. Dies bedeutet, dass die Umwandlung von Zellen im Pankreas in  $\beta$ -Zellen für neuartige regenerative Therapien genutzt werden könnte.

In mehreren neuen Studien beschäftigten sich Forscher schwerpunktmäßig mit der Generierung von  $\beta$ -Zellen aus anderen Zelltypen des Pankreas, indem sie Schlüsselfaktoren der Transkription exprimierten, welche die Entwicklung der  $\beta$ -Zellen regulieren [32-35]. Im Jahr 2008 berichteten Zhou und Kollegen darüber, dass exokrine Zellen direkt *in vivo* zu Insulinproduzierenden Zellen umprogrammiert werden konnten, ohne dass Zellen repliziert oder in einen Vorläuferzell-ähnlichen Zustand versetzt wurden (36). Durch die Induktion der ektopischen Expression dreier endokriner Transkriptionsfaktoren (NGN3, PDX1 und MAFA) konnten die Autoren die Bildung neuer  $\beta$ -Zellen

aus Azinus-Zellen bewirken. Diese  $\beta$ -ähnlichen Zellen exprimierten  $\beta$ -Zell-spezifische Gene, zeigten morphologische Charakteristika von  $\beta$ -Zellen und verbesserten die Glukoselevel von diabetischen Mäusen. Diese aus Azinus-Zellen abgeleiteten  $\beta$ -Zellen verbanden sich jedoch nicht zu Inselstrukturen, was Fragen zu deren Reifegrad und funktionalem Status offen lässt [37]. In einer weiteren aktuellen Publikation wird über die *in vivo* Umwandlung von Azinus-Zellen des Pankreas zu  $\beta$ -Zell-ähnlichen Zellen mit Hilfe ähnlicher Mechanismen berichtet [38]. In hyperglykämischen adulten Mäusen wurden die Zellen vorübergehend einer Behandlung mit epidermalem Wachstumsfaktor (epidermal growth factor EGF) und ziliärem Nervenwachstumsfaktor (ciliary neurotrophic factor CNF) ausgesetzt. Die Umwandlung von Azinus- zu  $\beta$ -Zellen mittels intrinsischer oder extrinsischer Signalfaktoren scheint also eine Option für neue Behandlungsmethoden zu eröffnen.

Die Entscheidung für die exokrine oder endokrine Zelllinie fällt auf einer frühen Entwicklungsstufe. Die endokrinen Zelltypen stehen in enger Beziehung zueinander. Daher ist anzunehmen, dass diese Zellen wegen ihrer engen Verwandtschaft eine bessere Quelle für die Generierung neuer  $\beta$ -Zellen durch die Induktion zellulärer Plastizität darstellen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass humane  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zellen epigenomisch eng verwandt zu sein scheinen [32]. Dementsprechend gibt es viele Versuche, mit der Manipulation eines einzigen Gens die Umwandlung von Inselzellen in  $\beta$ -Zellen anzuregen [39,40]. Es berichten zum Beispiel Collombat und Kollegen, dass die ektoische Expression des Transkriptionsfaktors Pax4 in  $\alpha$ -Zellen deren Umwandlung in  $\beta$ -Zellen stimulierte. In einem Modellsystem, in dem  $\beta$ -Zellen durch die genetische Expression eines Zellgiftes vernichtet worden waren, konnten die aus  $\alpha$ -Zellen umgewandelten  $\beta$ -Zellen eine progressive Verbesserung der systemischen Glykämie bewirken [41]. Al-Hasani et al. konnten jüngst eine Verbindung zwischen der Pax4-vermittelten Umwandlung von  $\alpha$ - in  $\beta$ -Zellen zu einer verstärkten  $\beta$ -Zell-Regeneration durch Vorläuferzellen, welche am Pankreasgang zu finden sind, zeigen [42]. Andererseits führt die Expression des  $\alpha$ -Zell-spezifischen Transkriptionsfaktors Arx in  $\beta$ -Zellen zu einer Transdifferenzierung in die  $\alpha$ - oder PP-Zelllinie. Dies zeigt deutlich die Möglichkeit, dass durch induzierte Aktivierung dieses Faktors in  $\alpha$ - oder PP-Zellen eine Umwandlung von  $\alpha$ - zu  $\beta$ -Zellen induziert werden kann [43]. Schaffer et al. stellten kürzlich die wichtige Rolle des Transkriptionsfaktors Nkx6.1 als  $\beta$ -Zell-spezifischem Reprogrammierungsfaktor vor, mit dem die Entwicklungsrichtung zur  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Zelllinie bestimmt werden kann [33].

Neben allen Bemühungen zu verstehen, wie endokrine Zellen zu  $\beta$ -Zellen umprogrammiert werden können, verstärken sich die Hinweise auf die Hypothese, dass  $\alpha$ -Zellen eine natürliche Quelle von  $\beta$ -Zellen darstellen. Mittels eines Systems zur Nachverfolgung der genetischen Disposition bez. einer bestimmten Zelllinie (lineage tracing) konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ -Zellen nach beinahe kompletter Zerstörung der  $\beta$ -Zellen *in vivo* zu  $\beta$ -Zellen konvertieren [44]. Ein besseres Verständnis der Heterogenität und des epigenetischen Status endokriner Zellen wird ein ganz neues Forschungsgebiet eröffnen mit dem Ziel, genetische und epigene-

tische Manipulationen zu entwickeln, welche zu einer Umprogrammierung in Richtung  $\beta$ -Zelllinie führen. Zusätzliche Studien sind nötig, um den Nutzen und die möglichen Gefahren der inter- und intra-endokrinen Umwandlung in Richtung  $\beta$ -Zelllinie zu therapeutischen Zwecken zu verstehen.

