

PREMIO NOBEL PER LA FISILOGIA O LA MEDICINA 2019

assegnato a

**William G. Kaelin Jr, Sir Peter J. Ratcliffe
and Gregg L. Semenza**

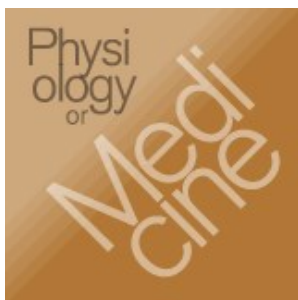
*"for their discoveries of how cells sense
and adapt to oxygen availability"*

*di Paolo Tortora**

Nel corso dell'evoluzione si sono sviluppati complessi sistemi per adattare gli organismi alle variazioni di disponibilità di ossigeno; sistemi spiegati dalle ricerche di Kaelin, Ratcliffe e Semenza, spianando la strada a possibili applicazioni terapeutiche.



** Ordinario di Biochimica,
presso il Dipartimento di
Biotecnologie e Bioscienze
dell'Università degli Studi
di Milano Bicocca*



Come è a tutti noto, le piante e gli animali superiori, uomo incluso, utilizzano l'ossigeno atmosferico per sostenere il metabolismo ossidativo, vale a dire quell'insieme di trasformazioni che consentono la completa ossidazione dei nutrienti fino a produrre anidride carbonica e acqua.

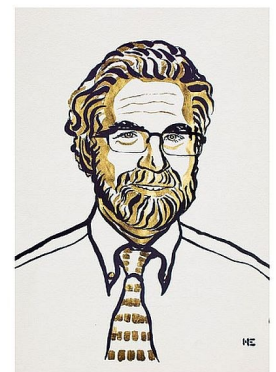
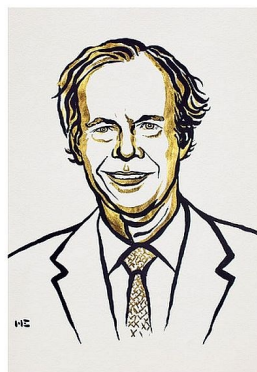
Tale innovazione metabolica è stata resa possibile dalla comparsa dell'ossigeno nell'atmosfera circa due miliardi di anni fa, grazie all'attività fotosintetica degli organismi vegetali. A tale cambiamento si è associato un cospicuo vantaggio energetico: la degradazione ossidativa

dei nutrienti produce infatti energia in una misura di più di un ordine di grandezza superiore rispetto a quella anaerobica, cioè quella che avviene in assenza di ossigeno.

È tuttavia anche vero che, sia a livello di organismo, sia di singoli tessuti, la disponibilità di ossigeno può variare in misura anche cospicua, in dipendenza delle condizioni fisiologiche o metaboliche.

A questo riguardo, esempi immediatamente comprensibili a chiunque sono la condizione ipossica (scarsità di ossigeno) che si instaura a livello dei muscoli durante un esercizio fisico prolungato, o quella che si verifica in alta quota, una condizione questa che interessa l'intero organismo.

Dato che nel corso dell'evoluzione gli animali hanno sviluppato complessi sistemi per adattarsi a tali variazioni, è evidente che queste risposte adattative devono giocare un ruolo cruciale per garantire le migliori chances di sopravvivenza.



*William G. Kaelin Jr, Sir Peter J. Ratcliffe and Gregg L. Semenza
(Illustrazione di Niklas Elmehed. Copyright Nobel Media)*

Il premio Nobel per la Fisiologia o Medicina del 2019 è stato assegnato agli americani William Kaelin Jr e Gregg Semenza e al britannico Peter J. Ratcliffe proprio per avere chiarito in dettaglio i meccanismi molecolari che sono alla base di questi fenomeni di adattamento.

Un primo impulso alle ricerche che hanno fruttato il premio Nobel ai tre scienziati è dovuto al contributo di diversi gruppi che negli anni 1986-87 identificarono l'eritropoietina (EPO), una proteina ad azione ormonale prodotta e rilasciata da particolari cellule renali quando un individuo si trova in condizioni di ipossia (scarsità di ossigeno): tale ormone stimola infatti un incremento degli eritrociti circolanti (e quindi dell'emoglobina disponibile).

