UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia

ELABORATO DI LAUREA

STUDIO DEL RUOLO DI ATAD3B NEL PROCESSO DI MITOFAGIA

Tutor: Prof.ssa Maria Eugenia Soriano Garcia Cuerva
Dipartimento di Biologia

Co-tutor: Dott.ssa Valeriya Zhegalova
Dipartimento di Biologia

Laureando: Lovato Alessandro

ANNO ACCADEMICO 2024/2025

Indice

1. *Introduzione* 3

2.1. *I mitocondri: struttura e funzione* 3

2.2. *Famiglia di proteine ATAD3* 5

2.3. *Processo di mitofagia: proteine e rilevanza* 6

3. *Scopo della tesi* 7

4. *Materiali e Metodi* 8

4.1. *Coltura cellulare* 8

4.2. *Blue Native* 9

4.3. *Condizioni non riducenti* 11

4.4. *Immunofluorescenza* 13

5. *Risultati* 14

5.1. *La capacità di oligomerizzazione di ATAD3B è regolata dallo stress ossidativo indotto da H_2O_2* 14

5.2. *ATAD3B contiene diverse cisteine che potrebbero essere coinvolte nella sua oligomerizzazione* 16

5.3. *ATAD3B non sembra colocalizzare con LC3 negli autofagosomi* 17

6. *Conclusione e discussione* 18

7. *Bibliografia* 19

1. Introduzione

1.1. I mitocondri: struttura e funzione

I mitocondri, presenti nella maggior parte delle cellule eucariotiche, sono organelli citoplasmatici caratterizzati da una doppia membrana e da una struttura interna altamente specializzata. Vengono definiti le "centrali energetiche" delle cellule perché generano la maggior parte dell'adenosina trifosfato (ATP), utilizzato per svolgere funzioni vitali molto importanti quali contrazione muscolare, divisione cellulare, biosintesi di molecole e mantenimento dei potenziali di membrana (Kühlbrandt, 2015). In realtà i mitocondri svolgono un ruolo molto più ampio, poiché sono coinvolti nella regolazione dell'omeostasi del calcio, nei processi di apoptosi e invecchiamento cellulare e nella sintesi dei gruppi eme (Protasoni & Zeviani, 2021).

Si ritiene che abbiano avuto origine da un evento di endosimbiosi tra un progenitore eucariotico e un α-proteobatterio, come suggerisce la stretta somiglianza tra i complessi della catena respiratoria dei batteri e quelli dei mitocondri. La prova più importante che suggerisce questa origine è però il fatto che i mitocondri possiedono un proprio sistema genetico, differente da quello della cellula eucariotica. Essi hanno infatti un meccanismo di produzione proteica autonomo, completo di ribosomi, mtRNA e fattori proteici associati (Kühlbrandt, 2015).

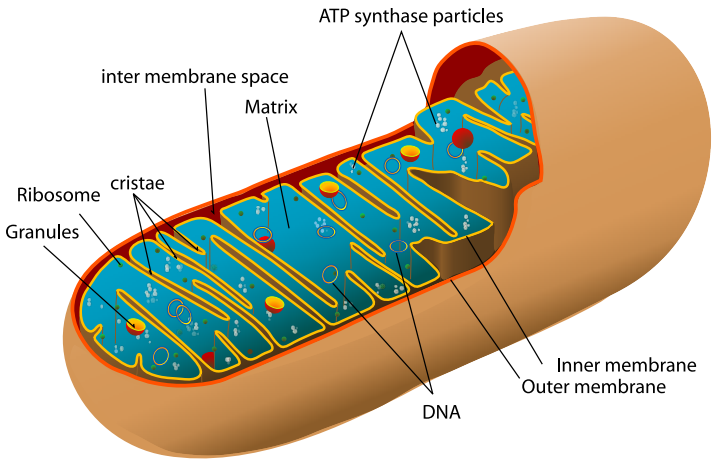

Figura 1 - Sezione di un mitocondrio appartenente ad una cellula eucariotica. Immagine in pubblico dominio, opera di Mariana Ruiz Villareal (LadyofHats), Wikimedia Commons

La doppia membrana delimita la loro struttura: una membrana esterna (OMM), permeabile a piccole molecole tramite proteine chiamate porine, come VDAC, e una membrana interna (IMM), caratterizzata da invaginazioni verso la matrice, dette creste (cristae), che aumentano la superficie disponibile per i processi metabolici in quanto ospitano la maggior parte del macchinario deputato alla fosforilazione ossidativa. Queste membrane definiscono due compartimenti distinti: lo spazio intermembrana (IMS) e la matrice mitocondriale. Le cristae sono strutture dinamiche, capaci di riorganizzarsi in risposta a vari stimoli, quali cambiamenti del fabbisogno energetico o processi apoptotici (Protasoni & Zeviani, 2021).

Esse non solo massimizzano l'area della membrana interna, ma contribuiscono anche a segregare lateralmente i complessi proteici della catena respiratoria (ETC) e l'ATP sintasi dal resto dell'IMM (Kühlbrandt, 2015). Come già accennato, le cristae ospitano i complessi I-IV della catena di trasporto degli elettroni, l'ATP sintasi (complesso V) e i trasportatori di metaboliti, tutti elementi chiave della fosforilazione ossidativa e quindi della produzione di ATP.

Oltre al rimodellamento delle cristae, i mitocondri sono soggetti a eventi di fusione e fissione, regolati da proteine GTPasiche, che ne modificano la morfologia. La fusione permette lo scambio di metaboliti, proteine e mtDNA tra mitocondri, formando reti iperfuse che possono rappresentare un meccanismo di adattamento utile alla sopravvivenza cellulare. Al contrario, la fissione comporta la divisione dei mitocondri; essa può generare piccoli mitocondri che vengono successivamente eliminati tramite mitofagia, ma è anche necessaria per la formazione di nuovi mitocondri, poiché essi non possono originarsi da nulla. È stato dimostrato che fusione e fissione devono coesistere in equilibrio e che la prolungata assenza di uno dei due processi porta a disfunzioni cellulari.

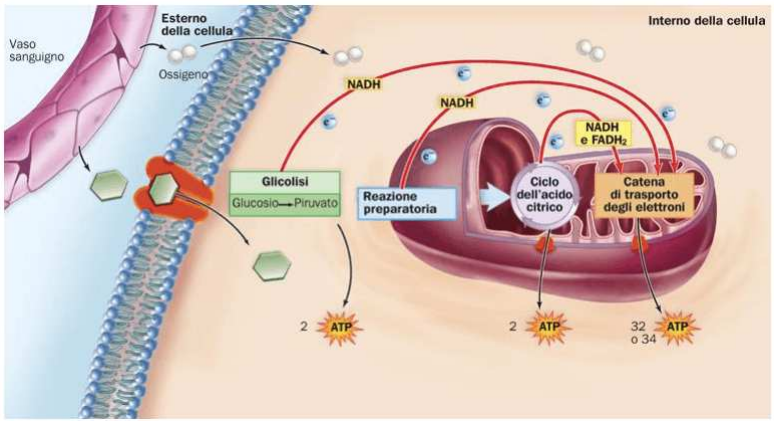

Figura 2 - Schema catena di trasporto degli elettroni. Fonte: Microbiologia Italia (2021) disponibile su: https://www.microbiologiaitalia.it

Come già menzionato, i mitocondri svolgono un ruolo fondamentale nella generazione di ATP. Il processo di fosforilazione ossidativa prevede che gli elettroni vengano trasferiti dal complesso I o II della catena di trasporto elettronico ai complessi successivi, con il concomitante pompaggio di protoni (H^+) nello spazio intermembrana, generando un potenziale elettrochimico. Questo gradiente protonico è utilizzato dall'ATP sintasi per sintetizzare ATP nella matrice, in presenza di ossigeno.

