

I PREMI NOBEL PER LA CHIMICA 2008

di Roberto Rizzo

Anche quest'anno abbiamo cercato di non mancare l'appuntamento con l'assegnazione del Premio Nobel per la Chimica che lo scorso anno è stato assegnato a tre ricercatori americani, di cui uno nato a Kyoto, in Giappone. Sebbene nella chimica sia in atto un nuovo modo di vedere e studiare sistemi complessi di interesse fondamentale o applicativo, che ha anche importanti ricadute in campo applicativo, va sottolineato che ancora una volta la giuria del Premio Nobel ha voluto premiare ricercatori che lavorano su sistemi biologici, le cui ricerche hanno immediate ricadute in campo medico. A nostro parere, questa tendenza rafforza la natura sempre più interdisciplinare delle ricerche più significative per cui la tradizionale distinzione tra biologia, chimica e fisica va sempre più sfumando per confluire nella più generale Scienze della Natura.

Il Comitato Editoriale

L'annuncio stampa della Reale Accademia delle Scienze Svedese è stato rilasciato l'8 ottobre 2008 con il seguente testo:

"The Royal Swedish Academy of Sciences has decided to award the Nobel Prize in Chemistry for 2008 jointly to:

Osamu Shimomura

Marine Biological Laboratory (MBL), Woods Hole, MA, USA and Boston University Medical School, MA, USA

Martin Chalfie

Columbia University, New York, NY, USA

Roger Y. Tsien

Howard Hughes Medical Institute, University of California, San Diego, La Jolla, CA, USA

for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP"

Lo scorso annuncio stampa non lascia trasparire l'importanza del lavoro svolto dai tre ricercatori. Infatti, proteine che entrano a far parte di sistemi che emettono luce in sistemi viventi sono ben note e fanno parte dell'esperienza di molti dei lettori fra cui primeggia quella dell'osservazione delle lucciole, ma non solo. In realtà, i sistemi di bioluminescenza richiedono in genere, per il loro funzionamento, la partecipazione di numerose molecole proteiche e la presenza

di altri cofattori. La proteina fluorescente con emissione di radiazione nel verde scoperta da *Osamu Shimomura*, ha caratteristiche diverse da altri sistemi bioluminescenti in quanto la parte più interna della proteina assume una struttura tale da richiedere solo la presenza di ossigeno perché possa modificarsi ed essere quindi capace di assorbire radiazione nell'ultravioletto e riemetterla come radiazione nel verde attraverso un meccanismo di trasferimento di energia.

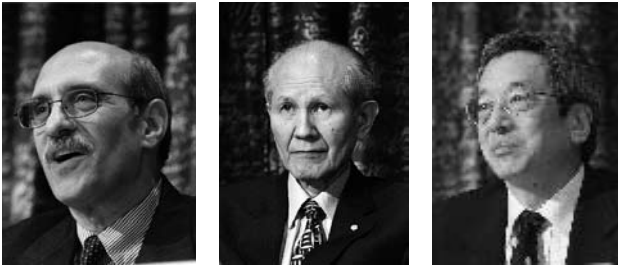


Figura 1: Da sinistra a destra: Martin Chalfie, Osamu Shimomura, Roger Tsien.

Il ruolo dei tre vincitori del Nobel nella ricerca sulla GFP permette di capire già meglio l'importanza del lavoro svolto. Alla fine degli anni '60 dello scorso secolo Osamu Shimomura, che già in Giappone si era interessato all'isolamento di molecole connesse con fenomeni di bioluminescenza, fu incuriosito dal comportamento di *Aequorea victoria*, una medusa che viaggia con le correnti del Pacifico che costeggiano il Nord America, osservando che sotto lo stimolo di radiazione ultravioletta l'organismo emetteva luce verde e per primo isolò la proteina responsabile del fenomeno. Martin Chalfie si rese conto delle potenzialità della GFP come sonda luminescente da utilizzare per rendere visibili processi biologici complessi. Il fatto che la proteina funzioni senza l'aiuto di sistemi biochimici più complessi, specifici dell'organismo che la produce, nella fattispecie la nostra medusa, permette infatti di esprimere la proteina in altri organismi senza che perda la sua attività biologica. Naturalmente, in questa ricerca i progressi dell'ingegneria genetica hanno permesso di clonare il gene della proteina e quindi rendere praticamente fattibile l'idea di Martin Chalfie. Egli, infatti, utilizzando la GFP fu in grado di "colorare" in verde alcune cellule del verme trasparente *Caenorhabditis elegans*. Infine, Roger Tsien attraverso studi strutturali sulla GFP non solo contribuì alla conoscenza dei meccanismi molecolari che sono alla base alle proprietà fluorescenti, ma fu anche in grado di variare le caratteristiche di colore della proteina, attraverso mutazioni in specifici residui di amminoacidi presenti nella struttura primaria della proteina, e di rendere la sua attività più stabile nel tempo, rallentando il normale processo di denaturazione con l'uso ¹. In questo modo, produsse diverse molecole proteiche analoghe (proteine fluorescenti, FP), ma tali da emettere fluorescenza a lunghezze d'onda diverse e quindi presentare diversi colori. Queste proteine analoghe possono essere utilizzate contemporaneamente permettendo di riconoscere diversi processi biologici allo stesso tempo. Dai lontani anni '60 del 1900 siamo così arrivati alla fine

