

Hitz egiten dizudanean, entzuidazu mesedez

Eneko Urizar Andrieu

Laburpena: G proteinen bidez funtzionatzen duten hartzaileak dimero edota oligomeroak izan daitezke. Dimerizazioa, gerta daiteke bi hartzaile berdinen artean homomeroak sortuz edo bi hartzaile desberdinen artean heteromeroak sortuz. Honelako elkarrekintza batek seinalizazio-plataforma hauen aukera funtzionalak areagotu eta dibertsifika ditzake, eta horrela kontrol farmakologikoa era esanguratsu batean zabaltzen da. Luza-rora ideia hau terapeutikan aplikatu liteke. Bi hartzaileen dimeroen adibide desberdin biren bitartez G proteinen bidez funtzionatzen duten hartzaileen komunikazio alosterikoa-ren froga aurkeztuko dugu hemen, seinalizazio-unitatearen funtzioa aztertuz.

Abstract: G protein-coupled receptors exist as dimers or oligomers. Dimerization can occur between identical, resulting in the formation of homomers, or between different receptors, forming heteromers. Such interaction enhances and diversifies the functional potential of a drugable signaling platform, significantly expanding pharmacological intervention. Ultimately this idea could be apply to therapeutics. Using two different receptor dimer examples we present evidence of GPCR allosteric communication and dissect the function of the signaling unit.

Azaro hartan ikerlaria nintzen oraindik. New Yorkeko 168 kaleko 632W zenbakiko seigarren pisura nindoan, Kolbe Annex deritzon eraikineko igogailu gris eta hotz horietako baten barruan.

Igogailutik irten bezain laster, Kavli Institute for Brain Science hitzek agurtzen zaituzte. Ezkerretarantz irten behar da, ezkerretara berriz, eta korridorearen amaieran, ezkerreko azken atean, komuna egon beharrean, Eric R. Kandelen bulegoa dago. Ondoko atean Millie bere idazkari pertsonalaren bulegoa. Kandelen bulegoaren ate aurrean, korridorean, Nobel saria. Eusko Jaurlaritzako nire doktorego osteko bekaren egiaztagirian bere izena. Hitzordua daukat Kandel doktorearekin. Zer esango diot? Beldurtuta nago. Zer esango dit? Jakin-minak erre egiten nau. Ezin izango dugu biok batera hitz egin, G proteinen bidez funtzionatzen duten hartzaileek bezala. Listo, hori esango diot.

Batek adi entzun behar du, besteak hitz egiten duen bitartean.

Atea irekita dago. Bata bestearen atzetik elkarri egunon esan diogu, singularreko lehen pertsona beti maiuskulaz idazten duen hizkuntza horretan. Ericek kafea prestatu dit. Kroisant batekin batera edango dudan kafe zatarra. Bere bulegoa nire apartamentua baino handiagoa da. Hemendik Hudson ibaiaren ikuspena behar bezala dastatzeko aukera daukat. George Washington zubiak inoiz baino distiratsua eta ederragoa dirudi. Horregatik soilik merezi izan du honaino etortzeak. Ericek bere liburutegia bitan banatua dauka; hegoaldeko horman zientzia-liburuak daude, testu-liburuak eta monografiak. Ekialdeko horman berriz, berak idatzitakoak; haietariko bat hizkuntza desberdinetako agrialpenetan du. Euskarazko itzulpenik ez dago.

«*Bigarren Nobela irabazten lagunduko didan zerbaitetan ibiltzea espero dut. Bihar nire larogeigarren urtebetzea da, denbora agortzen ari zait... ba al zatoz afarira? Hamabost minutu barru hitzordua dut Richardekin, zeren zain zaude gaztetxo?*». Ahaztu du ez nauela gonbidatu eta badaikit Richard hori R. Axel dela. Bigarren Nobel saria irabazi nahi duen beste zientzialari horietako bat. Hauxe da unea! honetarako prestatzen egon naiz urte hauetan zehar. Hitzordu bat, mezu bat.

D₁ eta D₂ hartzaille dopaminergikoen aktibazio mekanismoa ikertzen ari naiz, Eric. Badakizu G proteinen bidez funtzionatzen duten zelularen mintz plasmatikoa dauden proteinak direla. Familia bereko hartzaille guztiak bezala, kanpoko estimuluak (fotoiak, adrenalina edo dopamina bezalako neurotransmisoreak, zapoak zein usainak osatzen dituzten molekulak, endorfinak eta beste hainbat proteina eta hormonak) espezifikoki ezagutu, lotu eta G proteina aktibatuz zelularen begi, mingain, sudur eta belarri dira. Behin G proteina aktibatuta, zelularen barruan hainbat proteinaren aktibazio sekuentzialaren ondoren hainbat gen piztu edo itzaliko dira [1].