Un'altra funzione cruciale dei mitocondri riguarda i meccanismi di morte cellulare programmata. L'apoptosi rappresenta una risposta a danni o stress cellulari, come lo stress ossidativo, ma può anche far parte dei normali processi di sviluppo e invecchiamento (Protasoni & Zeviani, 2021). Durante l'apoptosi le cristae subiscono rimodellamenti, con allargamento delle giunzioni che comunicano con l'IMS, favorendo il rilascio di proteine pro-apoptotiche quali citocromo c (Cyt c) e AIF. Una volta rilasciate, queste attivano nel citoplasma la cascata apoptotica, che

include l'attivazione delle caspasi, la frammentazione del DNA, la degradazione delle proteine citoscheletriche e nucleari e la formazione dei corpi apoptotici.
I mitocondri sono inoltre fondamentali per la regolazione dell'omeostasi del calcio. Attraverso canali come VDAC, MCU e TMEM65, localizzati nelle membrane, sequestrano e rilasciano ioni Ca^{2+}, regolando così processi metabolici chiave. Il calcio mitocondriale è essenziale per l'attività enzimatica, influenzando la respirazione e l'apertura del poro di transizione di permeabilità mitocondriale (Protasoni & Zeviani, 2021).

Un'ulteriore funzione vitale dei mitocondri è la biosintesi di molecole essenziali per la vita cellulare. Tra queste vi è l'eme, una porfirina contenente ferro indispensabile per il trasporto dell'ossigeno, il metabolismo dei farmaci, la trasduzione del segnale e la regolazione dei microRNA. La sua sintesi avviene parzialmente nel citosol e parzialmente nei mitocondri, dove l'enzima ferrochelatasi inserisce il ferro ferroso nella protoporfirina IX derivata da glicina e succinil-CoA. Inoltre, i mitocondri rappresentano il sito principale di assemblaggio dei cluster ferro-zolfo, cofattori cruciali per la replicazione e riparazione del DNA, il metabolismo energetico e il trasporto di elettroni. Tali cluster possono rimanere all'interno dei mitocondri o essere trasferiti nel citosol tramite specifici trasportatori.

1.2. Famiglia di proteine ATAD3

La famiglia ATAD3 (ATPase family AAA domain-containing protein 3) costituisce un gruppo di ATPasi appartenenti alla classe AAA+, fortemente conservata nei metazoi, presente sotto forma di un unico gene.
Nei primati, il gene *Atad3* è andato incontro a una doppia duplicazione in tandem, dando origine a tre geni paraloghi: *ATAD3A, ATAD3B e ATAD3C*, localizzati vicino al telomero del cromosoma 1p. ATAD3B si differenzia dall'ancestrale ATAD3A per un'estensione di 62 amminoacidi all'estremità C-terminale, dovuta a una mutazione nel codone di stop originale. ATAD3C, invece, appare come un gene troncato, privo dei primi 70 amminoacidi della proteina, la cui espressione è ancora oggetto di discussione (Merle et al., 2012).
Un'ulteriore differenza tra i paraloghi riguarda i pattern di espressione: ATAD3A è ubiquitariamente espressa e localizzata nella membrana mitocondriale interna, mentre ATAD3B sembra essere espressa durante lo sviluppo embrionale, nella linea germinale e nuovamente in alcuni tumori, tutti caratterizzati da un metabolismo altamente glicolitico. Esperimenti condotti nel nostro laboratorio, utilizzando un pannello di cellule tumorali di carcinoma mammario, hanno evidenziato una significativa espressione di ATAD3B in cellule provenienti da tumori triplo-negativi (TNBC), noti per la loro elevata aggressività e capacità metastatica, mentre non è stata rilevata espressione in altri sottotipi meno aggressivi, come Her2+ (MCF-7) o Luminal A (HCC202).

Per quanto riguarda ATAD3A, studi recenti hanno dimostrato un duplice ruolo nella biogenesi delle cristae mitocondriali e nel mantenimento del mitoribosoma,

mediato dalla formazione di complessi proteici di circa 500 kDa e 1 MDa, identificati tramite elettroforesi Blue Native. Al contrario, la funzione di ATAD3B è meno definita: è stato proposto un possibile ruolo di dominante negativo nei confronti di ATAD3A (Merle et al., 2012) e, più recentemente, Shu et al. (2021) hanno descritto un suo potenziale ruolo come recettore di mitofagia specifico in condizioni di stress ossidativo indotto da H_2O_2. Questa ipotesi è supportata da analisi in silico che mostrano la presenza di un motivo LIR (LC3-interacting region), tipico delle proteine coinvolte nell'autofagia appartenenti alla famiglia ATG8, quali LC3.
LC3 è infatti una piccola proteina che marca la membrana degli autofagosomi e, durante l'autofagia, si lega ai recettori specifici grazie alla presenza del motivo LIR. Secondo lo studio citato, in condizioni fisiologiche ATAD3B etero-oligomerizzerebbe con ATAD3A, favorendo l'esposizione della regione C-terminale di ATAD3B nello spazio intermembrana mitocondriale. Lo stress ossidativo e il conseguente danno al mtDNA sembrano ridurre l'interazione tra ATAD3A e ATAD3B, determinando l'esposizione della regione C-terminale di ATAD3B sulla membrana mitocondriale esterna, dove avviene il reclutamento e l'interazione con LC3, avviando così il processo di mitofagia.

Nonostante le evidenze siano interessanti, alcune conclusioni restano controverse, in particolare per quanto riguarda la topologia delle proteine. Non è chiaro, infatti, come una regione localizzata nella matrice mitocondriale possa, secondo gli autori, trovarsi successivamente nel citoplasma attraversando due membrane, condizione necessaria per l'interazione con LC3, che si trova nel citosol.

1.3. Processo di mitofagia: proteine e rilevanza

La mitofagia è un processo di autofagia selettiva fondamentale per mantenere una popolazione di mitocondri funzionali all'interno della cellula, eliminando quelli disfunzionali. Questo meccanismo consente di rimuovere i mitocondri danneggiati, prevenendo l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e proteggendo così l'integrità cellulare complessiva (Pickles et al., 2018). I ROS sono molecole altamente reattive e la catena di trasporto degli elettroni dei mitocondri ne rappresenta la principale fonte. Essi danneggiano sia il DNA nucleare (nDNA) sia il DNA mitocondriale (mtDNA), causando lesioni pericolose.

