UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia

ELABORATO DI LAUREA

IL RUOLO DELLA MITOFAGIA MEDIATA DA PINK1-PARKIN NELLA PATOGENESI DELLA MALATTIA DI PARKINSON: MECCANISMI MOLECOLARI E POSSIBILI TERAPIE

Tutor: Prof. Marco Bisaglia
Dipartimento di Biologia

Laureanda: Martina Albertin
Matricola: 2076373

ANNO ACCADEMICO 2024/2025

Abstract

Nelle cellule, quando il sistema di controllo qualità mitocondriale percepisce un danno o un mal funzionamento a livello mitocondriale, si attivano diversi processi dinamici con lo scopo di minimizzare il danno, tra cui la mitofagia, che porta gli organelli danneggiati a degradazione. Questo processo vede come principali effettrici due proteine: la chinasi PINK1 e Parkin, con attività di E3 ubiquitina ligasi, codificate rispettivamente dai geni *PINK1* e *PRKN*, per i quali è ormai noto da decenni che una mutazione può portare allo sviluppo della forma precoce del Parkinson. Una disfunzione a livello delle due proteine blocca infatti la mitofagia e causa un accumulo di mitocondri disfunzionali che interferiscono sulle attività cellulari, promuovendo degenerazione dei neuroni dopaminergici a livello della sostanza nera. Tuttavia, la maggior parte delle informazioni molecolari sul funzionamento delle due proteine sono state ottenute da esperimenti condotti in vitro. È importante quindi verificare che questo processo avvenga anche *in vivo*, e, in particolare, che sia esportabile anche nel contesto degli esseri umani. Infatti, comprendere nella sua completezza il processo e poter esportare i risultati all'organismo umano, permetterebbe di avanzare nella ricerca di nuove terapie, sempre più specifiche per i pazienti che soffrono di questa particolare forma di Parkinson.

Indice

1 **Introduzione** 4
1.1 Il ruolo dei mitocondri nella malattia di Parkinson..... 5
2 **PINK1-PRKN nel mitocondrio** 8
2.1 PINK1-PRKN in condizione mitocondriale fisiologica..... 8
2.2 PINK1-PRKN in condizione mitocondriale alterata……..9
3 **I differenti risultati tra gli studi *in vitro* e *in vivo*** 14
3.1 Gli studi *in vitro* 14
3.2 Gli studi *in vivo* 15
4 **DJ-1: essenziale mediatore a valle della mitofagia**..... 19
4.1 Un primo sguardo a DJ-1 nelle cellule umane 19
4.2 Mutanti DJ-1 falliscono nel reclutamento dell'optineurina…… 20
5 **Prospettive terapeutiche** 22
5.1 Stabilizzatori di PINK1 22
5.2 Attivatori della mitofagia 24
6 **Conclusioni** 25
Bibliografia 26

1 Introduzione

Il Parkinson è una malattia neurodegenerativa che colpisce principalmente persone in età avanzata e i cui principali sintomi sono soprattutto motori. Questi ultimi sono, solitamente, preceduti da sintomi non motori prodromici, tra cui disturbi del sonno e dell'apparato digerente, i quali sono spesso significativi per l'elaborazione di una diagnosi clinica. La malattia presenta una lenta progressione, in cui si manifestano principalmente bradicinesia, ovvero la lentezza nel compiere un certo movimento, che inizialmente si presenta in modo asimmetrico sul corpo per poi colpire la sua interezza, oltre a rigidità e tremore. Tali deficit sembrano essere la conseguenza di una perdita dei neuroni dopaminergici, insieme alla formazione di aggregati proteici di α-sinucleina (Morris et al., 2024), chiamati corpi di Lewy, che si depositano a livello della sostanza nera comportando danno neuronale. Alcuni studi hanno rilevato la presenza di questi aggregati proteici anche a livello del sistema nervoso autonomo periferico, come anche a livello intestinale (figura 1), portando allo sviluppo dell'ipotesi secondo la quale la patologia di Parkinson non cominci immediatamente dalla sostanza nera, ma che abbia una fase antecedente che potrebbe anche spiegare i sintomi non motori prodromici di questo disturbo.[1]

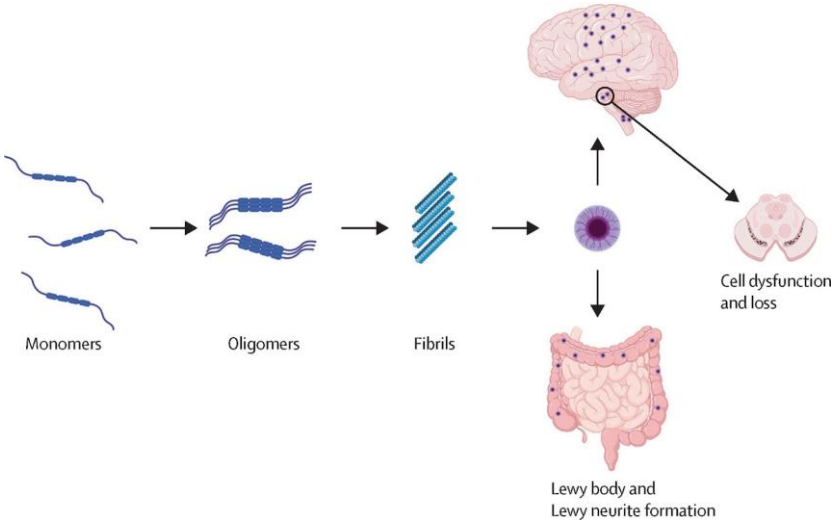

Figura 1: La proteina α-sinucleina aggrega formando oligomeri e fibrille che si accumulano nei corpi di Lewy. Quest'ultimi sono stati trovati nell'intestino, nel tronco encefalico e nella corteccia cerebrale" (Morris et al., 2024)

La malattia di Parkinson è eterogenea, in quanto le cause che portano alla comparsa di tale disturbo sono molteplici, sia per quanto riguarda i motivi genetici che anche per quelli ambientali. Un'elevata esposizione a certi agenti chimici, pesticidi come il rotenone ed il paraquat sono stati spesso associati a un maggior rischio di sviluppare il Parkinson e tale possibilità aumenta con l'aumentare del tempo di esposizione a quei composti. Inoltre, il fumo di sigaretta e la caffeina sembrano proteggere dall'insorgenza della malattia, benché possano portare ad altri tipi di complicazioni.

Ad oggi, varianti patogene a penetranza variabile sono state identificate in diversi geni che risultano essere determinanti principali o forti fattori di rischio per le forme ereditarie di parkinsonismo e PD tra cui *SNCA, PINK1, PRKN, DJ-1, LRRK2, VPS35, VPS13C, FBXO7, PLA2G6, SYNJ1, ATP13A2, RAB39B e GBA.* [2] L'esordio del Parkinson ha, dunque, una certa correlazione con fattori genetici e, grazie all'identificazione delle mutazioni che possono avvenire in questi geni ed allo studio delle funzioni esercitate dalle proteine codificate da tali geni, è stato possibile avanzare nelle conoscenze dei diversi processi coinvolti nell'alterazione dell'omeostasi dei neuroni dopaminergici, tra cui difetti nelle proteine delle vescicole sinaptiche e l'alterazione del controllo qualità mitocondriale.

