

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMEDICHE E NEUROMOTORIE

Ciclo XXXIII

Settore Concorsuale: 06/D6
Settore Scientifico Disciplinare: MED/26

**RUOLO DELLA PROTEINA OPA3
NELLA PATOGENESI DI MALATTIE NEURODEGENERATIVE**

Presentata da: **Dott.ssa Emanuela Scimonelli**

Coordinatore Dottorato
Prof.ssa Matilde Yung Follo

Supervisore
Prof. Valerio Carelli

Co-Supervisore
Dott.ssa Alessandra Maresca

Esame finale anno 2021

SINTESI DELLA TESI

OPA3 è una proteina codificata dal genoma nucleare che, grazie a una sequenza di *targeting* mitocondriale, viene indirizzata ai mitocondri dopo la sua sintesi. Le mutazioni nel gene *OPA3* sono associate a due patologie neurodegenerative: la Sindrome di Costeff, causata da mutazioni recessive, e una forma di atrofia ottica dominante che si manifesta con cataratta e spesso sordità.

Ad oggi, l'esatta funzione e regolazione della proteina non sono ancora state completamente chiarite, così come la sua localizzazione nella membrana mitocondriale esterna o interna.

Lo scopo di questa tesi era quello di fare luce sulla funzione della proteina OPA3, con particolare interesse alla dinamica mitocondriale e all'autofagia, sulla sua localizzazione subcellulare ed infine di definire il meccanismo patogenetico nelle patologie neurodegenerative causate da mutazioni in questo gene. A questo scopo abbiamo utilizzato sia una linea di neuroblastoma silenziata stabilmente per OPA3 che linee cellulari primarie derivate da pazienti.

I risultati del presente studio dimostrano che la riduzione di OPA3, indotta nelle cellule del neuroblastoma e presente nei fibroblasti derivati dai pazienti, produce alterazioni nel *network* mitocondriale con uno sbilanciamento a favore della fusione. Questo fenomeno è probabilmente dovuto all'aumento della forma *long* della proteina OPA1 che è stato riscontrato in entrambi i modelli cellulari. Inoltre, seppur con direzione apparentemente opposta, in entrambi i modelli abbiamo osservato un'alterata regolazione dell'autofagia.

Infine, abbiamo confermato che OPA3 localizza nella membrana mitocondriale interna ed è esposta per gran parte nella matrice. Inoltre, un segnale della proteina è stato trovato anche nelle *mitochondrial associated membranes*, suggerendo un possibile ruolo di OPA3 nel trasferimento dei lipidi tra i mitocondri e il reticolo endoplasmatico. Abbiamo rilevato un'interazione della proteina OPA3 con l'acido fosfatidico che non era mai stata evidenziata fino ad oggi. Queste osservazioni sono compatibili con le alterazioni della dinamica mitocondriale e la disregolazione dell'autofagia documentate nei modelli studiati.

Ulteriori approfondimenti dovranno chiarire il ruolo di OPA3 nei *pathway* oggetto di studio. A tale scopo si ritiene opportuno condurre le prossime indagini avvalendoci di modelli cellulari quali iPSCs (cellule staminali pluripotenti indotte) derivanti da pazienti con patologia o cellule in cui viene soppressa l'espressione del gene *OPA3*.

Indice

Introduzione	1
1. Biologia dei mitocondri.....	2
1.1 La struttura mitocondriale.....	4
1.2 La dinamica mitocondriale	5
1.2.1 <i>La fusione mitocondriale</i>	6
1.2.2 <i>La fissione mitocondriale</i>	9
2. L'autofagia	11
2.1 Il macchinario autofagico	13
2.1.1 <i>Induzione</i>	13
2.1.2 <i>Elongazione e formazione delle vescicole</i>	14
2.1.3 <i>Maturazione dell'autofagosoma</i>	15
2.2 La mitofagia	16
3. Mitochondria-Associated Membranes (MAMs).....	17
3.1 Biosintesi e trasporto dei lipidi.....	19
3.2 L'omeostasi e il segnale del calcio.....	21
4. OPA3 (Optic Atrophy 3), una proteina mitocondriale di incerta funzione.....	23
4.1 OPA3 e le neuropatie ottiche ereditarie	25
Materiali e metodi	27
1. Colture cellulari.....	28
2. Silenziamento stabile mediante vettore virale di terza generazione	28
3. Estrazione e dosaggio delle proteine	29
4. Analisi di Western blotting	30
5. Purificazione di mitocondri.....	31
6. Purificazione delle MAMs.....	31
7. Misurazione del potenziale della membrana mitocondriale.....	32
8. Determinazione del contenuto di ATP cellulare.....	32
9. Valutazione della respirazione mitocondriale	33
10. Saggio della Sulfurodamina B	34
11. Analisi della morfologia mitocondriale.....	34
12. Induzione della fissione mitocondriale.....	34
13. Immunofluorescenza e microscopia confocale	35
14. Induzione e inibizione del flusso autofagico	35
15. Digestione con proteinasi K e digitonina	35
16. Overespressione della proteina OPA3.....	36
17. Estrazione dell'RNA totale	36

18. La trascrizione inversa e la valutazione quantitativa dell'espressione genica	36
19. Valutazione delle interazioni della proteina OPA3 con i fosfolipidi di membrana.....	37
20. Analisi statistica.....	38
Scopo della tesi.....	39
Risultati	42
Parte I - Studio di OPA3 in linee cellulari di neuroblastoma silenziate per OPA3V1	43
1. Generazione e validazione della linea SK-N-SH silenziata stabilmente per OPA3V1	43
2. Analisi del metabolismo energetico	44
3. Valutazione della dinamica mitocondriale	46
4. Analisi del processo autofagico	51
5. Analisi delle interazioni della proteina OPA3 con i fosfolipidi di membrana	56
Parte II - Studio di linee cellulari di fibroblasti provenienti da pazienti con diagnosi ADOAC e 3-MGA III e portatori di mutazioni in OPA3	58
1. Espressione di OPA3 in linee primarie di fibroblasti	58
2. Analisi del metabolismo energetico	59
3. Analisi morfologica della dinamica mitocondriale	60
4. Analisi del processo autofagico	66
Parte III - Studio della localizzazione mitocondriale di OPA3	68
1. Indagine sulla localizzazione subcellulare di OPA3	68
2. Analisi della localizzazione di OPA3 nelle membrane mitocondriali.....	69
3. Analisi della localizzazione di OPA3V1 nelle MAMs	69
Discussione	71
Conclusioni	82
Bibliografia	85

Introduzione

1. Biologia dei mitocondri

I mitocondri sono organelli citoplasmatici che svolgono un ruolo bioenergetico essenziale nelle cellule eucariotiche, fornendo la maggior parte di adenosina trifosfato (ATP) attraverso la catena respiratoria mitocondriale e il processo della fosforilazione ossidativa (OXPHOS). Oltre alla produzione di energia, i mitocondri sono coinvolti in altri processi cellulari fondamentali quali l'omeostasi del calcio, regolandone i livelli citosolici, il metabolismo dei fosfolipidi, la regolazione dell'apoptosi e del ciclo cellulare, e svolgendo inoltre un ruolo cruciale nei processi di invecchiamento e stress ossidativo (Wang et al., 2001; Silva Ramos et al., 2016; Macvicar et al., 2016).

Secondo la teoria dell'endosimbiosi proposta da Lynn Sagan Margulis, l'origine dei mitocondri risale a circa due miliardi di anni fa quando le ancestrali cellule eucariotiche anaerobiche furono invase da batteri aerobici adattati all'incremento di ossigeno nell'atmosfera e successivamente diventati degli endosimbionti (Margulis, 1975). I principali punti di forza della teoria endosimbiotica sono le numerose analogie fisiologiche e biochimiche esistenti tra mitocondri e cellule procariotiche, tra cui la caratteristica comune di avere un proprio DNA circolare (Zimorski et al., 2014; Perkins et al., 2000).

Il genoma mitocondriale presenta caratteristiche peculiari rispetto al genoma nucleare. Esso viene ereditato esclusivamente per via materna, ha uno specifico codice genetico, è caratterizzato da poliploidia, ovvero la presenza di molte copie di DNA mitocondriale (mtDNA) nello stesso mitocondrio (fino a mille copie per cellula), ed ha una particolare organizzazione strutturale.

Nell'uomo l'mtDNA è infatti una molecola circolare a doppia elica costituita da 16.569 paia di basi. I due filamenti che la compongono possono essere distinti in base ad un'asimmetrica distribuzione dei nucleotidi. Vengono definiti quindi un filamento H (*Heavy strand*), ricco in residui guaninici, e un filamento L (*Light strand*) con un alto contenuto di residui citosinici (Fernandez-Silva et al., 2003). Il cromosoma mitocondriale inoltre possiede soltanto due regioni non codificanti. Esso, infatti, risulta estremamente compatto poiché privo di introni, di sequenze ripetute e di regioni intergeniche (Pakendorf e Stoneking, 2005). Le due sequenze principali non codificanti (NCR, *non-coding region*) sono 1) la regione di controllo, che include la regione della D-loop, *displacement loop*, caratterizzata dalla presenza di un triplo filamento e contenente al suo interno sia l'origine di replicazione del filamento H (O_H) che i promotori per la trascrizione di entrambi i filamenti (LSP, HSP1, HSP2, e 2) l'origine di replicazione del filamento L (O_L), localizzata all'interno di un cluster di geni codificanti per 5 tRNA (Anderson et al., 1981; Fernández-Silva et al., 2003).

1.1 La struttura mitocondriale

I mitocondri sono delimitati da una doppia membrana che costituisce una complessa struttura e una fine compartimentazione, importanti per le funzioni dei singoli organelli. È possibile distinguere una membrana esterna (OMM, *Outer Mitochondrial Membrane*) e una membrana interna (IMM, *Inner Mitochondrial Membrane*), che delimitano lo spazio intermembrana (IMS, *InterMembrane Space*) e la regione più interna chiamata matrice mitocondriale (Fig. 2). Le due membrane mitocondriali presentano una diversa composizione lipidica e proteica in quanto svolgono funzioni differenti.

La membrana mitocondriale esterna è costituita da lipidi, la cui componente più abbondante è rappresentata dai fosfolipidi, e proteine con funzioni enzimatiche, tra cui enzimi coinvolti nel metabolismo dei fosfolipidi, e di trasporto. Essa è resa altamente permeabile grazie alla presenza di un elevato numero di proteine integrali di circa 30-35 kDa, le porine, che formano dei canali transmembrana non selettivi (VDAC, Canale Anionico Voltaggio Dipendente) e che consentono lo scambio di metaboliti e di ioni tra il citoplasma e lo spazio intermembrana (Frey e Mannella, 2002).

Nella OMM sono inoltre localizzate proteine deputate a formare connessioni fisiche, definite "*contact sites*", tra il mitocondrio e altri organelli citoplasmatici come il reticolo endoplasmatico, i ribosomi e il nucleo (De Brito e Scorrano, 2008; Pernas e Scorrano, 2016; Giacomello et al., 2020).

Al contrario della OMM, la membrana mitocondriale interna è strutturalmente e funzionalmente molto complessa. L'assenza di porine e di colesterolo e l'alto contenuto di cardiolipina conferiscono una scarsa e selettiva permeabilità necessaria alla formazione di un corretto gradiente elettrochimico tra la matrice mitocondriale e lo spazio intermembrana, fondamentale alla funzione mitocondriale (Frey e Mannella, 2000). La IMM è strettamente associata alla OMM in diversi tratti lungo il perimetro mitocondriale dando origine ad una regione definita membrana interna di confine (IBM, *inner boundary membrane*) (Adams et al., 1989; Frey et al., 2002). La IMM forma delle strutture tubulari o lamellari che si estendono nella matrice mitocondriale definite creste e che rappresentano i principali siti di conversione energetica del mitocondrio in quanto ospitano i complessi della catena respiratoria mitocondriale e l'ATP sintasi, responsabili del sistema OXPHOS (Rampelt et al., 2017). Le creste creano inoltre delle connessioni con lo spazio intermembrana mediante piccole giunzioni dette *cristae junctions* (CJs) che garantiscono un alto grado di curvatura della membrana. La struttura delle CJs ha delle implicazioni funzionali poiché rappresenta una barriera alla diffusione libera di metaboliti, proteine (per esempio, il citocromo c) e soluti tra il lume delle creste e lo spazio intermembrana. La formazione delle giunzioni è mediata da un complesso multiproteico denominato MICOS (*Mitochondrial contact site and cristae organizing system*).

Questa complessa struttura oltre ad essere coinvolta nella biogenesi e nel rimodellamento delle creste, media la formazione di punti di contatto tra la IMM e la OMM. (Harner et al., 2011; von der Malsburg et al., 2011; Kühlbrandt, 2015; Silva Ramos et al., 2016; Wollweber et al., 2017; Harwig et al., 2018).

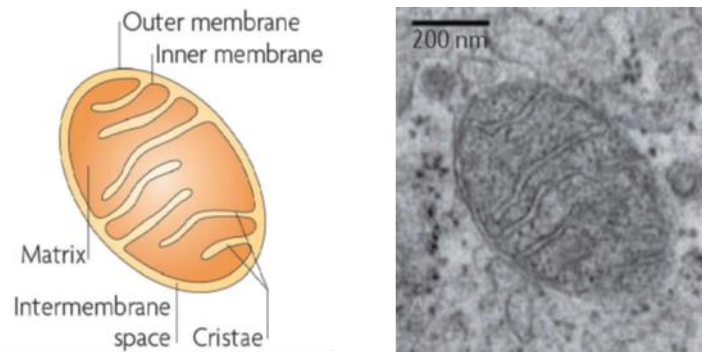


Figura 2. Ultrastruttura del mitocondrio (Westermann, 2010).

1.2 La dinamica mitocondriale

I mitocondri sono degli organelli citoplasmatici altamente dinamici. Essi sono in grado di cambiare posizione nel citosol, avendo una loro mobilità, ma anche di fondersi e dividersi, tutti meccanismi con cui rispondono alle diverse richieste di energia da parte dei vari tipi cellulari (Collins et al., 2002). La caratteristica dei mitocondri di modificare la propria morfologia in base alle necessità della cellula viene definita dinamica mitocondriale, un meccanismo che testimonia come esista una stretta correlazione tra la cellula e l'organello. Alcune patologie sono state associate ad alterazioni della dinamica mitocondriale. Ad esempio, mutazioni in geni codificanti per proteine coinvolte nei processi di fusione e fissione sono caratteristicamente associate a malattie neurodegenerative, ma possano essere correlate anche ad altre patologie come cancro o malattie cardiache (Archer, 2013). La fusione e la fissione mitocondriale sono due eventi opposti e finemente bilanciati, implicati nel mantenimento della morfologia mitocondriale e nella regolazione di numerose funzioni fondamentali come la distribuzione dei mitocondri, la proliferazione e differenziamento cellulare, la trasmissione del genoma mitocondriale, l'omeostasi del calcio e i processi di "quality control" come l'autofagia/mitofagia, ed infine la morte cellulare programmata, cioè l'apoptosi (Wai e Langer, 2016).

1.2.1 La fusione mitocondriale

Il meccanismo di fusione mitocondriale prevede che i mitocondri entrino strettamente in contatto favorendo la formazione di complessi tra proteine presenti sulle membrane degli organelli adiacenti, fino alla completa fusione delle membrane esterne e successivamente quella delle membrane interne (El-Hattab et al., 2018). In questo modo più mitocondri sono in grado di intercomunicare scambiando tra loro molecole di mtDNA, proteine, lipidi e metaboliti (Nunnari et al., 1997; Jacobs et al., 2003) (Fig. 3).

Nell'uomo tale meccanismo è mediato da tre GTPasi, evolutivamente conservate, appartenenti alla famiglia delle dinamine, con una diversa sub-localizzazione mitocondriale: la mitofusina 1 (MFN1) e mitofusina 2 (MFN2) localizzano sulla OMM, mentre la proteina OPA1 (Optic Atrophy 1) è situata sulla IMM.

Le MFN1 e MFN2, responsabili della fusione della membrana mitocondriale esterna, sono state identificate nei mammiferi come due isoforme omologhe della proteina *Fuzzy onion* (Fz01), primo mediatore di fusione mitocondriale scoperto in *Drosophila Melanogaster* (Hales e Fuller, 1997).

Entrambe le mitofusine sono caratterizzate da un dominio N-terminale con attività GTPasica e due domini superavvolti HR1 ed HR2 (*heptad-repeat*) separati da una porzione transmembrana che consentono la loro inserzione nella membrana mitocondriale esterna. Questa particolare organizzazione favorisce l'esposizione nel citoplasma dei domini C-terminale ed N-terminale (Santel et al., 2003).

L'interazione tra due regioni HR di mitofusine in trans induce cambiamenti conformazionali che guidano l'idrolisi del GTP da parte delle proteine MFN portando alla fusione delle membrane mitocondriali esterne (Giacomello, 2020). Questo processo è promosso dalla formazione di dimeri antiparalleli che possono essere omotipici, per esempio MFN1-MFN1, o eterotipici, MFN1-MFN2 (Koshiba et al., 2004).

Nonostante entrambe le mitofusine presentino un elevato grado di omologia nella sequenza primaria ed una organizzazione strutturale molto simile, diversi studi biochimici e genetici hanno evidenziato come MFN1 e MFN2 possano avere funzioni distinte.

MFN1 presenta un'attività GTPasica maggiore rispetto a MFN2 ed è prevalentemente coinvolta nella fusione mitocondriale (Eura et al., 2003; Ishihara et al., 2004). MFN2 invece sembra avere anche un ruolo centrale nel metabolismo mitocondriale ed essere coinvolta nelle interazioni tra mitocondri ed altri organelli citoplasmatici, in modo particolare con il reticolo endoplasmatico (RE) (De Brito e Scorrano, 2008). Queste interazioni generano dei siti definiti MAMs (*mitochondria-associated*

membranes), microambienti che influenzano la biosintesi dei lipidi e l'omeostasi del calcio (Burtè et al., 2015). Le differenze funzionali tra le due mitofusine sono rimarcate anche dal fatto che soltanto mutazioni nel gene *MFN2* sono responsabili dell'insorgenza di una rara neuropatia ereditaria, la malattia di Charcot-Marie-Tooth di tipo 2A (CMT2A), mentre finora non sono state mai riportate mutazioni patogene in *MFN1* (Zuchner et al., 2004; Polke et al., 2011).

La fusione della membrana mitocondriale interna è mediata da OPA1, proteina identificata nell'uomo grazie alla sua omologia con l'ortologo Mgm1 presente nel lievito (Alexander, 2000; Delettre et al., 2000) e definita così in quanto mutazioni nel suo gene risultano associate all'Atrofia Ottica Autosomica Dominante (ADOA), una delle forme più comuni di neuropatia ottica ereditaria (Alexander et al., 2000; Delettre et al., 2000). Diversi studi hanno dimostrato che OPA1, oltre a svolgere un ruolo cruciale nel meccanismo di fusione, è implicata in altre importanti funzioni mitocondriali come il controllo della morfologia e dell'organizzazione delle creste mitocondriali e di conseguenza la regolazione dei processi apoptotici mediante la compartimentazione del citocromo c all'interno del lume delle creste, il corretto funzionamento dei complessi respiratori, e infine il mantenimento del mtDNA (Olichon et al., 2003; Frezza et al., 2006, Del Dotto et al., 2017).

La proteina OPA1 è presente all'interno dei mitocondri sia in forma solubile, localizzata nello spazio intermembrana, che ancorata alla IMM. La struttura della proteina include un dominio N-terminale con una sequenza definita MTS (*Mitochondrial target sequence*) per l'indirizzamento ai mitocondri, seguita da una sequenza transmembrana (TM) responsabile dell'associazione alla membrana mitocondriale, un dominio GTPasico esposto nello spazio intermembrana ed un dominio superavvolto definito GED (*GTPase effector domain*) posizionato nella estremità C-terminale (Delettre et al., 2000; Satoh et al., 2003; Belenguer et al., 2013). La biogenesi e la regolazione di OPA1 è molto complessa. Nell'uomo la proteina è presente in 8 isoforme generate dallo splicing alternativo degli esoni 4, 4b e 5b e con un pattern di espressione che varia nei diversi tessuti (Olichon et al., 2007a). La proteina tradotta viene indirizzata ai mitocondri dove si lega alla membrana interna e qui viene sottoposta ad un primo taglio proteolitico, a livello della MTS, da parte di una peptidasi mitocondriale (MPP) generando così la isoforma "long" (OPA1-l). Ogni OPA1-l può essere a sua volta clivata in due siti di taglio S1 e S2, corrispondenti rispettivamente agli esoni 5 e 5b, dando così origine alla isoforma "short" (OPA1-s) priva della porzione TM (MacVicar et al., 2016).

Gli enzimi proteolitici inizialmente considerati coinvolti nelle modificazioni post-traduzionali della proteina OPA1 erano la proteasi PARL (*Preselin-associated rhomboid-like*) e la paraplegina (*SPG7*

protein), una AAA metalloproteinasi mitocondriale entrambe localizzate nella IMM (Cipolat et al. 2006; Ishihara et al., 2006). Successivi studi su MEFs (*Murine Embryonic Fibroblasts*) hanno però messo in luce che la deplezione di PARL o della paraplegina non interferivano sul corretto processamento di OPA1, suggerendo quindi il coinvolgimento di altre proteasi (Duvezin-Caubet et al., 2007). Ad oggi si ritiene che le proteasi OMA1 (*ATP-independent metalloprotease*) e YME1L (*YME1 like ATPase, ATP-dependent AAA+ protease*) siano le responsabili della regolazione della morfologia mitocondriale in quanto, agendo rispettivamente sui siti di taglio S1 e S2, bilanciano il rapporto tra isoforma *long* e *short* (Rainbolt et al., 2016). Ciascuna delle due proteasi forma complessi omo-oligomerici ancorati alla membrana mitocondriale interna esponendo il sito con attività enzimatica nello spazio intermembrana (Baker et al., 2014). YME1L è costitutivamente attiva, mentre OMA1 mantiene uno stato di quiescenza e può essere attivata in particolari condizioni di stress come nel caso della depolarizzazione del potenziale della membrana mitocondriale (Baker et al., 2014).

La combinazione tra splicing alternativo e i diversi tagli proteolitici da parte di YME1L ed OMA1 sui siti S1 e S2 di OPA1 danno origine ad un pool di 5 isoforme proteiche, 2 *long* (a, b) e 3 *short* (c, d, e), che promuovono la fusione o la frammentazione dei mitocondri; questa variabilità strutturale sembra possa essere responsabile delle molteplici funzioni della proteina OPA1 (Rainbolt et al., 2016; Del Dotto et al., 2018).

Una proteina di rilevante interesse che, se mutata, può causare atrofia ottica dominante è AFG3L2 (AFG3 Like Matrix AAA Peptidase Subunit 2), una proteasi presente come complesso omo-oligomerico di sei subunità o come etero-oligomero insieme a SPG7; quest'ultima, dopo la formazione del complesso, viene attivata da AFG3L2 mediante un taglio proteolitico nella sequenza N-terminale (Almontashiri et al., 2014). Studi recenti hanno dimostrato che AFG3L2 coopera con YME1L e che inoltre interviene nel processo di maturazione di OMA1; ciò evidenzia un coinvolgimento di AFG3L2 nella regolazione della dinamica mitocondriale (Cesnekova et al., 2018; Puchades et al., 2019; Caporali et al., 2020).

Un ruolo di rilevante importanza nell'ambito dei processi di fusione mitocondriale in condizioni di stress è svolto dal complesso SPY (SLP-2/PARL/YME1L). SLP2 (Stomatin-like protein 2) è una proteina *scaffold* localizzata nella matrice e ancorata alla membrana mitocondriale interna, che promuove l'interazione tra le proteasi PARL e YME1L. All'interno del complesso, SLP-2 regola il processamento mediato da PARL della fosfatasi PGAM5, anch'essa coinvolta nella dinamica mitocondriale e nel

processo mitofagico, mentre rimane ancora da definire l'azione esercitata su YME1L (Wai et al., 2016).

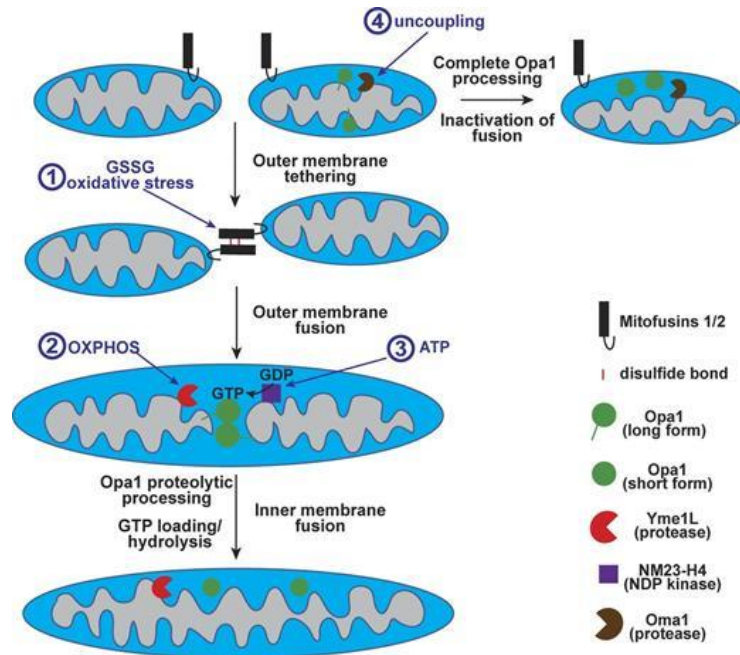


Figura 3. Regolazione della fusione mitocondriale (Mishra e Chan, 2016).

1.2.2 La fissione mitocondriale

La fissione mitocondriale, così come la fusione, rappresenta un evento cruciale per la fisiologia cellulare (Labbé et al., 2014) (Fig. 4). Durante la mitosi cellulare, ad esempio, la fissione contribuisce alla replicazione del mtDNA e alla segregazione dei mitocondri, con il loro genoma, che vengono così distribuiti nelle cellule figlie (Nunnari et al., 1997); durante il processo di mitofagia invece la fissione facilita la rimozione degli organelli danneggiati (Labbé et al., 2014).

Il principale regolatore della fissione mitocondriale è una proteina altamente conservata e anch'essa con attività GTPasica, appartenente alla famiglia delle dinamine, *Dynamin-related protein 1* (DRP1) (nel lievito Dnm1) (Smirnova et al., 2001; Roy et al., 2015). DRP1 è caratterizzata da una struttura con un dominio GTPasico nella porzione N-terminale, una regione centrale a α -elica (*dynamin-like central domain*) e un dominio GED al C-terminale (Knott et al., 2008). Nell'uomo sono stati identificati diversi siti di splicing alternativo che danno origine a sei trascritti codificanti per varie isoforme della proteina (Reddy et al., 2011).

DRP1 è localizzata principalmente nel citosol e viene reclutata sulla membrana mitocondriale esterna mediante recettori transmembrana; nei mammiferi sono stati identificati diversi adattatori tra cui MFF (*Mitochondrial Fission Factor*), MiD49 e MiD51 (*Mitochondrial Dynamics protein*) e FIS1

(*Fission 1 protein*), quest'ultimo conservato anche nel lievito (Palmer et al., 2013; Pernas e Scorrano, 2016). Una volta sui mitocondri, DRP1 localizza nei siti di costrizione in cui avviene la fissione, si auto-assembla formando strutture ad anello che, in seguito all'idrolisi del GTP, restringono la membrana mitocondriale fino alla completa scissione (Hinshaw et al., 1999; Mishra e Chan, 2016). La regolazione della proteina è molto complessa. Sono stati identificati vari meccanismi di modificazioni post-traduzionali come fosforilazione, S-nitrosilazione, sumoilazione e acetilazione, che si attivano in risposta a diversi stimoli cellulari (Wilson et al., 2013, Reddy et al., 2011). Il meccanismo meglio descritto è quello che vede coinvolti gli eventi di fosforilazione e defosforilazione di siti specifici di DRP1, quali la serina 616 (S616) e la serina 637 (S637) (Mishra e Chan, 2016). L'incremento dei livelli di calcio citoplasmatico attiva la calcineurina, una fosfatasi calcio dipendente, che determina la defosforilazione dei residui S637 di DRP1 attivando la proteina e il suo reclutamento mitocondriale (Cereghetti et al., 2008). Viceversa, l'attivazione della PKA (*Protein kinase A*) mediata da elevati livelli di AMP ciclico determina la fosforilazione dello stesso residuo amminoacidico che causa l'inibizione e il mantenimento di DRP1 nel citoplasma, promuovendo così l'elongazione mitocondriale (Cribbs e Strack, 2007). In aggiunta, la fissione può essere promossa dalla fosforilazione del residuo S616; questo evento sembra essere coinvolto nel processo di tumorigenesi mediato dall'oncogene Ras che, attivando il *pathway* delle MAP chinasi, determina un aumento della fissione mitocondriale (Mishra e Chan, 2016).

L'attività di DRP1 è supportata dal reticolo endoplasmatico che avvolge i mitocondri marcando i punti in cui avverrà la divisione. Nei mammiferi, attorno a quelli che saranno i siti di costrizione, avviene la polimerizzazione dei filamenti di actina, a sua volta mediata da una proteina che si trova ancorata al reticolo endoplasmatico, INF2 (*Inverted Formin 2*). In questo modo INF2 promuove la fase iniziale della fissione in maniera indipendente da DRP1 (Korobova et al., 2013). Manor e colleghi, inoltre, hanno dimostrato l'esistenza di una proteina ancorata alla membrana esterna del mitocondrio, Spire1C, che interagendo e cooperando con INF2 favorisce la nucleazione dell'actina (Manor et al., 2015).

Il meccanismo di fissione della membrana mitocondriale interna resta poco conosciuto. Non è chiaro se l'azione di DRP1 sia sufficiente da sola a determinare la scissione sia della OMM che della IMM, o se esistano ulteriori proteine in grado di mediare il restringimento e conseguentemente la divisione della membrana mitocondriale interna (Wai e Langer, 2016). Un meccanismo recentemente proposto si basa su un aumentato ingresso di calcio nei mitocondri durante il processo di fissione che determinerebbe una temporanea depolarizzazione del potenziale di

membrana mitocondriale, con conseguente stimolazione dell'attività proteolitica di OMA1 e incremento di OPA1-s (Cho et al., 2017; Chakrabarti et al., 2017).

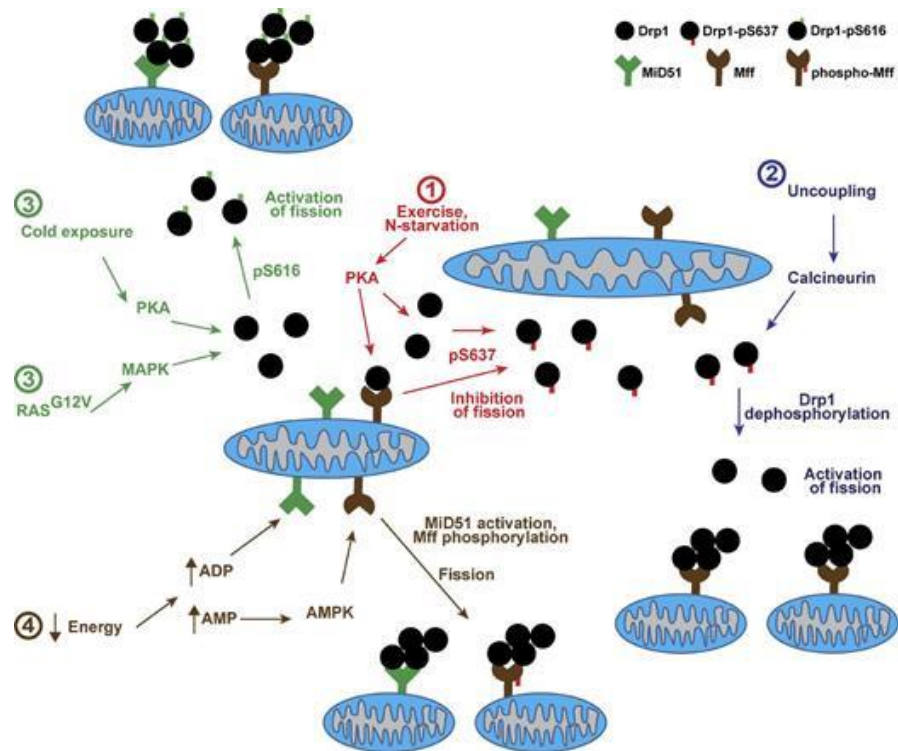


Figura 4. Regolazione della fissione mitocondriale (Mishra e Chan, 2016).

2. L'autofagia

Il termine autofagia deriva dal greco (auto-, “αὐτός” sé stesso, e -fagia, “φαγεῖν” mangiare) e significa letteralmente “mangiare sé stesso”.

L'autofagia è un processo catabolico lisosomiale altamente conservato in tutti gli eucarioti, attivo a livello basale per il turnover di proteine, deputato alla degradazione di organelli citoplasmatici danneggiati o superflui e al riciclo dei loro componenti, garantendo in questo modo l'omeostasi cellulare (Levine e Kroemer 2008). Inoltre, l'autofagia viene indotta in condizioni di stress, come ad esempio la deprivazione di nutrienti o in risposta ad una maggiore richiesta bioenergetica, assicurando così la sopravvivenza della cellula. È infine coinvolta nella difesa contro infezioni da parte di virus e batteri, nel rimodellamento durante lo sviluppo embrionale e nel differenziamento cellulare (Kirkegaard et al., 2004; Mizushima e Komatsu, 2011).

Ci sono sempre maggiori evidenze che l'autofagia possa essere implicata in diverse patologie umane; alterazioni nel processo autofagico sono infatti correlate all'insorgenza di cancro, cardiomiopatie e numerosi disordini neurodegenerativi come il morbo di Parkinson, di Alzheimer e la malattia di Huntington (Choi et al., 2013).

È possibile distinguere tre forme di autofagia sulla base dei diversi meccanismi di attivazione: l'autofagia mediata da chaperonine (CMA), la microautofagia e la macroautofagia (Mizushima et al., 2008). In tutte e tre le forme la fase finale consiste nell'indirizzamento del materiale citoplasmatico ai lisosomi, dove viene poi degradato. Mentre nella microautofagia e nella macroautofagia il materiale da degradare viene inglobato all'interno di vescicole citoplasmatiche, nella CMA gli elementi da demolire vengono trasportati in maniera attiva all'interno dei lisosomi.

La CMA è un meccanismo altamente specifico deputato al recupero di proteine che contengono la sequenza amminoacidica Lys-Phe-Glu-Arg-Gln (KFERQ) (Dice, 1990). Queste proteine vengono riconosciute da un complesso multimerico formato da chaperoni molecolari citosolici tra cui Hsc70 (*Heat shock cognate protein, 70kDa*), che le trasloca verso la membrana lisosomiale; qui le proteine, che hanno perso la loro struttura terziaria, interagiscono con recettori di membrana lisosomiali LAMP2A (*Lysosomal-Associated Membrane protein 2A*) e vengono trasportate all'interno del lume dei lisosomi (Cuervo e Dice, 1996; Agarraberes e Dice, 2001).

La microautofagia è un processo mediante il quale il contenuto citoplasmatico viene sequestrato direttamente dal lisosoma attraverso la formazione di invaginazioni multiple e il rimodellamento delle membrane lisosomiali. In questo modo viene garantito un continuo e fisiologico turnover di proteine citoplasmatiche (Tekirdag e Cuervo, 2018).

La macroautofagia, o più semplicemente autofagia, è il meccanismo meglio studiato e conosciuto, caratterizzato da una successione di eventi che definiscono varie fasi: induzione, elongazione e maturazione dell'autofagosoma, fusione dell'autofagosoma con il lisosoma e infine degradazione dell'autofagolisosoma (Levine e Kroemer 2019). Durante le fasi di induzione, elongazione e maturazione, membrane isolate dette fagofori, formatesi all'interno del citoplasma, inglobano le componenti da degradare dando origine agli autofagosomi, vescicole a doppia membrana, che vengono indirizzati ai lisosomi. Da alcune osservazioni sembra che la doppia membrana dell'autofagosoma derivi dal reticolo endoplasmatico anche se questo non sembra essere l'unico organello coinvolto; altri studi hanno dimostrato la presenza di marcatori molecolari specifici del mitocondrio, dell'apparato del Golgi e della membrana plasmatica (Tooze e Yoshimori, 2010). La

fusione tra autofagosoma e lisosoma dà luogo alla formazione degli autofagolisosomi, che contengono gli enzimi litici lisosomiali responsabili della degradazione del materiale nel loro interno.