In condizioni di stress ossidativo, i ROS agiscono come iniziatori e mediatori dell'autofagia, che in questo contesto rimuovono biomolecole ossidate in maniera permanente (Shu et al., 2021).
Tra le vie molecolare più indagate nel controllo della mitofagia c'è quella mediata dalle proteine PINK1 e Parkin, che agiscono come regolatori chiave della qualità mitocondriale (Durcan & Fon, 2015).
In condizioni fisiologiche, PINK1 viene trasportata all'interno dei mitocondri attraverso i complessi di traslocasi della membrana esterna (TOM) e della membrana interna (TIM), per poi essere degradata a livello di quest'ultima. In

seguito a danni indotti da stress ossidativo, il potenziale di membrana mitocondriale si perde, di conseguenza PINK1 non riesce a oltrepassare la membrana interna e si accumula su quella esterna. Qui PINK1 fosforila residui specifici della proteina Parkin, oltre a molecole di ubiquitina già presenti sulla membrana esterna, innescando un meccanismo di amplificazione che stimola l'attività ligasica di Parkin (Durcan & Fon, 2015).

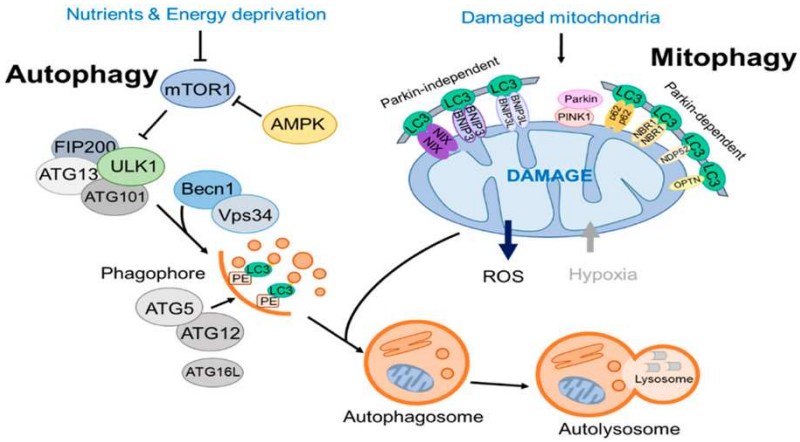

Figura 3 - Fonte: Cells 2023, 12, 2742. MDPI. doi:10.3390/cells1222742

Parkin catalizza quindi l'ubiquitinazione di numerose molecole, segnalandole per la rimozione e modificando la morfologia mitocondriale in modo da facilitare la degradazione selettiva dell'organello.
Le catene di ubiquitina sintetizzate da Parkin costituiscono un segnale di riconoscimento per gli adattatori dei complessi autofagici, come NDP52 e p62. Questi adattator collegano i mitocondri danneggaiti agli autofagosomi attraverso l'interazione con LC3 tramite il motivo LIR. Questo doppio legame permette il collegamento tra l'autofagosoma e il mitocondrio danneggiato, che viene inglobato e successivamente degradato nel lisosoma (Pickles et al., 2018).

Dal punto di vista fisiologico, la mitofagia rappresenta un meccanismo cruciale per prevenire l'accumulo di mitocondri danneggiati, contribuendo alla protezione da malattie neurodegenerative, disturbi cardiovascolari e patologie metaboliche. Inoltre, difetti nella mitofagia sono implicati nell'invecchiamento cellulare e nello sviluppo di stati infiammatori cronici, sottolineando l'importanza di questo processo per il mantenimento dell'omeostasi dell'organismo (Pickles et al., 2018).
Lo studio precedentemente descritto esclude il coinvolgimento di ATAD3B in queste vie, proponendo invece una nuova via di regolazione che deve ancora essere confermata.

2. Scopo della tesi

In questo lavoro di tesi abbiamo voluto investigare come lo stress ossidativo indotto da H_2O_2 alteri la formazione dei complessi di ATAD3B precedentemente identificati e descritti nel nostro laboratorio, nonché verificare la possibile connessione con l'evento di mitofagia.
Nello specifico, ci siamo focalizzati sullo studio della proteina ATAD3B che, secondo quanto riportato da Shu et al., risulta implicata nel processo di mitofagia.

In particolare, essa è stata identificata come un elemento essenziale capace di reclutare la proteina LC3, suggerendo quindi un ruolo diretto nella modulazione di tale meccanismo. Considerata l'importanza della mitofagia per il mantenimento dell'omeostasi mitocondriale, l'obiettivo del nostro studio è stato quello di verificare e approfondire le osservazioni riportate in letteratura, valutando se ATAD3B eserciti effettivamente una funzione di modulatore del processo autofagico selettivo. A tal fine, ne abbiamo analizzato il contributo sia in condizioni fisiologiche sia in presenza di stress ossidativo, per chiarirne la funzione e comprendere quanto la sua attività influenzi il processo di mitofagia.

Per approfondire il ruolo di ATAD3B nella mitofagia, abbiamo adottato un approccio sperimentale articolato su tre metodiche complementari. In primo luogo, l'analisi mediante Blue Native-PAGE ci ha permesso di valutare l'organizzazione e la possibile associazione di ATAD3B in complessi proteici nativi, fornendo informazioni sulla sua interazione strutturale con altre componenti mitocondriali e su come questa vari dopo stress ossidativo.
Successivamente abbiamo eseguito analisi di immunofluorescenza, che hanno consentito di localizzare la proteina all'interno della cellula e di osservare, in condizioni fisiologiche, dopo trattamento con clorochina e in condizioni di stress ossidativo, la sua eventuale colocalizzazione con LC3, indicativa di un coinvolgimento diretto nella formazione di autofagosomi.
Infine, il Western blot in condizioni non riducenti è stato utilizzato per indagare lo stato conformazionale e i possibili legami intermolecolari della proteina, evitando la perdita di ponti disolfuro che potrebbero risultare rilevanti per la sua funzione.
L'integrazione di queste analisi ci ha permesso di verificare in modo critico le osservazioni riportate da Shu et al., con l'obiettivo di chiarire se ATAD3B rappresenti effettivamente un modulatore chiave della mitofagia. In questo modo, il nostro lavoro intende contribuire a definire con maggiore precisione il ruolo di questa proteina nel mantenimento dell'omeostasi mitocondriale, sia in condizioni fisiologiche sia in presenza di stress ossidativo.

3. Materiali e Metodi

3.1. Coltura cellulare

Le cellule sono state mantenute in terreno Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, High Glucose) (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, cod. 12800-082, Waltham, MA, USA), supplementato con $NaHCO_3$ (44 mM; Sigma-Aldrich, cod. S5761, St. Louis, MO, USA), siero fetale bovino (FBS) (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, cod. A5256701, Waltham, MA, USA), penicillina-streptomicina (P/S) 100X (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, cod. 15140122, Waltham, MA, USA) e amminoacidi non essenziali (MEM NEAA, 100X) (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, cod. 11140035, Waltham, MA, USA).

