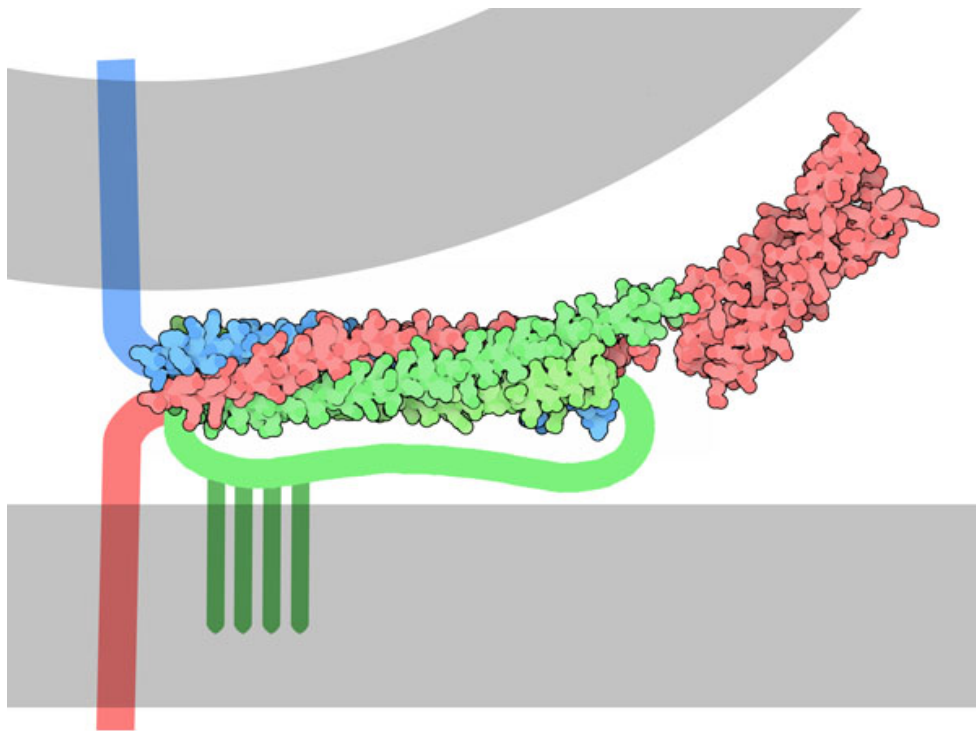




UPPSALA  
UNIVERSITET

## SNARE-proteiner och deras roll vid exocytos av insulin samt koppling till diabetes typ 2



Jackie Bruhn

---

Independent Project in Biology  
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2015  
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

# SNARE-proteiner och deras roll vid exocytos av insulin, samt koppling till diabetes typ 2

Jackie Bruhn

Självständigt arbete i biologi 2015

## Sammandrag

Diabetes typ 2 är ett växande samhällsproblem i världen och globalt sett så är det just nu ungefär 400 miljoner människor som lever med denna sjukdom varje dag. Sjukdomen karakteriseras av att man utvecklar en resistens mot insulin i kroppens celler, samt att man får en kraftigt minskad reaktion på för högt blodsocker. Detta i sin tur leder till utveckling av symptomen som associeras med typ 2 diabetes. Hormonet som är involverat är insulin och bildas i tre steg. I första steget kallas det för preproinsulin, vilket sedan klyvs till proinsulin. I det sista steget klyvs det ytterligare en gång och bildar då den färdiga produkten, insulin. SNARE proteiner är en familj av proteiner som har identifierats att ha en viktig roll vid exocytos av insulin. Dessa delas upp i t-SNAREs och v-SNAREs som samarbetar för att dra vesikeln mot cellmembranet där den sedan fuserar. Fuseringen sker spontant vid kroppstemperatur och medieras inte av SNARE-proteinerna, som enbart är där för att dra membranerna tillräckligt nära för att överkomma den energibarriär som finns mellan två hydrofila membransidor. Efter fusering kan vesikeln släppa ut sitt innehåll (*insulin*) varvid den sedan tas tillbaka för att återanvändas. Dessa protein tillsammans med en till familj av Munc-proteiner, bestående av Munc18a, Munc18b och Munc18c har visats leda vesiklarna genom de steg som sker vid exocytos av insulin. SNARE proteinerna bildar vid förhöjt blodsocker ett komplex som medierar exocytosen. Studier har visat att Langerhanska öar från diabetiska möss uttrycker en minskad mängd av t-SNAREs Syntaxin och SNAP-25, vilket är en av orsakerna till att insulinresponsen inte fungerar som den ska vid typ 2 diabetes. Med hjälp av pulse-chase teknik har man återställt mängden t-SNAREs och upptäckt att detta återställer de diabetiska symptomen hos mössen. SNARE molekylerna i sig är uppbyggda av en mängd aminosyror och alla delar en speciell sekvens som kallas för motiv. Denna är cirka 60-70 aminosyror lång. De flesta SNARE proteiner har ett motiv, men SNAP-25 har två motiv. När fyra eller tre SNARE proteiner med de 4 olika unika motiven möts så bildas ett komplex som är stabilt och hjälper till att dra vesikeln mot membranet med hjälp av zipping. I vilostadie, alltså när exocytos av insulin inte skall ske, är komplexet dissociativt och är inte en sammanhängande enhet. Den flyter istället runt i cytosolen. När cellmembranet och vesikelmembranet kommit tillräckligt nära varandra sker fuseringen automatiskt utan hjälp av SNARE-molekylerna.

