



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Duct cells in development, regeneration, and transplantation: charting a path to new islets

Balak, J.R.A.

Citation

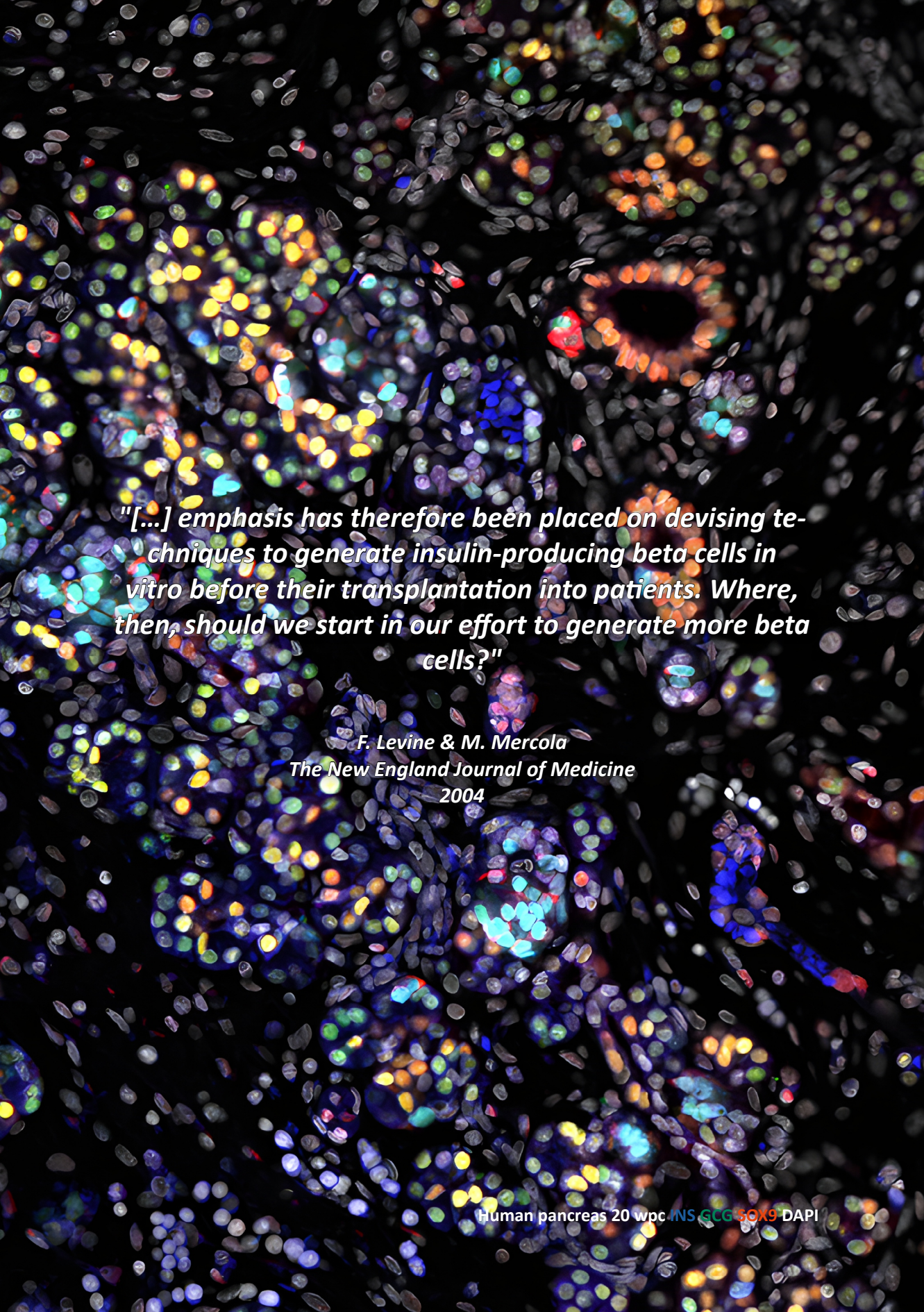
Balak, J. R. A. (2025, May 16). *Duct cells in development, regeneration, and transplantation: charting a path to new islets*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4246519>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4246519>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).



"[...] emphasis has therefore been placed on devising techniques to generate insulin-producing beta cells in vitro before their transplantation into patients. Where, then, should we start in our effort to generate more beta cells?"

*F. Levine & M. Mercola
The New England Journal of Medicine
2004*

CHAPTER| 10

Nederlandse Samenvatting

Curriculum Vitae

List of Publications

Nederlandse Samenvatting

Diabetes mellitus type 1 (T1DM) is een auto-immuunziekte waarbij insuline producerende bètacellen in de pancreas worden vernietigd. Dit leidt tot ernstige complicaties en vereist levenslange insulinetherapie. Bètacel regeneratie therapie in de vorm van bijvoorbeeld een eilandjestransplantatie (transplantatie van de geïsoleerde eilandjes van Langerhans) kan de fysiologische insuline secretie herstellen. Echter, de beperkte beschikbaarheid van donorweefsel vormt een belemmering voor een brede toepassing van deze therapie. Daarom worden alternatieve strategieën voor bètacelregeneratie onderzocht, waaronder het gebruik van voorlopercellen als mogelijke bron voor nieuwe bètacellen. Dit proefschrift onderzoekt of humane ductale cellen uit de pancreas zouden kunnen dienen als een potentiële bron voor bètacelregeneratietherapie.

