

Μοριακοί μηχανισμοί έκκρισης ινσουλίνης από το β-κύτταρο

Κ. Κανταρτζής

Η ινσουλίνη συντίθεται ως προπροϊνσουλίνη στα ριβοσώματα του τραχέος ενδοπλασματικού δικτύου. Από αυτήν αποκόπτονται δύο ακραία τμήματα, παραγομένης της προϊνσουλίνης, που συσκευάζεται στη συσκευή Golgi σε εκκριτικά κοκκία. Μέσα στα κοκκία το μεγαλύτερο μέρος της προϊνσουλίνης διασπάται σε C-πεπτίδιο και ινσουλίνη. Ένα ποσοστό (10-15%) της προϊνσουλίνης δεν διασπάται και εκκρίνεται (εξωκυττάρωση κοκκίων) μαζί με την ινσουλίνη στην κυκλοφορία. Αύξηση του ποσοστού αυτού, δηλαδή του λόγου προϊνσουλίνης/ινσουλίνη στο πλάσμα θεωρείται δείκτης διαταραχής της έκκρισης ινσουλίνης καθόσον σε άτομα με τύπου 2 διαβήτη φθάνει το 40%.

Η άρτια λειτουργία του β-κυττάρου εξαρτάται από την έκκριση ινσουλίνης στο σωστό χρονικό σημείο και σε ικανά ποσά ανάλογα με το ερέθισμα. Σύμφωνα με ένα γενικά αποδεκτό σχήμα, το β-κύτταρο αντιδρά στο ερέθισμα με αντιστροφή του δυναμικού ηρεμίας της κυτταρικής μεμβράνης σε δυναμικό ενεργείας. Το τελευταίο ανοίγει εξαρτώμενους από το δυναμικό (voltage-dependent) διαύλους ασβεστίου με συνέπεια εισροή Ca^{++} στο κύτταρο και αύξηση της συγκέντρωσής του στο κυτταρόπλασμα. Η αύξηση αυτή προκαλεί την εξωκυττάρωση των εκκριτικών κοκκίων ινσουλίνης.

Δύο ερεθίσματα είναι ικανά να προκαλέσουν εκπόλωση του β-κυττάρου:

α) Γλυκόζη. Παραλαμβάνεται από τους GLUT-2 υποδοχείς και φωσφορυλιώνεται με τη δράση της γλυκοκινάσης. Η γλυκοκινάση του β-κυττάρου εμφανίζει σιγμοειδή καμπύλη δράσης με $K_m \approx 5,5 \text{ mmol/l}$, που σημαίνει ότι εμφανίζει σημαντική ενζυμική δραστηριότητα σε φυσιολογικά ως μέτρια αυξημένα, αλλά όχι σε υπογλυκαιμικά επίπεδα γλυκόζης. Οι ιδιότητες αυτές την καθιστούν ιδανικό αισθητήρα του β-κυττάρου για τη γλυκόζη. Άλλοστερικοί ενεργοποιητές της γλυκοκινάσης είχαν δοκιμαστεί ως αντιδιαβητικά φάρμακα. Η 6-P-γλυκόζη υπόκειται σε γλυκόλυση στο κυτταρόπλασμα και ακολούθως μπαίνει στον κύκλο του Krebs στα μιτοχόνδρια με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του ATP και του λόγου ATP/ADP. Η αύξηση αυτή κλείνει τους εξαρτώμενους από το ATP διαύλους K^+ που συντηρούν σε μεγάλο βαθμό το δυναμικό ηρεμίας του κυττάρου επιτρέποντας την έξοδο K^+ . Οι διάυλοι αποτελούνται από 4 υπομονάδες της πρωτεΐνης Kir6.2 εσωτερικά και 4 υπομονάδες του

Επιμελητής Β' Προπ.
Παθολογικής Κλινικής ΕΚΠΑ
Γενικό Πανεπιστημιακό
Νοσοκομείο «Αττικό»
Επιστημονικός Συνεργάτης
Department of Internal Medicine
Division of Endocrinology,
Diabetology, Nephrology,
Vascular Disease and
Clinical Chemistry
University of Tübingen,
Germany

