

Kako celice zaznajo in se prilagodijo razpoložljivosti kisika

Nobelova nagrada za fiziologijo ali medicino za leto 2019

Radovan Komel

Kisik predstavlja približno petino prostornine današnjega Zemljinega ozračja in je osrednji dejavnik življenja, kot ga poznamo. Potrebo po njem za vzdrževanje življenja razumemo že od začetka sodobne biologije, molekularni mehanizmi, s katerimi se celice prilagajajo spremembam v oskrbi s kisikom, pa so ostali nepojasnjeni vse do odkritij v

zadnjih tridesetih letih, ki so bila novembra leta 2019 tudi okronana z Nobelovo nagrado za fiziologijo oziroma medicino. Nagradjenci so Gregg L. Semenza, ki je leta 1990 odkril protein HIF, ki uravnava odziv celic na prisotnost kisika, William G. Kaelin, ki je leta 1995 odkril protein VHL, zaviralca rakavih tumorjev in obnem vpletenega v



William G. Kaelin se je rodil leta 1957 v New Yorku. Doktoriral je na Univerzi Duke v Durbamu in se nato specializiral za interno medicino in onkologijo na Univerzi Johns Hopkins v Baltimoru in na Inštitutu za raka Dana-Farber v Bostonu. Svoj raziskovalni laboratorij je ustanovil na Inštitutu za raka Dana-Farber in leta 2002 postal redni profesor na Harvardski medicinski šoli. Od leta 1998 je raziskovalec na Medicinskem inštitutu Howard Hughes.



Sir Peter J. Ratcliffe se je rodil leta 1954 v Lancashiru v Veliki Britaniji. Študiral je medicino na Gonville & Caius College Univerze v Cambridgeu in na Oxordu opravil specialistično usposabljanje iz nefrologije. Na Univerzi v Oxfordu je ustanovil neodvisno raziskovalno skupino in leta 1996 postal redni profesor. Je direktor kliničnih raziskav na Inštitutu Francis Crick v Londonu, direktor Inštituta za odkrivanje molekulskih tarč v Oxfordu in član Ludwigovega inštituta za raziskave raka.



Gregg L. Semenza se je rodil leta 1956 v New Yorku. Na Univerzi Harvard v Bostonu je opravil študij iz biologije. Leta 1984 je doktoriral na Medicinski fakulteti Univerze v Pensilvaniji v Filadelfiji in se izučil za specialista iz pediatrije na Univerzi Duke v Durhamu. Podoktorsko se je izobraževal na Univerzi Johns Hopkins v Baltimoru, kjer je ustanovil tudi neodvisno raziskovalno skupino. Leta 1999 je postal redni profesor na Univerzi Johns Hopkins, od leta 2003 pa je direktor programa za vaskularne raziskave na Inštitutu za celično inženirstvo Johns Hopkins.

uravnavanje celične ravni proteina HIF, ter Peter J. Ratcliffe, ki je v nadaljevanju skupaj s Kaelinom prispeval k razjasnitvi mehanizma od kisika odvisnega uravnavanja celične ravni proteina HIF s strani proteina VHL.

Živali potrebujejo kisik za pretvorbo hrane v koristno energijo. V mitohondrijih, dihalnih organelih večine evkariontskih celic, poteka tako imenovano celično dihanje, pri katerem se produkti presnove hranil (sladkorji, aminokisliline, maščobne kisline) v kaskadi encimskih reakcij in v prisotnosti kisika pretvorijo v ogljikov dioksid (CO_2) in vodo (H_2O), pri tem pa se energija iz razgradnje njihove zgradbe prenese v nastanek oziroma zgradbo molekul ATP (adenozin trifosfat). Adenozin trifosfat je shranjevalec presnovne energije ter njen prenašalec v izgradnjo novih molekul, sestavnih delov celice, in v izvajanje drugih pomembnih dejavnosti organizma, kot so gibanje, krčenje mišic in prenos/širjenje živčnih signalov. S presnovo adenozin trifosfata se namreč energija njegove zgradbe ne sprosti v prazno, temveč se pretvori v energijo zgradbe novo nastalih molekul oziroma se porabi za omenjene druge dejavnosti celic, tkiv, organov in organizma.

Kako se organizem odzove na pomanjkanje kisika?