dello scorso secolo: l'intero percorso della ricerca, che ha visto coinvolti i tre vincitori insieme ai loro gruppi di ricerca, è durato quasi mezzo secolo.

Il meccanismo di utilizzazione delle FP nella ricerca biologica è concettualmente semplice: se il loro gene viene geneticamente legato ad altri geni dell'organismo che si vuole studiare, l'espressione di questi geni è rivelata dalla presenza di fluorescenza data dalla specifica FP che viene co-espressa. Questo meccanismo permette di seguire nel tempo complessi sistemi biochimici che in precedenza erano studiati solo dal punto di vista statico perdendo così molte delle informazioni rilevanti per la comprensione di ciò che realmente avviene nella cellula. Infatti, come è stato riportato da molti studiosi: la vita, anche quella delle cellule *in vitro*, non è una fotografia, ma è un film.

La struttura tridimensionale della GFP è stata ottenuta mediante diffrattometria dei raggi X su cristallo utilizzando la tecnica della dispersione anomala a più lunghezze d'onda ². È stato così possibile osservare che la proteina ha una forma peculiare detta "a barile" o "lattina di birra" dove numerosi segmenti di catena proteica formano un esteso foglietto beta che è avvolto su se stesso a formare un cilindro con un diametro di circa 30 Å ed un'altezza di 40 Å. La novità del motivo strutturale di questa proteina ha portato alla definizione di una nuova classe strutturale detta appunto beta-lattina (*beta-can*).

La struttura terziaria comprende anche un paio di piccoli segmenti di alfa-elica di cui uno è posto approssimativamente al centro del cilindro e costituisce l'impalcatura del gruppo fluoroforo.

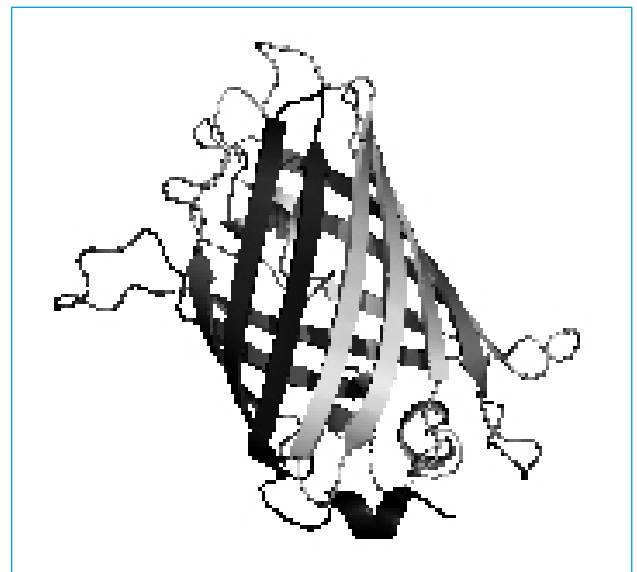


Figura 2: Schema della struttura tridimensionale della GFP. Le frecce indicano la presenza di foglietti beta.

Infine, nella struttura cristallina, la molecola è presente come dimero che è stato osservato anche in soluzione a bassa forza ionica. Il dimero ha una funzione biologica in quanto condiziona lo spettro di eccitazione ed il meccanismo di trasferimento di energia della *GFP*. Un'ulteriore caratteristica interessante della *GFP* è la sua alta stabilità chimica anche in condizioni di temperatura e pH estremi ed in presenza di denaturanti; per di più, una volta denaturata è in grado di rinaturare spontaneamente semplicemente ripristinando le condizioni chimico-fisiche native.