Le colture cellulari sono state mantenute in condizioni sterili nella sala colture cellulari, utilizzando terreno Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose opportunamente integrato.
Per la preparazione del terreno incompleto, sono stati disciolti 13,5 g di polvere di DMEM e 3,7 g di bicarbonato di sodio ($NaHCO_3$) in 800 ml di acqua deionizzata. La soluzione è stata portata a pH 7,1–7,2, completata con acqua deionizzata fino a 1 L e successivamente filtrata tramite filtro da 0,22 µm, ottenendo così terreno DMEM incompleto contenente glucosio, L-glutammina, sodio piruvato e bicarbonato di sodio.

Il terreno completo è stato ottenuto a partire da 1 L di DMEM incompleto, integrando con il 10% (v/v) di siero fetale bovino inattivato al calore (100 ml), 1% (v/v) di penicillina/streptomicina 100X (10 ml) e 1% (v/v) di aminoacidi non essenziali 100X (10 ml). Dopo filtrazione sterile (0,22 µm), il terreno è stato conservato a 4 °C.

Le cellule utilizzate sono MCF-7, una linea cellulare epiteliale derivata da carcinoma mammario umano, ampiamente utilizzata come modello in studi di biologia tumorale e farmacologia.
La sovraespressione di ATAD3B è stata ottenuta attraverso l'uso di un plasmide precedentemente preparato nel nostro laboratorio.
Questo plasmide deriva dalla clonazione di ATAD3B-FLAG nel plasmide pLJM1-Kai2. A queste cellule è stato aggiunto un FLAG, ossia una piccola sequenza peptidica in modo tale che attraverso anticorpi specifici anti-FLAG siamo in grado di rilevarla per studiare la sua presenza e le interazioni che presenta.

Le cellule vengono mantenute in flask di piccole dimensioni in condizioni sterili, utilizzando terreno di coltura completo basato su DMEM. Al raggiungimento di una confluenza approssimativa del 90%**,** le cellule vengono sub-coltivate in nuove flask per preservare la loro vitalità e garantire condizioni di crescita ottimali.
Il passaggio alle nuove flask avviene rimuovendo il terreno di coltura, lavando le cellule con PBS per eliminare residui e trattandole con tripsina per 5 minuti al fine di favorirne il distacco dalla superficie di crescita. Le cellule staccate vengono quindi risospese in terreno fresco e trasferite nelle nuove flask, dove continuano la proliferazione fino al raggiungimento della confluenza desiderata.

3.2. Blue Native Page

Digitonina (Sigma-Aldrich, cod. D141, St. Louis, MO, USA); NativePAGE™ Cathode Buffer Additive (20X) (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, cod. BN2002, Waltham, MA, USA) per anodo e catodo, NativePAGE™ Running Buffer (20X) (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, cod. BN2001, Waltham, MA, USA). NativeMark™ Unstained Protein Standard (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, cod. LC0725, Waltham, MA, USA).
Anticorpi primari: anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich, cod. F1804), anti-SDHA (Abcam, cod. 2E3GC12FB2AE2).

Anticorpo secondario: Goat anti-mouse (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, cod. 32430).

Per la preparazione dei campioni è stato utilizzato un numero di cellule pari a 4×10^6 per ogni condizione. Il medium di coltura è stato rimosso dalle piastre e le cellule sono state lavate con PBS. Successivamente, è stato aggiunto 1 ml di PBS per piastra e le cellule sono state distaccate meccanicamente mediante l'uso di uno scraper. La sospensione cellulare è stata raccolta in provette eppendorf da 1,5 ml e centrifugata per 5 minuti a 600 g a 4 °C. Il surnatante è stato scartato e ciascun pellet cellulare è stato risospeso in 200 µl di PBS ghiacciato. A ciascun campione sono stati aggiunti 200 µl di digitonina (stock 8 mg/ml in PBS), ottenendo così una concentrazione finale di 4 mg/ml. Dopo un'incubazione su ghiaccio per 10 minuti, i campioni sono stati centrifugati a 1.000 g per 5 minuti a 4 °C. Il surnatante contenente i mitocondri è stato trasferito in una nuova provetta, mentre il pellet residuo è stato scartato. Infine, il surnatante è stato ulteriormente centrifugato a 12.000 g per 10 minuti a 4 °C, ottenendo così la frazione mitocondriale per le successive analisi.

I pellet ottenuti sono stati risospesi in 100 µl di Native Buffer, preparato mescolando 1X Native PAGE buffer con PIC (1:100). I campioni sono stati incubati nel ghiaccio per 5 minuti. Successivamente, è stata aggiunta digitonina fino a raggiungere una concentrazione finale dell'1,25%, seguita da un'ulteriore incubazione su ghiaccio per 5 minuti. I campioni così trattati sono stati centrifugati a massima velocità per 30 minuti a 4 °C. Il surnatante è stato raccolto con attenzione e vi sono stati aggiunti 3,6 µl di Coomassie G-250 al 5%, ottenendo una concentrazione finale dell'1%, per preparare i campioni per l'analisi successiva mediante Blue Native PAGE.

Per la corsa elettroforetica in Blue Native PAGE sono state preparate le soluzioni dei compartimenti elettrodici. La soluzione per l'anodo è stata ottenuta miscelando 12,5 ml di Running Buffer con 237,5 ml di acqua distillata. Per il catodo, sono state preparate due soluzioni: la prima soluzione (catodo 1) è stata composta da 10 ml di Running Buffer, 10 ml di Catode Buffer e 180 ml di acqua distillata, mentre la seconda soluzione (catodo 2) è stata ottenuta miscelando 10 ml di Running Buffer, 1 ml di Catode Buffer e 189 ml di acqua distillata. Queste soluzioni sono state utilizzate per garantire la corretta conduzione elettrica e il mantenimento della carica dei complessi proteici durante la corsa elettroforetica L'elettroforesi in condizioni native è stata eseguita inizialmente a 90 V per 30 minuti, poi a 150 V per 45 minuti, utilizzando la soluzione di catodo 1. Successivamente, la soluzione di catodo 1 è stata sostituita con la soluzione di catodo 2 e la corsa elettroforetica è proseguita a 250 V per 90 minuti. Al termine della separazione, le proteine sono state trasferite su membrana in condizioni controllate a 4 °C per tutta la notte.

Dopo il trasferimento, la membrana è stata trattata con acido acetico 8% per circa 10 minuti a temperatura ambiente, quindi risciacquata con TBS (3 × 5 minuti) al

fine di fissare le proteine. Successivamente, per ridurre la colorazione residua del Coomassie, la membrana è stata lavata in metanolo 3 volte e infine nuovamente risciacquata in TBS (3 × 5 minuti). La membrana è stata quindi incubata in TBS contenente 5% latte in polvere per 1 ora a temperatura ambiente, al fine di bloccare i siti di legame aspecifico. Successivamente è stata incubata con l'anticorpo primario overnight a 4 °C.