Ko se ukvarjamo z napornimi športi (na primer s tekom), pri katerih organizem porablja veliko kisika, da si zagotovi dovolj energije za mišično delo, ali visoko v gorah, ko se alpinist sooči z redkejšim zrakom in pomanjkanjem kisika, se organizem odzove s pospešenim dihanjem, ki ga opisujemo kot »zadihanost«. V evoluciji so organizmi razvili način, kako v takih primerih zagotoviti zadosten dovod kisika v tkiva in celice. Na meji velikih krvnih žil na obeh straneh vratu se nahaja tako imenovano karotidno telo, sestavljeno iz specializiranih živčnih celic, katerih površinski receptorji (posebne proteinske molekule) so občutljivi za spremem-

be ravni kisika. Z vezavo kisika na receptor ali po drugi strani z njegovo odsotnostjo se zgradba oziroma prostorska oblika receptorja spreminja in to se kaže tudi v njegovi encimski aktivnosti oziroma v odnosu do drugih, v celični membrani povezanih molekul, ki so s soodvisnimi, kaskadnimi spremembami v zgradbi in aktivnosti udeležene pri prenosu sporočila. O samem poteku dogodkov v stanju pomanjkanja kisika (hipoksija) je več hipotez, vsem pa je skupna nit, da znižanje delnega tlaka kisika ter povečanje delnega tlaka ogljikovega dioksida in s tem povečana kislost v končni posledici vplivajo na proteine, ki sestavljajo kanalčke za pretok kalijevih ionov (K^+) skozi celično membrano. Kanalčki se zaprejo in to povzroči zmanjšanje razlike v koncentraciji kalijevih ionov na obeh straneh membrane (depolarizacija membrane), posledica pa je odprtje kanalčkov za kalcijeve ione (Ca^{2+}) in s tem povečanje njihove koncentracije v celici. Kalcijevi ioni povzročijo, da se znotrajcelični vezikli, ki vsebujejo različne posrednike za prenos živčnih signalov (živčne prenašalce, nevrottransmitterje), zlijejo s celično membrano in svojo vsebino oddajo v okolje (eksocitoza veziklov). Živčni prenašalci, kot so acetilholin, noradrenalin, dopamin, met-enkefalin, učinkujejo na receptorje živčnih vlaken in signal je posredovan do središč v možganih, ki uravnavajo dihanje in krvni tlak. Pomanjkanje kisika tako pospeši dihanje (hitrost in moč vdihavanja zraka).

Pljuča so priskočila na pomoč, kako pa naprej ...?

Že nekaj časa vemo, da pomanjkanje kisika predvsem v ledvicah, v manjši meri pa tudi v jetrih in nekaterih drugih organih, sproži aktivnost eritropoetskega gena, kar povzroči takojšen in močan dvig ravni hormona eritropoetina v krvi. Eritropoetin deluje neposredno na matične celice v kostnem mozgu in nadzira njihovo proliferacijo (namnožitve in rast), zorenje in diferenciacijo v rdeče krvničke (eritrocite), prenašalce kisika

do celic. Povezavo med hipoksijo in številom eritrocitov so klinično opazili že proti koncu devetnajstega stoletja, ko so zaznali povečano število eritrocitov pri bivanju na višjih nadmorskih višinah. Po drugi strani pa pri bolnikih s kronično odpovedjo ledvic pride do izrazitega upada števila eritrocitov, ki ga opisujemo kot slabokrvnost ali anemijo, saj je z okvaro ledvic onemogočeno zadostno nastajanje eritropoetina in s tem rdečih krvničk. Hudi ledvični bolniki za preživetje potrebujejo redno dializo s spremljajočo transfuzijo krvi ali presaditev ledvic. Medtem ko je védenje o pomembnosti hormonskega (eritropoetskega) nadzora nastajanja rdečih krvničk v kostnem mozgu (eritropoeza) prisotno od začetka dvajsetega stoletja, pa je vprašanje, kako kisik vpliva na izražanje eritropoetskega gena, ostalo neodgovorjeno vse do odkritij v zadnjih tridesetih letih. Ključno vlogo pri tem so imeli lanski Nobelovi nagrajenci, Gregg L. Semenza, William G. Kaelin in Peter J. Ratcliffe.

