



UPPSALA
UNIVERSITET

Stamceller i diabetesbehandling

Irina Samokhina

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2008
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Sammandrag

Diabetes är en av de vanligaste folksjukdomarna. Det är en polygen multifaktoriell sjukdom som orsakas av ett flertal samverkande gener i kombination med ogynnsamma faktorer. De viktigaste miljöfaktorerna innefattar övervikt, felaktig kost, stillasittande och infektioner.

Den enda behandlingsmetoden i dagsläget är tillförsel av insulin genom exempelvis insulinspruta 1-4 gånger per dag. I de mest komplicerande fallen kan transplantation av en hel bukspottskörtel alternativt Langerhanska öar från friska personer bli aktuell. Det finns en rad stora nackdelar med sådana transplantationer såsom risk för avstötning, behov av immunosuppressiva medel, långa vårdtider men framförallt brist på donatorer.

Framtida forskning riktas mot att kunna framställa kroppsegna insulinproducerande celler. I det avseendet är stamceller en viktig tillgång som ger stora förhoppningar. Stamceller har förmåga att differentiera sig både in vivo och in vitro till olika slags vävnader. Man kan använda stamceller för att få dem att bilda β -celler (insulinproducerande celler) eller öar. Insulinfrisättande strukturer kan därefter transplanteras till diabetessjuka patienter. Det finns flertal rapporter om lyckade försök med framställning av insulinproducerande celler från såväl embryonala stamceller som vuxna stamceller. Transplantation av insulinfrisättande celler gav också goda resultat i försök med möss. I dagsläget har vi kunskaper om tillväxtfaktorer som är viktiga för bukspottkörtelns utveckling och därmed behövs för framställning av β -celler och öar med maximal insulinproduktion.

Det finns dock några problem att lösa innan man kan använda stamceller för behandling av patienter med diabetes. Man behöver bland annat få fram nya mindre toxiska immunosuppressiva medel för att minska risken att cellerna utvecklar tumörer efter transplantationen. Trots en del nackdelar anses stamceller ändå vara ett av de mest lovande botemedlen.

Inledning

Drygt 300 000 personer har idag diabetes enbart i Sverige (Steineck 2002). Varje år växer siffran och diabetes går allt längre ner i åldrarna. Detta gör sjukdomen till en av de vanligaste. Diabetes är ett samlingsnamn för flera olika ämnesomsättningsjukdomar som innebär att bl. a. sockeromsättning inte sker som den ska. Diabetes typ-1 anses vara den allvarligaste då detta är en autoimmun sjukdom. I det fallet bildar kroppen antikroppar mot sina egna celler vilket leder till att kroppens egna insulinproducerade Langerhanska öar i bukspottskörteln (pankreas) angrips och förstörs. Man hoppas att kunna utveckla tekniker för att ersätta de skadade vävnaderna med hjälp av insulinproducerande celler. Sådana kan man odla fram från stamceller (Soria 2001).

Man har känt till stamceller sedan 1960-talet. Under de senaste decennierna har människan utvecklat en hel rad nya tekniker i sitt arbete med stamceller. Tack vare forskningsframgångar har det blivit möjligt att odla stamceller från ett embryo och få dem att bilda olika vävnader och till och med organ (t.ex. hud eller ett öra). Man har däremot inte lärt sig att odla bukspottskörteln än. Det finns dock ett flertal rapporter om lyckade försök med framställning av insulinproducerande celler från såväl embryonala stamceller som vuxna stamceller. Transplantation av insulinfrisättande celler gav också goda resultat i försök med möss. I dagsläget har vi kunskaper om tillväxtfaktorer som behövs för att skapa insulinfrisättande celler. Man har även lyckats att odla fram betaceller i serumfritt medium (Jiang *et al.* 2007).

Det återstår en del problem att lösa för att teknikerna ska fungera effektivt. Ett av problemen är avstötning och förstöring av Langerhanska öar / betaceller efter transplantationen. Det

behövs nya och mindre toxiska suppressiva medel. Ett annat problem är att lära sig behålla stamceller i oförändrat tillstånd vid odling. Det finns stora etiska betänkligheter om människovärde i samband med forskning på embryonala stamceller. Det bästa vore självklart att kunna hitta andra lösningar som fungerar lika bra. På så sätt skulle man slippa stå inför komplicerade etiska frågor och svåra beslut.

Uppsatsen sammanfattar olika tekniker som i dagsläget används för att framställa insulinproducerande celler samt ger en översikt av forskningsresultat på stamceller med inriktning mot diabetesbehandling. Utifrån detta diskuteras fördelar och problem med användning av stamceller i diabetesbehandling.

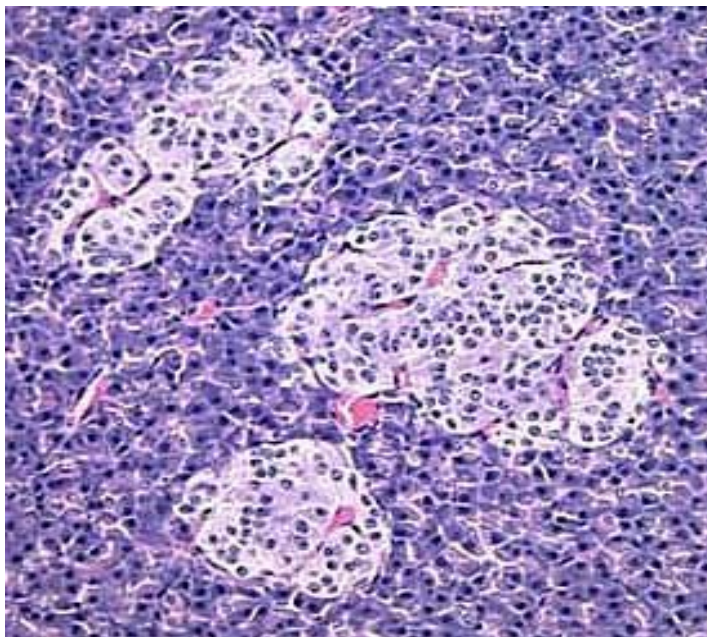
Vad är diabetes?

Diabetes mellitus är en grupp metabola sjukdomar som karakteriseras av kronisk hyperglykemi, dvs. förhöjd blodsockernivå (Groop 1998). Diabetesdiagnosen baseras på bestämning av blodglukosvärde: fastande $>6,7$ mmol/l (normalt blodsockervärde 4-6 mmol/l), efter måltid $>11,1$ mmol/l (Groop 1998).

Typer

Det finns olika typer av diabetes. Klassificeringen baseras på etiologi, dvs. sjukdomens uppkomst.

Typ-1 diabetes (s.k. barn och ungdomsdiabetes) står för 10-15% av alla diabetesfall. Typ-1 diabetes är en autoimmun sjukdom som leder till att kroppens immunförsvar successivt förstör sina egna insulinproducerade β -celler i Langerhanska öarna i bukspottskörteln (Hanås 2004). Diabetes typ-1 anses vara den allvarligaste formen eftersom nedsatt eller utslagen insulinproduktion gör det svårt för glukos att komma in i cellerna. På så sätt stannar socker i blodbanan. Hög blodsockernivå i blodet är ett farligt tillstånd som måste undvikas genom kontinuerliga kontroller och insulinsprutor.