Per l'analisi sono stati utilizzati due anticorpi primari in tempi differenti, sviluppando la membrana in due momenti successivi. In una prima fase è stato impiegato l'anticorpo anti-FLAG al fine di visualizzare la proteina ATAD3B nelle cellule. Il giorno seguente è stato applicato l'anticorpo secondaro corrispondenti: un anticorpo anti-mouse HRP-coniugato (1:2000) per rivelare il segnale del FLAG. Dopo l'incubazione, la membrana è stata sottoposte a tre lavaggi consecutivi in TBS (3 × 5 min). Infine, la rivelazione del segnale è stata eseguita mediante chemiluminescenza utilizzando il substrato Immobilon Forte e acquisita con apposito sistema di rilevazione d'immagine.
Successivamente la membrana è stata incubata con l'anticorpo anti-SDHA, impiegato per verificare l'uniformità dei campioni. Il giorno seguente è stato utilizzato l'anticorpo secondario anti-mouse HRP-coniugato (1:2000) per rivelare il segnale SDHA nella stessa maniera.

3.3. Condizioni non riducenti

Tris-HCl (tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride; OmniPur®, Merck, cod. 9350-5KG), Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Sigma-Aldrich, cod. L3771, ≥98.5%), Glicerolo (Promega, cod. H5433, ≥99.5%).
RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific, cod. 89901, Waltham, MA, USA), Protease inhibitor cocktail (PIC) (Halt™, cod. 78437), BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, cod. 23250).
Gel NuPAGE™ LDS Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific, cod. NP0008), NuPAGE™ 3–8% Tris-Acetate Gel (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, cod. EA0375BOX), Membrane PVDF (Immobilon, cod. IPVH00010), Transfer buffer (20X) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, cod. NP00061).
Anticorpi primari: anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich, cod. F1804), anti-ATAD3 (Proteintech®, cod.16610-1-AP).
Anticorpi secondari: Goat anti-rabbit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, cod. 32460), Goat anti-mouse (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, cod. 32430).

Il Western blot è stato eseguito in condizioni non riducenti, in modo da preservare i ponti disolfuro e la struttura quaternaria delle proteine. Questo approccio consente di analizzare gli stati oligomerici e i complessi proteici nativi, mantenendo intatte eventuali interazioni proteina-proteina che andrebbero perse in condizioni riducenti.

Le cellule MCF-7 sono state seminate in piastre da coltura a 6 pozzetti (6-well plates) e suddivise in quattro condizioni sperimentali: ATAD3B-FLAG-OE control,

ATAD3B-FLAG-OE H_2O_2, EV control ed EV H_2O_2. Al raggiungimento della confluenza desiderata, il terreno di coltura è stato rimosso, le cellule sono state lavate con PBS e successivamente è stato aggiunto nuovo terreno di coltura. Nelle condizioni ATAD3B-FLAG-OE H_2O_2 ed EV H_2O_2, è stato somministrato perossido di idrogeno (H_2O_2) alla concentrazione di 200 µM, con incubazione per 3 ore a 37 °C. Al termine del trattamento, la soluzione contenente H_2O_2 è stata rimossa, i pozzetti sono stati lavati con PBS e nuovamente ricoperti con medium fresco, mantenendo le cellule in coltura fino al momento della raccolta.

Per la preparazione dei lisati proteici, il terreno è stato rimosso e ciascun pozzetto lavato con 300 µL di PBS. Le cellule sono state distaccate meccanicamente mediante scraper, risospese in 300 µL di PBS e trasferite in provette Eppendorf da 1,5 mL. I campioni sono stati centrifugati a 600 g per 5 minuti a temperatura ambiente, eliminando successivamente il surnatante. I pellet cellulari ottenuti sono stati risospesi in 20 µL di tampone RIPA arricchito con inibitori proteasici (PIC, in rapporto 1:100 con RIPA) e mantenuti in ghiaccio per 30 minuti. È seguita una centrifugazione ad alta velocità per 30 minuti a 4 °C. Il surnatante, contenente le proteine cellulari solubili, è stato trasferito in nuove provette denominate "Lysate – MCF-7" e contrassegnate con il nome del rispettivo gruppo sperimentale.

Parallelamente, per la determinazione della concentrazione proteica, sono state preparate provette contenenti 100 µL di soluzione A e 2 µL di soluzione B del kit BCA, a cui sono stati aggiunti 2 µL di lisato per ciascun campione. Le provette sono state incubate a 37 °C per 30 minuti e successivamente analizzate con metodo colorimetrico, al fine di uniformare il contenuto proteico dei campioni.
Per l'analisi mediante Western blot, i lisati proteici originali sono stati trattati a 70 °C per 5 minuti in buffer di caricamento non riducente (privo di β-mercaptoetanolo). Le proteine sono state caricate su un gel di Tris-acetato insieme a un marcatore di peso molecolare, e l'elettroforesi è stata eseguita a 100 V fino alla completa separazione delle bande proteiche. Successivamente, le proteine sono state trasferite su una membrana di polivinilidene difluoride (PVDF) mediante elettroblotting a 100 V per 90 minuti.

La membrana è stata lavata tre volte con tampone TBS (Tris-buffered saline), quindi bloccata con una soluzione di latte per un'ora per ridurre i legami aspecifici degli anticorpi. Dopo un nuovo lavaggio con TBS, la membrana è stata incubata overnight a 4 °C con anticorpi primari specifici. Il giorno successivo, dopo tre ulteriori lavaggi con TBS, la membrana è stata incubata per 1 ora a temperatura ambiente con anticorpi secondari (diluizione 1:2000 in TBS). Infine, dopo altri tre lavaggi, la membrana è stata sviluppata mediante sistema chemiluminescente con Immobilon Forte, che permette l'acquisizione dei segnali proteici tramite strumentazione dedicata. Questo substrato consente all'enzima HRP di emettere un segnale luminoso rilevabile dal sistema di acquisizione.
L'analisi è stata eseguita per ciascun anticorpo primario utilizzato: ATAD3 per il target di interesse, FLAG per la proteina etichettata e actina come controllo di carico, tutti diluiti secondo le concentrazioni ottimali. Per ATAD3 è stato utilizzato

un anticorpo secondario anti-rabbit (1:2000 in TBS), mentre per FLAG e actina un anticorpo secondario anti-mouse (1:2000 in TBS).

3.4. Immunofluorescenza

Triton® X-100, Molecular Biology Grade (Promega Corporation, cod. H5141, Madison, WI, USA), PBS (Phosphate-Buffered Saline), Tablets (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, cod. 003002, Waltham, MA, USA).
BSA (Bovine Serum Albumin) (Sigma-Aldrich, cod. A9647, St. Louis, MO, USA), Goat Serum (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, cod. 16210064, Waltham, MA, USA).
Anticorpi primari: Anti-LC3 (rabbit) (Proteintech, cod. 14600-1-AP), Anti-ATAD3A/ATAD3B (rabbit) (Proteintech, cod. 16610-1-AP).
Anticorpi secondari: Alexa Fluor™ 647 (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, cod. A-21235, Waltham, MA, USA) emissione (nm) 668 rosso, Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ Plus 488 (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, cod. A32731, Waltham, MA, USA) emissione (nm) 519 verde.