υποδοχέα των σουλφονουριών 1 (SUR1) στην περιφέρεια. Οι σουλφονουριές συνδεόμενες με τον SUR1 κλείνουν τους διαύλους, ενώ η διαζοξίδη τους ανοίγει, υπερπολώνοντας το κύτταρο και αναστέλλοντας την έκκριση ινσουλίνης. Η σύνδεση ATP-SUR1 κλείνει τους διαύλους με αποτέλεσμα αντιστροφή του δυναμικού της μεμβράνης και έκλυση δυναμικού ενεργείας. Αυτό όπως έχει ήδη αναφερθεί ανοίγει τους διαύλους Ca^{++} και τελικά προκαλεί εξωκυττάρωση των κοκκίων ινσουλίνης. Για κάθε συνιστώσα του μηχανισμού αυτού έχουν περιγραφεί μεταλλάξεις που έχουν ως συνέπεια διαταραχές της έκκρισης ινσουλίνης. Ορισμένες μεταλλάξεις του γονιδίου της γλυκοκινάσης ευθύνονται για το MODY2. Κυρίαρχες μεταλλάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν την Kir6.2 (*KCNJ11*) και το SUR1 (*ABCC8*) και καθιστούν αδύνατη τη σύνδεση του διαύλου K^+ με ATP ευθύνονται για περιπτώσεις νεογνικού διαβήτη. Μέρους αυτών ανταποκρίνεται στη θεραπεία με σουλφονουριές. Άλλες μεταλλάξεις του *ABCC8* που έχουν ως αποτέλεσμα την αδυναμία διάνοξης του διαύλου K^+ από το σύμπλεγμα Mg^{++} -ADP έχουν ενοχοποιηθεί για επιμένουσα υπερινσουλιναιμική υπογλυκαιμία της παιδικής ηλικίας.

β) Αργινίνη. Είναι το ισχυρότερο εκκριταγωγό. Αποτελεί κατιόν και μεταφερόμενη μέσα στο κύτταρο μπορεί να εκλύσει δυναμικό ενεργείας ανεξάρτητα από τους διαύλους K^+ .

Όπως και αν εκλύεται το δυναμικό ενεργείας (γλυκόζη ή αργινίνη ή φαρμακολογικά με KCl ή ακετυλοχολίνη), διάφοροι παράγοντες ενισχύουν το αποτέλεσμά του, αυξάνουν δηλαδή περαιτέρω την ενδοκυττάρια $[Ca^{++}]$, αλλά και τη δράση αυτού στην έκκριση ινσουλίνης:

1) Διάφοροι μεταβολίτες, με πιθανότερους ενδιάμεσους μεταβολίτες του κύκλου του Krebs, NADPH, μηλονικό, γλουταμικό κ.ά.

2) Λιπαρά οξέα. Έχουν προταθεί τρεις μηχανισμοί: Οξειδωση στα μιτοχόνδρια και αύξηση ATP, πρόσδεση στον συνδεόμενο με G-πρωτεΐνη υποδοχέα GPR40 που προκαλεί έξοδο Ca^{++} από την ενδοκυττάρια δεξαμενή, και μετατροπή σε ακυλ-CoAs που προκαλούν εξωκυττάρωση των κοκκίων ινσουλίνης άμεσα ή μέσω πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC).

3) Παρασυμπαθητικό (ακετυλοχολίνη μέσω μουσκαρινικών υποδοχέων και διακυλογλυκερόλης) και συμπαθητικό σύστημα (διεγερτικοί β- και ανασταλτικοί α_2 αδρενεργικοί υποδοχείς μέσω αδενυλκυκλάσης και κυκλικού AMP).

4) Ινκρετίνες, GLP-1 και GIP. Προσδένονται σε συνδεόμενους με G-πρωτεΐνη υποδοχείς και αυξάνουν την ενδοκυττάρια $[Ca^{++}]$ μέσω αδενυλκυκλάσης, cAMP και ενεργοποίησης PKA ή EPAC2 (cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor).