### Regeneration von Inselzellen

Im Jahr 2004 postulierten Dor et al., dass die Proliferation von existierenden  $\beta$ -Zellen der Hauptmechanismus für die Regulation der  $\beta$ -Zellmasse im Erwachsenenalter ist, d.h. dass der Beitrag von Stammzellen zur  $\beta$ -Zellbildung sehr gering ist [45]. Die Selbst-Replikation von  $\beta$ -Zellen wurde von mehreren anderen Arbeitsgruppen bestätigt [46,47]. Beispielsweise nutzten Nir et al. ein transgenes Mausmodell für  $\beta$ -Zell-Mangel in Kombination mit einer *in vivo* Doppel-Label-Strategie von Thymidin-Analoga, um zu zeigen, dass sogar unter einem  $\beta$ -Zell-Mangelzustand die erhöhte Proliferation verbliebener  $\beta$ -Zellen den Hauptmechanismus für die  $\beta$ -Zell-Regeneration darstellt. Diese Beobachtung wurde kürzlich in mehreren Krankheitsmodellen bestätigt. Durch Beobachtung des Lebenszyklus der Insulin-produzierenden Zellen ergaben sich Anhaltspunkte, die gegen eine Neogenese von  $\beta$ -Zellen aus anderen Zelltypen als Insulin-produzierenden Zellen sprechen [48]. Beim Einsatz von Systemen zur Verfolgung genetisch bestimmter Zelllinien (lineage tracing) bestehen die meisten Bedenken wegen der geringen Markierungseffizienz und des beschränkten Beobachtungszeitfensters [49,50]. Außerdem basieren alle diese System auf der Annahme, dass eine mögliche Vorläuferzelle von  $\beta$ -Zellen durch die *de novo* Expression von Insulin charakterisiert sein sollte. Dabei bleibt unberücksichtigt, dass Vorläuferzellen schon Insulin exprimieren können. Dieses Szenario wird durch aktuelle Forschungsergebnisse gestützt. In murinen und in humanen Inseln des Pankreas wurde eine seltene Population einer multipotenten Vorläuferzelllinie (pancreatic multipotent precursor PMP) identifiziert, die Insulin und geringe Mengen des Glukosetransporters Glut2 exprimiert. PMP können pankreatische und neuronale Vorläufer *in vitro* erzeugen. Wie die aus dem Endoderm entstandenen PMP dabei Neuronen bilden sollen, ist jedoch unklar. Sicher ist, dass aus PMP *in vitro* und *in vivo* reife und auf Glukose ansprechende  $\beta$ -Zellen entstehen

können [51,52]. Aktuelle Daten aus dem Humanbereich zeigen, dass interessanterweise eher eine Neogenese von  $\beta$ -Zellen aus Vorläuferzellen stattfindet als die Proliferation von präexistierenden  $\beta$ -Zellen, wenn die Kompensation aufgrund einer erniedrigten Glukosetoleranz erfolgen muss [53]. Möglicherweise zeigt sich hier, dass sich in verschiedenen Spezies unterschiedliche Mechanismen der Regeneration entwickelt haben oder dass je nach Erkrankung unterschiedliche Regenerationsmechanismen aktiviert werden. Es ist auch denkbar, dass Neogenese und Proliferation existierender  $\beta$ -Zellen gleichzeitig existieren, um die  $\beta$ -Zell-Masse zu regulieren [50].

Während der Embryonalentwicklung enthält das Epithel des Pankreas multipotente Vorläuferzellen, aus denen alle Zelltypen des Pankreas entstehen: die duktafen, endokrinen und exokrinen Zelllinien [54,55]. Während die Zellen an der Spitze sich in Richtung Azinus-Zellen entwickeln, entstehen aus dem duktafen Epithel die endokrinen Vorläuferzellen, die vom Epithel auswandern und wieder zusammenschließen, um die Langerhans'schen Inseln zu bilden. Auf dieser Grundlage konzentriert sich die aktuelle Forschung auch auf das adulte duktafe bzw. Azinus-Epithel als mögliche fakultative Stammzellen. Man geht davon aus, dass diese Zellen ein embryonales Programm neu aktivieren und in die endokrine Zelllinie differenzieren können. Dem Konzept liegt die Hypothese zugrunde, dass bei einer Entzündung, Erkrankung oder längerem metabolischem Stress eine voll ausdifferenzierte Zelle des Pankreas dedifferenzieren und die Charakteristika von Stammzellen annehmen kann, um somit endokrine Zellen zu regenerieren [56]. Dieses Szenario wird gestützt durch Beobachtungen von Xu et al.. Die Arbeitsgruppe beobachtete in einem Modell, in dem eine Schädigung durch Ligation des Pankreasgangs erzeugt wird, dass in der duktafen Region endokrine Neurogenin3-positive Vorläuferzellen induziert werden und aus diesen alle Typen an Insel-Zellen hervorgehen [57]. Es wurde auch gezeigt, dass fakultativ CALL-positive duktafe Vorläuferzellen in alle endokrinen Zelllinien differenzieren und zur Kompensation von Gewebeerlust beitragen [58]. Es existieren allerdings auch andere Studien, welche der Hypothese der duktafen Vorläuferzellen widersprechen. Zum Beispiel zeigten Solar et al., dass Hnf1b-positive Vorläuferzellen aus dem embryonalen Pankreasgang postnatal nicht zum

