

Aproximación preclínica para revertir la resistencia a insulina mediante una nueva molécula no peptídica, modulando el complejo de andamiaje entre la actina y la quinasa ligada a integrinas (ILK) sin alterar su actividad catalítica.

P-101

M. GRIERA MERINO ^{1,2,3}, J. GARCÍA MARÍN ^{2,4}, J.L. ACEÑA ^{2,4}, M. DURÁN MARTÍN ^{2,4}, P. MARTÍNEZ MIGUEL ⁴, A. SILVESTRE VARGAS ^{1,2}, S. GARCÍA VILLORIA ^{1,2}, L. CALLEROS BASILIO ^{1,2}, D. RODRÍGUEZ PUYOL ^{2,5,6}, S. DE FRUTOS GARCÍA ^{1,2 *}

1 Departamento de Biología de Sistemas, Universidad de Alcalá; Fundación Renal Iñigo Álvarez de Toledo (FRIAT), Madrid
2 Instituto Ramon y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), RICORS2040-RENAL de Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), INNOREN-CM, Madrid
3 Graphenano Medical Care S.L., Alcalá de Henares
4 Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica, Universidad de Alcalá, Instituto de Investigación Química Andrés M. del Río (IQAR), Madrid
5 Unidad de Nefrología, Hospital Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares
6 Departamento de Medicina y especialidades médicas, Universidad de Alcalá, Fundación para la investigación biomédica Hospital Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Fundación Renal Iñigo Álvarez de Toledo (FRIAT), Madrid
*Corresponding autor: 34918854519, e-Mail: sergio.frutos@uah.es



FINANCIACIÓN: Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Comunidad de Madrid (CAM), Universidad de Alcalá and FEDER funds (PI20/00634, PI20/00664, PI22/01714, PI23/01071, P2022/BMD7221, B2017/BMD3751, 2025/00041/001); Contrato predoctoral ISCIII a S.G.-V. (FI24/00014); RETIC REDinREN y RICORS 2040 (RD21/0005/0023; RD24/0004/0020); INNOREN-CM (S2022/BMD-7221); UAH (PIUAH23/CCS-010; PIUAH23/CC-022; Art.60 LOSU 2022/024).

INTRODUCCION: Los trastornos metabólicos relacionados con la resistencia a la insulina (IR), como la diabetes tipo 2 y la obesidad, están relacionados con el riesgo renal y asociados a un depósito excesivo de matriz extracelular (ECM) en los tejidos metabólicamente activos. Entre el receptor de ECM, INTEGRINA-B1, y el citoesqueleto de actina, media un complejo intracelular asociado de andamiaje, IPP, formado por ILK, parvina y PINCH [PMID: 20033063]. Hemos demostrado que ILK regula la expresión y tráfico intracelular del transportador de glucosa GLUT4 en cultivos celulares de musculo esquelético y en animales en un contexto de resistencia a la insulina [PMID: 31972071; 28490443]. ILK pertenece al 10% de quinasas sin actividad catalítica, o “pseudoquinasas”, pero actúa en el complejo de andamiaje que comunica la dinámica entre el medio extracelular y el citoesqueleto de actina [PMID: 30367047]. Hemos patentado [WO/2022/023612, ES2891987] y publicado [PMID: 34790291; 35869378] nuevas moléculas peptídicas que interactúen con este complejo, de utilidad en patologías donde demostramos la importancia de regular ILK [PMID: 37306667 ; 35090553, 35246616; 25398526]. Presentamos la molécula no peptídica JGM416 que activa la interacción ILK/actina sin mediar en la fosforilación directa de otros sustratos, para mejorar la captación de glucosa mediada por GLUT4 en mioblastos y miotubos.