Orokorrean, farmazian erosi ditzakezun botiken % 40 inguruk egiten du lan, G proteinen bidez [2]. Batzuek hartzaille aktibatuz (agonistak) eta beste batzuek inhibituz (antagonistak) funtzionatzen dute, zentzu zabalean behintzat. D₁ eta D₂ hartzaille funtzioa modulatzeko duten farmakoen artean daude antipsikotikoak (eskizofreniaren tratamendurako egun dagoen terapia bakarra), Parkinsona tratatzeko sendagaiak eta anfetaminak eta kokaina bezalako sustantziak, besteak beste. Hartzaille dopaminergikoek mugimendua, kognizioa, garunaren sari sistema, motibazioa, atentzioa, ikasketa eta memoria, sexu jokaera eta gogaldiaren kontrolean parte hartzen dute... «*Tell me something I don't know*». Entzungo balit gutxienez... [3, 4]

Familia honetako hartzailleak taldeka elkartzen dira [5], bata bestearen alboan daudelarik. Bikote katolikoak bezalaxe, elkarrekin jaio, bizi eta hil egiten diren proteinak dira... «*dimers, so what?*». Ez al da inoiz isilduko! Bikoteka bakarrik edo unitate gehiago izan ditzakeen hartzaille konplexu



Merkatuan dauden botiken %40ak G proteinen bitartez funtzionatzen duten hartzaileen funtzioa modulatu du.

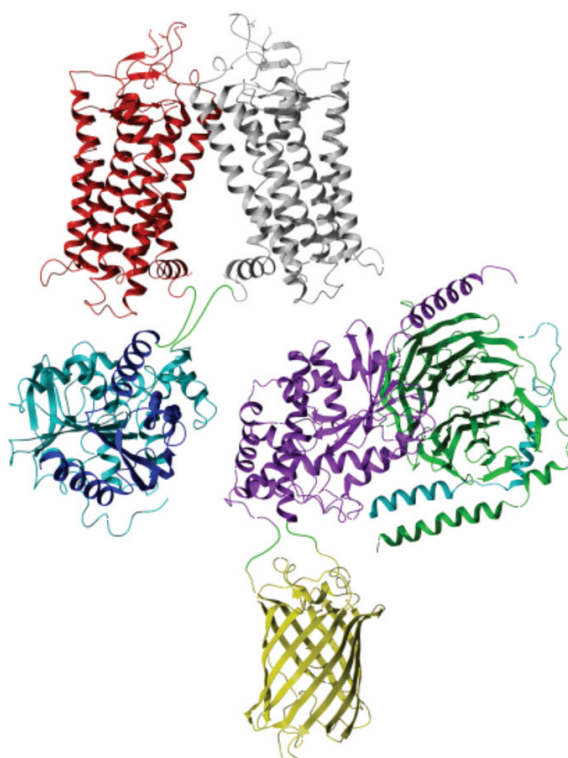
hauen berri 1999an izan genuen, nik tesia hasi baino aste batzuk lehenago. New Yorkeko beste zentru batean emakume ikerlari bikote batek hartzaile opioideen kontaktu fisiko zuzena frogatu zuen [6].

Nik D_1 - D_2 hartzaileen heterodimeroa (hetero, bi molekula desberdinez gutxienez osatutako bikotea delako; homodimeroa bi molekula berdineko konplexua da) eta D_2 -delta deritzon hartzaile opioidearen arteko heterodimeroak propietate bitxiak dituela aurkitu dut. Farmakologian iraultzailea izango da ideia, nik uste. «*Farmakologian zeozer aldatzeko, nik uste behar izango dut, ezta? bestela laborategian egongo zinateke zure esperimentuak egiten, hemen Eric zaharrarekin baino*». Bikotea, proteinen bikotea kasu honetan, ondo aukeratzearen garrantzia azpimarratzen duten emaitzak bildu ditut.

Agonista horietako batekin hasiko naiz. D_2 hartzailea aktibatzen duen molekula batek, D_1 - D_2 bikotea D_2 - D_2 -a baino potentzia haundiagoarekin aktibatzen du. Hori dela eta, sustantzia beraren dosi askoz txikiagoa behar da heterodimeroa aktibatzeko homodimeroa aktibatzeko baino. N-propil apomorfina, edo NPA, D_2 aktibatzen duten agonista guztien artean propietate hau duen molekula bakarra da. Dopaminak zein beste agonista guztiek ez daukate berezitasun hau. Hartzailea norbere buruarekin zein beste hartzaille batekin elkartuz gero dimeroak ezaugarri desberdinak izango ditu. Jabetzen zara zenbat aukera zabaltzen dituen ideia honek? «*I see*». Istorio hau *Nature Chemical Biology* aldizkarian argitaratu berri dugu [7]. Oraindik argitaratugabea dagoena delta hartzaillearekin bat datorrenean D_2 -ak egiten duena da. «*Tell me*».