1.1 Il ruolo dei mitocondri nella malattia di Parkinson

I mitocondri hanno un'importanza rilevante nella patogenesi del Parkinson. Essi sono organelli che provvedono a produrre l'energia necessaria alle attività cellulari, che nei neuroni dopaminergici sono altamente dispendiose e richiedono un gran numero di mitocondri e il loro corretto funzionamento. Questo organello, difatti, è conosciuto comunemente per il suo ruolo nella produzione di adenosina trifosfato (ATP), è dotato di due membrane, una esterna e una interna e di un suo DNA (DNA mitocondriale, mtDNA). Al suo interno si svolge la fosforilazione ossidativa, un processo che coinvolge diverse proteine e che, oltre alla sintesi di ATP, comporta un'alta produzione di specie reattive dell'ossigeno (*reactive oxygen species,* ROS), tenuta sotto controllo da specifici enzimi, come le superossido dismutasi (SOD) e

dal processo di controllo qualità mitocondriale. Nonostante esso sia dotato del suo mtDNA, non è in grado di sintetizzare autonomamente la totalità delle proteine che necessita, ma deve dunque affidarsi anche al DNA nucleare della cellula che gli procura, tramite i processi di trascrizione e traduzione, i precursori delle proteine che devono successivamente essere portate al suo interno e di conseguenza poi assemblate. Dunque, per mantenere il mitocondrio sano, è necessario che tutti questi processi siano altamente regolati e controllati principalmente dal controllo qualità mitocondriale. Consistenti evidenze epidemiologiche sottolineano la fragilità dei mitocondri verso specifiche tossine, come pesticidi o la neurotossina MPTP che portano alla comparsa di sintomi parkinsoniani. Infatti, esse sembrano recare danno in particolare ai neuroni della sostanza nera, area maggiormente colpita nel Parkinson, tramite l'inibizione del complesso I della catena respiratoria, comportando una grave interferenza alle funzioni del mitocondrio. In questo modo si va a compromettere l'intero processo di fosforilazione ossidativa, con il risultato di bassi livelli di produzione di ATP e dunque minore energia per le attività delle cellule, con il risultato di una loro vulnerabilità che le porta, di conseguenza, alla degenerazione. Un'alterazione della loro struttura o dinamica sono, di fatto, connesse a un aumento della produzione di ROS, anormali livelli di calcio intracellulare e una ridotta produzione di ATP (figura 2). [1]

Due geni associati a forme familiari di Parkinson, che sembrano essere coinvolti nell'importante processo di controllo qualità mitocondriale, sono *PINK1* e *PRKN*. PTEN-induced kinase 1 (PINK1) è una proteina "sensore" che percepisce eventuali malfunzionamenti del mitocondrio. In condizioni fisiologiche si trova a basse concentrazioni in quanto, una volta importata nella membrana mitocondriale interna, se non percepisce alcuna alterazione, viene immediatamente proteolizzata. Al contrario in caso di alterazioni funzionali dell'organello, viene trasferita sulla membrana esterna mitocondriale (*outer mitochondrial membrane*, OMM) dove promuove il processo di mitofagia, che vede il coinvolgimento della proteina effettrice Parkin che porta alla completa degradazione del mitocondrio. Non appena percepita l'alterazione, PINK1 procede a fosforilare le proteine ubiquitinate e Parkin sulla OMM. Questo porta Parkin a cambiare conformazione, da una autoinibitoria ad una attiva, con la conseguente ubiquitinazione da parte sua delle

restanti proteine limitrofe a PINK1. Le proteine ubiquitinate sono successivamente intercettate da recettori dell'autofagia, promuovendo la cattura del mitocondrio in un autofagosoma e la sua degradazione in seguito a fusione con un lisosoma. Alterazioni a livello della funzionalità di queste due proteine comportano malfunzionamenti del controllo qualità mitocondriale che può quindi risultare nella degenerazione neuronale. [3]

Comprendere meglio questo processo e la sua importanza nei neuroni dopaminergici della sostanza nera è quindi di fondamentale rilevanza per permettere una migliore diagnosi e lo sviluppo di nuove terapie per la malattia di Parkinson.

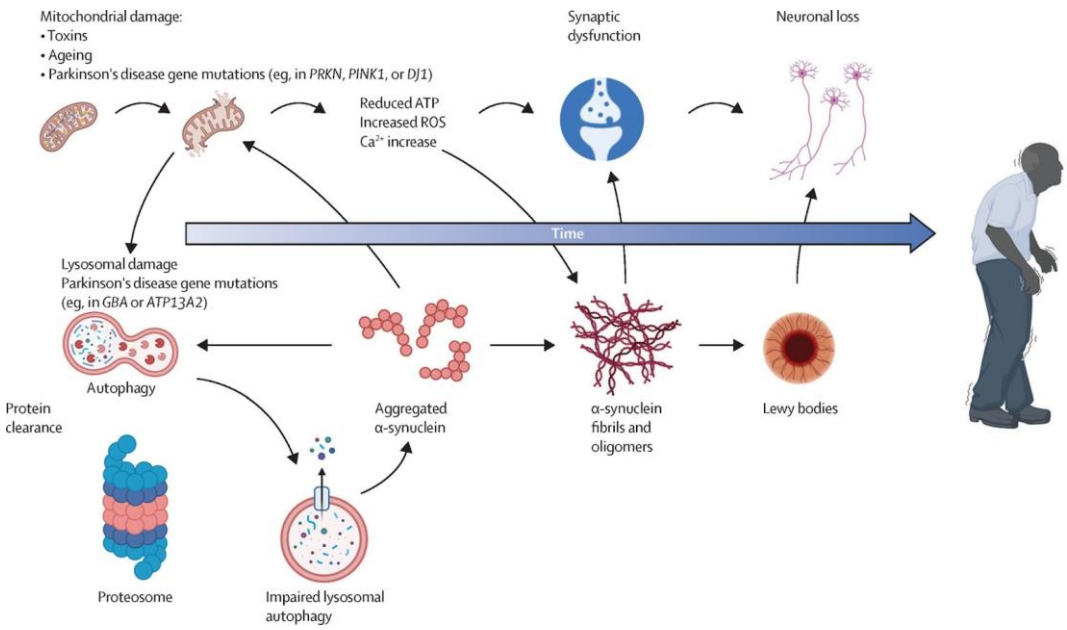

Figura 2: Meccanismi molecolari che contribuiscono alla malattia di Parkinson. (Morris et al., 2024)

2 PINK1-Parkin nei mitocondri

Il gene *PRKN* è stato identificato nel 1998 all'origine di *early-onset Parkinson's disease* (EOPD), ovvero casi di Parkinson ad esordio precoce. Il gene *PRKN*, che codifica per la proteina Parkin, è di notevoli dimensioni (1.4 megabase) e si trova in una regione cromosomica instabile, il che lo rende incline a mutazioni. È infatti coinvolto in forme autosomiche recessive della malattia di Parkinson e quindi per il manifestarsi dei casi EOPD, è necessaria una doppia mutazione con perdita totale di funzione.