Si tratta evidentemente del già menzionato processo di adattamento all'alta quota.

Anche prima della scoperta dell'EPO, a cominciare dagli anni '70 del secolo scorso, apparve sempre più chiaro che la risposta adattativa alla ipossia coinvolgeva un ampio repertorio di geni (a oggi ne conosciamo circa 300).

Un gene è un tratto di DNA che di norma codifica l'informazione necessaria per la sintesi di una determinata proteina. Le proteine, a loro volta, costituiscono nel loro insieme il macchinario che attua virtualmente tutte le funzioni di un organismo. Ciascun gene non produce in modo costante la corrispondente proteina, ma può essere "acceso" o "spento" a seconda delle esigenze dell'organismo.

L'espressione del gene (questa è la terminologia utilizzata per significare che il gene viene acceso e quindi produce la corrispondente proteina) prevede un processo detto trascrizione, consistente nella sintesi di una molecola di RNA, un acido nucleico simile al DNA, che utilizza lo stesso alfabeto a quattro lettere e contiene la stessa informazione del gene corrispondente.

L'RNA derivante da uno specifico gene esce poi dal nucleo dove è immagazzinato il DNA e viene utilizzato per la sintesi nel citoplasma della proteina codificata (quest'ultimo processo è denominato traduzione).

Fu dunque osservato che le attivazioni trascrizionali di questi geni rappresentavano risposte regolative all'ipossia, capaci di modificare il metabolismo cellulare così da controllare processi biologici fondamentali quali l'angiogenesi, l'infiammazione e lo sviluppo.

Nonostante questa grande mole di osservazioni, tali meccanismi di attivazione genica iniziarono ad essere chiariti solo verso la fine degli anni '90 del secolo scorso, e molto di più nei primi anni del nuovo millennio grazie alle ricerche dei tre premi Nobel. In particolare, Gregg Semenza e Peter Ratcliffe condussero esperimenti che diedero un contributo fondamentale alla loro comprensione. Il presupposto delle loro investigazioni era che ai geni codificanti proteine sono generalmente associati dei tratti di DNA che ne regolano la trascrizione.

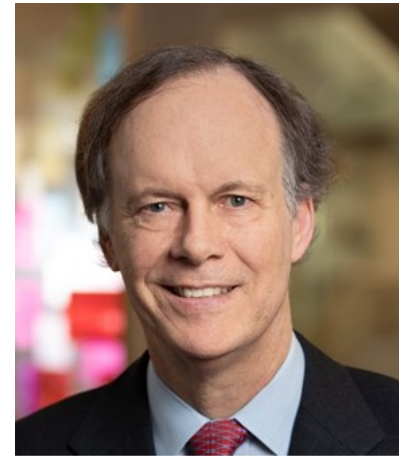
L'attivazione della trascrizione si verifica quando a tali tratti di DNA a funzione regolativa si legano certe proteine, dette appunto attivatori trascrizionali. Al termine di una complessa serie di esperimenti, Semenza e Ratcliffe isolarono diverse sequenze di DNA che modulavano l'espressione del gene dell'EPO.

Uno in particolare, di 50 basi, a seguito del legame con l'attivatore trascrizionale stimolava l'espressione del gene in una grande varietà di tipi cellulari. Fu quindi denominato "hypoxia response element" (HRE). Tale elemento genico fu quindi utilizzato come "esca" per identificare le proteine che, legandovisi, modulavano l'espressione dell'EPO. In particolare due proteine furono identificate, strettamente associate tra loro: una che era costitutiva (era cioè permanentemente presente) e l'altra inducibile da ipossia, vale a dire che il suo livello aumentava in scarsità di ossigeno. Il complesso delle due proteine fu denominato "hypoxia-inducible factor" (HIF).

Ratcliffe e Semenza dimostrarono inoltre che l'HRE controllava l'espressione dei geni ad esso associati in un'ampia gamma di tipi cellulari di mammifero.