Nelle piastre a 24 pozzetti sono state allestite le condizioni sperimentali di controllo (ATAD3B-FLAG-OE), trattamento con clorochina (ATAD3B-FLAG-OE chloro) e trattamento con perossido di idrogeno (ATAD3B-FLAG-OE H_2O_2). In ciascun pozzetto sono stati seminati 0,5 mL di sospensione cellulare prelevata dai terreni di coltura, all'interno dei quali erano state precedentemente inserite delle coverslip in vetro per consentire l'adesione delle cellule. Per i trattamenti sono state preparate due provette Eppendorf contenenti rispettivamente H_2O_2 alla concentrazione finale di 200 µM e clorochina alla concentrazione finale di 100 µM. Alle cellule sono stati aggiunti 1 µL di H_2O_2 o 0,5 µL di clorochina e mantenuti in incubazione per 3 ore. Successivamente le cellule sono state fissate con 500 µL di PFA per 30 minuti a temperatura ambiente. Il fissativo è stato poi rimosso e i campioni sono stati lavati tre volte con PBS (500 µL per lavaggio). È seguita la permeabilizzazione con Triton 0,1% in PBS (10 µL) per 10 minuti, quindi ulteriori tre lavaggi con PBS. Il blocco è stato effettuato utilizzando una soluzione di PBS contenente 2% BSA e 10% siero di capra.

Una volta ottenuta una buona crescita cellulare, le coverslip sono state trasferite con cautela e capovolte, in modo che la superficie cellulare risultasse a diretto contatto con la soluzione di anticorpo primario, precedentemente distribuita (40 µL per goccia) su fogli di parafilm posti all'interno di una camera umidificata con carta imbevuta d'acqua. L'incubazione con anticorpo primario è stata condotta overnight a 4 °C.

La soluzione di anticorpi primari era composta da anti-FLAG (1:300) e anti-LC3 (1:300), diluiti in BSA. Il giorno successivo le coverslip sono state riposizionate nei rispettivi pozzetti e sottoposte a tre lavaggi con PBS. Successivamente, le coverslip sono state nuovamente trasferite nella camera umidificata con parafilm per l'incubazione con gli anticorpi secondari. L'incubazione è stata condotta per 2 ore

a temperatura ambiente in soluzione di PBS contenente AF647 anti-mouse (1:500), AF488 anti-rabbit (1:500) e Hoechst (0,5 µL).
Dopo l'incubazione con gli anticorpi secondari, le coverslip sono state riportate nei pozzetti originali e lavate cinque volte con PBS. Infine, i campioni sono stati montati sui vetrini portaoggetti utilizzando mounting medium, sigillati con smalto trasparente e conservati a 4 °C al buio fino al momento dell'analisi. L'osservazione è stata eseguita al microscopio a fluorescenza ZEISS LSM 900 con obiettivo 63X.

4. Risultati

4.1. La capacità di oligomerizzazione di ATAD3B è regolata dallo stress ossidativo indotto da H_2O_2

In base agli esperimenti descritti da Shu et al., abbiamo voluto indagare se e in che modo lo stress ossidativo influenzi la formazione e la stabilità dei complessi contenenti ATAD3B. A questo scopo, abbiamo trattato cellule MCF7-EV (naturalmente prive di ATAD3B) e cellule con espressione di ATAD3B (ATAD3B-FLAG-OE) con 200 µM di H_2O_2. Dopo tre ore, le cellule sono state raccolte e i complessi proteici estratti come descritto nella sezione Materiali e Metodi.

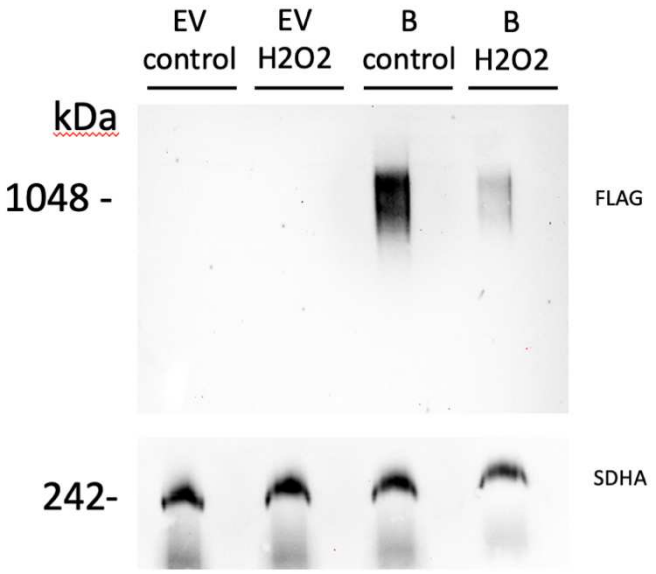

Figura 4 - Analisi dell'elettroforesi Blue Native Page su cellule MCF-7. Nella prima immagine è stato rilevato FLAG (marcatore ATAD3B). Nella seconda immagine è stata analizzata la quantità della proteina SDHA.

I complessi sono stati separati tramite Blue Native PAGE in base alla loro massa e successivamente trasferiti su membrana PVDF, procedendo poi con l'immunodetezione mediante anticorpi specifici.

Dai risultati riportati in Figura 4 si osserva che, in condizioni di controllo, nelle cellule ATAD3B^{-FLAG}-OE si forma un complesso di circa 1 MDa, rilevato con anticorpo anti-FLAG.
Questo conferma la presenza di un complesso proteico a quel peso molecolare contenente ATAD3B. Come atteso, nelle cellule EV non compare la stessa banda, a conferma della specificità del segnale. È interessante notare che, dopo trattamento con H_2O_2, il complesso di ATAD3B a circa 1 MDa risulta significativamente ridotto, nonostante la quantità totale di

proteina caricata per campione non mostri variazioni rilevanti, come evidenziato dall'immunodetezione con anticorpo anti-SDHA.
Questi dati suggeriscono che ATAD3B formi complessi proteici stabili in condizioni fisiologiche, ma sensibili allo stress ossidativo, poiché la loro presenza diminuisce dopo esposizione a H_2O_2.

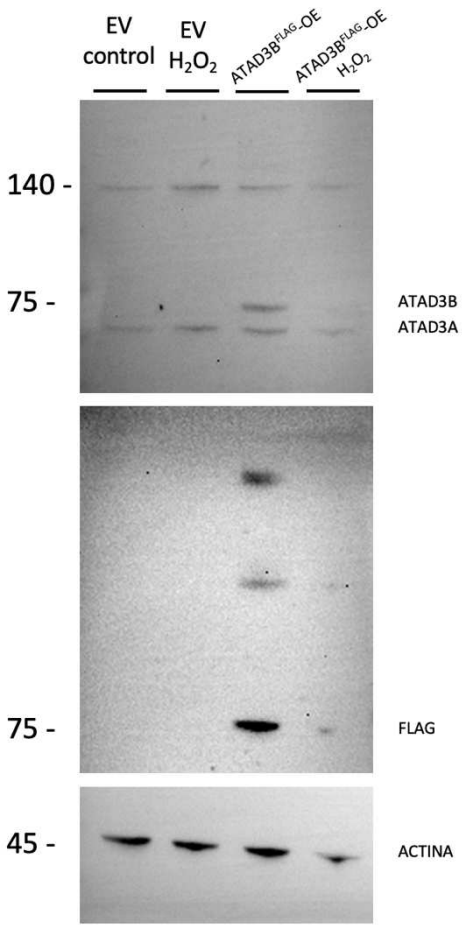

Figura 5 - Western Blot in condizioni non riducenti. nella prima immagine è stato utilizzato un anticorpo anti-ATAD3, nella seconda l'anticorpo anti-FLAG e nella terza l'anticorpo anti-Actina.