Nel 2004, è stata successivamente scoperta una mutazione bi-allelica del gene *PINK1* in pazienti EOPD che presentavano un fenotipo simile ad altri pazienti con mutazioni in *PRKN*. La proteina codificata da questo gene risiede principalmente a livello mitocondriale, sottolineando il legame tra questo organello e la patogenesi del Parkinson. Studi aggiuntivi hanno successivamente dimostrato come mutanti di *Drosophila* per entrambi i geni *PINK1* e *PRKN*, presentassero gli stessi sintomi dei singoli mutanti, suggerendo dunque, il coinvolgimento dei due geni nello stesso *pathway*. Inoltre, mentre aumentati livelli di espressione di Parkin possono in parte sopperire alla mancanza di PINK1, l'aumento di quest'ultima non produce una simile compensazione per la perdita di Parkin, suggerendo che PINK1 possieda un ruolo a monte di Parkin. [3]

2.1 PINK1-Parkin in condizione fisiologiche

PINK1 e Parkin sono due proteine che possiedono una certa importanza nel processo di controllo qualità mitocondriale e mitofagia, fondamentale per questo organello. In condizioni fisiologiche, la proteina Parkin si trova localizzata nel citosol, mentre PINK1 svolge il suo ruolo come sensore del danno mitocondriale. PINK1 ha un'emivita breve. Una volta sintetizzato, il suo precursore viene diretto verso la membrana esterna mitocondriale, dove grazie all'azione della traslocasi della membrana esterna TOM (*translocase outer membrane*, TOM) prima, e della traslocasi TIM (*translocase inner membrane,* TIM) poi, si trasferisce nella membrana interna. Qui il precursore di PINK1 viene tagliato dalla proteasi PARL

nel suo dominio transmembrana permettendone la “liberazione” nel citosol (Narendra and Youle, 2024). La regione N-terminale che presenta una fenilalanina viene riconosciuta dall’E3 ubiquitina ligasi che procede a ubiquitinare e marchiare PINK1 per la successiva degradazione nel proteasoma (figura 3a). Questo processo spiega la breve durata di PINK1 in mitocondri sani, che in alcune cellule è stata stimata essere circa ventisette minuti. [3]

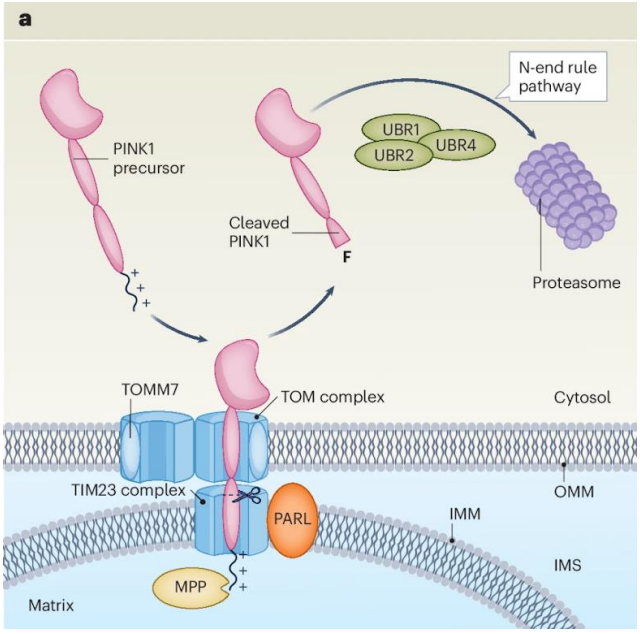

Figura 3a: Mitocondri sani. PINK1 viene importato nei mitocondri sani, dove viene scissa da PARL per essere rilasciata nel citosol. Una fenilalanina presente nella regione N-terminale è riconosciuta dalle ubiquitina ligasi UBR1, UBR2 e UBR4, che ubiquitinano PINK1 per la degradazione da parte del proteasoma. Questo meccanismo mantiene PINK1 a livelli molto bassi nei mitocondri sani. (Narendra and Youle, 2024, modificato)

2.2 PINK1-Parkin in condizioni patologiche

Quando le attività del mitocondrio subiscono delle alterazioni, come l’inibizione di uno dei complessi della catena respiratoria con il conseguente blocco della sintesi di ATP o un problema nell’importo delle proteine, si genera la depolarizzazione della membrana che viene percepita dal sistema di controllo qualità. Infatti, il potenziale di membrana presente sul mitocondrio è di forte rilevanza nei processi

di importo, e quando questo viene meno, il “sensore” PINK1 lo rileva e si accumula sulla membrana esterna dando inizio alla mitofagia [1].

A differenza delle condizioni fisiologiche, in presenza di alterazioni mitocondriali PINK1 aumenta la sua emivita ad ore, stabilizzandosi sull’OMM, dove forma un complesso con la traslocasi TOM, In questo stato, PINK1 espone il dominio C-terminale nel citosol, mentre il suo dominio N-terminale è introdotto nel poro del complesso TOM e prende contatto con la traslocasi TIM (Narendra and Youle, 2024). Verosimilmente, la sequenza target mitocondriale (*mitochondrial targeting sequence,* MTS) carica positivamente della regione N-terminale di PINK1 potrebbe prendere contatto con il sito di iniziazione della traslocazione (*translocation initiation site,* TIS) a carattere acido, nello spazio intermembrana di TIM (Narendra and Youle, 2024). In questo modo, anche in assenza di potenziale di membrana mitocondriale PINK1 potrebbe legarsi a TIS, senza però arrivare alla matrice a causa dell’assenza di un potenziale di membrana negativo. Si ritiene che questo sia il meccanismo attraverso il quale PINK1 riesca a percepire se la membrana interna mitocondriale presenta un adeguato potenziale di membrana per la sintesi di ATP, e quindi rilevare un’eventuale irregolarità nell’attività dell’organello. In quest’ultima condizione PINK1, associata al complesso TOM, può dimerizzare permettendo l’autofosforilazione in trans sul suo residuo di serina 228 necessario per la sua attivazione. Poiché però il rapporto della concentrazione tra PINK1 e TOM è stimato essere 3:10.000, ci vorrà un certo tempo prima che una seconda proteina PINK1 raggiunga il complesso TOM e dimerizzi con quella già presente, attivandosi a vicenda (figura 3b). Questo spiega il motivo per cui l’attivazione di Parkin ha un ritardo approssimativo di 30 minuti e rende possibile una reversione del processo. Infatti, si pensa che lo spazio temporale tra l’associazione di una prima proteina PINK1 e l’interazione con una seconda e la successiva attivazione di Parkin mediante fosforilazione, dia la possibilità al mitocondrio di ripristinare la fosforilazione ossidativa e dunque il potenziale di membrana, prima di essere indirizzato verso la degradazione [3].