2.1 Il macchinario autofagico

L'autofagia è regolata da un set di geni inizialmente identificati grazie a studi genetici condotti su lieviti (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* e *Hansenula polymorpha*) conosciuti come ATG (*AuTophagy-related genes*) (Klionsky et al., 2003). Fino ad oggi, i geni ATG identificati sono circa 35 e codificano per proteine (Atg) classificate in distinti gruppi biochimici e funzionali e che agiscono in specifiche fasi della genesi dell'autofagosoma (Reggiori, 2006) (Fig. 5).

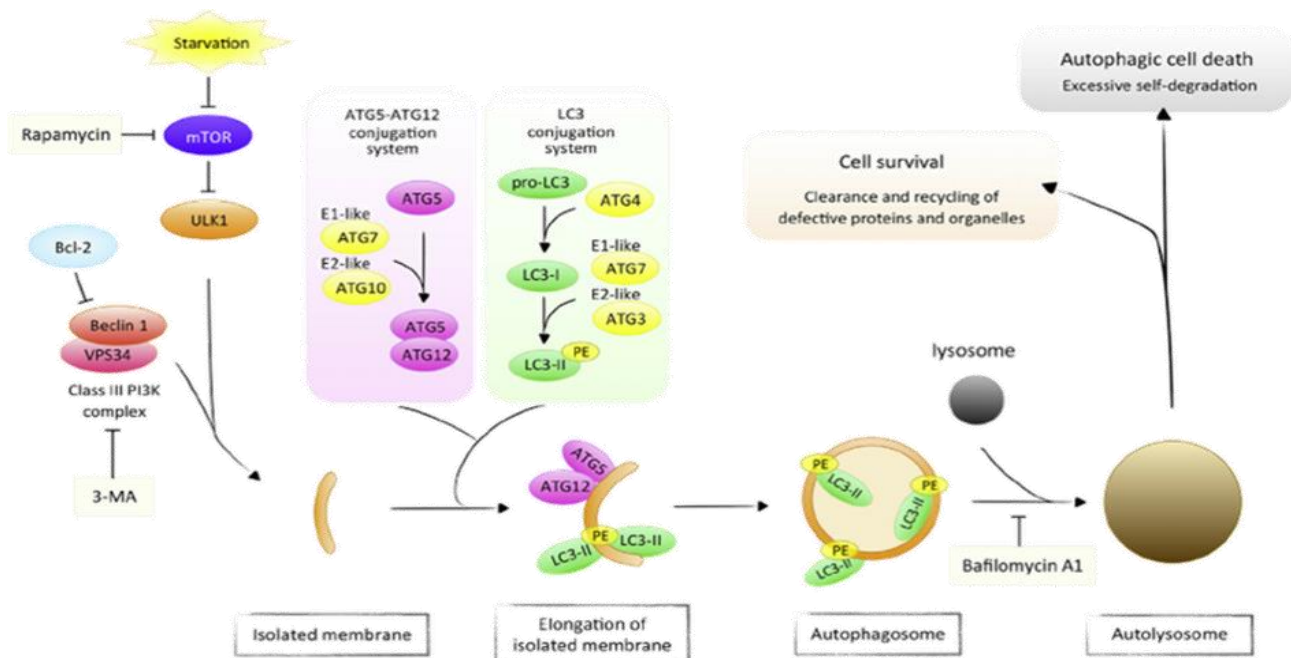


Figura 5. Il macchinario autofagico (Murakami et al, 2013).

2.1.1 Induzione

Nel lievito il segnale di induzione di autofagia è dato da una proteina serina/treonina chinasi Atg1. Nei mammiferi sono state identificate proteine omologhe ad Atg1 quali Unc-51-like Chinasi 1 e 2 (ULK1 e ULK2) (Chan et al., 2007; Murakawa et al., 2019). Sia Atg1 che ULK1/2 esistono come parte di un complesso che vede coinvolte le proteine mAtg13 (Atg13 nel lievito) e RB1CC1/FIP200 (*RB1-inducible coiled-coil 1*), che è l'ortologo di Atg17 nel lievito. Nei mammiferi è stata identificata un'altra proteina essenziale per l'autofagia ma di cui non si conosce la funzione, ovvero la proteina

Atg101 (nei lieviti non è stato identificato l'ortologo) che si lega ad ULK1/2 in maniera mAtg13-dipendente (Hosokawa et al., 2009; Jung et al., 2009).

Atg1 e ULK1/2 sono proteine altamente fosforilate e la loro attivazione è regolata dal complesso I del target della rapamicina (TORC1; nei mammiferi mTORC1) che ne determina lo stato di fosforilazione.

In condizioni di abbondanza di nutrienti mTORC1 si associa e fosforila il complesso ULK1/2-mAtg13-RB1CC1/FIP200 determinandone l'inattivazione. Viceversa, la deprivazione di nutrienti o la presenza di rapamicina causano la rapida dissociazione di mTORC1 che si traduce in una parziale defosforilazione del complesso da parte di fosfatasi ancora non identificate (Hosokawa et al., 2009; Parzych e Klionsky, 2014).

Questo evento dà l'avvio ad una serie di eventi fosforilativi a valle che coinvolgono diverse proteine e che determineranno l'inizio della formazione del fagoforo.

2.1.2 Elongazione e formazione delle vescicole

L'inizio della formazione del fagoforo è strettamente connesso all'attività della fosfatidilinositolo-3-chinasi di classe 3 (PIK3C3, nel lievito Vsp34), deputata alla produzione di fosfatidilinositolo-3-fosfato (PtdIns3P). La funzione del prodotto di reazione, quale PtdIns3P, si pensa possa essere quello di reclutare effettori a valle, che presentano specifici siti di legame, come i domini PX (*Phox Omology*) e *zing finger* FYVE (Burman e Ktistakis, 2010).

La PIK3C3 forma un complesso stabile a livello della struttura pre-autofagosomale (PAS) con la Beclina-1 (*coiled-coil, myosin-like BCL2-interacting protein*; omologo di Atg6 nel lievito), PIK3R4/p150 (*Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4*; omologo di Vps15 nel lievito) e Atg14. L'attività di questo complesso è strettamente controllata da regolatori positivi e negativi (Parzych e Klionsky, 2014).

La regolazione del complesso avviene prevalentemente attraverso la proteina Bcl2 (*B-cell lymphoma 2*), un fattore anti-apoptotico che lega la Beclina-1 impedendone l'interazione con gli altri elementi del complesso, inibendo di fatto così il processo autofagico (Pattingre et al., 2005). In condizioni di carenza di nutrienti è stato dimostrato che l'enzima JNK1 (*c-Jun N-terminal Kinase 1*) fosforila Bcl2 a livello dei residui di serina e treonina determinando il rilascio della Beclina-1 (Wei et al., 2008).

Altri fattori determinanti nella modulazione del processo autofagico sono AMBRA1 (*Activating Molecule in Beclin1-regulated Autophagy*) e UVRAG (*UV irradiation resistance-associated gene*), entrambi regolatori positivi di autofagia (Fimia et al. 2007; Liang et al., 2007).

2.1.3 Maturazione dell'autofagosoma

I processi di espansione della membrana del fagoforo e di chiusura dell'autofagosoma sono operati in modo coordinato da due sistemi di coniugazione simili all'ubiquitina che vedono coinvolte principalmente le proteine Atg12 e Atg8/LC3 (Nakatogawa et al., 2013).

Il primo sistema identificato è stato quello che vede la formazione di un complesso multimerico Atg12-Atg5-Atg16L che localizza sulla membrana delle vescicole in formazione. In un primo momento la proteina Atg12 viene attivata in maniera ATP-dipendente dalla proteina Atg7 (omologa all'enzima attivatore dell'ubiquitina, E1) e successivamente viene legata covalentemente alla proteina Atg5 grazie all'attività dell'enzima Atg10 (omologo all'enzima coniugatore dell'ubiquitina, E2) (Parzych e Klionsky, 2014). Avvenuta la coniugazione Atg12-Atg5, che è un processo irreversibile, la formazione del complesso viene completata dal legame non covalente della proteina Atg16L alla proteina Atg5. Uno dei ruoli di questo complesso multimerico si pensa possa essere quello di dirigere e influenzare la curvatura delle membrane durante la formazione dell'autofagosoma. Il sistema Atg12-Atg5-Atg16L si associa al fagoforo ma, una volta avvenuto il completamento del processo, viene rilasciato nel citosol dissociandosi dall'autofagosoma maturo.

Il secondo sistema di coniugazione è Atg8/LC3-PE (PE, fosfatidiletanolamina). La proteina LC3 (*Microtubule-associated proteins 1 light chain 3*), il cui ortologo nel lievito è Atg8, ha diverse implicazioni nel processo autofagico essendo coinvolta nell'espansione delle membrane dell'autofagosoma, nel reclutamento del materiale da degradare e nella fusione tra autofagosoma e lisosoma (Tanida et al., 2004). Nell'uomo esistono diverse isoforme di LC3 divise in sottofamiglia LC3 (LC3A, -B, -B2, -C) e sottofamiglia GABARAP (*Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein*), tra queste l'isoforma meglio conosciuta e studiata è LC3B (Agrotis et al., 2019).

La reazione di coniugazione che prevede il legame del lipide PE alla proteina LC3 è catalizzata da due enzimi: Atg7 e Atg3 (quest'ultimo, come Atg10, è omologo all'enzima coniugatore dell'ubiquitina, E2).

Prima del processo di coniugazione la proteina LC3 neosintetizzata subisce un taglio proteolitico nella porzione C-terminale da parte della proteasi cisteinica Atg4, producendo la forma matura citosolica LC3-I. A differenza dei lieviti, in cui esiste una sola proteina Atg4, nei mammiferi sono presenti quattro isoforme (Atg4A, -B, -C, e -D) molto simili tra di loro, di cui quella maggiormente attiva e funzionale è Atg4B (Agrotis et al., 2019). Il taglio di LC3 effettuato dall'enzima proteolitico causa l'esposizione del residuo di glicina che lega un residuo di cisteina della proteina Atg7, stesso enzima usato nel sistema di coniugazione Atg12-Atg5. In questo modo la proteina LC3-I attivata

viene trasferita sull'enzima Atg3 e con esso forma un legame tioestere. Questa fase finale è essenziale affinché la proteina LC3-I possa essere coniugata con la PE attraverso un legame ammidico tra la glicina esposta all'estremità C-terminale e il gruppo amminico della fosfatidiletanolamina (Ichimura et al., 2000). La proteina LC3-I che ha subito il processo di lipidazione è definita LC3-II; questa è strettamente associata sia alla membrana esterna che interna della vescicola. A differenza della coniugazione Atg12-Atg5, la lipidazione LC3-PE è un processo reversibile (Kirisako et al., 2000). Nello specifico soltanto il pool associato alla membrana esterna dell'autofagosoma, quindi esposto nello spazio citosolico, viene riciclato poiché la proteasi Atg4 la scinde dalla PE. Le proteine LC3-II associate alle membrane interne verranno invece degradate dagli enzimi presenti nei lisosomi (Kabeya et al, 2000).

2.2 La mitofagia

Oltre ai fenomeni di autofagia non selettiva, precedentemente descritti, che interessano in maniera non distinta gli elementi del citoplasma, esistono dei meccanismi di autofagia selettiva che prevedono la degradazione di specifici organelli danneggiati o superflui (Youle e Narendra, 2011; Gatica et al., 2018).

Nell'ambito dell'omeostasi mitocondriale tale meccanismo prende il nome di mitofagia e rappresenta un fenomeno di notevole interesse poiché influenza numerosi processi fisiologici (ad esempio sviluppo e invecchiamento) e una sua disfunzione è associata all'insorgenza di diverse patologie neurodegenerative e cancro (Pickles et al., 2018).

Il processo mitofagico meglio conosciuto è quello che vede coinvolte le proteine *PTEN-induced kinase 1* (PINK1) e Parkin, responsabili se mutate dell'insorgenza della malattia di Parkinson. PINK1 è una serina/treonina protein-chinasi che in condizioni fisiologiche viene reclutata nella matrice mitocondriale, clivata da specifiche proteasi e successivamente rilasciata nel citosol per la degradazione (Harper et al., 2018). Quando la funzione mitocondriale è gravemente alterata, l'eventuale perdita del potenziale di membrana non consente l'internalizzazione della proteina che così si accumula sulla membrana mitocondriale esterna attivandosi mediante autofosforilazione. PINK1 attivata fosforila catene di ubiquitina preesistenti sulla OMM (Mishra e Chan, 2016). L'ubiquitina fosforilata recluta Parkin, una E3 ubiquitina ligasi, che viene a sua volta attivata mediante fosforilazione da parte di Pink1. La forma attivata di Parkin determina un'ulteriore ubiquitinazione di proteine della OMM, fornendo così più substrati per la fosforilazione da parte di PINK1 (Chin e Li, 2016). Viene pertanto innescato così un meccanismo a feedback positivo che porta

ad un rapido incremento di ubiquitina sulla OMM, che rappresenta un segnale per il reclutamento di recettori autofagici come la optineurina (OPTN) e il sequestosoma 1 (SQSTM1, conosciuto come p62). Questi, legando LC3-II, assicurano che i mitocondri vengano inglobati dall'autofagosoma e quindi indirizzati ai lisosomi (Hamacher-Brady e Brady, 2016).

La mitofagia può anche essere indotta da stress cellulari che determinano l'attivazione di AMPK (5'-AMP-activated protein kinase) che a sua volta attiva ULK1/2 mediante fosforilazione di sei residui di serina (Zhang et al., 2016). AMPK contemporaneamente inibisce il *pathway* di mTORC1, bloccando in questo modo la sua azione inibitoria su ULK (Egan et al., 2011). Questo processo mitofagico è preceduto dall'attivazione del fattore di fissione mitocondriale MFF da parte di AMPK che ha come risultato la frammentazione dell'organello (Seabright et al., 2020).

3. Mitochondria-Associated Membranes (MAMs)

Gli organelli cellulari sono stati storicamente considerati come entità con funzioni ed organizzazioni ben distinte. Più di recente è invece emerso che all'interno delle cellule eucariotiche le membrane dei diversi organelli, così come la membrana plasmatica, rappresentano strutture altamente dinamiche che governano molteplici processi cellulari indispensabili per l'integrità cellulare e per una corretta fisiologia dei tessuti (Lee e Min, 2018). Il normale funzionamento e la sopravvivenza delle cellule vengono garantiti attraverso la compartimentazione dei processi metabolici. Ad oggi numerose evidenze indicano che gli organelli citoplasmatici, pur avendo ruoli biologici distinti, stabiliscono tra loro una rete di comunicazione che li rende interdipendenti; per tale ragione, essi sono disposti ed organizzati in modo tale che le loro membrane possano prendere contatto e stabilire delle interazioni funzionali (Vance, 2014).

Le prime evidenze di uno stretto contatto tra le membrane, nello specifico tra il reticolo endoplasmatico e la membrana mitocondriale esterna, furono descritte da Wilhelm Bernhard negli anni Cinquanta del Novecento e successivamente confermate da altri ricercatori (Bernhard et al., 1952; Bernhard et al., 1956; Copeland et al., 1959). Successivamente, studi basati su metodiche di frazionamento subcellulare portarono al co-isolamento delle membrane del reticolo endoplasmatico con i mitocondri (Lewis e Tata, 1973). Fu Jean Vance a coniare il termine MAMs (*Mitochondria-Associated Membranes*) e a dimostrare che il reticolo endoplasmatico stabilisce dei contatti fisici con i mitocondri per consentire un corretto ed efficiente scambio di lipidi tra i due organelli (Vance, 1990). I microdomini che si formano tra il RE ed il mitocondrio sono stati oggetto

di approfondimento e diversi studi hanno messo in luce che l'interfaccia tra i due organelli rappresenta una piattaforma necessaria per la regolazione di diversi processi come la sintesi e trasporto dei lipidi, ma anche il *signaling* del calcio, l'autofagia, la dinamica mitocondriale e l'apoptosi (Raturi e Simmen, 2013).

L'interazione tra il RE ed i mitocondri si realizza attraverso una serie di ponti proteici di 15-30 nm di lunghezza, distanza che si riduce a 10 nm in condizioni di stress cellulare; tuttavia il meccanismo coinvolto in tale processo rimane ancora poco chiaro (Herrera-Cruz e Simmen, 2017). Il subset proteico che determina il contatto tra i due organelli è vario: sono stati identificati canali ionici per il Calcio, come IP3R (*Inositol 1,4,5 triphosphate receptor*) e VDAC1 (*voltage dependent anion channel 1*), proteine coinvolte nella sintesi e nello scambio dei lipidi, altre coinvolte nello smistamento di proteine come PACS-2 (*Phosphofurin acidic cluster sorting protein 2*), varie chaperonine come GRP75 (*Glucose-regulated protein 75*), e proteine implicate nella dinamica mitocondriale come MFN2 e DRP1 (van Vliet et al., 2014) (Fig. 6).

Diversi studi supportano un coinvolgimento del RE nei processi di fusione e fissione mitocondriale. A tal proposito non sorprende quindi che le proteine coinvolte nel rimodellamento delle membrane come MFN1/2 possano essere implicate nelle interazioni tra i due organelli (Marchi et al., 2014).

Mentre a livello mitocondriale la MFN2 regola la dinamica della OMM, nelle MAMs agisce da modulatore stabilizzando le connessioni tra mitocondri ed ER attraverso la formazione di complessi omo-dimerici o etero-dimerici rispettivamente con MFN2 e MFN1 localizzate sulla OMM (de Brito e Scorrano, 2008).

A differenza di MFN2, DRP1 e PACS-2 regolano la morfologia e le interazioni tra le membrane dei due organelli, pur non prendendo fisicamente parte al processo. PACS-2 è un enzima che riconosce e lega proteine che presentano una particolare sequenza di riconoscimento, *acidic cluster*, per poi veicolarle verso specifici organelli (Li et al., 2020). È noto che PACS-2 non sia semplicemente deputata allo smistamento di proteine ma che regoli diversi e determinanti processi cellulari come il *signaling* del calcio, l'apoptosi e la formazione di una corretta struttura delle MAMs (Simmen et al., 2005; Li et al., 2020).

Diversi studi dimostrano che il knockout di PACS-2 causa la perdita della formazione dei siti di contatto tra mitocondrio e RE e la conseguente frammentazione delle membrane mitocondriali. Infatti l'assenza della proteina induce, attraverso l'attivazione della caspasi-8, il taglio proteolitico di Bap31 (*B-cell receptor-associated protein 31*), proteina integrale di membrana del RE e presente a livello delle MAMs, promuovendo così il rilascio di ioni calcio dal reticolo endoplasmatico ai

mitocondri e quindi la fissione mitocondriale attraverso il reclutamento di DRP1 (Simmen et al., 2005).

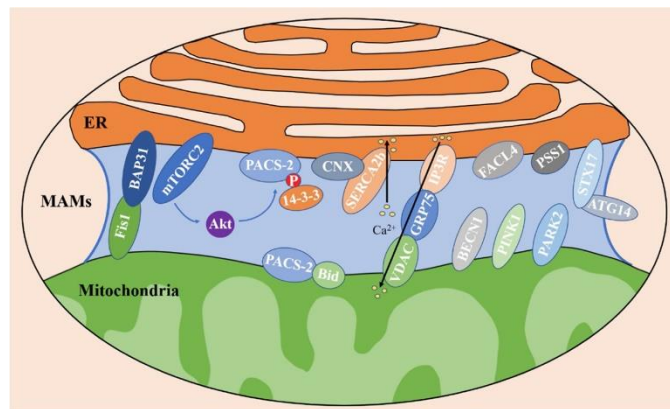


Figura 6. Mitochondria-associated membranes (Li et al., 2020).

3.1 Biosintesi e trasporto dei lipidi

La membrana del reticolo endoplasmatico è la sede di sintesi della maggior parte dei lipidi che vengono successivamente distribuiti ai vari organelli. Poiché i lipidi sono molecole idrofobiche, il loro trasporto attraverso il citoplasma risulta energeticamente sfavorevole. Nel corso degli anni sono state avanzate diverse ipotesi in grado di spiegare tale fenomeno. Ad oggi risulta chiaro che il trasporto bidirezionale di fosfolipidi sia favorito dalla formazione di siti di contatto tra i due organelli e quindi dalle MAMs, che risultano caratterizzate da un proteoma specializzato che ne influenza struttura e funzione. Come già esposto, questo sottodominio è stato inizialmente identificato proprio per il suo coinvolgimento nell'immagazzinamento, nel trasporto e nel metabolismo di diverse classi di lipidi. Infatti le MAMs presentano sia proteine coinvolte nel trasferimento di queste macromolecole che enzimi di biosintesi lipidica, tra cui l'acilcoenzima A-colesterolo aciltransferasi (ACAT), la diacilglicerolo O-aciltransferasi 2 (DGAT2), la fosfatidiletanolamina N-metiltransferasi (PEMT2), la fosfatidilserina sintasi 1 e 2 (PSS1 e PSS2), l'acetil-coenzima A sintetasi (ACS4, nota anche come FACLA) e una specifica proteina di trasporto degli acidi grassi quale FATP4 (Raturi e Simmen, 2013; Janikiewicz et al., 2018)

Una fase cruciale della biosintesi dei lipidi è la sintesi dell'acido fosfatidico (PA) nel RE. Una frazione di PA può essere trasferita alla IMM; questo processo è garantito dal complesso TRIAP1/PRELID1 che media il trasporto intramitocondriale del lipide, attraverso lo spazio intermembrana (Potting et al., 2010; Potting et al., 2013; Miliara et al., 2019). L'acido fosfatidico può essere convertito in due

composti intermedi, il citidin difosfato diacilglicerolo (CDP-DAG), grazie all'enzima citidindifosfato-diacilglicerolosintasi (CDS), e il diacilglicerolo (DAG), mediante l'idrolisi del gruppo fosfato catalizzata da LIPIN1, una fosfatasi PAP1 (*phosphatidate phosphatase type-1*) (Zhang P e Reue, 2017; Blunsom e Cockcroft, 2020). CDP-DAG porta alla sintesi di fosfatidilinositolo (PI) e cardiolipina (CL), invece DAG di glicerofosfolipidi azotati tra cui la fosfatidilserina (PS), la fosfatidilcolina (PC) e la fosfatidiletanolamina (PE) (Zhang P e Reue, 2017; Lutkewitte e Finck, 2020).

La PS, precursore della PC, viene sintetizzata principalmente nel reticolo endoplasmatico e nelle MAMs dove si concentra l'attività della PSS1 e della PSS2 e quindi trasportata al mitocondrio dove viene convertita in PE attraverso la reazione di decarbossilazione svolta dalla fosfatidilserina decarbossilasi (PSD) (Vance e Tasseva, 2013). A questo punto la PE può essere veicolata al RE attraverso un meccanismo che rimane ancora sconosciuto e qui convertita in PC da PEMT2 (Vance, 2014) (Fig. 7). Uno studio recente ha messo in luce che la MFN2 svolge un ruolo cruciale nel metabolismo dei fosfolipidi (Hernández-Alvarez et al., 2019). MFN2 permette infatti il trasporto della PS dal reticolo endoplasmatico alle membrane mitocondriali arricchendo quest'ultime di PE, un lipide che influenza la morfologia mitocondriale (Tasseva et al., 2013; Hernández-Alvarez et al., 2019). È stato infatti dimostrato che la PE favorisce la fusione mitocondriale, in quanto l'abbassamento dei suoi livelli causato, per esempio, dal knockout dell'enzima PSD o della MFN2 stessa, provoca la frammentazione delle membrane del mitocondrio (Vance e Tasseva, 2013; Zhao et al., 2019; Hernández-Alvarez et al., 2019).

Le membrane mitocondriali hanno una particolare composizione lipidica e risultano primariamente composte da fosfolipidi. Il 30-40% del totale dei fosfolipidi sono rappresentati da PE e PC, al contrario l'acido fosfatidico e la PS sono presenti a livelli inferiori (Horvath e Daum, 2013; Kameoka et al., 2018). La cardiolipina è l'unico fosfolipide che localizza e viene sintetizzato in modo specifico nella membrana mitocondriale interna; soltanto una piccola frazione è esportata nella OMM e qui idrolizzata dalla MitoPLD (*Mitochondria-localized phospholipase D*) per essere convertita nuovamente in PA (Adachi et al., 2016; Kameoka et al., 2018). La CL svolge un ruolo chiave nella morfologia del mitocondrio, nella corretta organizzazione dei complessi proteici della catena di trasporto degli elettroni e del macchinario di import della IMM, nella mitofagia e nei processi apoptotici (Mejia e Hatch, 2016; Paradies et al., 2019).

Un numero crescente di evidenze suggerisce che il mantenimento di una corretta composizione di fosfolipidi nelle membrane mitocondriali sia essenziale per l'integrità funzionale e strutturale dell'organello.

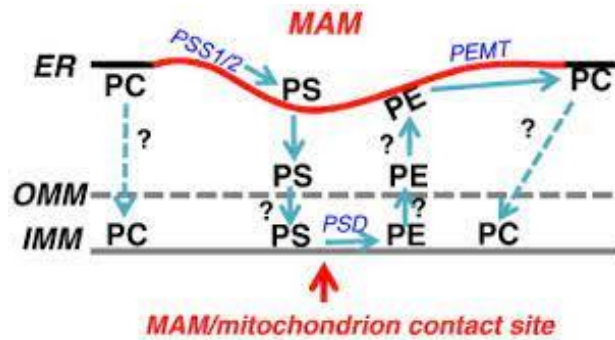


Figura 7. Trasporto di fosfolipidi attraverso le MAMs (Vance, 2014).

3.2 L'omeostasi e il segnale del calcio

Lo ione calcio rappresenta un secondo messaggero ubiquitario e necessario alla trasduzione di segnali cellulari (Patergnani et al., 2011).

Nelle cellule eucariotiche la concentrazione di calcio intracellulare è finemente regolata da pompe, proteine e complessi multi-proteici localizzati sia sulla membrana plasmatica che sulle membrane di specifici organelli. Queste proteine hanno la capacità di legare e scambiare ioni Ca^{2+} con l'ambiente esterno o di immagazzinarli come fonte di riserva all'interno di determinati compartimenti intracellulari.

La bassa permeabilità della membrana plasmatica e la presenza di canali ionici garantiscono una differenza di concentrazione di Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]$) tra il citosol, dove si mantiene intorno ai 100nM, e l'ambiente extracellulare dove raggiunge valori significativamente più elevati (1mM) (Rizzuto et al., 2009). Tuttavia, in seguito a stimoli elettrici o chimici, la mobilitazione di ioni Ca^{2+} dai depositi interni o dallo spazio extracellulare può provocare un repentino e temporaneo incremento della $[\text{Ca}^{2+}]$ nel citosol, raggiungendo valori che possono arrivare a 1-2 μM (Patergnani et al., 2011).

Il reticolo endoplasmatico rappresenta il principale deposito intracellulare di ioni Ca^{2+} ; il meccanismo centrale con cui avviene il rilascio del calcio dall'organello vede implicati i recettori dell'inositolo trifosfato (IP3Rs) e i recettori della rianodina (RyRs). I primi sono composti da quattro subunità e presentano una struttura caratterizzata da una porzione N-terminale idrofobica che sporge nello spazio citoplasmatico, sei eliche transmembrana e una piccola regione C-terminale (Patterson et al., 2004; Patergnani et al., 2011). L'attivazione del recettore IP3R è determinata dal legame dell'inositolo-1,4,5-trifosfato (IP3) alla porzione citoplasmatica che induce un cambiamento conformazionale con conseguente apertura del dominio di membrana e la diffusione di calcio dal deposito intracellulare (Rizzuto et al., 2009).

Il recettore della rianodina (RyR) è un canale omo-tetramericico che viene attivato dall'alcaloide rianodina e dallo stesso ione calcio che induce un processo definito "*calcium induced calcium release*" (CICR) (Lanner et al., 2010; Van Petegem et al., 2012).

Oltre al reticolo endoplasmatico, anche i mitocondri svolgono un ruolo importante nel mantenimento dell'omeostasi del calcio (Reddish et al., 2017). Il rilascio e la captazione attraverso la membrana mitocondriale esterna e la conseguente disponibilità di Ca^{2+} nello spazio intermembrana sono modulati dal canale anionico voltaggio- dipendente 1 (Shoshan-Barmatz et al., 2017). VDAC1, grazie alla formazione del complesso IP3R/GRP75/VDAC, prende parte all'interscambio di calcio tra il reticolo endoplasmatico e i mitocondri nelle regioni in cui le membrane dei due organelli prendono contatto (Csordás et al., 2006).

Il rapido passaggio di ioni calcio verso la matrice mitocondriale è permesso da un complesso proteico localizzato nella membrana mitocondriale interna, l'uniporato mitocondriale del calcio (MCU), che sfrutta a tale scopo il gradiente elettrochimico transmembrana (De Stefani et al., 2015; Mishra et al., 2017).

I trasportatori mitocondriali del calcio sono dei sistemi a bassa affinità; ciononostante, nell'interfaccia con il reticolo endoplasmatico, l'elevata $[\text{Ca}^{2+}]$ favorita dall'apertura dei canali del calcio del RE permette ai mitocondri di accumulare facilmente gli ioni Ca^{2+} (Fig. 8).

La rete di interscambio tra mitocondri e reticolo endoplasmatico e la conseguente formazione delle MAMs garantiscono il mantenimento dell'omeostasi del calcio, svolgendo un ruolo chiave nella regolazione del metabolismo mitocondriale e dei processi apoptotici (Pinton et al., 2008).

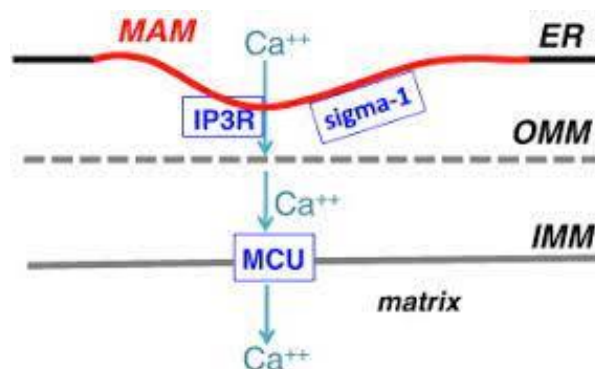


Figura 8. Flusso degli ioni calcio tra mitocondrio e reticolo endoplasmatico (Vance, 2014).

4. OPA3 (Optic Atrophy 3), una proteina mitocondriale di incerta funzione

OPA3 è una proteina codificata dal genoma nucleare, il cui gene è stato mappato sul braccio lungo del cromosoma 19 (19q13.2–13.3) ed è costituito da tre esoni (Nystuen et al., 1997; Huizing et al., 2010). Le sequenze nucleotidiche dell'esone 2 e dell'esone 3, compresi i confini introne-esone, hanno una omologia dell'80% suggerendo un possibile evento di duplicazione segmentale, ciò supportato dalla presenza di un elemento di trasposizione (LINE-1) situato a circa 24 Kb a monte dell'esone 2 (Huizing et al., 2010) (Fig. 9).

Mediante un processo di *splicing* alternativo che vede coinvolti gli esoni 2 e 3 (quest'ultimo talvolta riportato in letteratura come esone 2b) vengono generati due diversi trascritti; OPA3A (esone 1 ed esone 2) codificante per l'isoforma OPA3V1 (NP_079412.1), mentre OPA3B (esone 1 ed esone 3) codificante per l'isoforma OPA3V2 (NP_001017989.2) (Sergouniotis et al., 2015).

Le due varianti della proteina hanno un peso molecolare di circa 20 kDa e sono costituite rispettivamente da 179 e 180 amminoacidi. Esse presentano una struttura molto simile e sono caratterizzate da una sequenza di target mitocondriale (*Mitochondrial target sequence*, MTS) nel dominio N-terminale, che comprende una sequenza con segnale di smistamento verso il mitocondrio (*Mitochondrial sorting signal*) situata tra i residui amminoacidici 25-29 (NRIKE), e un dominio transmembrana (TM) (Huizing et al., 2010). La presenza della MTS e del dominio TM ha suggerito che le due proteine possano localizzare nei mitocondri e che nello specifico siano ancorate alle membrane (Da Cruz et al., 2003; Huizing et al., 2010; Ryu et al., 2010). Alcuni ricercatori, mediante indagini di proteomica, hanno ipotizzato che la proteina localizzasse nella membrana mitocondriale interna (Da Cruz et al., 2003). Tuttavia, negli anni successivi, Ryu e colleghi hanno dimostrato che OPA3 localizzava nella membrana mitocondriale esterna (Ryu et al., 2010). Studi più recenti condotti sulla proteina OPA3 con una particolare mutazione (c.10_11insCGCCCG/p.V3_G4insAP) che determina l'inserzione di due amminoacidi nel sito MTS (esone 1) dimostrano che, sebbene non ci siano differenze nell'*import* mitocondriale tra la proteina mutante e la forma *wild type*, trattamenti con un agente disaccoppiante (Carbonil cianuro m-clorofenil idrazone, CCCP) ne determinano una ridotta importazione nei mitocondri (Grau et al., 2013). Ciò suggerisce che il potenziale di membrana sia necessario allo smistamento della proteina verso l'organello. Poiché per la localizzazione delle proteine nella membrana esterna non è necessario un intatto potenziale di membrana, si deduce che OPA3 possa localizzare nella IMM (Grau et al., 2013).

Nonostante numerose evidenze indichino la sua localizzazione mitocondriale, possibilmente nella membrana interna, il tema della localizzazione di OPA3 nella IMM o nella OMM rimane ad oggi controverso.

Inoltre, OPA3 contiene nella porzione C-terminale un tripeptide (SKK e SEK rispettivamente nelle isoforme OPA3V1 e OPA3V2) simile al segnale di indirizzamento ai perossisomi (*Peroxisomal targeting signal type 1*; SKL), ma la possibilità che queste possano essere delle effettive e funzionali sequenze di *targeting* perossisomiale è stata esclusa (Powell et al., 2011; Navein et al., 2016).

Sebbene ad oggi non sia chiara la sua funzione, OPA3 sembra essere coinvolta nella regolazione della morfologia mitocondriale. Studi funzionali condotti sulla linea cellulare HeLa hanno messo in luce che l'overespressione della proteina determina una diffusa frammentazione del *network* mitocondriale, al contrario i mitocondri risultano filamentosi e tubulari in seguito alla down-regolazione effettuata mediante siRNA (Ryu et al., 2010).

Inoltre, difetti in OPA3 sembrano influenzare la funzionalità mitocondriale. In fibroblasti derivati da pazienti con mutazione c.313C>G (p.Q105E) sono stati infatti riscontrati una riduzione del potenziale di membrana mitocondriale e un difetto nella capacità respiratoria, seppur con livelli di ATP simili ai controlli, possibilmente in conseguenza di meccanismi di compensazione (Chevrollier et al., 2008; Davies et al., 2008).

Un altro possibile ruolo di OPA3 potrebbe essere la regolazione del metabolismo dei lipidi, considerato che in pazienti con mutazioni dominanti o recessive sono state osservate forme di lipodistrofia di entità variabile (Bourne et al., 2017). Le stesse evidenze erano state precedentemente riscontrate in modelli murini con mutazione nel gene *Opa3* c.365T>C (p.L122P) in cui si registrava una importante riduzione del peso corporeo correlata alla perdita del tessuto adiposo (Wells et al., 2012).

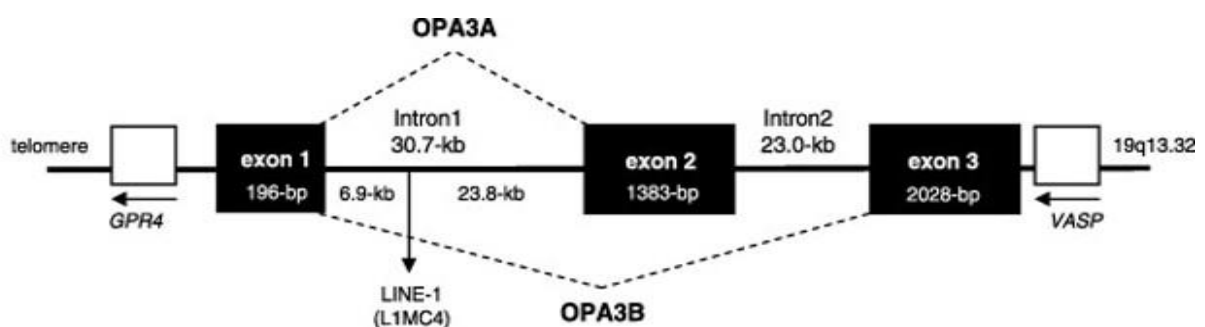


Figura 9. Struttura del gene OPA3 (Huizing et al., 2010).

