UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare

ELABORATO DI LAUREA

Diminuzione di DRP1 e alterazione del *network* mitocondriale in cardiomiociti di paziente affetto da atassia di Friedreich

Tutor: Prof.ssa Paola Costantini
Dipartimento di Biologia

Laureanda: Maria Pia Marchisotti

ANNO ACCADEMICO 2025/2026

INDICE

Abstract 3
1. Introduzione 4
1.1. Atassia di Friedreich 4
1.1.1. Caratteristiche cliniche 4
1.1.2. Fisiopatologia 4
1.2. I mitocondri e il loro network 5
1.2.1. La dinamica mitocondriale 6
1.3. Scopo dell'elaborato 8
2. Materiali e metodi 9
2.1. Riprogrammazione cellulare e colture hIPSCs 9
2.2. Differenziamento in cardiomiociti 9
2.3. Western blot 10
2.4. Isolamento dell'mRNA e PCR quantitativa 10
2.5. Immunofluorescenza 11
2.6. Footprint mitocondriale 11
2.7. Potenziale di membrana mitocondriale ΔΨm 12
2.8. Citometria a flusso: quantificazione ROS 12
2.9. Statistica 12
3. Risultati 13
3.1. Footprint mitocondriale 13
3.2. Espressione dei trascritti e delle proteine di fusione e fissione mitocondriale 13
3.3. Analisi di colocalizzazione proteina-mitocondrio 15
3.4. Potenziale di membrana mitocondriale ΔΨm 16
3.5. Citometria a flusso: quantificazione ROS 17
4. Discussione e conclusioni 18
4.1. Disequilibrio della dinamica mitocondriale e regolazione di DRP1 18
4.2. OPA1 limiti della significatività statistica e prospettive future 18
Bibliografia 20

Abstract

L'atassia di Friedreich (FA) è una malattia neurodegenerativa, autosomica recessiva, causata dall'espansione patologica di triplette GAA nel primo introne del gene *FXN*, codificante per la proteina mitocondriale fratassina, che ha un ruolo essenziale nel metabolismo energetico e la cui espressione risulta diminuita nei pazienti FA.

Circa il 60% dei pazienti affetti da FA muore a causa di una cardiomiopatia ipertrofica (HCM), nonostante ciò, l'anatomia mitocondriale dei cardiomiociti di paziente è ancora poco conosciuta. L'articolo analizzato in questo elaborato si propone di indagare l'equilibrio tra fissione e fusione dei mitocondri di cardiomiociti derivati da cellule staminali sia di un paziente affetto da FA e HCM che di un controllo sano.

La fusione permette il trasferimento di prodotti genici tra due mitocondri, mentre la fissione permette alla cellula di effettuarne un controllo qualitativo. Un loro disequilibrio è associato a varie malattie.

I risultati di questo studio evidenziano in cardiomiociti FA un disequilibrio tra fusione e fissione, sbilanciato a favore della prima, dato confermato dalla riduzione dei livelli di DRP1, proteina implicata nel processo di fusione. Ciò è inoltre associato ad un aumento di specie reattive dell'ossigeno, potenzialmente responsabile del danno ossidativo nella HCM di pazienti FA.

1. Introduzione

1.1. Atassia di Friedreich

1.1.1. Caratteristiche cliniche

L'atassia di Friedreich (FA) è l'atassia che più comunemente viene ereditata negli individui di origini europea; si tratta di una malattia multisistemica che colpisce maggiormente i distretti anatomici a più alto fabbisogno energetico: sistema nervoso centrale e periferico (SNC e SNP), il miocardio, il sistema muscolo-scheletrico e il pancreas endocrino.

In generale i sintomi tendono a presentarsi fra i 10 e i 16 anni d'età e consistono in una progressiva perdita di coordinazione muscolare degli arti e dell'andatura, che comporta spesso la necessità dell'uso di una sedia a rotelle. Inoltre, si sviluppa gradualmente una disartria, ovvero un disturbo motorio del linguaggio che lo rende più confuso e difficile da capire. La scoliosi è comune, anche la spasticità è un sintomo ma si sviluppa negli stadi più avanzati; inoltre, due terzi dei pazienti soffrono anche di disturbi alla vista che in rari casi portano alla cecità; complessivamente aumenta il tasso di insorgenza di diabete mellito. [2]

Un altro sintomo è dato da una particolare cardiomiopatia ipertrofica, sviluppata da circa il 60% dei pazienti, nella cui patogenesi sembra avere un ruolo la miocardite indotta da ferro. A prova del fatto che questa sia una cardiomiopatia ipertrofica particolare, sembra che alcuni farmaci, usati classicamente per trattare questa patologia cardiaca, possano essere dannosi nei pazienti affetti da FA. [1, 3]

L'aspettativa di vita per i pazienti affetti da FA è di circa 36 anni dall'esordio dei primi sintomi e la causa di morte è frequentemente una disfunzione cardiaca, ma altre cause includono ictus, malattie cardiache ischemiche e polmonite. [2]

1.1.2. Fisiopatologia

FA è causata nel 96% dei casi da un'espansione in omozigosi di triplette ripetute GAA nell'introne 1 del gene *FXN*, che codifica per la proteina fratassina (FXN); quest'espansione nel DNA comporta una diminuzione della trascrizione del gene, causata dalla formazione di strutture non canoniche, e dunque un'alterazione di tutti quei processi in cui FXN è implicata. Nei rimanenti 4% dei casi gli affetti sono individui eterozigoti per questa mutazione: presentano un allele con espansione di GAA e un allele con una differente mutazione. Negli individui sani la tripletta GAA viene ripetuta meno di 36 volte, mentre in individui malati viene ripetuta circa fra le 56 e le 1300 volte; inoltre esiste una correlazione inversa tra il numero di ripetizioni di GAA con l'età dello sviluppo dei sintomi e con la presenza di complicazioni.

Individui eterozigoti, che presentano un allele *FXN* wildtype e uno con l'espansione di GAA, non sono affetti dalla malattia, nonostante i livelli di proteina FXN siano dimezzati rispetto a quelli presenti in individui omozigoti per l'allele wildtype. Le persone affette da FA esprimono comunque FXN, ma i livelli di trascritto sono pari al 5-30% rispetto ai livelli espressi in individui sani omozigoti. I malati che sono omozigoti per più di 400 triplette GAA hanno meno del 10% di trascritti *FXN*; mentre i malati omozigoti per meno di 400 triplette GAA hanno una minor riduzione dei livelli di trascritti FXN, e questo comporta un esordio più tardivo della patologia e un progresso fenotipico più lento. [4]

Il gene *FXN* si trova sul cromosoma *9q21.11*, e codifica per una sequenza proteica lunga 210 amminoacidi. Una volta sintetizzata come precursore, la proteina viene importata nel mitocondrio dove va incontro a due tagli proteolitici. Il primo va a

rimuovere 41 amminoacidi all'N-terminale, corrispondenti alla sequenza segnale di importazione mitocondriale (MTS). Il secondo taglio, che avviene fra l'amminoacido 80 e 81, rende la forma predominante della proteina quella matura. [3, 4]

La FXN è normalmente presente nella matrice mitocondriale, dove interagisce con il macchinario di assemblaggio dei centri ferro-zolfo (ISC); recenti studi suggeriscono che essa sia implicata nell'attivazione della formazione di ISC. I gruppi ferro-zolfo (Fe-S), assemblati da ISC, sono cofattori molto utilizzati dalla cellula, si trovano legati ad esempio ai complessi della catena di trasporto degli elettroni I, II e III, ma anche ad altre proteine, fra cui l'aconitasi mitocondriale, enzima che partecipa al ciclo di Krebs. Una loro diminuzione, causata ad esempio da una riduzione dell'espressione di FXN, comporta una diminuzione dell'attività delle proteine che li utilizzano come cofattori. In caso di riduzione dei gruppi Fe-S si ha una diminuzione della produzione di ATP mitocondriale a causa della riduzione dell'attività dei complessi di trasporto degli elettroni, implicati nel processo di respirazione cellulare. [2, 4]

Oltre alla partecipazione all'assemblaggio dei centri Fe-S, la FXN partecipa anche alla sintesi del gruppo eme e ha un ruolo nel metabolismo dello ione ferro. [4] Infatti, una riduzione dei livelli di FXN comporta un minore utilizzo di ferro per creare i centri Fe-S e, di conseguenza, un accumulo dello ione che si ossiderà, aumentando lo stress ossidativo nei mitocondri. [2]

1.2. I mitocondri e il loro *network*

I mitocondri sono organelli plastici e dinamici presenti nella maggior parte delle cellule eucariotiche; hanno due ruoli principali: uno bioenergetico, come centrale energetica della cellula, e uno come organelli di segnalazione cellulare. Sono delimitati da due membrane distinte, strutturalmente e funzionalmente: la membrana mitocondriale esterna (OMM), principale piattaforma di segnalazione mitocondriale, e la membrana mitocondriale interna (IMM), sede della conversione energetica mitocondriale. [6, 7]

L'OMM è liscia e permeabile a molecole più piccole di 5 kDa; le proteine che sono qui presenti sono traslocatori proteici, proteine di connessione ad altri compartimenti subcellulari e proteine coordinanti le vie di trasduzione del segnale. L'IMM delimita il lume mitocondriale, denominato matrice, e la si può distinguere in due sub-compartimenti: la porzione limitante della membrana interna (IBM) e le creste mitocondriali. L'IBM si dispone parallelamente all'OMM; mentre le creste mitocondriali, sede della fosforilazione ossidativa, sono ripiegamenti dell'IMM che ne espandono la superficie (**Figura 1A**). [7]

Nella matrice si trova il genoma mitocondriale circolare a doppia elica di DNA (mtDNA) lungo circa 16,5kpb, costituito da 37 geni codificanti per 13 proteine, 2 rRNA e 22 tRNA. Le restanti proteine necessarie al mitocondrio, ovvero la maggior parte, vengono codificate da geni nucleari e vengono poi importate nell'organello.

Nei mitocondri prendono luogo molti processi metabolici importanti per la cellula, fra cui: la fosforilazione ossidativa, il metabolismo di carboidrati, amminoacidi e lipidi, processi regolatori dell'apoptosi e le vie di segnalazione del calcio (**Figura 1B**). Per mantenere l'omeostasi e la corretta funzionalità, questi organelli vanno incontro a continui cambiamenti nella loro morfologia e nel loro numero tramite un'importante regolazione dei processi di fusione e fissione mitocondriale. [6]

1.2.1. La dinamica mitocondriale

In risposta a specifiche richieste tissutali e cellulari, i mitocondri si adattano a livello di morfologia, organizzazione e *network* in modo molto sensibile (**Figura 1C**); questo a causa delle numerose modifiche post-traduzionali che modulano l'attività delle molecole effettrici dei processi di dinamicità mitocondriale. [7]

I mitocondri possono unirsi tramite fusione assumendo una forma più allungata; questo permette loro di effettuare uno scambio genico e metabolico del loro contenuto, utile ad esempio per superare lesioni al mtDNA, spesso indotte da specie reattive dell'ossigeno (ROS). Le proteine che mediano il processo della fusione sono la mitofusina 1 e la mitofusina 2 (MFN1 e MFN2) sull'OMM, mentre la proteina dell'atrofia ottica 1 (OPA1) sull'IMM. [6]

Le MFN1 e MFN2 appartengono alla famiglia delle grandi GTPasi correlate alla dinamina, presentano fra loro un alto grado di omologia e una simile organizzazione strutturale, ma svolgono funzioni diverse. La MFN1, insieme a OPA1, è una componente centrale della reazione di fusione mitocondriale; mentre MFN2, la cui funzione è ancora poco chiara, è stata dimostrata partecipare nell'interazione dei mitocondri con altri organelli, specialmente con il RE.

OPA1 coordina la fusione di OMM e IMM, oltre ad avere un importante ruolo nel rimodellamento delle creste mitocondriali. Il suo omologo in lievito è stato dimostrato potersi assemblare sia in eliche sinistrorse, sia in eliche destrorse. Sembra assemblarsi in eliche sinistrorse nelle creste mitocondriali inducendone una costrizione della membrana; mentre sembra assemblarsi in eliche destrorse nell'IBM tirando la membrana e portando ad eventi di fusione. OPA1 e il suo omologo in lievito presentano però una scarsa omologia e non è ancora chiaro se la capacità di assemblarsi in eliche destrorse e sinistrorse sia valida anche per OPA1.

Come la fusione venga coordinata fra le membrane dei mitocondri non è stato ancora ben definito, ma sicuramente viene coinvolta un'interazione diretta tra OPA1 e MFN1. Uno dei modelli più plausibili prevede la formazione di pori di fusione su OMM, dovuti all'oligomerizzazione di MFN1, stimolata dall'idrolisi di GTP; seguita dalla fusione di IMM, guidata da OPA1, la quale è stata attivata da MFN1 con una modalità ancora non nota. OPA1 è soggetta a diversi processamenti, impattando fortemente sulla dinamica mitocondriale, ma ancora non è stato scoperto come le sue diverse forme funzionino e si coordinino. [7]

I mitocondri possono anche frammentarsi tramite il processo di fissione, ovvero di scissione degli organelli, ad esempio, per distribuirsi correttamente nelle cellule figlie dopo la divisione cellulare e per eliminarne le parti danneggiate tramite mitofagia, una degradazione autofagica dell'organello. [6]

La fissione è principalmente effettuata dalla proteina correlata alla dinamina 1 (DRP1), la quale trasloca dal citosol ai mitocondri legandosi ai propri recettori presenti sull'OMM: il fattore di fissione mitocondriale (MFF), la proteina di fissione mitocondriale 1 (FIS1) e i fattori di divisione mitocondriali 49 e 51 (MiD49 e MiD51). In seguito a questo legame, DRP1 oligomerizza; alcune analisi hanno rivelato che la formazione di polimeri lineari su OMM è indotta dal legame con GTP, il quale stabilizza l'interazione DRP1-recettore. La successiva idrolisi di GTP causa un accorciamento e un ripiegamento del polimero in anelli chiusi con un diametro interno di 16nm; questi anelli sono compatibili con la costrizione mitocondriale e la conseguente fissione. Vi sono evidenze che DRP1 sia in grado di oligomerizzare anche senza interagire con i propri recettori, ma alcuni studi indicano che la

costrizione di membrana risultante non sia sufficiente ad indurre una divisione mitocondriale. [7]

Inoltre, l'OMM stabilisce siti di contatto di membrana con altri organelli e compartimenti subcellulari (Figura 1D), i quali possono regolare la dinamica mitocondriale. Questo viene dimostrato sia dall'interazione che la MFN2 permette con il RE, sia dalla localizzazione spaziale della fissione mitocondriale in siti di prossimità al RE. I siti di contatto tra mitocondri e RE vengono chiamati MERCs e sono mediati da alcune proteine ponte. La MFN2 è localizzata sia su OMM, sia sul RE e può omo-oligomerizzare, ma anche etero-oligomerizzare con la MFN1. In prossimità dei MERCs è stato dimostrato esserci un accumulo di actina, la quale sembra poter guidare l'iniziale costrizione mitocondriale, successivamente supportata dalla polimerizzazione di DRP1. I siti MERCs permettono anche il trasporto di calcio ai mitocondri, questo attiva la costrizione di IMM in un modo DRP1-indipendente per completare la fissione, ma può anche indurre l'apoptosi mitocondriale. I siti di contatto sono anche importanti punti di scambio lipidico fra RE e mitocondri; una perdita dell'omeostasi lipidica comporta una morfologia anormale con creste più corte e un'iperfusione mitocondriale. [7]