endokrinen Wachstum beitragen und auch nicht zur  $\beta$ -Zell-Neogenese nach einer Ligation des Pankreasgangs oder nach chemisch-induzierter Entfernung der  $\beta$ -Zellen [59]. Bemerkenswerterweise zeigten die Hfn1bCreER-Mäuse während der Embryonalentwicklung eine geringe Markierungseffizienz und im Erwachsenenalter blieben die meisten Zellen des Pankreasgangs unmarkiert [60]. Weiterhin wurde kürzlich in einer Studie von Rankin und Kollegen gezeigt, dass das klassische Modell der Ligation des Pankreasgangs zu einer massiven Schädigung des Pankreas und einer Veränderung in der Zusammensetzung des Pankreas führt, jedoch nicht die  $\beta$ -Zell-Masse beeinflusst. Dies lässt darauf schließen, dass die Umwandlung von duktalem endokrinen Vorläuferzellen in die  $\beta$ -Zelllinie ausgelöst wird [61]. Tatsächlich wurden in einer aktuellen Studie von Pan et al. neue Anzeichen gefunden, dass im Pankreas multipotente Vorläuferzellen existieren und wie sie aussehen. Mittels eines eleganten Ansatzes zur Verfolgung von Zelllinien war es den Autoren möglich, räumlich-zeitliche Muster von Multipotenz in Ptf1a-exprimierenden Zellen während der Pankreasentwicklung zu ermitteln. Interessanterweise konnten die Autoren Hinweise dafür finden, dass Azinus-Zellen zu duktalem und  $\beta$ -Zellen transdifferenzieren können, ohne dass dafür exogene Faktoren nach einer Schädigung nötig wären [62]. Wie oben erwähnt konnten Al-Hasani et al. zunächst zeigen, dass  $\alpha$ -Zellen Pax4-vermittelt in  $\beta$ -Zellen umzuwandeln sind und dass duktales Vorläuferzellen in endokrine Zellen differenzieren. Man geht davon aus, dass dies durch ein Wiedererwachen des embryonalen Prozesses des Epithelial-Mesenchymalen-Übergangs (epithelial-mesenchymal transition EMT) geschieht und dass unter bestimmten Voraussetzungen duktales Zellen als fakultative endokrine Vorläuferzellen dienen [42]. Diese Annahme wird gestützt durch Daten aus Humanstudien, die zeigen, dass 15% aller  $\beta$ -Zellen in Ansammlungen längs des Pankreasgangs lokalisiert sind. *In vitro* scheinen humane Zellen des Pankreasgangs die Kapazität, in endokrine, exokrine und hepatische Zellen zu differenzieren, beizubehalten [63,64]. Ein besseres Verständnis der Plastizität pankreatischer Zellen, der Proliferation von  $\beta$ -Zellen und der Neogenese aus Vorläuferzellen ist dringend nötig. Die Identifikation spezifischer Vorläuferzellen wird es ermöglichen, Rezeptoren und molekulare Stoffwechselwege, die für die Regeneration von  $\beta$ -Zellen nötig sind, zu induzieren.

| Molekül                             | Syntheseort                                 | Effekt / Wirkort                                                          |
|-------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Betacellulin (BTC)                  | viele Zelltypen, u.a. $\beta$ -Zellen       | Anregung von $\beta$ -Zellen im Pankreas zum Wiedereintritt in Zellzyklus |
| Glukagon-ähnliches Peptid (Glp-1)   | L-Zellen im Duodenum                        | Glukose-stimulierte Insulinausschüttung der $\beta$ -Zellen erhöht        |
| Gastro-inhibitorisches Peptid (GIP) | K-Zellen im Duodenum                        |                                                                           |
| Prolactin (Prl)                     | laktotrope Zellen im Hypophysenvorderlappen | Nicht genau bekannt, Expansion der $\beta$ -Zell-Masse                    |
| Laktogene                           | Plazenta                                    |                                                                           |
| Serotonin                           | Magen-Darm-Trakt, Nervenzellen              | Erhöhung der $\beta$ -Zell-Proliferation                                  |
| Betatrophin                         | Leber, Fettgewebe                           | Expansion der $\beta$ -Zell-Masse                                         |
| Zytokine                            | Makrophagen                                 | Regulation der $\beta$ -Zell-Masse                                        |
| Myokine                             | Muskel                                      |                                                                           |
| Adipokine                           | Fettgewebe                                  |                                                                           |

