



LA INSULINA INDUCE LA EXPRESIÓN DEL PÉPTIDO INSULINOTRÓPICO DEPENDIENTE DE GLUCOSA (GIP) EN CÉLULAS ENTEROENDOCRINAS USANDO LOS EFECTORES DE LA VÍA WNT.



García-Martínez, JM, Chocarro-Calvo, A. & García-Jiménez, C.

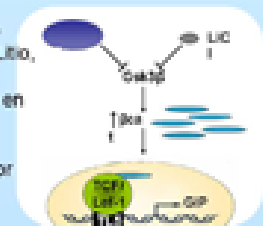
Fac. Ciencias de la Salud, Univ. Rey Juan Carlos, Alcorcón (Madrid), Spain.

INTRODUCCIÓN

Hasta el 80% de la secreción pancreática de insulina en respuesta a glucosa se debe a la acción de las incretinas gastrointestinales (1), la más abundante es el péptido insulínico dependiente de glucosa: GIP. GIP es una hormona pro-obesidad, condición previa al desarrollo de diabetes tipo 2 (T2D) (2). Esto, junto con el hecho de que los pacientes con T2D y familiares de primer grado presentan hiperGIPemia (3) sugieren que GIP podría ser una diana molecular clave en estrategias preventivas contra la diabetes. El control de la producción entero endocrina de GIP casi no se conoce (4-6).

ANTECEDENTES

Nuestro grupo ha demostrado que tanto la vía Wnt como el Lipo, conocido insulinomimético, inducen la producción de GIP en células entero endocrinas a través de un sitio conservado TCF/Lef-1 (TL5) en el promotor proximal de GIP (7)



OBJETIVO

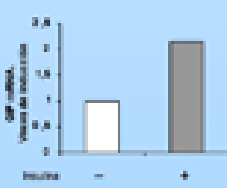
Determinar la influencia de la insulina en la producción entero endocrina de GIP.

Se usaron células entero endocrinas STC-1, único modelo in vitro capaz de secretar GIP. La actividad del promotor de GIP de ratón se estudia mediante cotransfecciones de células STC-1 tratadas con insulina o LICI.

DISEÑO EXPERIMENTAL

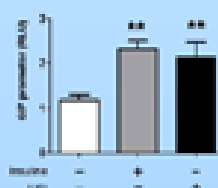
RESULTADOS

1. La insulina induce la expresión de GIP endógeno.



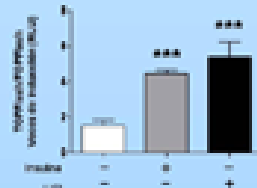
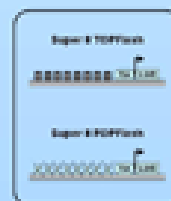
1. RT-qPCR. STC-1 se trató con insulina (100nM) durante 24h. Se obtuvieron extractos purificados para obtener cDNAs que se amplificaron mediante qPCR usando primers para GIP. Los valores normalizados con β-actina. Los resultados están referidos respecto al control de células no tratadas.

2. La insulina estimula la actividad del promotor de GIP de ratón.



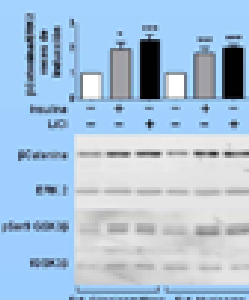
2. La insulina induce 2,2-2,8 veces la actividad del promotor de GIP de ratón (pGIP) en células STC-1 cuando se induce con insulina (100nM). La actividad del promotor se mide como Unidades Relativas LUC (RLU), expresadas como veces de insulina, en células referidas a un control (promotor + βGAL).