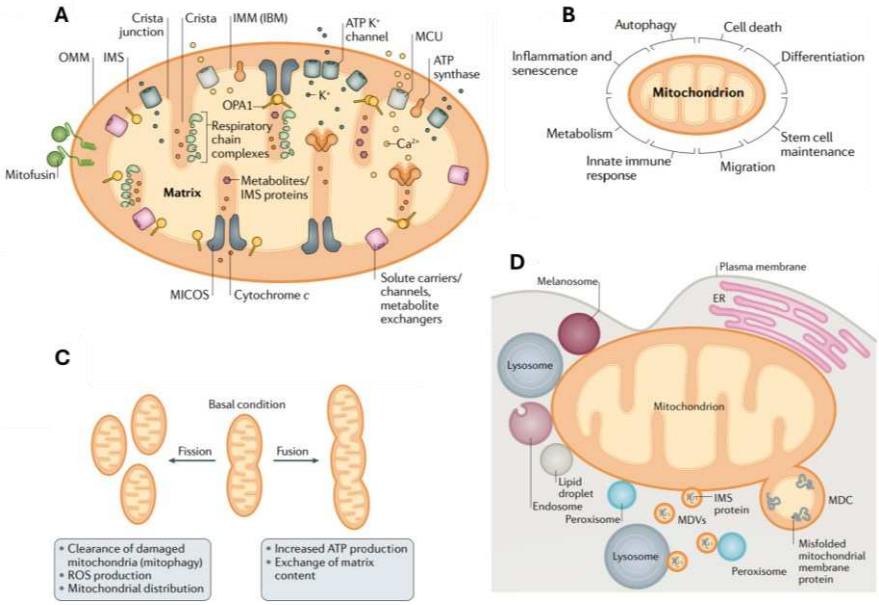

Figura 1. A. I mitocondri sono composti da: membrana mitocondriale esterna (OMM); spazio intermembrana; membrana mitocondriale interna (IMM), a sua volta suddivisa in porzione limitante della membrana interna (IBM) e creste mitocondriali; e matrice mitocondriale. Sono molte le proteine e le molecole residenti nel mitocondrio, qui ne sono rappresentate alcune; in particolare, vengono evidenziati i complessi della catena di trasporto degli elettroni, l'ATP sintasi, una serie di canali e trasportatori di membrana e alcune proteine che regolano la dinamica mitocondriale: OPA1 e le mitofusine. Inoltre, viene rappresentato il sistema di organizzazione dei siti di contatto e delle creste mitocondriali (MICOS), si tratta di un complesso multiproteico che regola la biogenesi delle creste. **B.** In questa figura vengono rappresentate le principali funzioni cellulari dei mitocondri. **C.** Il mantenimento dell'omeostasi mitocondriale è fondamentale per la corretta funzionalità di questi organelli. Gli eventi dinamici di fusione e fissione avvengono in risposta a specifiche richieste tissutali e cellulari. **D.** Oltre a formare *network* mitocondriali, i mitocondri possono creare connessioni con altri compartimenti subcellulari, come organelli (RE, lisosomi e perossisomi) e non solo (endosomi, gocce lipidiche, melanosomi ed altre vescicole contenenti proteine ripiegate in modo errato). Rielaborata dall'articolo di Giacomello M et al. [7]

1.3. Scopo dell'elaborato

Il cuore è uno degli organi che più risente dell'atassia di Friedreich; circa il 60% dei pazienti, infatti, sviluppa cardiomiopatia ipertrofica al ventricolo sinistro. Questo è legato al fatto che i mitocondri, gli organelli maggiormente compromessi dalla patologia, occupano il 35% del volume cellulare dei cardiomiociti. Lo sviluppo della cardiomiopatia ipertrofica è sicuramente dato dal danno tissutale ossidativo mediato dall'accumulo di ferro, ma sembra che il trattamento d'elezione per HCM, basato sui β-bloccanti, possa essere dannoso per questa particolare forma, in quanto i pazienti FA-HCM hanno già avuto una forte perdita di fibre contrattili nel miocardio. [1, 2]

Considerando che alterazioni e mutazioni delle proteine di fissione, fusione o mitofagia possono portare allo sviluppo di patologie cardiache, l'articolo di Chidipi B et al., analizzato in questo elaborato, si propone di indagare il *network* e il macchinario di fissione e fusione mitocondriale in cellule cardiache FA-HCM. La dinamica mitocondriale, come precedentemente descritto, ha lo scopo di mantenere funzionali i mitocondri in risposta a determinati stimoli. Uno dei parametri che influenza l'equilibrio tra fissione e fusione mitocondriale sono i livelli di ROS presenti (**Figura 1C**), i quali sono significativamente elevati nei pazienti affetti da FA. [1, 7]

A tale scopo il gruppo di ricerca utilizza western blot, microscopia confocale e citometria a flusso in cardiomiociti umani derivati da cellule staminali ottenute da un paziente FA-HCM e da un individuo sano. Inoltre, crea un modello computazionale stocastico della fissione e fusione mitocondriale che non verrà qui trattato. [1]

2. Materiali e metodi

2.1. Riprogrammazione cellulare e colture hIPSCs

Sono state acquistate da ATCC (ATCC-1026) cellule staminali di controllo, provenienti da un individuo sano; mentre le cellule staminali di paziente, affetto da FA-HCM, sono state ottenute a partire da cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs). Per indurre le PBMCs a diventare cellule staminali pluripotenti (hIPSCs) è stato seguito il protocollo descritto in un altro articolo. [8]

Il protocollo seguito prevede l'isolamento delle PBMCs dal sangue usando BD Vacutainer® CPT™, un sistema che separa PBMCs dal resto del sangue. Sono state poi risospese in 1 mL di terreno di coltura StemPro-34 (Thermo Fisher) insieme a vari supplementi: 100 ng/mL SCF (Peprotech), 100 ng/mL FLT3 (Thermo Fisher), 20 ng/mL IL-3 (Peprotech), e 20 ng/mL IL-6 (Peprotech).

In seguito, le cellule sono state trasdotte con i fattori di Yamanaka usando il kit di riprogrammazione cellulare CytoTune™-iPS 2.0 Sendai (# A16517, Thermo Fisher, MA, USA). Il giorno successivo sono state lavate e seminate in una piastra da 12 pozzetti, rivestiti da Matrigel (Corning), in un mezzo di coltura StemPro-34 (Thermo Fisher), sostituito con terreno fresco a giorni alterni. Il giorno 7 circa metà del mezzo di coltura è stato sostituito con un altro terreno, mTESR plus (STEMCELL Technologies); il giorno dopo il mezzo è stato completamente sostituito con quello nuovo. Successivamente il terreno è stato cambiato a giorni alterni con mezzo di coltura mTESR plus fresco, fino a quando, circa al giorno 15, le colonie di hIPSCs non sono state pronte per essere raccolte manualmente per la purificazione. [8]

Una volta ottenute, le colonie di hIPSCs, sono state coltivate in piastre rivestite da Matrigel (Corning, # 354277, AZ, USA) nel mezzo di coltura precedentemente usato, mTESR plus (# 100–0276, STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada), e nuove subculture sono state ottenute usando EDTA 0,5 mM, chelante cationico che indebolisce i legami cellulari con il Matrigel. Anche in questo caso, il terreno è stato cambiato a giorni alterni, le cellule sono state sempre incubate a 37°C, con una concentrazione relativa di CO2 al 5% e un'umidità relativa dell'85%.

Le espansioni di GAA degli alleli del gene FXN sono poi state validate tramite PCR, con primer fiancheggianti tali ripetizioni, così come descritto da Angulo ed al. [8]. Gli ampliconi di DNA sono stati fatti correre su un gel di agarosio; tramite Image Lab 6.0 (BioRad) ne è stata valutata la lunghezza. Per ottenere il numero di ripetizioni di GAA si sottrae, alla lunghezza dell'amplicone, la lunghezza dei primer e delle sequenze amplificate fiancheggianti le triplette, il tutto si divide per tre. Le ripetizioni delle espansioni rilevate di GAA, nei due rispettivi alleli, delle hIPSCs di paziente sono 834 e 1167; si tratta degli stessi valori rilevati nel paziente.

2.2. Differenziamento in cardiomiociti

Entrambe le linee cellulari hIPSCs, quella affetta da FA-HCM e quella di controllo, sono state differenziate in cardiomiociti usando il kit di differenziamento per cardiomiociti STEMdiff™ (# 05010, STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) secondo le istruzioni del produttore.

Le cellule sono state coltivate su piastre ricoperte da Matrigel, in terreno mTESR plus, fino al raggiungimento di una confluenza circa del 95%; il mezzo di coltura è stato poi sostituito con STEMdiff™ Cardiomyocyte Differentiation Medium A contenente Matrigel (1:100) per due giorni. Successivamente è stato nuovamente sostituito con STEMdiff™ Cardiomyocyte Differentiation Medium B, per due giorni, e

con STEMdiff™ Cardiomyocyte Differentiation Medium C per quattro giorni. Dopo otto giorni di differenziamento si sono ottenute cellule presentanti una spontanea attività contrattile, una morfologia di cardiomiociti embrionali e marker tipici della tipologia cellulare. Gli autori hanno deciso di non mostrare questi dati nel loro articolo.

Prima di effettuare ulteriori esperimenti, i cardiomiociti ottenuti dalle hIPSCs (hIPSC-CMs) sono stati mantenuti per trenta giorni in un terreno di mantenimento per cardiomiociti STEMdiff™, il quale è stato cambiato con mezzo fresco a giorni alterni. Per effettuare gli esperimenti successivi, le hIPSC-CMs sono state dissociate con il terreno di dissociazione per cardiomiociti STEMdiff™ (# 05025, STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada).

2.3. Western blot

Per quantificare le diverse proteine correlate alla fusione e alla fissione mitocondriale presenti nelle hIPSC-CMs, si inizia isolando le proteine totali dal controllo e dalle FA-HCM. Le cellule sono state dapprima lavate con tampone fosfato salino (PBS) e poi incubate in ghiaccio per 10 min nel tampone di lisi RIPA (# 89900, Thermo Scientifics, CA, USA), nel quale è presente anche un inibitore delle proteasi (# P8340, Sigma Aldrich, MO, USA). Il lisato totale è stato centrifugato a 12000 rpm per 20 min, per poi raccoglierne il surnatante; a questo punto è stata determinata la concentrazione proteica con il saggio BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit; # 23225, Thermofisher, CA, USA). Le proteine totali (10 µg) sono state caricate e separate su gel SDS-PAGE prefabbricati (# 4568095, BioRad, Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Precast Gels, CA, USA), per poi essere trasferite ad una membrana di nitrocellulosa ed essere incubate con anticorpi specifici per tutta la notte a 4°C. Gli anticorpi usati sono rivolti contro le seguenti proteine: MFN1 (1 µg/mL; # NBP1–51841; NOVUS Biotechnologies, CO, USA), MFN2 (1 µg/mL; # ab57602; abcam, MA, USA), FIS1 (1:1000; # PA5–22142, Invitrogen CA, USA), OPA1 (2 µg/mL; # NB110–55290, NOVUS Biotechnologies, CO, USA), DRP1 (1:1000; # D8H5, Cell Signaling, MA, USA), MFF (1:100; # 86668, Cell Signaling, MA, USA), e GAPDH (1:2000; # sc-137179, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Il giorno seguente, dopo il lavaggio, la membrana è stata incubata per un'ora con anticorpi secondari anti-IgG di coniglio o di topo coniugati con fluorofori IRDye rispettivamente 800CW e 680CW (1:2000; # sc-137179, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Infine, le immagini sono state acquisite con LiCOR Odyssey e la quantificazione delle bande proteiche è stata effettuata con il software Imagestudio-LiCOR 2019.

2.4. Isolamento dell'mRNA e PCR quantitativa

Per quantificare l'espressione dei trascritti di interesse, le hIPSC-CMs sono state lisate con il tampone RLT QiaShredder (Qiagen, # 79216, Hilden, Germany) e omogeneizzate con QiaShredder (# 79656, Qiagen, Hilden, Germany). L'RNA è stato estratto usando il Mini Kit RNAeasy (# 74194, Qiagen, Hilden, Germany) e retrotrascritto usando la master mix SuperScript VILO (# 11755050, Thermo Fisher, CA, USA). Il cDNA ottenuto è stato poi amplificato con il sistema StepOnePlus real-time PCR (Applied Biosystems, 4376600, Waltham, MA, United States) usando la master mix Applied Biosystems TaqMan Fast Advanced (# A44360, Thermo Fisher, MA, USA). In questa master mix sono presenti sonde TaqMan (Thermo Fisher, CA, USA) per le sequenze delle seguenti proteine: GAPDH (# Hs02786624_g1), FXN (#

Hs01075496_m1), DRP1 (# Hs01552605_m1), MFN1 (# Hs00250475_m1), e MFN2 (Hs00208382_m1).

Sono stati effettuati dei triplicati tecnici per ogni valore di espressione dei trascritti di interesse; è stato possibile comparare tali valori perché sono stati prima normalizzati con il livello di espressione del trascritto di GAPDH, usando il metodo comparativo Ct, in questo modo i valori di espressione sono relativi. I risultati ottenuti dalle cellule affette da FA-HCM sono stati comparati con quelli ottenuti dal controllo, ottenendo una variazione di espressione dei trascritti relativa; per determinare se questa variazione fosse statisticamente significativa è stato usato GraphPad Prism.

2.5. Immunofluorescenza

Le cellule hIPSC-CMs di controllo e quelle affette da FA-HCM sono state coltivate in una camera confocale da 8 pozzetti (# 80826, ibidi, WI, USA), e poi incubate con Mitotracker™ Red 50 nM per 30 min. Successivamente le cellule sono state lavate prima con il mezzo di coltura FluoroBrite DMEM (Dulbecco's modified Eagle's cell culture medium) (# 119955, Gibco, MD, USA) e poi con PBS. Le cellule sono state fissate per 10 min a temperatura ambiente con paraformaldeide al 4% (w/v) in PBS. Dopo tre lavaggi con PBS, le cellule sono state permeabilizzate con 0.5% (v/v) Triton-X 100 in PBS a temperatura ambiente per 10 min.

Le hIPSC-CMs sono state incubate per tutta la notte a 4°C con anticorpi monoclonali di coniglio anti DRP1 (1:1000; # D8H5; Cell Signaling, MA, USA) e anti OPA1 (2 µg/mL; # NB110–55290, NOVUS Biotechnologies, CO, USA). Gli anticorpi primari sono stati rimossi tramite tre lavaggi di 5 min con PBS-T, i campioni sono poi stati incubati con anticorpi secondari d'asino anti-IgG di coniglio coniugati con Alexa-488 (1:10,000; # A-21206, Life Technologies, CA, USA) in ghiaccio per 1 ora in PBS-T. Le cellule sono anche state marcate per l'α-actinina, usata come marcatore per l'avvenuto differenziamento dei cardiomiociti, come mostrato nei risultati dello studio. I vetrini coprioggetto sono stati montati usando il mezzo di montaggio VECTASHIELD® antifade (# H1000, Maravai Life Sciences, CA, USA). Le immagini sono state acquisite al microscopio confocale (Leica-SP8, Germany) usando un obiettivo a immersione in olio 63x. La colocalizzazione fra MitoTracker™ Red e DRP1, oppure fra MitoTracker™ Red e OPA1, è stata quantificata con il coefficiente di Pearson, usando per le analisi il plug-in Coloc 2 del software Fiji versione (2.1.0/1.53c) di ImageJ (NIH, USA).

2.6. *Footprint* mitocondriale

Per poter osservare il *footprint* mitocondriale, le cellule hIPSC-CMs di controllo e quelle affette da FA-HCM sono state coltivate in una camera confocale da 8 pozzetti (# 80826, ibidi, USA), e poi incubate con Mitotracker™ green 50 nM (# M7514, Invitrogen, MA, USA) per 30 min.

Per acquisire le immagini è stato usato un microscopio confocale a scansione laser (Leica-SP8, Germany) con obiettivo a immersione in olio 63x; le impostazioni del laser e della camera sono rimaste le stesse sia per il controllo sia per le cellule FA-HCM.

Il network mitocondriale è stato quantificato usando il plug-in Mitochondrial Network Analysis (MiNA) del software Fiji versione (2.1.0/1.53c) di ImageJ (NIH, USA).

2.7. Potenziale di membrana mitocondriale ΔΨm

Per misurare il potenziale di membrana mitocondriale (ΔΨm) è stata utilizzata la sonda fluorescente perclorato di tetrametilrodamina metil estere (TMRM). Le hIPSC-CMs controllo e FA-HCM sono state coltivate in una camera confocale da otto pozzetti (# 155409, LAB-TEK, DK, Denmark), per poi essere incubate per 30 min a 37°C con TMRM (30 nmol/L) (# I34361, Invitrogen, MA, USA) nel mezzo di coltura. Le cellule sono state successivamente lavate con il terreno FluoroBrite DMEM (# 119955, Gibco, MD, USA) preparato sul momento, a cui è stato aggiunto 10% di FBS (# 26140095, Gibco, MD, USA). Le acquisizioni delle immagini sono state effettuate ogni 2 min a 37°C. Per i primi 10 min si acquisisce il valore basale del potenziale di membrana mitocondriale, poi si aggiunge carbonil cianuro 4-(trifluorometil) fenilidrazone (FCCP, 10 µmol/L) (# C2920, Sigma-Aldrich, MA, USA) sia alle hIPSC_CMs di controllo, sia a quelle affette da FA-HCM. Si acquisisce la fluorescenza per altri 10 min ed infine, i segnali vengono analizzati con il software ImageJ (NIH, USA).