Figur 1. Langerhanska öar (stora ljusrosa partier på bilden). Figuren är återgiven med tillstånd från Richard Bowen.

Den andra vanliga typen av diabetes är Typ-2 diabetes (tidigare kallad åldersdiabetes). Den står för 60% av alla diabetesfall. I det här tillståndet producerar β -cellerna för lite insulin samtidigt som kroppens insulinupptagningsförmåga är nedsatt.

Det finns även fler olika typer av diabetes som är mindre vanliga:

LADA (Latent Autoimmun Diabetes in Adults). Man uppskattar att omkring 10-15% av typ-2 diabetesfall är i själva verket LADA-fall (Hanås 2004). LADA är en långsam form av diabetes typ-1 som slår in relativt sent.

De mer ovanliga typerna av diabetes är MODY (maturity-onset diabetes of the young) och MIDD (mitokondriell diabetes med dövhet). De anses vara monogena former som beror på mutationer i vissa gener (Groop 1998).

Behandlingsmetoder

I dagsläget finns det olika behandlingsmetoder för patienter med diabetes. För behandling av typ-2 diabetes använder man läkemedel som ökar öarnas insulinproducerande förmåga samt cellernas sockerupptagningsförmåga. Diabetes typ-1 behandlas däremot genom tillförsel av insulin, exempelvis insulinsprutor, 1-4 gånger per dag.

Eftersom kroppsegna betaceller angrips och förstörs vid diabetes typ-1 kan transplantation av bukspottkörteln eller Langerhanska öar från avlidna donatorer bli aktuell. Transplantationens möjligheter i behandling av diabetes upptäcktes av Dr. Paul Lacy i slutet av 1960-talet. Han tillsammans med sina kollegor var de första som visade att diabetes hos möss kan botas genom transplantation av öarna (Bonso *et al.* 2005).

Det finns även alternativa lösningar i form av transplantation av öar från genmodifierade grisar vilket minskar risken för avstötning och transplantation av betaceller som framställs från adulta eller embryonala stamceller. Det sista kommer att tas upp mer ingående under nästföljande rubriker.

Stamcell: definition, typer och källor

Vad är stamcell? Stamcell kan man beteckna som en cell som kan ge upphov till en annan stamcell eller differentierade celler. Det finns olika definitioner men alla de enas om att stamcell har kapacitet att bilda en ny stamcell eller utvecklas till en specialiserad cell av någon typ.

”Stamcell. Cell som inte är färdigspecialiserad och som då den delar sig bildar dels en ny stamcell, dels en cell som utvecklas vidare mot någon av de celltyper som utför olika arbetsuppgifter i kroppen” (Brändén 2004).

År 1964 upptäckte man den embryonala stamcellen (Kleinsmith och Pierce, 1964). Två år senare identifierade Friedenstein med sin forskargrupp den mesenkymala stamcellen i benmärg, vilken senare visade sig kunna ge upphov till olika slags celler: brosk-, ben-, fett- och muskelceller (Friedenstein *et al.* 1966). Samma år gjordes de första lyckade benmärgstransplantationerna hos barn med svår immunbrist.

Differentiering av celler

Varför celler differentierar är en komplicerad fråga som intresserat evolutionsbiologerna sedan 1990-talet. Genom experiment (Nüsslein-Volhard, Wieshaus, Edlewis, år 1995-1997) fick man i alla fall en allmän bild av hur celldifferentieringen går till.

Differentiering av celler sker som en reaktion på olika sorters signaler (Silver 1998). Signalerna är specialiserade molekyler som sänds mellan olika celler som vidrör varandra eller mellan celler som befinner sig på avstånd från varandra. En del celler kan endast ta emot signaler de är avsedda att motta och deras inställning baseras på respektive differentieringstillstånd (Silver 1998).

Hur celler kan behålla vävnadens nödvändiga antal celler är ett fortfarande olöst problem inom cellbiologin.

Vävnad kan bildas med hjälp av differentiering, som det är påvisat för bl.a. blod och hud eller duplikation av redan differentierade celler. I ett försök med transgena möss dras slutsatsen att tidiga betaceller, snarare än pluripotenta stamceller, är den viktigaste källan av nya betaceller hos vuxna möss (Dor *et al.* 2004). Forskarna utgår från att inga nya öar bildas hos vuxna individer (Dor *et al.* 2004).

Det går att styra differentiering av embryonala stamceller *in vivo* med hjälp av olika stimuli som feeder layers (hjälpceller) och differentieringsinhibitorer (vissa cytokiner) alternativt substanser som inducerar differentiering. Det finns fortfarande ganska lite kunskap om hur man styr utvecklingen av embryonala stamceller till just endoderm. Förmodligen är det tillväxtfaktorer, cell-till-cell interaktioner, extracellulär matrix och övriga signaler som spelar in. Ett sätt att skapa en stimulerande miljö för utveckling av endoderm är att samodla pluripotenta stamceller med primodermal vävnad från pankreas eller att applicera germ layers som kan ge faktorer vilka kan i sin tur inducera tidig endoderm differentiering (Soria *et al.* 2000).

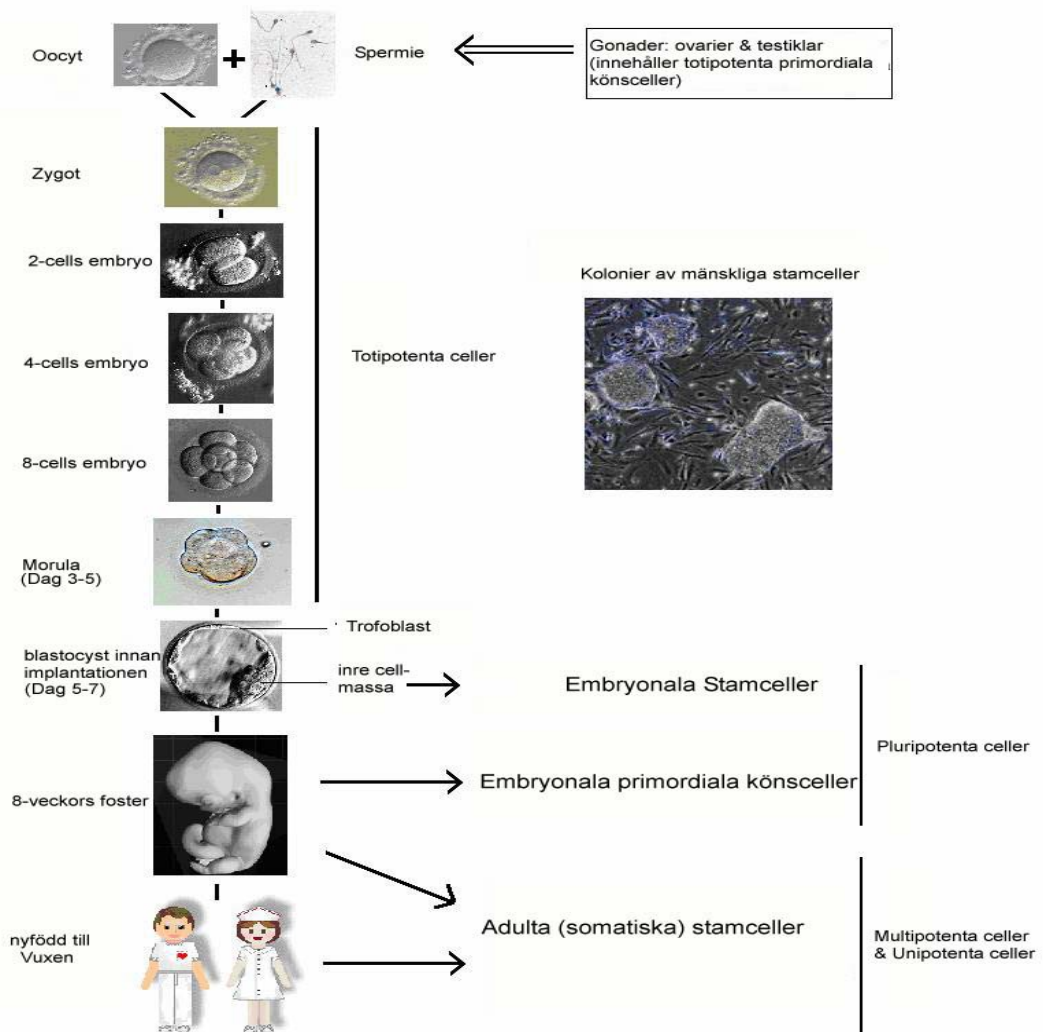
Differentieringsförmåga hos stamceller används som grund för klassifikation. Man urskiljer följande typer av stamceller: totipotenta, pluripotenta, multipotenta och unipotenta. Deras egenskaper återges i tabellen nedan.

