



UBIQUITINAZIONE DI TAU CON METODI SEMI-SINTETICI

La Divisione di Chimica dei Sistemi Biologici della SCI e la Società Italfarmaco conferiscono il Premio “Gastone De Santis” a giovani ricercatori per ricerche rilevanti per la Chimica dei Sistemi Biologici. Tra i vincitori 2022 vi è Francesca Munari per lo sviluppo di approcci di chimica biologica rivolti allo studio dell’ubiquitinazione di Tau, una proteina chiave nella malattia di Alzheimer.

Tau è una proteina espressa principalmente nel sistema nervoso centrale che, legando e stabilizzando i microtubuli, contribuisce alla regolazione di funzioni neuronali fondamentali. Tau è intrinsecamente disordinata ma in condizioni patologiche può subire una transizione conformazionale a strutture amiloidi, ricche di foglietti- β , e formare filamenti che si accumulano nei neuroni in forma di grovigli neurofibrillari (NFT) [1]. Questi rappresentano la caratteristica istopatologica distintiva di una vasta classe di malattie neurodegenerative molto gravi e, ad oggi, incurabili chiamate taupatie. Tra le taupatie vi è anche la forma di demenza più diffusa al mondo, ovvero la malattia di Alzheimer. Lo studio chimico-strutturale del cambiamento conformazionale e dell’aggregazione della proteina Tau può quindi portare ad un avanzamento della comprensione dei meccanismi molecolari alla base delle taupatie e fornire nuove informazioni per la progettazione di farmaci più efficaci mirati al rallentamento del processo neurodegenerativo e al ripristino della funzionalità neuronale.

Molti residui amminoacidici nei filamenti patologici di Tau presentano modifiche chimiche (e.g. fosforilazione, acetilazione, glicosilazione) chiamate modifiche post-traduzionali (PTMs). Queste sono usate tipicamente dalle cellule per regolare particolari processi cellulari. Lo studio delle modifiche di Tau è rilevante per capire le basi molecolari della neurodegenerazione in quanto gruppi di PTMs ben definiti sono stati associati a specifici stadi clinici che caratterizzano la progressione e la gravità della malattia di Alzheimer. Oltre ad essere ampiamente fosforilata in residui di serina e treonina, la proteina Tau isolata da

filamenti patologici presenta diverse lisine modificate per ubiquitinazione, ovvero legate covalentemente a uno o più monomeri di proteina ubiquitina mediante legame isopeptidico [2]. La maggior parte delle lisine ubiquitinate si trova nella parte di proteina che lega i microtubuli e che è coinvolta nella formazione di filamenti amiloidi. Nelle cellule l’ubiquitinazione è controllata dall’azione coordinata di tre enzimi (E1, E2, E3) che catalizzano la formazione di un legame isopeptidico tra il gruppo carbossilico della glicina C-terminale dell’ubiquitina e il gruppo ϵ -ammino della lisina della proteina bersaglio. L’ubiquitinazione funge solitamente da segnale per direzionare un substrato proteico agli apparati di degradazione cellulare. Recenti studi basati sulla crio-microscopia elettronica hanno inoltre rivelato che l’ubiquitinazione dei filamenti di Tau potrebbe avere un ruolo strutturale nell’impaccamento dei filamenti [3]. In questo contesto, il lavoro di ricerca che ho svolto in questi ultimi anni in qualità di ricercatrice presso il gruppo di Chimica delle Macromolecole Biologiche dell’Università di Verona, ha avuto l’obiettivo di comprendere il ruolo dell’ubiquitinazione di Tau nel modulare il processo di formazione dei filamenti amiloidi.

Lo studio del meccanismo di aggregazione di Tau in funzione di diversi fattori, tra cui le modifiche chimiche, richiede l’utilizzo di campioni di proteina altamente controllati, omogenei e modificati in modo univoco. Dal momento che tali caratteristiche sono difficilmente ottenibili mediante l’utilizzo di enzimi, negli ultimi anni sono stati sviluppati metodi semi-sintetici basati sulla coniugazione chimica di precursori proteici. Per ottenere campioni di proteina Tau

A Francesca Munari è stato assegnato Premio DCSB-Italfarmaco “Gastone De Santis” 2022 dalla Divisione di Chimica dei Sistemi Biologici della SCI.