4.1 OPA3 e le neuropatie ottiche ereditarie

Il termine “neuropatie ottiche ereditarie” si riferisce ad un gruppo di malattie che presentano caratteristiche genetiche e cliniche altamente eterogene, ma che allo stesso tempo sono caratterizzate da aspetti comuni quali la degenerazione selettiva delle cellule gangliari della retina e la lesione del nervo ottico (atrofia ottica) (Carelli et al., 2009; Lenaers et al., 2012; Maresca et al., 2013). Tali patologie, caratterizzate da deficit del campo visivo associato in genere alla perdita della visione centrale, bilaterale e simmetrica, hanno un esordio precoce e si manifestano nell’infanzia o nell’adolescenza (Maresca et al., 2013). Disfunzioni mitocondriali possono essere determinanti nella fisiopatologia di questi disturbi; infatti mutazioni sia nel mtDNA che a carico di geni nucleari codificanti per proteine mitocondriali sono alla base dell’insorgenza di diversi tipi di atrofie ottiche (Carelli et al., 2004; Maresca et al., 2014).

È noto che la proteina OPA3 svolge un importante ruolo nella patogenesi di due malattie neurodegenerative. Mutazioni recessive nel gene *OPA3* determinano l’insorgenza di una forma di atrofia ottica ereditaria sindromica, autosomica recessiva, conosciuta come aciduria 3-metilglutaconica tipo 3 (3-MGA III) o Sindrome di Costeff, mentre mutazioni dominanti sono associate ad una forma di atrofia ottica dominante caratterizzata anche da cataratta e sordità (ADOAC) (Nystuen et al., 1997; Reynier et al., 2004; Neas et al., 2005).

L’aciduria 3-metilglutaconica tipo 3 è stata descritta per la prima volta nel 1989 da Hanan Costeff ed è una rara patologia neuro-oftalmologica caratterizzata da atrofia ottica bilaterale infantile (pallore del disco ottico, ridotta acuità visiva) e coreoateosi associate ad un aumento dei livelli di acido 3-metilglutaconico e 3-metilglutarico nelle urine, a cui segue un successivo quadro clinico che comprende deficit cognitivo, paraparesi spastica e atassia con esordio nella seconda decade di vita (Costeff et al., 1989; Costeff et al., 1993; Anikster et al., 2001). Studi basati su organismi mutati di *Zebrafish* (*Danio rerio*), proposti come modelli della Sindrome di Costeff, hanno supportato l’ipotesi di una possibile funzione protettiva oltre che metabolica di OPA3, proponendo dunque un ruolo della proteina nei processi di preservazione della catena di trasporto degli elettroni dai danni dell’acido 3-metilglutaconico e 3-metilglutarico (Pei et al., 2010).

Originariamente furono tre le mutazioni in omozigosi identificate nel gene *OPA3* e causative della 3-MGA III: una mutazione nel sito accettore di *splicing* dell’introne 1 (c.143-1G<C), che abolisce l’espressione dell’ mRNA, riscontrata in 40 soggetti affetti di origine ebraica Irachena; una delezione *in frame* di 18 paia di basi nell’esone 2 (c.320_337del, p.Q108_E113del) in un paziente curdo-turco;

una mutazione nonsense c.415C>T (p.Q139X) in un soggetto di origine asiatica (Anikster et al., 2001; Kleta et al., 2002; Ho et al., 2008).

Nel corso degli anni sono state identificate ulteriori varianti: c.1A<G (p.M1V), c.32 T<A (p.L11Q), c.142+5G<C (sito donatore dell'introne 1), c.143-1G<C (sito accettore dell'introne 1), c.142-3G>C (sito accettore introne 1) (Arif et al., 2013; Lam et al., 2014). Recentemente, mediante sequenziamento completo dell'esoma (*Whole Exome Sequencing*) è stata rilevata in una famiglia afgana una nuova mutazione omozigote nel sito donatore di *splicing* tra esone 1 e introne 1, c.142 + 2_142 + 3dupTG (IVS1 + 2_IVS1 + 3dupTG) (Gaier et al., 2019).

L'atrofia ottica autosomica dominante (ADOA) è una delle forme più comuni di neuropatia ottica ereditaria ed è stata descritta per la prima volta da Kjer (Kjer, 1959; Votruba et al., 1998a, b). La proteina primariamente coinvolta nella patologia è OPA1, dato che il 60-80% dei casi di pazienti affetti da DOA presenta mutazioni nel gene *OPA1* (Delettre et al., 2000; Toomes et al., 2001; Thiselton et al., 2002; Li et al., 2017). Tuttavia, l'atrofia ottica dominante è stata anche associata a mutazioni nel gene nucleare *OPA3* (Reynier et al., 2004; Yu-Wai-Man et al., 2011; Chen et al., 2014). In quest'ultimo caso, oltre alla perdita della vista causata dalla degenerazione del nervo ottico, nei pazienti si riscontra un fenotipo distinto caratterizzato da cataratta, sordità, rigidità extrapiramidale e atassia (Powell et al. 2011; Grau et al., 2013).

Le prime mutazioni puntiformi in eterozigosi (una mutazione per transizione c.277G>A/p.G93S e l'altra per trasversione c.313C>G/p.Q105E entrambe nell'esone 2) furono identificate dopo aver condotto degli studi su soggetti affetti da ADOAC appartenenti a due famiglie francesi non correlate (Reynier et al., 2004; Verny et al., 2005). Nel corso degli anni sono state identificate nuove mutazioni patogenetiche nel gene *OPA3*, autosomiche dominanti, associate a ADOAC (Grau et al., 2013; Sergouniotis et al., 2015; Bourne et al., 2017).

Nonostante l'alta percentuale di omologia tra le due isoforme proteiche, i livelli di espressione della variante OPA3V1 sono maggiori rispetto a OPA3V2; ad oggi nessuna mutazione patogena nell'esone 3 è stata riportata in letteratura. Ciò ha portato a supporre che la proteina OPA3V2 possa non avere un ruolo funzionale determinante. Tuttavia i livelli di espressione genica di OPA3V2 risultano significativamente incrementati nelle cellule in cui è assente la variante proteica OPA3V1, una particolare condizione riscontrata in fibroblasti derivanti da pazienti affetti da 3-MGA III e che ha suggerito un possibile ruolo della proteina OPA3V2 nell'insorgenza della patologia (Huizing et al., 2010).

Materiali e metodi

1. Colture cellulari

Le linee cellulari primarie di fibroblasti e tumorali SK-N-SH (*Human neuroblastoma cell line*) e Hek 293 (*Human embryonic kidney 293*) sono state coltivate in terreno di crescita high glucose DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco) contenente 4,5 g/L di D-glucosio, 0,11 g/L di piruvato di sodio, e addizionato con il 10% di siero fetale bovino (FBS; Gibco), 2 mM di L-glutammina, e 100 U/ml di antibiotici (penicillina-streptomina). Le colture sono state mantenute in incubatore a 37°C, in ambiente umidificato e in presenza di una tensione di anidride carbonica del 5%.

I fibroblasti di controllo derivano da biopsie cutanee di donatori che hanno sottoscritto consenso informato, invece le linee di fibroblasti provenienti da pazienti affetti da 3-MGA III (mutazione recessiva c.143-1G>C /IVS1-1G>C) e ADOAC (mutazione dominante missenso c.313 C>G/p.Q105E) sono state generate dal gruppo della Prof. Ann Sada (Università di Israele) e dalla Prof. Patrizia Amati Bonneaut (Università di Angers) e gentilmente condivise con il gruppo del Prof. Valerio Carelli.

2. Silenziamento stabile mediante vettore virale di terza generazione

La linea cellulare di neuroblastoma silenziata stabilmente per OPA3V1 è stata ottenuta utilizzando un vettore lentivirale di terza generazione esprime un *short hairpin RNA* (shRNA) specifico per l'esone 2 (shOPA3 ex2). Il vettore contiene un gene reporter *Red Fluorescent Protein* (RFP) e un gene che conferisce alle cellule la resistenza ad uno specifico antibiotico, la blastidina.

Per l'infezione è stato utilizzato il kit Lenti-vpak Lentiviral Packaging (Origene).

Packaging delle particelle lentivirali

Per la produzione delle particelle virali sono state impiegate cellule Hek 293. L'esperimento si è svolto in diversi giorni di attività come segue:

Giorno 1. Le cellule sono state seminate in piastre da 6 pozzetti (380.000 cellule/pozzetto) in terreno di crescita *high glucose* DMEM privo di antibiotici.

Giorno 2. 1 µg di *Lenti Plasmid* e 1,2 µg di *Packaging Plasmid* sono stati diluiti in 250 µL di terreno *serum-free* Opti-MEM I (Gibco) a cui sono stati aggiunti 6,6 µL di reagente Turbofectin 8.0. La soluzione così preparata è stata incubata per 15 minuti a temperatura ambiente e successivamente dispensata goccia a goccia sulle cellule.

Giorno 3. Il terreno privo di antibiotici è stato sostituito dallo stesso volume di terreno completo fresco addizionato con antibiotici.

Giorno 4 e 5. Sono state effettuate due raccolte del terreno di coltura contenente le particelle virali. Per eliminare i detriti cellulari, il soprannatante così raccolto è stato centrifugato a 2500 rpm per 5 minuti e quindi filtrato utilizzando filtri con pori da 0,45 µm di diametro.

Infezione della linea cellulare SK-N-SH

Il virus ottenuto è stato utilizzato per trasdurre cellule SK-N-SH. Sono state seminate 100.000 cellule per pozzetto in piastre da 6 pozzetti garantendo una confluenza pari al 60% al momento dell'infezione. Dopo 24 ore 1,5 mL di sospensione virale sono stati aggiunti al terreno di crescita. Quattro ore dopo la trasduzione è stato sostituito il terreno e le cellule sono state tenute in coltura per circa tre giorni.

Selezione dei cloni

Al fine di selezionare le cellule trasdotte che avevano integrato il vettore in modo stabile, è stata aggiunta blasticidina 5 µg/mL al terreno di coltura. Le cellule sono state tenute in selezione per un minimo di 7 giorni.

Al fine di ottenere singoli cloni, le colture ottenute dalla trasduzione con il costrutto di interesse o con un plasmide di controllo (*Scramble*) sono state seminate a bassa densità in piastre Petri da 10 cm di diametro (100 cellule per piastra). I cloni sono stati raccolti e passati in piastre da 24 pozzetti e successivamente sono stati fatti espandere in piastra. Le cellule SK-N-SH shOPA3 e di controllo sono state raccolte ed utilizzate per eseguire la verifica dell'espressione genica e della proteina in esame.

3. Estrazione e dosaggio delle proteine

I pellet ottenuti dai campioni cellulari sono stati opportunamente risospesi nel buffer di lisi RIPA (50 mM TrisHCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 1% NaDOC, 1% SDS, 5mM EDTA) al quale è stata aggiunta una miscela di inibitori di proteasi 1x (Roche) e di fosfatasi 1x (Thermo Fisher). I lisati sono stati incubati in ghiaccio per 15 minuti, congelati a -20°C e scongelati a temperatura ambiente per due volte e infine centrifugati (10 min, 14000 rpm, 4°C). Recuperato il soprannatante, la concentrazione proteica è stata determinata tramite il metodo Bradford (Bradford, 1976).

L'assorbanza è stata misurata a 595 nm mediante lo strumento EnSpire Multimode Plate Reader (PerkinElmer).

4. Analisi di Western blotting

30-50 µg di estratto proteico sono stati diluiti in NuPAGE LDS sample buffer 4x (Life Technologies), NuPAGE Sample Reduction Agent 10x (Life Technologies) e successivamente denaturati a 70°C per 10 min. I campioni proteici sono stati separati su gel *precast* NuPAGE 4-12% o 12% Bis-Tris Glicina (Life Technologies) mediante corsa elettroforetica per circa 1 ora e 30 min a 120V nel buffer di corsa NuPAGE Mops SDS, utilizzando l' apparato XcellSure Lock (Life Technologies) Le proteine sono state successivamente trasferite, tramite il sistema Mini Cell Transblot (BioRad), su membrana di nitrocellulosa (0,22 mm, BioRad) utilizzando un buffer di trasferimento (Tris-HCl 24 mM, Glicina 193 mM, 20% di etanolo). Il trasferimento è stato eseguito a 100V per 60 minuti in condizioni refrigerate. La membrana è stata quindi incubata a temperatura ambiente per 1h in una soluzione di latte al 5% sciolto in TBS-T 1x (Tris-HCl 0,02 M, NaCl 0,137 M, pH 7.6, Tween 20 0,05%); successivamente la membrana è stata ibridata con un anticorpo primario a 4°C overnight e in seguito sottoposta a 2 lavaggi di 10 min ciascuno con TBS-T in agitazione. Terminati i lavaggi, è stata eseguita una incubazione per 1 ora a temperatura ambiente con un anticorpo secondario coniugato con un fluoroforo. Dopo 2 lavaggi di 10 min ciascuno con TBS-T in agitazione, la rilevazione del segnale è stata valutata mediante il sistema di acquisizione LI-COR Odyssey Fc Dual Mode Imager, mentre la quantificazione delle bande è stata eseguita tramite analisi della densitometria con il programma Image Studio.

Gli anticorpi utilizzati per le analisi di Western blotting sono di seguito elencati.

Anticorpi primari: OPA3 (1:500, Cell Signaling), OPA1 (1:1000 , Biosciences), MFN1 (1:1000, ProteinTech), MFN2 (1:1000, Abnova), DNM1L/DRP1 (1:1000, Abnova), Phospho DRP1 Ser616 (1:1000, Cell Signaling), FIS1 (1:1000, Abnova) TIM23 (1:2000, Biosciences), TOM20 (1:1000, Cell Signaling), CS (1:5000, Abnova), AFG3L2 (1:1000, Bethyl), YME1L (1:1000, ProteinTech), STOML2/SLP-2 (1:4000, ProteinTech), ROMO1 (1:2000, Origene), PGAM5 (1:2000, Sigma), ATG3 (1:1000, Santa Cruz), ATG4B (1:1000, Cell Signaling), ATG5 (1:1000, Cell Signaling), ATG7 (1:1000, Cell Signaling), LC3B (1:800, Novus), p62 (1:1000, Biosciences), Beclin-1 (1:1000, Cell Signaling), GAPDH (1:20000, Sigma), TUBB (1:20000, Abnova), Actin (1:5000, Abcam), IP3R3 (1:1000, BD Biosciences), VDAC1 (1:1000, abcam), SIGMAR1 (1:1000, Sigma).

Anticorpi secondari: IR dye 680 Goat Anti-Rabbit e IR dye 800 Goat Anti-Mouse (Licor, 1:5000).

5. Purificazione di mitocondri

Le cellule sono state lavate in PBS e risospese in 0,5 mL di *Mitochondrial buffer* (200 mM di mannitolo, 70 mM di saccarosio, 1 mM EGTA, 10 mM Hepes, pH 7.6) addizionato di inibitori di proteasi (Roche) e di fosfatasi (Thermo Fisher). A questo punto le cellule sono state rotte meccanicamente mediante un omogeneizzatore Dounce (EURO STAR 20 digital - Ika) ad una temperatura di 4°C. La sospensione dei lisati cellulari ottenuta è stata sottoposta a cicli di centrifugazione differenziale effettuati a 4°C. L'omogenato cellulare è stato centrifugato per 10 min a 4000 rpm per eliminare i nuclei e i detriti cellulari e il surnatante ottenuto è stato ulteriormente centrifugato per 20 min a 14000 rpm. Il pellet (frazione mitocondriale), separato dalla frazione citoplasmatica, è stato risospeso nel buffer precedentemente utilizzato e nuovamente centrifugato per 10 min a 14000 rpm.

Le proteine della frazione citoplasmatica sono state precipitate applicando il protocollo *Acetone precipitation of proteins* (TECH TIP #49, Thermo Fisher Scientific):

Fase 1. È stato aggiunto un volume di acetone freddo (-20°C) pari a quattro volte il volume del campione (frazione citoplasmatica).

Fase 2. Dopo avere risospeso il campione è stato incubato a -20°C per 1h e successivamente centrifugato per 10 minuti a 14000 rpm così da ottenere il pellet contenente le proteine citoplasmatiche.

Fase 3. Dopo aver eliminato il surnatante, l'eccesso di acetone è stato fatto evaporare lasciando la provetta aperta per circa 20 minuti a temperatura ambiente.

I pellet della frazione mitocondriale e citoplasmatica sono stati risospesi nel buffer di lisi RIPA e la concentrazione proteica è stata determinata mediante il metodo Bradford (Bradford, 1976).

6. Purificazione delle MAMs

In collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Paolo Pinton dell'Università di Ferrara è stata eseguita la purificazione del complesso delle MAM.

Brevemente, le frazioni subcellulari sono state isolate da cellule tumorali polmonari A549 risospese in uno specifico *buffer* di omogeneizzazione (225 mM mannitolo, 75 mM saccarosio, 30 mM Tris-HCl pH 7.4, 0,1 mM acido etilenglicole bis(2-amminoetiletere) N,N,N',N'-tetracetico (EGTA) e PMSF (fluoruro fenilmetilsolfonil) e rotte meccanicamente mediante omogeneizzatore Dounce. L'omogenato così ottenuto è stato sottoposto a due centrifugazioni per 5 min a 600 g per rimuovere

i nuclei e le cellule intatte (pellet). Il surnatante risultante è stato ulteriormente centrifugato per 10 min a 7000 g per far sedimentare i mitocondri crudi. Una centrifugazione aggiuntiva del secondo surnatante ottenuto, per 90 min a 100.000 g (rotore 70-Ti; Beckman), ha permesso l'isolamento della frazione contenente ER (pellet) e della frazione citosolica (surnatante). A questo punto i mitocondri crudi sono stati stratificati in un gradiente di densità (225 mM mannitolo, 25 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM EGTA, 0,1% BSA, 30% Percoll (v/v) all'interno di un tubo e dopo centrifugazione per 30 min a 95000 g il complesso MAM si è depositato sopra l'anello di mitocondri puri.

7. Misurazione del potenziale della membrana mitocondriale

Il potenziale della membrana mitocondriale è stato valutato utilizzando una sonda fluorescente, lo ioduro 5,5',6,6'-tetracloro-tetraetilbenzimidazolcarbocianina (JC-1). Un aumento del potenziale di membrana ($\Delta\psi_m$) determina la localizzazione di JC-1 sul mitocondrio sotto forma di aggregati che si traduce in uno spostamento della lunghezza d'onda di emissione di fluorescenza della sonda da 530 nm (verde), quando questa è in forma monomeric, a 590 nm (rossa). Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti (30.000 cellule/pozzetto in View plate, Perkin Elmer) e, il giorno successivo, trattate con JC-1 (Thermo Fischer) ad una concentrazione di 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 37°C al buio. Dopo 20 minuti sono stati effettuati due lavaggi in PBS e le cellule sono state incubate in high glucose DMEM senza rosso fenolo. Il segnale fluorescente è stato acquisito a 530 e 590 nm mediante lo strumento EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer).

8. Determinazione del contenuto di ATP cellulare

Il contenuto di ATP cellulare nei fibroblasti e nelle SK-N-SH shOPA3 è stato quantificato mediante il saggio ATPlite 1step Luminescence Assay System (Perkin Elmer), seguendo le indicazioni del produttore.

Nei fibroblasti, gli esperimenti sono stati eseguiti sia in condizioni basali (*glucose-medium*) che in condizioni di stress ossidativo. In quest'ultima condizione le cellule sono state incubate per 48 ore in *glucose-free medium* (DMEM, no glucose; Gibco) addizionato con 5 Mm di galattosio (*galactose-medium*) e quindi forzate a produrre energia utilizzando esclusivamente la fosforilazione ossidativa.

9. Valutazione della respirazione mitocondriale

La respirazione mitocondriale è stata valutata analizzando il consumo di ossigeno delle cellule intatte, sia in condizioni basali che dopo trattamento con diverse sostanze inibenti la respirazione mitocondriale. Le misurazioni sono state effettuate tramite lo strumento Seahorse XF^e24 Extracellular Flux Analyzer (Agilent Technologies) che, attraverso l'utilizzo di specifici sensori fluorescenti, permette la rilevazione delle variazioni di ossigeno (*Oxygen Consumption Rate, OCR*) in cellule intatte (Fig. 10).

Il giorno precedente l'esperimento sono state seminate 30.000 cellule in pozzetti di una piastra Seahorse 24-well XF in terreno di coltura e incubate *overnight* a 37°C. Il giorno successivo, dopo aver effettuato due lavaggi con 1 mL di Mito Stress Medium (XF Base Medium, Glucosio 10 mM, Glutamina 2 mM, Sodio piruvato 5 M, pH = 7.35 ± 0.05, 37°C) e aggiunto 525 µL per pozzetto dello stesso terreno, le cellule sono state incubate per 1h a 37°C in assenza di CO₂.

Nel frattempo è stata preparata la XF^e24 Sensor Cartridge seguendo le istruzioni del produttore. La piastra possiede quattro porte nelle quali sono stati caricati singolarmente 75 µL dei quattro modulatori della respirazione cellulare: l'oligomicina (1 µM), l'FCCP (il carbonilcianide-4-trifluorometossi-fenilidrazone; 2 µM) o CCCP (Carbonil cianuro m-clorofenil idrazone; 1 µM), il rotenone (1 µM) e l'antimicina A (1 µM). I dati di OCR sono stati normalizzati sulla quantità di cellule presenti nel pozzetto mediante il saggio della Sulfrodamina B.

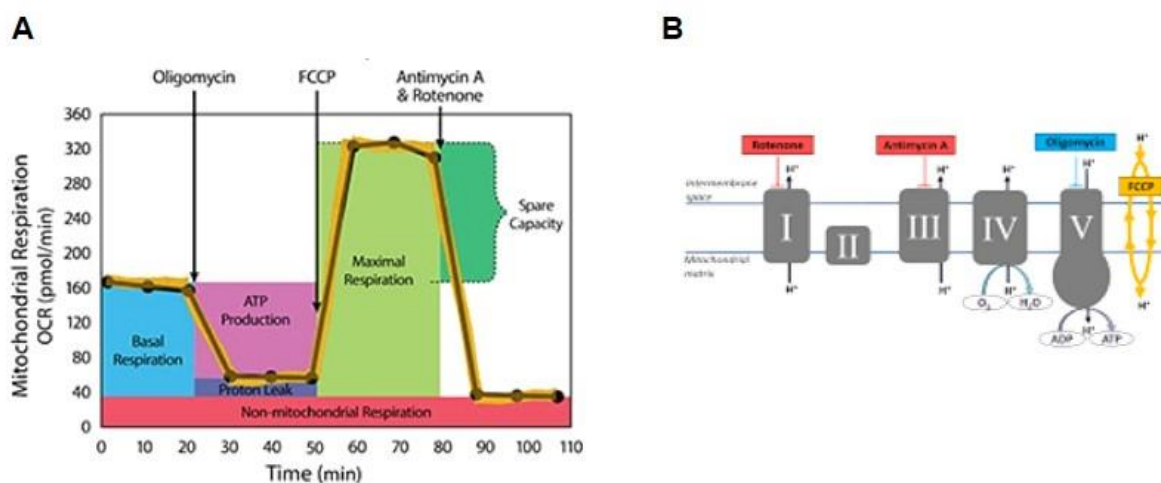


Figura 10. Analisi del consumo di ossigeno in cellule intatte.

A) Profilo dei parametri chiave della respirazione mitocondriale. B) Modulatori della respirazione e target dei componenti della catena di trasporto degli elettroni (Report Generator User Guide, Agilent Technologies).

10. Saggio della Sulforodamina B.

La Sulforodamina B (SRB), colorante in grado di legare residui proteici di cellule, permette di fare una valutazione della densità della popolazione cellulare.

Dopo aver effettuato il saggio di respirazione mitocondriale, le cellule sono state fissate in 125 μL di acido tricloroacetico (TCA) per 1h a 4°C. Successivamente, dopo aver eliminato il TCA, sono stati effettuati dei lavaggi con acqua bidistillata e quindi aggiunti 50 μL di una soluzione di SRB allo 0,4% sciolta in Acido Acetico all'1%. La piastra è stata lasciata per 30 minuti a temperatura ambiente. Alla fine dell'incubazione, per rimuovere il colorante non legato, sono stati effettuati 4 lavaggi con 200 μL di Acido Acetico all'1%. Infine è stata eseguita la solubilizzazione del colorante con 800 μL per pozzetto di una soluzione di TRIS 10mM (pH 10) (Skehan et al., 1990). La lettura del segnale colorimetrico è stata effettuata a 570 nm mediante lo strumento EnSpire Multimode Plate Reader (PerkinElmer).

11. Analisi della morfologia mitocondriale

La valutazione del network mitocondriale è stata condotta sulle linee di fibroblasti sia in condizioni basali che di stress ossidativo (*galactose-medium* per 72 ore). Le cellule vive sono state incubate con 10 nM di MitoTracker Red (ThermoFischer) per 20 minuti a 37°C.

Per la colorazione del nucleo è stato usato l'Hoechst (Thermo Fischer) ad una concentrazione di 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Le immagini sono state acquisite in modalità Z-stack (0.8 μm) utilizzando un microscopio confocale (A1 confocal microscope, Nikon Instruments) con obiettivo ad olio 60x/1.4-NA e le *Maximum intensity projection* (MIP) sono state generate mediante il programma NIS-elements software (Nikon Instruments).

Almeno 30 cellule per ciascuna linea cellulare e condizione sono state valutate in tre esperimenti indipendenti mediante *blind test* e classificate in tre categorie in base alla morfologia mitocondriale (filamentosi, intermedi e frammentati).

12. Induzione della fissione mitocondriale

I fibroblasti, fatti crescere su vetrino in piastre da 4 pozzetti, sono stati trattati con antimicina A (10 μM), un antibiotico che induce la fissione mitocondriale. Dopo 2 ore di incubazione, le cellule sono state fissate con una soluzione di paraformaldeide al 4% in PBS.

La risposta delle cellule al trattamento è stata verificata mediante la tecnica dell'immunofluorescenza. È stata analizzata la localizzazione della proteina di fissione DRP1 che quando attivata viene reclutata sulla membrana mitocondriale esterna. A tale scopo è stato usato sia l'anticorpo anti-DRP1 che l'anticorpo specifico per una proteina della OMM, TOM20 (dettagli paragrafo immunofluorescenza).

13. Immunofluorescenza e microscopia confocale

Le cellule sono state fissate su vetrino con una soluzione di paraformaldeide al 4% in PBS per 20 minuti a temperatura ambiente e successivamente lavate in PBS; i lavaggi sono stati ripetuti dopo ogni passaggio di seguito descritto. Le operazioni di permeabilizzazione e di bloccaggio sono state effettuate con una soluzione di PBS con 0,5% di Triton X-100 e 5% di FBS per 1h a temperatura ambiente in agitazione. Successivamente le cellule sono state incubate con un anticorpo primario per 2h a temperatura ambiente in agitazione e in seguito trattate con uno specifico anticorpo secondario fluoresceinato per 1h a temperatura ambiente. Talvolta è stato aggiunto un marcatore del DNA, l'Hoechst. I vetrini sono stati osservati al microscopio confocale (A1 confocal microscope, Nikon Instruments) usando un obiettivo ad olio 60x/1.4-NA e le *Maximum intensity projection* (MIP) sono state generate mediante il programma NIS-elements software (Nikon Instruments).

Gli anticorpi primari usati sono TOM20 (1:200, Cell Signaling Technology), DNM1L/DRP1 (1:100, Abnova), invece gli anticorpi secondari sono anti-rabbit e anti-mouse coniugati a diversi fluorofori (1:500, Alexa Fluor 488 carboxylic acid e Cy3 bis-NHS ester, Jackson Immuno Research).

14. Induzione e inibizione del flusso autofagico

L'indagine sul processo autofagico è stata condotta sia in condizioni basali che dopo induzione mediante deprivazione di nutrienti (*starvation*; EBSS – Earle's Balanced Salt Solution, Sigma) per 30 minuti o trattamento con rapamicina 10 μ M per 2 ore. Inoltre, al fine di esaminare il flusso autofagico, è stato indotto il blocco della fase finale del meccanismo mediante trattamento con Bafilomicina A1 (Baf-A1) 100 nM o Cloroquina (CHL) 25 μ M per 2 ore.

15. Digestione con proteinasi K e digitonina

40 μ g di mitocondri purificati da colture cellulari di Hek 293 sono stati trattati con concentrazioni crescenti di proteinasi K (0.0025 μ g, 0.005 μ g, 0.02 μ g, 0.05 μ g, 0.1 μ g) e proteinasi K 0.1 μ g +

digitonina 0,6% per 15 minuti in ghiaccio. La reazione è stata bloccata mediante l'aggiunta di PMSF (Fenil metil sulfonil fluoruro) 2 mM e mantenendo i campioni in incubazione per 10 minuti in ghiaccio. Dopo aver aggiunto *LDS sample buffer* e *Sample Reduction Agent* i campioni sono stati denaturati a 95°C per 10 minuti e analizzati mediante SDS-PAGE.

16. Overespressione della proteina OPA3

La trasfezione transiente, finalizzata all'overespressione delle proteine chimeriche OPA3V1-DDK e OPA3V2-DDK, è stata eseguita su cellule Hek 293.

Il giorno antecedente l'esperimento le cellule sono state seminate in due piastre Petri da 10 cm di diametro (960.000 cellule per piastra) e incubate a 37°C *overnight* per ottenere una confluenza pari al 50-70% al momento della trasfezione.

Si è proceduto quindi con la formazione del complesso DNA-reagente di trasfezione per ciascuna piastra attraverso lo svolgimento dei seguenti passaggi:

- a) 7 µg di DNA plasmidico sono stati diluiti in 1,5 mL di terreno *serum-free* Opti-MEM I (Gibco);
- b) Sono stati aggiunti 21 µL di reagente Turbofectin 8.0 (Origene);
- c) La soluzione così preparata è stata incubata per 15 minuti a temperatura ambiente.

Trascorso il tempo di incubazione e dopo aver distribuito goccia a goccia la miscela DNA-reagente sulle cellule quest'ultime sono state successivamente incubate per 24 ore a 37°C.

17. Estrazione dell'RNA totale

L'RNA totale è stato estratto dai campioni cellulari utilizzando il mini kit Pure Link RNA (Ambion), seguendo il protocollo fornito dalla ditta, e successivamente trattato con l'enzima DNAsi I (Sigma Aldrich), per eliminare l'eventuale contaminazione di DNA genomico. L'RNA totale è stato eluito in acqua Milli-Q (Millipore) e conservato a -80 °C per le successive analisi. L'RNA estratto è stato quantificato misurandone l'assorbanza a 260 nm con Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) e la purezza del campione è stata verificata valutando i rapporti 260/280 nm e 260/230 nm.

18. La trascrizione inversa e la valutazione quantitativa dell'espressione genica

La trascrizione inversa è stata eseguita su 1 µg di RNA estratto utilizzando il kit SuperScript VILO cDNA synthesis (Thermo Fisher Scientific). I profili di espressione genica sono stati analizzati e

valutati mediante Real time-PCR (LightCycler®480, Roche Diagnostics) o Droplet Digital-PCR (QX200™ Droplet Digital™ PCR System, BIO-RAD) usando i dye SYBR Green I o EvaGreen.

Fragments	Primers	Sequences (from 5' to 3')
OPA3V1	forward	CTCCCGCCGGCTCAACTGTA
	reverse	GCCACGATGAAGATGGTGGCT
BCN1	forward	ACGTGGAAAAGAACCGCAAG
	reverse	CTCTGATACTGAGCTTCTCTCC
GAPDH	forward	AGCCACATCGCTCCAGACA
	reverse	GCCCAATACGACCAATC
AFG3L2	forward	TGAACGAGTGATTGGTGGCT
	reverse	CGTGGGATGATGGATACCTTT
OMA1	forward	TTGGATAGACTTATACCTCAGGCTC
	reverse	GGGTCTGGATTAGACAGTGGTG
SPG7	forward	GCTTCAAAGACGTGGCAGGA
	reverse	AGCGTTCTGGGCTTTCAGAT
ATG3	forward	AAACTGATGCTGGCGGTGAA
	reverse	TGCCGTTGCTCATATAGCC
ATG5	forward	AGCAACTCTGGATGGGATTG
	reverse	AAGGTCTTTCAGTCGTTGTCTGAT
ATG7	forward	GCATCCAGAAGGGGGCTATG
	reverse	AGGCTGACGGGAAGGACATT
ATG12	forward	TCTCTATGAGTGTTTTGGCAGTG
	reverse	TTCAGAGCTGTCTCTCCGTG

Tabella 1. Sequenze dei primer.

19. Valutazione delle interazioni della proteina OPA3 con i fosfolipidi di membrana

La valutazione delle interazioni della proteina OPA3 con i lipidi di membrana è stata eseguita mediante *Membrane Lipid Arrays* (Echelon Biosciences Cat# P-6003), una membrana di nitrocellulosa su cui sono presenti in spot otto diversi lipidi con gradiente di concentrazione decrescente (Fig. 11).

La membrana di nitrocellulosa è stata incubata a temperatura ambiente per 1h in una soluzione di BSA al 3% sciolto in TBS-T 1x (Tris-HCl 0,02 M, NaCl 0,137 M, pH 7.6, Tween 20 0,1%) e successivamente incubata con la proteina OPA3V1 purificata da Hek 293 (TP302959, Origene) ad una concentrazione di 0,1 µg/mL a temperatura ambiente per 2h. In seguito sono stati effettuati 4 lavaggi di 10 min ciascuno con TBS-T in agitazione; i lavaggi sono stati ripetuti dopo ogni passaggio di seguito descritto.

Successivamente la membrana è stata ibridata prima con un anticorpo primario a temperatura ambiente per 1h e in seguito con uno specifico anticorpo secondario coniugato all'enzima perossidasi (HRP, *Horseradish peroxidase*) per 1h a temperatura ambiente.

La reazione di chemiluminescenza è stata catalizzata adoperando il kit Immobilion Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) e la rilevazione del segnale è stata effettuata mediante

il sistema di acquisizione LI-COR Odyssey Fc Dual Mode Imager.

Gli anticorpi utilizzati sono i seguenti:

OPA3 (1:2000, Cell Signaling) e Goat anti-Rabbit Secondary Antibody, HRP coniugated (Life Technologies).

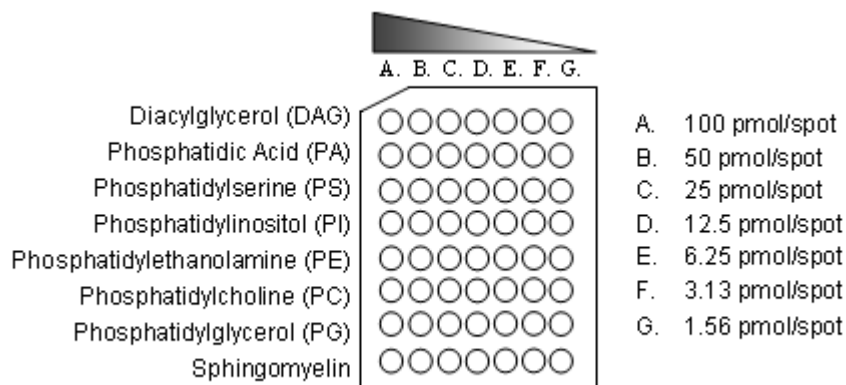


Figura 11. Membrane Lipid Arrays, Echelon Biosciences.

20. Analisi statistica.

Per le analisi statistiche è stato utilizzato GraphPad Prism (GraphPad Software). I confronti tra più di due gruppi sono stati effettuati con il test Anova e il Dunnett's test per i confronti multipli, scegliendo come categoria di riferimento il gruppo di controllo (Scramble o fibroblasti di donatori sani). Gli esperimenti sono stati condotti su almeno tre campioni indipendenti.

Scopo della tesi

OPA3 è una proteina codificata dal genoma nucleare e presente in due isoforme, OPA3V1 e OPA3V2, generate da un processo di splicing alternativo (Huizing et al., 2010).

Le due varianti OPA3 sono caratterizzate entrambe da una sequenza di target mitocondriale nel dominio N-terminale e da un dominio transmembrana che hanno portato ad ipotizzare una loro importazione a livello delle membrane mitocondriali, anche se ancora oggi rimane controversa l'esatta localizzazione (Da Cruz et al., 2003; Huizing et al., 2010; Ryu et al., 2010).

Mutazioni nel gene OPA3 sono state associate a due malattie neurodegenerative: la sindrome di Costeff o 3-MGA III, una patologia autosomica recessiva caratterizzata da atrofia ottica, deficit cognitivo, paraparesi spastica, atassia e aciduria 3-metilglutaconica, e una forma di atrofia ottica dominante che spesso si presenta associata a cataratta e sordità (ADOAC) (Nystuen et al., 1997; Reynier et al., 2004; Neas et al., 2005).