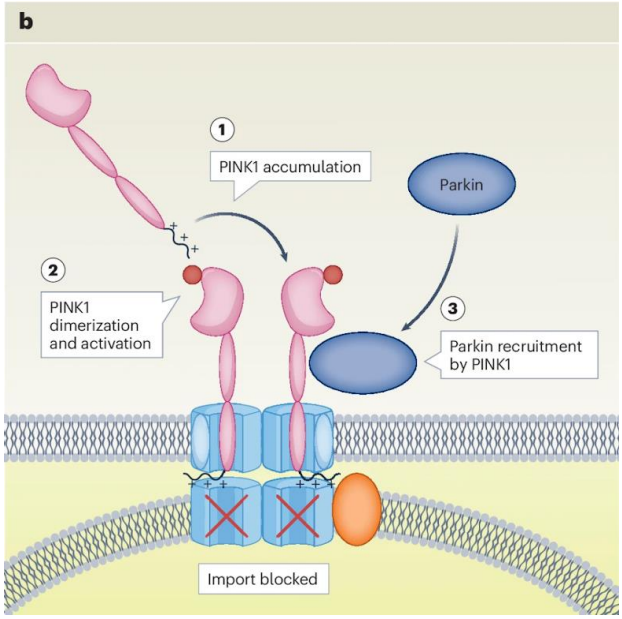

Figura 3b: Mitocondri danneggiati. In caso di danno mitocondriale, l'importazione di PINK1 nella membrana mitocondriale interna dove risiede PARL viene bloccata e PINK1 si accumula come dimero legato al supercomplesso TOM-TIM23. La dimerizzazione porta all'attivazione di PINK1 attraverso la trans-autofosforilazione, che richiede la piccola proteina TOMM7. PINK1 si accumula quindi sull'OMM, dove recluta Parkin specificamente per i mitocondri danneggiati, risparmiando i mitocondri sani adiacenti. (Narendra and Youle, 2024, modificato)

La presenza di PINK1 nell'OMM permette il reclutamento di Parkin, che prima di essere attivata si trova in una conformazione autoinibitoria nel citosol. Innanzitutto, perché Parkin venga richiamata a livello del mitocondrio, PINK1 fosforila una molecola di ubiquitina sul residuo di serina 65 (pS65-ubiquitina), a livello delle proteine dell'OMM. La presenza di pS65-ubiquitina sulle proteine dell'OMM è necessaria per la traslocazione di Parkin al mitocondrio. Qui avviene un cambio conformazionale che libera il dominio UBL di Parkin e, con la conseguente fosforilazione della sua serina da parte di PINK1, avvengono un'altra serie di riarrangiamenti di Parkin che ne comportano l'attivazione, esponendo sia il sito di legame per l'enzima E2 che il suo sito attivo. Quest'ultimo è quindi in grado di ricevere ubiquitina dall'enzima E2 e di trasferirla sulle proteine dell'OMM (figura 4) [3].

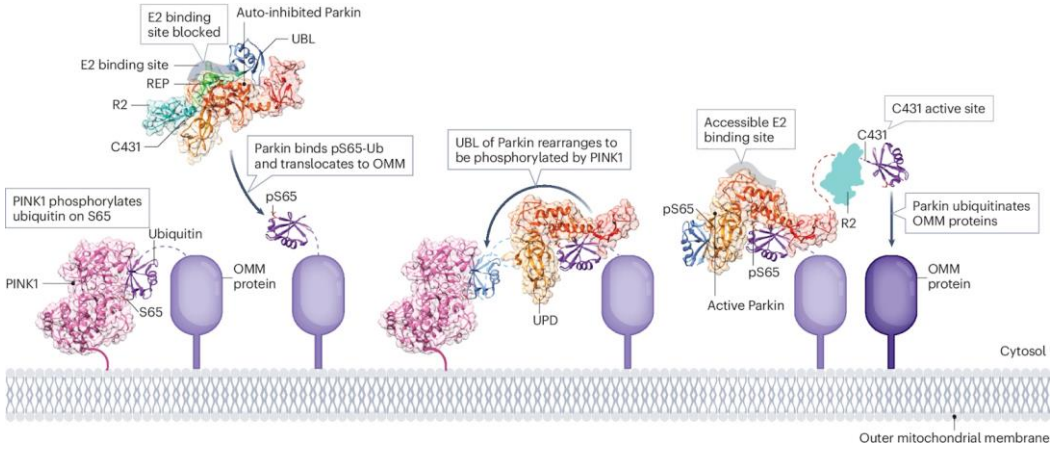

Figura 4: Le basi strutturali della fosforilazione mediata da PINK1 dell'ubiquitina e dell'attivazione di Parkin da parte della fosfo-ubiquitina. (Narendra and Youle, 2024)

In seguito all'ubiquitinazione da parte di Parkin, le proteine dell'OMM diventano marcatori per segnalare il mitocondrio alterato e procedere con la sua degradazione. Difatti, la presenza di poliubiquitina sulla membrana esterna del mitocondrio richiama proteine adattatrici dell'autofagia che legano l'ubiquitina, tra le quali, quella probabilmente più di rilievo nei neuroni è l'optineurina, OPTN. Oltre ad avere il dominio legante l'ubiquitina, tutti gli adattatori dell'autofagia possiedono una regione interagente con la proteina LC3 (*LC3-interacting region,* LIR) presente sulla superficie degli autofagosomi. In questo modo avviene il reclutamento dell'autofagosoma attorno al mitocondrio alterato, il quale una volta inglobato, è direzionato verso il lisosoma per essere degradato (figura 5) [3].

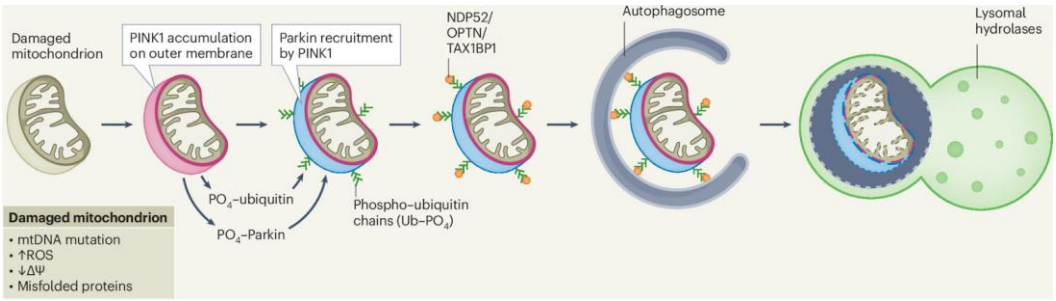

Figura 5: mitofagia mediata da PINK1–Parkin (Narendra and Youle, 2024)

Concludendo, la corretta comunicazione tra il controllo qualità mitocondriale e la mitofagia è di rilevante importanza per mantenere la popolazione mitocondriale sana e quindi anche l'integrità cellulare. Anomalie in tali processi possono essere collegate a diverse malattie dell'invecchiamento, tra le quali anche il Parkinson [4].