Tab. 1: Übersicht Humoralantwort

### Regulation der Zellregeneration durch Humoralantwort

Derzeit geht man davon aus, dass die Selbstreplikation von  $\beta$ -Zellen einen der Hauptmechanismen zur Regulation der  $\beta$ -Zell-Expansion darstellt. Daher ist es ein wichtiges Ziel, diejenigen Faktoren zu identifizieren, welche die Proliferation der  $\beta$ -Zellen steuern. Es ist lange bekannt, dass die proliferative Kapazität der  $\beta$ -Zellen altersabhängig ist, dass sie von Spezies zu Spezies variiert und mit der Zeit abnimmt [65]. Für Nager, zum Beispiel, wird eine Replikationsrate von 2,5% berichtet, während sie im Menschen nur bei 0,2% liegt [65,66]. Aus den Ergebnissen mehrerer Studien meint man zu schließen, dass sich  $\beta$ -Zellen aufgrund Gewebeverlust durch Verletzung regenerieren. Jedoch ist nicht bekannt, wie und in welchem Ausmaß segregierte Moleküle diesen Prozess regulieren (Tabelle 1) [2,66]. Betacellulin (BTC) wurde als eines der ersten segregierten Proteine als Regulator für die Regeneration von  $\beta$ -Zellen identifiziert. BTC gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren und wird in einer großen Anzahl an Zelltypen exprimiert, einschließlich der  $\beta$ -Zellen, in denen es 1993 identifiziert

wurde. Es wurde gezeigt, dass BTC zusammen mit Activin-A *in vitro* die Umwandlung von Azinus- in  $\beta$ -Zellen induziert [67]. Es gibt Berichte darüber, dass Hyperglykämie in einem murinen Diabetesmodell durch ektopische Expression von BTC behandelt werden konnte. Hierbei wurden  $\beta$ -Zellen zum Wiedereintritt in den Zellzyklus angeregt [68,69]. Ein Austausch zwischen Organen kontrolliert nicht nur den systemischen Stoffwechsel, sondern reguliert auch die Gewebemöiostase und das Gewebewachstum. Dies wird hauptsächlich durch segregierte Faktoren moduliert, welche Zellverhalten und -umsatz beeinflussen. So sind Hormone aus dem Verdauungstrakt ein wichtiger Regulator für die Masse und Funktion von  $\beta$ -Zellen. Nach Nahrungsaufnahme, zum Beispiel, segregieren L- und K-Zellen im Duodenum das Glukagon-ähnliche Peptid 1 (glucagon like peptide 1 Glp-1) beziehungsweise das Gastro-inhibitorische Peptid (gastric inhibitor peptide GIP). Diese Hormone haben einen pleiotropen Effekt auf  $\beta$ -Zellen, und beide führen zu einer vermehrten Glukose-stimulierten Ausschüttung von Insulin durch  $\beta$ -Zellen, so dass die postprandiale hyperglykämische Spitze ausgeglichen wird. Sie lösen in pankreatischen  $\beta$ -Zellen auch

die Aktivierung von überlebensfördernden und Apoptosis-hemmenden Signalwegen aus [70,71]. Darüber hinaus soll Glp-1 in Nagern die  $\beta$ -Zell-Masse erhöhen, indem es den IRS2-Akt-Pfad aktiviert, welcher zu erhöhter  $\beta$ -Zell-Proliferation führt [72-74]. Auch in Mäusen mit Streptozotocin(STZ)-induziertem Diabetes konnte gezeigt werden, dass endogene Expression von Glp-1 Hyperglykämie verhindert und das Überleben von  $\beta$ -Zellen verbessert [75-77]. Es liegen Ergebnisse von klinischen Studien vor, in denen durch Verabreichung von Lixisenatid der Glp-1-Weg angesprochen wurde. Die Daten sind im Sinne neuer therapeutischer Ansätze für T2D vielversprechend, jedoch ist die Frage offen, ob Glp-1 auch im Menschen zur Regeneration von  $\beta$ -Zellen beiträgt [78-80]. Ergebnisse jahrelanger Forschung weisen darauf hin, dass  $\beta$ -Zellen ihre Kapazität für dynamische Veränderungen zur Kompensation von sowohl physiologischen (z. B. Schwangerschaft) als auch pathologischen (z. B. Insulinresistenz) metabolischen Veränderungen erhalten [81,82]. Während der Schwangerschaft wird die Expansion der  $\beta$ -Zellen durch Hormone wie Prolaktin (Prl), Laktogene der Plazenta und Serotonin reguliert [83,84]. Prolaktin und Laktogene scheinen über einen Prl-Rezeptor und den Jak2/Stat5-Pfad zu agieren, wobei durch Aktivierung der mTOR-Signalkaskade eine Erhöhung der  $\beta$ -Zell-Replikation erreicht wird [85]. In Studien an Prl-Rezeptor Knock-out-Mäusen zeigte sich außerdem, dass der Prl-Signalweg während der Embryogenese und der frühen Postnatalzeit aktiv ist. Bei 18,5 Tage alten Embryonen dieser Tiere zeigte sich eine 30%ige Verminderung der  $\beta$ -Zell-Masse und eine gestörte Proliferation von  $\beta$ -Zell-Vorläufern [86]. Wie genau die laktogenen Hormone auf  $\beta$ -Zellen wirken, ist jedoch noch nicht verstanden. Als weiterer Akteur wurde kürzlich für Serotonin eine Erhöhung der  $\beta$ -Zell-Proliferation berichtet. Serotonin setzt nachgeordnet zu dem durch Laktogene aktivierten Stoffwechselweg an und führt so zu einer Proliferation von  $\beta$ -Zellen [83]. Neben der Regulation der  $\beta$ -Zell-Masse unter physiologischen Bedingungen tragen diverse segregierte Moleküle unter erhöhtem Insulinbedarf, wie z. B. bei systemischer Insulinresistenz, zum Wachstum der  $\beta$ -Zell-Masse bei. Interessante Daten von El Quamari et al. belegen die Beteiligung eines Wachstumsfaktors aus der Leber an der Expansion von  $\beta$ -Zell-Masse bei Insulinresistenz. Anhand eines *in vivo* Parabiose-Modells mit Leber-Insulinresistenten LIRKO (liver-specific insulin receptor knock-out) und