Sebbene ad oggi non sia stato definito in maniera univoca il meccanismo di funzionamento di OPA3, la proteina sembra avere un ruolo nei processi di fusione e fissione mitocondriale (Ryu et al., 2010) e nel metabolismo lipidico (Wells et al., 2012; Bourne et al., 2017). Alterazioni della dinamica mitocondriale sono alla base del meccanismo patogenetico di altre forme di atrofie ottiche ereditarie, prime fra tutte l'atrofia ottica dominante (ADOA) causata da mutazioni nel gene *OPA1* (Burté et al., 2015). Inoltre, è stato osservato che difetti della proteina OPA1 hanno conseguenze anche sull'autofagia e mitofagia, processi strettamente correlati alla dinamica mitocondriale (Kane et al., 2017; Liao et al., 2017; Carelli et al., 2015; Zaninello et al., 2020).

Questo progetto è quindi focalizzato sullo studio della proteina OPA3 nell'ambito della dinamica mitocondriale e dell'autofagia, con la finalità di delineare il suo ruolo all'interno dei mitocondri, chiarire la sua localizzazione subcellulare, ed infine di definire il meccanismo patogenetico delle patologie neurodegenerative causate da mutazioni in questo gene. A questo scopo abbiamo utilizzato sia modelli cellulari generati *in vitro* che linee cellulari primarie derivate da pazienti. I risultati di questo studio sono suddivisi in tre parti.

Nella prima parte sono state utilizzate linee cellulari tumorali di neuroblastoma (SK-N-SH) stabilmente silenziate per OPA3V1, come modello per lo studio *in vitro* dei processi di dinamica mitocondriale e dell'autofagia.

Nella seconda parte le medesime analisi sono state effettuate sui fibroblasti derivati da pazienti con mutazioni nel gene *OPA3* con diagnosi ADOAC (mutazione dominante, p.Q105E) o 3-MGA III (mutazione recessiva, IVS1-IG>C), al fine di verificare i dati sperimentali ottenuti nel modello di neuroblastoma in un contesto più fisiologico.

La terza parte è stata infine dedicata ad un'indagine più approfondita sulla localizzazione mitocondriale di OPA3 che, come precedentemente riportato, non è ancora chiaramente definita. Sebbene in letteratura siano riportate numerose evidenze che indicano la sua importazione nei mitocondri e la possibile localizzazione nella membrana interna del mitocondrio, ad oggi il tema della localizzazione di OPA3 nella IMM o nella OMM rimane controverso.

Risultati

PARTE I - Studio di OPA3 in linee cellulari di neuroblastoma silenziate per OPA3V1

1. Generazione e validazione della linea SK-N-SH silenziata stabilmente per OPA3V1

Al fine di studiare gli effetti della mancanza della proteina OPA3V1 in una linea cellulare immortalizzata e di origine neuronale, è stata generata una linea di neuroblastoma (SK-N-SH) silenziata stabilmente per OPA3V1, utilizzando un vettore lentivirale di terza generazione esprime un *short hairpin* RNA (shRNA) e contenente un gene reporter *Red Fluorescent Protein* (RFP) e uno che conferisce alle cellule la resistenza alla blasticidina. Le cellule trasdotte sono state quindi selezionate clonalmente mediante trattamento con blasticidina 5 µg/mL. Al termine della selezione, otto cloni della linea SK-N-SK shOPA3 sono stati analizzati mediante Western Blotting per verificare i livelli di espressione della proteina OPA3 e l'efficienza di silenziamento. A tale scopo è stato utilizzato un anticorpo che riconosce la porzione C-terminale della proteina OPA3V1. Dagli otto cloni testati, sono stati selezionati due cloni, SK-N-SH shOPA3 ex2#2 e ex2#4, che mostravano una riduzione dell'espressione proteica di OPA3V1 rispettivamente di circa il 60% e il 20%, se confrontati con la linea controllo (SK-N-SK *scramble*) (Fig. 12).

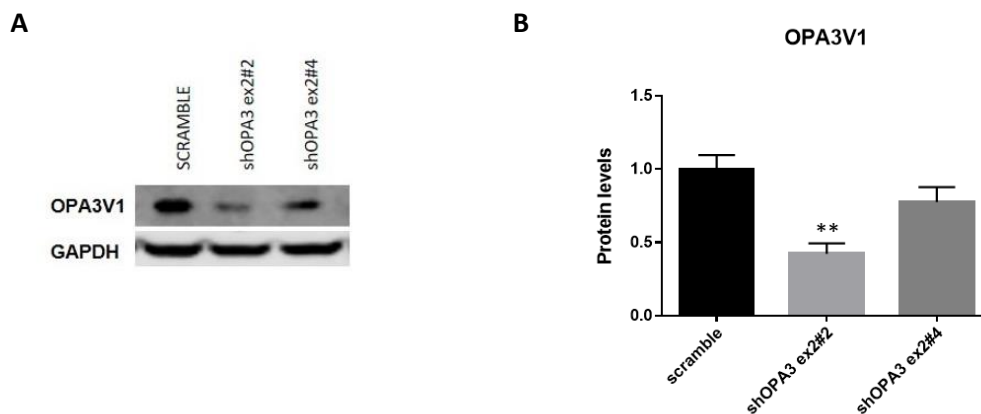


Figura 12. Espressione proteica di OPA3 nei cloni silenziati shOPA3 ex2#2, ex2#4 e di controllo (scramble). A) Immagine rappresentativa del Western Blot per OPA3V1. B) Analisi densitometrica dei livelli della variante OPA3V1 normalizzati sui valori di gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH). I dati sono espressi come media di 3 esperimenti indipendenti. Per la significatività statistica (** $p < 0,01$) è stato eseguito un test one-way ANOVA (Dunnett's multiple comparisons) fra linee di controllo e silenziate.

2. Analisi del metabolismo energetico

Studi precedentemente pubblicati hanno dimostrato una riduzione del potenziale di membrana mitocondriale e un difetto nella capacità respiratoria nei fibroblasti derivanti da pazienti affetti da ADOAC con mutazioni in *OPA3*, nonostante i livelli di ATP fossero analoghi ai controlli (Chevrollier et al., 2008; Davies et al., 2008).

Per testare l'eventuale presenza di un difetto bioenergetico dovuto al silenziamento di *OPA3V1*, abbiamo valutato il metabolismo energetico nelle linee cellulari silenziate SK-N-SH sh*OPA3 ex2#2*, *ex2#4* e di controllo (*scramble*).

La capacità respiratoria cellulare è stata valutata mediante lo strumento Seahorse XFe24 Extracellular Flux Analyzer, che consente di determinare il consumo di ossigeno OCR (*Oxygen Consumption Rate*) in cellule intatte in diverse condizioni: basale e dopo aggiunta di oligomicina (inibitore dell'ATP sintasi), CCCP (disaccoppiante), rotenone e antimicina A (inibitore del Complesso I e III, rispettivamente).

Sono stati quindi valutati i valori di respirazione basale, *ATP-linked*, respirazione massima e respirazione di riserva o *capacity spare* nel seguente modo:

- Respirazione basale: valori ottenuti prima dell'aggiunta di oligomicina meno valori ottenuti dall'aggiunta dell'antimicina A.
- Dissipazione protonica: valori ottenuti dopo l'aggiunta di oligomicina meno valori ottenuti in seguito all'aggiunta dell'antimicina A.
- Respirazione legata alla sintesi di ATP (*ATP-linked*): respirazione basale meno dissipazione protonica.
- Respirazione massima: valori dopo l'aggiunta di CCCP meno valori dopo l'aggiunta dell'antimicina A.
- Capacità respiratoria residua (*Spare*): respirazione massima meno respirazione basale.

Da quest'analisi è emerso che il *knockdown* di *OPA3V1* induce una significativa diminuzione del consumo di ossigeno (Fig. 13). Nello specifico, nella linea cellulare silenziata SK-N-SH sh*OPA3 ex2#2* si osserva un difetto respiratorio caratterizzato da una diminuzione della respirazione basale, *ATP-linked*, massima e *spare capacity* rispetto al controllo. Al contrario, nel clone sh*OPA3 ex2#4* non si evidenziano alterazioni se paragonato al controllo (Fig. 14), probabilmente a causa della minore riduzione dell'espressione di *OPA3V1* (20% riduzione).

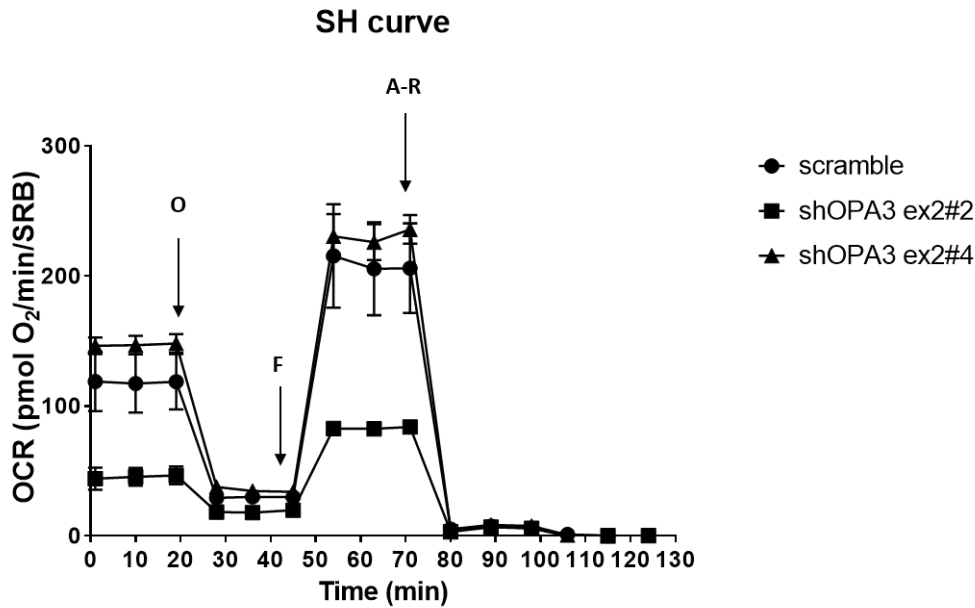


Figura 13. Consumo di ossigeno (OCR) nelle linee cellulari SK-N-SH shOPA3 ex2#2 e ex2#4 e di controllo (scramble).

Diagramma del consumo di ossigeno (OCR), espresso in pmoli/min, in condizioni basali e dopo l'aggiunta di oligomicina (O), FCCP (F), antimicina A (A) e rotenone (R). I valori ottenuti sono stati normalizzati sull'effettivo numero di cellule tramite il saggio SRB. I dati sono espressi come media di due esperimenti indipendenti e SEM.

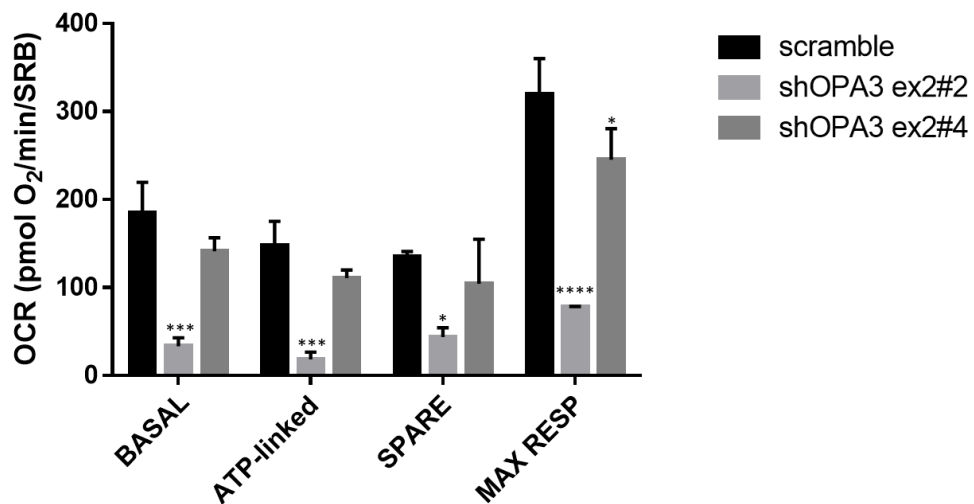


Figura 14. Valori di OCR basale, ATP-linked, massimo e residuo nelle linee cellulari SK-N-SH shOPA3 ex2#2 e ex2#4 e di controllo (scramble).

BASAL: respirazione basale; ATP-linked: respirazione legata alla sintesi di ATP; SPARE: capacità respiratoria residua; MAX RESP: respirazione massima. I dati sono espressi come media di due esperimenti indipendenti e SEM. Per la significatività statistica (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$) è stato eseguito un test two-way ANOVA (Dunnett's multiple comparisons) fra linee di controllo e silenziate.

A completamento dei risultati ottenuti si è voluto valutare il contenuto cellulare di ATP totale nei due cloni silenziati SK-N-SH shOPA3 ex2#2 e ex2#4. L'analisi è stata svolta mediante il saggio in luminescenza ATPlite 1step Luminescence Assay System (Perkin Elmer).

Da quest'analisi è emerso che nel clone ex2#2, nonostante il difetto nella respirazione mitocondriale, il contenuto di ATP totale tende ad aumentare rispetto al controllo, anche se in modo non significativo (Fig. 15). Questo dato potrebbe indicare un meccanismo di compensazione da parte di altri processi metabolici, quali ad esempio la glicolisi, considerando anche l'origine tumorale della linea cellulare SK-N-SH. Diversamente, nel clone ex2#4 si evidenziano valori di ATP cellulare analoghi a quelli del controllo (Fig. 15).

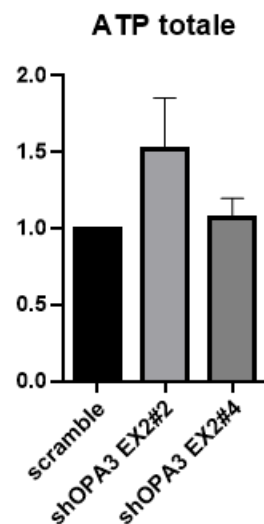


Figura 15. Contenuto cellulare di ATP totale in condizioni basali (glucose-medium).

I livelli di ATP totale sono stati analizzati tramite il saggio ATPlite (Perkin Elmer) e i dati sono mostrati come media e SEM di 3 esperimenti indipendenti. Per la valutazione della significatività statistica è stato eseguito un test one-way ANOVA (Dunnett's multiple comparisons) fra linee di controllo e silenziato.

3. Valutazione della dinamica mitocondriale

In letteratura sono diversi gli studi che hanno messo in luce un possibile ruolo della proteina OPA3 nella regolazione della morfologia dei mitocondri; nello specifico sembra essere coinvolta nei processi di fissione delle membrane mitocondriali (Ryu et al., 2010).

È stato quindi valutato il network mitocondriale osservando la proteina TOM20 mediante immunofluorescenza e microscopia confocale delle linee SK-N-SH shOPA3 ex2#2, ex2#4 e *scramble*.

Mentre non è emersa la presenza di un *network* mitocondriale alterato nelle linee cellulari silenziate se confrontate con il controllo (*scramble*), si riscontra una maggiore compattazione del reticolo mitocondriale nella regione perinucleare (Fig. 16).

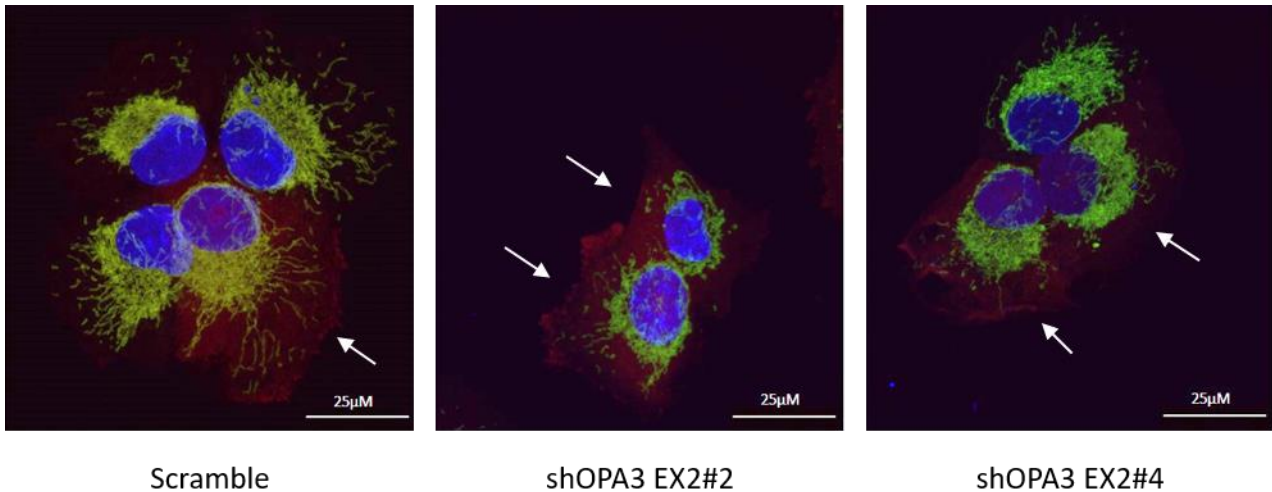


Figura 16. Morfologia del network mitocondriale.

I mitocondri sono stati marcati mediante immunofluorescenza con marcatore di membrana TOM20 (fluorescenza verde) e i nuclei con Hoechst (fluorescenza blu). Le frecce bianche indicano le cellule trasdotte (fluorescenza rossa). Le immagini sono state acquisite mediante microscopia confocale (A1 confocal microscope, Nikon Instruments) con obiettivo ad olio 60x/1.4-NA.

Abbiamo quindi analizzato l'espressione dei principali regolatori dei meccanismi di fissione (DRP1) e fusione (OPA1, MFN1 e MFN2) nelle linee silenziate SK-N-SH shOPA3 ex2#2 e ex2#4 mediante Western Blotting. Dai risultati ottenuti si riscontra un aumento significativo di fosforilazione di DRP1 sul residuo di serina 616 (Fig. 17A-B); tale modifica post-traduzionale determina l'attivazione della proteina e va dunque considerato come indice di un aumento di fissione. Non si riscontrano variazioni nei livelli proteici delle proteine di fusione della membrana mitocondriale esterna, MFN1 e MFN2 (Fig. 17C-D), tuttavia, si evidenzia un lieve aumento del rapporto OPA1-*long* (OPA1-l)/OPA1 short (OPA1-s) (Fig. 17E-F). Quest'ultima analisi è stata effettuata sia nei lisati totali cellulari che nelle frazioni mitocondriali isolate dalle cellule. L'aumento dell'isoforma long, non processata, della proteina OPA1 corrisponderebbe a un aumento della fusione della membrana mitocondriale interna, dato in apparente contrasto con l'attivazione di DRP1 osservata in queste stesse cellule.

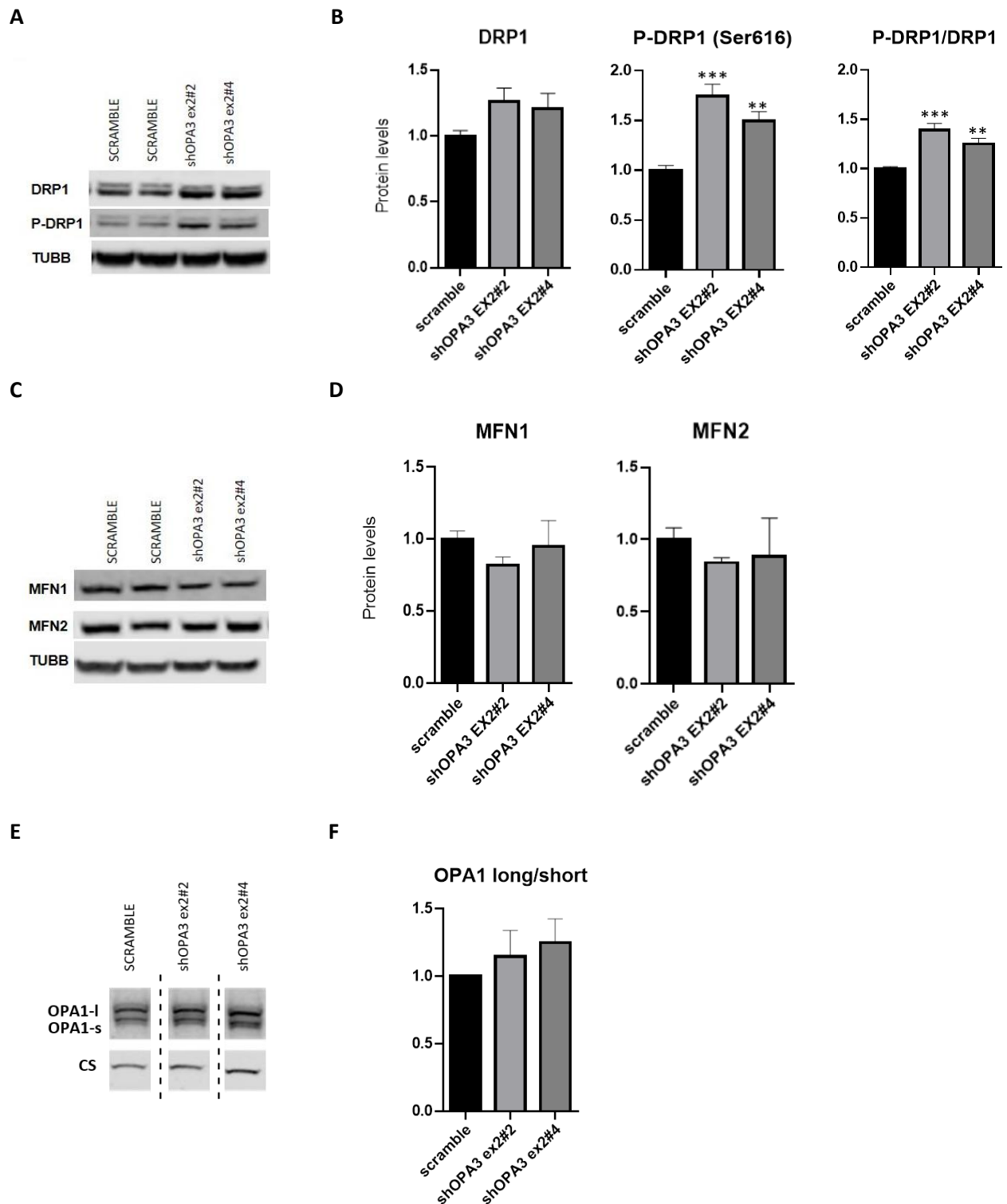


Figura 17. Analisi dei principali regolatori della dinamica mitocondriale mediante Western Blotting nei cloni silenziati SK-N-SH shOPA3 ex2#2, ex2#4 e di controllo (scramble).

A) Western Blot per DRP1 e P-DRP1 (Ser616). B) Analisi densitometrica che mostra i livelli proteici di DRP1 totale e della forma fosforilata P-DRP1 (Ser616), normalizzati sui valori di β -tubulina (TUBB), e il rapporto P-DRP1/DRP1. C) Western Blot per MFN1 e MFN2. D) Analisi densitometrica che mostra i livelli proteici di MFN1 e MFN2, normalizzati sui valori di β -tubulina (TUBB). E) Western Blot per OPA1 (frazione mitocondriale). F) Analisi densitometrica che mostra il rapporto OPA1 long/OPA1 short da frazione mitocondriale normalizzati sui valori di citrato sintasi (CS). Per la significatività statistica (** p < 0,01, *** p < 0,001) è stato eseguito un test one-way ANOVA (Dunnett's multiple comparisons) fra linee di controllo e silenziate.

Come precedentemente riportato, le due forme della proteina OPA1, OPA1-l e OPA1-s, sono determinate dall'azione proteolitica di specifiche proteasi tra cui AFG3L2, SPG7, OMA1 e YME1L (Ishihara et al., 2006; Rainbolt et al., 2016). Tale processamento rappresenta un aspetto chiave nella regolazione della morfologia mitocondriale. Abbiamo pertanto voluto approfondire lo studio relativo alla dinamica mitocondriale analizzando le proteasi AFG3L2, SPG7, OMA1 e YME1L. Dal risultato del *Western blotting*, AFG3L2 mostra una significativa riduzione dei livelli proteici in entrambi i cloni silenziati (Fig. 18A-B) e una riduzione dei livelli di mRNA con maggiore evidenza nel clone ex2#2 (Fig. 18E).

I livelli trascrizionali di SPG7 sono ridotti soltanto nel clone ex2#2, mentre non si evidenziano in alcun caso variazioni significative nell'espressione genica di OMA1 rispetto allo *scramble* (Fig. 18E). Per quanto riguarda YME1L, non si riscontrano variazioni nei livelli proteici della forma matura della proteina, al contrario si evidenzia un aumento del suo precursore (pre-YME1L) (Fig. 18A-B) e contemporaneamente un aumento dei livelli di ROMO1 (*Reactive oxygen species modulator 1*), coinvolto nell'*import* mitocondriale di YME1L (Fig. 18C-D).

Lo studio sulla dinamica mitocondriale è proseguito analizzando il complesso SPY (SLP-2/PARL/YME1L), il quale risulta avere un ruolo chiave nei processi di fusione mitocondriale in condizioni di stress (Wai et al., 2016). Si è proceduto quindi all'analisi dei livelli proteici di SLP2 e PGAM5 mediante *Western blot* nelle linee cellulari silenziate e di controllo. Il risultato dimostra che in entrambi i cloni cellulari silenziati per OPA3 si ha un aumento significativo di SLP-2 (Fig. 19A-B) e una riduzione significativa di entrambe le forme di PGAM5, short (s) e long (l), corrispondenti rispettivamente alla forma clivata e non clivata (Fig. 19A e C). Tuttavia, non si evidenzia variazione del rapporto PGAM5-l/PGAM5-s 2 (Fig. 19C).

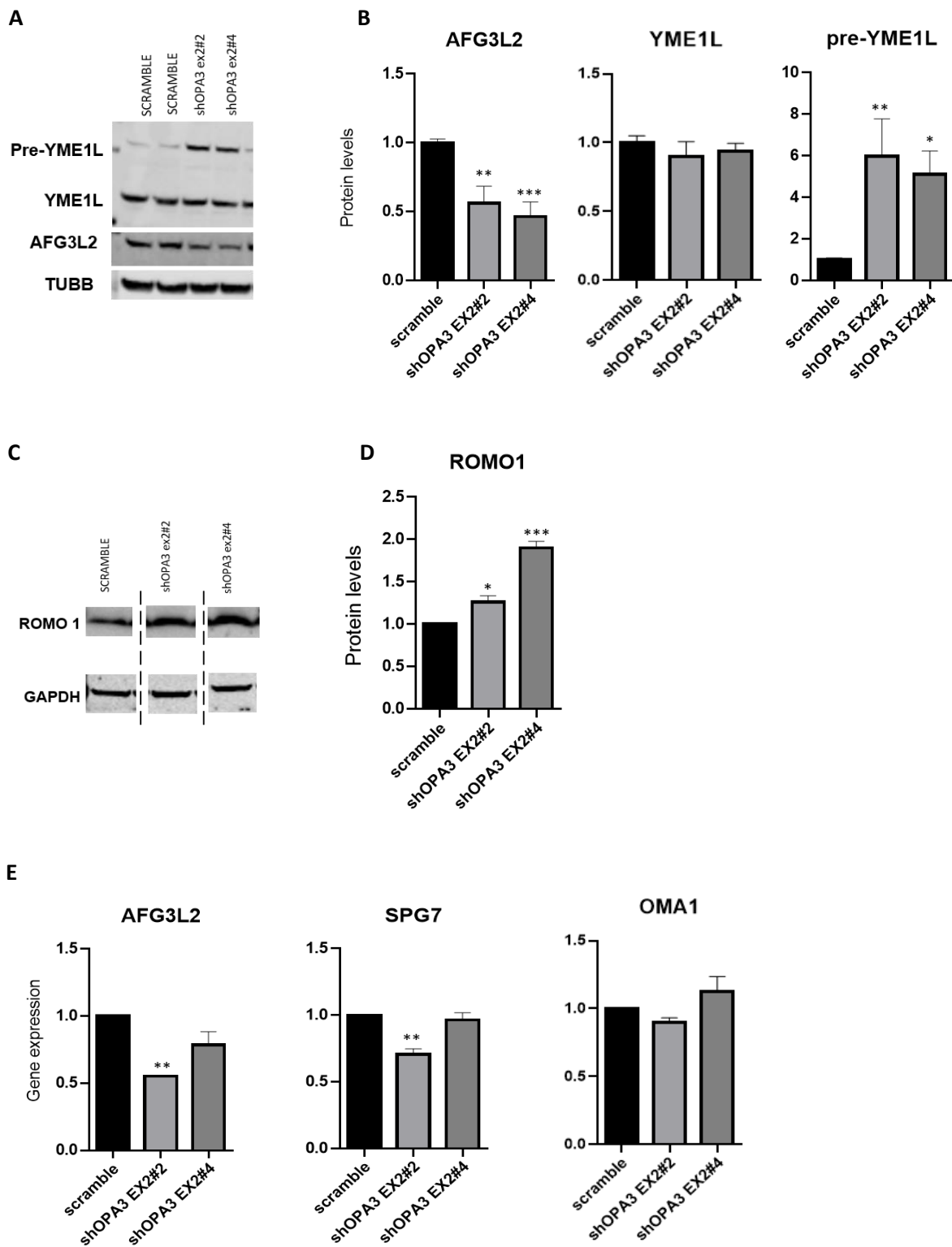


Figura 18. Espressione genica e proteica delle proteasi di OPA1 e di ROMO1.

A) Western Blot per AFG3L2, YME1L e pre-YME1L. B) Analisi densitometrica che mostra i livelli proteici di AFG3L2, YME1L e pre-YME1L, normalizzati sui valori di β -tubulina (TUBB). C) Western Blot per ROMO1. D) Analisi densitometrica che mostra i livelli proteici di ROMO1, normalizzati sui valori di gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH). E) Espressione genica delle proteasi AFG3L2, SPG7, OMA1 mediante Real time PCR. Per la significatività statistica (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) è stato eseguito un test one-way ANOVA (Dunnnett's multiple comparisons) fra linee di controllo e silenziate.

4. Analisi del processo autofagico

La continua riorganizzazione del network mitocondriale è strettamente integrata ad altre funzioni mitocondriali, nello specifico esiste una chiara correlazione tra i meccanismi della dinamica e l'autofagia (Galluzzi et al., 2011). È inoltre noto che alterazioni di proteine coinvolte nella regolazione della morfologia dei mitocondri e associate all'insorgenza di atrofia ottica, come OPA1, siano a loro volta implicate nei meccanismi autofagici (Kane et al., 2017; Liao et al., 2017; Carelli et al., 2015; Zaninello et al., 2020).

I risultati sin qui ottenuti con le linee cellulari SK-N-SH shOPA3 relativi alle alterazioni della regolazione dei processi di fissione e fusione ci hanno indotto pertanto a proseguire lo studio concentrandoci sulla valutazione del processo autofagico.

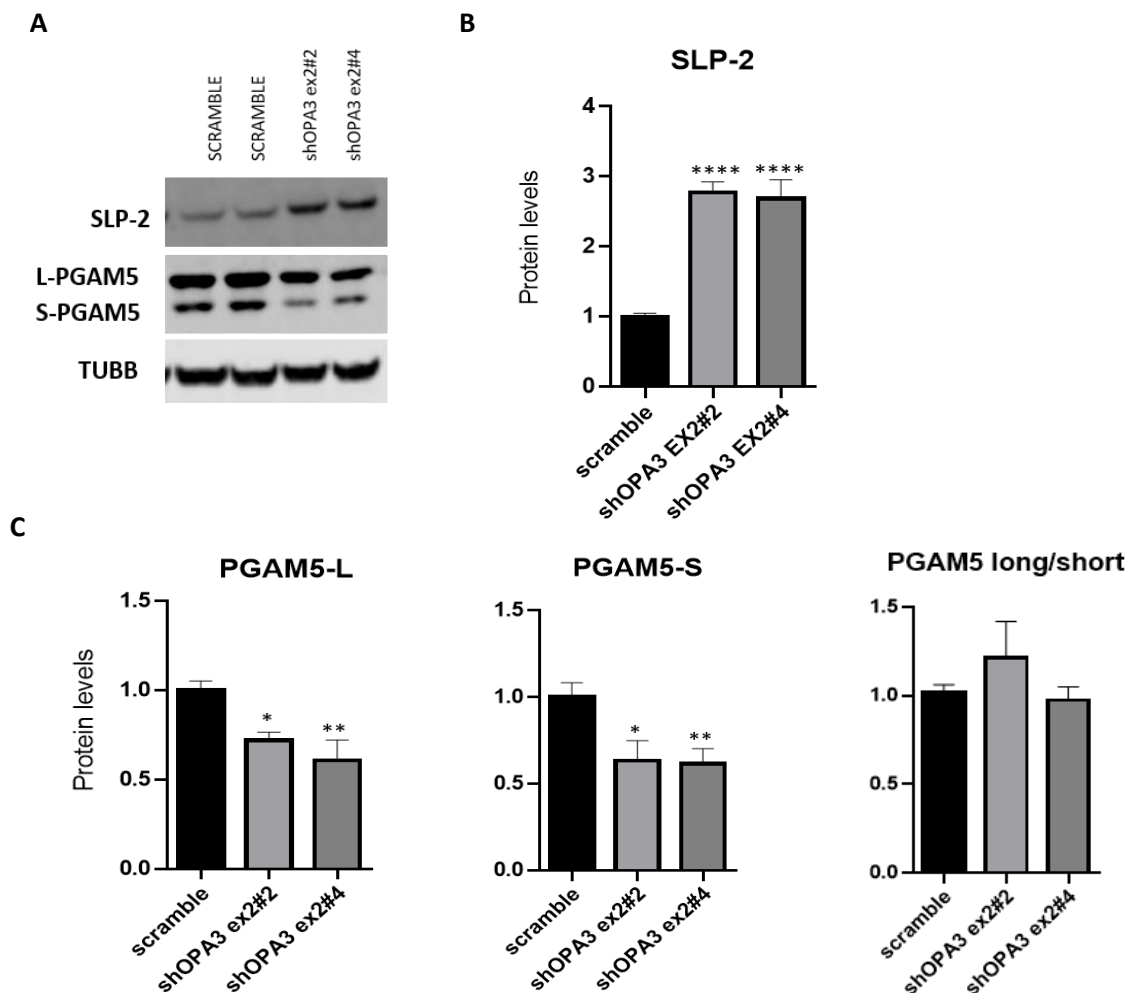


Figura 19. Espressione proteica di SLP-2 e PGAM5 nelle linee silenziate SK-N-SH shOPA3 ex2#2, ex2#4 e di controllo.

A) Western Blot per SLP-2 e PGAM5. B) Analisi densitometrica che mostra i livelli proteici di SLP-2 da densitometria, normalizzati sui valori di β -tubulina (TUBB). C) Analisi densitometrica che mostra i livelli proteici di PGAM5-L e PGAM5-S, normalizzati sui valori di β -tubulina (TUBB). Per la significatività statistica (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$) è stato eseguito un test one-way ANOVA (Dunnett's multiple comparisons) fra linee di controllo e silenziate.

L'analisi dei principali marcatori del flusso autofagico, LC3B e p62, è stata effettuata in un primo momento in condizioni basali e successivamente dopo induzione con Rapamicina (RAPA), inibitore di mTOR, o trattamento con Cloroquina (CHL), che determina il blocco della proteolisi mediata dai lisosomi provocando un incremento del numero di autofagosomi. In condizioni basali i livelli di LC3II, forma lipidata di LC3B che correla con il numero di autofagosomi, risultano aumentati in entrambi i cloni cellulari silenziati rispetto allo *scramble*, seppur non raggiungendo una significatività statistica (Fig. 20A-B). La proteina p62 risulta invece significativamente aumentata a livello basale in entrambi i cloni silenziati rispetto allo *scramble* (Fig. 20A-B).