Tabell 1. Egenskaper hos olika typer av stamceller baserat på differentieringsförmåga.

Typ av stamcell	Egenskaper
Totipotenta	Finns i könsceller och embryo upp till morula stadium. Totipotenta stamceller kan bilda vilka celltyper som helst samt en ny individ
Pluripotenta	Härstammar från totipotenta. Pluripotenta celler kan differentiera till ektoderm, mesoderm eller endoderm.
Multipotenta	Kan ge upphov till flera olika celltyper dock av samma grupp, t.ex. immunförsvarets celler
Unipotenta	Kan differentiera sig endast till en enda celltyp

Man träffar ofta i litteraturen uttryck ”embryonala stamceller” och ”adult stamceller”. Den här indelningen är självklart baserat på utgångskälla.

Översikt av stamcellers uppkomst och deras förmåga till differentiering beroende på källa sammanfattas nedan i en figur.



Figur 2. Stamcellers uppkomst. Figuren är återgiven med tillstånd från Justin Brownlie.

Embryonala och adulta stamceller har sin för- och nackdelar som vi beskriver i rubriker nedan.

Embryonala stamceller

Embryonala stamceller (ES) får man ur inre cellskiktet i blastocyst, cirka 5-7 dagar gammalt människoembryo. År 1981 isolerades embryonala stamceller från mus för första gången (Evans & Kaufman 1981). De första lyckade försöken med odling av embryonala stamceller från mänskliga embryon rapporterades i slutet av 90-talet (Thomson *et al.* 1998). Som utgångskälla för embryonala stamceller används embryon som blivit över från IVF-behandling, s.k. provrörsbefruktning. Man placerar den inre cellmassan på ett lager bindvävsceller som kommer från ett musembryo. Dessa "hjälp-celler" producerar tillväxtfaktorer och därmed håller stamcellerna i ett ständigt delande men odifferentierat tillstånd. Att stamcellerna haft kontakt med ämnen från djur kan innebära två risker vid transplantationer: smitta som kan spridas från djur till människan och förhöjd avstöttningsrisk (Semb 2005).

Embryonala stamcellers fördelar innefattar deras förmåga att dela sig snabbt, bilda med hjälp av signalämnen \ tillväxtfaktorer olika slags celler. Embryonala stamceller är inte minst fördelaktiga genom att de fortsätter växa generation efter generation. På så sätt kan man få stora mängder av olika celltyper, tillräckligt för att t.ex. reparera en komplicerad kroppsskada. Pluripotenta cellinjer från mänskliga blastocyster karakteriseras av normal karyotyp, hög nivå av telomerasaktivitet och cellytemarkörer som SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 och alkalint fosfatas (Thomson *et al.* 1998). Efter odifferentierad tillväxt in vitro 4-5 månader har dessa celler fortfarande en hög utvecklingspotential. De kan bilda trofoblast, den yttre cellskikt av det tidiga embryo som bildar fosterhinnan och moderkakan, och ge upphov till alla 3 lager: endoderm, mesoderm och ectoderm (Thomson *et al.* 1998).

Man måste ställa vissa krav på en stamcellslinje för att möjliggöra arbetet med odling av celler och vävnader för ett bestämt ändamål (Semb 2002):

- stamcellerna ska härstamma från en blastocyst.
- ska kunna föröka sig i ett odifferentierat stadium. Det betyder att en stamcellslinje har ett karakteristiskt utseende och genuttryck.
- de ska ha en normal uppsättning av kromosomer
- de ska vara pluripotenta.

År 2000 lyckades forskarna omvandla embryonala stamceller hos möss till insulinproducerande celler (Soria *et al.* 2000). Nästa år visade en annan forskargrupp att det går att ta fram insulinproducerande celler från mänskliga embryonala stamceller (Lumelsky *et al.* 2001). Användning av stamceller från besläktade givare underlättar behandlingen genom att minska risken för avstötning vid benmärgstransplantationer (Holgersson *et al.* 2002).

Adulta stamceller

Adulta stamceller finns i bland annat benmärgen, musklerna, huden och hjärnan, och ett fåtal i blodcirkulationen (blodbanan) i kroppen. Det finns två viktiga källor till adulta stamceller: benmärgen och navelsträngsblod. Stamceller från benmärgen kan man få ”att backa” så att de börjar producera helt andra celltyper som t.ex. tarmceller, nervceller etc. Fördelen med stamceller från navelsträngsblodet är att man kan få fram dem utan att modern eller barnet påverkas.

Forskning med adulta stamceller har kommit längre än forskning med embryonala stamceller, delvis beroende på att det är förbjudet i de flesta länder att forska på mänskligt embryo. Vissa behandlingar baserade på adulta stamceller har lämnat djurförsöksstadiet och testas idag på människan. Forskning på embryonala stamceller befinner sig för det mesta på djurförsöksstadiet.

Nackdelar med adulta stamceller ligger i att de delar sig långsamt och ett begränsat antal gånger. Detta gör att det är svårt att få tillräcklig mängd celler / vävnad för att reparera komplicerande skador. Förutom det vet man inte riktigt i dagsläge om adulta stamceller kan verkligen ge upphov till alla celltyper.

Djurmodeller

För att skapa djur med diabetes typ-1 symptom använder man alloxan och streptozotocin. Alloxan, eller mesoxalylurea, liknar ur strukturell synpunkt glukos. Alloxan är oxidationsprodukt av urinsyra. Alloxan tas upp av β -celler med hjälp av membranproteinet GLUT2 (Lenzen 2008). Vid oxidationsprocessen uppstår superoxidradikaler som därefter

omvandlas till peroxider vilka ger upphov till hydroxylradikaler som vid hög koncentration i cytosolen orsakar snabb destruktion av β -celler (Szkudelski 2001).