Kontrollmäusen, in Zusammenhang mit *in vitro* Experimenten an humanen Inseln zeigen die Autoren, dass eine Leber-abhängige Humoralantwort eine entscheidende Rolle in der Regulation der  $\beta$ -Zell-Proliferation bei Insulinresistenz spielt [87].

Yi et al. identifizierten in einer umstrittenen Studie einen systemischen Faktor, der unter Insulinresistenz eine erhöhte Expression in der Leber und im Fettgewebe zeigt und zur Expansion der  $\beta$ -Zell-Masse beiträgt. Der Faktor wurde Betatrophin genannt. Ektopische Expression dieses Hormons außerhalb der Leber induzierte in jungen, adulten Mäusen einen schnellen, robusten und spezifischen Anstieg der Proliferation von  $\beta$ -Zellen und verbesserte die Glukosetoleranz [12]. Allerdings zeigte die Analyse des Phänotyps von Betatrophin-Knock-out-Mäusen keine abnormale Glukoseregulation, sondern erniedrigte Triglyzeridwerte nach erneuter Fütterung [88]. Erwähnenswert ist, dass eine erhöhte Plasmakonzentration an Betatrophin in Patienten mit lang bekanntem T1D bestimmt wurde. Dies weist darauf hin, dass eine Behandlung mit Betatrophin allein für Patienten mit T1D nicht ausreichend ist [89]. In transplantierten humanen  $\beta$ -Zellen konnte nur eine begrenzte proliferative Kapazität auf eine erhöhte Expression von Betatrophin hin beobachtet werden [90]. Für die Zukunft wird es wichtig sein zu identifizieren, welche humoralen Faktoren bei einer Insulinresistenz kompensatorische  $\beta$ -Zell-Proliferation hervorrufen [9-11]. Im Zuge der umfangreichen Suche nach einem sezernierten Faktor, der die Expansion von  $\beta$ -Zellen reguliert, konnten auch Makrophagen-abhängige Zytokine, Muskel-abhängige Myokine und Fettgewebe-abhängige Adipokine als Regulatoren der  $\beta$ -Zell-Masse ermittelt werden [91-96]. Insgesamt deuten länger bekannte und aktuelle Forschungsergebnisse darauf hin, dass die Regulation der  $\beta$ -Zell-Masse durch ein systemisches Zusammenspiel von Organen und autokrinen sowie parakrinen Interaktionen von Zellen im Pankreas bestimmt wird. Daher wird es mehrere Optionen geben, endogene Mechanismen der Regeneration von  $\beta$ -Zellen anzuregen.

## Ausblick

Bevor die Regeneration funktionaler  $\beta$ -Zellen Realität wird, gilt es, verschiedenste Herausforderungen zu meistern. Die  $\beta$ -Zell-Ersatztherapie

in Verbindung mit neuen immunsuppressiven Behandlungen ist eine vielversprechende Perspektive zur Wiederherstellung der  $\beta$ -Zell-Masse beim T1D. Außerdem steht zu erwarten, dass die Neogenese von  $\beta$ -Zellen aus Vorläuferzellen innerhalb ( $\alpha$ - oder  $\beta$ -Zellen) sowie außerhalb (Azinus- oder duktale Zellen) der Inseln neue Strategien für die Regeneration aufzeigen werden. Als Schlüsselkomponenten für die Entstehung des T2D sehen wir eine fortschreitende Erschöpfung der  $\beta$ -Zell-Masse durch unkontrollierte metabolische Veränderungen und in der Folge einen Verlust der Funktion der  $\beta$ -Zellen durch Dedifferenzierung. Daher sollten Therapien mit dem Ziel, den metabolischen Stress zu reduzieren und die Regeneration dedifferenzierter  $\beta$ -Zellen anzustoßen, geeignet sein, die  $\beta$ -Zell-Masse zu erhalten, um die Kontrolle über den Blutzuckerspiegel wiederherzustellen. Dazu sind neue Marker zur Identifizierung reifer  $\beta$ -Zellen notwendig. Mit deren Hilfe sollte es möglich sein, neue Wirkstoffe zu entwickeln, die geeignete  $\beta$ -Zell-Populationen ansprechen und endogene Regenerationsmechanismen, wie zum Beispiel die  $\beta$ -Zell-Replikation oder die Neogenese, anstoßen können. Mit dem derzeitigen Wissensstand können wir nicht sagen, welcher Ansatz der geeignetste zur Behandlung beider Formen des Diabetes sein wird. Es ist jedoch zu erwarten, dass die aktuellen weltweiten Anstrengungen im Bereich der Erforschung der  $\beta$ -Zell-Regeneration eine Therapie in naher Zukunft ermöglichen werden.