Semenza je preučeval eritropoetski gen. Seveda ga je zanimalo, na kakšen način se sproži njegovo izražanje, to je prepis (transkripcija) v ustrežajočo molekulo sporočilne RNA (mRNA) in prevod zaporedja njenih nukleotidov (translacija) v zaporedje aminokislin (zgradbo) eritropoetina. Z uporabo gensko spremenjenih miši, pri katerih so odstranili različne in različno dolge odseke zaporedja DNA na različnih razdaljah pred eritropoetskim genom in za njim, je odkril zaporedja DNA, ki so odločilna za odgovor eritropoetskega gena v prisotnosti oziroma odsotnosti kisika. V odkrivanje teh, uravnalnih (regulatornih) zaporedij se je kmalu vključil tudi Ratcliffe, ki je ugotovil, da je mehanizem odgovora na razpoložljivost kisika ni omejen samo na ledvice, temveč je navzoč skoraj v vseh tkivih in na enak način deluje v različnih vrstah celic. Končno so s skupnimi močmi ugotovili osnovno uravnalno (regulatorno) zaporedje DNA, ki uravnava izražanje genov eritropoeze, in ga po-

imenovali »element odgovora na hipoksijo« (angleško *Hypoxia Response Element, HRE*). Na območja DNA, ki v večji ali manjši razdalji od genov uravnavajo njihovo izražanje, pa se, da jih aktivirajo, morajo vezati tako imenovani »transkripcijski dejavniki«: ti so proteini, katerih oblika je izrazito prilagojena za vezavo na omenjena zaporedja DNA. Semenza je iz različnih vzorcev kultiviranih celic kmalu izoliral proteinski kompleks, ki se veže na »element odgovora na hipoksijo« (HRE) v odvisnosti na razpoložljivost kisika. Poimenoval ga je »s hipoksijo spodbujeni dejavnik« (angleško *Hypoxia-Inducible Factor, HIF*) in kmalu za tem odkril tudi gena, ki zapisujeta njegovo dvokomponentno zgradbo, *HIF-1 α* in *ARNT* (angleško *Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*). Protein ARNT je bil sicer odkrit že pred tem, kot protein, ki se kot sestavna komponenta povezuje s številnimi drugimi proteinskimi dejavniki, vendar je bil Semenza tisti, ki je ugotovil, da se povezuje tudi s HIF-1 α , ki je v dimernem kompleksu HIF dejavnik odgovora na razpoložljivost kisika.

Ugotovili so, da ko je kisika dovolj, je v celicah zelo malo HIF-podenote HIF-1 α . Ko pa kisika zmanjkuje, se raven HIF-1 α bliskovito poveča, toliko ga je, da se uspešno poveže s podenoto ARNT v funkcionalni dimer HIF, ki se kot prepisovalni (transkripcijski) dejavnik lahko veže na uravnalno (regulacijsko) DNA-zaporedje HRE in sproži izražanje eritropoetskega in tudi drugih, v eritropoezi sodelujočih genov. Gen *HIF-1 α* in *ARNT* se sicer stalno (konstitutivno) izražata in načeloma bi zato v celicah vedno moralo biti dovolj obeh proteinov, sestavnih delov dimera HIF, vendar so številni raziskovalci prišli do ugotovitve, da je protein HIF-1 α zelo nestabilen in je podvržen razgradnji v razmerah, ko je kisika dovolj, pri hipoksiji pa nenadoma postane pred razgradnjo zaščiten. Kje je torej stikalo, ki odloča o stabilnosti proteina HIF-1 α in njegovi razpoložljivosti, da se vključi v proces eritropoeze?