Per confermare questo risultato, abbiamo analizzato lisati cellulari in condizioni non riducenti delle stesse cellule trattate come sopra. I campioni sono stati separati su gel non riducente e successivamente sottoposti a western blot. La membrana è stata incubata con diversi anticorpi per verificare se i complessi di ATAD3B si riducessero dopo esposizione a H_2O_2.
Come mostrato in Figura 5, utilizzando un anticorpo in grado di riconoscere sia ATAD3A che ATAD3B, si osservano oligomeri di circa 140 kDa contenenti ATAD3A sia in EV che in cellule ATAD3B^{-FLAG}-OE in condizioni di controllo. Inoltre, nelle cellule ATAD3B^{-FLAG}-OE di controllo è presente una banda leggermente più alta. Per verificare se questa corrispondesse a oligomeri di ATAD3B, la membrana è stata sottoposta a stripping e reincubata con anticorpo anti-FLAG. L'analisi ha evidenziato che, in tali condizioni, ATAD3B forma un oligomero che, in base al peso molecolare (superiore a 140 kDa), potrebbe corrispondere a un dimero, il quale risulta significativamente ridotto dopo trattamento con H_2O_2.
Si osserva inoltre una riduzione globale della quantità di ATAD3B dopo esposizione a H_2O_2. Tuttavia, il controllo con actina ha evidenziato che, nelle cellule ATAD3B^{-FLAG}-OE trattate con H_2O_2, è presente una diminuzione generale della proteina, poiché anche la forma monomerica di circa 75 kDa appare ridotta. Pertanto, per stabilire se siano esclusivamente gli oligomeri a diminuire, saranno necessari ulteriori esperimenti.
È interessante notare che le diverse forme di ATAD3A, osservate in condizioni non riducenti, non sembrano influenzate dal trattamento, suggerendo un effetto specifico su ATAD3B.
In sintesi, questi esperimenti supportano l'ipotesi che ATAD3B si assembli in complessi proteici stabili, ma sensibili allo stress ossidativo indotto da H_2O_2.

4.2. ATAD3B contiene diverse cisteine che potrebbero essere coinvolte nella sua oligomerizzazione

Attraverso uno studio di confronto tra le sequenze amminoacidiche di ATAD3A e ATAD3B eseguito con EMBL-EBI Job Dispatcher è stato possibile vedere come le due proteine differiscano per la presenza di ulteriori 62 amminoacidi nella sequenza C-terminale di ATAD3B.

```
501 KQRLKLAQFDYGRKCSEVARLTEGMSGREIAQLAVSWQATAYASEDGVLT 550
    |:||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||:|||||
501 KRRLKLAQFDYGRKCSEVARLTEGMSGREIAQLAVSWQATAYASKDGVLT 550

551 EAMMDTRVQDAVQQHQQKMCWLKAEGPGRGDEPSPS-------------- 586
    |||||..|||||||::|||.||||||||||.|...|
551 EAMMDACVQDAVQQYRQKMRWLKAEGPGRGVEHPLSGVQGETLTSWSLAT 600

587 ---------------------------------------------- 586

601 DPSYPCLAGPCTFRICSWMGTGLCPGPLSPRMSCGGGRPFCPPGHPLL 648

The EMBL-EBI Job Dispatcher sequence analysis tools framework in 2024
```

Figura 6 - Differenza tra la parte terminale della sequenza amminoacidica di ATAD3A (in blu) e di ATAD3B (in giallo). Sono segnalate le Cisteine con dei pallini rossi.

Come si può vedere dalla figura ATAD3B presenta 6 Cisteine nella coda C-terminale, un numero importante in una sequenza così breve.
La presenza di queste Cisteine può essere un segnale importante per indicare la causa della formazione di oligomeri da parte di ATAD3B^{-FLAG}-OE.
I ponti disolfuro che legano le proteine infatti si formano solitamente attraverso il legame tra uno zolfo presente su una cisteina e lo zolfo presente su un'altra cisteina.
Per questo motivo, in condizioni non riducenti, abbiamo la formazione di complessi stabili ad alto peso molecolari, identificati come oligomeri di ATAD3B, probabilmente favoriti dalla presenza di legami tra le cisteine presenti nell'estremità C-terminale, che non vengono rotti da agenti riducenti.
Quando i campioni sono trattati con H_2O_2, il segnale che indica la presenza di oligomeri formati da ATAD3B è molto ridotto. Questo può essere causato dal fatto che durante lo stress ossidativo la coda C-terminale venga intaccata e perda di integrità, rendendo difficile la formazione di legami disolfuro tra le proteine.
Il trattamento con H2O2 infatti potrebbe causare un'ossidazione irreversibile tale da impedire il legame tra queste due proteine.
Per verificare che le Cisteine e i legami che ne derivano abbiano un ruolo chiave nella formazione di questi oligomeri, sarebbero necessari esperimenti che studino il ruolo funzionale di questi amminoacidi, come ad esempio la mutazione di questi o la loro sostituzione.

4.3. ATAD3B non sembra colocalizzare con LC3 negli autofagosomi

Vista il lavoro pubblicato da Shu et al., nel quale si suggerisce il ruolo di ATAD3B come mediatore della mitofagia tramite il suo legame con LC3, abbiamo voluto investigare se le due proteine fossero in grado di colocalizzare tramite l'uso di immunofluorescenza su cellule e analisi delle immagini acquisite tramite microscopia confocale. In particolare, la colocalizzazione è stata valutata tramite l'uso di un anticorpo anti-FLAG per identificare la proteina ATAD3B e di un anticorpo anti-LC3 per marcare gli autofagosomi. L'esperimento è stato eseguito su cellule ATAD3B^{-FLAG}-OE in tre condizioni differenti:

- Condizione basale (ATAD3B^{-FLAG}-OE Control), senza alcuno stimolo.
- Trattamento con clorochina (ATAD3B^{-FLAG}-OE Chloro), che inibisce la degradazione autofagica determinando l'accumulo di autofagosomi; tale condizione è utile per valutare se l'espressione di ATAD3B possa incrementare l'autofagia.
- Trattamento con H_2O_2 (ATAD3B^{-FLAG}-OE H_2O_2), volto a indurre stress ossidativo.