1. Shapiro, A.M., et al., 2000. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *New England Journal of Medicine* 343(4):230–238.
2. Pagliuca, F.W., Melton, D.A., 2013. How to make a functional beta-cell. *Development* 140(12):2472–2483.
3. Rahier, J., et al., 2008. Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 10(4):32–42.
4. Butler, A.E., et al., 2003. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52(1):102–110.
5. Butler, A.E., et al., 2003. Increased beta-cell apoptosis prevents adaptive increase in beta-cell mass in mouse model of type 2 diabetes: evidence for role of islet amyloid formation rather than direct action of amyloid. *Diabetes* 52(9):2304–2314.
6. Rhodes, C.J., 2005. Type 2 diabetes – a matter of beta-cell life and death? *Science* 307(5708):380–384.
7. Araujo, T.G., Oliveira, A.G., Saad, M.J., 2013. Insulin-resistance-associated compensatory mechanisms of pancreatic beta cells: a current opinion. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)* 4. (p.146).
8. Talchai, C., et al., 2012. Pancreatic beta cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic beta cell failure. *Cell* 150(6):1223–1234.
9. Lickert, H., 2013. Betatrophin fuels beta cell proliferation: first step toward regenerative therapy? *Cell Metabolism* 18(1):5–6.
10. Crunkhorn, S., 2013. Metabolic disorders: Betatrophin boosts beta-cells. *Nature Reviews Drug Discovery* 12(7).(p.504).
11. Kugelberg, E., 2013. Diabetes: Betatrophin-inducing beta-cell expansion to treat diabetes mellitus? *Nature Reviews Endocrinology* 9(7).(p.379).
12. Yi, P., Park, J.S., Melton, D.A., 2013. Betatrophin: a hormone that controls pancreatic beta cell proliferation. *Cell* 153(4):747–758.
13. Collombat, P., et al., 2006. Specifying pancreatic endocrine cell fates. *Mechanisms of Development* 123(7):501–512.
14. Jain, R., Lammert, E., 2009. Cell–cell interactions in the endocrine pancreas. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 11(4):159–167.
15. Steiner, D.J., et al., 2010. Pancreatic islet plasticity: interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islets* 2(3):135–145.
16. Brissova, M., et al., 2005. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 53(9):1087–1097.
17. Kim, A., et al., 2009. Islet architecture: a comparative study. *Islets* 1(2):129–136.
18. Bonner-Weir, S., 1988. Morphological evidence for pancreatic polarity of beta- cell within islets of Langerhans. *Diabetes* 37(5):616–621.
19. Nikolova, G., et al., 2006. The vascular basement membrane: a niche for insulin gene expression and beta cell proliferation. *Developmental Cell* 10(3):397–405.
20. Zaret, K.S., 2006. Pancreatic beta cells: responding to the matrix. *Cell Metabolism* 3(3):148–150.
21. Lammert, E., Cleaver, O., Melton, D., 2001. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science* 294(5542):564–567.
22. Eberhard, D., Kragl, M., Lammert, E., 2010. Giving and taking: endothelial and beta-cells in the islets of Langerhans. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 21(8):457–463.
23. Speier, S., et al., 2007. Cx36-mediated coupling reduces beta-cell heterogeneity, confines the stimulating glucose concentration range, and affects insulin release kinetics. *Diabetes* 56(4):1078–1086.
24. Mori, Y., et al., 2002. Genome-wide search for type 2 diabetes in Japanese affected sib-pairs confirms susceptibility genes on3q, 15q, and 20q and identifies two new candidate loci on 7p and 11p. *Diabetes* 51(4):1247–1255.
25. Hezel, A.F., et al., 2008. Pancreatic LKB1 deletion leads to acinar polarity defects and cystic neoplasms. *Molecular and Cellular Biology* 28(7):2414–2425.
26. Woods, A., et al., 2003. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Current Biology* 13(22):2004–2008.
27. Granot, Z., et al., 2009. LKB1 regulates pancreatic beta cell size, polarity, and function. *Cell Metabolism* 10(4):296–308.
28. Fu, A., et al., 2009. Loss of Lkb1 in adult beta cells increases beta cell mass and enhances glucose tolerance in mice. *Cell Metabolism* 10(4):285–295.
29. Cortijo, C., et al., 2012. Planar cell polarity controls pancreatic beta cell differentiation and glucose homeostasis. *Cell Reports* 2(6):1593–1606.
30. Schambony, A., Wedlich, D., 2007. Wnt-5A/Ror2 regulate expression of XPAPC through an alternative noncanonical signaling pathway. *Developmental Cell* 12(5):779–792.
31. Han, S.I., Yasuda, K., Kataoka, K., 2011. ATF2 interacts with beta-cell-enriched transcription factors, MafA, Pdx1, and beta2, and activates insulin gene transcription. *Journal of Biological Chemistry* 286(12):10449–10456.
32. Bramswig, N.C., et al., 2013. Epigenomic plasticity enables human pancreatic alpha to beta cell reprogramming. *Journal of Clinical Investigation* 123(3):1275–1284.
33. Schaffer, A. E., et al., 2013. Nkx6.1 controls a gene regulatory network required for establishing and maintaining pancreatic beta cell identity. *PLoS Genetics* 9(1). (p.e1003274).
34. St-Onge, L., et al., 1997. Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature* 387(6631):406–409.
35. Sosa-Pineda, B., et al., 1997. The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature* 386(6623):399–402.
36. Zhou, Q., et al., 2008. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 455(7213):627–632.
37. Puri, S., Hebrok, M., 2010. Cellular plasticity within the pancreas – lessons learned from development. *Developmental Cell* 18(3):342–356.
38. Baeyens, L., et al., 2014. Transient cytokine treatment induces acinar cell reprogramming and regenerates functional beta cell mass in diabetic mice. *Nature Biotechnology* 32:76–83.
39. Collombat, P., et al., 2003. Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes and Development* 17(20):2591–2603.
40. Biressi, S., et al., 2008. The homeobox gene Arx is a novel positive regulator of embryonic myogenesis. *Cell Death and Differentiation* 15(1):94–104.