Hasteko, hartzaille bi hauek burmuinean bikote bat osatzen dutela Pierrekin batera frogatu dugu. Delta opioidea eta D_2 dopamina hartzailleak

garuneko toki jakin batean bakarrik daude elkarrekin; nukleo ildaskatuko —latinezko *striatum*— neuronetan. Dakizun moduan, bai opioide bai dopamina neurotransmisio sistemek garunaren sari sisteman eta droga adikzioan duten funtzioa oso garrantzitsua da. Horrez gain, argi dago nukleo ildaskatuak funtzio berberetan parte hartzen duela. Fluoreszentzia mikroskopia konfokalarik esker Pierrek eta biok saguaren nukleo ildaskatuan hartzaile bien konplexua ikusi ditugu.



Hartzaile bakoitzean (gorri eta grisa) luziferasa (urdin argi eta ilun) osatzen duten bi zatiak jarriz, hartzaileak espazioan gertu egotearen argi urdina sortzen da. G proteina aktibatzean (morea, berde eta magenta) —honek Venus itsatsita duelarik— luziferasak igorritako argi transferentzia dimeroaren aktibazioaren marka izango da.

Proteina fluoreszente eta biolumineszenteetara jo genuen gero. Venus deritzon proteina fluoreszente horia eta luziferasa proteina biolumineszente urdina aukeratu genituen. Azken hau *Aequorea victoria* algan aurki daiteke eta algari bere urdin kolore berezia ematen dio. Luziferasak zelenterazina izeneko bere substratoaren bidez uhin-luzera neurgarri jakin batean argia igortzen du. Aldiz, Venus espazioan luziferasarengandik hurbil egote-

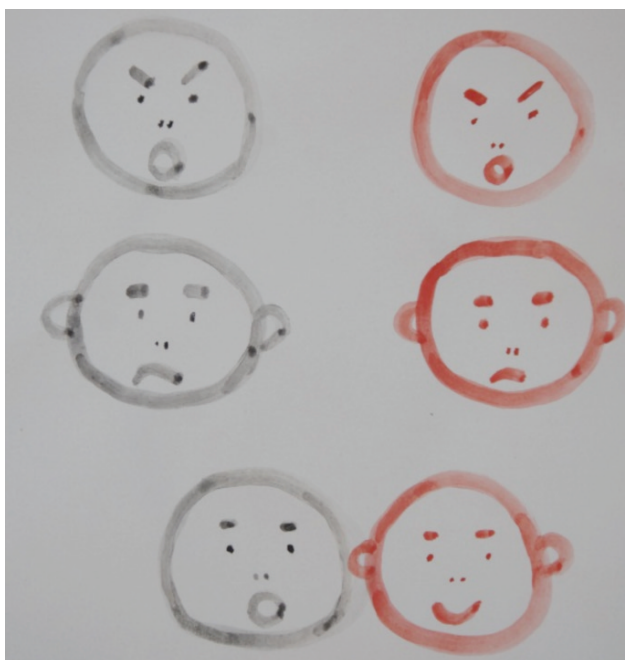
rakoan, (100 Angstrom edo 10 nanometro baino txikiagoa izan behar duen distantzia) Venusek luziferasak igorritako zenbait fotoi xurgatu eta uhin-luzera desberdin batean igortzen ditu. Fenomeno honi energia erresonante biolumineszentearen transferentzia deritzo, ingelesezko BRET. Luziferasa bi zatitan «banatu» genuen. Zati biek zelulan elkartzen direnean soilik igor dezakete argia, zati bakoitzak bere aldetik ez duelako argirik igortzen. Luziferasa zati bakoitza, oinarriko biologia molekularrari esker, hartzaile bakoitzean —zati bat D_2 -an eta bestea delta hartzailean— jarri genuen. Hartzaileak mintzean hurbil izatekotan, argi urdina neurtzeko gai izango ginela pentsatu genuen. «mmm... interesting».