MÉTODOS: JGM416 mostro in sillico e in vitro su unión a la región pseudoquinasa de ILK. Se estudio su toxicidad y funcionalidad en cultivos de mioblastos C2C12 sin diferenciar o diferenciados a miotubos [PMID: 28490443]. La internalización de JGM416 unido covalentemente a fluoresceína, los estudios de inmunofluorescencia y de co-localizacion citosólica de ILK, actina polimerizada (F-actina) y presencia en membrana del transportador de glucosa GLUT4 [PMID:36703726] se realizaron por análisis de microscopia confocal utilizando anticuerpos primarios específicos para ILK, GLUT4 y faloidina y DAPI para tinción de núcleos. La fosforilación del sustrato de ILK GSK3beta de muestras obtenidas de cultivos se realizó por inmunoblot usando anticuerpos especificost. La actividad quinasa de ILK in vitro se realizó con ILK inmunoprecipitada y GSK recombinante ante la presencia o ausencia de ATP. La captación de glucosa por los miotubos se realizó mediante la detección de capatación de sonda fluorescente 2-NBDG [PMID: 28490443]. En algunos casos, utilizamos miotubos carentes de ILK, mediante la transfección de RNAs de interferencia específicos (siRNA-ILK) o inespecíficos en los controles por 16 h previo a los tratamientos. Análisis estadístico ANOVA, Los datos de los histogramas representan la media +/- SEM., donde * = p>0,05 vs control (CT), #=p>0,05 vs JGM416.

RESULTADOS: JGM416 no es toxico y se internaliza al citosol para interactuar con ILK, incrementando la polimerización de actina y aumenta la captación de glucosa y la presencia en membrana de GLUT4, al mismo nivel de eficiencia que el tratamiento con insulina. Las células sin ILK (siRNA-ILK) revirtieron los efectos observados. JGM416 no modifica la actividad “pseudokinasa” de ILK sobre la fosforilación del sustrato GSK3beta en cultivo o in vitro.