K odgovoru na ta vprašanja je bistveno prispevala ugotovitev, da razgradnja proteina HIF-1 α poteka preko specifičnega proteasoma. Proteasomi so proteinski kompleksi, ki so v celicah namenjeni proteolizni razgradnji prekomernih, odsluženih ali poškodovanih proteinov. Take proteine za razgradnjo označi dodatek posebne, majhne proteinske molekule, ubikvitina, kar opravi encim ubikvitinska ligaza. Kako se v primeru proteina HIF-1 α nanj v odvisnosti od kisika veže ubikvitin, pa je ostalo osrednje vprašanje, ki je mučilo Semenzo in Ratcliffe, najpomembnejša raziskovalca, ki sta se ob sodelovanju številčnih drugih posvečala raziskavam uravnavanja eritropoetinskega gena in eritropoeze. Odgovor je prišel iz nepričakovane smeri, s strani Williama Kaelina, ki je raziskoval redko dedno bolezen, imenovano sindrom von Hippel-Lindau. Bolezen, ki povzroča številne in raznolike sistemske težave organizma in pri družinah, ki podedujejo zaradi genskih mutacij spremenjeni oziroma okvarjeni gen *VHL*, se tudi zelo poveča tveganje za nastanek različnih oblik raka. Kaelin je ugotovil, da neokvarjeni gen *VHL* nosi zapis za protein, ki preprečuje nastanek raka, obenem pa tudi to, da rakave celice, pri katerih je gen *VHL* spremenjen in zato nefunkcionalen, kažejo nenavadno velike ravni proteinov, katerih izražanje sicer poteka v razmerah hipoksije. Ko je v rakavih celicah okvarjeni gen *VHL* nadomestil z normalnim, se je vzpostavilo normalno ravnovesje proteinov, kar je bil dokaz za domnevo, da je protein VHL na neki način udeležen pri nadzoru odgovora na raven kisika v organizmu. V nadaljevanju so raziskovalci ugotovili, da je protein VHL del proteinskega kompleksa, ki proteine označuje z ubikvitinom in jih s tem povede v proteasomsko razgradnjo. Ratcliffe je nato prišel do odločilnega odkritja, da protein VHL v razmerah z dovolj kisika fizično interagira s HIF-1 α in da je to pogoj za razgradnjo tega proteina. Odprto je ostalo še vprašanje, na kakšen

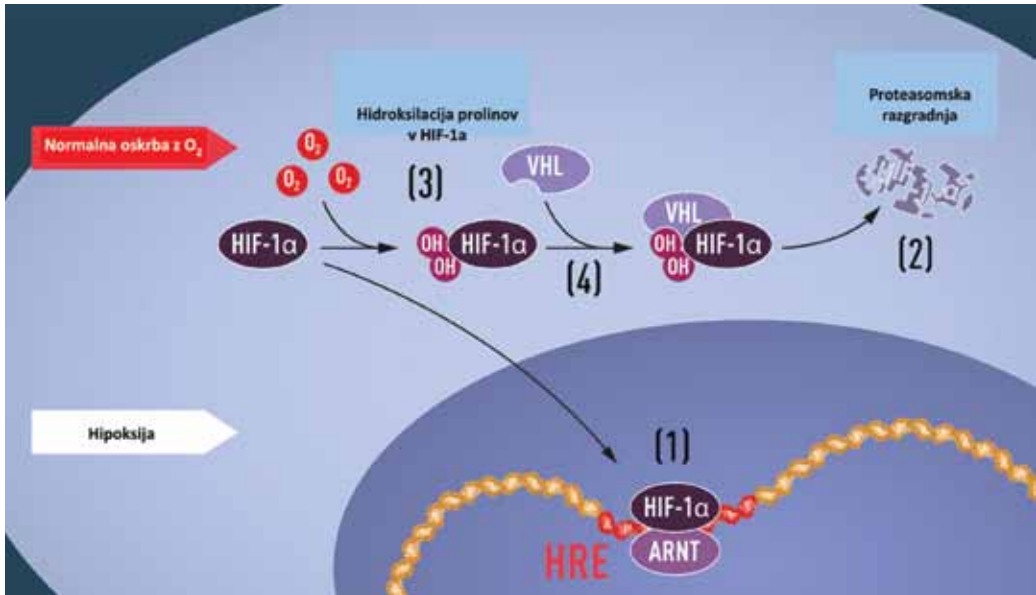
način kisik uravnava interakcijo med proteinom VHL in proteinom HIF-1 α ? Odgovor sta leta 2001 v vzporednih objavah podala Kaelin in Ratcliffe, ki sta pokazala, da v razmerah z normalno oskrbo kisika encim, imenovan prolil hidroksilaza, na dve specifični mesti proteina HIF-1 α uvede hidroksilni skupini, tako spremenjena oblika proteina pa omogoči njegovo prepoznavo s strani proteina VHL, ki se zato poveže z njim, omogoči označbo z ubikvitinom in nadaljevanje v proteasomsko razgradnjo.

Kaj pa se zgodi, ko je kisika premalo?