2.8. Citometria a flusso: quantificazione ROS

Per misurare i livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS) è stato usato il kit CellROX™ Green Flow Cytometry Assay (# C10492, Invitrogen, MA, USA). Le cellule sono state distaccate e risospese nel terreno di coltura con una concentrazione cellulare di circa 5×10^5 cell/mL.

I campioni sono stati marcati con CellROX Green a una concentrazione di 500 nM e incubati a 37°C per 30 min. Per marcare le cellule morte è stato usato il colorante SYTOX Red Dead Cell stain (# S34859, Thermo Fisher, MA, USA) a una concentrazione di 5 µM. Dopo aver marcato le cellule, queste sono state analizzate mediante un citofluorimetro BD LSRII, mentre l'analisi dati è stata eseguita usando il software FlowJo.

2.9. Statistica

I dati sono presentati come valore ± errore standard relativo.

Per le analisi statistiche sono stati usati t-test per due campioni indipendenti.

3. Risultati

3.1. Footprint mitocondriale

Per indagare il *network* mitocondriale e valutarne l'integrità in hIPSC-CMs affette da FA-HCM e nel controllo, è stata utilizzata la sonda fluorescente Mitotracker™ green, la cui marcatura ai mitocondri avviene grazie alla presenza di una porzione leggermente reattiva ai gruppi tiolo, come indicato nella scheda tecnica del prodotto. Le immagini sono state poi acquisite al microscopio confocale; nel pannello superiore della **Figura 2A** in verde si può osservare il *network* mitocondriale di un cardiomiocita di controllo, mentre nel pannello inferiore il *network* mitocondriale di un cardiomiocita FA-HCM. Il *footprint* mitocondriale rappresenta l'area totale della cellula che esprime il marcatore mitocondriale, ovvero l'area marcata dalla sonda Mitotracker™ green. Per quantificarlo è stato usato il plugin MiNA del software Fiji (**Figura 2B**): è risultato che il *footprint* mitocondriale è significativamente maggiore nelle hIPSCs di paziente rispetto al controllo. Questo risultato suggerisce che i mitocondri FA-HCM siano iperfusi, a causa di un'alterazione tra fissione e fusione mitocondriale in cardiomiociti FA-HCM. Per verificare ulteriormente questa ipotesi sono state analizzate le proteine coinvolte in questi due processi di dinamica mitocondriale tramite western blot.

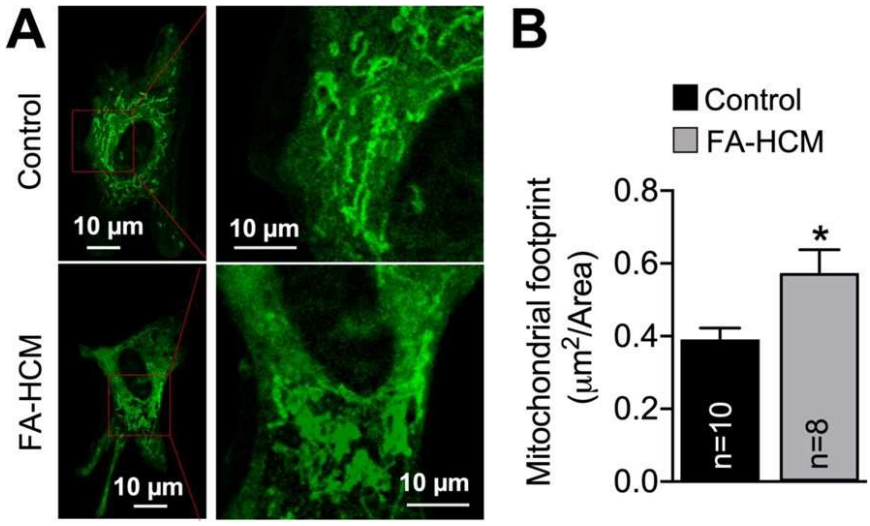

Figura 2. A. Immagini rappresentative della marcatura con Mitotracker™ green in hIPSC-CMs di controllo (pannello superiore) e affette da FA-HCM (pannello inferiore). **B.** Dalla quantificazione del *footprint* mitocondriale, questo è risultato essere significativamente maggiore nelle cellule FA-HCM rispetto al controllo, secondo il *t*-test per due campioni indipendenti con *p-value* minore della soglia di significatività (= 0,05). Tratta da [1]

3.2. Espressione dei trascritti e delle proteine di fusione e fissione mitocondriale

La quantificazione delle proteine di fusione e di fissione mitocondriale è stata eseguita tramite western blot sulle proteine totali isolate da hIPSC-CMs di controllo e affette da FA-HCM. L'unica proteina con un'alterazione significativa fra controllo e paziente è DRP1 (**Figura 3A**), la quale si trova diminuita nelle cellule FA-HCM. Le altre proteine, MFN1, MFN2, MFF e FIS1, non presentano nessun cambiamento nei livelli di espressione proteica (**Figura 3B-E**).

La proteina OPA1 sembra avere una tendenza ad aumentare nelle cellule di paziente, che però non è statisticamente significativa (Figura 3F). Infatti, il *p-value* (=0,09) è di poco superiore alla soglia di significatività (=0,05).

Tramite PCR quantitativa è stata valutata la presenza di cambiamenti nell'espressione di mRNA codificanti per queste proteine. L'articolo riporta solo i dati per l'mRNA di DRP1, in quanto questa è l'unica proteina che presenta una variazione, rispetto al controllo, statisticamente significativa. Non sono state rilevate differenze di espressione, infatti dopo la normalizzazione con il trascritto di GAPDH, l'espressione di mRNA *DRP1* in FA-HCM è pari a 1,09 ± 0,06, mentre nel controllo è 1,04 ± 0,08.

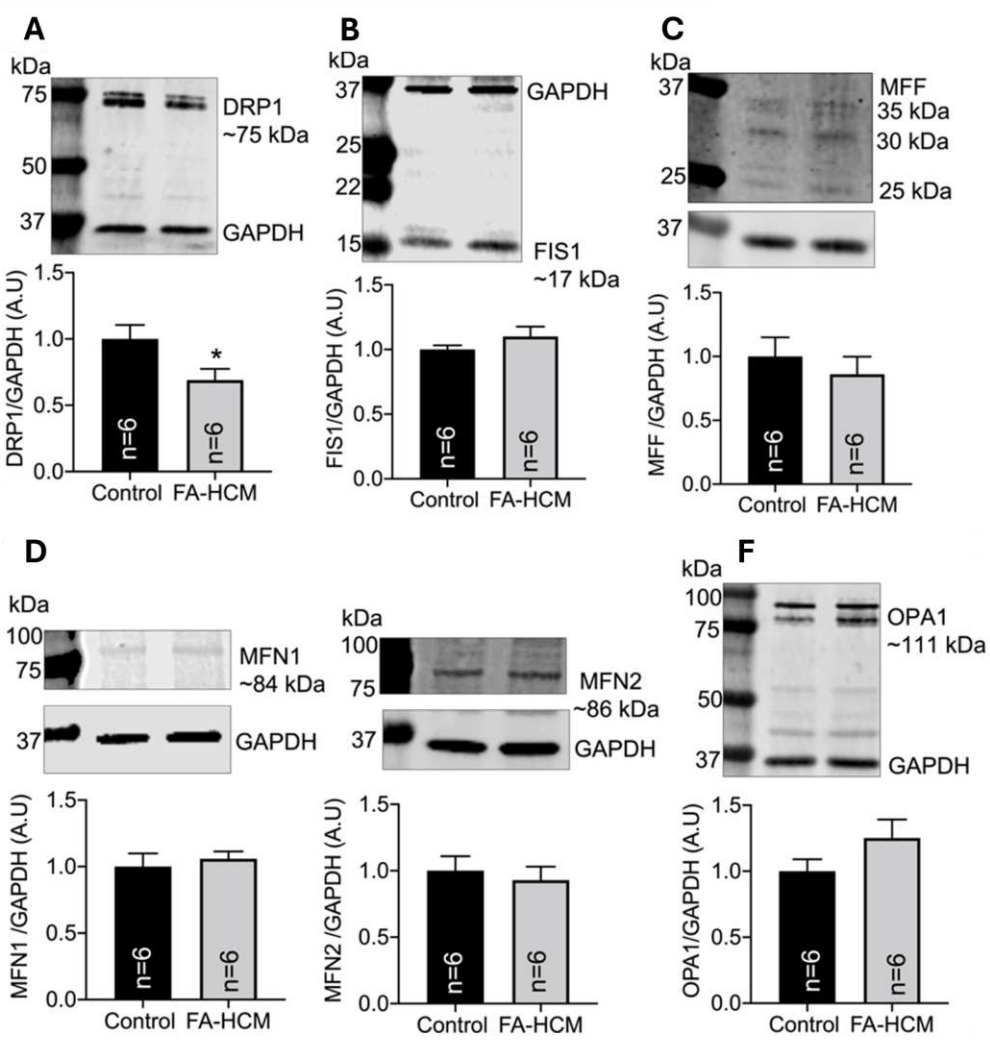

Figura 3. Per ogni proteina di fissione e fusione mitocondriale è presente l'immagine della membrana con la banda della proteina relativa, quella di GAPDH e il marcatore di pesi molecolari. Sotto vi è la quantificazione, già normalizzata per i livelli di GAPDH, della proteina relativa. **A.** DRP1: i suoi livelli sono significativamente diminuiti nelle cellule affette da FA-HCM secondo il *t*-test per due campioni indipendenti con *p-value* minore della soglia di significatività (= 0,05). Non sono invece state riscontrate differenze significative rispetto al controllo **B.** in FIS1 (*p-value*=0,25), **C.** in MFF (*p-value*=0,50), **D.** in MFN1 (*p-value*=0,60), **E.** in MFN2 (*p-value*=0,64). **F.** Anche in OPA1 le differenze non sono statisticamente significative seppur il valore del *p-value*=0,09 è molto vicino alla soglia di significatività (0,05). Rielaborata da [1]

3.3. Analisi di colocalizzazione proteina-mitocondrio

Per confermare ulteriormente i risultati già ottenuti tramite western blot è stata eseguita un'immunofluorescenza osservando la colocalizzazione delle proteine mitocondriali DRP1 e OPA1 con il mitocondrio.

Dal microscopio confocale si ottengono immagini sia per i cardiomiociti FA-HCM, sia per quelli di controllo con colorazioni differenti, le quali evidenziano strutture o proteine differenti, e che vengono anche sovrapposte in un'immagine composta (**Figura 4A**). È stato rilevato in blu il segnale della marcatura per l'α-actinina, proteina usata come marcatore di differenziamento cardiomiocitario. In rosso è evidenziato il *network* mitocondriale, mentre nel canale del verde si evidenzia DRP1.

La fluorescenza data da DRP1 è visibilmente minore nelle cellule di paziente rispetto al controllo, in accordo con i risultati finora ottenuti. Per misurare la colocalizzazione fra DRP1 e i mitocondri è stato calcolato il coefficiente di Pearson, da cui si evince che la colocalizzazione è significativamente diminuita nelle hIPSC-CMs affette da FA-HCM rispetto al controllo (**Figura 4B**).

Come descritto nella sezione relativa a materiali e metodi dell'articolo analizzato, anche OPA1 è stata marcata in verde per mezzo di anticorpi secondari in parallelo rispetto a DRP1; dunque, alcune cellule sono state marcate per OPA1 ed altre per DRP1. I dati per OPA1 non sono riportati.

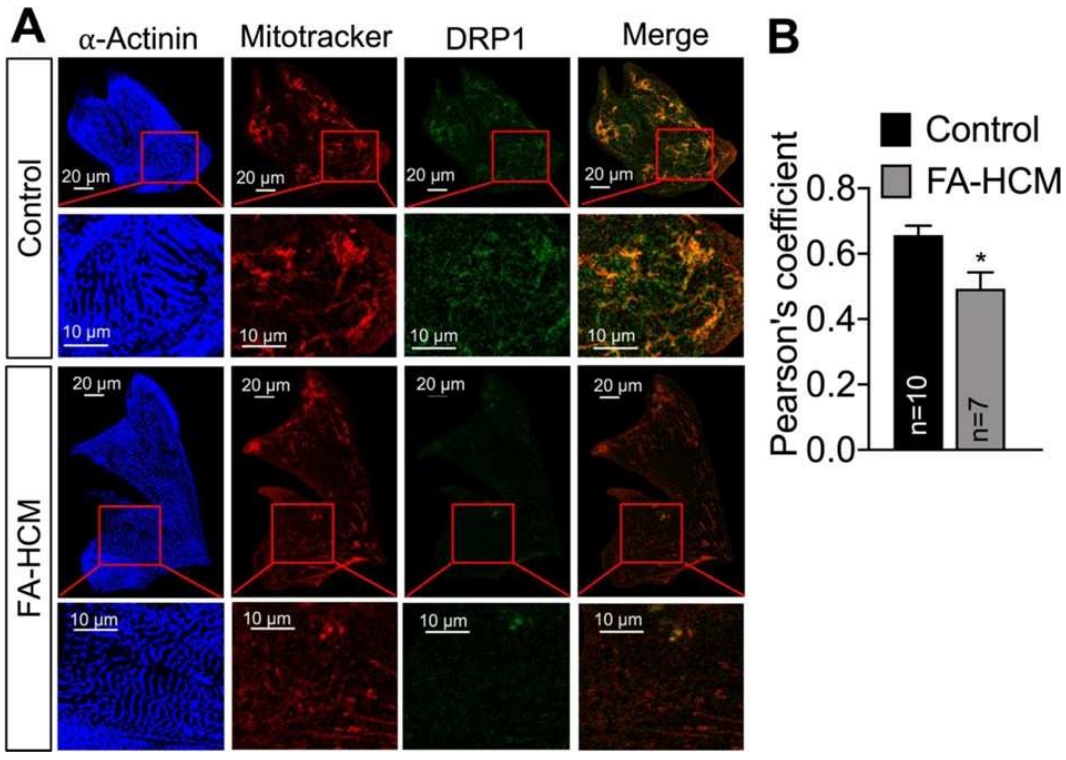

Figura 4. **A.** Immagini rappresentative della colocalizzazione nelle hIPSC-CMs affette da FA-HCM e nel controllo tramite immunofluorescenza di DRP1 con i mitocondri. **B.** Dall'analisi quantitativa si evince che DRP1 presenta livelli di colocalizzazione mitocondriale significativamente ridotti nei cardiomiociti malati, rispetto ai sani, secondo il *t*-test per due campioni indipendenti con *p-value* minore della soglia di significatività (= 0,05). Tratta da [1]

3.4. Potenziale di membrana mitocondriale ΔΨm

Un importante parametro per determinare la funzionalità e l'integrità del mitocondrio è il potenziale di membrana mitocondriale (ΔΨm); per misurarlo è stata usata la sonda fluorescente TMRM. Questa sonda è permeabile alle membrane cellulari e si accumula nei mitocondri funzionali producendo un segnale luminoso. Con la perdita di ΔΨm TMRM smette di accumularsi e si ha una diminuzione di intensità o una perdita del segnale luminoso.

I cardiomiociti FA-HCM e di controllo, dopo l'incubazione con la sonda TMRM sono stati visualizzati al microscopio confocale, dove le immagini sono state acquisite ogni 2 minuti per un periodo complessivo di 10 minuti (**Figura 5A**). Successivamente è stato aggiunto FCCP, una molecola che dissipa il gradiente protonico della membrana mitocondriale interna, facendo collassare il ΔΨm. Anche dopo l'aggiunta di FCCP, il valore del ΔΨm, rilevato tramite la sonda TMRM, è stato acquisito ogni 2 minuti per ulteriori 10 minuti. Nel pannello superiore della **Figura 5B** è presente un grafico del ΔΨm in funzione del tempo; mentre nel pannello inferiore è presente l'intensità media del ΔΨm pre- e post-trattamento con FCCP. È stato rilevato che il ΔΨm basale, ovvero il potenziale pre-trattamento con FCCP, in hIPSC-CMs FA-HCM è significativamente minore che nel controllo.

