

Dual functions of DOR protein: role in autophagy and in transcription

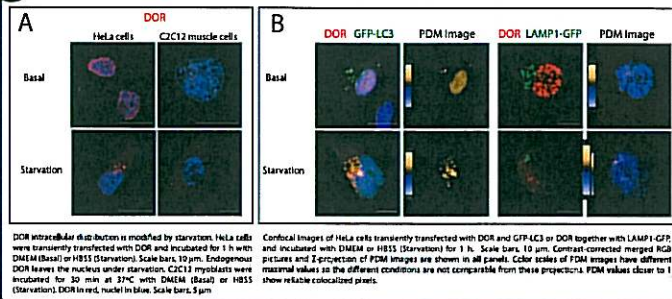
Caroline Mauvezin¹, Ana Sancho¹, Antonio García-España¹, Jordi Duran¹, María Jesús Macías¹, R. Desaille¹, Miriam Royo¹, Antonio Zorzano¹

¹Instituto for Research in Biomedicine (IRB) Barcelona, C/ Baldori Reixac 10, 08028 Barcelona, Spain; ²Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain; ³CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III, 4th Unit de Recerca, Hospital Joan XXIII, Institut de Investigació Sanitària Rovira i Virgili (IISPV), Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain; ⁴Sackler Institute for Comparative Genomics, American Museum of Natural History, New York, NY 10024; ⁵Combinatorial Chemistry Unit, Barcelona Science Park, Baldià Reixac 10, 08028 Barcelona, Spain

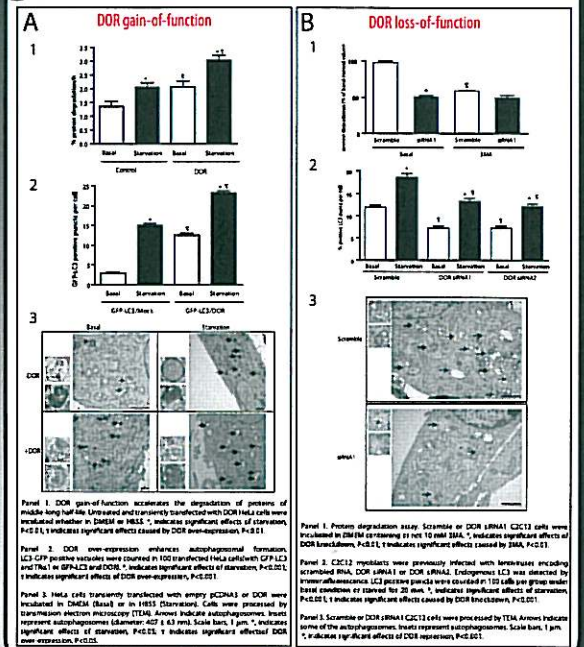
Abstract

DOR is a recently reported nuclear cofactor of thyroid hormone receptors, abundantly expressed in metabolically active tissues such as muscle. Here we show that DOR shuttles between nucleus and cytoplasm depending on cellular stress conditions, and re-localizes to early autophagosomes upon autophagy activation. Gain-of-function and loss-of-function studies indicate that DOR stimulates autophagosome formation and accelerates the degradation of stable proteins. Phylogenetic analysis revealed a highly conserved region in DOR protein sequence. Studies of this specific region indicate that it is important for both DOR functions: transcriptional activity and autophagy regulation.

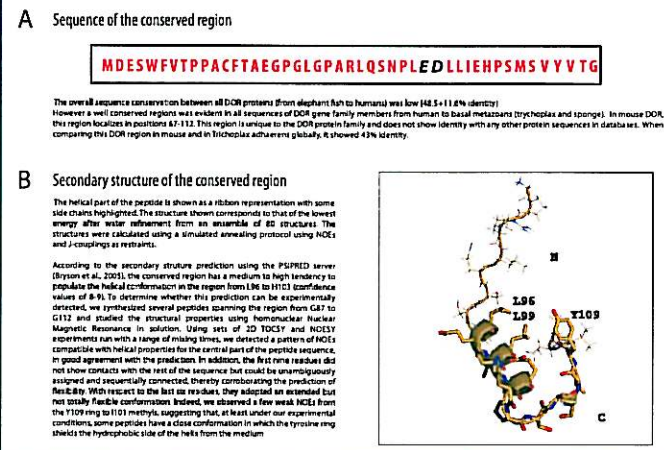
1 DOR exits the nucleus under starvation and colocalizes with early autophagosomes