Streptozotocin (Sz) upptäcktes först som ett antibiotikum. Streptozotocin produceras av en svampliknande bakterie, aktinomyseten (*Streptomyces achromogenes*). Streptozotocin tas också upp med hjälp av membranproteinet GLUT2 och orsakar DNA-skador vilket i sin tur förstör betaceller och leder till ett tillstånd liknande diabetes typ-1 (Szkudelski 2001). Man använder därför sz och alloxan för att skapa diabetiska djurmodeller. I en studie av pankreasregenerationsförmåga har man inte sett sz inducera reparationen av de pre-existerande öarna. Dock observerades bildandet av nya öar hos vuxna under vissa förhållanden. Den mest imponerande regenerationen av öarna upptäckte man hos nyfödda djur. Man behandlade nyfödda råttor med sz, och såg att öarna regenererade (Marshak *et al.* 2001).

Tillväxtfaktorer

Pankreas har inte kapacitet att läka sina skadade insulinfrisättande celler vid exempelvis diabetes typ-1. Langerhanska öarna har dålig tillväxtförmåga hos vuxna. Man vet till exempel att Msx-2 är en transkriptionsfaktor som deltar i tillväxt av olika vävnader (Marshak *et al.* 2001). Man har dessutom identifierat ett antal faktorer som är av betydelse för utvecklingen av pancreas: Pdx-1, Pax-4 och Pax-6, islet-1, beta2, NeuroD, NKX2.2, NKX6.1, Hexb9, neurogenin och p48. Möss som saknade de ovannämnda faktorerna visade ett förändrat mönster i utvecklingen av sin pankreas (Soria *et al.* 2001).

Det finns flera faktorer som spelar en viktig roll i utveckling av pankreasceller (Soria *et al.* 2001):

1. I tidigt stadium är det signaler från notochord (fibroblast tillväxtfaktor FGF 2, aktivin β B)
2. I senare skede är det signaler från mesenkymet som inducerar proliferation och differentiering av epitala celler i pankreas till öarna

Det finns ett antal faktorer som reglerar transkription av insulin. Därför är de nödvändiga för differentiering av pankreas. PDX-1 är ett protein som spelar en viktig roll i regleringen av uttrycket av insulingenen. PDX-1 är därmed den kritiska pusselbiten i utvecklingen av både endokrina och exokrina pankreas. Möss som saknar PDX-1 utvecklar aldrig någon pankreas. HNF3 är en viktig regulator av PDX-1 och behövs för utveckling av endodermala celler. Man vet att möss som saknar HNF3 dör tidigt under embryogenes. Isl-1 krävs för differentiering av β -cellerna. Deletion av generna PAX4 och PAX6 resulterade i att mogna endokrina celler inte utvecklades. Således är PAX4 är nödvändig för utveckling av insulin- och somatostatinfrisättande celler, medan PAX6 krävs för differentiering av glukagonfrisättande celler. Studierna av mutanter som saknade Nkx2.2 visade att även den här faktorn är nödvändig för normal utveckling av pankreatiska celler. Det finns ett antal för pankreasutveckling viktiga bHLH proteiner (basic helix-loop-helix). Neurogenin3, en bHLH transkriptionsfaktor, är ett protein som krävs för utveckling av samtliga fyra endokrina celltyper. BETA2 / NeuroD är också ett bHLH protein som är en viktig transkriptionsfaktor för pankreas utveckling. Möss som saknade proteinet hade avvikelser i antalet endokrina celltyper samt defekter i öarnas och exokrinvävnadens morfologi. Hes1 deltar också i processen och regleras genom s.k. Notch signalering. Det finns även ett antal andra markörer som uttrycks i utvecklingen av Langerhanska öar: CK20, vimentin, Bcl-2, Nkx6.1.

Hormonpeptid YY frisätts av endokrina stamceller under utvecklingen. Endokrina celler i pankreasgången frisätter tyrosin hydroxylas (TH) i ett tidigt skede av embryogenes. Man tror att TH fungerar som markör för endokrina progenitorcellerna under de tidiga stadierna av utvecklingen (Marshak *et al.* 2001).

Ett annat problem som man kan få vid diabetes är celler med alltför liten insulinproduktion. För transplantation krävs celler med fungerande insulinproduktion.

Tabell 2. Faktorer som spelar en viktig roll i utvecklingen av fungerande öar med maximal insulinproduktion (enligt Soria *et al.* 2000)

Namn	Definition	Funktion
Aktivin A	Tillhör TGF-beta familjen	Reglerar tillväxt och differentiering hos de flesta celler. Deltar bl.a. i utvecklingen av Langerhanska öar
Betacellulin	Protein, Tillhör EGF-familjen	Deltar bl.a. i utvecklingen av Langerhanska öar med maximal insulinproduktion.
Exendin-4	Peptid	Deltar bl.a. i utvecklingen av Langerhanska öar med maximal insulinproduktion.
Gastrin	Hormon	Deltar bl.a. i utvecklingen av Langerhanska öar.
GLP-1	Glukagonliknande peptid-1	Deltar bl.a. i utvecklingen av Langerhanska öar med maximal insulinproduktion.
IGF-I, IGF-II	Insulinliknande tillväxtfaktor Peptid, nära besläktad med insulin	Deltar bl.a. i utvecklingen av Langerhanska öar med maximal insulinproduktion.
INGAP	Protein	Ökar öarnas massa, regenererar betaceller, ökar insulinproduktion hos betacellerna.
HGF	Hepatocyt tillväxtfaktor, protein	Produceras av mesenkymala celler, spelar roll i utvecklingen av fungerande öar med maximal insulinproduktion.
Regenerating gen-1	Gen	Deltar bl.a. i utvecklingen av Langerhanska öar med maximal insulinproduktion.
TGF	Transformerande tillväxtfaktor	Kontrollerar tillväxt och differentiering hos de flesta celler. Deltar i utvecklingen av Langerhanska öar.
VEGF	Vaskulär endotelial tillväxtfaktor, protein	Inducerar angiogenes, spelar roll i utvecklingen av fungerande öar med maximal insulinproduktion.

Cytokiner spelar en viktig roll i utvecklingen av Langerhanska öar samt diabetes typ-1. Studien av Börjesson m.fl. visade att exponering för IL-1 β enskilt eller i kombination med IFN- γ inducerar uttryck av iNOS (nitric oxide synthase). Inhibering av iNOS eller

deletion av iNOS genen visade sig ge skydd i T1D djurförsök. Ett antal möss har fått antingen ett vanligt transplantat eller ett iNOS^{-/-} transplantat. Därefter ökade man glukoshalten i blodet upp till 12mM hos mössen. De möss som har fått iNOS^{-/-} transplantaten visade högre mRNA halter av insulin, proinsulin (PC-1 och PC-2) samt IL-1 β i jämförelse med de möss som har fått de vanliga transplantaten. Detta tyder på att iNOS^{-/-} öarna kan vara mer resistenta mot destruktionsen (Börjesson *et al.* 2006).