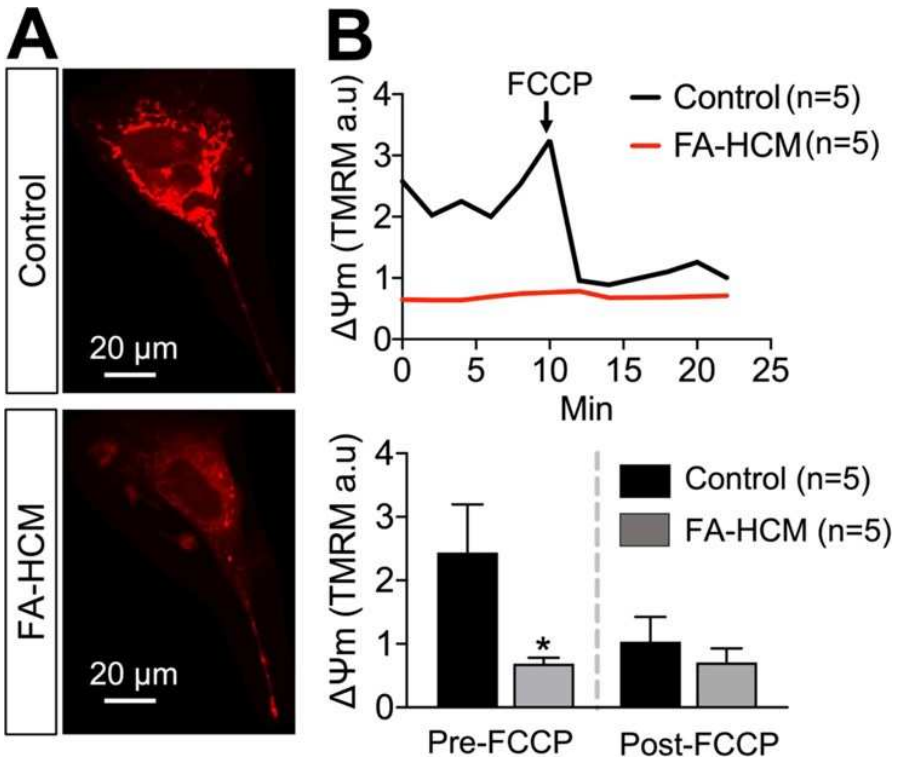

Figura 5. A. Immagini rappresentative del potenziale di membrana mitocondriale (ΔΨm), rilevabile nel canale del rosso grazie alla sonda TMRM, nelle hIPSC-CMs affette da FA-HCM e nel controllo. **B.** Nel pannello superiore è visibile un grafico del ΔΨm dei cardiomiociti in esame in funzione del tempo, si evidenzia in particolare il momento in cui è stato aggiunto FCCP. Nel pannello inferiore è presente un grafico con l'intensità media del ΔΨm delle cellule FA-HCM e del controllo pre- e post- trattamento con FCCP: i cardiomiociti FA-HCM presentano un ΔΨm basale significativamente minore di quello dei cardiomiociti di controllo, secondo il *t*-test per due campioni indipendenti con *p-value* minore della soglia di significatività (= 0,05). Tratta da [1]

3.5. Citometria a flusso: quantificazione ROS

La citometria a flusso è stata utilizzata per misurare i livelli di ROS cellulari, i quali sono stati rilevati tramite la sonda fluorescente CellROX Green. Confrontando la percentuale di cellule di controllo altamente fluorescenti, quindi che presentano un elevato livello di ROS, con quella di cellule affette da FA-HCM è chiaro che la percentuale di quest'ultime è significativamente maggiore (**Figura 6**).

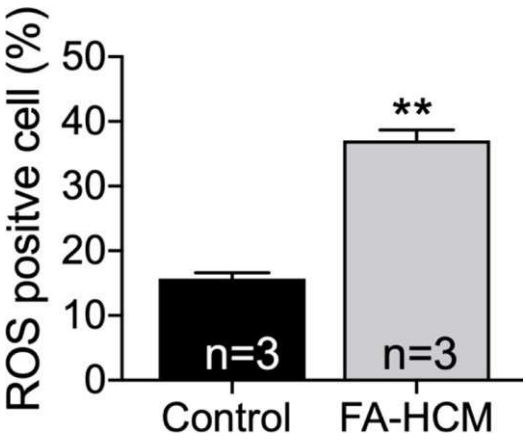

Figura 6. È presente un grafico rappresentante la percentuale di hIPSC-CMs ROS positivi di controllo e affetti da FA-HCM. La percentuale di cellule ROS positive FA-HCM è significativamente maggiore rispetto a quella del controllo, secondo il *t*-test per due campioni indipendenti con *p-value* minore della soglia di significatività (= 0,01). Tratta da [1]

4. Discussione e conclusioni

Lo scopo dello studio analizzato in questo elaborato di tesi è di indagare l'anatomia mitocondriale di cardiomiociti derivati da hIPSCs di paziente affetto da atassia di Friedreich e cardiomiopatia ipertrofica. Dagli esperimenti condotti dal gruppo di ricerca di Chidipi et al. si evince che i mitocondri di hIPSC-CMs, ottenuti da PBMCs di paziente con FA-HCM, presentano elevati livelli di ROS e un basso potenziale di membrana rispetto alle stesse cellule di un controllo sano, così come già descritto precedentemente in letteratura [2, 5].

4.1. Disequilibrio della dinamica mitocondriale e regolazione di DRP1

Per quanto riguarda il *network* mitocondriale, dalle analisi del *footprint* mitocondriale è evidente che ci sia un disequilibrio nei cardiomiociti FA-HCM tra fissione e fusione mitocondriale a favore di quest'ultima. A conferma di ciò, i risultati del western blot indicano che i livelli di DRP1, la proteina principalmente implicata nel processo di fissione, sono diminuiti in cardiomiociti FA-HCM rispetto al controllo; anche se non variano i livelli di espressione del trascritto. Mentre non varia significativamente l'espressione dei trascritti e delle altre proteine FIS1, MFF, MFN1, MFN2 e OPA1, coinvolte nel processo di fissione e fusione mitocondriale. Un'altra evidenza della diminuzione della fissione mitocondriale è data dall'analisi di colocalizzazione di DRP1 con i mitocondri, la quale risulta significativamente minore nelle cellule malate rispetto al controllo.

Dal momento che i livelli di trascritto di mRNA *DRP1* non sono diminuiti nelle hIPSC-CMs FA-HCM, ma lo sono solo i livelli proteici, è molto probabile, secondo gli autori, che la regolazione venga effettuata sull'emivita della proteina. Potrebbe essere ragionevole pensare, inoltre, che sia una specifica modifica post traduzionale, l'ubiquitinazione, a regolare l'emivita di DRP1, indirizzandola al proteasoma. Ciò, oltre a spiegare il diminuito livello di proteina, ma non di trascritto, spiegherebbe anche la sua diminuita colocalizzazione mitocondriale, in quanto il proteasoma si trova nel citosol.

Il complesso ubiquitina ligasi APC/C è uno dei complessi che può ubiquitinare la proteina DRP1, permettendone la degradazione da parte del proteasoma. L'azione di APC/C permette in questo modo di cambiare la dinamica mitocondriale, riducendo il processo di fissione, nel momento in cui la cellula esce dalla mitosi. Un'altra ubiquitina ligasi, denominata MARCH5, diminuisce la fissione mitocondriale e ha come substrati, oltre a DRP1, anche FIS1 e MFN1 [7].

L'ipotesi meriterebbe di essere verificata attraverso ulteriori analisi sulle modifiche post traduzionali di DRP1, ma anche sull'attività delle ubiquitine ligasi coinvolte e su altri enzimi responsabili di altre modifiche post traduzionali di DRP1, in modo da verificare che non siano queste ad avere un ruolo sulla diminuzione di DRP1.

4.2. OPA1 limiti della significatività statistica e prospettive future

Appare opportuno notare che, secondo l'articolo, gli autori hanno fatto studi di immunofluorescenza per analizzare la colocalizzazione di OPA1 con i mitocondri, ma hanno deciso di non ripotarne i risultati. Sebbene l'aumento di OPA1 in cardiomiociti FA-HCM non fosse significativo, è tendente ad esserlo, infatti, il *p-value* (=0,09) ha un valore molto vicino alla soglia di significatività (=0,05).

Dal momento che il cambiamento dei livelli proteici di OPA1 è tendente alla significatività il limite dell'esperimento potrebbe essere dato dall'utilizzo di cellule ottenute da un solo paziente e un solo controllo. L'utilizzo di cellule provenienti da

diversi individui affetti da FA-HCM avrebbe potuto rendere più solido il risultato statistico.

Proprio perché OPA1 non è implicata solo nel processo di fusione mitocondriale, sarebbe interessante in futuro poter effettuare studi analoghi anche sulla dinamica delle creste mitocondriali e sulle proteine coinvolte, sempre in hIPSC-CMs affette da FA-HCM.

In conclusione, la ricerca evidenzia come l'atassia di Friedreich in cardiomiociti derivati da hIPSC di paziente affetto anche da cardiomiopatia ipertrofica causi un disequilibrio nella dinamica mitocondriale. Rimane da dimostrare con ulteriori esperimenti se i cambiamenti nell'anatomia e nella funzionalità mitocondriale cardiaca avvengono direttamente tramite una via di segnale che porta in prima istanza alla riduzione di DRP1. Nuovi studi potrebbero indagare meglio anche se viene regolata OPA1 in questo possibile pathway, utilizzando diversi individui di partenza per avere una solida significatività statistica. In ultimo, conoscere il pathway che regola direttamente la fusione e la fissione mitocondriale in queste cellule permette di esplorare nuove strategie terapeutiche per la cardiomiopatia ipertrofica in pazienti FA nel tentativo di ristabilire un equilibrio tra fissione e fusione mitocondriale.

Bibliografia

1. Chidipi B, Angulo MB, Shah SI, Rieser M, Ullah G, McDonald TV, Noujaim SF (2022). The Dynamin Related Protein 1 is Decreased and the Mitochondrial Network is Altered in Friedreich's Ataxia Cardiomyopathy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 143:106137. doi:10.1016/j.biocel.2021.106137

2. Cook A, Giunti P (2017). Friedreich's ataxia: clinical features, pathogenesis and management. *British Medical Bulletin* 124:19-30. doi:10.1093/bmb/ldx034

3. Hanson E, Sheldon M, Pacheco B, Alkubeysi M, Raizada V (2019). Heart disease in Friedreich's ataxia. *World Journal of Cardiology* 11(1): 1-12. doi:10.4330/wjc.v11.i1.1

4.Delatycki MB, Bidichandani SI (2019). Friedreich's ataxia- pathogenesis and implication for therapies. *Neurobiology of Diseade* 132:104606. doi:10.1016/j.nbd.2019.104606

5. Read AD, Bentley RE, Archer SL, Dunham-Snary KJ (2021). Mitochondrial iron-sulfur clusters: Structure, function, and an emerging role in vascular biology. *Redox Biology* 47:102164. doi:10.1016/j.redox.2021.102164

6. Adebayo M, Singh S, Singh AP, Dasgupta S (2021). Mitochondrial fusion and fission: The fine-tune balace for cellular homeostasis. *The FASEB journal* 35(6):e21620. doi:10.1096/fj.202100067R

7. Giacomello M, Pyakurel A, Glytsou C, Scorrano L (2020). The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21(4):204-224. doi:10.1038/s41580-020-0210-7

8. Angulo MB, Yang J, Argenziano MA, Bertalovitz AC, Beidokhti MN, McDonald TV (2021). Generation of a Friedreich's Ataxia patient-derived iPSC line USFi001-A. *Stem Cell Research* 54:102399. doi:10.1016/j.scr.2021.102399

International Journal of Biochemistry and Cell Biology 143 (2022) 106137

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biochemistry and Cell Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biocel

The dynamin-related protein 1 is decreased and the mitochondrial network is altered in Friedreich's ataxia cardiomyopathy

Bojjibabu Chidipi [a,*], Mariana Burgos Angulo [a,b], Syed Islamuddin Shah [c], Michelle Rieser [a], Ganim Ullah [c], Thomas V. McDonald [a,b], Sami F. Noujaim [a]

[a] Department of Molecular Pharmacology and Physiology, Morsani College of Medicine, University of South Florida, Tampa, FL, USA
[b] Department of Medicine (Cardiology), Morsani College of Medicine, University of South Florida, Tampa, FL, USA
[c] Department of Physics, University of South Florida, Tampa, FL, USA

ARTICLE INFO

Keywords:
Friedreich ataxia
Hypertrophic cardiomyopathy
DRP1
Mitochondrial fusion and fission

ABSTRACT

Friedreich ataxia is an autosomal recessive congenital neurodegenerative disease caused by a deficiency in the frataxin protein and is often diagnosed in young adulthood. An expansion of guanine-adenine-adenine repeats in the first intron of the FXN gene leads to decreased frataxin expression. Frataxin plays an essential role in mitochondrial metabolism. Most Friedreich ataxia patients are diagnosed with left ventricular hypertrophic cardiomyopathy, and 60% of patients die with hypertrophic cardiomyopathy. However, the mitochondrial anatomy in Friedreich ataxia hypertrophic cardiomyopathy is still poorly understood. We investigated mitochondrial fission, fusion, and function using biochemical, microscopy, and computational stochastic analysis in human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes from a patient with Friedreich ataxia hypertrophic cardiomyopathy and a healthy individual. We found a significantly higher mitochondrial footprint, decreased mitochondrial fission protein dynamin-related protein, and mitochondrial fission rate over fusion with more giant mitochondrial clusters in human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes from a patient with Friedreich ataxia hypertrophic cardiomyopathy, compared to an unaffected individual. We also found significantly depolarized mitochondrial membrane potential and higher reactive oxygen species levels in Friedreich ataxia human induced pluripotent stem cell cardiomyocytes. Our results show that frataxin's depletion may dampen the mitochondrial fission machinery by reducing dynamin-related protein1. The loss of mitochondrial fission might lead to elevated reactive oxygen species and depolarized mitochondrial membrane potential, which may cause oxidative damage in Friedreich ataxia hypertrophic cardiomyopathy. Further investigations are needed to identify the mechanism of downregulating dynamin-related protein1 due to the frataxin deficiency in Friedreich ataxia hypertrophic cardiomyopathy.

1. Introduction

Friedreich ataxia (FA) is a genetic neurodegenerative disease. According to the Friedreich's Ataxia Research Alliance, FA is most commonly diagnosed in young people between 5 and 18 years of age and affects males and females equally. Sixty percent of patients with FA develop left ventricular hypertrophic cardiomyopathy (FA-HCM). Complications from this cardiomyopathy is the most common cause of death in FA (Harding, 1981; Schulz et al., 2009; Tsou et al., 2011; Weidemann et al., 2012). FA is the most common autosomal recessive form of ataxia, and it is caused by an expansion of the DNA triplet guanine–adenine–adenine (GAA) in the first intron of the Frataxin gene (*FXN)*, located on chromosome 9q13 (Campuzano et al., 1996). GAA repeats generally range from 6 to 27 repetitions in the unaffected population, but in FA patients, GAA repeat expansions range from 44 up to 1700 repeats (Pandolfo, 1999). This high number of GAA repeats decreases the expression of frataxin in FA patients. Frataxin is a 210 amino acid protein ubiquitously expressed in the whole body, with high levels in the heart, spinal cord, liver, pancreas, and muscles (Santos et al., 2010). Frataxin plays a significant role in iron metabolism, iron storage, and iron-sulfur cluster in the mitochondria (Ristow et al., 2000). The decreased expression of Frataxin in FA impairs mitochondrial function

* Correspondence to: Department of Molecular Pharmacology and Physiology, Morsani College of Medicine, University of South Florida, 12901 Bruce B Downs Blvd, Tampa, FL 33612, USA.
E-mail address: chidipib@usf.edu (B. Chidipi).

https://doi.org/10.1016/j.biocel.2021.106137
Received 16 August 2021; Received in revised form 8 December 2021; Accepted 14 December 2021
Available online 16 December 2021
1357-2725/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

by increasing the iron-sulfur cluster, affecting heme biosynthesis and ultimately leading to increased oxidative stress (Bulteau et al., 2004; Mielcarek et al., 2015).