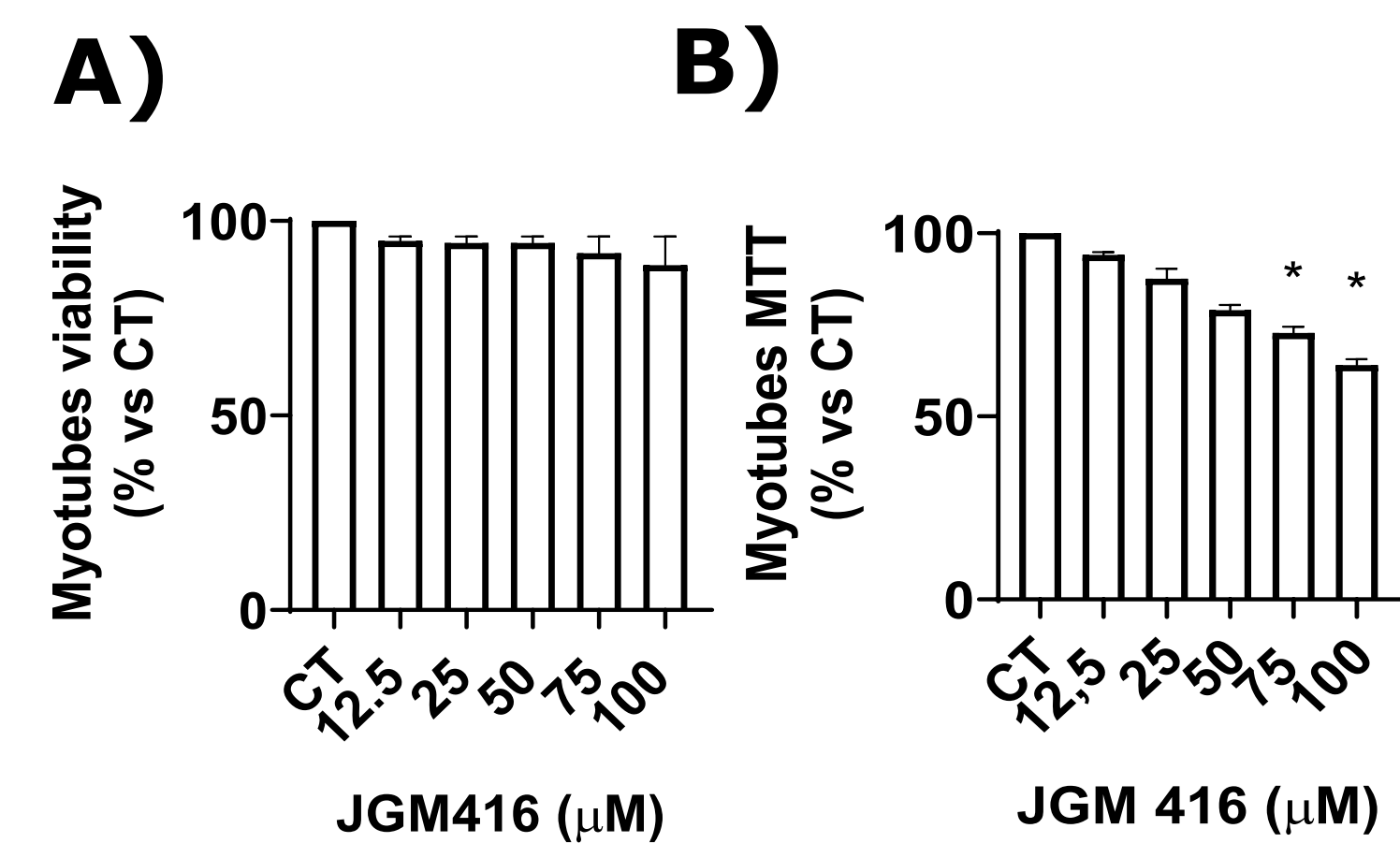


Figura 1. BIOCMPATIBILIDAD DE JGM416: pruebas de A) viabilidad por exclusion celular de tripan blue y B) toxicidad (fluorescencia de sonda MTT) sobre miotubos tras 24 h de tratamiento a las concentraciones indicadas.