3. La insulina induce la actividad del promotor utilizando los efectores de la vía Wnt.



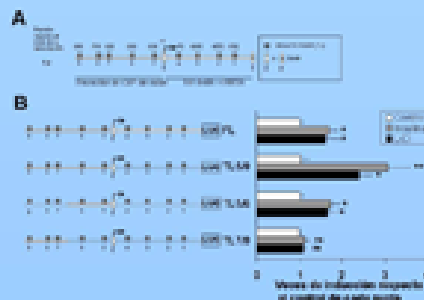
3. Se transfirieron células STC-1 con un vector vacío de la activación de la vía Wnt, TOPFlash o una versión mutada de éste que sirve como control de la especificidad de la señal. TOPFlash lleva el report del sitio consenso de unión de TCF/Lef-1 al promotor de la célula y actividad de Luciferasa. La activación de estos sitios en TOPFlash se inspecciona para una TOPFlash-reporter. El tratamiento con insulina induce la actividad TOPFlash, como el vector vacío que el día, completamente utilizado como indicador de la vía Wnt. La actividad del promotor se mide como Unidades Relativas LUC (RLU), expresadas como veces de insulina, está referida a los correspondientes controles (promotor + βGAL).

4. La insulina aumenta los niveles de βcatenina nuclear en células entero endocrinas.



4. Western (blot) y cuantificación del aumento de los niveles de βcatenina en células STC-1 tratadas con o sin insulina (100nM). Se muestra también la inducción de GIP (30 pg/ml) durante de 24h (GIP30) nuclear, responsable del aumento de βcatenina. Los valores de insulina están referidos a los controles (promotor + βGAL).

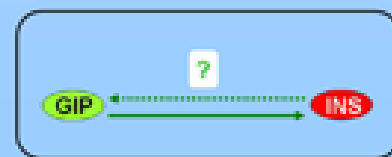
5. Datos preliminares indican que la insulina utiliza el sitio funcional TL5 para inducir la actividad del promotor de GIP de ratón.



5. A) Esquema de los nueve sitios funcionales de unión para TCF/Lef-1 (cuadrado gris) en el promotor de GIP de ratón y en la región 5' no codificante (5'). B) La transfección de células STC-1 con diferentes constructos de promotor de GIP de ratón sugiere que el tratamiento con insulina (100nM) induce la actividad del Promotor de GIP utilizando los mismos sitios activados por LICI a nivel del TL5 y otros sitios adyacentes.

CONCLUSIONES y FUTURO

Proponemos la existencia de un bucle de retroalimentación positiva. GIP aumenta la secreción pancreática de insulina y nuestros resultados demuestran que la Insulina puede estimular la producción de GIP al menos bajo determinadas condiciones. En nuestro laboratorio estamos trabajando para determinar las condiciones en que este bucle de retroalimentación positiva se hace posible



REFERENCIAS

1. Gault VA, Itoh H, Hasegawa H, Patel PH, Charka PP. GIP is resistance and insulin releasing activity of a novel rat substituted analog of glucose dependent insulinotropic polypeptide. (GIP) Appl 13GIP. Cell Metab 14 (2) 144-154, 2002. 2. Ahgag MC, Ford RL, Wang S, Yu P, Pennington TH, Wain BM. Targeted inhibition of glucose-dependent insulinotropic polypeptide-producing cells in transgenic mice results in obesity and insulin resistance induced by a high fat diet. J Biol Chem 283 (12) 8071-8076, 2008. 3. Havelin SM, Hansen M, Møller AJ. Glucose inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide 1 in the pathogenesis of type 2 diabetes. Diabetes Care 33 (1) 18-24, 2010. 4. Japaz L, Fujitani T, Boyer MC, Wilson CM, Wang CY, Kelle SM. Cell-specific expression of glucose-dependent insulinotropic polypeptide in cells of pancreatic endocrine lineage. Mol Cell Endocrinol 187 (2) 21-28, 2003. 5. Fujita T, Choi JW, Song CS, Zhang T, Saitoh T, Yamada T, Cheung AT, Kiefer T, Patel and Patel are required for production of glucose-dependent insulinotropic polypeptide in progenitor and opening. J. Cell. An J Physiol Cell Physiol 295 (2) 404-411, 2008. 6. García-Martínez JM, Chocarro-Calvo A, Moya CM, García-Jiménez C. GIP30 nuclear increases the production of insulin by entero endocrine cells. Diabetologia. Sep 2010; 53(9):1911-20, 2010.