Mitochondria represent approximately one-third of the mass of the heart (35% of the volume of adult cardiomyocytes) and play a critical role in maintaining cellular function. A healthy mitochondrial population is essential for cell survival. Mitochondrial quality control is accomplished by an active interplay between mitochondrial fusion, fission, mitophagy, and biogenesis events (Carreira et al., 2011). Fusion is a dynamic process in which two healthy individual mitochondria fuse and form a new elongated mitochondrion that can produce enough ATP to sustain physiological function (Chen et al., 2003). Fission eliminates the damaged part of a mitochondrion by mitophagy, and the remaining undamaged part forms a new healthy organelle through the process of fusion (Labrousse, Zappaterra, Rube, and van der Bliek, 1999; Smirnova, Griparic, Shurland, and van der Bliek, 2001). Mitochondrial fusion is controlled by GTPases such as mitofusins (MFN 1 and MFN 2) located on the outer mitochondrial membrane and optic atrophy 1 (OPA1) located on the inner mitochondrial membrane. Mitochondrial fission is in part mediated by mitochondrial fission factor (MFF) and large GTPase dynamin-related protein (DRP1) (Detmer and Chan, 2007; Lackner and Nunnari, 2009; Scott and Youle, 2010; Smirnova et al., 2001). During fission, DRP1 is recruited from the cytosol to the mitochondrial surface by MFF and other outer mitochondrial membrane proteins such as mitochondrial fission protein 1 (FIS1), and mitochondrial division factors 49 and 51 kDa (MiD49 and MiD51) (Kornfeld et al., 2018; Sánchez-Alvarez, De Francesco, Fiorillo, Sotgia, and Lisanti, 2020; Youle and van der Bliek, 2012). Mitochondrial fission results in fragmentation in order to regulate oxidative metabolism and ATP levels. Maintaining an appropriate balance between fission and fusion events is necessary to preserve a healthy population of mitochondria (Chen et al., 2012, 2011). On the other hand, mitophagy is regulated by the PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1)/Parkin pathway (He et al., 2019).

Alterations or mutations in fission, fusion, or mitophagy proteins can result in cardiac pathology and arrhythmias (Bukowska et al., 2008; Redpath et al., 2013). In this study, we investigated the mitochondrial fusion and fission machinery and mitochondrial networking using western blot, confocal microscopy, and flow cytometry in human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes (hIPSC-CMs) from a patient with Friedreich ataxia hypertrophic cardiomyopathy, and a healthy individual. Additionally, to gain insights into the molecular processes affecting the mitochondrial dynamics in FA-HCM-affected hIPSC-CMs, we performed mitochondrial network quantification using novel image processing and agent-based stochastic modeling.

2. Materials and methods

2.1. Cell reprogramming and hIPSC culture

hIPSCs from FA-affected subjects were derived from peripheral blood mononuclear cells (PBMCS), and control hIPSCs were purchased from ATCC (ATCC-1026). PBMCs were reprogrammed into hIPSCs as previously described (Angulo et al., 2021). Briefly, PBMCs were isolated from whole blood and transduced with the Yamanaka factors using the CytoTune™-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (# A16517, Thermo Fisher, MA, USA). hIPSCs colonies were manually picked for purification. hIPSCs were cultured in Matrigel (Corning, # 354277, AZ, USA) coated plates in mTESR plus medium (# 100–0276, STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) and passaged using EDTA 0.5 mM. Cultured conditions were at 37 °C, 5% CO2, and 85% relative humidity. The medium was changed every other day. The FA-associated pathogenic GAA trinucleotide repeats were validated by PCR of the first intron as described (Angulo et al., 2021). The GAA repeat expansion in the hIPSCs line was consistent with those detected from the subject (1167 and 834 repeats).

2.2. Cardiomyocyte differentiation

FA-HCM-affected hIPSCs and controls were differentiated into cardiomyocytes (hIPSC-CMs) using STEMdiff™ Cardiomyocyte Differentiation Kit (# 05010, STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) according to the manufacturer's instructions. hIPSCs were seeded on Matrigel coated plates with mTESR plus medium and cultured until they were ~ 95% confluent. Then, the medium was changed to STEMdiff™ Cardiomyocyte Differentiation Medium A containing matrigel (1:100) for two days, followed by STEMdiff™ Cardiomyocyte Differentiation Medium B for two days, and STEMdiff™ Cardiomyocyte Differentiation Medium C for four days. hIPSC-CM were maintained in STEMdiff™ Cardiomyocyte Maintenance Medium, which was changed every other day. After eight days of differentiation, beating cells with embryonic cardiomyocyte morphology and expression of cardiomyocyte markers were observed in the wells (data not shown). hIPSC-CM were maintained in STEMdiff™ Cardiomyocyte Maintenance Medium for 30 days before further experiments were performed. This media was changed every other day. For downstream experiments, hIPSC-CM were dissociated with cardiomyocyte dissociation media (# 05025, STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada).

2.3. Western blotting

Total protein was isolated from control and FA hIPSC-CM, cells were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) and incubated on ice for 10 min in RIPA lysis buffer (# 89900, Thermo Scientifics, CA, USA) containing protease inhibitor (# P8340, Sigma Aldrich, MO, USA). The total lysate was centrifuged at 12000 rpm for 20 min, and the supernatant was collected.

Protein concentrations were determined by BCA assay (Pierce™ BCA Protein Assay Kit; # 23225, Thermofisher, CA, USA). Total protein (10 μg) was loaded and separated by 4–20% premade SDS-PAGE gels (# 4568095, BioRad, Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Precast Gels, CA, USA), then transferred to a nitrocellulose membrane and probed with antibodies against MFN1 (1 μg/ml; # NBP1–51841; NOVUS Biotechnologies, CO, USA), MFN2 (1 μg/ml; # ab57602; abcam, MA, USA), FIS1 (1:1000; # PA5–22142, Invitrogen CA, USA), OPA1 (2 μg/ml; # NB110–55290, NOVUS Biotechnologies, CO, USA), DRP1 (1:1000; # D8H5, Cell Signaling, MA, USA), MFF (1:100; # 86668, Cell Signaling, MA, USA), and GAPDH (1:2000; # sc-137179, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) at 4 °C overnight. After washing, the membrane was incubated with secondary fluorescent IRDye 800 CW and 680 CW goat anti-rabbit and anti-mouse antibodies (1:25,000; LiCOR, Nebraska, NE, USA) for 1 h. The final images were detected with LiCOR Odyssey, and the gray color protein bands were quantified using Imagestudio-LiCOR, software-2019.

2.4. mRNA isolation and qPCR

hIPSC-CMs were lysed with buffer RLT QiaShredder (Qiagen, # 79216, Hilden, Germany) and homogenized with QiaShredder (# 79656, Qiagen, Hilden, Germany). RNA was extracted using the RNAeasy Mini Kit (# 74194, Qiagen, Hilden, Germany) and reverse transcribed using the SuperScript VILO master mix (# 11755050, Thermo Fisher, CA, USA). The cDNA was amplified in the StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems, 4376600, Waltham, MA, United States)) with Applied Biosystems TaqMan Fast Advanced Master Mix (# A44360, Thermo Fisher, MA, USA). GAPDH expression was used to normalize the data and to obtain relative expression values with the comparative Ct method. The results are expressed as the fold-change compared to control in triplicates. GraphPad Prism was used for statistical analysis. The following TaqMan Assay probes (Thermo Fisher, CA, USA).) were used: GAPDH (# Hs02786624_g1), *FXN* (# Hs01075496_m1), *DRP1* (# Hs01552605_m1), *MFN1* (# Hs00250475_m1), and *MFN2* (Hs00208382_m1).

2.5. Confocal microscopy

Control and FA-HCM-affected hIPSC-CM cells were cultured in an eight well confocal chamber (# 80826, ibidi, WI, USA), and then incubated with Mitotracker™ green (50 nM, # M7514, Invitrogen, MA, USA) for 30 min and washed with FluoroBrite Dulbecco's modified Eagle's cell culture medium (# 119955, Gibco, MD, USA). Cells were then washed with PBS once and fixed with 4% (*w/v)* paraformaldehyde in PBS for 10 min at room temperature. After three washes with PBS, cells were permeabilized with 0.5% (*v/v)* Triton-X 100 in PBS for 10 min at room temperature. The antibodies used were: Rabbit monoclonal anti DRP1 antibody (1:1000; # D8H5; Cell Signaling, MA, USA), Rabbit monoclonal anti OPA1 antibody (2 μg/ml; # NB110–55290, NOVUS Biotechnologies, CO, USA). The primary antibody was removed by washing 3 times for 5 min with PBS-T. The preparations were then incubated with donkey anti-rabbit Alexa-488 conjugated antibody (1:10,000; # A-21206, Life Technologies, CA, USA) on ice for 1 h in PBS-T. The coverslips were then mounted using VECTASHIELD® antifade mounting media (# H1000, Maravai Life Sciences, CA, USA) and imaged on a confocal microscope (Leica-SP8, Germany) using a 63x oil objective. Immunolocalization was quantified between MitoTracker™ Red and DRP1 or OPA1 by analyzing Pearson's coefficients using the Coloc 2 plugin Fiji version (2.1.0/1.53c) of ImageJ (NIH, USA) software (*https://fiji.sc/*) (Dunn et al., 2011; González-Domínguez et al., 2019).

2.6. Mitochondrial footprint

Control and FA-HCM-affected hIPSC-CMs were cultured in an eight confocal chamber slide (# 80826, ibidi, USA). We incubated cells with Mitotracker™ green (50 nM, # M7514, Invitrogen, MA, USA) for 30 min. We washed cells with freshly prepared FluoroBrite Dulbecco's modified Eagle's cell culture medium (# 119955, Gibco, MD, USA) supplemented with 10% FBS (# 26140095, Gibco, MD, USA). Cells were then washed with PBS once and fixed with 4% (*w/v*) paraformaldehyde in PBS for 10 min at room temperature. After three washes with PBS, cells were permeabilized with 0.5% (*v/v*) Triton-X 100 in PBS for 10 min at room temperature. A laser-scanning confocal microscope (Leica-SP8, Germany) with a 63x oil objective was for imaging. Identical laser and camera settings were used for FA and control cells. The mitochondrial network footprint was quantified using the Mitochondrial Network Analysis (MiNA) plug-in in Fiji version (2.1.0/1.53c) of ImageJ (NIH, USA) software (*https://fiji.sc/*) (Machiraju et al., 2019; Valente et al., 2017).

2.7. Mitochondrial membrane potential (ΔΨm)

We measured the mitochondrial membrane potential (ΔΨm) (Zorova et al., 2018) using tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) dye (Chalmers and McCarron, 2008; Perry et al., 2011; Scaduto and Grotyohann, 1999). Control and FA-HCM hIPSC-CMs were cultured in an eight well confocal chamber (# 155409, LAB-TEK, DK, Denmark), and cells were incubated with TMRM (30 nmol/L) (# I34361, Invitrogen, MA, USA) for 30 min in a culture medium at 37 °C and washed with freshly prepared FluoroBrite Dulbecco's modified Eagle's cell culture medium (# 119955, Gibco, MD, USA) supplemented with 10% FBS (# 26140095, Gibco, MD, USA). The images were acquired at 37 °C every 2 min. After 10 min of baseline recording, carbonyl cyanide 4–(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) (10 μmol/L) (# C2920, Sigma-Aldrich, MA, USA) was added to both control and FA-HCM-affected hIPSC-CMs, and fluorescence was recorded for 10 more minutes. Analysis of the signals was performed with the ImageJ (NIH, USA) software (*https://fiji.sc/*).

2.8. Reactive oxygen species (ROS) flow cytometry

ROS was measured using CellROX™ Green Flow Cytometry Assay Kit (# C10492, Invitrogen, MA, USA). Cells were lifted and resuspended in cell culture medium at $\sim 5 \times 10^5$ cell/ml. Samples were labeled with 500 nM CellROX Green and incubated at 37° for 30 min. For dead cells labeling, 5 μM SYTOX Red Dead Cell stain (# S34859, Thermo Fisher, MA, USA) was used. The cells were read on a BD LSRII Cytometer. Data analysis was conducted using FlowJo software.

2.9. Image analysis

Mitochondrial networks are often modeled by graph theoretic techniques by representing each mitochondrion as a node, and edges represent the connection between these mitochondria (nodes). Each node in the network can have zero (isolated mitochondrion), one (two connected mitochondria), two (three mitochondria connected in a linear chain), or three (four mitochondria connected in branched fashion) neighbors (mitochondria), termed as degree (k) of the node. Depending on the pathophysiological state of the cell, a mitochondrial network evolves into different topologies, driven by microscopic fission and fusion processes, ranging from a fully fragmented state (a network comprising of nodes of degree zero or one only) to a network with clusters of varying sizes that are made of loops and branches to a fully connected network of a single cluster. We will refer to the largest cluster in the network as a giant cluster. Thus, in the case of a fully connected network, the size of the giant cluster is the same as the whole network. Depending upon the balance between fission and fusion (driven by the underlying physiological condition), a mitochondrial network may exist as a network of clusters (of varying sizes) or a giant cluster where each small cluster is connected to every other cluster in the network. Topologically, a mitochondrial network in control and FA hIPSC-CM cells can be uniquely distinguished by various microscopic network parameters such as mean degree $< k >$ (sum of degrees of all nodes in the network divided by the total number of edges (N) in the network), size (number of edges) of the giant cluster (N_g), N_g/N, and features like distributions of branch lengths (number of edges in the branch), loop sizes (number of edges in the cyclic loop), and cluster (number of edges in a cluster involving both branches and loops) sizes.

We have used our previously curated pipeline of MATLAB-based tools to extract network parameters from experimental images of mitochondrial networks obtained from hIPSC-CM cells patients with FA-CHM and healthy individuals using the following steps (Chidipi et al., 2021; Shah et al., 2019; Sukhorukov et al., 2012; Zamponi et al., 2018).

Step 1: We use Matlab function *im2bw* to generate a binary image (not shown) from the preprocessed gray scale image (not shown) of the original micrograph (Fig. 6A & B, left panels) by applying an appropriate threshold intensity using Matlab function *graythresh*.

Step 2: A single one-pixel thick skeleton image representing mitochondrial network (Fig. 6A & B, right panels) was generated from the binary image (using *bwmorph* function from Matlab) of step 1. Each pixel (representing a single mitochondrion in Fig. 6A & B, right panels) is colored based on whether it has one (red), two (green), or three (blue) neighbors.

Step3: Skeletonized image from step 2 was converted to an undirected graph to extract network parameters $< k >$, N_g, N_g/N, branch lengths, loop sizes, and cluster sizes (Matlab function *bwlabel*).

2.10. Modeling mitochondrial network

To simulate the mitochondrial network, we used the model described in Sukhorukov et al. (Sukhorukov et al., 2012). A simplistic mitochondrial network consists of two mitochondria (called a dimer) connected by an edge, referred to as X_1. In our simulations, a mitochondrial network grows/disintegrates through two fusion/fission reactions (Fig. 7A) given in Eqs. 1 & 2 below. In the first (tip-to-tip) reaction (Fig. 7A), the tip (one of the red nodes in Fig. 7A) of a dimer, representing a single mitochondrion, fuses with the tip of another dimer to form a linear network of three mitochondria (X_2) with an internal node

(green node in Fig. 7A) of degree 2. Note that the fusion of an X_1 specie with the end-node of an X_2 specie or the fusion of the end-nodes of two X_2 species results in a linear chain of more than three mitochondria with all internal nodes of degree 2. In the second (tip-to-side) reaction (Fig. 7A), the tip of a dimer (X_1) fuses with the internal node (of degree 2) of X_2 to form a branched node X_3 (blue node in Fig. 7A) of degree 3. Note that the tip-to-side reaction can also occur due to the fusion of the end-node of a linear chain with the internal node of X_2 species or another linear chain.

Similarly, the end-node of a chain can react with the other end (tip-to-tip reaction) or the internal nodes (tip-to-side reaction) in the same chain to form cyclic loops. Generally, tip-to-side fusion reaction leads to clusters with loops and branches, whereas tip-to-tip fusion reactions result in linear chains of longer branch lengths. While fusion reactions make bigger clusters, fission reactions (reverse arrows in Eqs. 1 & 2) disintegrate a given network. In the tip-to-tip fission reaction (Fig. 7A and Eq. 1 reverse arrow), and X_2 (mitochondrial network) disintegrates (from one of the nodes of degree 2, shown as green in Fig. 7A) into two X_1 species. Note that tip-to-tip fission reaction in more extensive networks involving linear chains can also result in X_1, X_2, or X_3 species or combinations. In the tip-to-side fission reaction (Fig. 7A and Eq. 2 reverse arrow), and X_3 (mitochondrial network from one of the nodes of degree 3, shown as a blue node in Fig. 7A) disintegrates to form one X_1 and one X_2 specie). Similar to the case of tip-to-tip fission, tip-to-side fission from more extensive networks can also result in either of the X_1, X_2, or X_3 species alone or a combination of any of these types of species. The following two reaction equations can represent all the possible fusion and fission reactions described above and are shown graphically in Fig. 7A.

$$X_1 + X_1 \underset{b_1}{\overset{a_1}{\leftrightarrows}} X_2 \tag{1}$$

$$X_1 + X_2 \underset{b_2}{\overset{a_2}{\leftrightarrows}} X_3 \tag{2}$$

Where a_1 and a_2 are the rates for the tip-to-tip and tip-to-side fusion reactions, b_1 and b_2 are the rates for the respective fission reactions. The analysis of our images and others shows that nodes of degree 4 are extremely rare and therefore are ignored in the model. Network edges connecting nodes define minimal (indivisible) constituents of the organelle. Therefore, all parameters from our simulations are calculated based on the number of edges in the network.