SNARE proteiner verkar spela en viktig roll vid exocytos av insulin men är inte nödvändigtvis de enda spelarna i situationen. Även andra protein som t.ex. munc18 har identifierats att mediera fuseringen av membranerna. En ökad förståelse för exocytos kommer inte enbart leda till förbättrade chanser till ett botemedel för just diabetes men även andra exocytosrelaterade sjukdomar. Det finns idag, utöver forskningen kring just den molekylära mekaniken bakom exocytos, även andra förslag och idéer på hur man skulle kunna bota diabetes. Bland annat transplantation av Langerhanska öar, samt stamcellstransplantation. Som slutsats kan man anta att detta forskningsområde kommer att fortsätta göra stora framsteg mot både en större förståelse och förbättring av behandling samt eventuellt ett botemedel mot sjukdomen. Ett botemedel som skulle hjälpa miljontals människor. Huruvida forskningen kommer kunna appliceras på människor eller inte återstår att se.

# Inledning

## Typ 2 diabetes

Diabetes orsakas av en blandning av gener och miljöfaktorer. Dessa tillsammans bidrar till en minskad reaktion på höga blodsockervärden, samt en ökad resistans för insulin i kroppens celler. De vanligaste typerna av diabetes brukar delas upp i två delar, typ 1 diabetes och typ 2 diabetes där den första är autoimmun medan den andra inte är det. Globalt sett finns det ungefär 400 miljoner som är drabbade av sjukdomen och som lever med den varje dag (Nathan 2015).

Några av de faktorer som spelar roll vid utvecklingen av diabetes är bland annat mutationer på en gen som kallas för HLA, Human Leukocyte Antigen Complex. Detta är ett område i våra kromosomer som styr stora delar av vårt immunförsvar, därmed även de delar som kan anses vara involverade i utvecklingen av diabetes (Horton *et al.* 2004). Även om den typen av diabetes som man främst tänker på som kopplad till immunförsvaret är typ 1 diabetes så är även typ 2 diabetes delvis beroende av hur genetiska faktorer samverkar. Till exempel så finns det genetiska faktorer som påverkar hur svårt eller lätt det är för en individ att gå upp eller ner i vikt och eftersom fetma är en stor faktor vid utvecklingen av typ 2 diabetes så är även dessa genetiska faktorer kopplade till sjukdomen (Smyth & Heron 2006). Resistansen som karakteriserar typ 2 diabetes leder till att mer insulin behövs medan den minskade reaktionen på höga blodsockervärden alltså leder till att för lite insulin bildas (Kaufman 2011). Vid typ 1 diabetes behandlas detta med injektioner av insulin medan typ 2 diabetes i första hand behandlas med hjälp av tabletter samt ändrade kost- & motionsvanor. Detta beror på att typ 2 diabetes är starkt länkat till övervikt och fetma. Detta beror på att kroppen inte orkar eller hinner producera tillräckligt med insulin för att förse en för stor kropp med lagom mycket, och då utvecklas det diabetiska symptom (Cooper 2000).

Diabetes är en sjukdom som inte bara påverkar blodsockret och som snabbt tas om hand om med insulin. Kroppen tar skada av att pendla mellan för höga och för låga blodsockernivåer vilket ger upphov till en rad komplikationer. Komplikationer som kan uppstå vid diabetes är bland annat tandköttproblem (Mealey 2006), njursvikt och hjärtkärlproblem (Cooper 2000). Tidigare så kopplades diabetes typ 2 inte bara till övervikt och fetma utan även äldre ålder. Det var vuxna som drabbades och det var ovanligt att se det hos barn. Med den ökande epidemin av barnfetma så syns även att folk i yngre åldrar, till och med små barn drabbas av typ 2 diabetes som en följd av sin övervikt. Detta är en oroväckande trend som många länder idag försöker ta tag i (*World Health Organization: [www.who.int](http://www.who.int)*). I tvillingstudier på råttor har det visats att fetma kan vara beroende av vad råttan har för bakterieflora. I studier överfördes bakterieflora från en överviktig råtta till dess smala tvilling och det visades att även denna utvecklade en övervikt. Åt andra hållet visades det att bakterieflora från den smala tvillingen inte ledde till en viktnedgång hos den överviktiga råttan. Detta ledde till slutsatserna att den tarmflora man har troligtvis kan påverka hur svårt eller lätt man som individ har för att gå upp i vikt. Även detta styrs delvis av ens gener (Ridaura *et al.* 2013).