41. Collombat, P., et al., 2009. The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells. *Cell* 138 (3):449–462.
42. Al-Hasani, K., et al., 2013. Adult duct-lining cells can reprogram into beta-like cells able to counterrepeated cycles of streptozotocin-induced diabetes. *Developmental Cell* 26(1):86–100.
43. Collombat, P., et al., 2007. Embryonic endocrine pancreas and mature beta cells acquire alpha and PP cell phenotypes upon Arx misexpression. *Journal of Clinical Investigation* 117(4):961–970.
44. Thorel, F., et al., 2010. Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature* 464(7292):1149–1154.
45. Dor, Y., et al., 2004. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429(6987):41–46.
46. Nir, T., Melton, D.A., Dor, Y., 2007. Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration. *Journal of Clinical Investigation* 117(9):2553–2561.
47. Teta, M., et al., 2007. Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors. *Developmental Cell* 12(5):817–826.
48. Xiao, X., et al., 2013. No evidence for beta cell neogenesis in murine adult pancreas. *Journal of Clinical Investigation* 123(5):2207–2217.
49. Magnuson, M.A., Osipovich, A.B., 2013. Pancreas-specific cre driver lines and considerations for their prudent use. *Cell Metabolism* 18(1):9–20.
50. Bonner-Weir, S., et al., 2010. Beta-cell growth and regeneration: replication is only part of the story. *Diabetes* 59(10):2340–2348.
51. Seaberg, R.M., et al., 2004. Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nature Biotechnology* 22(9):1115–1124.
52. Smukler, S.R., et al., 2011. The adult mouse and human pancreas contain rare multipotent stem cells that express insulin. *Cell Stem Cell* 8(3):281–293.
53. Yoneda, S., et al., 2013. Predominance of beta-cell neogenesis rather than replication in humans with an impaired glucose tolerance and newly diagnosed diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 98(5):2053–2061.
54. Pan, F.C., Wright, C., 2011. Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. *Developmental Dynamics* 240(3):530–565.
55. Raducanu, A., Lickert, H., 2012. Understanding pancreas development for beta-cell repair and replacement therapies. *Current Diabetes Reports* 12 (5):481–489.
56. Ziv, O., Glaser, B., Dor, Y., 2013. The plastic pancreas. *Developmental Cell* 26 (1):3–7.
57. Xu, X., et al., 2008. Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell* 132(2):197–207.
58. Inada, A., et al., 2008. Carbonic anhydrase II-positive pancreatic cells are progenitors for both endocrine and exocrine pancreas after birth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (50):19915–19919.
59. Solar, M., et al., 2009. Pancreatic exocrine duct cells give rise to insulin-producing beta cells during embryogenesis but not after birth. *Developmental Cell* 17(6):849–860.
60. Kushner, J.A., Weir, G.C., Bonner-Weir, S., 2010. Ductal origin hypothesis of pancreatic regeneration under attack. *Cell Metabolism* 11(1):2–3.
61. Rankin, M.M., et al., 2013. Beta-cells are not generated in pancreatic duct ligation-induced injury in adult mice. *Diabetes* 62(5):1634–1645.
62. Pan, F.C., et al., 2013. Spatiotemporal patterns of multipotentiality in Ptf1a- expressing cells during pancreas organogenesis and injury-induced facultative restoration. *Development* 140(4):751–764.
63. Bouwens, L., Pipeleers, D.G., 1998. Extra-insular beta cells associated with ductules are frequent in adult human pancreas. *Diabetologia* 41(6):629–633.
64. Zulewski, H., et al., 2001. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 50(3):521–533.
65. Kushner, J.A., 2013. The role of aging upon beta cell turnover. *Journal of Clinical Investigation* 123(3):990–995.
66. Cano, D.A., et al., 2008. Regulated beta-cell regeneration in the adult mouse pancreas. *Diabetes* 57(4):958–966.
67. Nagaoka, T., et al., 2008. A betacellulin mutant promotes differentiation of pancreatic acinar AR42J cells into insulin-producing cells with low affinity of binding to ErbB1. *Journal of Molecular Biology* 380(1):83–94.
68. Oh, Y.S., et al., 2011. Betacellulin-induced beta cell proliferation and regeneration is mediated by activation of ErbB-1 and ErbB-2 receptors. *PLoS One* 6(8):e23894.
69. Shin, S., et al., 2008. Remission of diabetes by beta-cell regeneration in diabetic mice treated with a recombinant adenovirus expressing betacellulin. *Molecular Therapy* 16(5):854–861.
70. Yabe, D., Seino, Y., 2011. Two incretin hormones GLP-1 and GIP: comparison of their actions in insulin secretion and beta cell preservation. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 107(2):248–256.
71. Li, Y., et al., 2003. Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates beta cell apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 278(1):471–478.
72. Meloni, A.R., et al., 2013. GLP-1 receptor activated insulin secretion from pancreatic beta-cells: mechanism and glucose dependence. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 15(1):15–27.
73. Wang, Q., Brubaker, P.L., 2002. Glucagon-like peptide-1 treatment delays the onset of diabetes in 8 week-old db/db mice. *Diabetologia* 45(9):1263–1273.
74. Xu, G., et al., 1999. Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* 48(12):2270–2276.
75. Gaddy, D.F., et al., 2010. In vivo expression of HGF/NK1 and GLP-1 from dsAAV vectors enhances pancreatic ss-cell proliferation and improves pathology in the db/db mouse model of diabetes. *Diabetes* 59(12):3108–3116.
76. Tonne, J.M., et al., 2013. Global gene expression profiling of pancreatic islets in mice during streptozotocin-induced beta-cell damage and pancreatic Glp-1 gene therapy. *Disease Models and Mechanisms* 6(5):1236–1245.
77. Farilla, L., et al., 2002. Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. *Endocrinology* 143(11):4397–4408.