Questa osservazione, unitamente al fatto che anche l'HIF fu trovato in molti diversi tipi di cellule di mammifero, suggerì immediatamente l'esistenza di un meccanismo molecolare universale di controllo dell'adattamento degli organi alla disponibilità di ossigeno.

Il passaggio successivo fu naturalmente l'isolamento e la caratterizzazione delle due componenti proteiche della HIF: quella inducibile (che compariva solo in assenza di ossigeno) fu denominata HIF-1 α ; quella costitutiva, quindi sempre presente a livelli sostanzialmente costanti, fu denominata ARNT. Dato che era HIF-1 α a variare nelle diverse condizioni, fu subito chiaro che era questa la proteina più direttamente implicata nella risposta adattativa all'ipossia.



*William Kaelin Jr,
Harvard University & Dana-Farber
Cancer Institute (USA).*



*Peter J. Ratcliffe,
Francis Crick Institute, University
of Oxford (UK).*

In questa fase della ricerca, attorno al 1995 Kaelin isolò un'altra proteina, denominata VHL, che se non funzionale portava alla eccessiva espressione di geni sotto il controllo di HIF (quindi legati alla risposta ipossica), anche in presenza di ossigeno. Tale proteina fu in realtà caratterizzata inizialmente come soppressore tumorale proprio in quanto la perdita della sua funzione portava anche alla comparsa di certi tipi di tumore.

Ulteriori investigazioni alle quali partecipò lo stesso Kaelin dimostrarono infine che VHL è una proteina ubiquitinante, cioè capace di legare un piccolo peptide, l'ubiquitina, a un repertorio di proteine bersaglio. Tale peptide è una "etichetta molecolare", generalmente utilizzata dagli organismi superiori per destinare la proteina bersaglio alla proteolisi, cioè alla frammentazione. L'ubiquitinazione è a sua volta attivata da segnali molecolari molto specifici presenti sulla proteina bersaglio: si tratta quindi di un sistema di controllo finemente regolato che consente di eliminare selettivamente proteine la cui funzione, in una determinata condizione metabolica, non sia utile o sia addirittura dannosa per la cellula. La frammentazione delle proteine ubiquitinate avviene poi nel proteasoma, un grosso assemblaggio proteico citoplasmatico a funzione proteolitica.

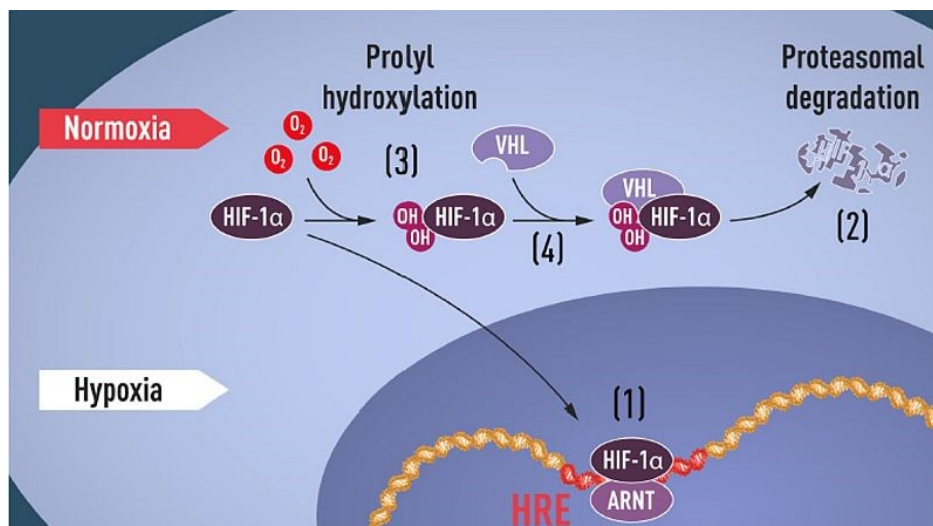
Il quadro regolativo alla base del controllo della trascrizione dei geni attivati dall'ipossia si stava così delineando: si sapeva che HIF-1 α era in grado di attivare la trascrizione di molti geni in condizioni ipossiche; si sapeva che, in abbondanza di ossigeno, VHL ne determinava la degradazione mediata da ubiquitinazione; ma era ancora da chiarire quale caratteristica strutturale presente sulla proteina HIF-1 α solo in condizioni di abbondanza di ossigeno fosse riconosciuta da VHL.