Lehenik eta behin, argi urdin hori neurtzeko gai ginela egiaztatu genuen. Horrek, bi hartzaileek «dimerizatzen» dutela frogatzen du. Ez zenuke sinistuko, D_1 eta deltarekin saiatu ginenean, D_2 eta D_1 hartzaile berdintsuak izan arren, ez genuen luziferasaren argi urdina inondik inora antzeman. Honek interakzio fisikoa espezifikoa dela esan nahi du. Bitartean, Venus G proteinari «itsatsi» genion. Helburua oso sinplea zen: hartzaile jakin biren arteko interakzio fisikoa jarraitzen genuen heinean dimeroak eragindako G proteinaren aktibazioa aztertzeko gai izango ginen, BRET seinale bat neurtuz gero... «*I love it!*».

Teknikoki dena egiaztatu genuen, egin beharreko kontrol guztiekin. Gure emaitzen arabera hartzaile bakar bat aktibatzen duen agonista bakar bat dimeroa aktibatzeko gai da. Hori gutxi balitz, bi hartzaileak aktibatzen dituen agonistak batera jartzean dimeroak aktibazio txikiagoa eragingo du. Beraz, sistemak momentu jakin batean hartzaile aktibo bakarrarekin hobeto funtzionatzen du. Eta ez da hori onena. «*what!? there is more!?*». Sistemak oraindik hobeto funtziona dezake, ba al dakizu nola? «...». Zein ondo ulerzen duen benetan entzuten didanean. Hartzaile bat agonista batekin aktibatuz, eta bestea antagonista batekin inhibituz gero, dimeroak G proteina modu eraginkorrago batean aktibatzen du hartzaile bakar baten aktibazioarekin konparatuz.

Laburbilduz, dimeroko hartzaile baten aktibazioak bikoteko beste hartzailearen funtzioa gutxiagotzen du. Nola edo hala, aktibatutako hartzaileak bere egoeraren berri ondoko hartzaileari ematen dio. Ondoko hartzailea guztiz inhibitua dagoenean —antagonista batekin— aktibatutako hartzaileak bere aktibazioaren maximoa lortuko du, ondokoaren aktibazioak eraginiko inhibitiorik jasan ez duelako. Saguekin frogatuko dugu ideia datorren astean; D_2 -ren agonista delta hartzailearen antagonistarekin batera eman eta agonista bakarrik ematean lortutako emaitzekin alderatuko dugu. Medikuntzan zabal daitekeen tratamendu konbinatu berritzailea da...

«*Brilliant! Hemen azaldu didazuna ez inori kontatu, gaztetxo. Sekretua ondo gordetzen badugu artikulu eder bat idatziko dugu. Oraintxe bertan Science eta Natureko editoreei deituko diet. Millie!*». Editoreek, Eric



Hartzaileen kasuan, giza hartuemanetan bezala, batek soilik hitz egin eta besteak entzuten duenean komunikazioa hobezina da.

baino hobeto entzun dezaten espero dut, bestela nire sekretua benetan ondo gordea geldituko delakoan nago. Argi dago bikote batek (homo zein hetero) hobeto elkar ulertzen duela bietariko batek soilik hitz egiten duenean, hartzaileen antzera. Horiek horrela, entzuleak (komunikazio-lengoaian hartzailea deiturikoak) arreta osoz entzunez gero, komunikazioa benetan eraginkorra izango da. Hemingwayk esan zuen moduan «*Jendeak hitz egiten duenean, benetan entzun. Jende gehienak ez du inoiz entzuten*». Nik adi-adi jasotzen dut aspaldi Ernestek esateko duena.

BIBLIOGRAFIA

- [1] GETHER U. 2000. «Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors». *Endocr Rev* **21**, 90-113.
- [2] GEORGE SR, O'DOWD BF, LEE SR. 2002. «G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery». *Nature Reviews Drug Discovery* **1**, 808-820.
- [3] IVERSEN SD, IVERSEN LL. 2007. «Dopamine: 50 years in perspective». *Trends in Neurosciences* **30**, 188-193.
- [4] BJORKLUND A, DUNNETT SB. 2007. «Dopamine neuron systems in the brain: an update». *Trends in Neurosciences* **30**, 194-202.

- [5] FERRE S, BALER R, BOUVIER M, CARON MG, DEVI LA, DURROUX T, FUXE K, GEORGE SR, JAVITCH JA, LOHSE MJ, MACKIE K, MILLIGAN G, PFLEGER KDG, PIN JP, VOLKOW ND, WALDHOER M, WOODS AS, FRANCO R. 2009. «Building a new conceptual framework for receptor heteromers». *Nat Chem Biol* **5**, 131-134.
- [6] JORDAN BA, DEVI LA. 1999. «G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function». *Nature* **399**, 697-700.
- [7] URIZAR E, YANO H, KOLSTER R, GALES C, LAMBERT N, JAVITCH JA. 2011. «CODA-RET reveals functional selectivity as a result of GPCR heteromerization». *Nat Chem Biol* **7**, 624-630.