Stamceller i diabetesbehandling

Stamceller har förmåga att differentiera sig både in vivo och in vitro till olika slags vävnader. Man kan förhoppningsvis använda embryonala stamceller (ES) bl.a. för behandling av diabetes Typ-1 och diabetes Typ-2. Mål för diabetesterapi är att skapa insulinfrisättande betaceller. Fördelar med sådana är enligt Soria A. (Soria *et al.* 2002):

- obegränsat antal,
- cellerna odlas till lågt pris,
- de odlas under patogenfria förhållanden eftersom celldelningen sker på naturligt sätt,
- man kan välja de bästa cellinjerna.

En stor del av stamcellsforskningen inriktar sig mot faktorer inblandade i utveckling av insulinfrisättande celler under embryogenes. Förståelse om tillväxtfaktorernas påverkan öppnar möjligheter att designa odlingar av stamcellslinjer efter behov. Man tror sig hitta en huvudmekanism i utvecklingen av friska insulinproducerande betaceller under embryogenes. Glukos visade sig spela en huvudroll. Glukos får genen Neurogenin3 att sätta igång en annan gen som heter NeuroD (Guillemain *et al.* 2007). Om glukosnivåerna är för låga blir detta omöjligt. Forskarna hoppas att studien ska hjälpa till att hitta effektiva behandlingsmetoder vid diabetes.

Det är viktigt att kunna skapa välfungerande betaceller för transplantationer. Man behöver således metoder för att kunna bedöma cellernas duglighet. Mätningar på cellulär nivå, i detta fall av syreförbrukningen i kulturen (OCR), visade sig vara ett fungerande verktyg. OCR-index är ett värde som skulle kunna användas för att bestämma potential av Langerhanska öar innan transplantationen. Chris Fraker m.fl. i sin forskning använder BD Oxygen Biosensor System (OBS) för att mäta OCR i 27 kulturer med öarna. De mätte OCR samt skillnaden dO₂ under odlingen ("dO₂"). Mätningarna av varje kultur genomfördes genom att inkubera var och en av dem i ett medium med antingen låg (2,2 mM) eller hög (22mM) glukoskoncentration. OCR Index definieras som nivå av DNA-stabiliserande "dO₂-slope" i ett medium med hög glukoskoncentration till ett med låg glukoskoncentration. Sextionio möss har fått var sitt transplantat. Transplantaten hade olika OCR. 90% av de möss som har fått öarna med OCR Index högre än 1.27 stabiliserade under 3 dygn. Däremot uppvisade de möss som har fått transplantaten med OCR-index under 1.27 ingen stabilisering, inte ens efter 35 dygn (Fraker *et al.* 2006).

Forskning på mänskliga embryonala stamceller och embryonala stamceller från möss

Beta celler kan man möjligtvis få från:

- pluripotenta stamceller, embryonala stamceller (ESC),
- embryonala germceller, dvs. embryonala köns-celler (EGC),
- teratocarcinoma (ECC), embryonala carcinoma celler,
- duktala celler från pankreas (Soria *et al.* 2000).

Soria B (Soria 2001) har forskat på mESC (Embryonala stamceller från möss) och var en av de första som tagit fram insulinfrisättande celler med hjälp av 3-steg in-vitro

differentieringsmetoden. Metoden omfattade differentiering av cellerna, selektion av cellinjerna och deras mognad. De skapade insulinfrisättande cellerna har transplanterats i möss vilket ledde till normalisering av glukoshalterna i blodet hos djuren. Redan i tidigt skede av forskningen på ESC insåg man hur stor roll transkriptionsfaktorerna Pdx1, Ngn3, Isl-1 tillsammans med de extracellulära faktorerna spelade i differentieringen av stamceller. Redan då nämnde man möjligheter att skapa insulinfrisättande celler från adulta stamceller (Soria 2001).

Embryonala stamceller är en viktig tillgång i transplantationer vid behandling av diabetes eftersom det finns en stor brist på donatorer. Bland de övriga fördelarna är:

- minskar avstötningsrisken, och som följd av det blir det även en minskad risk för immunosuppressiva medel då användningsbehov av sådana minskar,
- minskar risk för uppkomst av cancer (maligna tumörer) som en följd av lång immunosuppressiv behandling,
- man slipper problem med otillräckligt antal av betaceller i transplantatet (Soria *et al.* 2000).

En studie gjord vid Lunds universitet visade att insulinfrisättande ES-celler har ett antal karaktärsdrag gemensamma med normala beta-celler som syntes av proinsulin och processning (C-peptid) av insulin samt en nukleär lokalisering av de transkriptionsfaktorerna Foxa2, Pdx1 och Isl1 (Brolèn *et al.* 2005).

Under den senaste tiden har det förekommit flera försök att skapa insulinfrisättande celler från hESC utan hjälp av s.k. "feeders" (hjälpceller). I en studie behandlades hESC med natrium butyrat och aktivin under 36 dagar för att skapa endoderm som uttryckte CXCR4 och Sox17 samt CXCR4 och Foxa2. Under påverkan av EGF, bFGF och noggin transformerade endodermet därefter till pankreatiskt endoderm, som uttryckte Pdx1. Mognadsprocessen stimulerades med hjälp av IGFII och nikotinamid. De skapade öliknande strukturerna (ILC) visade likhet med utveckling av pankreas *in vivo* och dessutom utmärktes av en mängd av sekretoriska granula. Dessa ILC-strukturerna innehöll exokrin- och endokrin delar samt en pankreasgångliknande del. Insulinhalten var 70 ng insulin/mikrog vilket är högre än i de naturliga öarna (Jiang *et al.* 2007). Den här studien visar att i dagsläget är det möjligt att skapa insulinfrisättande celler från hESC utan hjälp av "feeders". Man har även studerat förhållanden (förutsättningarna) i en spontan utveckling av hESC till pankreatiska öar (Xu *et al.* 2006).

Även om man skapar den nödvändiga miljön kan antalet differentierade celler som tillhör samma fenotyp vara lågt. Den kan vara från 0,1 till 0,5% (Soria *et al.* 2001). En sådan blandad cellpopulation är olämplig för transplantation och kräver vidare urval. Selektion av specifika celler kan baseras på genetiska faktorer och fenotyp (membranproteiner). Soria använder sig av en markör i sin studie som de kopplade till den regulatoriska delen av en mänsklig insulinen. En markör kan vara till exempel en gen för resistens mot något ämne, exempelvis neomycin. Beroende på hur den markörigen uttrycker sig genomför man selektionen av de aktuella cellerna. Alltså; sådana celler som visade resistens mot i detta fall neomycin uttryckte även ett protein som var av intresse (Soria *et al.* 2000).

Molekylära metoder tillämpas i stamcellsforskningen. Lavon m.fl. använde i sin studie eGFP (enhanced green fluorescent protein) för att studera differentiering av hESC. De har kommit fram till att det krävs uttryck av både Pdx1 och Foxa2 för att hESC ska kunna differentiera.

Forskarna har även gjort ett antagande om att det förmodligen krävs speciella signaler som finns endast in vivo för att inducera cellerna att bli insulinfrisättande (Lavon *et al.* 2006).