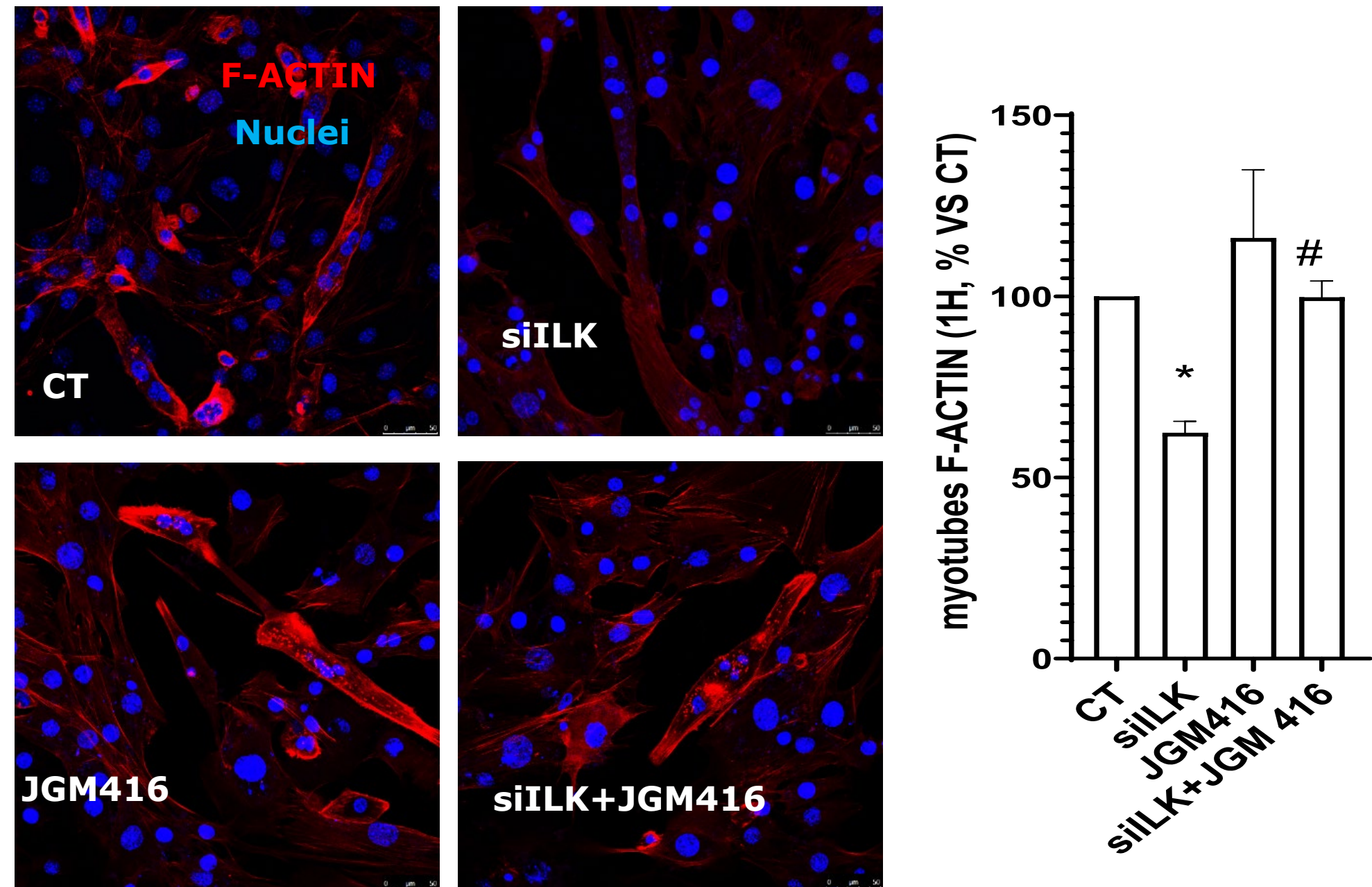


Figura 4. POLIMERIZACIÓN DE ACTINA POR JGM416 DEPENDE DE ILK: Imágenes de confocal representativas muestran actina polimerizada (F-ACTIN, rojo) y núcleos (azul) en miotubos transfectados con siRNAs específicoS contra ILK (siILK) o inespecíficos (CT) y tratados con 50 μM JGM416 durante 1h. Histograma representa intensidad de rojo normalizado contra numero de núcleos. Barra 100 μm.

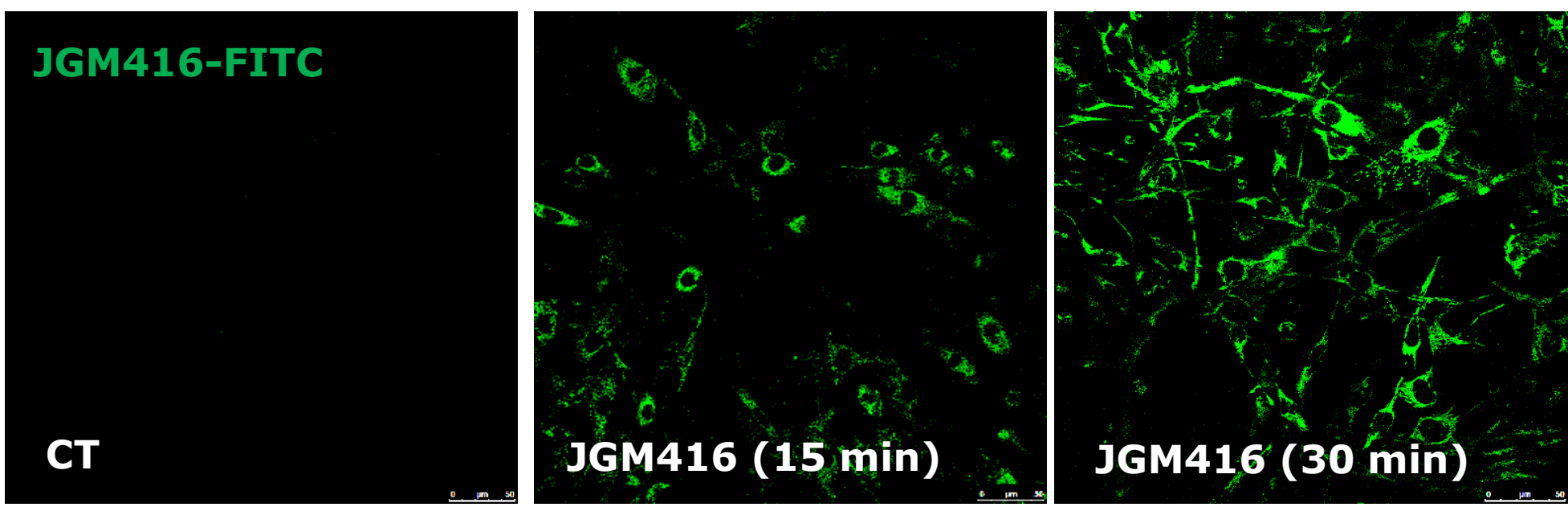


Figura 2. CAPTACIÓN DE JGM416: imágenes de confocal representativas muestran presencia citosólica en mioblastos tratados con 50 μM JGM416 unido covalentemente a FITC (verde) o vehículo (CT) a los tiempos indicados. Barra 100 μm.