We implemented our mitochondrial network model as an agent-based model using the Gillespie algorithm (Gillespie, 1977; Sukhorukov et al., 2012; Zamponi et al., 2018). Assuming that we want to model a mitochondrial network of size N (generally, N is determined by the size of the mitochondrial network retrieved by experimental micrographs as described in the Image Analysis section), each simulation started with N species of type X_1 (Table 1). The network was allowed to stochastically evolve through a sequence of fusion and fission processes according to their propensities (rates) at a given time step. We ran the algorithm for 10 X N time steps to reach a steady state. We extracted various network features ($< k >$, N_g, branch lengths, etc.) at the end of the simulations using different Graph and Network algorithms in MATLAB's graph toolbox. Results reported here are averaged over 100 such simulations in each case. Depending on the fusion (a_1 & a_2) and fission (b_1 & b_2) rates (Fig. 7A and Eqs. 1 & 2) used, networks of varying properties ranging from the one comprising of linear chains and branched clusters to a single fully connected giant cluster can be generated. To search for a network with properties ($< k >$, N_g, branch length, etc.) observed experimentally, we followed the procedure in (Sukhorukov et al., 2012; Zamponi et al., 2018) and varied the ratio of fusion and fission processes using parameters $C_1 = a_1/b_1$ and $C_2 = a_2/b_2$ by respectively fixing $b_1 = 0.01$ and $b_2 = (3/2)^*b_1$ and allowing a_1 and a_2 to vary. Assuming revised (b_1 and b_2), each value of a_1 and a_2 (and hence C_1 and C_2) generates a single mitochondrial network of a fixed topology (for a limited size N of the initial network). This way, a mitochondrial network with different topologies can be generated for every (C_1, C_2) pair in the (C_1, C_2) phase space. For every set of (C_1, C_2) values, we repeated the simulation 100 times, each time using a different random sequence for the stochastic fusion and fission processes. The network parameters/features averaged over all 100 runs are reported as the final results below. Larger values of C_1 and C_2 indicate more frequent tip-to-tip and tip-to-side fusion reactions, respectively, and vice versa. A minimal value of C_2 (or C_1) results in a network mainly consisting of linear (X_2 and X_1) networks (typical of a fragmented network) with small $< k >$ and N_g/N. The medium value of C_2 leads to a network having clusters with both branches and loops, whereas a large C_2 value results in a network having one giant cluster with large $< k >$ and N_g/N values.

Table 1
Comparison of microscopic parameters of mitochondrial network obtained from experiments (Exp) and theory. C1 (tip-to-tip fusion/fission ratio) and C2 (tip-to-side fusion/fission ratio) were obtained by fitting the model to the data. Notice that there is almost 7.7 times increase in C1 in the case of FA-HCM hIPSC-CMs. compared to control. This large increase in C1 likely indicates that most of the clusters in FA-HCM hIPSC-CMs are of medium size (with large branch lengths and loops sizes as evident in Fig. 6 C & D) with relatively comparable number of large clusters as compared to control cases as is evident in Fig. 6E.

Condition	Mean Degree <k>		Ng/N		C1	C2
	Exp	Theory	Exp	Theory		
Control	1.83	1.84	0.040	0.044	9.0×10^{-3}	5.0×10^{-5}
FA-HCM	1.95	1.94	0.057	0.073	70.0×10^{-3}	3.0×10^{-5}

2.11. Statistics

Data are presented as mean ± standard error of the mean. Unpaired 2-sample *t-test* or one-sample *t*-test were used for statistical analysis.

3. Results

3.1. Mitochondrial footprint in FA-HCM-affected hIPSC-CMs

We assessed mitochondrial network integrity in control and FA-HCM-affected hIPSC-CMs. As shown in Fig. 1 A, upper and lower images are the mitochondrial networks in control and FA-HCM-affected hIPSC-CMs. Fig. 1B is the quantified mitochondrial footprint significantly larger in FA-HCM-affected hIPSC-CMs compared to control

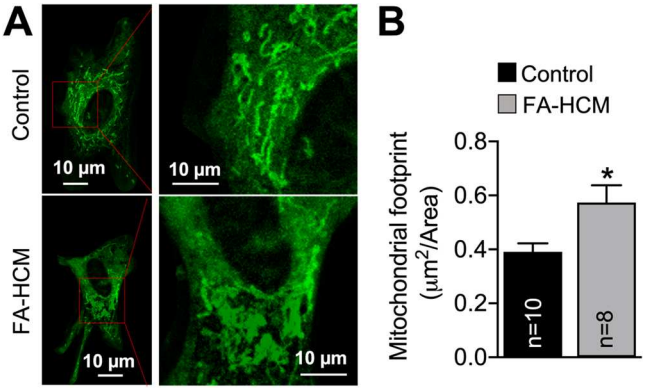

Fig. 1. Visualization and quantification of Mitotracker™ green staining of mitochondria. (A) Representative example of Mitotracker™ green staining in control and FA-HCM-affected hIPSC-CM. (B) Mitochondrial footprint is the total area in the cell expressing the mitochondrial marker. It was significantly higher in FA-HCM-affected hIPSC-CMs when compared to control hIPSC-CMs. (*$p < 0.05$, vs. control; unpaired 2-sample *t*-test).(For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(* $p < 0.05$, t-test). This finding of elevated mitochondrial footprint suggests that the mitochondria are likely over fused due to altered fusion and fission events in FA-HCM-affected hIPSC-CMs. We further evaluated the fusion and fission machinery using western blot.

3.2. Mitochondrial fission protein DRP1 decreased in FA-HCM-affected hIPSC-CMs

In order to quantify fusion and fission proteins, we measured the expression of mitochondrial fusion proteins MFN1, MFN2, and OPA1 and fission proteins MFF, FIS1, and DRP1 in total protein isolated from control and FA-HCM-affected hIPSC-CMs. The mitochondrial fission protein DRP1 was significantly decreased in FA-HCM-affected hIPSC-CMs compared to control (n = 6, $p < 0.05$, t-test). However, there were no changes in OPA1, MFN1, MFN2, and FIS1 proteins expression levels (Fig. 2). We also evaluated the DRP1 mRNA levels, and we found no change in mRNA expression in FA-HCM-affected hIPSC-CMs (1.09 ± 0.06) compared to control hIPSC-CMs (1.04 ± 0.08).

3.3. Analysis of DRP1 colocalization in FA-HCM-affected hIPSC-CMs

We further performed an immunofluorescence study to confirm the lower expression of DRP1 protein using confocal microscopy. Fig. 3A shows FA-HCM-affected hIPSC-CMs co-stained for mitochondria (Mitotracker™ red, red channel), DRP1 (green channel), and alpha-actinin (blue channel). Alpha-actinin was used as a marker for differentiation into cardiomyocytes. Pearson's coefficient was quantified as a measure for colocalization between the DRP1 and the mitochondrial signals. DRP1 fluorescence was visibly less robust in FA-HCM-affected hIPSC-CMs cells than controls, consistent with the western blot results in Fig. 2. In addition, we found significantly decreased colocalization between DRP1 and mitochondria (Fig. 3B) in FA-HCM-affected hIPSC-CMs. It was shown that DRP1 deficiency and reduced mitochondrial localization could result in mitochondrial dysfunction (Twig et al., 2008).

3.4. Depolarization of mitochondrial membrane potential (ΔΨm) in FA-HCM-affected hIPSC-CMs

ΔΨm is a one of the key indicators of mitochondrial health. To determine the ΔΨm in FA-HCM and control hIPSC-CMs, use the TMRM dye. After incubation with TMRM, live cells were imaged in 2 min intervals on a confocal microscope. Fig. 4A shows representative microscopic images from control (upper panel) and FA-HCM-affected hIPSC-CMs (lower panel). Fig. 4B, upper panel is the time-dependent ΔΨm before, and after addition of 10 μM FCCP, a proton uncoupler that collapses the ΔΨm. The lower panel shows the average ΔΨm intensity pre and post treatment with FCCP. The basal level of ΔΨm in FA hIPSC-CM (n = 5) was significantly lower than in control cells (n = 4) ($p < 0.05$, t-test). This is consistent with what was shown that frataxin silencing in SH-SY5Y human neuroblastoma cells depolarizes ΔΨm (Abeti et al.,

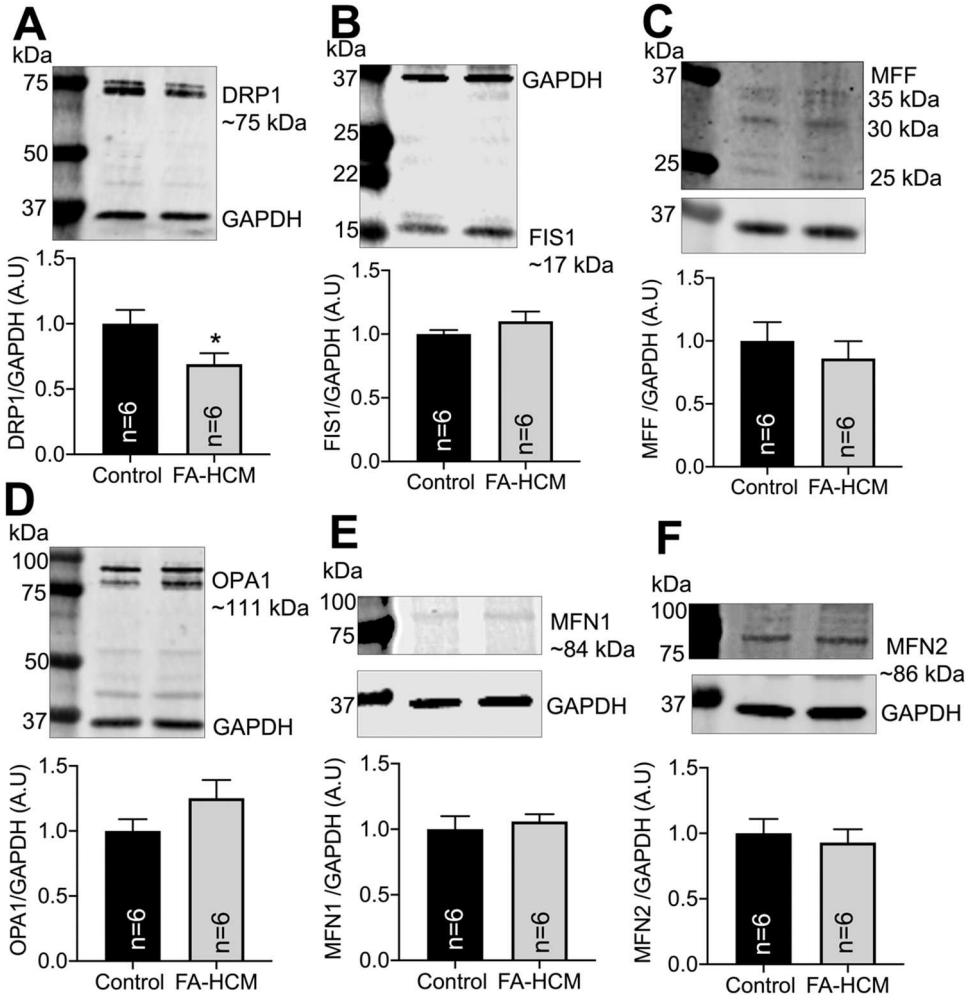

Fig. 2. Mitochondrial fission and fusion protein levels in control and FA-HCM-affected hIPSC-CMs. (A) DRP1 levels were significantly decreased in FA-HCM-affected hIPSC-CMs (*$p < 0.05$, vs. control; unpaired 2-sample *t*-test). There was no change in FIS1 (p = 0.25) (B), MFF (p = 0.50) (C), OPA1 (p = 0.09) (D), MFN1 (p = 0.60) (E) and MFN2 (p = 0.64) (F).

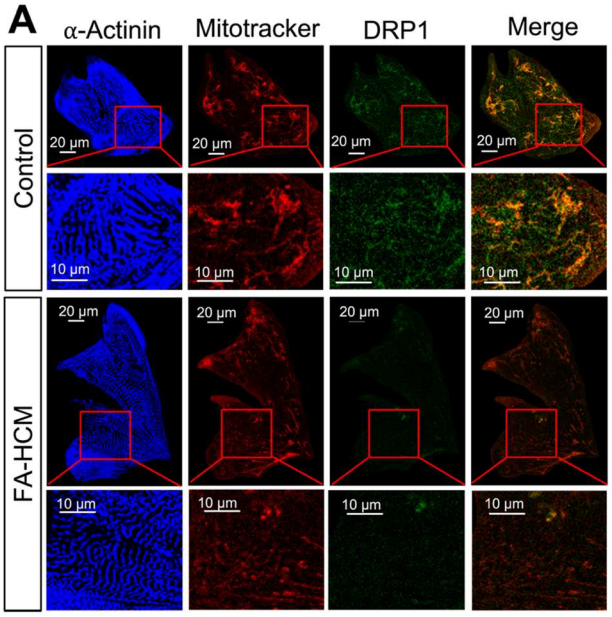

Fig. 3. Immunofluorescence colocalization in control and FA-HCM-affected hIPSC-CMs (A) Representative colocalization images of control and FA-HCM-affected hIPSC-CM. α-Actinin (blue signal), Mitotracker™ (red signal), DRP1 (green signal). (B) DRP1 colocalization levels were significantly decreased in FA-HCM-affected hIPSC-CM (*$p < 0.05$, vs. control; unpaired 2-sample *t*-test).(For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

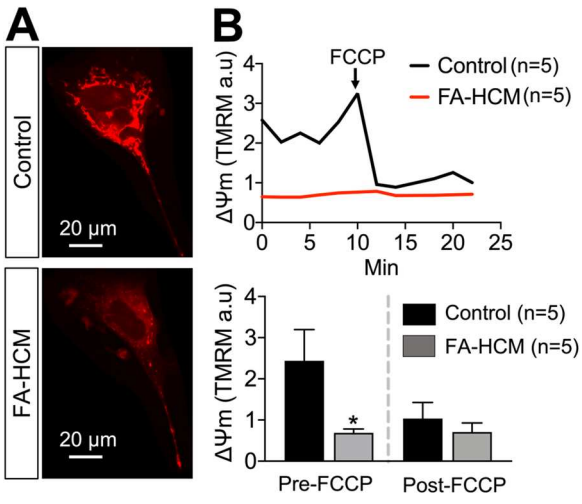

Fig. 4. Mitochondrial membrane potential (ΔΨm) in control and FA-HCM-affected hIPSC-CMs. (A) Representative images of control and FA-HCM-affected hIPSC-CMs. (B) Upper panel; time dependent change in ΔΨm after addition of 10 μM FCCP. Lower panel; average intensity pre and post FCCP (*$p < 0.05$, vs. control; unpaired 2-sample *t*-test).

2016).

3.5. Elevated levels of ROS in FA-HCM-affected hIPSC-CMs

We measured ROS levels in control and FA-HCM hIPSC-CMs via flow cytometry using CellROX Green. The percentage of cells with high ROS staining was significantly higher in FA-HCM-affected hIPSC-CMs versus control hIPSC-CMs Fig. 5 ($p < 0.001$ vs. control, t-test, n = 3 preparations each). This experiment confirms in hIPSC-CMs from patients with FA-HCM, that this disease increases oxidative stress. This is in line with studies showing that frataxin deficiency inhibits mitochondrial respiration and promotes ROS production, causing mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and subsequent mitochondrial iron accumulation in animal models (Abeti et al., 2016; Bennett et al., 2017) (Fig. 6).

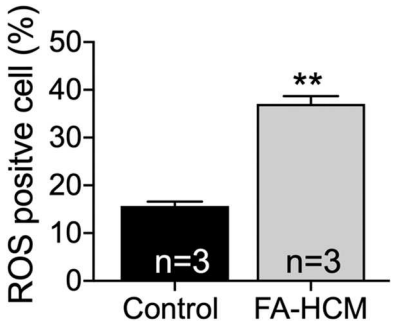

Fig. 5. Elevated ROS levels in FA-HCM-affected hIPSC-CMs. Bar graph represents the percentage of ROS positive cells, (**$p < 0.01$ vs. control; unpaired 2-sample *t*-test).