3 I differenti risultati tra gli studi *in vitro* e *in vivo*

Gli studi riguardo il funzionamento delle proteine PINK1 e Parkin e del loro coinvolgimento nella patogenesi della malattia di Parkinson sono principalmente esperimenti condotti *in vitro*. Questo ha portato all'insorgenza di alcuni dubbi riguardo ai risultati ottenuti, in quanto negli esperimenti l'espressione di PINK1 era esogena e l'alterazione mitocondriale era dovuta a tossine. Esperimenti condotti *in vitro* differiscono infatti da quelli *in vivo* per diversi motivi, tra cui l'impossibilità di ricreare in laboratorio le esatte condizioni in cui le cellule sono inserite normalmente in un organismo. Inoltre, anche gli studi svolti su modelli animali presentano limitazioni, in quanto è altamente improbabile che gli organismi modello su cui si basano i ricercatori abbiano le stesse caratteristiche del corpo umano. Quanto detto finora rende complicato lo studio del *pathway* di PINK1-Parkin in relazione al Parkinson. Tuttavia, pur con i suddetti limiti, si sono comunque ottenuti importanti risultati che hanno offerto una visione generale del processo.

3.1 Gli studi *in vitro*

Innanzitutto, è doveroso spiegare cosa s'intende per esperimenti condotti *in vitro*. Essi sono basati sull'utilizzo in laboratorio di cellule coltivate in provetta o su una piastra di coltura. Sono solitamente cellule immortalizzate, ovvero geneticamente modificate per dividersi un numero illimitato di volte. Il loro utilizzo comporta una serie di vantaggi, come lo studio isolato di processi biologico-molecolari insieme alla possibilità di effettuare esperimenti in maniera controllata e a basso costo. D'altro canto, le cellule immortalizzate possono presentare proprietà diverse da quelle normali, rendendo difficile generalizzare i risultati ottenuti.

Numerosi studi *in vitro* riguardo il *pathway* di PINK1-Parkin e la mitofagia confermano i ruoli delle due proteine descritti sopra e la loro attività sinergica. Ulteriori esperimenti hanno coinvolto l'uso di tossine mitocondriali, come il cianuro di carbonile m-clorofenil idrazone (CCCP), l'antimicina A e il rotenone (R Han et al., 2023) su fibroblasti embrionali di topo, con il risultato di un accumulo

di PINK1 sull'OMM e la conseguente attività di Parkin fino alla degradazione del mitocondrio. Tutto ciò sembra dimostrare in modo significativo l'importanza del *pathway* di PINK1-Parkin per i mitocondri. Sono state sottoposte a tossine mitocondriale anche cellule neuronali corticali coltivate di topo, sovraesprimenti Parkin. Tali studi hanno evidenziato come il processo di mitofagia dipendente da PINK1-Parkin potrebbe essere molto più lento nei neuroni rispetto a cellule non neuronali, in quanto Parkin viene reclutato sull'OMM depolarizzata dopo circa dodici ore. Inoltre, è da considerare che esistono diverse tipologie di neuroni sottoposti a differenti ambienti intracellulari e stress mitocondriali, che rendono ancora più difficile lo studio e la generalizzazione dei risultati. Verosimilmente, questa variabilità implica che nei neuroni ci siano più meccanismi che regolano la mitofagia. Inoltre, è da considerare che i neuroni dipendono fortemente dai mitocondri per la produzione di energia e che quindi un loro malfunzionamento possa compromettere la salute del neurone stesso. Al contrario, nelle cellule immortalizzate usate in laboratorio, il metabolismo energetico dipende quasi esclusivamente dalla glicolisi, e che quindi non sono necessariamente influenzate da una perdita mitocondriale. [5]

3.2 Gli studi *in vivo*

Per studi *in vivo* s'intendono gli esperimenti condotti su organismi vivi, sia piante che animali. Permettono di apprendere i processi biologici all'interno della complessità dell'organismo e di studiare le diverse interazioni che hanno anche con i tessuti o cellule in cui sono svolti. Rimane sempre vero, che gli organismi modello usati in laboratorio difficilmente rispecchiano la biologia umana. Inoltre, questa tipologia di esperimenti è altamente costosa.

Drosophila

Nel 2003, uno studio condotto sull'organismo modello *Drosophila*, comunemente detto moscerino della frutta, ha rivelato per la prima volta *in vivo* il coinvolgimento di PINK1 e Parkin nella regolazione del controllo qualità mitocondriale e mitofagia

tramite mutanti *knock-out* per *PRKN*. Essi presentavano problemi nella locomozione, degenerazione muscolare e disfunzione mitocondriale. La domanda che molti ricercatori si posero di conseguenza è se la mitofagia mediata da PINK1-Parkin intervenisse in situazioni di stress fisiologico, ordinario, quindi con una mitofagia basale, o solo in condizioni di stress eccessivo, patologico [3]. Studi recenti hanno dimostrato tramite l'uso di sonde fluorescenti proteiche (mito-QC) in *Drosophila* che, nonostante la perdita di PINK1, la mitofagia basale non subisce variazioni. Tuttavia, in seguito all'esposizione del moscerino a composti tossici per i mitocondri, la presenza di PINK1 risulta necessaria per l'induzione della mitofagia [5]. Oltre ad aver osservato mitofagia in cellule muscolari e in neuroni dopaminergici senza la stimolazione tramite tossine esogene, altri ricercatori hanno dimostrato, sempre in Drosophila, come essa aumenti con l'età e di come questa relazione con l'invecchiamento si perda in mancanza di PINK1 e Parkin [6]. Quanto detto è di rilevante importanza, considerando che il maggior rischio dell'esordio del Parkinson è proprio l'invecchiamento [3].

Topo

Nella ricerca *in vivo* per la mitofagia dipendente da PINK1-Parkin, nonostante gli innumerevoli studi, il topo non ha dato risultati capaci di replicare la neurodegenerazione osservata nel Parkinson. Nonostante il *knockout* per i geni *PINK1* e *PRKN*, i modelli murini non hanno dimostrano alcuna perdita neuronale, contrariamente ai risultati ottenuti con *Drosophila* e lasciando ipotizzare che la mitofagia mediata da PINK1-Parkin vari tra le diverse specie e/o che siano presenti meccanismi compensatori nelle specie più evolute [5]. Ulteriori studi hanno sottoposto i topi al sistema Cre-loxP mediato da AAV (un mediatore virale, virus adeno-associato), ovvero una tecnica che permette la modifica del DNA in modo mirato per indurre il *knockout* genico di *PRKN*, dando come risultato una degenerazione dei neuroni dopaminergici nei topi anziani. Tuttavia, uno studio più recente ha dimostrato che la tecnica molecolare sopracitata comporti di per sé un certo danno neuronale e che quindi i risultati ottenuti dall'esperimento precedente potrebbero non essere dovuti esclusivamente all'assenza del gene *PRKN*, ma più probabilmente da un eccessivo stress causato dalla tecnica usata. Considerando la

totalità dei risultati ottenuti finora, i ricercatori sono stati motivati ad ampliare la ricerca su animali evolutivamente più vicini agli esseri umani [5].