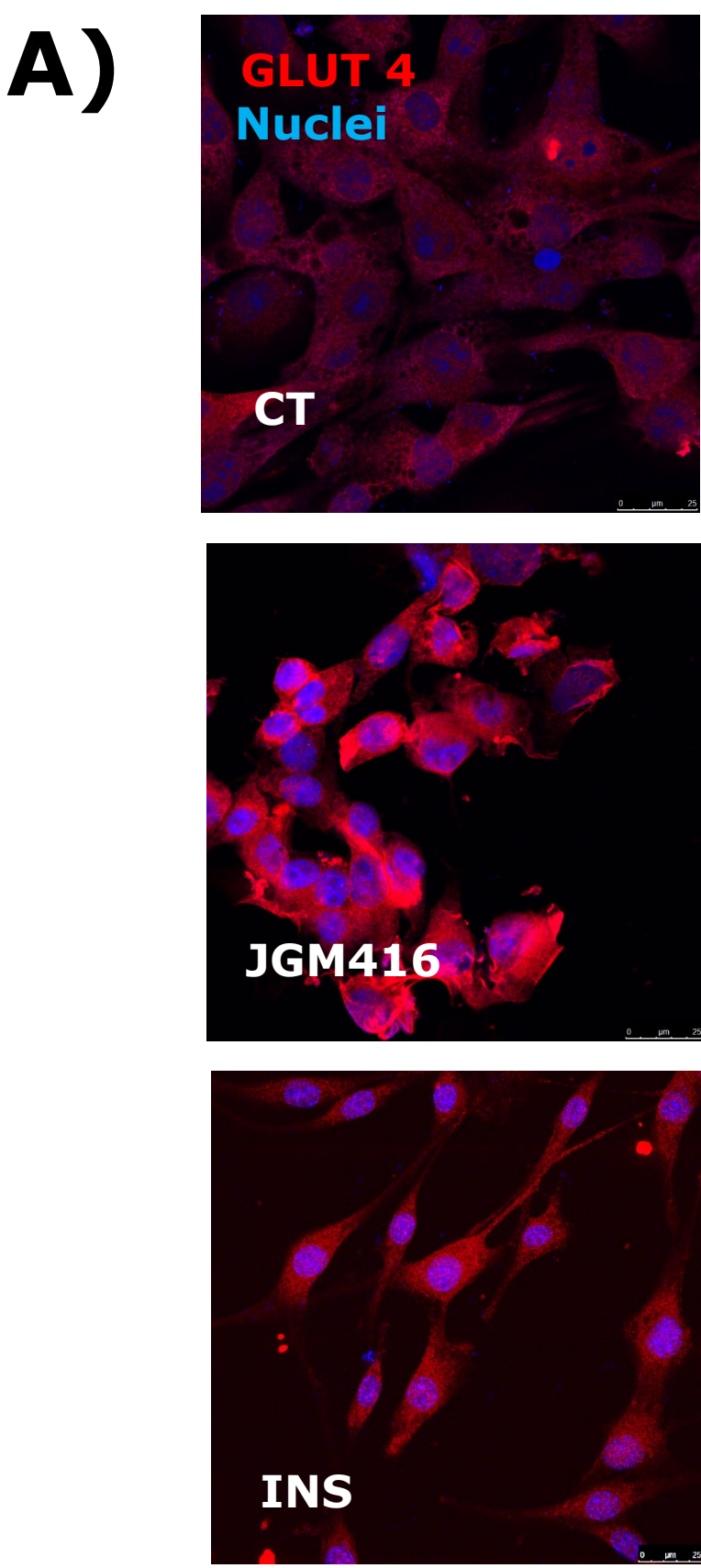


Figura 5. JGM416 AUMENTA LA PRESENCIA DE GLUT4 EN MEMBRANA Y LA CAPTACIÓN DE GLUCOSA: A) imagenes de confocal representativas mostrando la traslocación de GLUT4 (rojo) a membrana de mioblastos tratados con 50 microM JGM416, vehículo (CT) o 100 nM insulina (INS, control positivo) por 1 h. Barra 100 μm. B) Captación intracelular de glucosa (fluorescencia de 2-NBDG) en miotubos.