Studien utförd av Shim m.fl. (Shim *et al.* 2007) visade att utvecklingen av insulinfrisättande celler kan ske in vivo efter transplantationen. I den aktuella studien behandlades hESC med serum, aktivin och A-vitaminsyra vilket ledde till högt uttryck av FOXA2, Sox17, PDX1 och HB9 (HLXB9). Därefter transplanterades cellerna till möss med sz-inducerad diabetes. De PDX1-positiva cellerna differentierade efter transplantationen till mogna celltyper, som producerande insulin och glukagon. Vikten hos mössen minskade, och glukoshalten stabiliserades (Shim *et al.* 2007).

Soria använde musembryon i sin studie för att få betaceller och djur vars diabetes var inducerad med streptozotocin. De lyckades med att få fram fungerande insulinproducerande celler från R1 musembryo. Den slutliga cellinjen IB/3x-99 transplanterades till djur vars diabetes var framkallat med hjälp av streptozotocin. Resultatet var:

- glukoshalten i blodet ändrades till normal nivå,
- djuren kompenserade sin hyperglykemi inom en vecka,
- återgick till normal vikt inom 4 veckor.

Tre av mössen var normalglykemiska längre än 12 månader. Dock har 40% av de djur som fick transplantatet fått tillbaka sin hyperglykemi igen inom 12 veckor efter transplantationen (Soria *et al.* 2000).

Baharvand m.fl. (Baharvand *et al.* 2006) i sitt försök med att skapa insulinfrisättande celler använde en strategi som inkluderade 4 steg:

1. Formation av EB.
2. Selektiv differentiering av cellpopulationerna som uttryckte nestin. Forskarna använde serum och en kultur med ITSFn (insulin-transferrin-selen-fibronektin).
3. Tillväxt av cellerna.
4. Inducering av differentiering till insulinpositiva celler.
5. Uppkomst av öliknande strukturer.

Forskarna lyckades i sitt försök att få insulinfrisättande celler som uttryckte proinsulin, insulin och andra pankreatiska, relaterade till betaceller, markörer som Nkx6.1, ISII, Glut2, Pax4, PC2 (prohormon konvertas2) (Baharvand *et al.* 2006).

I en studie upptäckte man med hjälp av Southern blot att de transplanterade hepatocyterna var heterozygota till skillnad från donatorens homozygota celler (Wang *et al.* 2003).

Förutom det uppvisade de transplanterade cellerna ändrade karyotyper – diploida och tetraploida som resultat av fusion mellan donatorens och recipients celler (Wang *et al.* 2003).

Insulinfrisättande celler i ett serumfritt medium

Kinesiska forskare har utarbetat en effektiv metod som förmår embryonala stamceller (ES) till att differentiera till insulinfrisättande celler i ett serumfritt medium. De använde i början Aktivin A till differentiering av endoderm. Uttryck av endodermmarkörerna Sox17 och Brachyury tydde på ett lyckat resultat. Därefter användes tretinoin (koncentrerad A-vitaminsyra) till att få pankreas celler differentiera. De tidiga transkriptionsfaktorerna för pankreas pdx1 och hlxb9 fungerade som indikatorer. Efter att de differentierade cellerna hade mognat i ett DMEM/F12 serumfritt medium med bFGF och nikotinamid, har de uttryckt öarnas specifika markörer som C-peptid, insulin, glukagon och glut2. Antalet C-peptid-frisättande celler uppgick till drygt 15%. Frisättningen av C-peptid var relaterad till variation i

glukoskoncentrationen. De aktuella cellerna transplanterades till möss med sz-inducerad diabetes. De transplanterade cellerna överlevde och uttryckte β -cellernas markörgener inklusive C-peptid, pdx1, glukokinas, nkx6.1, IAPP, pax6 och Tcfl. Förutom det saknade 30% av mössen diabetesymptom. Tillståndet varade i längre än 6 veckor (Jiang *et al.* 2007).

Öliknande strukturer från navelsträngsblodsstamceller

En forskargrupp har lyckats inducera stamceller från navelsträngsblod till insulinfrisättande öliknande strukturer som producerar insulin och C-peptid. Stamceller från navelsträngsblod har en del gemensamma karaktärsdrag med embryonala stamceller. Cellkolonierna från stamceller från navelsträngsblod uttryckte en speciell embryonal markör SSEA-4 och multipotentiell stamcellsmarkör Oct4. SSEA-4 är en ytmarkör på en odifferentierad embryonal stamcell. Oct4 anses vara en stamcellsmarkör som reglerar transkription i hESC. De flesta av cellerna i studien uttryckte en mononukleär cellmarkör CD29 (85%), hematolinje cellmarkör CD45 (78,44%), hematopoetisk cellmarkör (92,09%) och endotelial- och stamcellsmarkör CD31 (90,53%). Efter 5-7 dagars behandling av cellerna med ett differentieringsmedium klumpade några celler ihop och bildade öliknande strukturer. Strukturerna producerade insulin och C-peptid. Studien innebär ett betydelsefullt framsteg mot en effektiv behandling av diabetes (Sun *et al.* 2007).

Öcellstransplantationer visar sig mest framgångsrika medan pankreastransplantationer har hög frekvens av rejektion (Andersson 2002). Man tror att den höga rejektionsbenägenhet berår på att den exokrina delen av pankreas stimulerar recipientens immunsystem (Andersson 2002).

Insulinfrisättande celler från adulta stamceller

Man kan även inducera adulta stamceller som ursprungligen är tagna från pankreasgången till att differentiera till insulinfrisättande celler. Det positiva med metoden är att man har stor tillgång på celler både från donator och patient. I en studie forskade man på faktorer som får celler från pankreasgången att differentiera till insulinproducerande celler. Försöken utfördes på möss och celler från mänsklig pankreas. Infektion med adenovirus som uttrycker PDX-1, Ngn3, NeuroD eller Pax4 inducerar i sin tur uttryck av ”insulingenen”. NeuroD visade sig vara den effektivaste faktorn i inducering av primära celler från pankreasgången till insulinfrisättande celler (Noguchi *et al.* 2006).

En ny amerikansk-brasiliansk studie (Voltarelli *et al.* 2007) visar att transplantationer av blodstamceller från benmärgen kan hjälpa diabetiker att slippa insulin. Vid universitetet i São Paulo i Brasilien deltog 15 personer med diabetes mellan 14 och 31 år. I studien har patienterna behandlats med stamceller från benmärgen och immunsuppressiva medel. Efter behandlingen slapp 14 diabetiker insulin under flera månader. En patient var utan insulin i 35 månader, 4 i 21 månader, 7 i minst 6 månader och två i en respektive 4 månader (Voltarelli *et al.* 2007).

Diskussion

Stamceller har varit ett aktivt forskningsområde under de senaste fyrtio åren. Eftersom stamceller kan ge upphov till alla celltyper anses de vara av terapeutiskt värde. Man hoppas att det blir möjligt att effektivt bota en del sjukdomar som diabetes, Parkinsons sjukdom, Alzheimers sjukdom, infarkt och andra patologiska tillstånd där skadade celler behöver ersättas med nya.