In **hoofdstuk 2** onderzochten we hoe de zuiverheid van eilandjes-transplantaten de functie beïnvloedt na transplantatie bij patiënten met ernstige bètaceldeficiëntie. Zuiverheid verwijst naar de verhouding tussen geïsoleerde eilandjes van Langerhans en andere cellen in het transplantaat. Een hoog zuiverheidspercentage betekent dat een transplantaat voornamelijk endocriene cellen bevat, terwijl een transplantaat met een lagere zuiverheid ook andere cellen bevat, zoals ductale- en acinaire cellen. Eerdere studies suggereren dat minder zuivere eilandjes de transplantaatfunctie op lange termijn verbeteren, mogelijk doordat voorlopercellen, zoals ductale cellen, zich tot bètacellen ontwikkelen. Echter, door kleine cohorten en onbetrouwbare methoden voor zuiverheidsbepaling, blijft de impact van niet-endocriene cellen op metabole uitkomsten na eilandjestransplantatie onduidelijk. In deze studie hebben we een objectieve en reproduceerbare methode toegepast om de zuiverheid van getransplanteerde eilandjes te kwantificeren. Daarnaast hebben we de eilandjesfunctie geëvalueerd met een robuuste methode op basis van gestimuleerde C-peptide- en glucosewaarden. Onze resultaten tonen aan dat een hoge zuiverheid van het eilandjestransplantaat na drie maanden een betere functie geeft, maar op de lange termijn geen significante invloed heeft op metabole uitkomsten. Dit suggereert dat eilandjeszuiverheid geen bepalende factor is voor de lange termijn functie van het transplantaat. Daarnaast vonden we geen overtuigend bewijs dat potentiële voorlopercellen bijdragen aan de vorming van nieuwe bètacellen in de setting van een klinische eilandjestransplantatie.

Organoïden zijn driedimensionale gekweekte celstructuren met complexe cel interacties die *in vitro* de menselijke biologie nabootsen. Hierdoor is het mogelijk om organoïden te gebruiken voor medisch onderzoek. Zo kunnen organoïden bijvoorbeeld dienen als ziektemodellen, door cellen te laten groeien met genetische mutaties of bloot te stellen aan ziekteverwekkers. Daarnaast kunnen organoïden gebruikt worden voor medicijntesten en onderzoek in de regeneratieve geneeskunde. In de context van diabetesonderzoek worden pancreas organoïden gebruikt als een mogelijke bron voor nieuwe insuline producerende bètacellen. In **hoofdstuk 3** geven we een uitgebreide samenvatting en evaluatie van de toepassing van pancreas organoïden afkomstig van primair humaan donor materiaal in regeneratieve studies, ziektemodellering en gepersonaliseerde geneeskunde. We onderzoeken hoe deze organoïden onze kennis over de pancreasbiologie hebben vergroot en hun potentie als platform voor de ontwikkeling van nieuwe behandelingen.

In **hoofdstuk 4** optimaliseerden we het kweekstelsel voor organoïden uit humaan pancreasweefsel afkomstig van zowel volwassenen als foetussen, met als doel het bestuderen van de potentiële bètacel vorming uit voorloper cellen. We toonden aan dat organoïden efficiënt kunnen worden gekweekt uit exocrien weefsel, voornamelijk uit epitheliale ductale cellen bestaan en langdurig in kweek kunnen worden gehouden. Om potentiële bètacel voorlopercellen te identificeren, onderzochten we de expressie van aldehyde dehydrogenase (ALDH) in de organoïden. ALDH is een stamcel- en voorloper cel marker in verschillende weefsels waaronder de pancreas. We vonden ALDH-expressie in de organoïden en ontdekten dat ALDH^{hi} ductale cellen zich efficiënt konden vernieuwen, en daarnaast ook andere stamcel eigenschappen hadden zoals de capaciteit voor clonale expansie. Genexpressieanalyse liet zien dat deze ALDH^{hi} ductale cellen meer overeenkomsten vertoonden met ALDH^{hi}-positieve ductale cellen afgeleid van foetaal pancreas weefsel dan van volwassen pancreas weefsel. Verder konden de pancreas organoïden differentiëren in insuline-positieve cellen na transplantatie in muizen. Hoewel de differentiatie-efficiëntie laag was, met slechts 1,5% insuline-positieve cellen, toont dit onderzoek de potentie van dit kweekstelsel.