3.6. Changes in the mitochondrial network architecture in FA-HCM-affected hIPSC-CMs

Next, we applied our image processing toolkit and stochastic network simulation paradigm, as explained above, to process experimental micrographs and model mitochondrial networks in control and FA-HCM-affected hIPSC-CMs. Images of the mitochondrial networks were obtained as described above. We processed multiple z-stack slices and analyzed micrographs from 9 control hIPSC-CMs and 6 FA-HCM-affected hIPSC-CMs. After preprocessing each experimental micrograph, we generated a graph of the experimental mitochondrial micrograph (Fig. 6A &B) and retrieved microscopic network parameters such as $< k >$, Ng, Ng/N, loop sizes (see Image Analysis section), branch lengths, and cluster sizes for each case. The resulting distribution of loop sizes, branch lengths, and cluster sizes for the micrographs are shown in Fig. 6C, D, & E, respectively. In the healthy hIPSC-CMs, distributions of loops sizes, branch lengths, and cluster sizes are small (red colored bars and dots in Fig. 6C, D, & E). Inset in Fig. 6C displays loop sizes in healthy hIPSC-CMs as they are relatively small than in FA-HCM case. As is clear from these distributions, loop sizes, branch lengths, and cluster sizes all shift to larger values in the FA-HCM-affected hIPSC-CMs (blue) compared to control cells (red), indicating a relative decrease in fission in FA-HCM-affected hIPSC-CMs. Similarly, microscopic network parameters including average cluster size (Fig. 6F), mean degree (Fig. 6G),

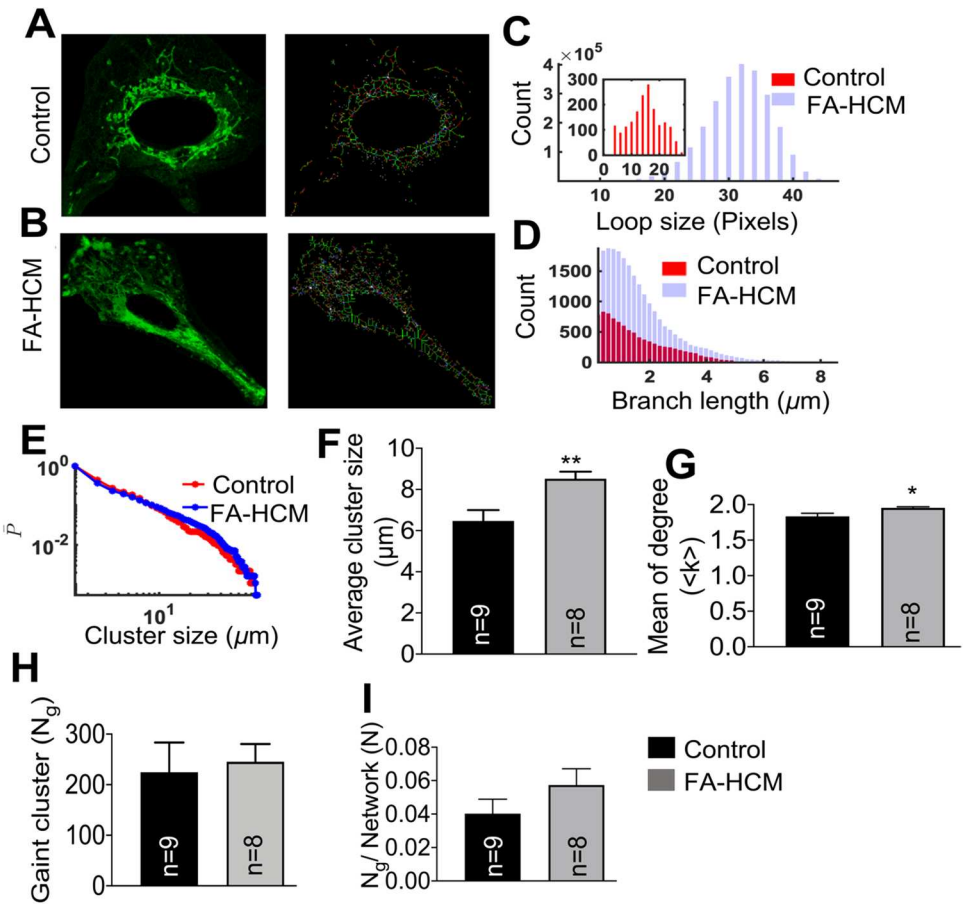

Fig. 6. Image Processing protocol. Representative micrographs from (A) control (original [left] and identified by the algorithm [right]) and (B) FA-HCM-affected hIPSC-CM (original [left] and identified by the algorithm [right]). Bar graphs for (C) loop sizes, (D) branch lengths, and (E) cluster size in a sample control (red) and FA-HCM-affected hIPSC-CM (blue) cell. (F) average cluster size, (G) mean degree, (H) giant cluster size, and (I) ratio of giant cluster to total edges in control and FA-HCM-affected hIPSC-CMs retrieved from experimental micrographs.(For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the largest cluster size (Ng) (Fig. 6H), the largest cluster size normalized with respect to the total network size (Ng/N) (Fig. 6I), are also larger in FA-HCM-affected hIPSC-CMs (gray bars) as compared to control hIPSC-CMs (black bars).

3.7. Upregulated fusion to fission ratio in FA-HCM-affected hIPSC-CMs

After identifying various network parameters from experimental micrographs, we performed stochastic simulations (see Modeling Mitochondrial Network section) to identify microscopic fusion and fission rates responsible for network topology in control and FA-HCM-affected hIPSC-CMs. For a mitochondrial network of size N (approximated from

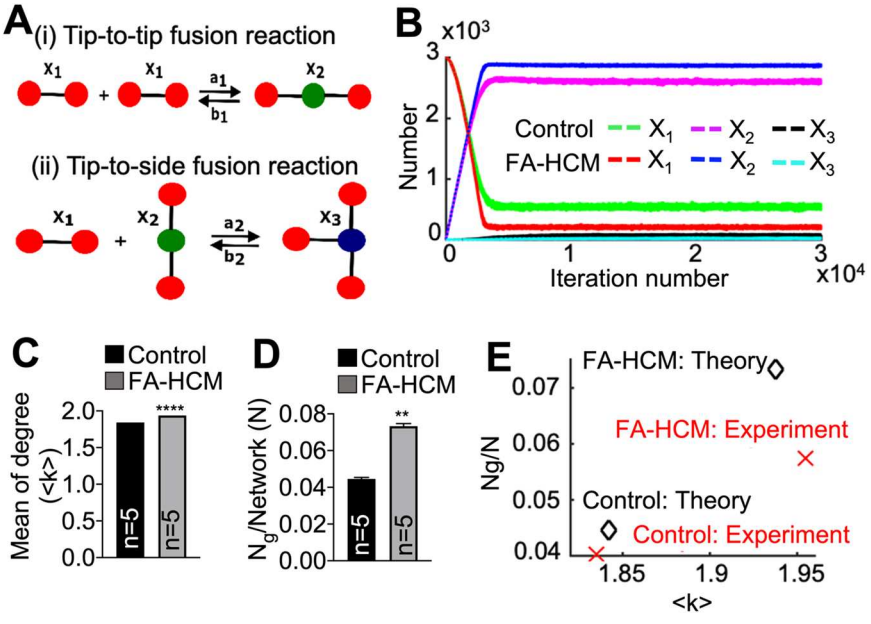

Fig. 7. Stochastic simulation protocol. (A) Agent-based model for mitochondrial network used in this study. (B) Coverages of X1, X2 and X3 species during simulations as functions of time. Green (X1), magenta (X2), and cyan (X3) are for control and red (X1), blue (X2), and black (X3) lines are for FA-CHM networks. (C) Mean degree, (D) giant cluster normalized by the total number of edges in the network (Ng/N). Error bars are from 5 such simulations for each condition. (E) Comparison of Ng/N vs mean degree of the simulated networks in control and FA-HCM-affected hIPSC-CMs from theory (black symbols) and experiment (red symbols).(For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

experiential micrograph), we start with the N number of X_1 species and run the simulations with a given combination of C_1 and C_2 values. Over time, the network evolves such that it will have a different number of X_1, X_2, and X_3 species at a given time. Typical evolution of the network over time for two different combinations of C_1 and C_2 values is shown in Fig. 7B. Each time, the simulation was run until a steady state was reached where the number of X_1, X_2, and X_3 are not changing anymore (Fig. 7B) to retrieve all network parameters as reported below.

The above approach allowed us to scan the (C_1, C_2) phase space and find the C_1 and C_2 values that result in the mitochondrial network with the topology and microscopic parameters observed in control and FA-HCM-affected hIPSC-CMs. Increasing tip-to-side fusion reaction will result in networks with larger branched clusters with higher mean degree $< k >$, N_g/N, cluster sizes, etc. A thorough search of (C1, C2) phase space was conducted to find a combination of C_1 and C_2 values that resulted in a network with the $< k >$ and N_g/N matching those observed experimentally within a certain tolerance. Due to the very nature of the huge number of possible network topologies for a given mitochondrial network, we have performed 100 simulations for each case after achieving steady state networks. To show the statistical significance of our simulations, we have averaged mean degree $< k >$ and the ratio of a giant cluster to total network size Ng/N. These results are shown in Fig. 7C & D.

In Fig. 7E, we show N_g/N and $< k >$ values of the mitochondrial network in experimental images from one control and one FA-HCM-affected hIPSC-CM (red crosses) and the fits from the model (black diamond symbols). Both observed and simulated networks show a significant shift in N_g/N and $< k >$ towards larger values in FA-HCM-affected hIPSC-CM as compared to healthy cells. We remark that the fit to the data can be improved further by decreasing the increment by changing C_1 and C_2 values while scanning the parameter space. However, decreasing this increment increases the computational time exponentially. Thus, a compromise has been made between the accuracy of the fit and the computational time.

Table 1 lists the values of $< k >$, and N_g/N obtained from our experiments and simulations. The C_1 and C_2 values giving these $< k >$ and N_g/N values are also reported in Table 1, indicating a substantial increase ($\sim$ 770%) in tip-to-tip fusion process in FA-HCM hIPSC-CMs than in healthy hIPSC-CMs. Furthermore, Fig. 7B shows the fraction of X_1, X_2, and X_3 species in the network at a steady state for control and FA-HCM hIPSC-CMs. We found a substantial increase in X2 species (blue) in FA hIPSC-CMs compared to control hIPSC-CMs (magenta), confirming a large number of clusters with longer branch lengths and cluster sizes. Furthermore, a slight increase in the number of X_3 species in FA-affected hIPSC-CMs further demonstrates enhancement of mitochondrial networking compared to control hIPSC-CMs.

4. Discussion

Frataxin is a protein involved in iron metabolism, iron storage, and iron–sulfur cluster biosynthesis (Vaubel and Isaya, 2013). It also plays several key roles in nitric oxide signaling (Martin et al., 2009), ROS and redox control (Gakh et al., 2006), mitochondrial respiration (Babcock et al., 1997), mitochondrial energy conversion, and cellular respiration. However, the mitochondrial characteristics are still unclear in cardiac cells with FA (Ristow et al., 2000). It was shown that mitochondrial volume is increased, and mitochondria are over-fused in frataxin knock-out mice (Hanson et al., 2019). Additionally, it was suggested that mitochondrial dysfunction could increase the organelle's network footprint (Machiraju et al., 2019). It is also known that frataxin silencing in SH-SY5Y human neuroblastoma cells altered the mitochondrial morphology (Bolinches-Amorós et al., 2014). We thus analyzed the mitochondrial footprint in hiPSC-CMs from a patient with FA and found that the mitochondrial footprint is larger in these myocytes compared to the unaffected control.

Mitochondrial fusion and fission are dynamic events and change in fusion and fission causes alterations in mitochondrial morphology, size, and number and leads to cellular death (Chen et al., 2012, 2011). Numerous neurodegenerative diseases have been linked to mitochondrial fusion and fission changes, which compromise mitochondrial health and morphology (Chen et al., 2003; Suen et al., 2008). Our study found that the mitochondrial fission protein DRP1 was significantly decreased in FA-HCM-affected hIPSC-CMs however, there was no change in the mRNA expression levels. This might suggest that the lower DRP1 levels could be due to a reduction in the half-life of the protein, rather than through transcriptional regulation. It has been shown that reduction in DRP1 half- life suppressed mitochondrial fission, and the opposite occurs with increased half-life of the protein (Shi et al., 2020).

Our stochastic modeling suggested that the mitochondrial network in FA-HCM-affected hIPSC-CMs is larger and manifests as increased parameters such as mean degree, giant cluster, branch lengths, clusters, and loops. We exploited these differences and modeled the mitochondrial network to gain a quantitative understanding of the changes in the fission and fusion processes in healthy and FA-HCM-affected hIPSC-CMs that would result in such changes to the network. Our modeling suggested that the mitochondrial network increase observed in FA-HCM-affected hIPSC-CMs (Fig. 1 experimental, and Fig. 6 theoretical) mainly results from the increased tip-to-tip fusion in favor of fission. The upregulated fusion to fission ratio could be attributed to the decrease in the DRP1 fission protein (Fig. 2 and 3. In mitochondrial functional measurements, we found that $\Delta\Psi m$ was depolarized, and ROS was increased in FA-HCM-affected hIPSC-CMs.

In FA-HCM-affected hIPSC-CMs, our results suggested a decreased fission rate and a depolarized $\Delta\Psi m$. This could be a protective mechanism against expected mitophagy, since depolarization of $\Delta\Psi m$ may suggest poor mitochondrial activity and can signal for mitophagy to begin (Twig and Shirihai, 2011). Mitophagy is a ubiquitous pathway for eliminating dysfunctional or damaged mitochondria (Ding and Yin, 2012; Gilad Twig & Shirihai, 2011). Mitophagy could also eliminates functional mitochondria in certain physiological conditions (Elmore et al., 2001). Mitochondrial damage and dysfunction have been well characterized as precursors to cell death following ischemia/reperfusion (I/R) injury (Crack and Taylor, 2005; Lucas and Szweda, 1998; Sanderson et al., 2013; Yue et al., 2015) and a recent study reported a robust increase in mitophagy following cerebral I/R (Ułamek-Kozioł et al., 2017). Interestingly, it was shown in DRP1 KO mice that mitochondrial fragmentation and mitophagy are upregulated independently, and that mitophagy does not require DRP1-mediated mitochondrial fission (Anzell et al., 2021). Since mitochondrial fission and mitophagy are two critical processes in mitochondrial homeostasis, future efforts could focus on further investigating the possible interplay between mitophagy and fission in regulating cardiac and neuronal mitochondrial function and bioenergetics in FA.

The elevation of cell ROS leads to mitochondrial membrane potential loss, resulting in increased apoptosis (Marchi et al., 2012; Zorov et al., 2014). This is consistent with what has been known in neuronal cells that frataxin deficiency promotes mitochondrial elongation, irregular mitochondrial morphology, slow cell growth, $\Delta\Psi m$, and cellular apoptosis (Lee et al., 2014; Palomo et al., 2011).

5. Conclusion

Our findings suggest decreased DRP1 expression, mitochondrial fission events, and altered mitochondrial network and function are present in FA-HCM-affected hIPSC-CMs. Enlarged heart size and increased wall thickness have been documented in DRP1 heterozygous knockout mice (Shirakabe et al., 2016). Lower DRP1 levels were detected in chronically hypertrophied, hypertensive rat hearts (Tang et al., 2014). Moreover, (Kageyama et al., 2014) demonstrated that DRP1 deficiency in mice leads to cardiac dysfunction and reduces contractility, heart rate, and left ventricular function. It remains to be demonstrated whether frataxin deficiency leads to changes in cardiac

mitochondrial anatomy and function via a pathway that directly relies on DRP1 as a regulator of mitochondrial fusion and fission in FA-HCM-affected hIPSC-CMs.

Funding

This research was funded by AHA Postdoc grant (19POST34450203), USA to B.C, NIH-R01 (AG053988), USA to G.U, NIH-R01 (HL129136), USA to S.F.N.

CRediT authorship contribution statement

Bojjibabu Chidipi: Conceptualization, Investigation, Analysis, Manuscript Preparation. **Mariana Burgos Angulo:** Investigation, Analysis, Manuscript preparation. **Syed Islamuddin Shah:** Investigation, Analysis, Manuscript Preparation. **Michelle Rieser:** Investigation, Analysis, Manuscript Preparation. **Ganim Ullah:** Investigation, Analysis, Manuscript Preparation. **Thomas V. McDonald:** Investigation, Analysis, Manuscript Preparation. **Sami F. Noujaim:** Conceptualization, Investigation,Analysis, Manuscript Preparation.

All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Institutional Review Board Statement

Not applicable.

Informed Consent Statement

Not applicable.