Man har gjort enorma framsteg inom området till exempel kan man få både embryonala (Soria *et al.* 2000) och adulta stamceller (Sun *et al.* 2007) att bilda insulinproducerande celler

eller öliknande strukturer. En hel del studier riktas mot tillväxtfaktorer som får en stamcell att differentiera just till en insulinproducerande cell. Ett antal för pankreasutveckling viktiga tillväxtfaktorer som Pdx-1, Pax-4 och Pax-6, islet-1, beta2, NeuroD, NKX2.2, NKX6.1, Hexb9, neurogenin och p48. har blivit identifierade (Soria *et al.* 2001). I dagsläget har man således forskat fram värdefulla kunskaper om tillväxtfaktorer inblandade i tillväxt och differentiering av betaceller. Det är dock svårt att hålla stamceller odifferentierade i odlingar vilket är ett av problemen.

Transplantationer av blodceller från benmärgen visade sig hjälpa diabetiker att slippa insulin (Voltarelli *et al.* 2007). De studier som utfördes på människan är dock få. I huvudsak kan man säga att forskning om stamceller i diabetesbehandling inte har lämnat djurförsöksstadiet än.

Det återstår en hel rad svårigheter som man behöver lösa för att få fram effektivt fungerande terapeutiska tekniker. Avstötning är ett av problemen. Pankreastransplantationer uppvisar hög frekvens av rejektion. Man är tvungen att använda immunosuppressiva medel för att minska risk för avstötningen. Användning av immunosuppressiva medel leder i sin tur till en rad komplikationer. På så sätt behöver man ta fram även nya, mindre toxiska, mediciner.

Å andra sidan skulle man kunna utveckla metoder för öcellstransplantationer och transplantationer av insulinproducerande celler. I djurförsök har öcellstransplantationer varit framgångsrika.

Man har kommit fram till att adulta stamceller har en begränsad förmåga att differentiera medan användning av mänskligt embryo för att få fram stamceller väcker negativa reaktioner på etisk och religiös grund. Man kan säga med säkerhet att användning av mänskligt embryo för att få fram stamceller kommer alltid att möta motstånd. Forskning på mänskligt embryo är förbjudet i de flesta länder. På så sätt krävs det mer forskning kring adulta stamcellers differentieringspotential.

Jag tycker att Soria sammanfattar bra de problem som måste lösas innan man kan använda stamceller för diabetesbehandling (Soria *et al.* 2001):

- Utveckla odlingstekniker av rena cellpopulationer,
- öka proliferativ kapacitet,
- minska risken att cellerna utvecklar tumörer efter transplantationer,
- öka differentieringspotential,
- använda autologi (immunology-masked),
- utveckla metoder för att få fenotypiskt homologa celler.

Maskering med kroppsegna substanser skulle i sin tur leda till att rejektionsrisken minskar. Gentekniska metoder som kärnöverföring kan vara ett potentiellt verktyg för att minska avstötningsrisken.

Förutom ovannämnda svårigheter visade de senaste studierna att stamcellstransplantat kan orsaka tumörer och kromosomavvikelser (Wang *et al.* 2003). Man behöver mer forskning inom det området i syfte att lära sig undvika utveckling av tumörer och kromosomavvikelser efter transplantationer.

Det återstår en hel rad arbete innan stamceller kan tillämpas för behandling av diabetes. Trots en hel rad svårigheter och problem anser jag stamcells forskning för diabetesbehandling ett av de högprioriterade områdena. Stamceller har stor kapacitet att bli ett effektivt och tillgängligt botemedel vilket ger hopp till hundratusentals patienter.

Tack

Tack till seminariegruppen för förbättringsförslag och givande återkoppling, Lage Cerenius och Reidar Magnusson för korrekturläsning. Jag vill även tacka Richard Bowen och Justin Brownlie för tillstånd att publicera bilderna.

Referenser

- Andersson A. 2002. Transplantation av insulinproducerande vävnad. I: I: Johnsson, C. & Tufvesson, G. (red.), Transplantation. Studentlitteratur, Lund.
- Baharvand, H., Jafary, H., Massumi, M., Ashtiani S. 2006. Generation of insulin-secreting cells from human embryonic stem cells. *Development, Cell Growth & Differentiation* 48: 323-332.
- Bonso, A. och Lee, E.H. (red.) 2005. *Stem Cells: From Bench to Bedside*. World Scientific Publishing Company Incorporated, Hackensack.
- Brolén, G.K., Heins, N., Edsbacke, J., Semb, H. 2005. Signals from the embryonic mouse pancreas induce differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing beta-cell-like cells. *Diabetes* 54: 2867-2874.
- Brändén, H. 2004. *Genteknik, kloning och stamceller*. 2:a uppl. Vetenskapsrådet, Linköping.
- Börjesson, A., Andersson, A., Sandler, S. 2006. Survival of an Islet Allograft Deficient in iNDS after implantation into Diabetic NOD mice. *Cell Transplantation* 15: 769-775.
- Diabetes: forskning, framsteg, framtiden. Aktuell medicinsk forskning. Vetenskapsrådet, 2002
- Dor, Y., Brown, J., Martinez, O.I., Melton, D.A. 2004. Adult pancreatic β -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429: 41-46.
- Dr Mehboob, A., Hussain, M.D., Neil, D., Theise, M.D. 2004. Stem-cell therapy for diabetes mellitus. *The Lancet* 364: 203-205.
- Evans, M.J. & Kaufman, M.H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*: 292, 154-156.
- Fraker, C., Timmins, M.R., Guarino, R., Haaland, P., Ichii, H., Molano, D., Pileggi, A., Poggioli, R., Presnell, S., Inverardi, L., Zehtab, M., Ricordi, C. 2006. The use of the BD Oxygen Biosensor System to Assess Isolated Human Islets of Langerhans: Oxygen Consumption as a Potential Measure of Islet Potency. *Cell Transplantation* 15: 745-758.
- Friedenstein A., Piatetzky-Shapiro I., Petrakova K. 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Embryology* 16: 381-390.
- Groop, L. 1998. Ny diagnostik och klassifikation av diabetes. *Läkartidningen* 95: 5151-5155.
- Guillemain, G., Filhoulard, G., Silva-Xavier, G., Rutter, G., Scharfmann, R. 2007. Glucose Is Necessary for Embryonic Pancreatic Endocrine Cell Differentiation. *Journal Biological Chemistry* 282: 15228-15237
- Holgerson, S., Möller, E., Olerup, O., Persson, U. 2002. Basal immunologi och transplantationsimmunologi. I: Johnsson, C. & Tufvesson, G. (red.), Transplantation. Studentlitteratur, Lund.
- Jiang, J., Au, M., Lu, K., Eshpeter, A., Korbitt, G., Fisk, G., Majumdar, A. 2007. Generation of insulin-producing islet-like clusters from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 8: 1940-1953.
- Jiang, W., Shi, W., Zhao, D., Chen, S., Yong, J., Zhang, J., Qing, T., Sun, X., Zhang, P., Ding, M., Li, D., Beng, H. 2007. *In vitro* derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Cell Research*, doi: 10.1038/cr.2007.28.
- Kleinsmith, L. och Pierce J. 1964. Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Research* 24: 1544-1551.