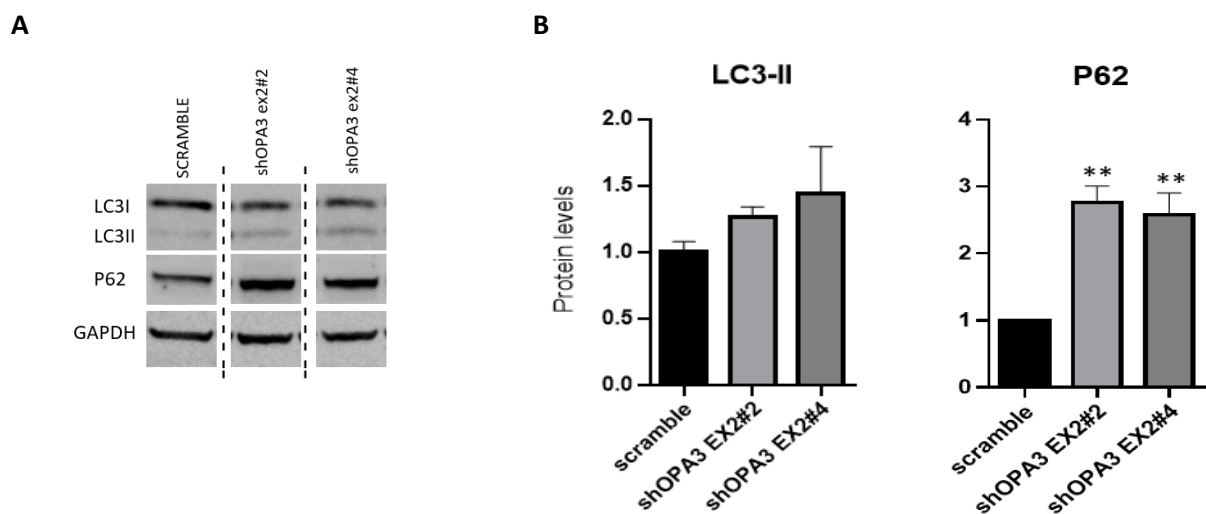


Figura 20. Espressione proteica dei principali marcatori di autofagia nelle linee silenziate SK-N-SH shOPA3 ex2#2, ex2#4 e di controllo.

A) Western Blot per LC3B e P62. B) Livelli proteici di LC3B e P62 da densitometria normalizzati sui valori di gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH). Per la significatività statistica (** $p < 0,01$) è stato eseguito un test one-way ANOVA (Dunnett's multiple comparisons) fra linee di controllo e silenziate.

Dopo trattamento con RAPA i cloni cellulari silenziati mostrano una scarsa risposta, mantenendo quasi invariati i livelli di LC3II e p62 rispetto alla condizione basale, possibilmente perché i livelli di autofagia erano già al limite massimo in queste cellule. Il trattamento con CHL determina invece una risposta coerente in entrambi i cloni, che si manifesta con l'ulteriore aumento di LC3II determinato dall'inibizione della degradazione degli autofagosomi e dal loro accumulo, mentre i livelli di p62, già fortemente aumentati rispetto al controllo in condizioni basali, non variano (Fig. 21A-B).

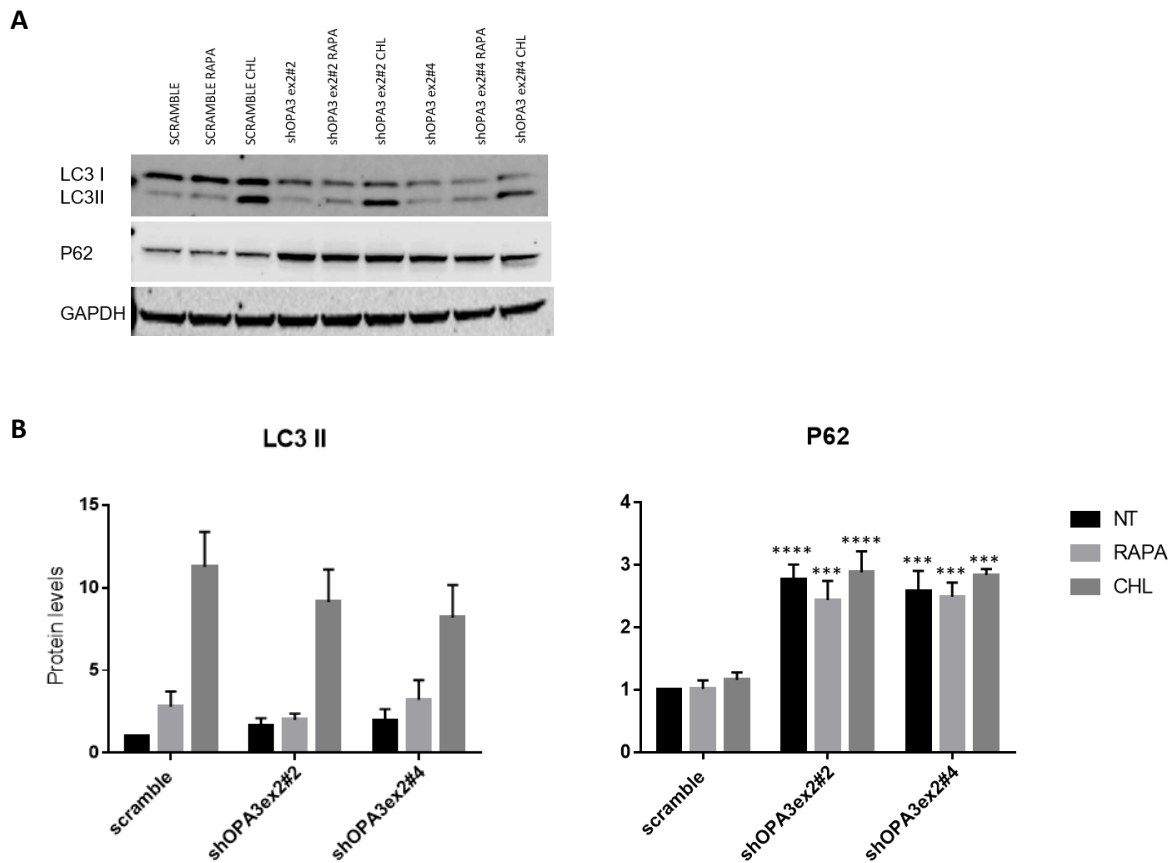


Figura 21. Valutazione del processo autofagico nelle linee silenziate SK-N-SH shOPA3 ex2#2, ex2#4 e di controllo (scramble) in condizioni basali (NT), dopo trattamento con rapamicina (RAPA) 10 μ M per 2 ore e clorochina (CHL) 25 μ M per 2 ore.

A) Western Blot per LC3B e P62. B) Analisi densitometrica che mostra i livelli proteici di LC3II, normalizzati sui valori del controllo non trattato; analisi densitometrica che mostra i livelli proteici di P62, normalizzati sui valori del controllo non trattato. Per la significatività statistica (***) $p < 0,001$, (****) $p < 0,0001$ è stato eseguito un test two-way ANOVA (Dunnett's multiple comparisons) fra linee di controllo e silenziate. I dati relativi ai valori di significatività fanno riferimento al confronto tra cellule silenziate e di controllo nelle medesime condizioni.

Alla luce dei risultati ottenuti si sono volute indagare meglio le fasi che precedono la formazione dell'autofagosoma. Nello specifico, ci siamo concentrati sull'analisi della proteina beclin-1 (BCN1), implicata nella formazione del fagoforo, e delle proteine ATG, coinvolte nei due sistemi di coniugazione che partecipano ai processi di espansione della membrana del fagoforo e della chiusura dell'autofagosoma.

La valutazione delle proteine ATG (ATG3, ATG4B, ATG5, ATG7, ATG12) e di Beclin1 ha mostrato una tendenza all'aumento, sia come espressione genica (Fig. 23) che a livello proteico (Fig. 22) in entrambe le linee silenziate rispetto al controllo.

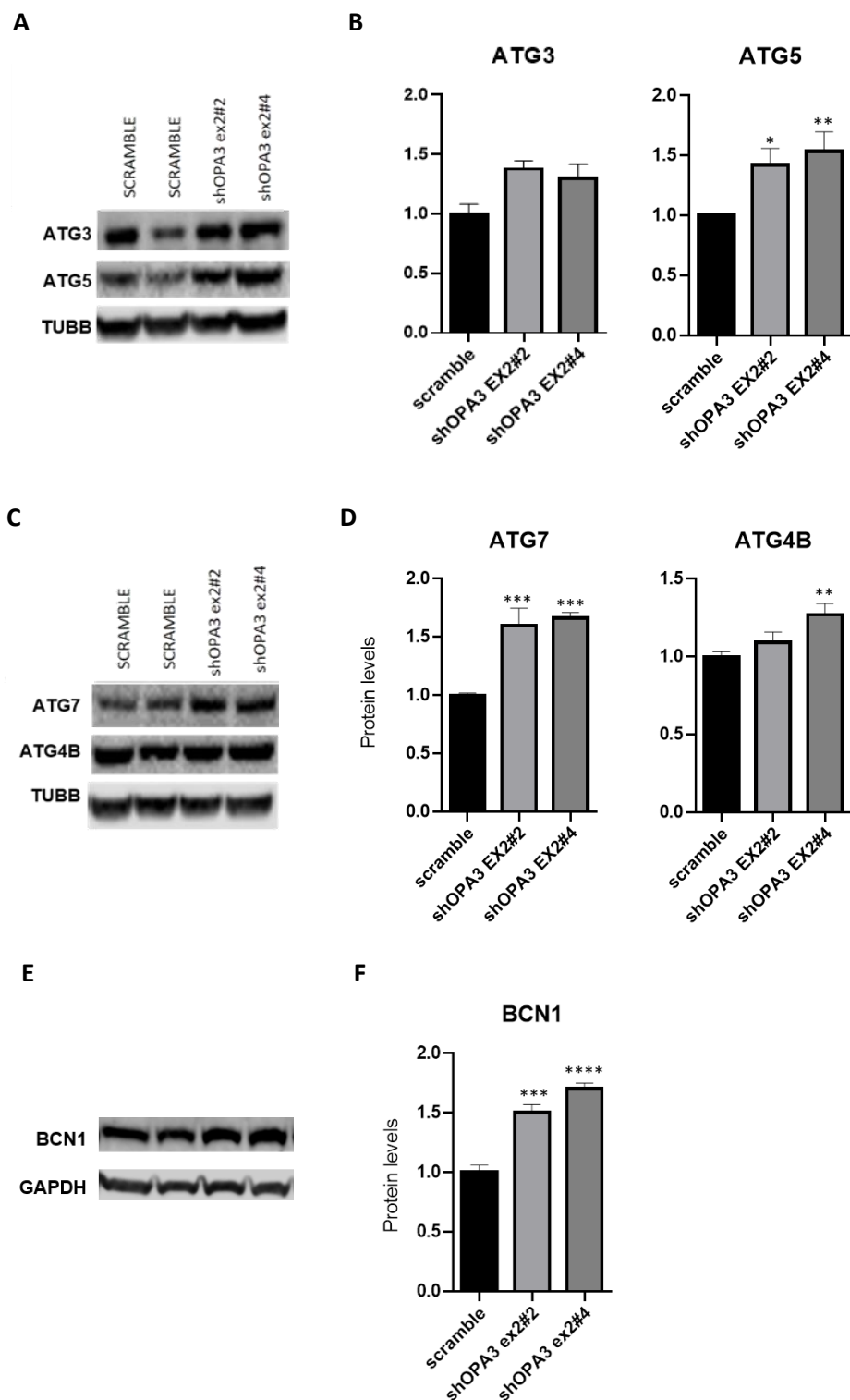


Figura 22. Espressione proteica delle proteine ATG e Beclin-1 (BCN1) nelle linee silenziate SK-N-SH shOPA3 ex2#2, ex2#4 e di controllo (scramble).

A) Western blot per ATG3 e ATG5. B) Analisi densitometrica che mostra i livelli proteici di ATG3 e ATG5, normalizzati sui valori di β -tubulina (TUBB). C) Western blot per ATG7 e ATG4B. D) Analisi densitometrica che mostra i livelli proteici di ATG7 e ATG4B, normalizzati sui valori di β -tubulina. E) Western blot per Beclin-1. F) Analisi densitometrica che mostra i livelli proteici di Beclin-1, normalizzati sui valori di gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH). Per la significatività statistica (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$) è stato eseguito un test one-way ANOVA (Dunnett's multiple comparisons) fra linee silenziate e di controllo.

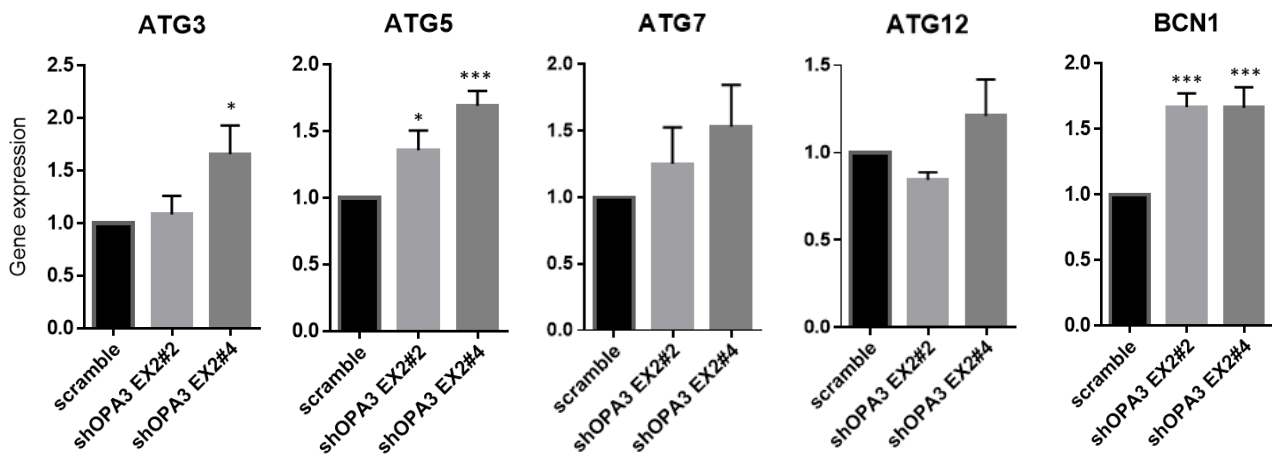


Figura 23. Espressione genica delle proteine ATG e Beclin-1 (BCN1) nelle linee silenziate SK-N-SH shOPA3 ex2#2, ex2#4 e di controllo (scramble).

Espressione genica valutata in Real time PCR di ATG3, ATG5, ATG7, ATG12 e BCN1. Per la significatività statistica (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$) è stato eseguito un test one-way ANOVA (Dunnett's multiple comparisons) fra linee silenziate e di controllo.

5. Analisi delle interazioni della proteina OPA3 con i fosfolipidi di membrana

Il rimodellamento delle membrane mitocondriali è regolato da interazioni tra le proteine implicate nei processi di dinamica mitocondriale e i lipidi. Nello specifico i fosfolipidi maggiormente coinvolti nei meccanismi di riorganizzazione del network mitocondriale sono l'acido fosfatidico e la cardiolipina che interagiscono con le proteine di fusione e fissione mitocondriale MFN1/2, OPA1 e DRP1 (Kameoka, 2018).

Avendo ottenuto dei dati che ci portano a sostenere alterazioni nei processi di dinamica mitocondriale e nel meccanismo autofagico e sapendo che quest'ultimi meccanismi sono strettamente correlati e influenzati dalla composizione lipidica delle membrane, abbiamo voluto approfondire il nostro studio facendo una valutazione delle interazioni della proteina OPA3 purificata con i principali fosfolipidi utilizzando una membrana di nitrocellulosa su cui sono legati in spot otto lipidi con gradiente di concentrazione decrescente.

Abbiamo osservato che OPA3 lega in modo specifico l'acido fosfatidico anche a concentrazioni molto basse (Fig. 24), suggerendo che queste interazioni proteina-lipide possano generare diverse risposte biologiche che sono alla base di importanti processi biologici che coinvolgono la biosintesi dei lipidi e la possibile regolazione dei processi di dinamica mitocondriale.

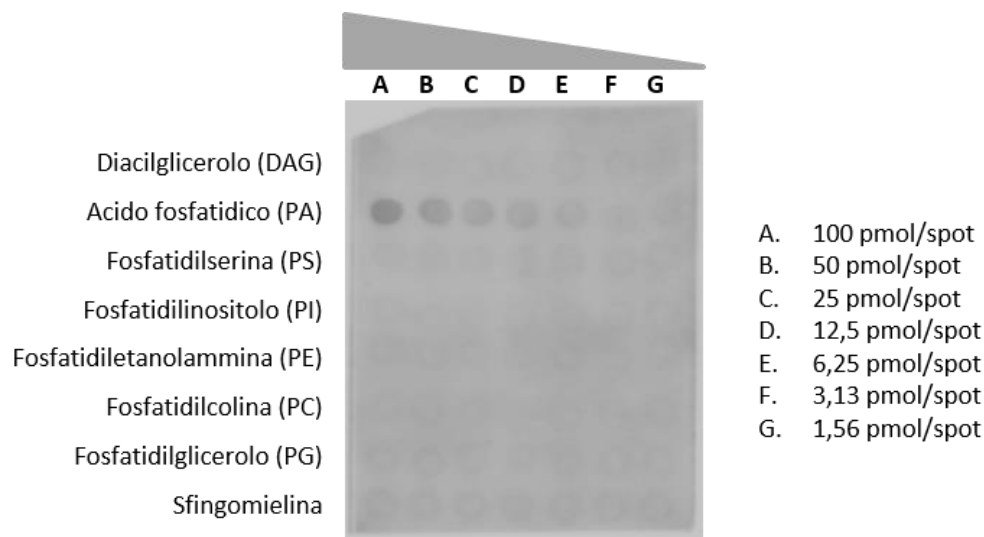


Figura 24. Valutazione delle interazioni di OPA3 con fosfolipidi di membrana.

Legame specifico all'acido fosfatidico della proteina OPA3 analizzato mediante *Membrane Lipid Array*. La rilevazione del segnale è stata effettuata in chemiluminescenza.

Successivamente abbiamo voluto approfondire la nostra indagine analizzando l'enzima LIPIN, una fosfatasi essenziale nel metabolismo dei lipidi, capace infatti di catalizzare la conversione di PA in DAG precursore di fosfolipidi quali PE, PS, PC e cardiolipina (Zhang e Reue., 2017).

LIPIN, mediante l'organizzazione della composizione lipidica, sembra garantire un bilanciamento tra i processi di fusione e fissione influenzando la morfologia mitocondriale (Kameoka et al., 2018). Da una valutazione in Western Blotting abbiamo rilevato che i livelli di LIPIN risultano significativamente ridotti nei due cloni se paragonati al controllo (Fig. 25), che potrebbe tradursi in una ridotta conversione dell'acido fosfatidico in DAG, con possibile inibizione del processo di fissione mitocondriale (Baba et al., 2013; Kameoka et al., 2018).

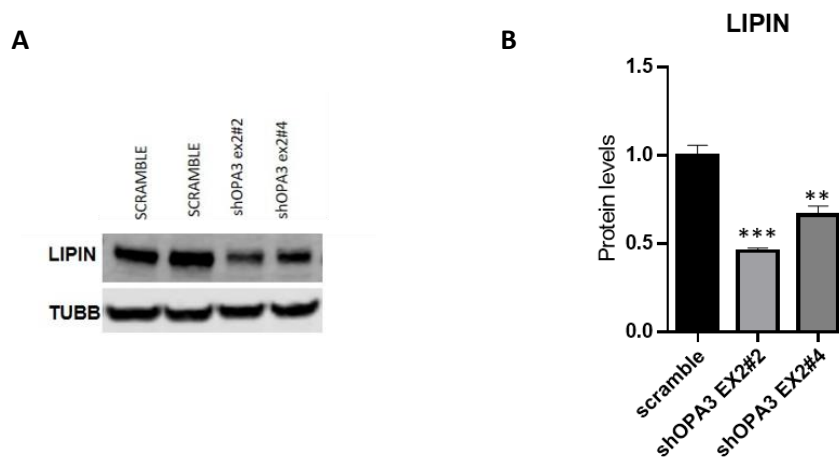


Figura 25. Analisi della fosfatasi LIPIN mediante Western Blotting nei cloni silenziati SK-N-SH shOPA3 ex2#2, ex2#4 e di controllo (scramble).

A) Western Blot per LIPIN. B) Analisi densitometrica che mostra i livelli proteici di LIPIN, normalizzati sui valori di β -tubulina (TUBB). Per la significatività statistica (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) è stato eseguito un test one-way ANOVA (Dunnett's multiple comparisons) fra linee di controllo e silenziate.

In conclusione, i risultati ottenuti nella prima parte di questa tesi hanno evidenziato una possibile riduzione dell'efficienza energetica quando la riduzione di OPA3 supera il 50%, una redistribuzione dei mitocondri nella zona perinucleare e un'alterazione dell'autofagia caratterizzata da un aumento dei marcatori degli autofagosomi e della proteina p62 che potrebbe indicare un'anomalia del flusso autofagico. Inoltre, è stata dimostrata l'interazione tra la proteina OPA3 e l'acido fosfatidico e la contemporanea riduzione della fosfatasi LIPIN nella linea cellulare SK-N-SH shOPA3, condizione che potrebbe provocare un aumento dell'acido fosfatidico con conseguente sbilanciamento verso la fusione mitocondriale.

PARTE II - Studio di linee cellulari di fibroblasti provenienti da pazienti con diagnosi ADOAC e 3-MGA III e portatori di mutazioni in *OPA3*

Lo studio dei processi di dinamica mitocondriale e autofagia sono stati riprodotti anche su linee cellulari di fibroblasti derivati da donatori sani e da pazienti portatori di mutazioni nel gene *OPA3*. Nello specifico, le linee di fibroblasti studiate sono state generate da pazienti affetti da atrofia ottica dominante e cataratta (ADOAC) causata da una mutazione dominante missenso c.313 C>G/p.Q105E nel gene *OPA3*, e da pazienti affetti da aciduria 3-metilglutaconica di tipo 3 (3-MGA III), causata dalla mutazione recessiva c.143-1G>C /IVS1-1G>C nel sito accettore di *splicing* dell'introne 1 nel gene *OPA3*, che, come già riportato, abolisce l'espressione della variante OPA3V1 (Kleta et al., 2002).

1. Espressione di *OPA3* in linee primarie di fibroblasti

Le linee di fibroblasti con mutazione dominante e recessiva sono state analizzate mediante PCR quantitativa (*Droplet Digital-PCR*, DD-PCR) e Western blotting, rispettivamente per la valutazione dell'espressione genica e dei livelli proteici di *OPA3*. Nella linea con mutazione dominante (p.Q105E) si assiste ad una riduzione significativa della proteina OPA3V1 (Fig. 26A-B), mentre l'espressione genica risulta significativamente aumentata (Fig. 26C), suggerendo un possibile meccanismo compensatorio; al contrario, nella linea con mutazione recessiva (IVS1-1G>C) abbiamo riscontrato, come atteso, una totale assenza di proteina e di mRNA dell'isoforma OPA3V1 (Fig. 26A-C).

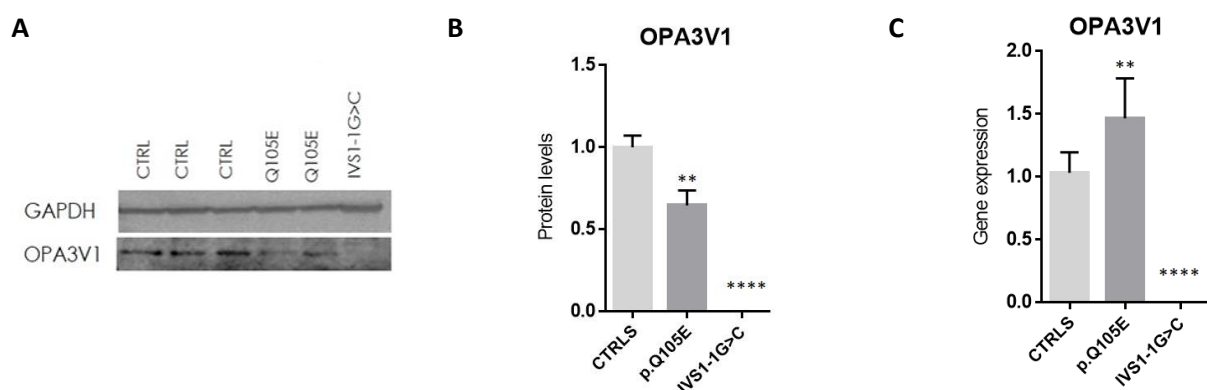


Figura 26. Espressione proteica e genica e di *OPA3* nelle linee di fibroblasti mutanti e di controllo.

A) Immagine rappresentativa del Western Blot per OPA3V1. B) Analisi densitometrica dei livelli della variante OPA3V1 normalizzati sui valori di gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH). C) Espressione genica della variante OPA3V1. I dati sono presentati come media di esperimenti indipendenti con SEM ($n=3$). Per la significatività statistica (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$) è stato eseguito un test one-way ANOVA (Dunnett's multiple comparisons) fra linee di controllo e mutate.

2. Analisi del metabolismo energetico

Analogamente a quanto svolto nella prima parte del presente studio, abbiamo effettuato una caratterizzazione bioenergetica sulle due linee di fibroblasti con mutazione nel gene *OPA3*. Il potenziale di membrana è stato valutato mediante l'utilizzo della sonda JC1, che mostra un accumulo nei mitocondri dipendente dal potenziale di membrana, indicato da uno spostamento dell'emissione di fluorescenza dal verde al rosso. Il rapporto tra il segnale rosso e verde non ha mostrato differenze significative nei fibroblasti mutanti rispetto alle linee di controllo (Fig. 27A). La quantificazione dei livelli di ATP totale è stata effettuata sia in condizioni di coltura standard (*glucose-medium*) che coltivando le cellule in un terreno privo di glucosio e addizionato di galattosio per 72 ore (*galactose-medium*), una condizione che forza l'utilizzo della catena respiratoria da parte delle cellule evidenziando possibili difetti biochimici. Anche per l'ATP totale non sono stati riscontrati difetti nei fibroblasti mutanti rispetto ai controlli (Fig. 27B).

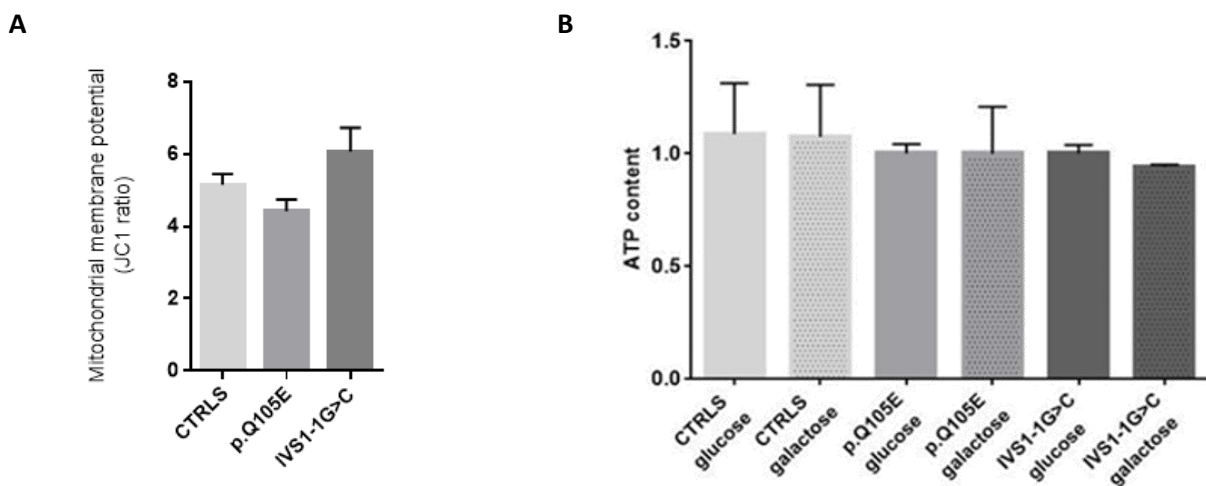


Figura 27. Caratterizzazione bioenergetica delle linee di fibroblasti con mutazione in *OPA3* e di controllo. A) Istogramma dei risultati dell'analisi del potenziale di membrana mitocondriale espressi come rapporto di fluorescenza della sonda JC-1 (590 nm/529 nm). I dati sono espressi come media di quattro esperimenti indipendenti e SEM. B) Istogramma dei risultati sul contenuto di ATP nelle linee cellulari in condizioni basali (*glucose medium*) e dopo incubazione per 48 ore in *glucose-free medium* addizionato con 5 Mm di galattosio. Sulla base del test two-way ANOVA non si rilevano differenze significative.

Infine, il consumo di ossigeno valutato nelle cellule intatte non ha evidenziato difetti nella respirazione mitocondriale, se non una leggera riduzione della respirazione massima e della capacità respiratoria residua nella linea con mutazione recessiva, sebbene non statisticamente significativa (Fig. 28A-B).

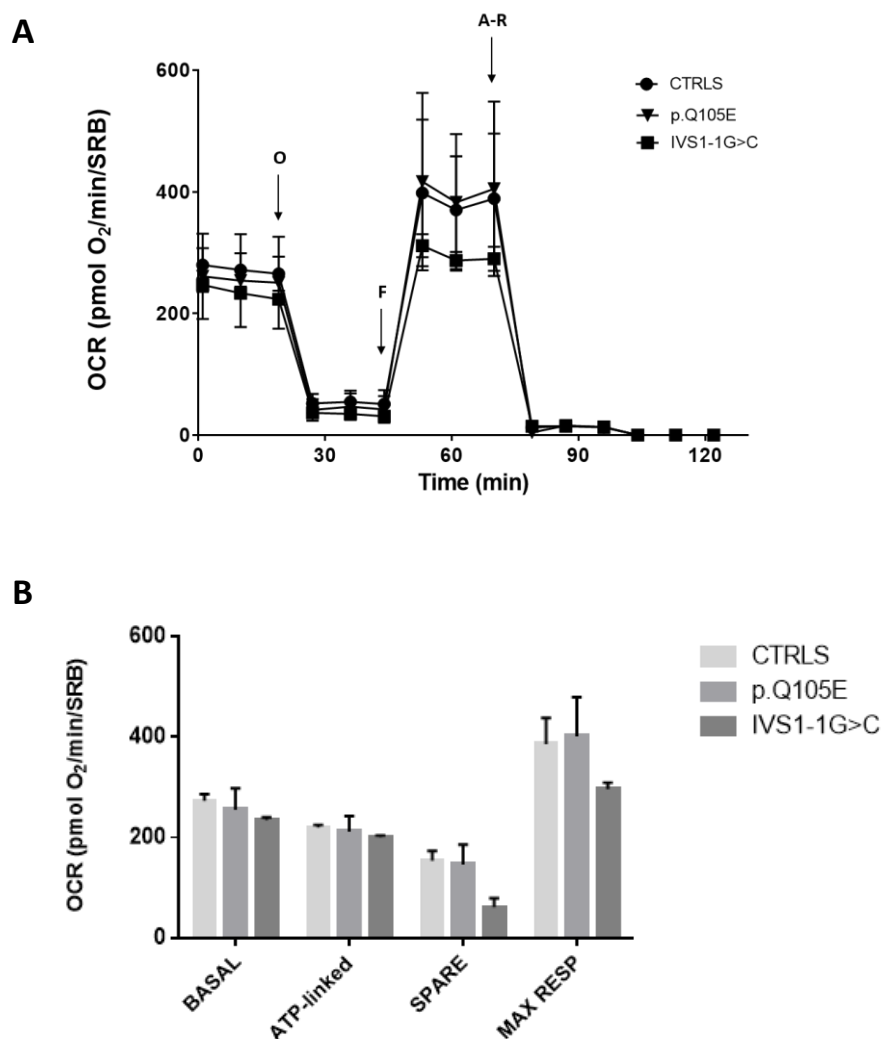


Figura 28. Consumo di ossigeno (OCR) nelle linee di fibroblasti con mutazione in *OPA3* e di controllo.

A) Rappresentazione del consumo di ossigeno (OCR), espresso in pmoli/min, in condizioni basali e dopo l'aggiunta di oligomicina (O), FCCP (F), antimicina A (A) e rotenone (R). I valori ottenuti sono stati normalizzati tramite il saggio SRB, indicativo del numero di cellule. I dati sono espressi come media di 3 esperimenti indipendenti e SEM. **B)** Istogramma dei valori di OCR basale, ATP-linked, massimo e residuo. I dati sono espressi come media di tre esperimenti indipendenti e SEM. Sulla base del test two-way ANOVA non si rilevano differenze significative. BASAL: respirazione basale; ATP-linked: respirazione legata alla sintesi di ATP; SPARE: capacità respiratoria residua; MAX RESP: respirazione massima.

3. Analisi morfologica della dinamica mitocondriale

Considerati i risultati ottenuti sulle linee cellulari silenziatae relativi alle proteine coinvolte nella dinamica mitocondriale e alla morfologia del reticolo mitocondriale, abbiamo voluto estendere lo studio alle linee primarie di fibroblasti con mutazioni nel gene *OPA3*.

La morfologia del network mitocondriale dei fibroblasti è stata valutata mediante la sonda MitoTracker Red e microscopia confocale, in condizioni basali (*glucose-medium*) e di stress (*galactose-medium*, 72h).

Il risultato dell'analisi ha messo in luce una differente morfologia del reticolo mitocondriale in condizioni basali esclusivamente nella linea con mutazione recessiva, che presenta un elevato numero di cellule con reticolo filamentoso rispetto al controllo ed alla linea con mutazione dominante. Dopo trattamento con galattosio, si osserva un aumento di cellule con network frammentato, ma con entità simili in tutte le linee analizzate, senza significative differenze rispetto ai fibroblasti di controllo (Fig. 29A-B).

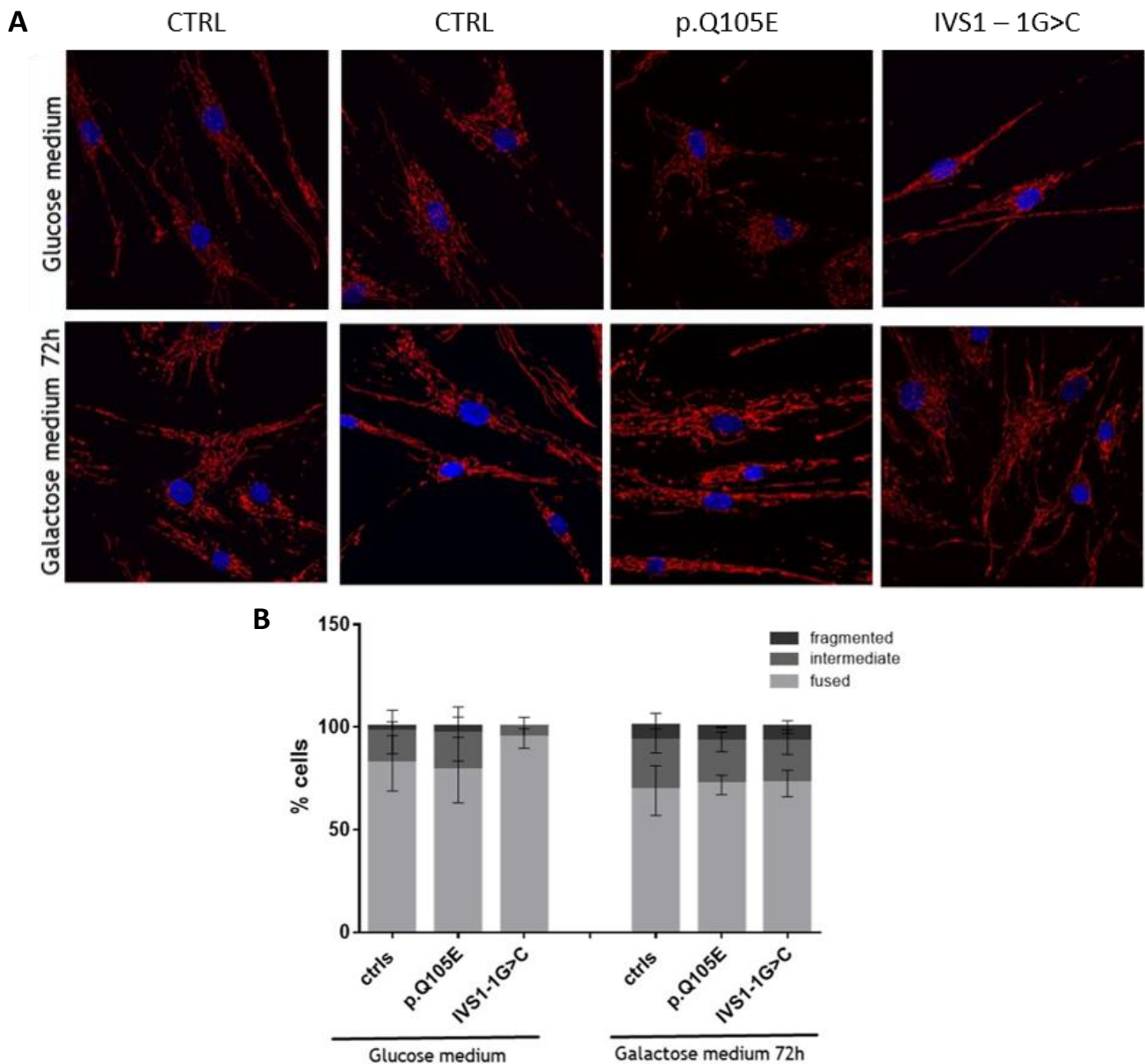


Figura 29. Analisi della morfologia mitocondriale in due linee controllo e nei fibroblasti con mutazione in OPA3.