Le caratteristiche ottiche della proteina dipendono ovviamente dalla struttura del sito attivo che costituisce il cromoforo. Questo è formato da tre residui di amminoacidi in sequenza *Ser-Tyr-Gly* che sono soggetti ad una modifica post-traslazionale. Le modifiche post-traslazionali sono le modifiche alla struttura chimica di una proteina che avvengono dopo la sintesi della catena peptidica ad opera dei meccanismi biochimici presenti nel ribosoma. Tipiche modifiche post-traslazionali sono la glicosilazione di proteine, che aggiunge alla struttura terziaria un numero variabile di catene saccaridiche più o meno lunghe, come pure la eliminazione di alcune sequenze della catena proteica per arrivare alla struttura dell'enzima attivo, come avviene nel caso dell'insulina.

Nel caso della *GFP* i gruppi C=O ed N-H dei due legami peptidici che precedono e seguono il residuo della tirosina reagiscono per formare un ulteriore anello che poi viene deidratato e quindi forma un sistema aromatico di tipo imidazolidone che coniuga con l'anello aromatico della tirosina formando così il fluoroforo efficiente (Fig. 3). L'ultimo stadio della reazione, che ne costituisce anche lo stadio lento essendo necessarie alcune ore, richiede la presenza di ossigeno, ma, come già accennato, non servono altri co-fattori per far avvenire la modifica post-traslazionale ed il tutto dipende dalla sola struttura tridimensionale della proteina.

La presenza del residuo di glicina è indispensabile per la formazione del cromoforo, probabilmente per la sua caratteristica di avere una maggior libertà conformazionale attorno agli angoli che

ne definiscono la conformazione locale. Tuttavia, non va dedotto che sequenze *Ser-Tyr-Gly* possano comunque dar luogo alla formazione del cromoforo. Infatti, questa sequenza è presente in altre strutture proteiche, ma non dà luogo al gruppo fluoroforo neppure in presenza di alte concentrazioni di ossigeno. Sebbene, come è stato detto, la proteina goda di una notevole stabilità conformazionale, la formazione del cromoforo dipende dalla temperatura che per valori maggiori di 30°C ne rallenta di molto la formazione. In questo, molto probabilmente, hanno un ruolo determinante le condizioni ambientali in cui vive *Aequorea victoria* che sono le acque piuttosto fredde del Pacifico settentrionale.

È interessante notare che, come è noto agli spettroscopisti che si interessano di fluorescenza, sebbene l'ossigeno sia necessario per la formazione del sito attivo cromoforo, la sua presenza deve essere evitata all'atto del funzionamento del sito attivo poiché produce un notevole quenching collisionale di fluorescenza. La proteina naturale è in grado di assorbire radiazione con lunghezza d'onda di circa 400 nm e di riemetterla a 475 nm, appunto nel verde. Tuttavia, l'intensità del fenomeno dipende dal pH. La definizione della struttura terziaria della molecola ha anche permesso di capire perché le proteine mutate in specifici singoli residui di amminoacidi prodotte da *Roger Tsien* avessero diverse proprietà di trasferimento di energia producendo quindi colorazioni diverse dal verde. Infatti, oltre all'ovvio ruolo dei residui coinvolti nel sito attivo, i residui di treonina 203, glutammico 222 e isoleucina 167 sono in stretto contatto con il residuo di tirosina coinvolto nella formazione del cromoforo e costituiscono una gabbia dove sono presenti interazioni polari e non polari tra i gruppi chimici dei residui coinvolti. Le mutazioni apportate nella sequenza a livello dei residui in posizione 203, 222 e 167 portano sia ad una diverso intorno sterico del cromoforo che ad una variazione della distribuzione elettronica che ne modifica le proprietà ottiche di assorbimento ed emissione.

Sulla base di queste osservazioni i ricercatori del gruppo di *Tsien* si sono "divertiti" a progettare e sintetizzare diversi mutanti ed osservare le variazioni delle proprietà ottiche. Per esempio, la sostituzione della serina 65 con un residuo di treonina (la cui catena laterale ha un gruppo metile in più rispetto alla serina) porta ad un aumento dell'intensità di fluorescenza probabilmente perché il gruppo metile addizionale porta ad una maggiore protezione del sito in cui risiede il gruppo cromoforo nei riguardi di collisioni che producono quenching. La mutazione della tirosina in posizione

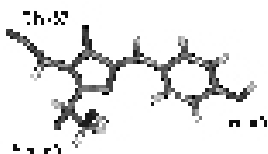


Figura 3: Struttura del gruppo fluoroforo della *GFP*.

66 con un residuo di istidina porta ad uno spostamento della lunghezza d'onda d'emissione nel blu. Ancora, la sostituzione del glutammico in posizione 222 con un residuo di glicina porta alla perdita della capacità di eccitazione del cromoforo alla lunghezza d'onda di circa 400 nm. Infine, la rimozione di una sequenza di 7 residui di amminoacidi dalla coda della catena proteica porta alla perdita totale della fluorescenza.