## Insulin – ett hormon av stor vikt

Insulin är ett peptidhormon som bildas i bukspottskörteln och som tillsammans med glukagon reglerar blodsockernivån i kroppen som påverkas av t.ex. träning eller intag av kolhydrater. Insulinets jobb är att signalera till andra vävnader som t.ex. muskler att föra in glukos till cellerna. Detta gäller alla vävnader förutom hjärnan som har en fristående glukostransport och inte är beroende av insulin (Reece *et al.* 2014). Insulin bildas i de Langerhanska Öarna som återfinns i bukspottskörteln, fast hos vissa typer av djur utsöndras det istället i hjärnan (Wang

*et al.* 2007). Upptäckten av insulinet startade redan 1869 då Paul Langerhans upptäckte det som vi idag kallar för de Langerhanska öarna i bukspottskörteln. Han hade dock ingen aning då om vad deras funktion var. Vidare forskning leddes av ett flertal forskare och först på 1920-talet som det började genomföras seriösa försök med att isolera insulin för att bota ”sockersjukan” (Cooper 2000). Att insulin är ett peptidhormon innebär att den är en peptid som agerar som ett hormon. Det bildas i tre steg i  $\beta$ -cellerna. I det första steget kallas det för preproinsulin, och det är då i ett stadie där det inte kan användas som hormon ännu. Sedan klyvs en del av proteinet och bildar det som kallas proinsulin. Även i detta stadie är det inte redo att användas. Sist görs ytterligare en klyvning och det har då bildats insulin, vilket nu är redo att användas i kroppen så som vi är vana vid att det används (Reece *et al.* 2014).

### **SNARE-proteiners koppling till diabetes**

När det gäller kopplingen till diabetes så är det viktigt att förstå just hur viktig frågan om diabetes är och hur stort det är som samhällsproblem. I världen lever ungefär 400 miljoner människor med diabetes och får varje dag kämpa för att undvika komplikationer. Diabetes kan leda till en rad olika komplikationer och problem, speciellt om den går obehandlad, vilket typ 2 diabetes ofta gör. Detta beror på att den smyger sig på och är svår att känna igen i början (Nathan 2015). SNARE-proteinerna är starkt kopplade till de molekylära mekanismer som styr blodsockernivåer och som kan ligga bakom en eventuell sjukdom.

### **Exocytos – dess funktion och mekanism**

Exocytos är en grundläggande molekylär mekanism som sker i alla levande celler. Exocytos sker när cellen behöver föra större molekyler än vad som kan ske genom diffusion över cellmembranet. Det rör sig då om stora biomolekyler, proteinkedjor som är för långa för att diffundera. Dessa inkapslas då istället i en vesikel som förs genom cytosolen mot cellmembranet där det sedan fuserar och innehållet kan släppas ut på utsidan. Detta är motsatsen till endocytos, då cellen vill ta in större biomolekyler från utsidan. Exocytos sker av många olika anledningar i cellen. Det kan vara för att skicka ut farliga ämnen och gifter ur cellen, för att bidra med något hormon eller annan signalering i kroppen, eller för att bygga upp det intercellulära området runt omkring cellen (Reece *et al.* 2014). Exocytos är en kontrollerad molekylär händelse som reagerar på olika stimuli i olika celler. Till exempel så sker den mellan neuron i hjärnan för att frisätta signalsubstanserna som t.ex. serotonin och dopamin. Men den sker även som reaktion på högt blodsocker i bukspottskörteln (Cooper 2000). Det som exocyteras som reaktion på högt blodsocker är insulin, ett hormon som hjälper till med att sänka blodsockerhalten efter intag av kolhydrater. Hormonet verkar genom att det ökar känsligheten hos kroppens celler så att de lättare ska ta upp glukos från blodet och fylla på sina glukoslager. Insulinet signalerar också till levern att fylla på de reserver av glukagon som finns där ifall detta skulle behövas vid ett senare tillfälle när blodsockret blir lägre. Levern och bukspottskörteln jobbar på detta sätt antagonistiskt mot varandra för att hålla blodsockernivån så jämn och stabil som möjligt (Reece *et al.* 2014). Det är denna balans och utsöndring av hormon som är ett av problemen som drabbar folk med diabetes. I bukspottskörteln är exocytosen en  $\text{Ca}^{2+}$ -beroende händelse som startas av att blodsockret är för högt och därmed signalerar att det måste tas om hand om.

### **Hur reagerar celler på förhöjt blodsocker?**

För att riktigt förstå hur SNARE-protein fungerar på molekylär nivå, kan det vara av intresse att förstå hur en  $\beta$ -cell reagerar vid höga blodsockerhalter och triggas till att släppa ut insulin. Detta sker i ett antal steg som alla bidrar till att tillslut bilda SNARE-komplex för exocytos av insulin. Vid höga blodsockerhalter tar cellerna in glukos via GLUT2-kanalen, vilket sedan fosforyleras av glukokinas och bildar glukos-6-fosfat. Detta kommer i sin tur metaboleras av

mitokondrierna och därmed skifta ATP/ADP-balansen i cellen. ATP-styrda kaliumkanaler kommer då stängas och cellen kommer depolariseras. Ett högt intag av  $\text{Ca}^{2+}$ -joner genom spänningsberoende kanaler leder sedan till att SNARE-komplex bildas och bidrar till exocytosen av insulin för att bemöta det höjda blodsockret (**Tab 1**). Det är dock inte exakt känt hur höjda nivåer av  $\text{Ca}^{2+}$ -joner faktiskt får komplexet att bildas (Jewell *et al.* 2010). När detta har hänt så kommer kroppen att bilda insulin av propreinsulin molekyler som sedan släpps ut i cytosolen genom exocytos. Propreinsulin kommer att klyvas för att bilda preinsulin vilket i sin tur klyvs för att bilda den färdiga produkten insulin. Även exocytosen ut till cytosolen är medierad av SNARE-proteiner. Insulinet kommer sedan signalera till andra vävnader att påbörja intaget av glukos och blodsockervärdet kommer då att återställas. Detta sker hos en frisk individ mycket fort och man har mycket få svängningar i blodsockret (Reece *et al.* 2014). Förutom dessa mekanismer så kontrolleras exocytosen av insulin även av andra protein, t.ex. RAB proteiner och G proteiner (Lang 1999).