78. Elkinson, S., Keating, G.M., 2013. Lixisenatide: first global approval. *Drugs* 73 (4):383–391.
79. Garber, A.J., 2012. Novel GLP-1 receptor agonists for diabetes. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 21(1):45–57.
80. Christensen, M., et al., 2009. Lixisenatide, a novel GLP-1 receptor agonist for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *IDrugs* 12(8):503–513.
81. Maclean, N., Ogilvie, R.F., 1955. Quantitative estimation of the pancreatic islet tissue in diabetic subjects. *Diabetes* 4(5):367–376.
82. Sorenson, R.L., Brelje, T.C., 1997. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Hormone and Metabolic Research* 29(6):301–307.
83. Kim, H., et al., 2010. Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nature Medicine* 16(7):804–808.
84. Rieck, S., et al., 2009. The transcriptional response of the islet to pregnancy in mice. *Molecular Endocrinology* 23(10):1702–1712.
85. Rieck, S., Kaestner, K.H., 2010. Expansion of beta-cell mass in response to pregnancy. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 21(3):151–158.
86. Auffret, J., et al., 2013. Defective prolactin signaling impairs pancreatic beta-cell development during the perinatal period. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 305(10):E1309–E1318.
87. El Ouamari, A., et al., 2013. Liver-derived systemic factors drive beta cell hyperplasia in insulin-resistant states. *Cell Reports* 3(2):401–410.
88. Wang, Y., et al., 2013. Mice lacking ANGPTL8 (Betatrophin) manifest disrupted triglyceride metabolism without impaired glucose homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (40):16109–16114.
89. Espes, D., Lau, J., Carlsson, P.O., 2014. Increased circulating levels of betatrophin in individuals with long-standing type 1 diabetes. *Diabetologia* 57(1):50–3.
90. Jiao, Y., et al., 2014. Elevated mouse hepatic betatrophin expression does not increase human beta-cell replication in the transplant setting. *Diabetes* 63(4):1283–1288.
91. Vasavada, R.C., et al., 2006. Growth factors and beta cell replication. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 38(5–6):931–950.
92. Charrier, A., Brigstock, D.R., 2013. Regulation of pancreatic function by connective tissue growth factor (CTGF, CCN2). *Cytokine and Growth Factor Reviews* 24(1):59–68.
93. Lee, Y.C., Nielsen, J.H., 2009. Regulation of beta cell replication. *Molecular and Cellular Endocrinology* 297(1–2):18–27.
94. Dunmore, S.J., Brown, J.E., 2013. The role of adipokines in beta-cell failure of type 2 diabetes. *Journal of Endocrinology* 216(1):T37–T45.
95. Plomgaard, P., Halban, P.A., Bouzakri, K., 2012. Bimodal impact of skeletal muscle on pancreatic beta-cell function in health and disease. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 14(3):78–84.
96. Wang, C., Guan, Y., Yang, J., 2010. Cytokines in the progression of pancreatic beta-cell dysfunction. *International Journal of Endocrinology* 2010:515136.