Scimmia

L'utilizzo di primati non-umani ha consentito di effettuare esperimenti su modelli sempre più vicini all'uomo. Oltre ai diversi processi molecolari che distinguono gli organismi modello precedentemente menzionati dall'individuo umano, anche la dimensione del cervello potrebbe risultare importante. Il soma di un neurone dopaminergico umano presenta infatti una vasta arborizzazione assonale lunga oltre 4 m, molto più grande di quella dei lunghi motoneuroni, e 1-3 milioni di mitocondri per cellula, come ci riferiscono Narendra e Youle (2024). Tali dimensioni sono quindi incomparabili con quelle di un neurone dopaminergico di un topo, rendendo difficile quindi, l'estensione dei dati al corpo umano [3].

Recenti studi hanno sfruttato il sistema CRISPR-Cas9, una tecnica di modifica di precisione del DNA, su delle scimmie, prendendo come target *PINK1*, provocandone una quasi completa eliminazione, con lo scopo di creare con esse un modello della malattia di Parkinson (Han et al, 2023). La prole appena nata ha evidenziato un grave danno neuronale o è morta nei brevi istanti successivi alla nascita, provando il ruolo necessario di PINK1 per la sopravvivenza dei neuroni cerebrali delle scimmie in via di sviluppo. Neurodegenerazione e deficit motori sono stati riscontrati anche in scimmie adulte in cui è stato interrotto *PINK1* usando il sistema CRISPR-Cas9 mediato da AAV. È importante considerare però che non sono presenti casi nell'uomo della delezione omozigote di un'ampia regione di *PINK1* (Han et al, 2023), poiché letale già a livello embrionale per la specie umana. Interessante è il fatto che, nonostante le conseguenze che comporti la mancanza di PINK1 a livello neuronale, non si sono riscontrate alterazioni nell'espressione proteica mitocondriale nel cervello delle scimmie mutate rispetto ad individui di controllo. Ciò ha portato ad ipotizzare che PINK1 si localizzi nel citoplasma delle cellule dell'encefalo dei primati e che sia coinvolta nei processi di fosforilazione di proteine che hanno un certo rilievo nella sopravvivenza neuronale. La sua assenza, dunque, comporterebbe neurodegenerazione senza tuttavia coinvolgere l'omeostasi mitocondriale [5].

Considerando il quadro dei risultati ottenuti, è verosimile immaginare che la mitofagia presenti diverse sfumature nell'organismo umano stesso e tra diverse specie e che quindi PINK1 e Parkin possano non essere le uniche proteine coinvolte in questo processo così complesso.

4 DJ-1: essenziale mediatore a valle della mitofagia.

Il gene *PARK7*, coinvolto nella forma autosomica recessiva del Parkinson, codifica per la proteina DJ-1. Il suo ruolo è rimasto a lungo sconosciuto e ad oggi gli si attribuiscono diverse funzioni, tra cui il controllo dell'autofagia e dell'omeostasi mitocondriale [7].

L'insorgenza di diversi dubbi riguardo il coinvolgimento esclusivo di PINK1 e Parkin nella mitofagia, ha spinto diversi ricercatori ad approfondire lo studio su un probabile ruolo di una terza proteina. Uno studio recente ha dimostrato come la proteina DJ-1 sia di rilevante importanza nello stesso processo che vede coinvolte anche PINK1 e Parkin. DJ-1 però sembra intervenire successivamente a PINK1 e Parkin, ovvero nel reclutamento dell'autofagosoma tramite il recettore dell'autofagia optineurina. Infatti, in una mutazione con perdita di funzione di DJ-1, la mitofagia si blocca solo quando fallisce il reclutamento dell'optineurina sul mitocondrio danneggiato [7].

4.1 Un primo sguardo a DJ-1 nelle cellule umane

Per studiare l'importanza della proteina DJ-1 nella mitofagia e nella patogenesi del Parkinson, uno studio ha condotto una serie di esperimenti su fibroblasti prelevati da pazienti malati di Parkinson e da coetanei sani, usati come controlli. Più nel dettaglio, i pazienti erano affetti da forme familiari della malattia che coinvolgevano i geni *PARK7, PRKN* e *PINK1* mentre i corrispettivi controlli sono stati definiti "sani" in seguito a un esame clinico neurologico.

Innanzitutto, i ricercatori hanno misurato la quantità della proteina DJ-1 nei fibroblasti di pazienti con *PARK7* mutato confrontandola con quella dei controlli. I risultati hanno mostrato che la presenza di DJ-1 nelle cellule dei pazienti malati è nettamente inferiore alla quantità misurata nei controlli, con una percentuale che si aggira al 3.8% rispetto al primo controllo femmina di quarant'anni e al 4.5%

rispetto al secondo controllo maschio di ventotto anni. L'esperimento è proseguito con l'esposizione dei fibroblasti alla valinomicina, un disaccoppiante mitocondriale noto per indurre la mitofagia dipendente da PINK1-Parkin. I dati ottenuti hanno indicato che i fibroblasti dei controlli presentavano livelli consoni di mitofagia indotta da valinomicina, al contrario delle cellule mutanti *PARK7*, i cui livelli di mitofagia, invece, erano notevolmente soppressi, ottenendo un risultato simile a quello ottenuto con fibroblasti mutanti per *PRKN* e *PINK1*. I dati hanno dunque evidenziato la necessaria presenza di DJ-1 per lo svolgersi della mitofagia indotta da valinomicina.

Gli esperimenti sono quindi stati ripetuti su neuroni ottenuti dai fibroblasti degli stessi individui degli esperimenti precedentemente descritti. Le cellule sono state sottoposte a dedifferenziazione tramite i fattori di trascrizione di Yamanaka ottenendo quindi cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) e successivamente riprogrammate a neuroni, in particolare neuroni dopaminergici. Per quanto riguarda la quantità della proteina DJ-1 in queste cellule, i risultati ottenuti non si sono discostati significativamente da quelli ottenuti dai fibroblasti. Anche in questo caso, la mitofagia è stata indotta depolarizzando la membrana mitocondriale tramite diverse sostanze, tra cui nuovamente la valinomicina. Nei neuroni dei controlli, sono stati osservati alti livelli di mitofagia, mentre nelle cellule mutanti *PRKN* e *PARK7* il processo è risultato soppresso, dimostrando che DJ-1 è indispensabile per la mitofagia dipendente da PINK1-Parkin anche nelle cellule neuronali [7].

4.2 Mutanti DJ-1 falliscono nel reclutamento dell'optineurina

Nei fibroblasti e neuroni dopaminergici degli individui sani DJ-1 si trova distribuita nel citosol in condizioni fisiologiche, ma non appena le cellule sono esposte alla valinomicina, DJ-1 trasloca a livello dei mitocondri. In particolare, si è notato che la traslocazione avviene nello stesso lasso di tempo della traslocazione dell'optineurina al mitocondrio, portando contemporaneamente le due proteine a livello della membrana mitocondriale depolarizzata. Tramite la tecnica della PLA (*Proximity Ligation Assay*) *in situ*, utilizzata per verificare la vicinanza fisica tra

due proteine e quindi la possibilità di un'interazione tra di loro, si è riscontrata una forte vicinanza tra DJ-1 e optineurina, sia a livello citosolico in condizioni fisiologiche, sia a livello mitocondriale in seguito all'esposizione alla valinomicina, lasciando intendere dunque l'esistenza di una interazione fisica tra le due proteine.