**Tabell 1.** Skiss över stegen vid förhöjt blodsocker.

<b>Glukos tas in i cellen via GLUT-2 kanaler</b>	<i>Reaktion på förhöjt blodsocker</i>
<b>Fosforylering glukos » glukos-6-fosfat</b>	<i>Glukokinas fosforylerar glukos</i>
<b>Skiftning av ATP-/ADP balansen</b>	
<b>Kaliumkanaler stänger</b>	<i>Cellen depolariseras</i>
<b><math>\text{Ca}^{2+}</math> joner tas in genom spänningsberoende kanaler och signalerar komplexbildning</b>	<i>Komplexet av SNARE-proteiner bildas och cellen kan nu bemöta det höga blodsockret</i>

### **SNARE-proteiner – vad är det egentligen?**

SNARE-proteiner är en familj av proteiner som tillsammans bildar stora komplex för att bidra till det mekaniska system som styr exocytos i många celler. Dessa kan delas upp i grupperna t-SNARE (target-SNARE) och v-SNARE (vesikel-SNARE) som sitter på målmembranet respektive vesikeln som skall fuseras vid exocytos (Söllner *et al.* 1993). När dessa olika protein möts, så sker en reaktion där de två typerna av protein kopplar ihop till varandra och dras samman. Denna zip-lock liknande rörelse leder till att vesikeln och membranet möts för att fusera. Själva fusionen av membranerna sker spontant vid kroppstemperatur och är inte i sig beroende av SNARE-proteinerna (Weber *et al.* 1998) men utan SNARE proteinerna kommer membranerna inte tillräckligt nära varandra för att detta ska ske. Proteinerna är livsviktiga för att överkomma den energinivå som krävs för att driva membranerna mot varandra. Vid fusionen släpper vesikeln ut sitt innehåll och tas sedan tillbaka in i cellen där vesikeln kan återanvändas. Tidigare hade forskare hittat SNARE-protein i nervceller som styrde neurosignaler och runt 1995 - 1996 visades det att dessa protein även uttrycktes vid exocytos hos  $\beta$ -celler (Wheeler *et al.* 1996). Några av de SNARE-proteiner som har hittats är bland annat VAMP-2 (v-SNARE), Syntaxin & SNAP-25 (t-SNARES) (Hu *et al.* 2003).

# SNARE-proteiner och deras roll i kontrollen av exocytos

## Hur fungerar SNARE protein i praktiken?

### *Utseende*

SNARE-proteiner består av olika strängar av aminosyror men delar en 60-70 lång delsträng med andra SNARE-proteiner, detta kallas deras motiv. Det är motivet som tillåter proteinerna att interagera och bilda ett större komplex. Det finns hittills cirka 35 olika SNAREs identifierade hos däggdjur. Protein är som redan nämnt uppbyggda av aminosyror och kedjornas ändar sitter en C-terminal och en N-terminal, en på vardera sida. C-terminalen består av en karboxylgrupp och N-terminalen av en fri aminogrupp (Reece *et al.* 2014). I de flesta fallen har SNARE-proteinet en transmembranförankring vid sin C-terminal. Det betyder att det är vid den sidan av proteinet som den fäster i cellmembranet genom att förankra sig i det. Det är även där som motivet oftast hittas, i närheten av C-terminalen. Vissa SNAREs (*t.ex.* SNAP-25) har två motiv, en vid varje terminal (Oyler *et al.* 1989). Motivets finns i fyra olika uppsättningar kallade Q<sub>a</sub>, Q<sub>b</sub>, Q<sub>c</sub> och R-SNAREs (Malsam & Söllner 2011).

### *t-SNARE*

t-SNAREs fungerar så att de sitter förankrade i cellmembranet och har en  $\alpha$ -helix form som sträcker sig utåt i cytosolen. Denna helixkonstruktion kan därmed vid kontakt med en v-SNARE bilda ett komplex som drar ihop en vesikel med membranet. Trots att SNARE-proteiner delvis skiljer sig i storlek och form så delar de alla en gemensam sekvens, motivet. Det finns fyra sådana motiv och tillsammans kan de bilda komplexet (Bock *et al.* 2001). De mest kända t-SNARE:n är Syntaxin och SNAP-25, men det finns åtskilliga fler identifierade.

### *v-SNARE*

v-SNAREs fungerar på liknande sätt som t-SNAREs med den skillnad att de sitter förankrade i membranet för en vesikel istället för cellmembranet. Även dessa sitter förankrade vid sin C-terminal och har en helixformad struktur utåt mot cytosolen (Weber *et al.* 1998). VAMP-2 är den v-SNARE som i störst utsträckning har lyckats identifieras i bukspottskörteln i samband med exocytos av insulin.