La scoperta di questa modificazione strutturale venne da ricerche svolte da Ratcliffe e Kaelin, e pubblicate in contemporanea nel 2001. I due gruppi di ricerca dimostrarono che un enzima, la prolina idrossilasi, era in grado di catalizzare il trasferimento di un atomo di ossigeno sotto forma di idrossile (-OH) dalla molecola biatomica dell'ossigeno gassoso a uno specifico amminoacido di HIF-1 α , la prolina.

In sintesi, il sistema di controllo si basa sulla idrossilazione di HIF-1 α , una modificazione covalente che può avvenire solo in presenza di ossigeno, e che la rende riconoscibile da VHL destinandola così alla degradazione. Di conseguenza, in queste condizioni l'espressione dei geni e la produzione di proteine destinate ad attuare l'adattamento all'ipossia viene abolita. Il quadro generale delle conoscenze risultanti dal complesso di queste investigazioni è riassunto nella seguente figura.



Gregg Semenza,
Johns Hopkins University School
of Medicine (USA).



(1) Nell'ipossia, il complesso HIF lega elementi HRE nel genoma, attivando così l'espressione di geni che esprimono proteine importanti per l'adattamento alla scarsità di ossigeno. (2) In condizioni di normale disponibilità di ossigeno, la proteina HIF-1 α è destinata alla distruzione ad opera del proteasoma, (3) dopo essere stata idrossilata in un processo che richiede la presenza di ossigeno. (4) Tale idrossilazione consente il riconoscimento di HIF-1 α da parte di VHL. (fonte: www.nobelprize.org/).

Un aspetto sorprendente di questa scoperta è che l'espressione di centinaia di geni, come pure una molteplicità di fenomeni di adattamento fisiologico di tessuti e dell'intero organismo all'ipossia sia sotto il controllo di un dispositivo così semplice a livello molecolare. In buona sostanza, il sensore dell'ossigeno consiste infatti di sole quattro proteine: HIF-1 α , ARNT, VHL e la prolina idrossilasi.

Come sempre nel caso di scoperte di grande portata in ambito biomedico, anche questa sta spianando la strada a possibili applicazioni terapeutiche, alcune delle quali già in via di sperimentazione. Per esempio, sono allo studio diversi inibitori della prolina idrossilasi che, prevenendo la degradazione di HIF-1 α , riproducono una condizione di ipossia anche in normale presenza di ossigeno. Conformemente alle aspettative, di tali molecole è stata dimostrata l'efficacia nel trattamento delle anemie.

In una prospettiva a più lungo termine, si sta valutando di sviluppare agenti farmacologici capaci di incrementare l'attività trascrizionale di HIF, in quanto tale complesso proteico ha un ruolo essenziale in una varietà di fenomeni fisiologici, come la funzione immunitaria, la formazione della cartilagine e la cicatrizzazione delle ferite. Un potenziamento della sua funzione potrebbe pertanto sopperire a difetti in tali processi. Inversamente, l'inibizione di HIF potrebbe contrastare alcune patologie che sono invece provocate o favorite da un eccesso della sua attività: si tratta in particolare di alcuni tipi di tumore e di malattie cardiovascolari.

In conclusione, è del tutto plausibile che il futuro ci riservi più ampi e rilevanti sviluppi applicativi in campo biomedico di questa scoperta, in considerazione del fatto che il descritto dispositivo di risposta alle variazioni dell'ossigeno costituisce uno dei meccanismi di adattamento fisiologico più centrali e importanti negli organismi animali.

Paolo Tortora

(Ordinario di Biochimica, presso il Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze dell'Università degli Studi di Milano Bicocca)