Per avere il quadro completo, la traslocazione di DJ-1 è stata in seguito studiata anche nelle cellule dei pazienti malati di Parkinson. In particolare, nei fibroblasti e neuroni dopaminergici che presentavano mutazioni a livello di *PINK1* e *PRKN*, la traslocazione al mitocondrio alterato di DJ-1 è risultata altamente compromessa, dimostrando che per questo processo è necessaria la presenza di PINK1 e Parkin. Simili risultati sono stati osservati anche sovraesprimendo Parkin nei fibroblasti mutanti di *PARK7*, in seguito a trattamento con valinomicina. Questo sta ad indicare che, nonostante l'alta concentrazione della proteina effettrice, carenze di DJ-1 influenzano negativamente la mitofagia. Risultati simili sono stati riportati anche nel reclutamento dell'optineurina al mitocondrio in seguito a esposizione a valinomicina. Infatti, l'accumulo di questa proteina sull'organello danneggiato è nullo in mancanza di DJ-1 nei fibroblasti e neuroni dopaminergici mutanti per *PARK7*, dimostrando quindi il ruolo critico che DJ-1 possiede nel reclutamento dell'optineurina sul mitocondrio.

In conclusione, DJ-1 sembra avere un ruolo come mediatore a valle essenziale nel processo della mitofagia dipendente da PINK1e Parkin. Una disfunzione in questo *pathway* può ritenersi un meccanismo patogenetico comune nella forma autosomica recessiva del Parkinson, in quanto, i neuroni delle persone affette da tale malattia non sono in grado di compiere una mitofagia corretta e completa, comportando un severo accumulo di mitocondri alterati e quindi, a livello cerebrale, risultare nella neurodegenerazione [7].

5 Prospettive terapeutiche

Lo sviluppo di terapie per malattie neurodegenerative è un procedimento molto lungo, che richiede molteplici sperimentazioni su modelli animali, il più possibile vicini all'organismo umano e spesso questo risulta un ostacolo particolarmente rilevante. Ancora ad oggi, la ricerca di terapie per la malattia di Parkinson offre poche soluzioni veramente efficaci. Alla luce del loro ruolo funzionale, PINK1 e Parkin rappresentano possibili bersagli terapeutici, attualmente studiati da diversi gruppi di ricerca. Difatti, soggetti affetti da Parkinson che presentano accumuli di α-sinucleina nei neuroni dimostrano un'elevata disfunzione mitocondriale e una rallentata e talvolta bloccata mitofagia. Sapendo, dunque, l'importanza dei mitocondri nei neuroni dopaminergici, l'obiettivo delle terapie in via di sviluppo è proprio aumentare il controllo qualità mitocondriale e la mitofagia [9].

Inoltre, per i pazienti avente una mutazione a carico del gene *PINK1* o *PRKN*, alcune sperimentazioni stanno cercando un sistema per compensare la perdita delle loro funzioni in modo che la mitofagia non venga interrotta per evitare la morte neuronale [3]. Sono tutte strategie ancora in fase di sperimentazione, ma che potrebbero promettere un nuovo futuro per questi particolari casi di Parkinson.

5.1 Stabilizzatori di PINK1

Una strategia terapeutica si sta focalizzando sulla ricerca di piccole molecole che vadano a ripristinare o aumentare i livelli di attività di PINK1 che, anche se funzionale, difficilmente è in grado da sola di contrastare l'elevata disfunzione mitocondriale dovuta ad accumuli di α-sinucleina, tipici del Parkinson idiopatico. L'idea è dunque di aumentare la capacità del controllo qualità mitocondriale e della mitofagia in modo da affievolire il danno mitocondriale e quindi ridurre le conseguenze patologiche osservate nella malattia [8].

Un esempio è rappresentato dalla piccola molecola MTK485. Si tratta di un composto che è stato identificato recentemente da un gruppo di ricerca e che per questo ha bisogno di ulteriori approfondimenti, ma che sembra essere una

promettente futura strategia terapeutica. MTK485 è in grado di legarsi a PINK1 e di conseguenza stabilizzare la sua forma attiva, in modo da permetterle di svolgere la sua attività di fosforilazione dell'ubiquitina e quindi di innescare la mitofagia. Da un punto di vista farmacologico, è importante notare che il vantaggio di questa molecola è che *stabilizza* PINK1 aumentando la sua efficacia e non l'*attiva*, evitando dunque di innescare la mitofagia in momenti inadeguati. È da tenere presente però, che MTK485 stabilizza PINK1 esclusivamente quando il mitocondrio è sottoposto a una debole depolarizzazione. Nelle cellule, ma anche come nei modelli animali del Parkinson in cui è stato somministrato MTK485, i sintomi della malattia si sono alleviati, così come la formazione di aggregati di α-sinucleina, la disfunzione mitocondriale e il blocco della mitofagia (Chin et al, 2023). Grazie alla stabilizzazione di PINK1 da parte di questa piccola molecola si sono ridotti anche i livelli di pUb (figura 6), ovvero l'ubiquitina fosforilata da PINK1, che si accumula laddove la mitofagia è interrotta in condizioni patologiche dimostrando ulteriormente che MTK485 può essere una valida soluzione terapeutica per curare il Parkinson [9].

Altri gruppi di ricerca hanno provato a individuare dei nuovi substrati per PINK1 per aumentare la sua attività, come la kinetina trifosfato KTP, una molecola simile all'ATP. Si è scoperto, però, che questo nucleotide non è in grado di entrare correttamente nel sito di legame dell'ATP presente in PINK1, a causa del suo ingombro sterico, e che quindi non può fungere come substrato alternativo per l'attività di fosforilazione di PINK1 [3].

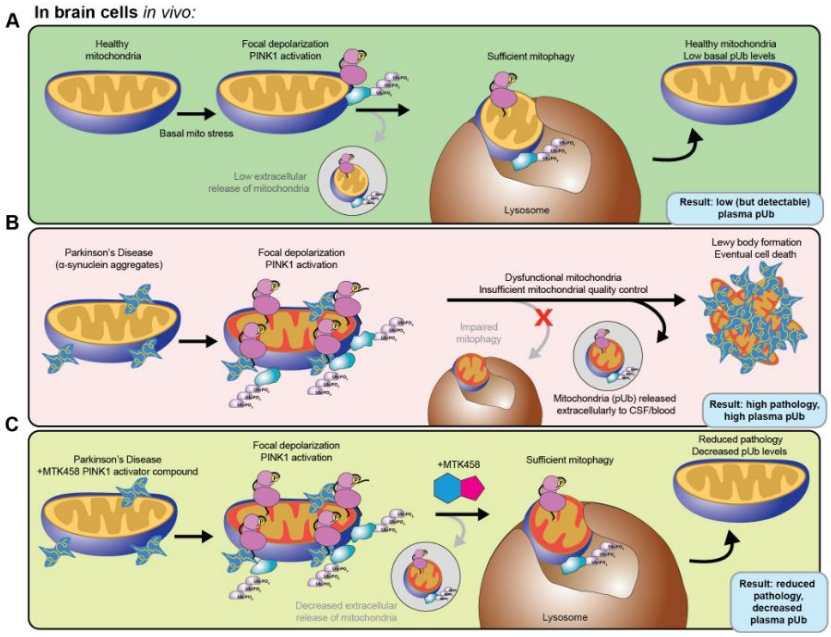

Figura 6: Modello per la regolazione dei livelli extracellulari di pUb tramite mitofagia e ipotesi terapeutica per l'attivazione di PINK1. (Chin et al, 2023, modificato)