### *Komplexet*

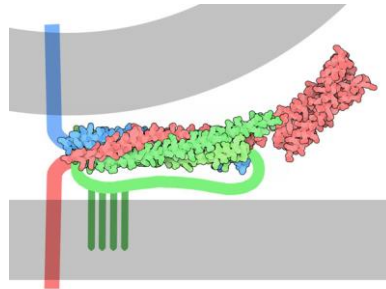
Komplexet i sig bildas när tre eller fyra olika SNARE-proteiner kommer i kontakt och deras motiv bildar en fyra-helix-formation som sedan arbetar med själva dockningen av vesikeln. Anledningen till att det är tre eller fyra SNAREs beror på att det måste vara en upplaga av varje motiv som möts för att bilda komplexet. Eftersom åtminstone en känd molekyl har två motiv behövs det alltså minst tre, men kanske fyra SNAREs (Oyler *et al.* 1989). När en v-SNARE interagerar med t-SNAREs så är det som sker att de tillsammans zippar ihop från N-terminalens ände till den membranbundna C-terminalen och drar således vesikeln mot cellmembranet där fusion sedan sker (Pobbati *et al.* 2006).

## Hur hittar SNARE-proteinet rätt?

Som vid alla molekylära mekanismer i cellen så beror bildandet av komplexet för exocytos på att rätt SNARE-proteiner är i rätt position vid rätt tillfälle. Studier har visat att t-SNAREs hittar sin position tack vare längden av den hydrofobiska delen vid sin C-terminal och graden av hydrofobi som kan uppmätas där. De olika lipidlagren som upphittas i cellen har olika grad av hydrofobi med ökande grad utåt från golgiapparaten mot cellmembranet. Tack vare detta så kan olika molekyler som är olika mycket hydrofoba fastna på olika stället. En molekyl söker sig till det membran där viloenenergin är så låg som möjligt. Genom detta så kan

t-SNARE proteinet därmed hitta dit det ska och hamna i antingen vesikeln eller cellmembranet. Studier har visat att en ändring av proteinkedjan som hittas vid C-terminalen hos t-SNAREs har lett till att protein placerats fel i cellmembranet och problem med exocytos. Detta beror alltså på att man inte kan få en fungerade fusering av membranerna utan fungerade t-SNAREs på rätt ställe (Malsam & Söllner 2011).

### Vilka delar består ett SNARE-komplex utav och hur ser de ut?



**Figur 1.** Heterodimeren av SNAP-25 och SYNTAXIN (grön och röd) utför en zipping-rörelse och binder samman med VAMP-2 (blå) vilket leder till att vesikeln dras till cellmembranet. (Bilden använd för edukativa ändamål med tack till David S. Goodsell och RCSB PDB).

De SNARE-komplex som har identifierats består till störst del av tre delar, SNAP-25, Syntaxin samt VAMP-2. Dessa är olika delar i det komplex som bildas för att exocytosen skall fungera. VAMP-2 är en v-SNARE och sitter således på vesikeln som ska fusera med cellmembranet, medan de andra två är t-SNAREs och sitter i cellmembranet vid exocytosplatsen. De t-SNAREs som sitter vid cellmembranet interagerar med varandra på molekylär nivå och skiftar mellan det som kallas för ett "zipped stage" och det dissociativa stadiet. I det dissociativa stadiet är proteinerna fria i cytosolen eller fästa vid membranerna. Medan de i "zipped stage" stadiet bildar komplex för att med hjälp av zippning (som en dragkedja) dra vesikeln och cellmembranet mot varandra. Dessa skiftningar sker på några sekunder (Weninger *et al.* 2008). SNARE-komplex består av två olika delar, delvis ett t-SNARE-komplex som består av olika typer av t-SNAREs som interagerar, men även ett ternärt stadie där v-SNAREs interagerar med det tidigare nämnda komplexet (Sutton *et al.* 1998) (*fig. 1*).

### Minskat uttryck av t-SNAREs Syntaxin och SNAP-25

I studier har det visats att ett minskat uttryck av t-SNAREs Syntaxin och SNAP-25 är involverat i minskad insulinproduktion hos råttor med typ 2 diabetes. Det användes 12 veckor gamla råttor och en kontrollgrupp för att testa detta. Värt att veta är att de diabetiska råttorna (*GK-råttor*) inte var överviktiga, vilket annars ofta kopplas till diabetes typ 2. Vid mätning upptäcktes att en ökad degradering av insulin skedde i de Langerhanska öarna (*eng. islets*) hos GK-råttorna jämfört med kontrollgruppen. Man uppmätte ett minskat uttryck av både Syntaxin och SNAP-25 i GK-råttorna när deras  $\beta$ -celler jämfördes med kontrollgruppen. Denna skillnad upptäcktes inte i andra celler när de jämfördes med celler från näthinnan i båda grupperna (Nagamatsu *et al.* 1999).

### Återställning av t-SNARE protein

Med hjälp av pulse-chase teknologi har det visats att återställning av t-SNARE nivåer i Langerhanska öar från diabetiska råttor även har lett till en delvis återställning av de diabetiska symptomen. (Nagamatsu *et al.* 1999). Detta tyder på att nivåerna av olika SNARE protein spelar roll inte bara vid uppkomst av symptom men även är värda att diskutera vid diskussioner kring eventuella botemedel för diabetes typ 2.