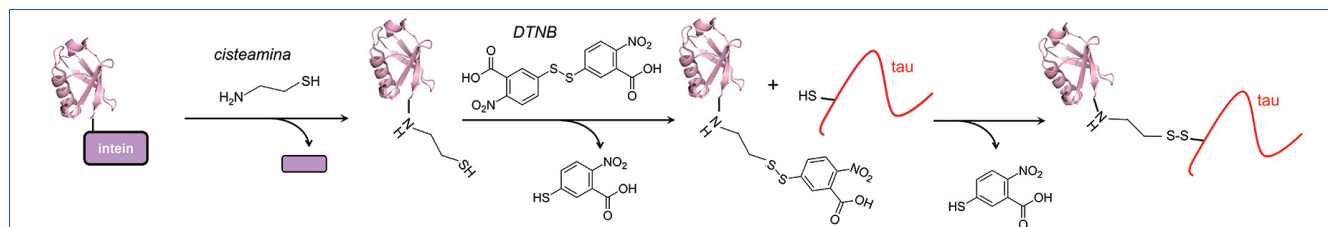
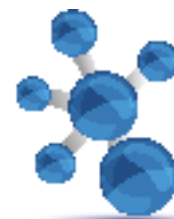


Fig. 1 - Schema di produzione di Tau ubiquitinata per via semi-sintetica. L'ubiquitina è rappresentata come modello strutturale in rosa, mentre l'intaina e Tau sono rappresentate schematicamente in viola e rosso

ubiquitinata in siti specifici, ho sviluppato un metodo semisintetico basato sulla formazione di un legame disolfuro tra un residuo di cisteina introdotto in una posizione specifica nella proteina bersaglio e l'amminoetantiolo C-terminale di un derivato dell'ubiquitina, in sostituzione del legame isopeptidico. Il procedimento è illustrato in Fig. 1. È stata, innanzitutto, prodotta una proteina ricombinante in cui l'ubiquitina è clonata all'N-terminale dell'intaina GyrA. La reazione tra inteina e cisteamina genera per trans(tio)-esterificazione e riarrangiamento acilico S-N un derivato di ubiquitina con un amminoetantiolo C-terminale (Ub-SH). Ub-SH viene fatta poi reagire con 2,2'-ditiobis(5-nitropyridine) (DTNP) oppure con acido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB), per dare un disolfuro asimmetrico attivato. Questo è quindi fatto reagire con un singolo residuo di cisteina, collocato in una specifica posizione sulla proteina Tau per mutagenesi, per ottenere i prodotti di Tau ubiquitinata. Mediante questo metodo semisintetico il gruppo di ricerca dell'Università di Verona ha quindi prodotto diversi regioisomeri di proteina ubiquitinata in modo selettivo nelle posizioni 254, 311 e 353, come specie rappresentative di Tau ubiquitinata trovate nei filamenti patologici *in vivo*. Sono state quindi studiate le proprietà di aggregazione dei tre campioni modificati mediante diverse tecniche biofisiche, tra cui saggi cinetici di fluorescenza, microscopia a forza atomica (AFM) e microscopia a trasmissione elettronica (TEM), per valutare l'impatto dell'ubiquitinazione nella formazione di filamenti di Tau. I risultati, pubblicati su *Angew. Chem. Int. Ed.* [4] e *Int. J. Mol. Sci.* [5], hanno dimostrato che l'ubiquitinazione ritarda la formazione e ostacola l'allungamento dei filamenti. La modifica nei tre siti ha effetti inibitori diversi sulla capacità di Tau di formare filamenti, e l'ubiquitinazione in posizione 311 ha l'effetto inibitorio più rilevante nell'aggregazione della proteina Tau. Studi futuri focalizzati sugli effetti sinergici di diverse modificazioni post-traduzionali, come l'ubiquitinazione, la fosforilazione e l'acetilazione, permetteranno di ottenere una comprensione molecolare dell'effetto

complessivo di modifiche chimiche sul processo di aggregazione patologica di Tau, con la finalità di progettare nuove strategie terapeutiche per limitare la progressione di malattie neurodegenerative molto diffuse nella popolazione.

Ringraziamenti

Francesca Munari ringrazia vivamente la Divisione di Chimica dei Sistemi Biologici della Società Chimica Italiana e la Società Italfarmaco SpA per il riconoscimento assegnato, ed il gruppo di Chimica delle Macromolecole Biologiche dell'Università degli Studi di Verona guidato da Michael Assfalg e Mariapina D'Onofrio, presso cui il lavoro è stato svolto. La ricerca è stata finanziata dall'Associazione Alzheimer (grant numero AARG-17-529221 a M. D'Onofrio), dall'Università di Verona, (Progetto Ricerca di Base 2015 a M. D'Onofrio), e dalla Fondazione Umberto Veronesi che ha assegnato una borsa di studio post-dottorato a F. Munari nel 2017.

BIBLIOGRAFIA

- [1] E.M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Trends Cell Biol.*, 1998, **8**, 425.
- [2] H. Wesseling *et al.*, *Cell*, 2020, **183**(6), 1699e13.
- [3] T. Arakhamia *et al.*, *Cell*, 2020, **180**(4), 633e12.
- [4] F. Munari *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2020, **59**, 6607.
- [5] F. Munari *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, **21**(12), 4400.

Ubiquitination of Tau by Semisynthesis

The Divisione di Chimica dei Sistemi Biologici of SCI and Società Italfarmaco confer the "Gastone De Santis" Award to young researchers for research activities relevant to the Chemistry of Biological Systems. Among the 2022 winners is Francesca Munari for the development of biological chemistry approaches aimed at studying the ubiquitination of Tau, a key protein in Alzheimer's disease.