Επιπλέον, για τη φυσιολογική έκκριση ινσουλίνης είναι απαραίτητοι πολυάριθμοι μεταγραφικοί παράγοντες. Παραδείγματα αποτελούν οι HNF-4a, HNF-1a, PDX1/IPF1, HNF-1β και NeuroD1/BETA, μεταλλάξεις στα γονίδια των οποίων προκαλούν αντίστοιχα τους MODY1 και MODY3-MODY6, και ο TCF7L2 και τα άλλα μέλη του μηνύματος WNT.

Η έκκριση της ινσουλίνης γίνεται κατά ώσεις που συμπίπτουν χρονικά με την έκλυση των δυναμικών ενεργείας και είναι ανάλογες της έντασης του ερεθίσματος και των ενισχυτικών μηχανισμών. Συνολικά η έκκριση ινσουλίνης μετά διέγερση με γλυκόζη διακρίνεται σε πρώτη φάση με κορύφωση στα 3-5 λεπτά και γρήγορη επάνοδο στα βασικά επίπεδα και δεύτερη φάση χωρίς κορύφωση. Η υπόθεση ότι για τις δύο φάσεις ευθύνεται η εξωκυττάρωση κοκκίων από διαφορετικές δεξαμενές του β-κυττάρου σήμερα αμφισβητείται. Στην πραγματικότητα οι ίδιοι μηχανισμοί είναι υπεύθυνοι και για τις δύο φάσεις, στην πρώτη φάση όμως η αύξηση της ενδοκυττάριας $[Ca^{++}]$ είναι ταυτόχρονη σε όλα τα β-κύτταρα σε όλα τα νησιδία, ενώ στη δεύτερη φάση είναι ταυτόχρονη μεν σε όλα τα β-κύτταρα ενός νησιδίου, ασύγχρονη όμως μεταξύ των νησιδίων.

Η συμβολή της γενετικής στην παθογένεια της δυσλειτουργίας του β-κυττάρου και η κλινική σημασία της.

Μέχρι το 2006 οι έρευνες συγκεκριμένων γονιδίων, «υποψηφίων» (candidate) σύμφωνα με γνωστούς μηχανισμούς, είχαν αποκαλύψει μόνον τρεις πολυμορφισμούς που συσχετίζονταν με τον διαβήτη τύπου 2. Με την ανακάλυψη του γονιδίου TCF7L2, του οποίου πολυμορφισμοί εμφανίζουν την ισχυρότερη συσχέτιση με τον διαβήτη από όλα τα γνωστά γονίδια, άρχισε μια νέα εποχή. Η πρόοδος της τεχνολογίας επέτρεψε τη μελέτη της συσχέτισης με πολυγονιδιακές ασθένειες ταυτόχρονα χιλιάδων πολυμορφισμών στο μεγαλύτερο μέρος του γονιδιώματος γρήγορα και φθηνά [Genome-Wide Association (GWA) studies, μελέτες συσχέτισης ολοκλήρου του γονιδιώματος]. Επιπλέον, συνεταιρισμοί (consortia) ερευνητικών

ομάδων από όλον τον κόσμο συγκέντρωσαν χιλιάδες δείγματα που αύξησαν την ισχύ (power) και επέτρεψαν την επαλήθευση (replication) των ευρημάτων των μελετών σε πολλούς πληθυσμούς. Έτσι κατέστη δυνατόν σε τρία χρόνια να αποκαλυφθούν 19 συχνοί (>5%) στο γενικό πληθυσμό πολυμορφισμοί που σχετίζονται με το διαβήτη. Τα ευρήματα αυτά ήταν σημαντικά από πολλές απόψεις:

α) Αποκάλυψη αγνώστων παθοφυσιολογικών μηχανισμών

Με τις GWA κατέστη δυνατό να ελεγχθούν «τυφλά» για πιθανή συσχέτιση και φαινομενικά άσχετα με το διαβήτη γονίδια. Πράγματι, για τα περισσότερα γονίδια με πολυμορφισμούς σχετιζόμενους με το διαβήτη δεν ήταν γνωστός ο τρόπος δράσης τους. Εντατικές μελέτες έδειξαν ότι η πλειονότητα αυτών των πολυμορφισμών σχετίζεται με διαταραχές στην έκκριση ινσουλίνης. Ο ακριβής παθοφυσιολογικός μηχανισμός εξακολουθεί όμως να παραμένει άγνωστος. Χρησιμοποιώντας καθιερωμένες λεπτομερείς τεχνικές μέτρησης της έκκρισης ινσουλίνης (OGTT, IVGTT, τροποποιημένη υπεργλυκαιμική clamp με επιπλέον μέτρηση της απάντησης σε ενδοφλέβια χορήγηση GLP-1 και αργινίνης) δείξαμε ότι οι πολυμορφισμοί των διαφόρων γονιδίων που ανακαλύφθηκαν στις GWA επιδρούν σε διαφορετικά σημεία στην έκκριση ινσουλίνης. Μία ομάδα γονιδίων μειώνει αμιγώς την επαγόμενη από τη γλυκόζη έκκριση της ινσουλίνης, μία ομάδα αυξάνει επιπλέον τον λόγο προ-ινσουλίνης προς ινσουλίνη και μία ομάδα εμφανίζει επιπλέον μειωμένο το φαινόμενο ινκρετίνης (επαγόμενη από GLP-1 έκκριση ινσουλίνης). Ειδικά το γονίδιο *TCF7L2* επιδρά και στα τρία σημεία, κυρίως επηρεάζοντας τη δράση (και όχι τη συγκέντρωση) του GLP-1.

β) Καθιέρωση νέων θεραπευτικών στρατηγικών ή καθορισμός νέων θεραπευτικών στόχων (gene-treatment interactions, pharmacogenomics)

Με βάση το πρότυπο περιπτώσεων νεογνικού διαβήτη που ανταποκρίνονται στη θεραπεία με σουλφονουλορίες, ο διαβήτης που αναπτύσσεται σε έδαφος συγκεκριμένων πολυμορφισμών θα μπορούσε τουλάχιστον θεωρητικά να ανταποκρίνεται καλύτερα σε συγκεκριμένα αντιδιαβητικά φάρμακα. Εξάλλου, με τη διευκρίνιση των παθογενετικών μηχανισμών που αντιστοιχούν στους νέους πολυμορφισμούς θα μπορούσαν ενδεχομένως να τεθούν

συγκεκριμένοι στόχοι για υφιστάμενα ή νέα φάρμακα. Ως παράδειγμα, ένας πολυμορφισμός στο γονίδιο *MTNR1B* συνδέεται με αυξημένη έκφραση του υποδοχέα 1B της μελατονίνης στο β-κύτταρο και μειωμένη έκκριση ινσουλίνης. Ένας αναστολέας του υποδοχέα θα μπορούσε να αποτελέσει πιθανό αντιδιαβητικό φάρμακο. Αλλά και μη φαρμακευτικές παρεμβάσεις (π.χ διατροφή, άσκηση) θα μπορούσαν να έχουν διαφορετική αποτελεσματικότητα ανάλογα με τον πολυμορφισμό. Πάντως κάτι τέτοιο δεν φάνηκε να ισχύει με το *TCF7L2* στη γνωστή μελέτη πρόληψης του διαβήτη DPP.