Dopo aver descritto, seppure sommariamente, le principali proprietà delle FP's vediamo le applicazioni che ne hanno fatto uno degli strumenti più interessanti per lo studio di processi biologici o per applicazioni biotecnologiche.

I genetisti hanno espresso proteine fluorescenti in batteri³, lievito⁴, funghi ameboidi⁵, piante^{6,7}, drososila⁸, pesce zebra⁹ e cellule di mammiferi^{10,11}. Il successo della tecnica dipende dal fatto che è possibile fondere la sequenza delle FP's mediante i terminali carbossilici o amminici di molte proteine, spesso senza distorcere in modo significativo la loro struttura terziaria. Naturalmente, questo risultato è ottenuto attraverso opportune manipolazioni genetiche¹². La grande compatibilità delle FP's con cellule viventi permette di utilizzarle come molecole-segnaletto per lo studio di molti processi biologici fra cui: la tracciabilità di linee cellulari, la definizione di espressione di specifici geni, lo studio delle interazioni proteina-proteina. Già questo breve elenco fa capire l'enorme potenzialità applicative di queste molecole.

Vale la pena di citare, infine, un paio di applicazioni che hanno suscitato notevole interesse. L'utilizzo di proteine fluorescenti, capaci di emettere diversi colori, in topi geneticamente modificati tali da esprimere queste proteine nelle cellule nervose ha permesso visualizzare una mappa del cervello dove era possibile seguire il percorso di singole fibre nervose all'interno dell'intricatissimo sistema neuronale attraverso la mappa creata dai diversi colori delle proteine utilizzate.

La seconda applicazione riguarda il campo delle biotecnologie. In questo caso, i ricercatori hanno espresso proteine fluorescenti in batteri resistenti ad agenti chimici pericolosi (in genere metalli pesanti) che divenivano capaci di dare fluorescenza in presenza di queste sostanze. Sono stati così costruiti biosensori sensibili e di facile utilizzo, soprattutto per il controllo delle acque.

Nel percorso di questo articolo siamo partiti da una curiosità biologica, come la luminescenza di una medusa del Pacifico, per arrivare a sofisti-

cate manipolazioni genetiche e biotecnologiche che permettono di studiare con più dettaglio processi cellulari complessi e quindi anche loro distorsioni che portano a patologie di diverso tipo. L'applicazione delle FP's ha una ricaduta importante anche in medicina. Tornando al parere espresso all'inizio di questo articolo, il premio Nobel è stato assegnato nell'ambito della Chimica, ma premia anche la estesa interdisciplinarietà degli studi condotti in questo campo.

Bibliografia

1. Tsien R. *The green fluorescent protein*. Annu Rev Biochem 1998;67:509-44. Sito: <http://www.tsienlab.ucsd.edu/Publications/Tsien%201998%20Ann%20u.%20Rev.%20Biochem%20-%20GFP.pdf>.
2. Yang F, Moss LG, Phillips GN. *The molecular structure of green fluorescent protein*. Nature Biotechnology 1996;14:1246-51.
3. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward W, Prasher D. *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science 1994;263:802-5.
4. Kahana J, Schapp B, Silver P. *Kinetics of spindle pole body separation in budding yeast*. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:9707-11.
5. Moores S, Sabry J, Spudich J. *Myosin dynamics in live Dictyostelium cells*. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:443-6.
6. Casper S, Holt C. *Expression of the green fluorescent protein-encoding gene from a tobacco mosaic virus-based vector*. Gene 1996;173:69-73.
7. Epel B, Padgett H, Heinlein M, Beachy R. *Plant virus movement protein dynamics probed with a GFP-protein fusion*. Gene 1996;173:75-9.
8. Wang S., Hazelrigg T. *Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in Drosophila oogenesis*. Nature 1994;369:400-3.
9. Amsterdam A, Lin S, Moss L, Hopkins N., *Requirements for green fluorescent protein detection in transgenic zebrafish embryos*. Gene 1996;173:99-103.
10. Ludin B, Doll T, Meill R, Kaech S, Matus A. *Application of novel vectors for GFP-tagging of proteins to study microtubule-associated proteins*. Gene 1996;173:107-11.
11. DeGiorgi F, Brini M, Bastianutto C, Marsault R, Montero M, Pizzo P, Rossi R, Rizzuto R. *Targeting aequorin and green fluorescent protein to intracellular organelles*. Gene 1996;173:113-7.
12. Cubitt A, Heim R, Adams S, Boyd A, Gross L, Tsien R. *Understanding, improving and using green fluorescent proteins*. TIBS 1995;20:448-55.
13. Mitra R, Silva C, Youvan D. *Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein*. Gene 1996;173:13-7.