A) Immagini rappresentative del network mitocondriale valutata mediante microscopia confocale (A1 confocal microscope, Nikon Instruments) con obiettivo ad olio 60x/1.4-NA, in condizioni basali (*glucose-medium*) e sotto stress ossidativo (*galactose-medium, 72h*). I mitocondri sono stati marcati con MitoTracker Red (fluorescenza rossa) e i nuclei con Hoechst (fluorescenza blu). **B)** Istogramma della valutazione del reticolo mitocondriale mediante *blind test* espresso come percentuale di cellule nelle tre categorie morfologiche (filamentoso, intermedio, frammentato).

Il risultato ottenuto ci ha indotto ad approfondire l'indagine attraverso una valutazione delle proteine coinvolte nel processo di dinamica mitocondriale, nello specifico la proteina di fusione OPA1 e le proteine regolatrici della fissione mitocondriale DRP1 e FIS1, mediante Western blotting. In entrambe le linee cellulari mutate i livelli proteici di OPA1 totale non sono risultate differenti rispetto ai fibroblasti di controllo (Fig. 30A-B). Al contrario, nella linea con mutazione recessiva si denota un incremento di circa il 50% rispetto al controllo del rapporto tra l'isoforma OPA1-long (OPA1-l) e l'isoforma OPA1-short (OPA1-s) (Fig. 30B), risultato analogo a quanto osservato nelle linee di neuroblastoma silenziate per OPA3V1 (Parte I). Da un'analisi dei marcatori di fissione non si evidenziano differenze rispetto alla linea di controllo per quanto riguarda la linea con mutazione recessiva, mentre la linea con mutazione dominante presenta una significativa riduzione di DRP1 (Fig. 30C-D).

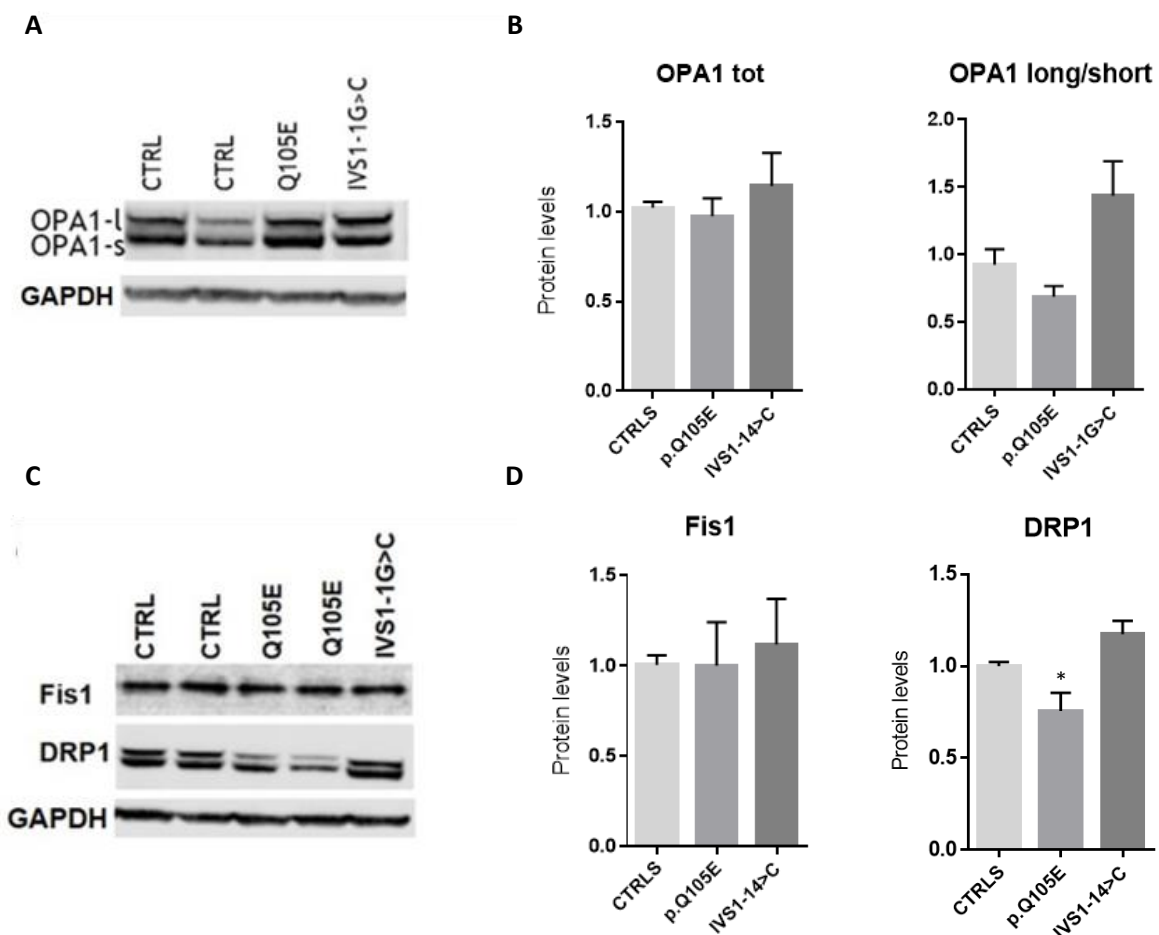


Figura 30. Valutazione delle proteine di fusione e fissione in due linee controllo e nei fibroblasti con mutazione OPA3.

A) Western Blot per OPA1. B) Livelli proteici di OPA1 totale (tot) da densitometria normalizzati sui valori di gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) e analisi densitometrica del rapporto OPA1-long/OPA1-short. C) Western Blot per Fis1 e DRP1. D) Livelli proteici da densitometria normalizzati sui valori di gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH). I dati sono una media di esperimenti indipendenti con SEM ($n=3$). Per la significatività statistica (* $p < 0,05$) è stato eseguito un test one-way ANOVA (Dunnnett's multiple comparisons) fra linee di controllo e fibroblasti mutati.

Avendo ottenuto dei risultati che riportano un incremento dei livelli dell'isoforma OPA1 long rispetto all'isoforma short nella linea con mutazione recessiva, abbiamo approfondito lo studio mediante l'analisi delle proteasi AFG3L2 e YME1L, coinvolte nel processamento della proteina OPA1. Dal risultato del Western blotting non emergono differenze significative dei livelli proteici di YME1L e del suo precursore, mentre osserviamo un incremento significativo di AFG3L2, esclusivamente nella linea di fibroblasti con mutazione recessiva (IVS1-1G>C) (Fig. 31A-B), risultato opposto a quello ottenuto sulle linee di neuroblastoma silenziate per OPA3V1.

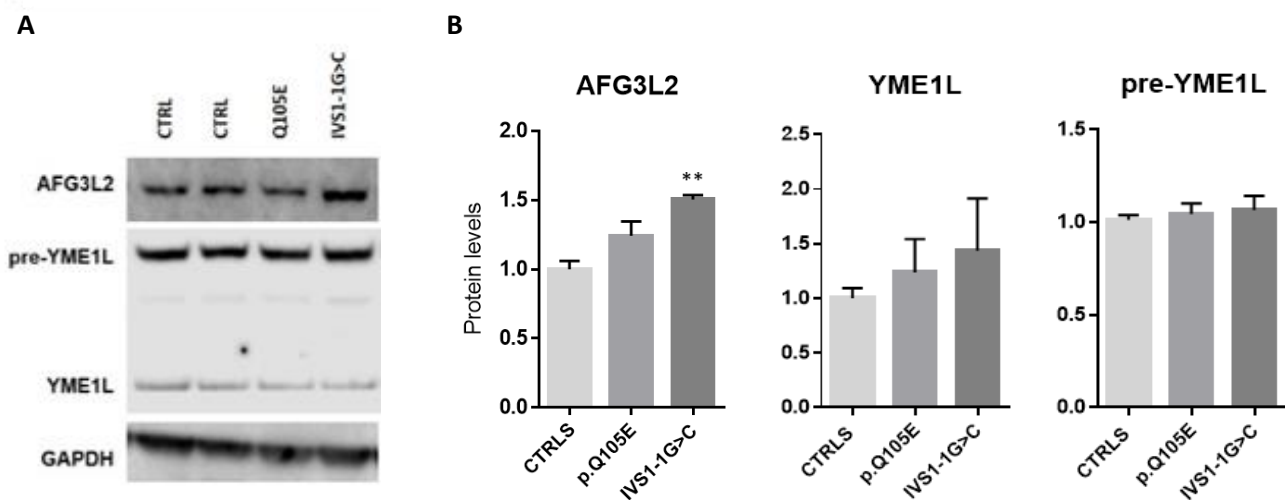


Figura 31. Espressione proteica delle proteasi AFG3L2 e YME1L.

A) Western Blot per AFG3L2, YME1L e pre-YME1L. B) Livelli proteici di AFG3L2, YME1L e pre-YME1L da densitometria normalizzati sui valori di gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH). Per la significatività statistica (** $p < 0,01$) è stato eseguito un test one-way ANOVA (Dunnett's multiple comparisons) fra linee di controllo e mutate.

Proseguendo lo studio delle proteine coinvolte nella dinamica mitocondriale, abbiamo analizzato il complesso SPY (SLP-2/PARL/ YME1L), che come già descritto, ha un ruolo chiave nei processi di fusione mitocondriale indotta da stress e risultava significativamente alterato nelle linee di neuroblastoma silenziate per OPA3V1. Si è proceduto quindi all'analisi dei livelli proteici di SLP2 e PGAM5, effettore a valle di SLP-2 e PARL, mediante Western blotting nelle linee cellulari mutate e di controllo. Come per AFG3L2, è stato riscontrato un risultato opposto a quanto osservato nelle linee di neuroblastoma silenziate per OPA3. Infatti, mentre la linea con mutazione dominante mostra un aumento significativo della proteina SLP-2 e livelli comparabili di PGAM5, la linea con mutazione recessiva ha livelli di SLP2 comparabili ai controlli e livelli di PGAM5-s significativamente aumentati (Fig. 32A-C).

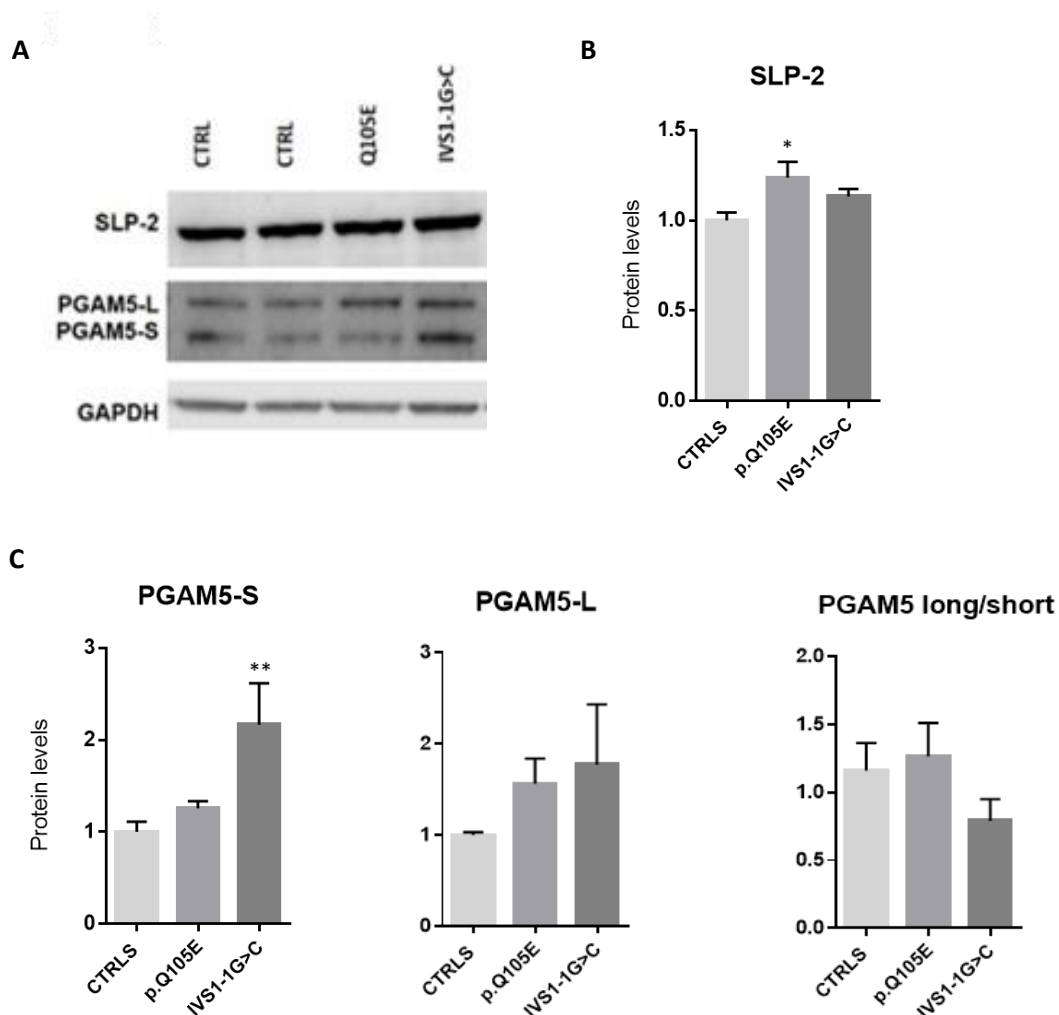
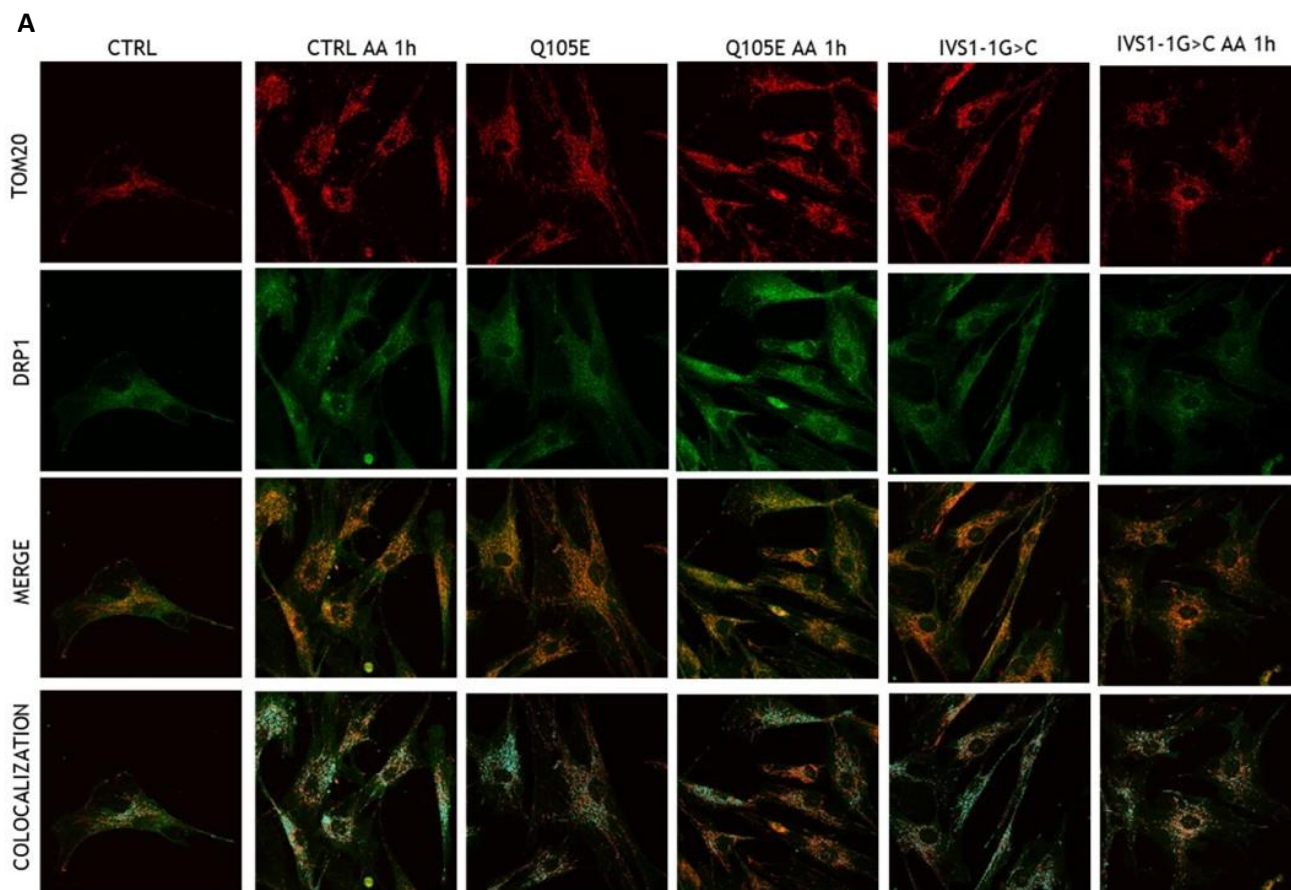


Figura 32. Espressione proteica di SLP-2 e PGAM5 nelle linee di fibroblasti con mutazione OPA3 e di controllo.

A) Western Blot per SLP-2 e PGAM5. B) Livelli proteici di SLP-2 da densitometria normalizzati sui valori di gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH). C) Livelli proteici di PGAM5-L e PGAM5-S da densitometria normalizzati sui valori di gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) e analisi densitometrica del rapporto PGAM5 long/PGAM5 short. Per la significatività statistica (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) è stato eseguito un test one-way ANOVA (Dunnett's multiple comparisons) fra linee di controllo e silenziate.

A completamento dello studio sulla dinamica mitocondriale, abbiamo effettuato un trattamento con antimicina A per indurre la fissione dei mitocondri nelle linee di fibroblasti mutati e di controllo, al fine di valutare il reclutamento di DRP1 sulla membrana mitocondriale esterna come risposta delle cellule allo stimolo di frammentazione (Toyama et al., 2016).

Si è proceduto dunque con l'analisi per immagini mediante immunofluorescenza e microscopia confocale per individuare la colocalizzazione della proteina di fissione DRP1 con il marker mitocondriale TOM20. Mentre la linea con mutazione dominante mostra una risposta al trattamento simile al controllo, la linea con mutazione recessiva non risponde allo stimolo di fissione, presentando infatti una percentuale di reclutamento di DRP1 sui mitocondri pressoché identica alla condizione basale (Fig. 33A-B).



B

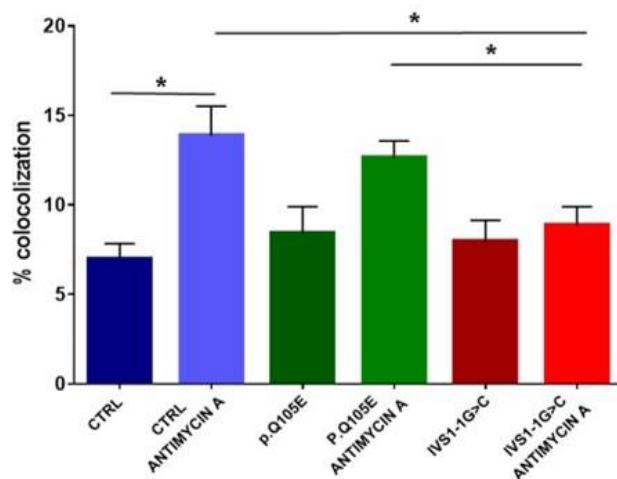


Figura 33. Localizzazione mitocondriale di DRP1 post trattamento con antimicina A in una linea di controllo e nei fibroblasti con mutazione OPA3.

A) La colocalizzazione di DRP1 (fluorescenza verde) con il marcatore mitocondriale TOM20 (fluorescenza rossa) è stata valutata mediante immunofluorescenza e microscopia confocale (A1 confocal microscope, Nikon Instruments) con obiettivo ad olio 60x/1.4-NA, in condizioni basali e dopo trattamento con antimicina A (AA) 10 μ M per 1h. La colocalizzazione risulta dalla sovrapposizione dei due segnali per DRP1 e TOM20 (fluorescenza gialla). B) Istogramma della colocalizzazione di DRP1 con TOM20 espressa in forma percentuale. Per la significatività statistica (* $p < 0,05$) è stato eseguito un one-way Anova e Tukey's test per i confronti multipli.

4. Analisi del processo autofagico

Analogamente a quanto effettuato sulle linee SK-N-SH shOPA3, abbiamo voluto riprodurre le analisi relative al processo autofagico nelle linee di fibroblasti derivanti da pazienti con mutazione nel gene *OPA3*.

Abbiamo quindi analizzato i principali marcatori autofagici LC3B e p62 in condizioni basali mediante Western blotting. Nello specifico abbiamo monitorato i livelli della forma lipidata di LC3B (LC3II), che correla con il numero di autofagosomi, rapportandola con la sua forma citoplasmatica (LC3I). Dai risultati ottenuti si denota, in condizioni basali, una riduzione significativa del rapporto LC3II/I (Fig. 34A-B) nelle linee mutate rispetto ai controlli suggerendo una possibile compromissione del processo autofagico, pur non registrando alcuna alterazione significativa dei livelli di p62 (Fig. 34A e C).

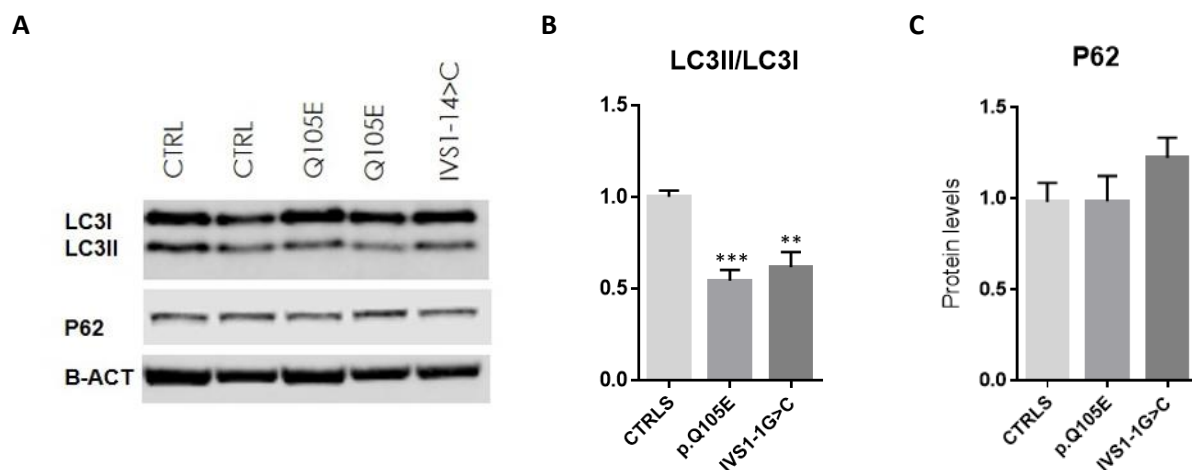


Figura 34. Analisi del processo autofagico in condizioni basali in linee di controllo e nei fibroblasti con mutazione *OPA3*.

A) Western blot per LC3B e p62. B) Analisi densitometrica del rapporto LC3II/I. Livelli proteici di p62 (C) ottenuti da analisi densitometrica e normalizzati sui valori di β -actina (B-ACT). I dati sono una media di tre esperimenti indipendenti con SEM. Per la significatività statistica (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) è stato eseguito un test one-way ANOVA (Dunnett's multiple comparisons) fra linee di controllo e mutate.

La riduzione di LC3II potrebbe derivare sia da un difetto di autofagia che da aumentata degradazione delle vescicole autofagiche. Per valutare se esistano effettivamente difetti del meccanismo autofagico nelle linee di fibroblasti con mutazione *OPA3* abbiamo indotto il processo mediante una deprivazione di nutrienti nel mezzo di coltura (*starvation*) incubando le cellule con EBSS. Inoltre è stato analizzato il flusso autofagico inducendo l'arresto della sua fase finale mediante trattamento con Bafilomicina A1 (Baf-A1), che determina il blocco della proteolisi mediata dai lisosomi favorendo così una ritenzione di vescicole autofagiche e di conseguenza un drastico aumento dei livelli di LC3II.

Valutando i livelli proteici di LC3II, intesi come rapporto LC3II/I, abbiamo riscontrato che in condizioni di *starvation* entrambe le linee mutate mostrano una scarsa attivazione del processo se paragonate al controllo. La risposta induttiva risulta completamente assente nelle cellule con mutazione dominante, mentre è parziale nelle linee con mutazione recessiva (Fig. 35A-B).

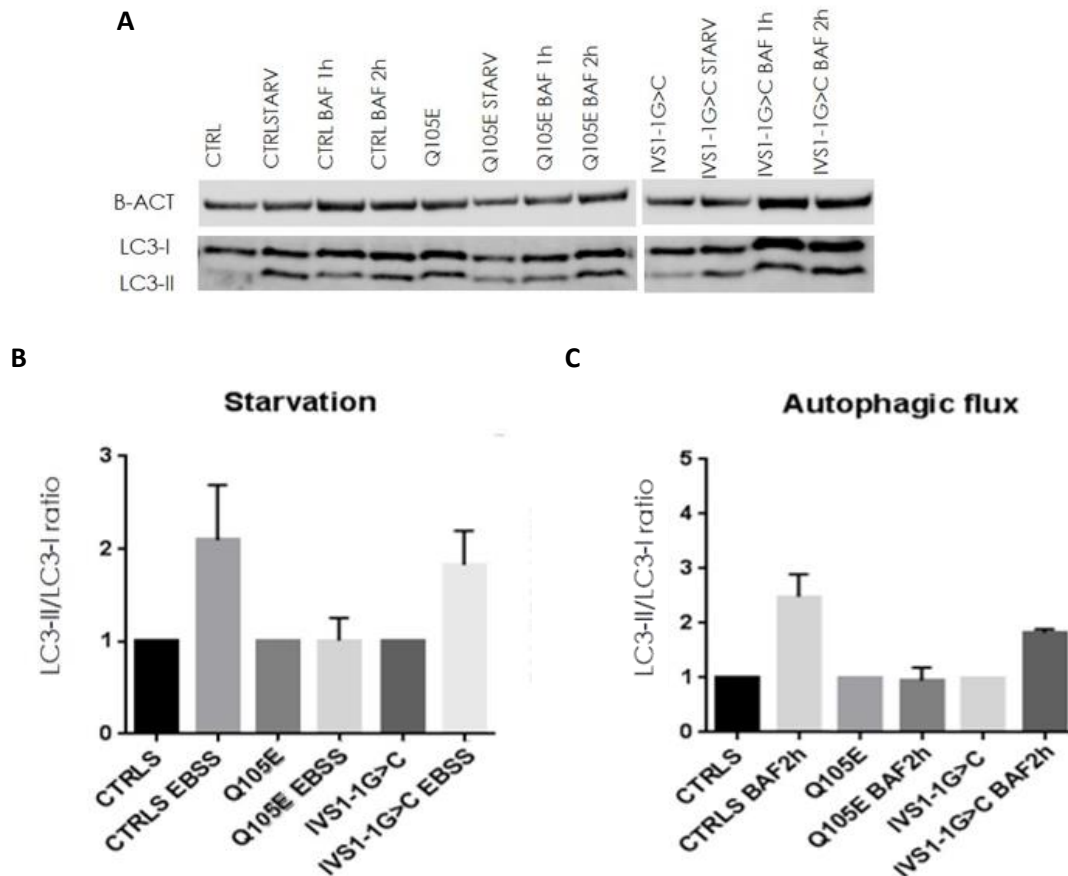


Figura 35. Analisi del flusso autofagico dopo *starvation* (STARV) e trattamento con Baf-A1.

A) Western blot rappresentativo per LC3B. B) Analisi densitometrica del rapporto LC3II/LC3I dopo induzione di autofagia mediante deprivazione di nutrienti (EBSS) per 30 minuti. C) Analisi densitometrica del rapporto LC3II/LC3I dopo trattamento con bafilomicina A1 per 2 ore (BAF2h).

Risultati simili sono stati ottenuti dopo trattamento con Baf-A1 per cui, anche in questo caso, solamente la linea con mutazione recessiva mostra un debole aumento di LC3II rispetto ai controlli, mentre nessuna variazione è stata riscontrata nella linea con mutazione dominante (Fig. 35A e C). Questi risultati suggeriscono quindi una diminuzione dei livelli di autofagia nelle linee mutanti, possibilmente dovuti a un difetto nel flusso autofagico, più evidente nella linea di fibroblasti con mutazione dominante p.Q105E.

PARTE III - Studio della localizzazione mitocondriale di OPA3

1. Indagine sulla localizzazione subcellulare di OPA3

Entrambe le varianti della proteina OPA3 presentano una sequenza di target mitocondriale nella porzione N-terminale e un dominio transmembrana, suggerendo quindi che le due proteine siano indirizzate ai mitocondri dopo la loro sintesi e che possano inserirsi nelle membrane mitocondriali (Da Cruz et al., 2003; Huizing et al., 2010; Ryu et al., 2010). Mentre la localizzazione mitocondriale è stata chiaramente dimostrata da studi indipendenti, l'esatta collocazione all'interno dei mitocondri è ancora controversa (Da Cruz et al., 2003; Ryu et al., 2010).

Allo scopo di confermare la localizzazione mitocondriale della proteina OPA3, abbiamo indotto l'overespressione della proteina chimerica OPA3-Myc in cellule Hek 293, mediante trasfezione transiente con vettore plasmidico, e successivamente abbiamo separato le frazioni citoplasmatica e mitocondriale delle linee cellulari in esame. Mediante Western blotting abbiamo quindi valutato la colocalizzazione del segnale di OPA3 con il tag Myc nelle cellule trasdotte, confrontandole con la linea cellulare Hek 293 non trasfettata. Come mostrato in Figura 36, OPA3 è visibile nel lisato totale e nella frazione mitocondriale, mentre è completamente assente nella frazione citosolica, sia nelle cellule non trasfettate che nelle Hek overesprimenti OPA3, dove il segnale di Myc corrisponde a quello dell'anticorpo specifico per OPA3.

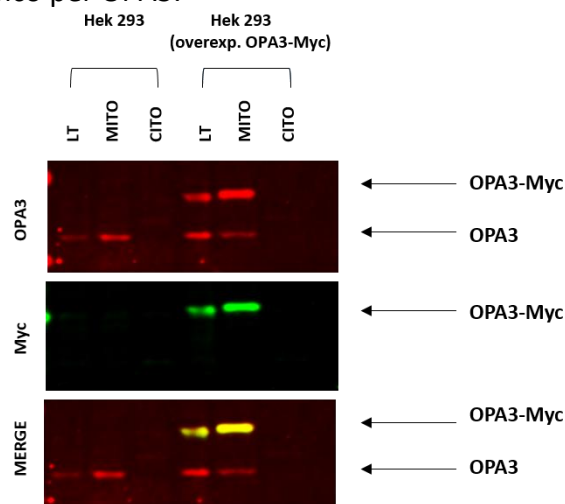


Figura 36. Localizzazione della proteina OPA3 in linee tumorali Hek 293.

Western blot per OPA3 e OPA3-Myc nel lisato totale (LT), nella frazione mitocondriale (MITO) e nella frazione citoplasmatica (CITO) di cellule Hek 293 standard e Hek 293 in cui è stata overespressa la proteina chimerica OPA3-Myc. Il segnale di fluorescenza (OPA3, fluorescenza rossa; Myc, fluorescenza verde) è stato rilevato mediante il sistema di acquisizione LI-COR Odyssey Fc Dual Mode Imager. La colocalizzazione risulta dalla sovrapposizione dei due segnali per OPA3V1 e Myc (Merge, fluorescenza gialla).

2. Analisi della localizzazione di OPA3 nelle membrane mitocondriali

Al fine di approfondire lo studio sulla localizzazione mitocondriale delle due varianti OPA3 è stata condotta un'ulteriore analisi per discriminare l'eventuale presenza nella membrana mitocondriale esterna o interna.

È stato effettuato un saggio di digestione enzimatica con proteinasi K (PK) a concentrazione crescente sulla frazione mitocondriale di cellule Hek 293. Dai risultati ottenuti appare evidente che OPA3V1 risulta più protetta sia rispetto a MFN2, proteina della membrana mitocondriale esterna, che rispetto a TIM23, proteina localizzata nella membrana mitocondriale interna e che viene completamente digerita alla concentrazione più alta di PK e digitonina (Fig. 37). Al contrario, OPA3V1 ha un andamento paragonabile all'enzima citrato sintasi (CS), proteina localizzata nella matrice, restando entrambe ancora visibili dopo trattamento con la concentrazione massima di PK e aggiunta di digitonina (Fig. 37).

In accordo con i dati precedentemente ottenuti, questo risultato indica che OPA3V1 è localizzata nella membrana interna mitocondriale ed è maggiormente esposta verso la matrice mitocondriale.

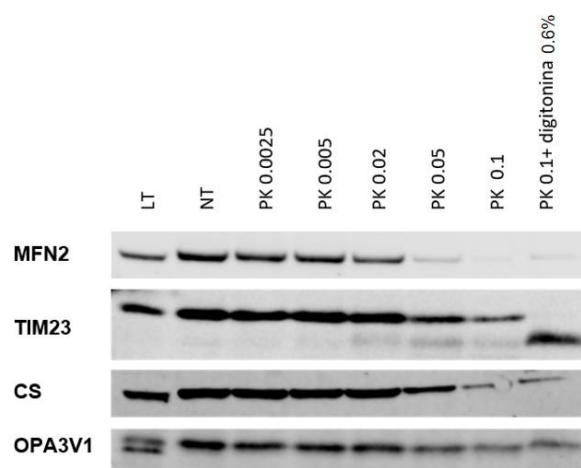


Figura 37. Saggio di localizzazione di OPA3V1 all'interno dei compartimenti mitocondriali.

Western blot per OPA3V1, MFN2 (marcatore della OMM), TIM23 (marcatore della IMM), CS (marcatore della matrice mitocondriale) dopo trattamento con quantità crescenti di proteinasi K e infine con aggiunta di digitonina nell'ultima condizione. LT: lisato totale; NT: frazione mitocondriale non trattata; PK: proteinase K (μg).

3. Analisi della localizzazione di OPA3V1 nelle MAMs

Grazie alla collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Paolo Pinton dell'Università di Ferrara è stato possibile condurre uno studio parallelo sulla localizzazione della proteina OPA3V1 nelle diverse frazioni subcellulari di linee cellulari A549 (cellule basali epiteliali alveolari di adenocarcinoma

umano). Dai risultati ottenuti è emerso che la proteina OPA3V1 è presente sia nella frazione mitocondriale che nelle MAMs, ovvero nella regione in cui le membrane dei mitocondri prendono contatto con il reticolo endoplasmatico (Fig. 38). Ciò suggerisce che l'isoforma 1 possa avere una localizzazione dinamica a livello mitocondriale ed essere coinvolta nei processi che avvengono nelle MAMs, come trasferimento di fosfolipidi dal reticolo endoplasmatico ai mitocondri o flusso del Ca^{2+} nei due organelli.

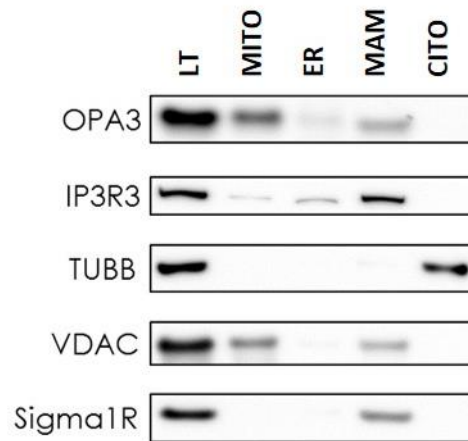


Figura 38. Western blot di frazioni subcellulari isolate da cellule tumorali polmonari A549.

IP3R3, Sigma 1-R, VDAC, TUBB sono stati utilizzati come marcatori rispettivamente di reticolo endoplasmatico, MAMs, mitocondri e citosol. LT: lisato totale; ER: reticolo endoplasmatico; MAM: mitochondria-associated membranes; CITO: citosol.