5.2 Attivatori della mitofagia

Una possibile alternativa per ripristinare la mitofagia è attraverso l'uso di piccole molecole che vanno ad inibire proteine che contrastano l'azione di Parkin. Una di queste proteine è USP30, una deubiquitinasi presente sulla OMM che ostacola l'ubiquitinazione delle proteine mitocondriali effettuata da Parkin (Narendra and Youle, 2024). In seguito alla generazione di un *knock out* genico per USP30 in linee cellulari umane che sovra esprimono Parkin (Eldeeb et al, 2022), si è notato come la sua assenza provocasse un aumento della mitofagia e come nei mutanti *PINK1* o *PRKN* di *Drosophila* riuscisse a portare a un recupero del fenotipo parkinsoniano [8].

Tali inibitori sembrano quindi rappresentare una nuova strada promettente per la regolazione della mitofagia nel Parkinson, tanto che molte piccole molecole sono ora in via di sviluppo [8].

6 Conclusioni

In questi ultimi decenni, la ricerca ha compiuto passi importanti nel comprendere la malattia di Parkinson, un disturbo neurodegenerativo che si manifesta inizialmente con alterazioni del sonno e problemi all'apparato digerente, per poi progredire con i sintomi più comuni, quelli motori, che portano alla totale incapacità motoria nelle ultime fasi della malattia. Le cause del Parkinson sono molteplici, da mutazioni genetiche che possono addirittura portare a un esordio precoce della malattia, a motivi tuttora ignoti come per i casi idiopatici.

Mutazioni a livello dei geni *PINK1* e *PRKN* che codificano per due delle principali proteine coinvolte nella mitofagia, portano a disfunzioni di questo processo, con il conseguente accumulo di mitocondri non funzionanti che inficiano le attività cellulari, comportandone la morte. A livello cerebrale, questo risulta nella degenerazione dei neuroni dopaminergici situati nella sostanza nera. Gli studi condotti *in vitro* sembrano confermare quanto detto sopra, mentre i risultati ottenuti *in vivo* non sempre sembrano supportare questo meccanismo. La mitofagia alterata a causa delle mutazioni su PINK1 o Parkin è dunque molto difficile da replicare su organismi modello e spesso i risultati ottenuti non sono esportabili nell'uomo. Sicuramente sono necessari ulteriori approfondimenti per avere un quadro il più chiaro possibile nello studio di questa malattia ricca di sfumature. Avendo comunque compreso la suscettibilità dei neuroni dopaminergici al processo della mitofagia, dovuta all'abbondante presenza di mitocondri, un ramo della ricerca si sta concentrando sullo sviluppo di terapie che hanno come target la mitofagia. L'obiettivo è quello di ripristinare tale processo tramite piccole molecole. Nonostante i risultati siano pochi e la strada ancora lunga, la ricerca non si ferma, ma continua sempre con la speranza che nel futuro si possa arrivare a una cura per donare una nuova vita a tutte le persone che soffrono della malattia di Parkinson.

Bibliografia

[1] Huw R. Morris, Maria Grazia Spillantini, Carolyn M. Sue and Caroline H. Williams-Gray, «The pathogenesis of Parkinson's disease», *The Lancet*, vol. 403, fasc. 10423, pp. 293–304, gen. 2024, doi: 10.1016/S0140-6736(23)01478-2.·

[2] Ana Kolicheski, Pierpaolo Turcano, Nicole Tamvaka, Pamela J. McLean, Wolfdieter Springer, Rodolfo Savica and Owen A. Ross «Early-Onset Parkinson's Disease: Creating the Right Environment for a Genetic Disorder», *J. Park. Dis.*, vol. 12, fasc. 8, pp. 2353–2367, nov. 2022, doi: 10.3233/JPD-223380.

[3] Derek P. Narendra and Richard J. Youle, «The role of PINK1–Parkin in mitochondrial quality control», *Nat. Cell Biol.*, vol. 26, fasc. 10, pp. 1639–1651, ott. 2024, doi: 10.1038/s41556-024-01513-9.

[4] Mohamed A. Eldeeb, Rhalena A. Thomas, Mohamed A. Ragheb, Armaan Fallahi and Edward A. Fon, «Mitochondrial quality control in health and in Parkinson's disease», *Physiol. Rev.*, vol. 102, fasc. 4, pp. 1721–1755, ott. 2022, doi: 10.1152/physrev.00041.2021.

[5] Rui Han, Yanting Liu, Shihua Li, Xiao-Jiang Li and Weili Yang, «PINK1-PRKN mediated mitophagy: differences between in vitro and in vivo models», *Autophagy*, vol. 19, fasc. 5, pp. 1396–1405, doi: 10.1080/15548627.2022.2139080.

[6] Tom Cornelissen, Sven Vilain, Katlijn Vints, Natalia Gounko, Patrik Verstreken and Wim Vandenberghe, «Deficiency of parkin and PINK1 impairs age-dependent mitophagy in Drosophila», *eLife*, vol. 7, p. e35878, doi: 10.7554/eLife.35878.

[7] Dorien Imberechts, Inge Kinnart, Fieke Wauters, Joanne Terbeek, Liselot Manders, Keimpe Wierda, Kristel Eggermont, Rodrigo Furtado Madeiro, Carolyn Sue, Catherine Verfaillie and Wim Vandenberghe «DJ-1 is an essential downstream mediator in PINK1/parkin-dependent mitophagy», *Brain*, vol. 145, fasc. 12, pp. 4368–4384, ago. 2022, doi: 10.1093/brain/awac313.

[8] Mohamed A. Eldeeb, Rhalena A. Thomas, Mohamed A. Ragheb, Armaan Fallahi and Edward A. Fon «Mitochondrial quality control in health and in

Parkinson's disease», *Physiol. Rev.*, vol. 102, fasc. 4, pp. 1721–1755, ott. 2022, doi: 10.1152/physrev.00041.2021.

[9] Randall M. Chin, Rishi Rakhit, Dara Ditsworth, Chengzhong Wang, Johan Bartholomeus, Song Liu, Akash Mody, Alex Laishu, Andrea Eastes, Chao Tai, Roy Y. Kim, Jessica Li, Steven Hansberry, Saurabh Khasnavis, Victoria Rafalski, Donald Herendeen, Virginia Garda, Jennie Phung, Daniel de Roulet Jr., Alban Ordureau, J. Wade Harper, Shawn Johnstone, Jan Stöhr and Nicholas T. Hertz «Pharmacological PINK1 activation ameliorates Pathology in Parkinson's Disease models», 15 febbraio 2023, *bioRxiv*. doi: 10.1101/2023.02.14.528378.