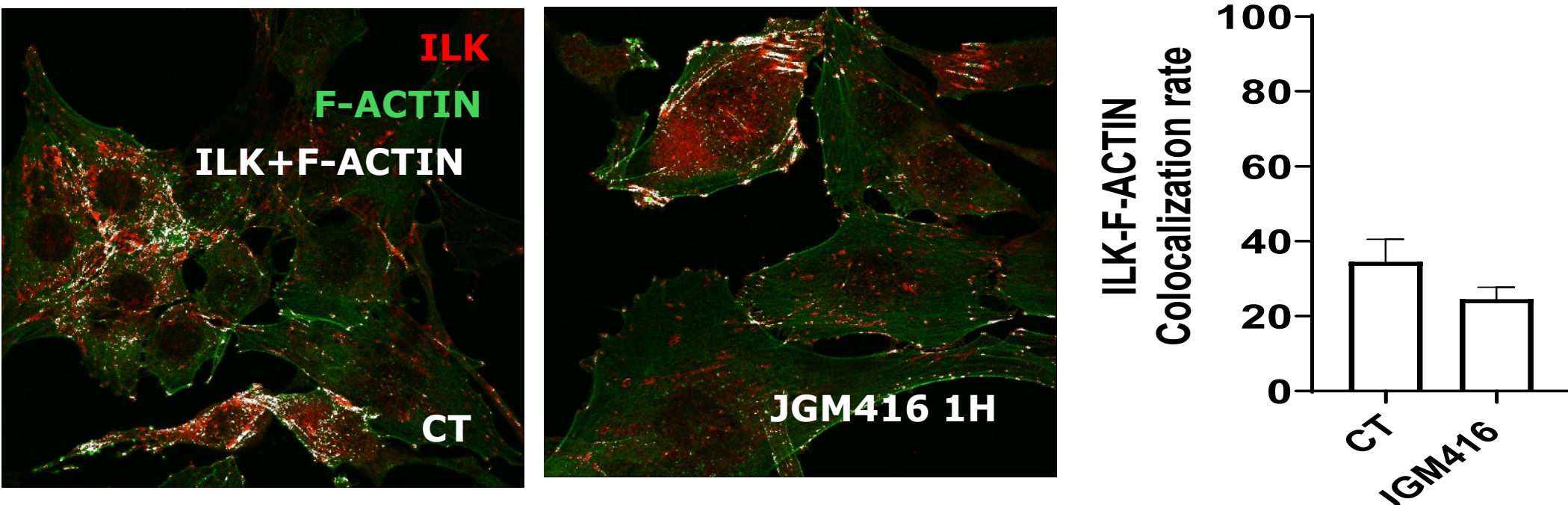
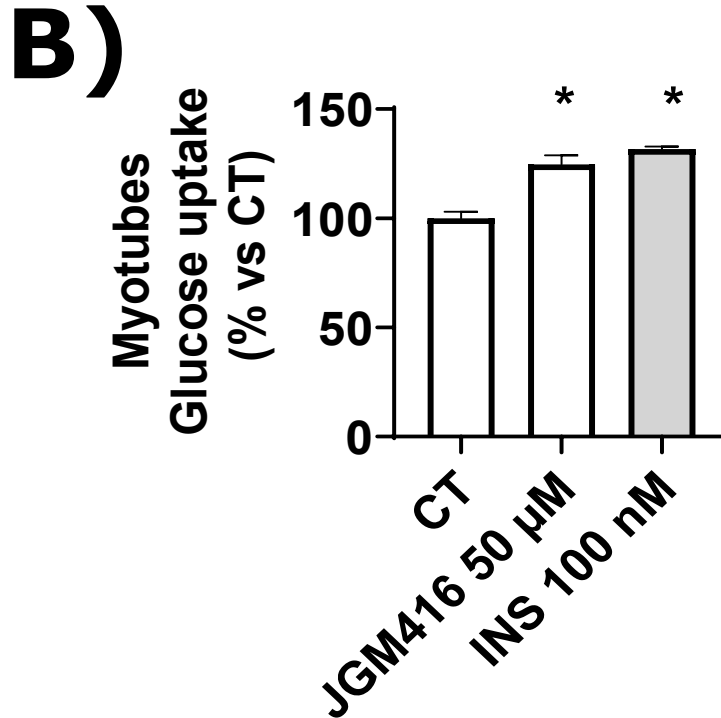


Figura 3. INTERACCIÓN ENTRE ILK Y ACTINA: imágenes de confocal representativas muestran la co-localización citosólica (blanco) de ILK (rojo) con actina polimerizada (faloidina, verde), en mioblastos tratados con 50 μM JGM416 durante 1 h. El histograma representa el % de colocalización (blanco). Barra 100 μm.