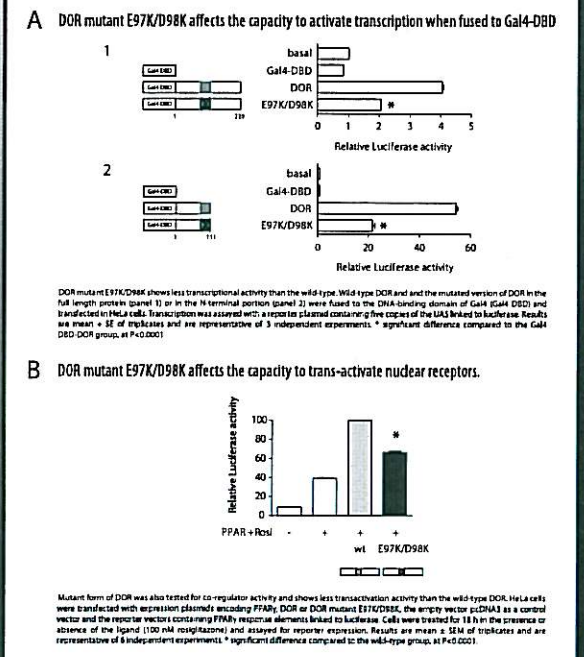
2 DOR stimulates autophagosomes formation and protein degradation



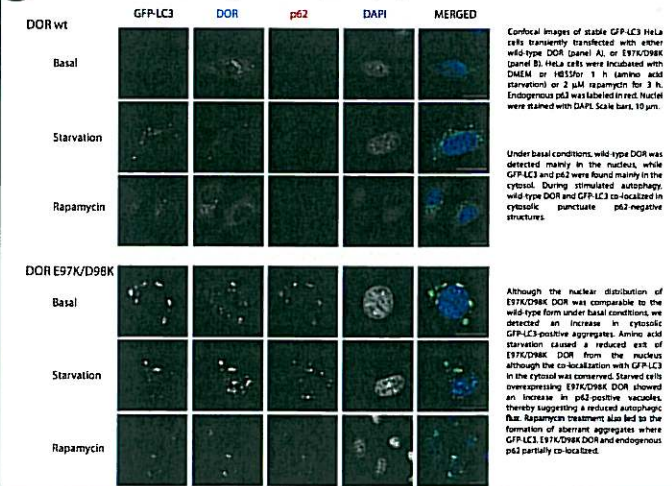
3 Phylogenetic studies revealed a well conserved region in all DOR gene family members



4 Role of this DOR specific region in transcriptional activity



5 Mutations in this conserved region of DOR impair autophagosome formation



Conclusions

1. DOR moves out of the nucleus under autophagy activation.
2. DOR physically interacts and colocalizes with autophagic proteins such as LC3 and GATE-16.
3. DOR does not colocalize with lysosomal markers as LAMP1, thus DOR takes part of only early autophagosomes.
4. DOR gain-of-function enhances the abundance of autophagosomes and accelerates long-lived proteins degradation in HeLa cells.
5. DOR loss-of-function reduces autophagosomes formation and protein degradation in muscle cells.
6. Phylogenetic analysis reveal a highly conserved region between aminoacids 67 to 112 with helical properties for the central part of the fragment
7. Mutations in this region affect the transcriptional activity of the protein and impair autophagosome formation.



Entregable 2.1-1:
Informe de vigilancia continuada

Fecha entrega: 11.04.2011

Autores: Prof. Antonio Zorzano (IRB Barcelona)

Autor responsable: Antonio Zorzano (IRB Barcelona)

Colaboraciones: IRB Barcelona – Parc Científic de Barcelona

Proyecto co-financiado por el Programa de Cooperación Territorial SUDOE (2007-2013). El contenido de este informe está bajo la responsabilidad única de sus autores y no representa necesariamente la opinión de la entidad financiadora.