## **Munc18**

Munc18 är ytterligare ett protein som används för att mediera exocytosen av insulin från  $\beta$ -celler i de Langerhanska öarna. B-celler uttrycker tre olika isomorfa former av Munc18, dessa kallas Munc18a, Munc18b och Munc18c. Vad de första två isomorfa formerna gör, men studier hade inte gjorts på exakt vad Munc18c gör. Munc18a är kopplad till förstadier av dockning av de exocytosiska granulerna, medan Munc18b är kopplat till de granuler som ska ta sig från golgistacken, en del av golgiapparaten, där skapande av vesiklar för insulin sker och vidare ut till cytosolen och upp till cellmembranet. Munc18c visades sedan spela en viktig roll i båda dessa stadier, samt vara delvis reaktivt med Syntaxin för att mediera det zipping som sker vid dockning av granulen till cellmembranet (Zhu *et al.* 2015).

## **Amyloid- $\beta$ -oligomers**

I studier har man visat att det finns olika saker som även kan inhibera bildandet av SNARE-komplexet. Bland annat har det visats att A $\beta$ -oligomerer har en inhiberande effekt och förhindrar att komplexet kan bildas. Detta har visats i nervceller men det misstänkts att liknande problematik kan uppstå även i  $\beta$ -celler från bukspottskörteln (Yang *et al.* 2015).

## **Diskussion**

### **Exocytos**

Exocytosens roll i kroppens celler är väl känd, men i många aspekter även okänd. Man vet hur de större molekylära förloppen går till, men är t.ex. inte helt säkra på exakt hur  $\beta$ -cellerna reagerar på de förhöjda  $\text{Ca}^{2+}$  värden som är kritiska vid förhöjt blodsocker för att signalera till cellerna vad som händer. Med hjälp av olika tekniker undersöks detta för att höja kunskapen och således chansen för utveckling av botemedel mot inte bara diabetes utan även andra sjukdomar som beror på felaktigheter i exocytosen av ämnen. Ett botemedel skulle hjälpa många av alla de miljoner människor som idag lider av diabetes.

### **Diabetes**

Att diabetes är ett växande samhällsproblem kan ingen förneka. Detta skiljer sig såklart mellan olika kulturer och världsdelar, men speciellt i västvärlden ser man en ökad trend och minskande ålder vid insjuknande. 1985 fanns det 30 miljoner människor med diabetes och vid 1995 hade den siffran ökat till 135 miljoner. Man förutser att 366 miljoner människor kommer ha typ 2 diabetes vid 2030 (Smyth & Heron 2006). Just för att diabetes har en så pass stor inverkan på den drabbades liv, med allvarliga komplikationer som kan uppstå samt att den är så starkt kopplad till övervikt och fetma så är det ett stort problem i dagens samhälle och det kostar samhället många miljarder kronor varje år globalt sett för att behandla diabetiker både med mediciner och vid komplikationer (Smyth & Heron 2006). Dessa komplikationer består t.ex. av tandproblem (Mealey 2006), njursvikt och hjärtkärlproblem (Cooper 2000). Komplikationer är potentiellt dödliga för den sjuka och enligt *World Health Organization (WHO)* är diabetes beräknat att bli den sjunde mest dödliga sjukdomen innan 2030. Enligt dem är också diabetes redan den ledande anledningen till att man blir blind.

En slutsats man kan dra är att detta forskningsområde är väldigt viktigt för att driva frågan både om diabetesens uppkomst och hur man kan eller bör behandla eller till och med bota sjukdomen i framtiden. Om man i framtiden kan förstå dessa processer på en djupare nivå så kommer det öka chansen att finna ett botemedel, vilket skulle förenkla livet för många miljoner människor runt om i världen.



## **SNAREs**

Forskningen kring SNARE-proteiner och deras roll vid exocytos är för tillfället ett ganska stort forskningsområde inte minst för att det potentiellt kan leda till nya lösningar och behandlingar av olika typer av diabetes. Forskning bedrivs inte bara på SNARE-proteiner utan även på hur  $\beta$ -celler fungerar och reagerar vid olika typer av situationer. Ämnet är inte bara otroligt hett utan även otroligt intressant. Det var inte förrän relativt sent (1995-1996) som man upptäckte att SNARE-proteiner återfanns i betaceller och hjälpte till att driva exocytosen i dessa celler. Den största delen av forskningen har bedrivits på nervceller då det var här de först upptäcktes och bekräftade att dessa molekyler var inblandade vid exocytos av neurosubstanser, men det har senare bekräftats att de molekyler som driver exocytosen i  $\beta$ -cellerna är mycket lika om inte identiska med de som hittats i neuroceller. Förutom dessa SNARE-proteinkomplex finns det fler proteiner som är involverade vid själva dockningen av vesiklarna. Bland annat munc18 (Dun *et al.* 2010) (Zhu *et al.* 2015). Den detaljerade processen för detta är inte helt känd utan kommer behövas fortsätta forskas på för att klargöra exakt hur det går till. Av de tre isomorfa formerna som har upptäckts vet man mycket om hur munc18a och munc18b fungerar men inte alls lika mycket om hur munc18c fungerar. Det har i försök visats att munc18c är involverad i båda de två tidiga stadierna av dockning av insulinvesiklar medan Munc18c är involverad i båda dessa stadier (Zhu *et al.* 2015). Detta kan tyda på att Munc18c har en viktigare roll än de andra två formerna, men även detta är något som måste fortsättas forska på för att klargöra frågan. Till skillnad från synaptiska SNARE proteiner så är de SNARE proteiner man finner i  $\beta$ -celler dissociativa i vilostadiet och komplexet bildas endast en kort stund innan exocytos ska ske (Takahashi *et al.* 2015).