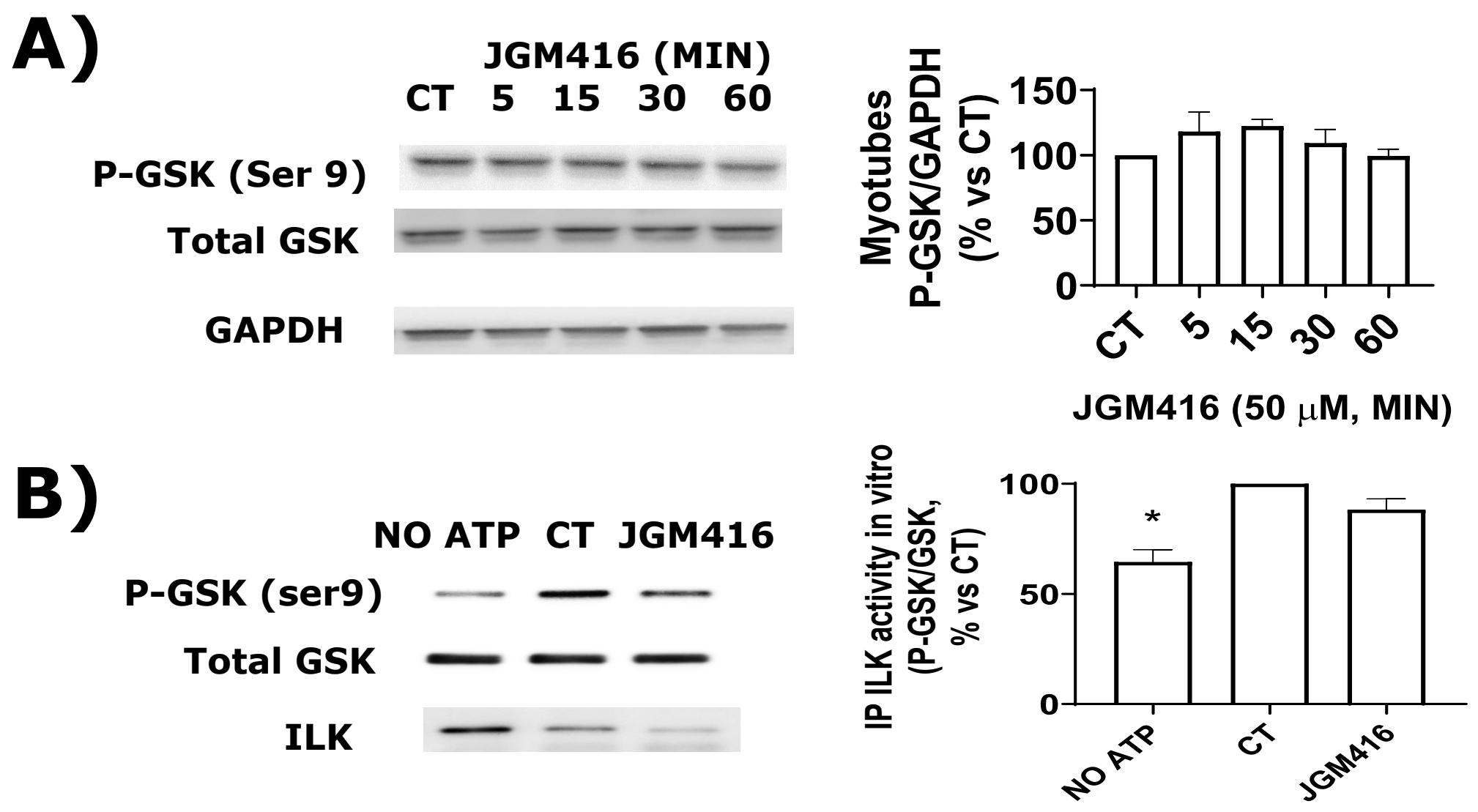
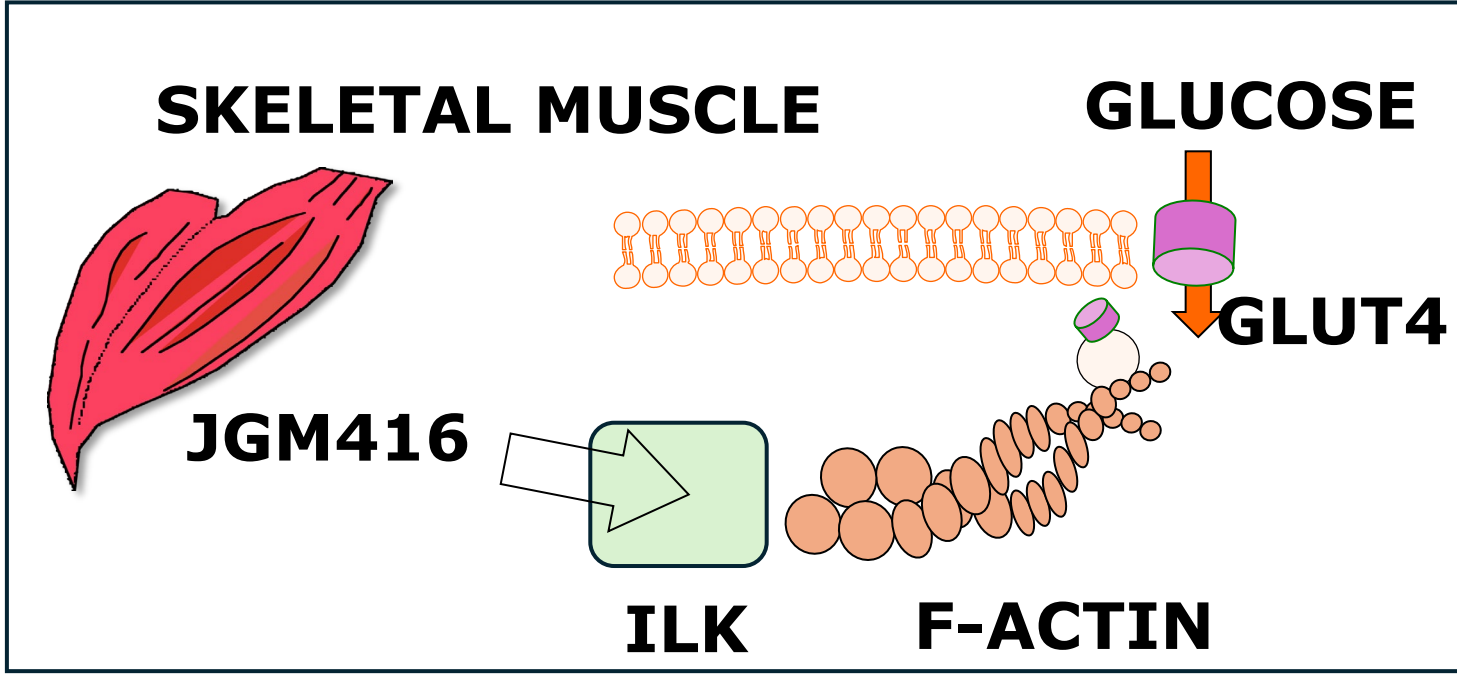


Figura 6. JGM416 NO MODULA LA ACTIVIDAD KINASA DE ILK: Inmunoblots representativos y análisis de las densitometrías de niveles de isoforma GSK3betafosforilada en ser9 (P-GSK), total (GSK) y GAPDH como control endogeno de A) extractos proteicos de miotubos tratados con 50 μm JGM416 durante los tiempos indicados (min) o vehículo (CT). B) ensayo kinasa in vitro con ILK inmunoprecipitada (IP), GSK recombinante, ATP o sin ATP como control negativo (NO ATP), JGM416 o vehículo (CT)



CONCLUSION: JGM416 modula la interacción ILK/actina y mejora la capacidad captadora de glucosa de mioblastos y miotubos al mismo nivel que la insulina, siendo una novedosa estrategia farmacológica para tratar patologías asociadas a la resistencia insulina, como la diabetes tipo 2, síndrome metabólico o nefropatía diabética.