- Lavon, N., Yanuka, O., Benvenisty. 2006. N. The effect of overexpression of Pdx1 and Foxa2 on the differentiation of human embryonic stem cells into pancreatic cells. *Stem Cells* 24: 1923-1930.
- Lenzen, S. 2008. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51: 216-226.
- Lumelsky, N., Blondel, O., Laeng, P., Velasco, I., Ravin, R., McKay, R. 2001. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 292: 1389-1394.
- Marshak, D., Gardner, R., Gottlieb, D. 2001. *Stem Cell Biology*. Gold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Noguchi, H., Xu, G., Matsumoto, S., Kaneto, H., Kobayashi, N., Bonner-Weir, S., Hayashi, S. 2006. Induction of pancreatic stem/progenitor cells into insulin-producing cells by adenoviral-mediated gene transfer technology. *Cell Transplantation* 15: 929-938.
- Nya Rön: Diabetes. Scientium, 4:2002
- Silver, L.M. 1998. *Kloning och genteknik : möjligheter och risker i en ny värld*. Richter, Malmö
- Shim, J.H., Kim, S.E., Woo, D.H., Kim, S.K., Oh, C.H., McKay, R., Kim, J.H. 2007. Directed differentiation of human embryonic stem cells towards a pancreatic cell fate. *Diabetologia* 50: 1228-1238.
- Soria, B. 2001. In-vitro differentiation of pancreatic beta-cells. *Differentiation* 68: 205-219.
- Soria, A., Skondy, A., Martin, F. 2001. From stem cell to beta cell: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia* 44: 407-415.
- Soria, A., Roche, E., Berna, G., Leon-Quinto, T., Reig, J.A., Martin, F. 2000. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 49: 157-162.
- Sun, B., Roh, K., Lee, S., Lee, Y., Kang, K. 2007. Induction of human umbilical cord blood-derived stem cells with embryonic stem cell phenotypes into insulin producing islet-like structure. *Nature Biotechnology* 360: 205-211.
- Sussel, L., Kalamaras, J., Hartigan-O'Connor, D., Meneses, J., Pedersen, R., Rubenstein, J., German, M. 1998. Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. *Development* 125: 2213-2231.
- Szkudelski, T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research* 50: 537-546.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor J., Sander S.S., Waknitz, M.A., Swiergid J.J., Marshall V.S., Jones, F.M. 1998. Embryonic Stem Cell Lines derived from Human Blastocysts. *Science* 282: 1145-1147.
- Voltarelli, J., Couri, C., Stracieri, A., Oliveira, M., Moraes, D., Pieroni, F., Coutinho, M., Malmegrim, K., Foss-Freitas, M., Simões, B., Foss, M., Squiers, E., Burt, R. 2007. Autologous Nonmyeloablative Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Newly Diagnosed Type 1 Diabetes Mellitus. *The journal of the American medical association* 297: 1568-1576.
- Wang, X., Willenbring, H., Akkari, Y., Torimaru, Y., Foster, M., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M., Olson, S., Grompe, M. 2003. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422: 823-825.
- Xu, X., Kahan, B., Forgianni, A., Jing, P., Jacobson, L., Browning, V., Treff, N., Odorico, J. 2006. Endoderm and pancreatic islet lineage differentiation from human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 8: 96-107.

Appendix

Tabell 3. Översikt över tillväxtfaktorer som påverkar utveckling av pankreas, Langerhanska öar och betaceller.

Namn	Definition	Funktion
Aktivin A	Peptid, tillhör TGF-beta familjen	Reglerar tillväxt och differentiering hos de flesta celler. Deltar bl.a. i utvecklingen av Langerhanska öar
Bcl-2	Gen	Höga koncentrationer av Bcl-2 skyddar celler mot apoptos. Behövs för utveckling av Langerhanska öar.
BETA2\ NeuroD	bHLH protein	Deltar i differentieringen av beta och deltaceller
Betacellulin	Protein, Tillhör EGF-familjen	Deltar bl.a. i utvecklingen av Langerhanska öar med maximal insulinproduktion.
bFGF	Basic fibroblast growth factor. Tillhör FGF-familjen	Under påverkan av bl.a. bFGF transformeras endoderm till pankreatiskt endoderm.
CK20	Cytokeratin 20, polypeptid	Uttrycks vid utvecklingen av Langerhanska öar
EGF	Epidermal tillväxtfaktor	Reglerar tillväxt och differentiering av celler. Deltar bl.a. i utvecklingen av Langerhanska öar med maximal insulinproduktion.
Exendin-4	Peptid	Deltar bl.a. i utvecklingen av Langerhanska öar med maximal insulinproduktion.
FGF 2	Fibroblast growth factor 1, polypeptid	Inducerar angiogenes, inducerar DNA-syntes i olika celler, deltar i sårhelingsprocessen.
Gastrin	Hormon	Deltar bl.a. i utvecklingen av Langerhanska öar.
GLP-1	Glukagonliknande peptid-1	Deltar bl.a. i utvecklingen av Langerhanska öar med maximal insulinproduktion.
Hes1	Gen, kodar för bHLH transkriptions repressor	regleras genom s.k. Notch signaling. Behövs för utvecklings av pankreas.
HGF	Hepatocyt tillväxtfaktor, protein	Produceras av mesenkymala celler, spelar roll i utvecklingen av fungerande öar med maximal insulinproduktion.
IGF-I, IGF-II	Insulinliknande tillväxtfaktor	Deltar bl.a. i utvecklingen av Langerhanska öar med maximal insulinproduktion.
	Peptid, nära besläktad med insulin	
IL-1 β	Cytokin, protein	Spelar roll vid utvecklingen av Langerhanska öar.
INGAP	Protein	Ökar öarnas massa, regenererar betaceller, ökar insulinproduktion hos betacellerna.
Islet-1	Transkriptionsfaktor	Uttrycks i celler av Langerhanska öar
NEUROG3	Neurogenin-3, bHLH protein,	Krävs för utveckling av alla 4 endokrina celltyper.

NKX2.2	transkriptionsfaktor Transkriptionsfaktor	Uttrycks i CNS samt alfa och betaceller (Sussel <i>et al.</i> , 1998)
NKX6.1	Gen	Behövs för utvecklings av betaceller.
Noggin	Gen	Under påverkan av noggin transformeras endoderm till pankreatiskt endoderm.
Pax-4 och Pax-6	Paired box genes, group 4, Transkriptionsfaktorer	Deltar i differentieringen av betaceller.
Pdx-1	Pancreatic duodenal homeobox -1, Transkriptionsfaktor	Uttrycks i beta och delta celer i Langerhanska öar. HNF3 är en viktig regulator av PDX-1. ¹
p48	bHLH protein, pancreas transcription factor 1 (PTF1)	Nödvändig för differentiering av exokrina celler.
TGF	Transforming tillväxtfaktor	Kontrollerar tillväxt och differentiering hos de flesta celler. Deltar i utvecklingen av Langerhanska öar.
VEGF	Vaskulär endotelial tillväxtfaktor, protein	Inducerar angiogenes, spelar roll i utvecklingen av fungerande öar med maximal insulinproduktion.
Vimentin	Protein	Uttrycks vid utvecklingen av Langerhanska öar