## **Pulse-Chase teknologin**

Denna teknologi går ut på att man med hjälp av markerande isotoper eller fluorescerande proteiner kan följa ett molekylärt händelseförlopp genom att titta på celler eller hela Langerhanska Öar genom att fluorescensmikroskåp. Till teknologin ingår att man antingen tar celler från odlingar, som ofta har skrapats från sina försöksdjur (*oftast råttor*). Dessa markerar man sedan för att efter det återinföra de omarkerade proteinerna. Resultatet blir att man likt en orm genom cellen kan följa i vilken ordning olika molekylära komponenter och steg har utförts. Genom denna teknologi kan man se de allra minsta proteinerna och var i cellen de uttrycks för att sedan få fram data om vad detta innebär i situationen, t.ex. exakt vad proteinet gör där. Teknologin används ofta inom molekylärbiologiska sammanhang och är väl utvecklad och beprövad.

## **Annan forskning och framtiden**

Även annan forskning bedrivs inom ämnet för att bota diabetes och många lösningar har föreslagits och ibland till och med testats. Bland annat så pratas det mycket om stamcellstransplantation eller transplantation av Langerhanska öar från friska individer till de som insjuknat. Om man med hjälp av detta samt ”återställning” av immunförsvaret kan bota diabetes återstår att se, men det är en mycket spännande forskning som pågår.

I framtiden får man hoppas att forskningen har gjort framsteg och kommit mycket närmare en lösning på många av de problem människor lever med idag. Det finns utan tvekan en ljus väg framåt när man har dagens forskning i åtanke. Nyheter skapas ofta och framsteg sker regelbundet. Huruvida denna forskning kommer att kunna användas och appliceras på människor återstår att se, men framtiden ser ljus ut.

## **Tack**

Jag vill tacka min arbetsgrupp, Magdalena Neijd, Frida Ronquist, Louise Granlund och Michaela Lindgren som har läst min text och gett återkoppling för att förbättra mitt arbete avsevärt. Jag vill även tacka mina handledare, Åsa McKenzie & Åsa Konradsson Geuken som varit ovärderliga med sina återkopplingar och sitt stöd. Sist vill jag tacka min sambo, Joel Dahne för hans förståelse och oändliga stöd för mitt arbete och all tid det har tagit.

## Referenser

- Bock JB, Matern HT, Peden AA, Scheller RH. 2001. A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* 409: 839–841.
- Cooper GM. 2000. *The cell: a molecular approach*, 2. ed. ASM Press [u.a.], Washington, DC.
- Dun A, Rickman C, Duncan R. 2010. *The t-SNARE Complex: A Close Up* - Springer. *Cell Mol Neurobiol* 30: 1321–1326.
- Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, Lush MJ, Povey S, Talbot CC, Wright MW, Wain HM, Trowsdale J, Ziegler A, Beck S. 2004. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet* 5: 889–899.
- Hu C, Ahmed M, Melia TJ, Söllner TH, Mayer T, Rothman JE. 2003. Fusion of cells by flipped SNAREs. *Science* 300: 1745–1749.
- Jewell JL, Oh E, Thurmond DC. 2010. Exocytosis mechanisms underlying insulin release and glucose uptake: conserved roles for Munc18c and syntaxin 4. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 298: R517–R531.
- Kaufman RJ. 2011. Beta-Cell Failure, Stress, and Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 365: 1931–1933.
- Lang J. 1999. Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur J Biochem FEBS* 259: 3–17.
- Malsam J, Söllner TH. 2011. Organization of SNAREs within the Golgi Stack. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, doi 10.1101/cshperspect.a005249.
- Mealey BL. 2006. Periodontal disease and diabetes. A two-way street. *J Am Dent Assoc* 139: 26S–31S.
- Nagamatsu S, Nakamichi Y, Yamamura C, Matsushima S, Watanabe T, Ozawa S, Furukawa H, Ishida H. 1999. Decreased expression of t-SNARE, syntaxin 1, and SNAP-25 in pancreatic beta-cells is involved in impaired insulin secretion from diabetic GK rat islets: restoration of decreased t-SNARE proteins improves impaired insulin secretion. *Diabetes* 48: 2367–2373.
- Nathan DM. 2015. Diabetes: Advances in Diagnosis and Treatment. *JAMA* 314: 1052–1062.
- Oyler GA, Higgins GA, Hart RA, Battenberg E, Billingsley M, Bloom FE, Wilson MC. 1989. The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J Cell Biol* 109: 3039–3052.
- Pobbati AV, Stein A, Fasshauer D. 2006. N- to C-Terminal SNARE Complex Assembly Promotes Rapid Membrane Fusion. *Science* 313: 673–676.
- Reece JB, Meyers N, Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky PV, Jackson RB, Cooke B, Campbell NA. 2014. *Campbell biology*. 9.ed. Pearson, San Francisco.
- Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, Griffin NW, Lombard V,