γ) Καθορισμός του γενετικού κινδύνου ανάπτυξης διαβήτη

Για όλους τους πολυμορφισμούς/γονίδια των GWA, ο σχετικός κίνδυνος να αναπτύξουν διαβήτη οι ετεροζυγώτες για το αλληλίο κινδύνου (risk allele) δεν ξεπερνά το 1,20 (20% αύξηση του κινδύνου), με μόνη εξαίρεση έναν πολυμορφισμό του *TCF7L2* που ο σχετικός κίνδυνος πλησιάζει ή φθάνει το 1,50. Οι ομοζυγώτες εμφανίζουν σε ορισμένες περιπτώσεις σημαντικά μεγαλύτερο κίνδυνο – για τον πολυμορφισμό του *TCF7L2* ο κίνδυνος είναι διπλάσιος, είναι όμως μάλλον σπάνιοι στο γενικό πληθυσμό, καθώς η συχνότητα του αλληλίου κινδύνου σπανίως ξεπερνά το 30%. Σε μια μελέτη που συνδύασε 11 γονίδια/πολυμορφισμούς ο σχετικός κίνδυνος για την ανάπτυξη διαβήτη ατόμων με ≥ 12 αλληλίου κινδύνου ήταν 2πλάσιος αυτών με ≤ 8 αλληλίου κινδύνου και σε μια άλλη μελέτη σε 15 πολυμορφισμούς ο κίνδυνος αυτών που φέρουν περισσότερα από 18-30 αλληλίου κινδύνου ήταν 8πλάσιος αυτών που φέρουν μέχρι 10 αλληλίου κινδύνου. Όμως ο αριθμός των ατόμων του γενικού πληθυσμού που εμπíπτουν στις ακραίες αυτές κατηγορίες είναι μικρός. Επειδή η πλειονότητα των ατόμων φέρει κάποια αλληλίου κινδύνου, σε ατομική βάση ο καθορισμός του γονοτύπου των σήμερα γνωστών πολυμορφισμών προσφέρει στην καλύτερη περίπτωση την πληροφορία του αυξημένου κινδύνου ανάπτυξης διαβήτη κατά 2-3 φορές. Όπως φάνηκε, ωστόσο, με τη χρήση καμπύλης ROC, τις ίδιες ή και ακριβέστερες πληροφορίες παρέχει η εκτίμηση του κινδύνου με αμιγώς κλινικά κριτήρια (κληρονομικό ιστορικό, BMI κλπ). Πιθανώς με την αποκάλυψη στο μέλλον και άλλων πολυμορφισμών (υπολογίζεται ότι χρειάζονται τουλάχιστον 25 πολυμορφισμοί με συχνότητα >10% στον πληθυσμό και σχετικό κίνδυνο τουλάχιστον 1,5) να καταστεί δυνατόν να γίνει ικανοποιητική πρόγνωση της ανάπτυξης διαβήτη στη διάρκεια της

ζωής ενός ατόμου με καθορισμό του γενετικού κινδύνου και μόνον.

Βιβλιογραφία

1. *Henquin JC*. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia* 2009; 52: 739-51.
2. *Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM*. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2006; 444: 840-6.
3. *Bratanova-Tochkova TK, Cheng H, Daniel S, et al*. Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes* 2002; 51: (Suppl 1): S83-90.
4. *Weedon MN, McCarthy MI, Hitman G, et al*. Combining information from common type 2 diabetes risk polymorphisms improves disease prediction. *PLoS Med* 2006; 3: e374.
5. *Schäfer SA, Tschrutter O, Machicao F, et al*. Impaired glucagon-like peptide-1-induced insulin secretion in carriers of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene polymorphisms. *Diabetologia* 2007; 50: 2443-50.
6. *Zeggini E, Scott LJ, Saxena R, et al*. Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nat Genet* 2008; 40: 638-45.
7. *Cauchi S, Meyre D, Durand E, et al*. Post genome-wide association studies of novel genes associated with type 2 diabetes show gene-gene interaction and high predictive value. *PLoS ONE*. 2008; 3: e2031.
8. *Lyssenko V, Groop L*. Genome-wide association study for type 2 diabetes: clinical applications. *Curr Opin Lipidol* 2009; 20: 87-91.
9. *Staiger H, Machicao F, Schäfer SA, et al*. Polymorphisms within the novel type 2 diabetes risk locus MTNR1B determine beta-cell function. *PLoS ONE* 2008; 3: e3962.
10. *Müssig K, Staiger H, Machicao F, et al*. Association of type 2 diabetes candidate polymorphisms in KCNQ1 with incretin and insulin secretion. *Diabetes* 2009; Apr 14. [Epub ahead of print].