Discussione

Le neuropatie ottiche ereditarie sono un gruppo di patologie principalmente causate da difetti genetici che possono interessare sia geni mitocondriali, come nel caso della Neuropatia Ottica Ereditaria di Leber (LHON), che geni nucleari codificanti per proteine regolatrici della funzionalità mitocondriale (Maresca e Carelli, 2021). La forma più comune di neuropatia ottica ad eredità mendeliana è l'atrofia ottica dominante (ADOA) causata da mutazioni nel gene *OPA1*, tuttavia altri geni sono stati associati a forme più rare in cui l'atrofia ottica può presentarsi sia come sintomo isolato che come parte di un quadro clinico più complesso, tra cui il gene *OPA3* (Maresca e Carelli, 2021). Le mutazioni nel gene *OPA3* sono infatti responsabili sia di una forma di atrofia ottica dominante che si manifesta assieme a cataratta e spesso sordità, che della Sindrome di Costeff o aciduria 3-metilglutaconica di tipo 3 (3-MGA III), causata da mutazioni recessive (Nystuen et al., 1997; Reynier et al., 2004; Neas et al., 2005).

Sebbene alterazioni a carico della proteina OPA3 abbiano quindi drammatiche conseguenze per le cellule neuronali producendo la neurodegenerazione, l'esatta localizzazione subcellulare, la funzione e la regolazione della proteina non sono ancora stati completamente chiariti.

Per questo motivo, lo scopo del nostro studio è stato quello di indagare la funzione biologica della proteina OPA3 avvalendoci di due modelli cellulari: (i) le SK-N-SH shOPA3, cellule derivate da neuroblastoma stabilmente silenziate per l'isoforma 1 di OPA3, e (ii) fibroblasti primari di pazienti con patologia 3-MGA III o ADOAC. Abbiamo inoltre valutato la sua localizzazione all'interno della cellula, confermando risultati precedentemente riportati ma anche mettendo in evidenza delle caratteristiche di OPA3 finora non note.

I due cloni di SK-N-SH analizzati presentavano una riduzione della proteina OPA3 di circa il 60% (clone#2) e 20% (clone #4). Le due linee di fibroblasti studiate invece erano portatrici di due mutazioni differenti, la recessiva IVS1-1G>C, che ha come conseguenza la completa assenza della proteina OPA3 a causa del difetto di *splicing*, e la dominante p.Q105E, per cui abbiamo osservato una riduzione di circa il 40% della proteina, con un contemporaneo aumento significativo dell' mRNA di OPA3V1. Possiamo quindi ipotizzare che la proteina che porta il cambio amminoacidico Q105E sia instabile e venga degradata, con una conseguente up-regolazione della trascrizione, come meccanismo di compensazione, che porta i livelli proteici residui sopra al 50%, come ci si aspetterebbe dal meccanismo di aploinsufficienza.

Come riportato in letteratura, OPA3 sembra essere coinvolta nei meccanismi di dinamica mitocondriale e, sebbene non sia ancora chiara la sua specifica funzione, sembra plausibile un suo ruolo nella regolazione del processo di fissione mitocondriale (Ryu et al., 2010; Ryu et al., 2013).

Le alterazioni del processo di dinamica mitocondriale è inoltre uno dei meccanismi molecolari alla base della neurodegenerazione del nervo ottico, come dimostrano le diverse forme di neuropatia ottica associate a proteine regolatrici di questo meccanismo, come ad esempio OPA1, MFN2, DRP1 e MFF (Maresca e Carelli, 2021).

Abbiamo quindi valutato la presenza di eventuali alterazioni di questo meccanismo nei nostri modelli cellulari SK-N-SH shOPA3 e fibroblasti con mutazione OPA3.

Nonostante non sia stato possibile ottenere una valutazione quantitativa della morfologia mitocondriale, nella linea SK-N-SH shOPA3 i mitocondri apparivano aggregati e localizzati nella regione perinucleare, fenotipo spesso riscontrato in presenza di inibizione della fissione mitocondriale, come ad esempio nel caso dell'espressione della proteina DRP1 in forma mutata (Yoon et al., 2001; Waterham et al., 2007). Mentre i livelli proteici delle mitofusine sono risultati paragonabili alla linea di controllo *scramble*, apparentemente in contrasto con il risultato della morfologia mitocondriale è il significativo aumento riscontrato in queste cellule della forma fosforilata della proteina DRP1 nel residuo Ser616, che solitamente è associata al suo stato attivo (Giacomello et al., 2020). Tuttavia, è stato dimostrato che la fosforilazione di DRP1 in questo residuo è aumentata nelle cellule tumorali a causa dell'attivazione del *pathway* della MAP chinasi (Kashatus et al., 2015; Serasinghe et al., 2015). L'aumento osservato nel nostro modello cellulare potrebbe quindi essere correlato all'origine tumorale delle cellule SK-N-SH. Inoltre, l'attività di DRP1 è ulteriormente regolata da numerose modifiche post-traduzionali, come fosforilazione in altri residui, sumoilazione, nitrosilazione o ubiquitinazione (Giacomello et al., 2020). È noto inoltre che molte proteine coinvolte nella dinamica mitocondriale stabiliscano interazioni con i fosfolipidi di membrana dell'organello, modulando in questo modo sia la loro localizzazione che la propria attività (Zhang et al., 2014). Un ulteriore meccanismo di regolazione di DRP1 è appunto rappresentato dall'interazione di DRP1 con il fosfolipide PA (acido fosfatidico) (Adachi et al., 2016). Adachi e colleghi hanno evidenziato come il fosfolipide PA sia in grado di inibire l'attività GTPasica di DRP1 in seguito alla formazione degli oligomeri di DRP1. Gli autori hanno inoltre dimostrato una diretta interazione tra DRP1 e la fosfolipasi mitocondriale MitoPLD, che crea attorno al macchinario di divisione mitocondriale un ambiente lipidico arricchito di PA (Adachi et al., 2016). Di particolare interesse è il fatto che anche l'overespressione di MitoPLD, che ha come conseguenza l'aumento di PA nelle membrane mitocondriali e l'inibizione della fissione, determina un cambiamento della distribuzione dei mitocondri all'interno della cellula, con aggregazione nella regione perinucleare (Adachi et al., 2016).

Abbiamo quindi voluto valutare la possibilità che anche OPA3, così come DRP1, potesse formare dei legami con PA e attraverso la regolazione di questo fosfolipide agire sulla dinamica mitocondriale. Il risultato dell'analisi condotta con la proteina purificata da cellule umane (Hek 293) ha messo in evidenza che la proteina OPA3 lega in maniera specifica il PA, in modo quantità-dipendente e anche a concentrazioni relativamente basse. La presenza di questa interazione proteina-lipide rappresenta un'ulteriore indicazione del possibile coinvolgimento di OPA3 nella regolazione dei processi di dinamica mitocondriale e, più nello specifico, nel controllo del funzionamento del macchinario di fissione che vede implicati oltre alle proteine deputate, quali ad esempio DRP1, anche il PA.

L'acido fosfatidico è un fosfolipide poco presente nelle membrane mitocondriali e la sua abbondanza e localizzazione nel mitocondrio dipendono prevalentemente dalla sintesi nel reticolo endoplasmatico, dal trasporto nei mitocondri, mediante i punti di contatto tra i due organelli, e da successive reazioni di conversione del fosfolipide catalizzate dagli enzimi MitoPLD e LIPIN (Tamura et al., 2014). Diversi studi hanno dimostrato che sia MitoPLD che la fosfatasi LIPIN reciprocamente regolano i processi di dinamica mitocondriale; il primo promuove la fusione mediata dalle mitofusine, mentre LIPIN convertendo PA in diacilglicerolo, precursore di importanti fosfolipidi (PE, PS, PC, etc), promuove la fissione mitocondriale (Baba et al., 2013; Zhang et al., 2017). Nel nostro modello di cellule silenziate per OPA3 i livelli proteici di LIPIN sono risultati significativamente ridotti rispetto al controllo, suggerendo un'insufficiente attività di conversione di PA in DAG e un possibile accumulo dell'acido fosfatidico nelle membrane mitocondriali. L'incremento dei livelli di PA determinerebbe l'inibizione del processo di fissione mitocondriale mediato da DRP1. Verosimilmente, alla luce delle ipotesi elaborate, nelle linee cellulari SK-N-SH shOPA3 l'elevata quantità di DRP1 nella sua forma attiva non si tradurrebbe in un aumento di divisione mitocondriale, ma al contrario, come precedentemente descritto, l'abbondanza di PA nelle membrane mitocondriali potrebbe determinare l'accumulo degli oligomeri della proteina privi però di attività GTPasica e al contempo sbilanciare la dinamica mitocondriale verso la fusione.

A supporto di questa interpretazione è da considerare anche il lieve aumento, seppur non significativo, del rapporto OPA1-*long* (pro-fusione) su OPA1-*short* (pro-fissione) riscontrato nei mitocondri isolati dalle cellule SK-N-SH shOPA3, che potrebbe essere correlato al contemporaneo aumento significativo della proteina SLP-2. Questa proteina infatti, assieme alle proteasi YME1L e PARL, costituisce un complesso (SPY) in grado di stabilizzare le forme OPA1-*long*, regolando negativamente OMA1, e indurre un meccanismo chiamato "*stress-induced mitochondrial*

hyperfusion-SIMH" (Wai et al., 2016). A causa della sua bassissima espressione in queste cellule, non è stato possibile valutare i livelli proteici di OMA1, mentre la sua espressione genica non risulta essere alterata a seguito del silenziamento di OPA3 nelle cellule SK-N-SH. La proteina PGAM5 invece, target della proteasi PARL che come OMA1 è regolata negativamente dal complesso SPY (Wai et al., 2016), risulta essere significativamente meno espressa sia nella forma *full length* che processata, seppure con una tendenza ad un aumento della forma *long* rispetto alla forma *short*. Resta quindi da chiarire il possibile coinvolgimento del complesso SPY e di OMA1 nel rimodellamento del network mitocondriale dovuto a down-regolazione di OPA3. Analogamente, non è ancora del tutto chiaro il ruolo delle proteasi AFG3L2 e Paraplegina (SPG7), i cui livelli di espressione sono risultati significativamente ridotti nelle cellule SK-N-SH shOPA3. Infatti, disfunzioni del complesso AFG3L2-Paraplegina si traducono in un difetto nel controllo di qualità delle proteine mitocondriali, scatenando una risposta allo stress mediata dall'attivazione di OMA1 (Richter et al., 2019; Tulli et al., 2019). Una possibile spiegazione potrebbe essere data dalla presenza di un difetto del controllo qualità delle proteine mitocondriali causato da una ridotta espressione di AFG3L2, e una conseguente attivazione del complesso SPY per sopprimere o limitare l'attività di OMA1. Infine, i livelli proteici della proteasi YME1L, che come OMA1 ha come target diretto OPA1, sono risultati invariati nelle cellule SK-N-SH shOPA3 rispetto alle cellule di controllo *scramble*. Tuttavia abbiamo riscontrato un aumento significativo del suo precursore, visibile nel western blot con un maggiore peso molecolare rispetto alla forma processata e importata nei mitocondri. Questo ci ha portato ad indagare i livelli di espressione di ROMO1, un costituente del macchinario di import IMM e necessario per lo specifico import di YME1L all'interno dei mitocondri, ROMO1 (Richter et al., 2019). Infatti, è stato già osservato come la deplezione di ROMO1 produca un accumulo del precursore di YME1L nel citosol (Richter et al., 2019). Tuttavia, al contrario di quanto atteso, i livelli proteici di ROMO1 sono risultati significativamente aumentati a seguito del silenziamento di OPA3. ROMO1 era stata precedentemente descritta come una proteina regolata dallo stress ossidativo e richiesta per la fusione mitocondriale, in quanto necessaria per la oligomerizzazione di OPA1 nella IMM (Norton et al., 2014). Un suo aumento potrebbe quindi nuovamente indicare uno sbilanciamento verso la fusione mitocondriale a discapito della fissione.

Passando al modello più fisiologico dei fibroblasti derivati da pazienti, dall'analisi quantitativa effettuata in condizioni di coltura standard (glucosio), le cellule portatrici della mutazione recessiva IVS1-1G>C presentavano un reticolo mitocondriale maggiormente filamentoso rispetto ai fibroblasti di controllo, sebbene questa differenza non sia risultata statisticamente significativa. I fibroblasti

portatori della mutazione dominante p.Q105E invece presentavano un reticolo mitocondriale comparabile a quello dei fibroblasti di controllo, in accordo con quanto precedentemente riportato in letteratura (Reynier et al., 2004). Mentre i livelli proteici di MFN1, MFN2 e DRP1 non sono risultati alterati nella linea con mutazione recessiva, la linea dominante ha mostrato una riduzione significativa dei livelli proteici di DRP1. Abbiamo quindi condotto un'analisi sul reclutamento di DRP1 sui mitocondri a seguito di uno stimolo pro-fissione, ossia il trattamento con antimicina A (Toyama et al., 2016). Mentre per la linea con mutazione dominante la localizzazione di DRP1 sui mitocondri aumentava a seguito dell'induzione della fissione, seppur con entità minore rispetto al controllo, la linea con mutazione recessiva non ha mostrato un aumento di localizzazione mitocondriale di DRP1, indicando una probabile inibizione della fissione mitocondriale coerente con la morfologia del reticolo osservata in queste cellule. Sempre in questa direzione è il dato dell'aumento del rapporto OPA1 *long/short* che si osserva nella linea con mutazione recessiva. Abbiamo quindi indagato anche in questo modello cellulare il possibile ruolo del complesso SPY nel rimodellamento del reticolo mitocondriale, ma anche in questo caso non risulta chiaro il suo coinvolgimento. Infatti, i livelli proteici di SLP2 sono risultati significativamente aumentati esclusivamente nella linea con mutazione dominante, mentre il processamento di PGAM5 sembra essere ridotto esclusivamente nella linea con mutazione recessiva. A determinare l'aumento delle forme long di OPA1 potrebbe però essere l'aumento dei livelli proteici di AFG3L2, che risulta statisticamente significativo proprio nella linea con mutazione recessiva e potrebbe determinare la mancata attivazione della proteasi OMA1. Per quanto riguarda YME1L, in questo modello non si osservano cambiamenti significativi né nella sua forma di precursore né in quella matura.

Alla luce di questi risultati, seppur con meccanismi non completamente sovrapponibili nei due modelli investigati, la mancanza di OPA3 sembra indurre uno sbilanciamento verso la fusione mitocondriale, che potrebbe derivare da un'inibizione della fissione.

I processi di fusione e fissione mitocondriale sono regolati anche in funzione della richiesta energetica della cellula (Collins et al., 2002). Uno studio precedentemente condotto su fibroblasti di pazienti portatori della mutazione dominante p.Q105E nel gene *OPA3* ha suggerito la presenza di possibili alterazioni del profilo bioenergetico. Gli autori hanno infatti osservato una riduzione, seppur non significativa, del potenziale di membrana mitocondriale e della capacità respiratoria massima, calcolata come rapporto tra respirazione dopo aggiunta del disaccoppiante e respirazione basale. Tuttavia i fibroblasti mutanti mostravano anche un aumento non significativo nella sintesi di ATP (Chevrollier et al., 2008). La precedente analisi di fibroblasti portatori di una differente

mutazione dominante (p.G93S) aveva invece escluso difetti biochimici (Reynier et al., 2004). Nessun difetto biochimico è stato riscontrato anche in un modello di zebrafish *OPA3-knockout* (Pei et al., 2010), mentre un modello murino portatore di una mutazione missenso in omozigosi ha documentato un aumento dell'attività mitocondriale nel nervo ottico dimostrato dalla colorazione per la Citocromo C Ossidasi (COX) (Davies et, 2008).

Abbiamo quindi analizzato la capacità energetica dei nostri modelli cellulari per valutare una possibile corrispondenza tra i difetti della dinamica mitocondriale individuati ed eventuali alterazioni del metabolismo energetico. La capacità respiratoria è stata quindi analizzata nelle cellule intatte *in vivo*, stimando il consumo di ossigeno (OCR) sia in condizioni basali che dopo l'aggiunta di inibitori dei complessi e disaccoppianti. Nella linea cellulare SK-N-SH shOPA3 ex2#2, clone in cui si ha una maggiore riduzione dell'espressione proteica di OPA3 (circa il 60%), si è rilevata una diminuzione significativa della respirazione basale, *ATP-linked*, massima e *spare capacity*, mentre la linea SK-N-SH shOPA3 ex2#4 dove si ha un livello di proteina OPA3 residua più alto, non mostra differenze significative rispetto alla linea *scramble*. Tuttavia, al contrario di quanto atteso, nella linea SK-N-SH shOPA3 ex2#2 i livelli cellulari di ATP totale sono risultati aumentati rispetto al controllo *scramble*, anche se non in modo significativo. Nonostante quest'ultimo dato sia simile a quanto osservato da Chevrollier e colleghi (Chevrollier et al., 2008), questa particolare condizione potrebbe essere spiegata anche dalla natura tumorale della linea cellulare. Infatti, le SK-N-SH shOPA3, in quanto cellule cancerose, potrebbero alterare il proprio metabolismo inducendo la produzione di ATP mediante processi metabolici alternativi, come la glicolisi, e superare quindi eventuali difetti legati alla fosforilazione ossidativa.

Nel modello dei fibroblasti, invece, entrambe le linee analizzate non mostrano alterazioni della respirazione mitocondriale, se non una riduzione non significativa della respirazione massima nella linea con mutazione recessiva IVS1-1G>C. Analogamente, anche il potenziale di membrana e la quantità di ATP totale non è risultata alterata nei fibroblasti con mutazioni del gene *OPA3*.

Alla luce di quanto precedentemente pubblicato e dei nostri risultati, si può ipotizzare che una sostenuta deplezione della proteina OPA3 possa avere degli effetti anche sul funzionamento della catena respiratoria mitocondriale, ma esclusivamente in cellule più sensibili ad alterazioni dell'omeostasi mitocondriale, come le cellule di origine neuronale.

Il processo dell'autofagia è strettamente connesso alla morfologia del network mitocondriale. È stato infatti dimostrato che i mitocondri si allungano quando l'autofagia è attiva, ad esempio in condizioni di *starvation*, proprio per evitare la propria degradazione e sostenere la vitalità cellulare

(Gomes et al., 2011; Galluzzi et al., 2011). Al tempo stesso, i mitocondri danneggiati che devono essere eliminati vanno incontro a fissione per facilitare il processo di mitofagia, meccanismo che può essere o meno dipendente da DRP1 (Yoo e Jung, 2018; Yamashita e Kanki, 2017).

Inoltre, un'aumentata attività autofagica e mitofagica sono state osservate in fibroblasti portatori di mutazioni nel gene *OPA1*, responsabile della ADOA, e nelle cellule ganglionari della retina isolate da modelli murini *OPA1* mutanti (Kane et al., 2017; Liao et al., 2017; Carelli et al., 2015; Zaninello et al., 2020).

Basandoci sui dati ottenuti che indicano un coinvolgimento di *OPA3* nei processi di dinamica mitocondriale, abbiamo valutato anche la possibile presenza di un difetto nel processo autofagico nei nostri modelli cellulari. Sono stati quindi analizzati i principali marcatori del flusso autofagico, LC3B e p62, sia in condizioni basali che in seguito a induzione, con rapamicina o *starvation*, e dopo trattamento con cloroquina o bafilomicina-A1, che determinano il blocco della proteolisi del cargo degli autofagosomi e un accumulo di quest'ultimi.

I risultati ottenuti evidenziano alterazioni nel processo autofagico che si riscontrano, anche se in modo non univoco, sia nel modello SK-N-SH sh*OPA3* che nei fibroblasti con mutazione in *OPA3*. Nel modello di neuroblastoma abbiamo osservato un lieve aumento della forma lipidata di LC3B (LC3II-PE), tuttavia non significativo, e la risposta al trattamento con rapamicina è risultata minima rispetto alla linea di controllo *scramble*. Il trattamento con cloroquina, come atteso, ha invece prodotto l'inibizione della degradazione degli autofagosomi e il loro accumulo, evidenziato da un aumento di espressione di LC3II. I livelli di p62 sono risultati invece significativamente elevati rispetto alla linea *scramble* in condizioni basali, e non subiscono cambiamenti né a seguito del trattamento con rapamicina che con cloroquina. Abbiamo però osservato lo stesso comportamento nella linea *scramble*, dato che suggerisce una possibile deregolazione a livello basale dell'autofagia in questo specifico tipo cellulare. Quindi, nonostante l'aumento di LC3II e p62 nelle linee silenziate potrebbe indicare un problema del flusso autofagico, questo aspetto non è del tutto valutabile in questo tipo cellulare. Nel modello dei fibroblasti abbiamo invece ottenuto un risultato opposto, nello specifico una riduzione significativa di LC3II a livello basale in entrambe le linee mutate che indicherebbe un difetto di autofagia. A seguito della *starvation* con EBSS o dell'inibizione della degradazione degli autofagosomi con bafilomicina-A1, i livelli di LC3II sono risultati aumentati esclusivamente nei fibroblasti di controllo e in modo meno consistente nella linea con mutazione recessiva, mentre non è stato osservato nessun cambiamento nella linea con mutazione dominante. I livelli di p62 sono risultati comparabili ai controlli nella linea con mutazione dominante e lievemente aumentati nella

linea con mutazione recessiva, tuttavia senza raggiungere significatività statistica. Questo dato potrebbe essere correlato all'aumento di p62 osservato anche nelle linee di neuroblastoma silenziate per OPA3, ma in questo caso potrebbe derivare da una riduzione dell'attività autofagica con conseguente accumulo del p62. Un'altra possibile ipotesi però potrebbe prevedere un'inibizione del macchinario del proteasoma.

Un ulteriore collegamento possibile è quello tra i ridotti livelli di LIPIN osservati nelle linee di neuroblastoma silenziate per OPA3 che potrebbero riflettersi in alterazioni nella composizione lipidica, influenzando anche l'autofagia. In letteratura è noto infatti il ruolo di LIPIN nel meccanismo autofagico. Zhang e colleghi hanno dimostrato che in linee cellulari MEF (*Mouse Embryonic Fibroblast*), in cui è stata indotta l'autofagia mediante *starvation*, l'assenza di LIPIN determinava una rilevante riduzione della formazione dell'autofagolisosoma e un notevole incremento dei livelli di PA, con conseguente riduzione di DAG, rispetto ai controlli (Zhang et al., 2014). LIPIN regola infatti i livelli di PA e DAG ed un decremento di quest'ultimo può essere alla base di difetti nell'attivazione della biosintesi dei fosfolipidi come PE, a sua volta essenziale per la maturazione di LC3I (Zhang et al., 2017). Il peculiare comportamento dei due modelli cellulari e la loro alterata risposta agli stimoli di induzione potrebbero dunque essere legati a difetti di reclutamento o scarsa sintesi di PE, necessario nel processo di lipidazione post-traduzionale di LC3I, ciò probabilmente come conseguenza di una inefficace attività di LIPIN.

Ulteriori approfondimenti dovranno chiarire le disfunzioni del processo autofagico correlate al deficit di OPA3 e i meccanismi molecolari correlati.

Infine, l'ultima parte del nostro studio ha riguardato la localizzazione subcellulare e submitocondriale di OPA3, che presenta una sequenza di target mitocondriale all' N-terminale, un dominio transmembrana interno (residui 83-102), un dominio *coiled-coil* (residui 103-176) e una sequenza all'estremità C-terminale di tre aminoacidi (SKK, Serina-Lisina-Lisina) molto simile alla sequenza di indirizzamento ai perossisomi (SKL, Serina-Lisina-Leucina). Sebbene ad oggi sia stata confermata la localizzazione mitocondriale di OPA3 ed esclusa quella perossisomiale, rimane ancora da chiarire se la proteina localizzi nella IMM o nella OMM (Da Cruz et al., 2003; Huizing et al., 2010; Ryu et al., 2010).

Per determinare la localizzazione di OPA3 abbiamo eseguito dei frazionamenti subcellulari in cellule Hek 293 dopo overespressione della proteina in forma chimerica (OPA3-Myc). OPA3, sia nella forma endogena che esogena, è stata rilevata nella frazione mitocondriale e non in quella citosolica, confermando la collocazione della proteina nell'organello. Confermata la localizzazione

mitocondriale di OPA3, abbiamo valutato se la proteina fosse presente nella IMM o nella OMM mediante trattamento dei mitocondri isolati con proteinasi K a concentrazioni crescenti. I nostri dati, oltre a confermare che OPA3 viene importata nella membrana mitocondriale interna, supportano l'ipotesi di una marcata esposizione della proteina verso lo spazio della matrice. Infatti, dopo aver effettuato il saggio enzimatico, OPA3 risultava più protetto rispetto a MFN2 e TIM23, rispettivamente proteine di OMM e IMM. Inoltre alla concentrazione massima dell'enzima, OPA3 rimaneva visibile e mostrava un andamento equiparabile a quello della CS, proteina di matrice.

In entrambi i modelli cellulari, SK-N-SH shOPA3 e fibroblasti con mutazione OPA3, si evidenziano alterazioni in proteine che prendono parte attiva alla regolazione della dinamica mitocondriale. In modo particolare, come già riportato, dal nostro studio è emerso uno sbilanciamento delle isoforme *long* e *short* di OPA1, che localizza nella IMM, e alterazioni nell'espressione delle proteasi e di proteine accessorie coinvolte nel *processing* di OPA1 quali AFG3L2, YME1L, SPG7, SLP-2; quest'ultime proteine si trovano ancorate alla IMM ed esposte verso la matrice mitocondriale. Potrebbe esserci quindi un'interazione diretta tra queste proteine e OPA3.

In aggiunta, un risultato preliminare ottenuto in collaborazione con il gruppo del Prof. Paolo Pinton dell'Università di Ferrara ha dimostrato che la proteina OPA3, oltre ad essere rilevabile nella frazione mitocondriale di cellule A549, è presente anche nelle MAMs, regione di contatto tra le membrane dei mitocondri e del reticolo endoplasmatico.

Il reticolo endoplasmatico è la principale sede di sintesi dei lipidi. La corretta composizione lipidica delle membrane mitocondriali è garantita dalla formazione delle MAMs e dal trasporto bidirezionale di fosfolipidi mediante proteine che fungono da trasportatori. È altresì noto che altre proteine coinvolte nei meccanismi di rimodellamento delle membrane mitocondriali, come ad esempio MFN2, prendono parte attiva ai processi di interazione tra il reticolo endoplasmatico e il mitocondrio (de Brito e Scorrano, 2008; Marchi et al., 2014). Una recente pubblicazione riporta che MFN2, oltre ad essere una proteina di fusione della OMM, è coinvolta nel metabolismo dei fosfolipidi regolando il flusso di PS che, se alterato, provoca la frammentazione delle membrane mitocondriali (Hernández-Alvarez et al., 2019).

La sintesi di PA è una delle fasi principali della biosintesi dei lipidi. Parte del fosfolipide viene trasferito alle membrane del mitocondrio per essere successivamente convertito in intermedi lipidici e in fosfolipidi. Il trasporto di PA è garantito da Nir2, proteina che permette il flusso dalle membrane plasmatiche al reticolo endoplasmatico, e dal complesso TRIAP1/PRELI1, che media il trasferimento tra le membrane mitocondriali (Potting et al., 2013; Kim et al., 2015; Miliara et al.,

2019). Ad oggi non è noto quale sia il trasportatore che permette il flusso di PA dal reticolo endoplasmatico al mitocondrio (Muallem et al., 2017). La localizzazione di OPA3 a livello delle MAMs potrebbe quindi avere un ruolo nella distribuzione di PA dal reticolo endoplasmatico al mitocondrio. Pertanto una insufficiente o alterata attività della proteina potrebbe determinare cambiamenti nella composizione lipidica delle membrane mitocondriali con ripercussioni sui processi di dinamica mitocondriale e autofagia. Saranno necessari ulteriori approfondimenti al fine di validare tale ipotesi e per chiarire l'eventuale meccanismo per cui OPA3, localizzata nella IMM, prenda parte ai contatti tra reticolo endoplasmatico e mitocondri.

Conclusioni

Questo studio si proponeva di valutare la funzione di OPA3 nell'ambito dell'omeostasi mitocondriale nelle linee cellulari SK-N-SH shOPA3 e fibroblasti primari di pazienti con patologia 3-MGA III o ADOAC.

I risultati ottenuti ci hanno permesso di mettere in luce diversi aspetti della proteina che, per quanto non perfettamente sovrapponibili nei due modelli cellulari, confermano il suo molteplice ruolo nell'omeostasi mitocondriale.

I nostri dati confermano il coinvolgimento di OPA3 nella dinamica mitocondriale. L'aggregazione dei mitocondri nella zona perinucleare e il *network* mitocondriale altamente filamentoso, uniti all'aumento della forma OPA1-*long*, strettamente correlata all'incremento di SLP-2 e di conseguenza alle alterazioni delle proteasi deputate al *processing* della proteina OPA1, fanno propendere per un'attivazione del processo di fusione che potrebbe derivare da un'inibizione della fissione. Inoltre ipotizziamo che OPA3, individuata a livello delle MAMs oltre che nella IMM, possa influenzare la composizione lipidica delle membrane mitocondriali e di conseguenza agire come regolatore dei processi della dinamica mitocondriale attraverso il suo legame con PA. È noto che l'inibizione della fissione avviene in risposta a particolari segnali intracellulari o in condizioni di stress mitocondriale (Kameoka et al., 2018). In tali condizioni viene favorito il meccanismo di fusione mediato da un aumento di PA nelle membrane mitocondriali.

Ipotizziamo che la de-regolazione di OPA3 possa determinare disfunzioni nel processo autofagico ed inoltre inficiare il corretto funzionamento della catena respiratoria mitocondriale, con maggiore evidenza nelle cellule caratterizzate da una elevata richiesta energetica come quelle di origine neuronale. Infatti, lo studio nei due modelli cellulari SK-N-SH shOPA3, cellule tumorali di origine neuronale, e fibroblasti, che seppur provenienti da pazienti con patologia 3-MGA III o ADOAC non rappresentano il tessuto target della malattia, ha messo in luce un diverso meccanismo di risposta alla deplezione della proteina OPA3.

Al fine di trovare ulteriori conferme di quanto riscontrato e per meglio comprendere il ruolo di OPA3 nei *pathway* oggetto di studio, riteniamo fondamentale condurre le prossime analisi su modelli diversi come iPSCs (cellule staminali pluripotenti indotte), derivanti da pazienti con mutazioni OPA3, o linee cellulari in cui indurre il *knockout* del gene che potrebbe determinare un effetto più marcato. In conclusione, i dati attuali hanno permesso alcuni progressi nella comprensione del ruolo fisiologico di OPA3, e del possibile meccanismo patogenetico derivante dalla sua ridotta presenza, arricchendo con la doppia localizzazione nelle MAMs e sulla membrana mitocondriale interna un quadro complessivo che lega la composizione lipidica delle membrane mitocondriali con i processi

della dinamica, sbilanciati verso la fusione, e dell'autofagia, tutti meccanismi cruciali per l'omeostasi dei mitocondri e della cellula stessa, quando questa abbia la complessa specializzazione funzionale dei neuroni.

Bibliografia

Adachi Y, Itoh K, Yamada T, Cerveny KL, Suzuki TL, Macdonald P, Frohman MA, Ramachandran R, Iijima M, Sesaki H. Coincident Phosphatidic Acid Interaction Restrains Drp1 in Mitochondrial Division. *Mol Cell*. 2016; 63(6):1034-43.

Adams V, Bosch W, Schlegel J, Wallimann T, Brdiczka D. Further characterization of contact sites from mitochondria of different tissues: topology of peripheral kinases. *Biochim. Biophys. Acta*. 1989; 981:213-25.

Agarraberes FA and Dice JF. A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci*. 2001; 114: 2491–2499.

Agrotis A, von Chamier L, Oliver H, Kiso K, Singh T, Ketteler R. Human ATG4 autophagy proteases counteract attachment of ubiquitin-like LC3/GABARAP proteins to other cellular proteins. *J Biol Chem*. 2019; 294(34): 12610–12621

Albring M, Griffith J, Attardi G. Association of a protein structure of probable membrane derivation with HeLa cell mitochondrial DNA near its origin of replication. *Proc Natl Acad Sci*. 1977; 74:1348-1352.

Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, Rodriguez M, Kellner U, Leo-Kottler B, Auburger G, Bhattacharya SS, Wissinger B. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet*. 2000; 26: 211–215.

Almontashiri NAM, Chen H, Mailloux RJ, Tatsuta T, Teng ACT, Mahmoud AB, Ho T, Stewart NAS, Rippstein P, Harper ME, Roberts R, Willenborg C, Erdmann J, Pastore A, McBride HM, Langer T, and Stewart AFR. SPG7 Variant Escapes Phosphorylation-Regulated Processing by AFG3L2, Elevates Mitochondrial ROS, and Is Associated with Multiple Clinical Phenotypes. *Cell Rep*. 2014; 7(3):834-47.

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich, DP, Roe BA, Sanger F, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290. 1981:457–465.

Anikster Y, Kleta R, Shaag A, et al. Type III 3-methylglutaconic aciduria (optic atrophy plus syndrome, or Costeff optic atrophy syndrome): identification of the OPA3 gene and its founder mutation in Iraqi Jews. *Am J Hum Genet*. 2001; 69:1218-1224.

Archer SL. Mitochondrial dynamics-mitochondrial fission and fusion in human diseases. *N Engl J Med*. 2013; 369:2236-2251.

Arif B, Kumar KR, Seibler P, Vulinovic F, Fatima A, Winkler S, Nürnberg G, Thiele H, Nürnberg P, Jamil AZ, Brüggemann A, Abbas G, Klein C, Naz S, Lohmann K. A novel OPA3 mutation revealed by exome sequencing: an example of reverse phenotyping. *JAMA Neurol*. 2013; 70(6):783-7.

Attardi G and Schatz G. Biogenesis of mitochondria. *Annu. Rev. Cell Biol*. 1988; 4:289-333.

Baba T, Kashiwagi Y, Arimitsu N, Kogure T, Edo A, Maruyama T, Nakao K, Nakanishi H, Kinoshita M, Frohman MA, Yamamoto A, Tani K. Phosphatidic acid (PA)-preferring phospholipase A1 regulates mitochondrial dynamics. *J Biol Chem*. 2014; 289(16):11497-11511.

Baker MJ, Lampe PA, Stojanovski D, Korwitz A, Anand R, Tatsuta T, Langer T. Stress-induced OMA1 activation and autocatalytic turnover regulate OPA1-dependent mitochondrial dynamics. *EMBO J*. 2014; 33:578–593.

Belenguer P and Pellegrini L, The dynamin GTPase OPA1: more than mitochondria? *Biochim. Biophys. Acta*. 2013; 1833:176–183.

Bernhard W., Haguenu F., Gautier A., Oberling C. Submicroscopical structure of cytoplasmic basophils in the liver, pancreas and salivary gland; study of ultrafine slices by electron microscope. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 1952; 37(3):281–300.

Bernhard W. and Rouiller C. Close topographical relationship between mitochondria and ergastoplasm of liver cells in a definite phase of cellular activity. *J Biophys Biochem Cytol*. 1956; 2(4 Suppl):73–8.

Bogenhagen DF, Rousseau D, Burke S. The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *J Biol Chem.* 2008; 283(6):3665-75.

Bourne SC, Townsend KN, Shyr C, Matthews A, Lear SA, Attariwala R, Lehman A, Wasserman WW, van Karnebeek C, Sinclair G, Vallance H, Gibson WT. Optic atrophy, cataracts, lipodystrophy/lipoatrophy, and peripheral neuropathy caused by a de novo OPA3 mutation. *Cold Spring Harb Mol Case Stud.* 2017; 3(1):a001156.

Blunsom NJ and Cockcroft S. CDP-Diacylglycerol Synthases (CDS): Gateway to Phosphatidylinositol and Cardiolipin Synthesis. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 8: 63.

Brown TA, Tkachuk AN, Shtengel G, Kopek BG, Bogenhagen DF, Hess HF, Clayton DA. Super resolution fluorescence imaging of mitochondrial nucleoids reveals their spatial range, limits, and membrane interaction. *Mol. Cell. Biol.* 2011; 31:4994–5010.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-254.

Burman B and Ktistakis NT. Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *FEBS Lett.* 2010; 584(7):1302-12.

Burté F, Carelli V, Patrick F, Chinnery, Yu-Wai-Man P. Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neurology* 2015; 11: 11-24.

Carelli V, La Morgia C, Valentino ML, Barboni P, Ross-Cisneros FN, Sadun AA. Retinal ganglion cell neurodegeneration in mitochondrial inherited disorders. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1787: 518-528.

Carelli V, Ross-Cisneros FN, Sadun AA. Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. *Prog Retin Eye Res.* 2004; 23: 53-89.