- Henrissat B, Bain JR, Muehlbauer MJ, Ilkayeva O, Semenkovich CF, Funai K, Hayashi DK, Lyle BJ, Martini MC, Ursell LK, Clemente JC, Van Treuren W, Walters WA, Knight R, Newgard CB, Heath AC, Gordon JI. 2013. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* 341: 1241214.
- Smyth S, Heron A. 2006. Diabetes and obesity: the twin epidemics. *Nat Med* 12: 75–80.
- Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT. 1998. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395: 347–353.
- Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE. 1993. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362: 318–324.
- Takahashi N, Sawada W, Noguchi J, Watanabe S, Ucar H, Hayashi-Takagi A, Yagishita S, Ohno M, Tokumaru H, Kasai H. 2015. Two-photon fluorescence lifetime imaging of primed SNARE complexes in presynaptic terminals and  $\beta$  cells. *Nat Commun* 6: 8531.
- Wang S, Tulina N, Carlin DL, Rulifson EJ. 2007. The origin of islet-like cells in *Drosophila* identifies parallels to the vertebrate endocrine axis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 19873–19878.
- Weber T, Zemelman BV, McNew JA, Westermann B, Gmachl M, Parlati F, Söllner TH, Rothman JE. 1998. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92: 759–772.
- Weninger K, Bowen ME, Choi UB, Chu S, Brunger AT. 2008. Accessory proteins stabilize the acceptor complex for synaptobrevin, the 1:1 syntaxin/SNAP-25 complex. *Struct Lond Engl* 1993 16: 308–320.
- Wheeler MB, Sheu L, Ghai M, Bouquillon A, Grondin G, Weller U, Beaudoin AR, Bennett MK, Trimble WS, Gaisano HY. 1996. Characterization of SNARE protein expression in beta cell lines and pancreatic islets. *Endocrinology* 137: 1340–1348.
- Yang Y, Kim J, Kim HY, Ryoo N, Lee S, Kim Y, Rhim H, Shin Y-K. 2015. Amyloid- $\beta$  Oligomers May Impair SNARE-Mediated Exocytosis by Direct Binding to Syntaxin 1a. *Cell Rep* 12: 1244–1251.
- Zhu D, Xie L, Karimian N, Liang T, Kang Y, Huang Y-C, Gaisano HY. 2015. Munc18c mediates exocytosis of pre-docked and newcomer insulin granules underlying biphasic glucose stimulated insulin secretion in human pancreatic beta-cells. *Mol Metab* 4: 418–426.

# **SNARE-proteiner och deras roll vid exocytos av insulin, samt koppling till diabetes typ 2: etisk bilaga**

**Jackie Bruhn**

Självständigt arbete i biologi 2015

## **Etik inom biologistudier**

Inom biologistudier finns oftast många etiska och moraliska ståndpunkter att fatta innan ett försök ens kan påbörjas. Frågor som, *kommer denna studie att leda till något relevant? Kommer vi behöva använda försöksdjur?* är sådant som måste diskuteras, övervägas och ibland redovisas innan man ens kan påbörja en studie över huvud taget.

### **Vilka etiska aspekter finns i min uppsats?**

Den största och kanske viktigaste aspekten i min uppsats berör användandet av försöksdjur. Försöksdjuren har i det här fallet använts för att testa proteinuttryck. Detta görs genom att man slår ut ett protein och ser vad som händer med djuren. I detta test handlar det om utvecklandet av diabetiska symptom. Detta är ett ämne som oftast hamnar i het debatt med åsikter från både höger och vänster. Något annat som jag bör ta i aktning är de implikationer som forskningen kan få på omvärlden vad gäller botemedel mot sjukdomar samt negativa aspekter som t.ex. individers känslor och tankar kring detta. Man måste också beakta hur resultatet kan komma att användas i framtiden. Kan det hamna ”i fel händer” och användas negativt? Hur stor är risken att detta sker?

### **Försöksdjur**

Personligen menar jag att försöksdjur kan användas i denna typ av studier då regulationerna kring försöksdjur ändå är såpass hårda som de är. Vem som helst kan inte utföra en studie med försöksdjur utan att redovisa detta och följa de restriktioner och bestämmelser som finns. Med detta i beaktning så ser jag inte användandet av råttor eller möss som ett problem i just denna situation. Å ena sidan finns det ett starkt motstånd mot försöksdjur av det etiska skälet att man inte bör utnyttja en individ som är lägre stående än sig själv, men å andra sidan så måste man ta i beaktning att denna forskning är otroligt viktig för utveckling av både mediciner och friskförklaringar hos individer med en annars livslång sjukdom.

### **Implikationer på individen**

De implikationer vi kan tänkas hitta hos individer ser jag som nästan enbart positiv. Forskningen berör botemedel mot en annars livslång sjukdom och detta är något som jag har svårt att se som något negativt. Det man skulle kunna argumentera är att sådan här typ av forskning kan få en individ att känna sig mer utsatt i samhället, som att man är något som folk vill göra sig av med, men då måste man tänka på frågan: *vem vill inte bli frisk?*

### **Forskningsetik**

Vid mina studier i detta ämne har jag till största del försökt använda mig av nyare referenser då dessa i större utsträckning representerar hur situationen ser ut idag. I texten har källorna refererats till löpande för att sedan sammanställas i källförteckningen. Jag känner mig säker i mitt användande av dessa källor och korrektheten i deras referat. Diskussionen i uppsatsen skedde utan mål eller mening och bör därmed anses vara nyanserad och öppen för olika tolkningar av forskningen som beaktats.