INFORMACIÓN DEL DECOMENTO

Contrato DIOMED: DIOMED – SOE1/P1/E178

Fecha de inicio del proyecto: 1.04.2009

Duración del proyecto: 36 meses

Sitio web del proyecto: <http://diomed-sudoe.eu/front>

Entregable	Número	2.1-1	Título	Informe de vigilancia continuada
GT	Número	2	Título	Vigilancia continuada de necesidades y de oportunidades y criterios de desarrollo
Acción	Número	2.1	Título	Vigilancia continuada



Durante los dos últimos años han tenido lugar una serie de cambios en el ámbito de la farmacología de enfermedades metabólicas como es la diabetes y la obesidad, a los que quiero referirme en este documento. Los campos específicos a los que haré referencia son los siguientes:

- a. Fármacos que han sido suspendidos por las agencias reguladoras o que incluso han sido retirados del mercado.
- b. Nuevos fármacos aprobados por los organismos reguladores,
- c. Fármacos que están cercanos a su aprobación por las agencias reguladoras
- d. Empresas biotecnológicas situadas en Francia, Portugal o España con interés en el desarrollo de fármacos en obesidad/diabetes.

a. Fármacos que han sido suspendidos por las agencias reguladoras o que incluso han sido retirados del mercado.

En Septiembre del año 2010 tuvo lugar la retirada del fármaco antidiabético *Avandia* (principio activo, rosiglitazona) del mercado Europeo, por la existencia de eventos cardiovasculares asociados a su administración. Asimismo, la FDA está insistiendo el retiro del mercado de *Avandia* por el riesgo hacia la salud asociado con la droga, y en Septiembre de 2010 restringió el uso de *Avandia* a pacientes de diabetes de tipo 2 que no pueden controlarse con otros medicamentos.

Esto ha supuesto un duro golpe en el desarrollo de fármacos antidiabéticos y esto por una razón. A partir de este momento, todos los compuestos antidiabéticos que quieran desarrollarse deberán demostrar la ausencia de eventos cardiovasculares, y estos estudios deben realizarse en miles de pacientes, y suponen una inversión adicional muy considerable. Como consecuencia de lo dicho, las empresas de “venture capital” internacionales ven a la diabetes como una actividad de negocio que se asocia con elevado riesgo de fracaso.



Durante los últimos meses ha tenido lugar una resolución relevante por parte de la FDA y que debe interpretarse a la luz de lo comentado anteriormente. En febrero del 2012, la FDA resolvió rechazar la solicitud de la empresa Orexigen de su fármaco "Contrave" (principios activos bupropion y naltrexona) por sus posibles problemas de seguridad cardiovascular tras su administración crónica. En ese sentido, la FDA pidió a Orexigen que lleve a cabo un estudio doble ciego y al azar controlado con placebo de suficiente tamaño y duración con el objeto de demostrar que el riesgo de eventos cardiovasculares adversos tras la administración de "Contrave" no afecta de manera adversa el perfil beneficio-riesgo del fármaco.

El rechazo de este fármaco anti-obesidad se une al rechazo de 2 fármacos anti-obesidad llevado a cabo por la FDA en el último año: "lorcaserin" (por una posible relación con cancer", y "Qnexa" debido a problemas cardiovasculares.

b. Nuevos fármacos aprobados por los organismos reguladores.

De manera positiva, los principales fármacos anti-diabéticos aprobados durante los últimos 2 años han sido los siguientes:

- En julio de 2009, la FDA aprobó la utilización de "saxagliptin" (Onglyza) (un inhibidor de DPP-4), y en Octubre de 2009 lo aprobó EMEA. Este fármaco ha sido desarrollado por Bristol-Myers Squibb y AstraZeneca. Debe comentarse en este sentido que otros inhibidores de DPP-4 ya habían sido aprobados con anterioridad;
- En Enero de 2010, la FDA aprobó el uso de "Liraglutide" (un análogo de GLP-1). Este fármaco ha sido desarrollado por Novo. Debe comentarse en este sentido que otros análogos de GLP-1 ya habían sido aprobados con anterioridad;
- En Noviembre de 2010, la FDA aprobó el uso de "Kombiglyze XR" (combinación de saxagliptin y de metformina) como una combinación



diaria de dosis fija de saxagliptina y de metformina de liberación lenta para el tratamiento de la diabetes de tipo 2.

c. Fármacos que están cercanos a su aprobación por las agencias reguladoras.