References

Abeti, R., Parkinson, M.H., Hargreaves, I.P., Angelova, P.R., Sandi, C., Pook, M.A., Abramov, A.Y., 2016. Mitochondrial energy imbalance and lipid peroxidation cause cell death in Friedreich's ataxia. Cell Death Dis. 7 (5), 2237. https://doi.org/10.1038/cddis.2016.111.

Angulo, M.B., Yang, J., Argenziano, M.A., Bertalovitz, A.C., Beidokhti, M.N., McDonald, T.V., 2021. Generation of a Friedreich's Ataxia patient-derived iPSC line USFi001-A. Stem Cell Res. 54, 102399 https://doi.org/10.1016/j.scr.2021.102399.

Anzell, A.R., Fogo, G.M., Gurm, Z., Raghunayakula, S., Wider, J.M., Maheras, K.J., Sanderson, T.H., 2021. Mitochondrial fission and mitophagy are independent mechanisms regulating ischemia/reperfusion injury in primary neurons. Cell Death Dis. 12 (5), 475. https://doi.org/10.1038/s41419-021-03752-2.

Babcock, M., de Silva, D., Oaks, R., Davis-Kaplan, S., Jiralerspong, S., Montermini, L., Kaplan, J., 1997. Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. Science 276 (5319), 1709–1712. https://doi.org/10.1126/science.276.5319.1709.

Bennett, C.F., Kwon, J.J., Chen, C., Russell, J., Acosta, K., Burnaevskiy, N., Kaeberlein, M., 2017. Transaldolase inhibition impairs mitochondrial respiration and induces a starvation-like longevity response in caenorhabditis elegans. PLoS Genet 13 (3), e1006695. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006695.

Bolinches-Amorós, A., Mollá, B., Pla-Martín, D., Palau, F., González-Cabo, P., 2014. Mitochondrial dysfunction induced by frataxin deficiency is associated with cellular senescence and abnormal calcium metabolism. Front. Cell. Neurosci. 8, 124. https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00124.

Bukowska, A., Schild, L., Keilhoff, G., Hirte, D., Neumann, M., Gardemann, A., Lendeckel, U., 2008. Mitochondrial dysfunction and redox signaling in atrial tachyarrhythmia. Exp. Biol. Med. 233 (5), 558–574. https://doi.org/10.3181/0706-rm-155.

Bulteau, A.L., O'Neill, H.A., Kennedy, M.C., Ikeda-Saito, M., Isaya, G., Szweda, L.I., 2004. Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. Science 305 (5681), 242–245. https://doi.org/10.1126/science.1098991.

Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M.D., Pianese, L., Cossee, M., Cavalcanti, F., Pandolfo, M., 1996. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. Science 271 (5254), 1423–1427. https://doi.org/10.1126/science.271.5254.1423.

Carreira, R.S., Lee, P., Gottlieb, R.A., 2011. Mitochondrial therapeutics for cardioprotection. Curr. Pharm. Des. 17 (20), 2017–2035. https://doi.org/10.2174/138161211796904777.

Chalmers, S., McCarron, J.G., 2008. The mitochondrial membrane potential and Ca²⁺ oscillations in smooth muscle. J. Cell Sci. 121 (1), 75–85. https://doi.org/10.1242/jcs.014522.

Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., Chan, D.C., 2003. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. J. Cell Biol. 160 (2), 189–200. https://doi.org/10.1083/jcb.200211046.

Chen, Y., Csordas, G., Jowdy, C., Schneider, T.G., Csordas, N., Wang, W., Maack, C., 2012. Mitofusin 2-containing mitochondrial-reticular microdomains direct rapid cardiomyocyte bioenergetic responses via interorganelle Ca(2+) crosstalk. Circ. Res. 111 (7), 863–875. https://doi.org/10.1161/circresaha.112.266585.

Chen, Y., Liu, Y., Dorn 2nd, G.W., 2011. Mitochondrial fusion is essential for organelle function and cardiac homeostasis. Circ. Res. 109 (12), 1327–1331. https://doi.org/10.1161/circresaha.111.258723.

Chidipi, B., Shah, S.I., Reiser, M., Kanithi, M., Garces, A., Cha, B.J., Noujaim, S.F., 2021. All-trans retinoic acid increases DRP1 levels and promotes mitochondrial fission. Cells 10 (5), 1202.

Crack, P.J., Taylor, J.M., 2005. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. Free Radic. Biol. Med. 38 (11), 1433–1444. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.01.019.

Detmer, S.A., Chan, D.C., 2007. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8 (11), 870–879. https://doi.org/10.1038/nrm2275.

Ding, W.-X., Yin, X.-M., 2012. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. Biol. Chem. 393 (7), 547–564. https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0119.

Dunn, K.W., Kamocka, M.M., McDonald, J.H., 2011. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 300 (4), C723–C742. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00462.2010.

Elmore, S.P., Qian, T., Grissom, S.F., Lemasters, J.J., 2001. The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. FASEB J. 15 (12), 2286–2287. https://doi.org/10.1096/fj.01-0206fje.

Gakh, O., Park, S., Liu, G., Macomber, L., Imlay, J.A., Ferreira, G.C., Isaya, G., 2006. Mitochondrial iron detoxification is a primary function of frataxin that limits oxidative damage and preserves cell longevity. Hum. Mol. Genet 15 (3), 467–479. https://doi.org/10.1093/hmg/ddi461.

Gillespie, D.T., 1977. Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions. J. Phys. Chem. 81 (25), 2340–2361.

González-Domínguez, I., Cervera, L., Gòdia, F., Roldán, M., 2019. Quantitative colocalization analysis of DNA delivery by PEI-mediated cationic polymers in mammalian cells. J. Microsc. 273 (1), 53–64. https://doi.org/10.1111/jmi.12760.

Hanson, E., Sheldon, M., Pacheco, B., Alkubeysi, M., Raizada, V., 2019. Heart disease in Friedreich's ataxia. World J. Cardiol. 11 (1), 1–12. https://doi.org/10.4330/wjc.v11.i1.1.

Harding, A.E., 1981. Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. Brain 104 (3), 589–620. https://doi.org/10.1093/brain/104.3.589.

He, L., Zhou, Q., Huang, Z., Xu, J., Zhou, H., Lv, D., Chen, L., 2019. PINK1/Parkin-mediated mitophagy promotes apelin-13-induced vascular smooth muscle cell proliferation by AMPKalpha and exacerbates atherosclerotic lesions. J. Cell Physiol. 234 (6), 8668–8682. https://doi.org/10.1002/jcp.27527.

Kageyama, Y., Hoshijima, M., Seo, K., Bedja, D., Sysa-Shah, P., Andrabi, S.A., Sesaki, H., 2014. Parkin-independent mitophagy requires Drp1 and maintains the integrity of mammalian heart and brain. EMBO J. 33 (23), 2798–2813. https://doi.org/10.15252/embj.201488658.

Kornfeld, O.S., Qvit, N., Haileselassie, B., Shamloo, M., Bernardi, P., Mochly-Rosen, D., 2018. Interaction of mitochondrial fission factor with dynamin related protein 1 governs physiological mitochondrial function in vivo. Sci. Rep. 8 (1), 14034. https://doi.org/10.1038/s41598-018-32228-1.

Labrousse, A.M., Zappaterra, M.D., Rube, D.A., van der Bliek, A.M., 1999. C. elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. Mol. Cell 4 (5), 815–826. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80391-3.

Lackner, L.L., Nunnari, J.M., 2009. The molecular mechanism and cellular functions of mitochondrial division. Biochim. Biophys. Acta 1792 (12), 1138–1144. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.11.011.

Lee, S., Park, Y.Y., Kim, S.H., Nguyen, O.T., Yoo, Y.S., Chan, G.K., Cho, H., 2014. Human mitochondrial Fis1 links to cell cycle regulators at G2/M transition. Cell Mol. Life Sci. 71 (4), 711–725. https://doi.org/10.1007/s00018-013-1428-8.

Lucas, D.T., Szweda, L.I., 1998. Cardiac reperfusion injury: aging, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (2), 510–514. https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.510.

Machiraju, P., Wang, X., Sabouny, R., Huang, J., Zhao, T., Iqbal, F., Greenway, S.C., 2019. SS-31 peptide reverses the mitochondrial fragmentation present in fibroblasts from patients with DCMA, a mitochondrial cardiomyopathy. Front. Cardiovasc. Med. 6 (167), 167. https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00167.

Marchi, S., Giorgi, C., Suski, J.M., Agnoletto, C., Bononi, A., Bonora, M., Pinton, P., 2012. Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging. J. Signal Transduct. 2012, 329635 https://doi.org/10.1155/2012/329635.

Martin, M., Colman, M.J., Gómez-Casati, D.F., Lamattina, L., Zabaleta, E.J., 2009. Nitric oxide accumulation is required to protect against iron-mediated oxidative stress in frataxin-deficient arabidopsis plants. FEBS Lett. 583 (3), 542–548. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.12.039.

Mielcarek, A., Blauenburg, B., Miethke, M., Marahiel, M.A., 2015. Molecular insights into frataxin-mediated iron supply for heme biosynthesis in Bacillus subtilis. PLoS One 10 (3), e0122538. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122538.

Palomo, G.M., Cerrato, T., Gargini, R., Diaz-Nido, J., 2011. Silencing of frataxin gene expression triggers p53-dependent apoptosis in human neuron-like cells. Hum. Mol. Genet 20 (14), 2807–2822. https://doi.org/10.1093/hmg/ddr187.

Pandolfo, M., 1999. Molecular pathogenesis of Friedreich ataxia. Arch. Neurol. 56 (10), 1201–1208. https://doi.org/10.1001/archneur.56.10.1201.

Perry, S.W., Norman, J.P., Barbieri, J., Brown, E.B., Gelbard, H.A., 2011. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. Biotechniques 50 (2), 98–115. https://doi.org/10.2144/000113610.

Redpath, C.J., Bou Khalil, M., Drozdzal, G., Radisic, M., McBride, H.M., 2013. Mitochondrial hyperfusion during oxidative stress is coupled to a dysregulation in calcium handling within a C2C12 cell model. PLoS One 8 (7), e69165. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069165.

Ristow, M., Pfister, M.F., Yee, A.J., Schubert, M., Michael, L., Zhang, C.Y., Kahn, C.R., 2000. Frataxin activates mitochondrial energy conversion and oxidative phosphorylation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (22), 12239–12243. https://doi.org/10.1073/pnas.220403797.

Sánchez-Alvarez, R., De Francesco, E.M., Fiorillo, M., Sotgia, F., Lisanti, M.P., 2020. Mitochondrial fission factor (MFF) inhibits mitochondrial metabolism and reduces breast cancer stem cell (CSC) activity. Front. Oncol. 10 (1776), 1776. https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01776.

Sanderson, T.H., Reynolds, C.A., Kumar, R., Przyklenk, K., Hüttemann, M., 2013. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation. Mol. Neurobiol. 47 (1), 9–23. https://doi.org/10.1007/s12035-012-8344-z.

Santos, R., Lefevre, S., Sliwa, D., Seguin, A., Camadro, J.-M., Lesuisse, E., 2010. Friedreich ataxia: molecular mechanisms, redox considerations, and therapeutic opportunities. Antioxid. Redox Signal. 13 (5), 651–690. https://doi.org/10.1089/ars.2009.3015.

Scaduto Jr., R.C., Grotyohann, L.W., 1999. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. Biophys. J. 76 (1), 469–477. https://doi.org/10.1016/s0006-3495(99)77214-0.

Schulz, J.B., Boesch, S., Bürk, K., Dürr, A., Giunti, P., Mariotti, C., Pandolfo, M., 2009. Diagnosis and treatment of Friedreich ataxia: a European perspective. Nat. Rev. Neurol. 5 (4), 222–234. https://doi.org/10.1038/nrneurol.2009.26.

Scott, I., Youle, R.J., 2010. Mitochondrial fission and fusion. Essays Biochem. 47, 85–98. https://doi.org/10.1042/bse0470085.

Shah, S.I., Paine, J.G., Perez, C., Ullah, G., 2019. Mitochondrial fragmentation and network architecture in degenerative diseases. PLoS One 14 (9), e0223014.

Shi, L., Liu, J., Peng, Y., Zhang, J., Dai, X., Zhang, S., Long, J., 2020. Deubiquitinase OTUD6A promotes proliferation of cancer cells via regulating Drp1 stability and mitochondrial fission. Mol. Oncol. 14 (12), 3169–3183. https://doi.org/10.1002/1878-0261.12825.

Shirakabe, A., Zhai, P., Ikeda, Y., Saito, T., Maejima, Y., Hsu, C.P., Sadoshima, J., 2016. Drp1-dependent mitochondrial autophagy plays a protective role against pressure overload-induced mitochondrial dysfunction and heart failure. Circulation 133 (13), 1249–1263. https://doi.org/10.1161/circulationaha.115.020502.

Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.L., van der Bliek, A.M., 2001. Dynamin-related protein drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. Mol. Biol. Cell 12 (8), 2245–2256. https://doi.org/10.1091/mbc.12.8.2245.

Suen, D.-F., Norris, K.L., Youle, R.J., 2008. Mitochondrial dynamics and apoptosis. Genes Dev. 22 (12), 1577–1590.

Sukhorukov, V.M., Dikov, D., Reichert, A.S., Meyer-Hermann, M., 2012. Emergence of the mitochondrial reticulum from fission and fusion dynamics. PLoS Comput. Biol. 8 (10), e1002745.

Tang, Y., Mi, C., Liu, J., Gao, F., Long, J., 2014. Compromised mitochondrial remodeling in compensatory hypertrophied myocardium of spontaneously hypertensive rat. Cardiovasc. Pathol. 23 (2), 101–106. https://doi.org/10.1016/j.carpath.2013.11.002.

Tsou, A.Y., Paulsen, E.K., Lagedrost, S.J., Perlman, S.L., Mathews, K.D., Wilmot, G.R., Lynch, D.R., 2011. Mortality in Friedreich ataxia. J. Neurol. Sci. 307 (1–2), 46–49. https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.05.023.

Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Shirihai, O. S., 2008. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. EMBO J. 27 (2), 433–446. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601963.

Twig, G., Shirihai, O.S., 2011. The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. Antioxid Redox Signal 14 (10), 1939–1951. https://doi.org/10.1089/ars.2010.3779.

Ułamek-Kozioł, M., Kocki, J., Bogucka-Kocka, A., Januszewski, S., Bogucki, J., Czuczwar, S.J., Pluta, R., 2017. Autophagy, mitophagy and apoptotic gene changes in the hippocampal CA1 area in a rat ischemic model of Alzheimer's disease. Pharmacol. Rep. 69 (6), 1289–1294.

Valente, A., Maddalena, L., Robb, E., Moradi, F., Stuart, J., 2017. A simple ImageJ macro tool for analyzing mitochondrial network morphology in mammalian cell culture. Acta Histochem. 119, 119–326. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2017.03.001.

Vaubel, R.A., Isaya, G., 2013. Iron-sulfur cluster synthesis, iron homeostasis and oxidative stress in Friedreich ataxia. Mol. Cell. Neurosci. 55, 50–61. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.08.003.

Weidemann, F., Rummey, C., Bijnens, B., Stork, S., Jasaityte, R., Dhooge, J., Meier, T., 2012. The heart in Friedreich ataxia: definition of cardiomyopathy, disease severity, and correlation with neurological symptoms. Circulation 125 (13), 1626–1634. https://doi.org/10.1161/circulationaha.111.059477.

Youle, R.J., van der Bliek, A.M., 2012. Mitochondrial fission, fusion, and stress. Science 337 (6098), 1062–1065. https://doi.org/10.1126/science.1219855.

Yue, R., Xia, X., Jiang, J., Yang, D., Han, Y., Chen, X., Zeng, C., 2015. Mitochondrial DNA oxidative damage contributes to cardiomyocyte ischemia/reperfusion-injury in rats: cardioprotective role of lycopene. J. Cell. Physiol. 230 (9), 2128–2141. https://doi.org/10.1002/jcp.24941.

Zamponi, N., Zamponi, E., Cannas, S.A., Billoni, O.V., Helguera, P.R., Chialvo, D.R., 2018. Mitochondrial network complexity emerges from fission/fusion dynamics. Sci. Rep. 8 (1), 1–10.

Zorov, D.B., Juhaszova, M., Sollott, S.J., 2014. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. Physiol. Rev. 94 (3), 909–950. https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013.

Zorova, L.D., Popkov, V.A., Plotnikov, E.Y., Silachev, D.N., Pevzner, I.B., Jankauskas, S. S., Zorov, D.B., 2018. Mitochondrial membrane potential. Anal. Biochem. 552, 50–59. https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009.