V razmerah slabe oskrbe s kisikom tega ni dovolj, da bi ga encim prolil hidroksilaza lahko porabil za uvedbo hidroksilnih skupin na prolinske ostanke proteina HIF-1 α . Zato protein VHL ne prepozna nehidroksilirane oblike proteina HIF-1 α in se nanjo ne veže, proteina HIF-1 α brez proteina VHL pa ne prepozna ubikvitinske ligaze in brez ubikvitinske oznake protein ne gre v proteasomsko razgradnjo. Nedotaknjeni protein HIF-1 α se v celici nakopiči do te mere, da se zlahka poveže s proteinom ARNT v funkcionalen dimer HIF, ki z vezavo na DNA-zaporedja HRE sproži program izražanja s hipoksijo spodbujenih genov.

Raziskave iz sedemdesetih in osemdesetih let preteklega stoletja so razkrile, da je v odgovor na spremembe v koncentraciji kisika lahko vpletenih tudi do tristo različnih genov, katerih spremenjeno izražanje spreminja oziroma prilagaja celično presnovo in sodeluje pri uravnavanju ključnih fizioloških procesov, kot so razvoj organov med razvojem zarodka, regeneracija poškodovanih tkiv in pravilno delovanje imunskega sistema. Z odkritjem s HIF posredovanega nadzora molekularnih dogodkov pri odgovoru organizma na prisotnost ali pomanjkanje kisika so Semenza, Ratcliffe in Kaelin ostali osrednji igralci v raziskavah izražanja genov pod vplivom kisika, ki jim danes namenja jo posebno pozornost številne raziskovalne skupine. Njihova odkritja so omogočila glo-

Prilaganje spremembam v razpoložljivosti kisika. V razmerah pomanjkanja kisika (hipoksije) se dimer HIF-1 α : ARNT kot transkripcijski dejavnik HIF veže na DNA-zaporedje HRE in s tem aktivira izražanje genov v proteine, pomembne za prilagoditev na razmere z malo kisika (1). V razmerah normalne oziroma višje oskrbe s kisikom se protein HIF-1 α razgrajuje v proteasomu (2), potem ko se pod vplivom kisika vanj vgradi hidroksilni skupini (3), kar je signal za prepoznavo s strani proteinskega ubikvitinacijskega kompleksa VHL (4). Prirjeno po *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2019*, <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2019/summary/>.



bji vpogled v vlogo s kisikom uravnanih presnovnih poti v zdravju in bolezni.

Kaj odkritje molekularnih osnov odgovora organizma na razlike v ravni kisika prinaša medicinski znanosti?

Odkritje prolinskih hidroksilaz, ki uravnava raven proteina HIF-1 α , je omogočilo iskanje zaviralcev (inhibitorjev) tega encima z namenom, da bi omogočili povišanje ravni HIF in s tem sprožili proces eritropoeze pri bolnikih, ki trpijo zaradi anemije. Dovolj visoka raven HIF je pomembna tudi za pravilno delovanje imunskega sistema, tvorbo hrustanca in celjenje ran. Po drugi strani pa pri nekaterih boleznih, kot so različne oblike raka in bolezni srca in ožilja (možganska kap, srčni napad, povišan krvni tlak v pljučnih arterijah), pride do povišanja ravni HIF, kar odpira nove poti pri raziskavah teh bolezni in iskanju načinov za njihovo

zdravljenje. Številne raziskovalne skupine in farmacevtske družbe se zato usmerjajo v razvoj zdravil, s katerimi bi lahko omogočili zdravljenje bolezni z aktiviranjem ali zaviranjem proteinov, ki so del sistema organizma za zaznavanje in odgovor na različne ravni kisika.

Viri:

The Nobel Assembly at Karolinska Institutet: Press release: The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2019. <https://www.nobelprize.org/uploads/2019/10/press-medicine2019.pdf>.

The Nobel Assembly at Karolinska Institutet: Advanced information: The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2019 – Scientific Background. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2019/advanced-information/>.

Wikipedia – the free encyclopedia: <https://en.wikipedia.org/wiki/Erythropoietin>; https://en.wikipedia.org/wiki/Carotid_body; <https://en.wikipedia.org/wiki/Erythropoiesis>; <https://en.wikipedia.org/wiki/Proteasome>; <https://en.wikipedia.org/wiki/Ubiquitin>.