Carelli V, Musumeci O, Caporali L, Zanna C, La Morgia C, Del Dotto V, Porcelli AM, Rugolo M, Valentino ML, Iommarini L, Maresca A, Barboni P, Carbonelli M, Trombetta C, Valente EM, Patergnani S, Giorgi C, Pinton P, Rizzo G, Tonon C, Lodi R, Avoni P, Liguori R, Baruzzi A, Toscano A, Zeviani M. Syndromic parkinsonism and dementia associated with OPA1 missense mutations. *Ann Neurol.* 2015; 78(1):21-38.

Caporali L, Magri S, Legati A, Del Dotto V, Tagliavini F, Balistreri F, Nasca A, La Morgia C, Carbonelli M, Valentino ML, Lamantea E, Baratta S, Schöls L, Schüle R, Barboni P, Cascavilla ML, Maresca A, Capristo M, Ardisson A, Pareyson D, Cammarata G, Melzi L, Zeviani M, Peverelli L, Lamperti C, Marzoli SB, Fang M, Synofzik M, Ghezzi D, Carelli V, Taroni F. ATPase Domain AFG3L2 Mutations Alter OPA1 Processing and Cause Optic Neuropathy. *Ann Neurol.* 2020; 88(1):18-32.

Cesnekova J, Rodinova M, Hansikova H, Zeman J and Stiburek L. Loss of Mitochondrial AAA Proteases AFG3L2 and YME1L Impairs Mitochondrial Structure and Respiratory Chain Biogenesis. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(12): 3930.

Cereghetti GM, Stangherlin A, Martins de Brito O, Chang CR, Blackstone C, Bernardi P, Scorrano Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(41):15803-8.

Chakrabarti R, Ji WK, Stan RV, de Juan-Sanz J, Ryan TA, Higgs HN. INF2-Mediated Actin Polymerization at the ER Stimulates Mitochondrial Calcium Uptake, Inner Membrane Constriction, and Division. *J. Cell Biol.* 2017; 217(1):251-268.

Chan EY, Kir S, Tooze SA. siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multi-domain modulator of autophagy, *J. Biol. Chem.* 2007; 282 25464–25474.

Chen J, Ke Xu K, Xiaohui Zhang X, Jiang F, Liu L, Dong B, Ren Y, Yang Li Y. Mutation screening of mitochondrial DNA as well as OPA1 and OPA3 in a Chinese cohort with suspected hereditary optic atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014; 55(10):6987-95.

Chevrollier A, Guillet V, Loiseau D, et al. Hereditary optic neuropathies share a common mitochondrial coupling defect. *Ann Neurol.* 2008; 63:794-798.

Chin LS and Li L. Ubiquitin phosphorylation in Parkinson's disease: Implications for pathogenesis and treatment. *Transl Neurodegener.* 2016; 5:1.

Cho B, Cho HM, Jo Y, Kim HD, Song M, Moon C, Kim H, Kim K, Sesaki H, Rhyu IJ et al. Constriction of the Mitochondrial Inner Compartment Is a Priming Event for Mitochondrial Division. *Nat. Commun.* 2017; 8:15754.

Choi AMK, Ryter SW, Levine B. Autophagy in Human Health and Disease. *N. Engl. J. Med.* 2013; 368:651–662.

Cipolat S, Rudka T, Hartmann D, Costa V, Serneels L, Craessaerts K, Metzger K, Frezza C, Annaert W, D'Adamio L, et al. Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell.* 2006; 126:163–175.

Collins TJ, Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells *EMBO J.* 2002; 21(7): 1616–1627.

Copeland D.E. and Dalton A.J. An association between mitochondria and the endoplasmic reticulum in cells of the pseudobranch gland of a teleost. *J Biophys Biochem Cytol.* 1959; 5(3):393-6.

Costeff H, Gadoth N, Apter N, Prialnic M, Savir H. A familial syndrome of infantile optic atrophy, movement disorder, and spastic paraplegia. *Neurology* 1989; 39(4):595–97.

Costeff H, Elpeleg O, Apter N, Divry P, Gadoth N. 3-Methylglutaconic aciduria in “optic atrophy plus” *Ann Neurol.* 1993; 33:103–4.

Cribbs JT and Strack S Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep.* 2007; 8(10):939-44.

Csordás G, Renken C, Várnai P, Walter L, Weaver D, Buttle KF, et al. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol.* 2006; 174:915–21.

Cuervo AM and Dice JF. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science.* 1996; 273: 501-503, 1996.

Da Cruz S, Xenarios I, Langridge J, Vilbois F, Parone PA, Martinou JC. Proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem.* 2003; 278:41566–71.

Davies VJ, Powell KA, White KE, et al. A missense mutation in the murine Opa3 gene models human Costeff syndrome. *Brain.* 2008; 131:368-380.

De Brito M. and Scorrano L. Mitofusin-2 Tethers Endoplasmic Reticulum to Mitochondria. *Nature.* 2008; 456: 605-610.

Del Dotto V, Mishra P, Vidoni S, Fogazza M, Maresca A, Caporali L, McCaffery JM, Cappelletti M, Baruffini E, Lenaers G, Chan D, Rugolo M, Carelli V, Zanna C. OPA1 Isoforms in the Hierarchical Organization of Mitochondrial Functions. *Cell Rep.* 2017; 19(12):2557-2571.

Del Dotto V, Fogazza M, Carelli V, Rugolo M, Zanna C. Eight human OPA1 isoforms, long and short: What are they for? *BBA – Bioenergetics.* 2018; 1859:263–269.

Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E, Astarie-Dequeker C, Lasquelléc L, Arnaud B, Ducommun B, Kaplan J, Hamel CP. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet.* 2000; 26: 207–210.

De Stefani D, Patron M, Rizzuto R. Structure and function of the mitochondrial calcium uniporter complex. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1853(9):2006-11

Dice JF. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci.* 1990; 15: 305–309.

Duvezin-Caubet S, Koppen M, Wagener J, Zick M, Israel L, Bernacchia A, Jagasia R, Rugarli EI, Imhof A, Neupert W, Langer T, Reichert AS. OPA1 processing reconstituted in yeast depends on the subunit composition of the m-AAA protease in mitochondria. *Mol. Biol. Cell.* 2007; 18(9): 3582–3590.

Egan D, Kim J, Shaw RJ, Guan K. The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy.* 2011; 7(6):643-4.

El-Hattab AW, Suleiman J, Almannai M, Scaglia F. Mitochondrial dynamics: Biological roles, molecular machinery, and related diseases. *Mol. Gen. Met.* 2018; 125: 315-321.

Eura Y, Ishihara N, Yokota S, Mihara K. Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion. *J. Biochem.* 2003; 134:333–44.

Farge G and Falkenberg M. Organization of DNA in mammalian mitochondria. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(11).

Fernandez-Silva P, Enriquez JA, and Montoya J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp. Physiol.* 2003; 88:41–56.

Fimia GM, Stoykova A, Romagnoli A, et al. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature.* 2007; 447:1121-5.

Frey TG and Mannella CA. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 2000; 25(7):319–324.

Frey TG, Renken CW, Perkins GA. Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002; 1555:196–203.

Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, Bartoli D, Polishuck RS, Danial NN, De Strooper B, Scorrano L, OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell.* 2006; 126:177–189.

Gaier ED, Sahai I, Wiggs JL, McGeeney B, Hoffman J, Peeler CE. Novel homozygous OPA3 mutation in an Afghani family with 3-methylglutaconic aciduria type III and optic atrophy. *Ophthalmic Genet.* 2019; 40(6):570-573.

Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Mitochondrial dynamics: a strategy for avoiding autophagy. *Curr Biol.* 2011; 21(12):R478-80.

Gatica D, Lahiri V, Klionsky DJ. Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nat Cell Biol.* 2018; 20(3):233-242.

Giacomello M, Pyakurel A, Glytsou C, Scorrano L. the cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020; 21(4):204-224.

Gomes LC, Di Benedetto G, Scorrano L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol.* 2011; 13(5):589-98.

- Grau T, Burbulla LF, Engl G, Delettre C, Delprat B, Oexle K, Leo-Kottler B, Roscioli T, Krüger R, Rapaport D, Wissinger B, Schimpf-Linzenbold S. A novel heterozygous OPA3 mutation located in the mitochondrial target sequence results in altered steady-state levels and fragmented mitochondrial network. *Med Genet.* 2013; 50(12):848-58.
- Hales KG and Fuller MT. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, and predicted GTPase. *Cell.* 1997; 90:121–129.
- Hamacher-Brady A and Brady NR. Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy. *Cell Mol Life Sci.* 2016; 73(4):775-95.
- Harner M, Körner C, Walther D, Mokranjac D, Kaesmacher J, Welsch U, Griffith J, Mann M, Reggiori F, Neupert W. The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *EMBO J.* 2011; 30:4356–70.
- Harper JW, Ordureau A, Heo J. Building and decoding ubiquitin chains for mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018; 19(2):93-108.
- Harwig MC, Viana MP, Egnér JM, Harwig JJ, Widlansky ME, Rafelski SM, Hill RB. Methods for imaging mammalian mitochondrial morphology: A prospective on MitoGraph. *Anal Biochem.* 2018; 552:81-99.
- Hernández-Alvarez MI, Sebastián D, Vives S, Ivanova S, Bartoccioni P, Kakimoto P, Plana N, Veiga SR, Hernández V, Vasconcelos N, Peddinti G, Adrover A, Jové M, Pamplona R, Gordaliza-Alaguero I, Calvo E, Cabré N, Castro R, Kuzmanic A, Boutant M, Sala D, Hyotylainen T, Orešič M, Fort J, Errasti-Murugarren E, Rodrigues CMP, Orozco M, Joven J, Cantó C, Palacin M, Fernández-Veledo S, Vendrell J, Zorzano A. Deficient Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Phosphatidylserine Transfer Causes Liver Disease. *Cell.* 2019; 177(4):881-895.
- Herrera-Cruz M.S and Simmen T. Of yeast, mice and men: MAMs come in two flavors. *Biol Direct.* 2017; 12(1):3.
- Hinshaw JE. Dynamin spirals. *Curr Opin Struct Biol.* 1999; 9:260-267.
- Ho G, Walter JH, Christodoulou J. Costeff optic atrophy syndrome: New clinical case and novel molecular findings. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2008.
- Horvath SE and Daum G. Lipids of mitochondria. *Prog Lipid Res.* 2013; 52(4):590-614.
- Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan JL, Oshiro N, and Mizushima N. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell.* 2009; 20: 1981–1991.
- Hosokawa N, Sasaki T, Iemura S, Natsume T, Hara T, and Mizushima N. Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy.* 2009; 5: 973–979.
- Huizing M, Dorward H, Ly L, et al. OPA3, mutated in 3-methylglutaconic aciduria type III, encodes two transcripts targeted primarily to mitochondria. *Mol Genet Metab.* 2010; 100:149-154.
- Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, Mizushima N, Tanida I, Kominami E, Ohsumi M, Noda T, Ohsumi Y. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature.* 2000; 408: 488–492.
- Ishihara N, Eura Y, Mihara K. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J. Cell Sci.* 2004; 117:6535–46.
- Ishihara N, Fujita Y, Oka T, Mihara K. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J.* 2006; 25:2966–2977.

- Janikiewicz J, Szymański J, Malinska D, Patalas-Krawczyk P, Michalska B, Duszyński J, Giorgi C, Bonora M, Dobrzyn A, Wieckowski MR. Mitochondria-associated membranes in aging and senescence: structure, function, and dynamics. *Cell Death Dis.* 2018; 9(3):332.
- Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, and Kim DH. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell.* 2009; 20: 1992–2003.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, and Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 2000; 19:5720–5728.
- Kane MS, Alban J, Desquirit-Dumas V, Gueguen N, Ishak L, Ferre M, Amati-Bonneau P, Procaccio V, Bonneau D, Lenaers G, Reynier P, Chevrollier A. Autophagy controls the pathogenicity of OPA1 mutations in dominant optic atrophy. *J Cell Mol Med.* 2017; 21(10):2284-2297.
- Kameoka S, Adachi Y, Okamoto K, Iijima M, Sesaki H. Phosphatidic Acid and Cardiolipin Coordinate Mitochondrial Dynamics. *Trends Cell Biol.* 2018; 28(1):67-76.
- Kashatus JA, Nascimento A, Myers LJ, Sher A, Byrne FL, Hoehn KL, Counter CM, Kashatus DF. Erk2 phosphorylation of Drp1 promotes mitochondrial fission and MAPK-driven tumor growth. *Mol Cell.* 2015; 57(3):537-51.
- Kienhöfer J, Häussler DJ, Ruckelshausen F, et al. Association of mitochondrial antioxidant enzymes with mitochondrial DNA as integral nucleoid constituents. *FASEB J.* 2009; 23:2034-2044.
- Kim YJ, Guzman-Hernandez ML, Wisniewski E, Balla. Phosphatidylinositol-phosphatidic acid exchange by Nir2 at ER-PM contact sites maintains phosphoinositide signaling competence. *Dev Cell.* 2015; 33:549 – 561.
- Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi M, Takao T, Noda T, Ohsumi Y. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol.* 2000; 151: 263–276.
- Kirkegaard K, Taylor MP and Jackson WT. Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganism. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2:301-314.
- Kjer P. Infantile optic atrophy with dominant mode of inheritance: a clinical and genetic study of 19 Danish families. *Acta Ophthalmol.* 1959; 37 (Suppl 54): 1–146.
- Kleta R, Skovby F, Christensen E, Rosenberg T, Gahl WA, Anikster Y. 3-Methylglutaconic aciduria type III in a non-Iraqi-Jewish kindred: clinical and molecular findings. *Mol. Genet. Metab.* 2002; 76:201–206.
- Klionsky DJ, Cregg, JM, Dunn WA JR., Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M and Ohsumi Y. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell.* 2003; 5(4):539-45.
- Knott AB, Perkins G, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzl E. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Neurosci.* 2008; 9:505-518.
- Korobova F, Ramabhadran V, Higgs HN. An Actin-Dependent Step in Mitochondrial Fission Mediated by the ER-Associated Formin INF2. *Science.* 2013; 339(6118).
- Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, Chan DC. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science.* 2004; 305: 858–862.
- Kühlbrandt W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes *BMC Biol.* 2015;13:89.

Labbé K, Murley A, Nunnari J. Determinants and functions of mitochondrial behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014; 30:357-91.

Lam C, Gallo LK, Dineen R, Carla Ciccone C, Dorward H, Hoganson GE, Wolfe L, Gahl WA, Huizing M. Two novel compound heterozygous mutations in OPA3 in two siblings with OPA3-related 3-methylglutaconic aciduria. *Mol Genet Metab Rep.* 2014; 1:114-123.

Lanner JT, Georgiou DK, Joshi AD, Hamilton SL. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010; 2(11).

Lee RS and Han J. Mitochondrial Nucleoid: Shield and Switch of the Mitochondrial Genome. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 8060949.

Lee S. and Min K.T. The Interface Between ER and Mitochondria: Molecular Compositions and Functions. *Mol Cells.* 2018; 41(12):1000-1007.

Lenaers G, Christian Hamel C, Cécile Delettre C, Amati-Bonneau P, Procaccio V, Bonneau D, Reynier P, Milea D. Dominant optic atrophy. *Orphanet J Rare Dis.* 2012; 7:46.

Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008; 132(1):27-42.

Levine B, Kroemer G. Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell.* 2019; 176(1-2):11-42.

Lewis JA and Tata JR. A rapidly sedimenting fraction of rat liver endoplasmic reticulum. *J Cell Sci.* 1973. 13(2): p. 447-59.

Li C, Li L, Yang M, Zeng L, Sun L. PACS-2: A key regulator of mitochondria-associated membranes (MAMs). *Pharmacol Res.* 2020; 160:105080.

Li Y, Li J, Jia X, Xiao X, Li S, Guo X. Genetic and Clinical Analyses of DOA and LHON in 304 Chinese Patients with Suspected Childhood-Onset Hereditary Optic Neuropathy. *PLoS One.* 2017; 12(1):e0170090.

Liang C, Feng P, Ku B, Oh BH, Jung JU. UVRAG: a new player in autophagy and tumor cell growth. *Autophagy.* 2007; 3: 69-71.

Liao C, Ashley N, Diot A, Morten K, Phadwal K, Williams A, Fearnley I, Rosser L, Lowndes J, Fratter C, Ferguson DJ, Vay L, Quaghebeur G, Moroni I, Bianchi S, Lamperti C, Downes SM, Sitarz KS, Flannery PJ, Carver J, Dombi E, East D, Laura M, Reilly MM, Mortiboys H, Prevo R, Campanella M, Daniels MJ, Zeviani M, Yu-Wai-Man P, Simon AK, Votruba M, Poulton J. Dysregulated mitophagy and mitochondrial organization in optic atrophy due to OPA1 mutations. *Neurology.* 2017; 88(2):131-142.

Lutkewitte AJ and Finck BN. Regulation of Signaling and Metabolism by Lipin-mediated Phosphatidic Acid Phosphohydrolase Activity. *Biomolecules.* 2020; 10(10):1386.

MacVicar T, Langer T. OPA1 processing in cell death and disease – the long and short of it. *Journal of Cell Science.* 2016; 129: 2297-2306.

Manor U, Bartholomew S, Golani G, Christenson E, Kozlov M, Higgs H, Spudich J, Lippincott-Schwartz J. A mitochondria-anchored isoform of the actin-nucleating spire protein regulates mitochondrial division. *Elife.* 2015; 4.

Marchi S., Patergnani S, Pinton P. The endoplasmic reticulum-mitochondria connection: one touch, multiple functions. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1837(4):461-9.

Maresca A, Chiara La Morgia C, Caporali L, Valentino ML, Carelli V. The optic nerve: a "mito-window" on mitochondrial neurodegeneration. *Mol Cell Neurosci.* 2013; 55(100):62-76.

Maresca A, L Caporali L, Strobbe D, Zanna C, Malavolta D, La Morgia C, Valentino ML, Carelli V. Genetic Basis of Mitochondrial Optic Neuropathies. *Curr Mol Med*. 2014 ;14(8):985-992.

Maresca A and Carelli V. Molecular Mechanisms behind Inherited Neurodegeneration of the Optic Nerve. *Biomolecules*. 2021; 11(4):496.

Margulis L. Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp Soc Exp Biol*. 1975; 29:21-38

Mejia EM and Hatch GM. Mitochondrial phospholipids: role in mitochondrial function. *J Bioenerg Biomembr*. 2016; 48(2):99-112.

Miliara X, Tatsuta T, Berry JL, Rouse SL, Solak K, Chorev DS, Wu D, Robinson CV, Matthews S, Langer T. Structural determinants of lipid specificity within Ups/PRELI lipid transfer proteins. *Nat Commun*. 2019; 10(1):1130

Mishra P and Chan DC. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J Cell Biol*. 2016; 212(4):379-87.

Mishra J, Jhun BS, Hurst S, O-Uchi J, Csordás G, Sheu SS. The Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter: Structure, Function, and Pharmacology. *Handb Exp Pharmacol*. 2017; 240:129-156.

Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008; 451:1069–1075.

Mizushima N and Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011; 147(4):728-41.

Muallem S, Chung WY, Jha A, Ahuja M. Lipids at membrane contact sites: cell signaling and ion transport *EMBO Rep*. 2017; 18(11):1893-1904.

Murakawa T, Okamoto K, Omiya S, Taneike M, Yamaguchi O, Otsu K. A Mammalian Mitophagy Receptor, Bcl2-L-13, Recruits the ULK1 Complex to Induce Mitophagy. *Cell Rep*. 2019; 26(2): 338–345.

Nakatogawa H. Two ubiquitin-like conjugation systems that mediate membrane formation during autophagy. *Essays Biochem*. 2013; 55:39-50.

Navein AE, Cooke EJ, Davies JR, Smith TG, Wells LHM, Ohazama A, Healy C, Sharpe PT, Evans SL, Evans BAJ, Votruba M, Wells T. Disrupted mitochondrial function in the Opa3L122P mouse model for Costeff Syndrome impairs skeletal integrity. *Hum Mol Genet*. 2016; 25(12):2404-2416.

Neas K, Bennetts B, Carpenter K, White R, Kirk EP, Wilson M, Kelley R, Baric I, Christodoulou J. OPA3 mutation screening in patients with unexplained 3-methylglutaconic aciduria. *J Inherit Metab Dis*. 2005;28(4):525-32.

Nicholls TJ and Minczuk M. In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA. *Exp. Gerontol*. 2014; 56:175–181.

Norton M, Ng AC, Baird S, Dumoulin A, Shutt T, Mah N, Andrade-Navarro MA, McBride HM, Sreaton RA. ROMO1 is an essential redox-dependent regulator of mitochondrial dynamics. *Sci Signal*. 2014; 7(310):ra10.

Nunnari J, Marshall WF, Straight A, Murray A, Sedat JW, Walter P. Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Cell*. 1997; 8:1233-42.

Nystuen A, Costeff H, Elpeleg ON, Apter N, Bonné-Tamir B, Mohrenweiser H, Haider N, Stone EM, Sheffield VC. Iraqi-Jewish kindreds with optic atrophy plus (3-methylglutaconic aciduria type 3) demonstrate linkage disequilibrium with the CTG repeat in the 3' untranslated region of the myotonic dystrophy protein kinase gene. *Hum Mol Genet*. 1997 Apr;6(4):563-9.

Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P, Lenaers G. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis, *J. Biol. Chem.* 2003; 278:7743–7746.

Olichon A, Elachouri G, Baricault L, Delettre C, Belenguer P, and Lenaers G. OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis. *Cell Death Differ.* 2007a; 14:682–692.

Pakendorf B and Stoneking M. Mitochondrial DNA and human evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2005; 6:165-83.

Palmer CS, Elgass KD, Parton RG, Osellame LD, Stojanovski D, Ryan MT. Adaptor proteins MiD49 and MiD51 can act independently of Mff and Fis1 in Drp1 recruitment and are specific for mitochondrial fission. *J. Biol. Chem.* 2013; 288:27584–93.

Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Role of Cardiolipin in Mitochondrial Function and Dynamics in Health and Disease: Molecular and Pharmacological Aspects. *Cells.* 2019; 8(7):728.

Parzych KR and Klionsky DJ. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxid Redox Signal.* 2014; 20(3): 460–473.

Patergnani S, Suski JM, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, Giorgi C, Marchi S, Missiroli S, Poletti F, Rimessi A, Duszynski J, Wieckowski MR, Pinton P. Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs). *Cell Commun Signal.* 2011; 9:19.

Patterson RL, Boehning D, Snyder SH. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators. *Annu Rev Biochem.* 2004; 73:437-65.

Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, and Levine B. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell.* 2005; 122: 927–939.

Pei W, Kratz LE, Bernardini I, et al. A model of Costeff Syndrome reveals metabolic and protective functions of mitochondrial OPA3. *Development.* 2010; 137:2587-2596

Perkins GA, Frey TG. Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy. *Micron.* 2000; 31(1):97-111.

Pernas L and Scorrano L. Mito-morphosis: mitochondrial fusion, fission, and cristae remodeling as key mediators of cellular function. *Annu Rev Physiol.* 2016; 78:505-31.

Pickles S, Vigji P, Youle RJ. Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Curr Biol.* 2018; 28(4):R170-R185.

Pinton P, Giorgi C, Siviero R, Zecchini E, Rizzuto R. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene.* 2008; 27(50):6407-18.

Polke JM, Laura M, Pareyson D, Taroni F, Milani M, et al. Recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease due to compound heterozygous mitofusin 2 mutations. *Neurology.* 2011; 77(2):168-73.

Potting C, Wilmes C, Engmann T, Osman C, Langer T. Regulation of mitochondrial phospholipids by Ups1/PRELI-like proteins depends on proteolysis and Mdm35. *EMBO J.* 2010; 29(17):2888-98.

Potting C, Tatsuta T, König T, Haag M, Wai T, Aaltonen MJ, Langer T. TRIAP1/PRELI complexes prevent apoptosis by mediating intramitochondrial transport of phosphatidic acid. *Cell Metab.* 2013; 18(2):287-95.

Powell KA, Davies JR, Taylor E, Wride MA, Votruba M. Mitochondrial localization and ocular expression of mutant Opa3 in a mouse model of 3-methylglutaconic aciduria type III. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52(7):4369-80.

Puchades C, Ding B, Song A, Wiseman RL, Lander GC, Glynn SE. Unique Structural Features of the Mitochondrial AAA+ Protease AFG3L2 Reveal the Molecular Basis for Activity in Health and Disease. *Mol Cell*. 2019; 75(5):1073-1085.

Rainbolt TK, Lebeau J, Puchades C, and Wiseman RL. Reciprocal Degradation of YME1L and OMA1 Adapts Mitochondrial Proteolytic Activity During Stress Cell Rep. 2016; 14(9): 2041–2049.

Rampelt H, Zerbes RM, van der Laan, M, and Pfanner N. Role of the mitochondrial contact site and cristae organizing system in membrane architecture and dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research*. 2017; 1864(4):737-746.

Raturi A. and Simmen T. Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: the mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1833(1):213-24.

Reddish FN, Miller CL, Gorkhali R, Yang JJ. Calcium Dynamics Mediated by the Endoplasmic/Sarcoplasmic Reticulum and Related Diseases. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(5):1024.

Reddy PH, Reddy TP, Manczak M, Calkins MJ, Shirendeb U, Mao P. Dynamin-related protein 1 and mitochondrial fragmentation in neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev*. 2011; 67(1-2):103-18.

Reggiori F. Membrane origin for autophagy. *Curr Top Dev Biol*. 2006; 74, 1-30.

Reynier P, Amati-Bonneau P, Verny C, et al. OPA3 gene mutations responsible for autosomal dominant optic atrophy and cataract. *J Med Genet*. 2004; 41:e110.

Richter U, Ng KY, Suomi F, Marttinen P, Turunen T, Jackson C, Suomalainen A, Vihinen H, Jokitalo E, Nyman TA, et al. Mitochondrial Stress Response Triggered by Defects in Protein Synthesis Quality Control. *Life Sci Alliance*. 2019; 2(1): e201800219.

Richter F, Dennerlein S, Nikolov M, Jans DC, Naumenko N, Aich A, MacVicar T, Linden A, Jakobs S, Urlaub H, Langer T, Rehling P. ROMO1 is a constituent of the human presequence translocase required for YME1L protease import. *J Cell Biol*. 2019; 218(2):598-614.

Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, Aguiari P, Bononi A, De Stefani D, Giorgi C, Leo S, Rimessi A, Siviero R, Zecchini E, Pinton P. Ca²⁺ transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1787(11):1342-51.

Roy M, Reddy PH, Iijima M, Sesaki H. Mitochondrial division and fusion in metabolism. *Curr Op Cell Biol*. 2015; 33:111-118.

Ryu SW, Jeong HJ, Choi M, et al. Optic atrophy 3 as a protein of the mitochondrial outer membrane induces mitochondrial fragmentation. *Cell Mol Life Sci*. 2010; 67:2839-2850.

Ryu SW, Yoon J, Yim N, Choi K, Choi C. Downregulation of OPA3 is responsible for transforming growth factor- β -induced mitochondrial elongation and F-actin rearrangement in retinal pigment epithelial ARPE-19 cells. *PLoS One*. 2013; 8(5):e63495.

Santel A, Frank S, Gaume B, Herrler M, Youle RJ, Fuller MT. Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci*. 2003; 116(Pt 13):2763-2774.

Satoh M, Hamamoto T, Seo N, et al. Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 300:482-493.

Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev*. 2008; 88:611-638.

Seabright PA, Fine NHF, Barlow JP, Lord SO, Musa I, Gray A, Bryant JA, Banzhaf M, Lavery GG, Hardie DG, Hodson DJ, Philp A, Lai Y. AMPK activation induces mitophagy and promotes mitochondrial fission while activating TBK1 in a PINK1-Parkin independent manner. *FASEB J*. 2020; 34(5):6284-6301.

Serasinghe MN, Wieder SY, Renault TT, Elkholi R, Ascioffa JJ, Yao JL, Jabado O, Hoehn K, Kageyama Y, Sesaki H, Chipuk JE. Mitochondrial division is requisite to RAS-induced transformation and targeted by oncogenic MAPK pathway inhibitors. *Mol Cell*. 2015; 57(3):521-36.

Sergouniotis PI, Perveen R, Thiselton DL, Giannopoulos K, Sarros M, Davies JR, Biswas S, Ansons AM, Ashworth JL, Lloyd C, Black GC, Votruba M. Clinical and molecular genetic findings in autosomal dominant OPA3-related optic neuropathy. *Neurogenetics*. 2015; 16(1):69-75.

Shoshan-Barmatz V, De S, Meir A. The Mitochondrial Voltage-Dependent Anion Channel 1, Ca²⁺ Transport, Apoptosis, and Their Regulation. *Front Oncol*. 2017; 7:60.

Silva Ramos E, Larsson NG, Mourier A. Bioenergetic roles of mitochondrial fusion. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1857(8):1277-1283.

Simmen T, Aslan JE, Blagoveshchenskaya AD, Thomas L, Wan L, Xiang Y, Feliciangeli SF, Hung CH, Crump CM, Thomas G. PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis. *EMBO J*. 2005; 24(4):717-29.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*. 1990; 82(13):1107–1112.

Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Blik AM. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 2001; 12(8):2245-56.

Tamura Y, Sesaki H, Endo T. Phospholipid transport via mitochondria. *Traffic*. 2014; 15(9):933-45.

Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36(12): 2503–2518.

Tasseva G, Bai HD, Davidescu M, Haromy A, Michelakis E, Vance JE. Phosphatidylethanolamine deficiency in Mammalian mitochondria impairs oxidative phosphorylation and alters mitochondrial morphology. *J Biol Chem*. 2013; 288(6):4158-73.

Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet*. 2005; 6(5):389-402.

Tekirdag K and Cuervo AM. Chaperone-mediated Autophagy and Endosomal Microautophagy: Joint by a Chaperone. *J Biol Chem*. 2018; 293(15):5414-5424.

Thiselton DL, Alexander C, Taanman JW, Brooks S, Rosenberg T, Eiberg H, et al. A comprehensive survey of mutations in the OPA1 gene in patients with autosomal dominant optic atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002; 43: 1715-1724.

Toomes C, Marchbank NJ, Mackey DA, et al. Spectrum, frequency and penetrance of OPA1 mutations in dominant optic atrophy. *Hum Mol Genet*. 2001; 10:1369–1378.

Tooze SA and Yoshimori T. The origin of the autophagosomal membrane. *Nature Cell Biology*. 2010; 12(9), 831–835.

Toyama EQ, Herzig S, Courchet J, Lewis TL Jr, Losón OC, Hellberg K, Young NP, Chen H, Polleux F, Chan DC, Shaw RJ. Metabolism. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. *Science*. 2016; 351(6270):275-281.

Tulli S, Bondio AD, Baderna V, Mazza D, Codazzi F, Pierson TM, Ambrosi A, Nolte D, Goizet C, Toro C, et al. Pathogenic Variants in the AFG3L2 Proteolytic Domain Cause SCA28 through Haploinsufficiency and Proteostatic Stress-Driven OMA1 Activation. *J. Med. Genet.* 2019; 56, 499-511.

Vance JE. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J Biol Chem.* 1990; 265(13):7248–56

Vance JE and Tasseva G. Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1831(3):543-54

Vance JE. MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1841(4):595-609

Van Petegem F. Ryanodine receptors: structure and function. *J Biol Chem.* 2012; 287(38):31624-32.

van Vliet AR, Verfaillie T, Agostinis P. New functions of mitochondria associated membranes in cellular signalling. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1843(10):2253-62.

Verny C, Amati-Bonneau P, Dubas F, et al. An OPA3 gene mutation is responsible for the disease associating optic atrophy and cataract with extrapyramidal signs. *Rev Neurol (Paris).* 2005; 161:451-454.

von der Malsburg K, Müller JM, Bohnert M, Oeljeklaus S, Kwiatkowska P, Becker T, Loniewska-Lwowska A, Wiese S, Rao S, Milenkovic D, et al. Dual role of mitofilin in mitochondrial membrane organization and protein biogenesis. *Dev. Cell.* 2011; 21:694–707.

Votruba M, Fitzke, FW, Holder GE, et al. Clinical features in affected individuals from 21 pedigrees with dominant optic atrophy. *Archives of Ophthalmology.* 1998a; 116, 351–358.

Votruba M, Moore AT, Bhattacharya SS. Clinical features, molecular genetics, and pathophysiology of dominant optic atrophy. *Journal of Medical Genetics.* 1998b; 35, 793–800

Wai T and Langer T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab.* 2016; 27(2):105-117.

Wai T, Saita S, Nolte H, Müller S, König T, Richter-Dennerlein R, Sprenger HG, Madrenas J, Mühlmeister M, Brandt U, Krüger M, Langer T. The membrane scaffold SLP2 anchors a proteolytic hub in mitochondria containing PARL and the i-AAA protease YME1L. *EMBO Rep.* 2016; 17(12):1844-1856.

Wang Y, Korman SH, Ye J, Gargus JJ, Gutman A, Taroni F, Garavaglia B, Longo N. Phenotype and genotype variation in primary carnitine deficiency. *Genet Med.* 2001; 3(6):387-392.

Waterham HR, Koster J, van Roermund CWT, Mooyer PAW, Wanders RJA, Leonard JV. A Lethal Defect of Mitochondrial and Peroxisomal Fission. *N. Engl. J. Med.* 2007; 356:1736-1741.

Wei Y, Pattingre S, Sinha s, Bassik M, Levine B. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell.* 2008; 30:678-688.

Wells T, Davies JR, Guschina IA, Ball DJ, Davies JS, Davies VJ, Evans BAJ, Votruba M. Opa3, a novel regulator of mitochondrial function, controls thermogenesis and abdominal fat mass in a mouse model for Costeff syndrome. *Hum Mol Genet.* 2012; 21(22):4836-44.

Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010; 11:872-884.

Wilson TJ, Slupe AM, Strack S. Cell signaling and mitochondrial dynamics: implications for neuronal function and neurodegenerative disease. *Neurobiol Dis.* 2013; 51:13-26.

- Wollweber F, von der Malsburg K, van der Laan M. Mitochondrial contact site and cristae organizing system: a central player in membrane shaping and crosstalk. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017; 1864(9):1481-1489.
- Yamashita SI, Kanki T. How autophagy eats large mitochondria: Autophagosome formation coupled with mitochondrial fragmentation. *Autophagy.* 2017; 13(5):980-981.
- Yoo SM, Jung YK. A Molecular Approach to Mitophagy and Mitochondrial Dynamics. *Mol Cells.* 2018; 41(1):18-26.
- Yoon Y, Pitts KR, McNiven MA. Mammalian Dynamin-like Protein DLP1 Tubulates Membranes. *Mol. Biol. Cell* 2001; 12, 2894–2905.
- Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011; 12(1):9-14
- Yu-Wai-Man P, Shankar SP, Biousse V, Miller NR, Bean LJH, Coffee B, Hegde M, Newman NJ. Genetic screening for OPA1 and OPA3 mutations in patients with suspected inherited optic neuropathies. *Ophthalmology.* 2011; 118(3):558-63.
- Zaninello M, Palikaras K, Naon D, Iwata K, Herkenne S, Quintana-Cabrera R, Semenzato M, Grespi F, Ross-Cisneros FN, Carelli V, Sadun AA, Tavernarakis N, Scorrano L. Inhibition of autophagy curtails visual loss in a model of autosomal dominant optic atrophy. *Nat Commun.* 2020; 11(1):4029.
- Zhang C, Lin S. AMPK Promotes Autophagy by Facilitating Mitochondrial Fission. *Cell Metab.* 2016; 3(3):399-401.
- Zhang P and Reue K. Lipin proteins and glycerolipid metabolism: Roles at the ER membrane and beyond. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2017; 1859(9 Pt B):1583-1595.
- Zhang Q, Tamura Y, Roy M, Adachi Y, Iijima M, Sesaki H. Biosynthesis and roles of phospholipids in mitochondrial fusion, division and mitophagy. *Cell Mol Life Sci.* 2014; 71(19):3767-78.
- Zhao T., Goedhart CM, Sam PN, Sabouny R, Lingrell S, Cornish AJ, Lamont RE, Bernier FP, Sinasac D, Parboosingh JS, Vance JE, Claypool SM, Innes AM, Shutt TE. PISD is a mitochondrial disease gene causing skeletal dysplasia, cataracts, and white matter changes. *Life Sci Alliance.* 2019; 2(2)
- Zimorski V, Ku C, Martin W.F., Gould SB. Endosymbiotic theory for organelle origins. *Curr Opin Microbiol.* 2014; 22:38-48.
- Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat. Genet.* 2004; 36:449–51.