En este aspecto, es de destacar el desarrollo del compuesto “Dapagliflozin” (un inhibidor del co-transportador renal de sodio/glucosa SGLT2). Este compuesto se encuentra en fase III de desarrollo clínico y se espera tener información en los próximos meses acerca del progreso en su desarrollo. El fármaco está siendo desarrollado por Bristol-Myers Squibb y AstraZeneca. Su interés radica en el hecho de que sería el primer fármaco anti-diabético dirigido a la inhibición de SGLT2.

d. Empresas biotecnológicas situadas en Portugal, España o Francia con interés en el desarrollo de fármacos en obesidad/diabetes.

Hemos identificado las siguientes empresas biotecnológicas con interés en el desarrollo de fármacos en obesidad/diabetes:

Ubicadas en Portugal:

- o *Gene PreDiT*: Una empresa biotecnológica fundada en 2006 y enfocada al desarrollo de estrategias innovadoras, identificación de biomarcadores novedosos y aplicaciones novedosas de compuestos farmacéuticos para enfermedades con alta incidencia como la obesidad y la diabetes. André Faustino (andre.faustino@genepredit.com.pt) es la persona de contacto en la empresa citada anteriormente. Se ubica en Castanhede (Biocant).

Ubicadas en España:

- o *Genmedica Therapeutics*: Una empresa biotecnológica orientada a la búsqueda de fármacos novedosos en la diabetes de tipo 2. Alec Mian



es el CEO de la citada empresa, la cual se ubica en Barcelona (Parc Científic de Barcelona);

- *Allinky Biopharma*: Esta empresa se orienta al descubrimiento y desarrollo de fármacos de pequeño peso molecular para el tratamiento de condiciones inflamatorias crónicas, enfermedades degenerativas relacionadas con la edad y cáncer. Se localiza en el Parque Científico de Madrid. Miguel Vega es el CEO de la citada empresa;
- *Genzyme España*: Una empresa interesada en enfermedades metabólicas raras. Fernando Castillo es Delegado Comercial, División LSD; E-mail: fernando.castillo@genzyme.com.

Ubicadas en Francia:

- *GlaxoSmithKline Research Center - France*: La Unidad “Lipid Metabolism DPU” es un centro de descubrimiento de fármacos que busca nuevas terapias en las enfermedades metabólicas, lo que incluye la obesidad, diabetes de tipo 2 y dislipidemias. Localización: Centre de recherche, 25 avenue du Québec ZA de Courtaboeuf ;
- *Physiogenex (CRO)*: Empresa especializada en la provisión de servicios en relación con enfermedades metabólicas. Localizada en Toulouse;
- *Poxel*: Situada en Lyon, esta empresa desarrolla compuestos en el ámbito de las enfermedades metabólicas y en particular en diabetes de tipo 2.



Conclusiones provisionales.

El desarrollo de fármacos anti-diabéticos es necesario con el objeto de un tratamiento efectivo de pacientes con diabetes de tipo 2 que debutan cada vez a una edad más temprana. Asimismo, es importante obtener tratamientos orales de la diabetes de tipo 1 y soslayar la necesidad de inyecciones diarias de insulina. Por otro lado, sólo existe un fármaco que permite el tratamiento crónico de la obesidad (orlistat) y con una eficacia limitada. En consecuencia, es muy necesario el desarrollo de fármacos anti-obesidad.

A pesar de la necesidad imperiosa de desarrollar nuevos fármacos anti-obesidad o anti-diabetes, la situación es que el desarrollo de estos fármacos es más difícil hoy que hace tres años y ello debido a la aumentada exigencia por parte de las agencias reguladoras FDA y EMA. No es de preveer que esta exigencia se reduzca en los años venideros.