De differentiatie van voorlopercellen naar functionele bètacellen is een complex proces dat afhankelijk is van omgevingsfactoren voor de juiste activering van signaaltransductieroutes en transcriptiefactoren. Studies met menselijke embryonale stamcellen (hESC's) hebben waardevolle inzichten opgeleverd en geholpen bij het identificeren van stimuli die noodzakelijk zijn om pluripotente cellen te ontwikkelen tot bètacellen. In **hoofdstuk 5** onderzochten we of de differentiatie van primaire humane ductale cellen naar bètacellen kon worden verbeterd met behulp van stimuli die zijn ontdekt in pluripotente stamcelprotocollen, diermodellen of *in vitro* studies. Door middel van een reeks experimenten met verschillende groeifactoren en kleine moleculen ontdekten we dat een combinatie van INGAP (islet neogenesis-associated protein), FGF7 (fibroblast growth factor 7) en een GLP-1R (glucagon-like peptide-1 receptor) agonist de differentiatie van ductcellen in insuline-producerende cellen induceerde, met betere resultaten dan spontane differentiatie in basaal medium. Na *in vivo* rijping in muizen nam het aantal insuline-positieve cellen toe tot 5%. Hoewel de differentiatie-efficiëntie en cel functionaliteit, waaronder glucoseresponsiviteit en insulinesecretie, beperkt bleven, toonden de resultaten aan dat aanvullende stimuli de efficiëntie van bètaceldifferentiatie uit primaire humane ductale cellen kan verbeteren.

Cell lineage tracing of celafstammingstracing maakt het mogelijk het lot van individuele cellen en hun nakomelingen *in vivo* of *in vitro* te volgen met minimale verstoring van hun normale functie. Hierbij worden cellen permanent gemerkt om bijvoorbeeld hun nakomelingen te identificeren, of de origine van gedifferentieerde cellen te identificeren. Deze benadering zou nuttig kunnen zijn voor het bestuderen van het voorloper potentie van ductale cellen, door deze bijvoorbeeld specifiek en permanent te markeren voordat ze gebruikt worden in differentiatie experimenten. In initiële experimenten bleek het echter moeilijk om humane pancreas ductale cellen te transduceren met lentivirale vectoren, wat het ontwikkelen van een lineage tracing-systeem bemoeilijkte. In **hoofdstuk 6** ontwikkelden we een efficiënt transductie protocol voor primaire humane exocriene cellen. Door systematisch verschillende transductiecondities te vergelijken

- waaronder verschillende promotoren, virale enveloppen, mediumcomposities en transductie-adjuvanten - hebben we het lentivirale transductieproces geoptimaliseerd. Door gebruik te maken van een VSV-G gepseudotyperde vector die eGFP tot expressie brengt onder controle van een CMV-promotor, met protaminesulfaat in een serumvrij kweek, bereikten we tot 90% GFP-positieve cellen vijf dagen na transductie. Dit benadrukt de cruciale rol van de kweekomgeving in gentransfer. Verder probeerden we een pancreas ductale cel-specifiek lineage tracing-systeem te ontwikkelen door gebruik te maken van verschillende ductale cel-specifieke promotoren, zoals bijvoorbeeld keratine 19 (KRT19) en carbonic anhydrase II (CAII). Echter, zowel de KRT19- als de CAII-promotoren vertoonden onvoldoende specificiteit voor betrouwbare toepassing in ductale cel lineage tracing. Verdere inspanningen om een specifiekere ductale cel promotor te identificeren zullen uiteindelijk een waardevol hulpmiddel opleveren voor verder onderzoek naar de plasticiteit van ductale cellen en hun potentie in bètacelregeneratie.

De transcriptiefactor SOX9 is essentieel voor pancreas formatie tijdens de ontwikkeling, waarbij SOX9 verantwoordelijk is voor het behoud en de differentiatie van voorloper cellen naar endocriene cellen. In **hoofdstuk 7** rapporteren we nieuwe inzichten in de rol van SOX9 in de humane pancreas ontwikkeling, met een specifieke focus op de cytoplasmatische expressie van SOX9 in foetale pancreascellen en de implicaties daarvan voor de ontwikkeling van endocriene cellen. Eerst beschrijven we de expressie van SOX9^{cyto} in een subset van pancreascellen; in het begin van de zwangerschap is SOX9^{cyto} aanwezig in zowel insuline-positieve als polyhormonale cellen, met een verschuiving naar monohormonale insuline-positieve cellen later in de ontwikkeling. Deze expressie van SOX9^{cyto} in een subset van foetale bètacellen staat in contrast met de bekende nucleaire expressie in foetale stamcellen tijdens ontwikkeling, en de cytoplasmatische expressie die eerder beschreven is in een subset van menselijke volwassen alfacellen. Daarnaast hebben we ontdekt dat de SOX9^{cyto}-cellen in de foetale alvleesklier niet sterk prolifereren, wat ook verschilt van eerdere bevindingen in volwassen weefsels. Dit suggereert dat de rol van SOX9^{cyto} tussen de ontwikkelings- en volwassen stadia kan variëren. Het begrijpen van de mechanismen waarmee SOX9^{cyto} de differentiatie beïnvloedt tijdens de ontwikkeling kan van cruciaal belang zijn voor het bevorderen van strategieën om functionele bètacellen te genereren voor de behandeling van diabetes. Onze bevindingen suggereren dat het nucleocytoplasmatische transport van SOX9 een belangrijke factor kan zijn in de specificatie van endocriene cellen uit voorloper cellen.