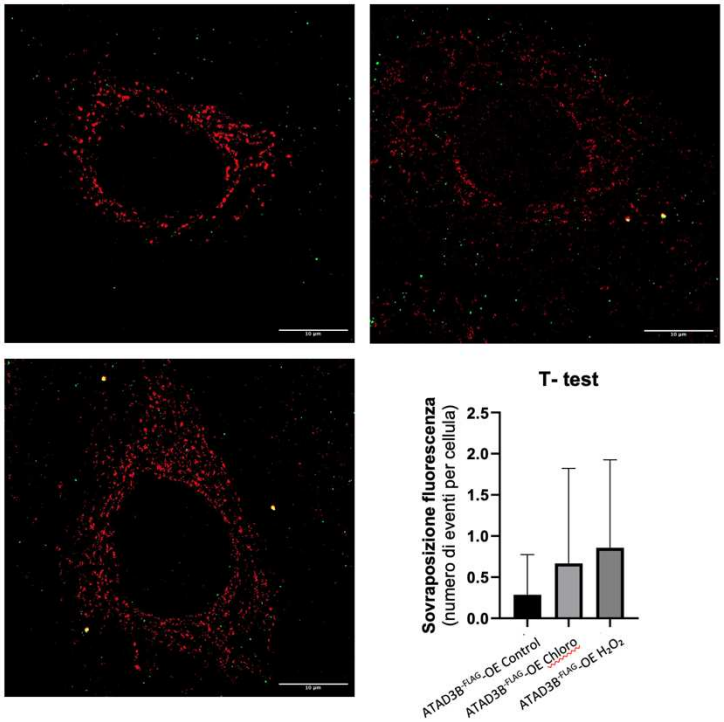

Figura 7 - Immunofluorescenza. La prima immagine rappresenta B^{-FLAG}-OE in condizionidi controllo, la seconda B^{-FLAG}-OE trattato con clorochina, nella terza B^{-FLAG}-Oe trattato con H2O2 e nell'ultima un T-test che rappresenta la non rilevanza in ambito statistico dell'interazione tra ATAD3B e LC3.

Dalle immagini rappresentative di microscopia confocale si osserva che, nel campione "ATAD3B^{-FLAG}-OE Control" (Figura 7), il segnale di FLAG (rosso) presenta una distribuzione citoplasmatica coerente con il network mitocondriale, mentre LC3 (verde) appare come un segnale debole, compatibile con la presenza di background non specifico.

La quantificazione non mostra colocalizzazione rilevante tra le due proteine.

Nel campione trattato con clorochina, come atteso, il segnale di LC3 risulta più intenso e numeroso, indicando un accumulo di autofagosomi. Tuttavia (Figura 7), la colocalizzazione tra FLAG e LC3 non è significativa, suggerendo che l'accumulo forzato di autofagosomi, in assenza di stress, non induca un'interazione rilevante tra ATAD3B e LC3.

Al contrario, nel campione trattato con H_2O_2, la colocalizzazione tra FLAG e LC3 appare aumentata, pur non raggiungendo la significatività statistica. In sintesi, i dati attuali non mostrano una correlazione solida a supporto dell'ipotesi che ATAD3B agisca come recettore di LC3.

Nell'ultima immagine è rappresentato un T-test di confronto tra la condizione di controllo, il trattamento con clorochina e il trattamento con H_2O_2, e com'è chiaramente visibile, la colocalizzazione tra FLAG e LC3 non è un evento statisticamente rilevante.

Per chiarire ulteriormente tale relazione, sarebbero necessari esperimenti in condizioni combinate (clorochina + H_2O_2) per verificare se l'accumulo di autofagosomi, associato a stress ossidativo, possa incrementare la colocalizzazione di ATAD3B con LC3. Parallelamente, l'esecuzione degli stessi test in cellule EV consentirebbe di valutare l'impatto della sola espressione di ATAD3B sui processi di autofagia e mitofagia.

5. Conclusione e discussione

Nel complesso, i risultati ottenuti in questo lavoro di tesi suggeriscono che ATAD3B possa partecipare alla formazione di complessi proteici mitocondriali, mostrando una particolare sensibilità allo stress ossidativo. L'analisi tramite Blue Native PAGE ha evidenziato che, in condizioni di sovraespressione di ATAD3B, è rilevabile un segnale indicativo della presenza di complessi contenenti questa proteina. Tale segnale risulta ridotto dopo trattamento con H_2O_2, suggerendo che lo stress ossidativo comprometta la stabilità di questi complessi.

Il Western blot in condizioni non riducenti ha confermato la presenza costitutiva di complessi formati da ATAD3A. Tuttavia, in condizioni di sovraespressione di ATAD3B, si osservano complessi ad alto peso molecolare che includono anche ATAD3B. Anche in questo caso, in condizioni di stress ossidativo si nota una diminuzione del segnale, indicando che lo stress interferisce con i meccanismi di oligomerizzazione. A supporto di questa ipotesi, l'analisi della sequenza mostra che la coda C-terminale di ATAD3B contiene numerosi residui di cisteina, potenzialmente coinvolti nella formazione di ponti disolfuro. In condizioni fisiologiche, tali residui potrebbero favorire la formazione di oligomeri, mentre lo

stress ossidativo potrebbe ossidarli in modo irreversibile, impedendo la loro interazione.

L'immunofluorescenza ha mostrato alcuni eventi di colocalizzazione tra ATAD3B, rilevato tramite anticorpo anti-FLAG, e LC3, ma senza significatività statistica, né in condizioni fisiologiche, né dopo trattamento con clorochina o H_2O_2. Questi risultati suggeriscono che, sebbene ATAD3B possa avere un ruolo potenziale nella modulazione della mitofagia, non emerge una colocalizzazione diretta e stabile con LC3 nei modelli sperimentali adottati.

In conclusione, i dati confermano l'esistenza di complessi oligomerici contenenti ATAD3B e la loro sensibilità allo stress ossidativo, ipotizzando un coinvolgimento dei residui di cisteina della coda C-terminale nella loro formazione. Tuttavia, il ruolo di ATAD3B nella regolazione della mitofagia rimane ancora da chiarire e richiederà ulteriori studi sperimentali. I risultati ottenuti potrebbero fornire nuovi spunti per comprendere il contributo di questa proteina in patologie a essa associate e aprire la strada a future indagini sui meccanismi molecolari attraverso cui ATAD3B modula la mitofagia.

6. Bibliografia

Kühlbrandt W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. BMC Biol. 2015 Oct 29;13:89. doi: 10.1186/s12915-015-0201-x. PMID: 26515107; PMCID: PMC4625866.

Shu L, Hu C, Xu M, Yu J, He H, Lin J, Sha H, Lu B, Engelender S, Guan M, Song Z. ATAD3B è un recettore mitofagico che media la clearance del DNA mitocondriale danneggiato indotto dallo stress ossidativo. EMBO J. 15 aprile 2021;40(8):e106283. doi: 10.15252/embj.2020106283. Epub 2021 5 marzo. PMID: 33665835; PMCID: PMC8047441.

Protasoni M, Zeviani M. Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions. Int J Mol Sci. 2021 Jan 8;22(2):586. doi: 10.3390/ijms22020586. PMID: 33435522; PMCID: PMC7827222.

Merle, Nicolas & Féraud, Olivier & Gilquin, Benoit & Hubstenberger, Arnaud & Kieffer-Jacquinot, Sylvie & Assard, Nicole & Bennaceur-Griscelli, Annelise & Honnorat, Jérôme & Baudier, Jacques. (2012). ATAD3B is a human embryonic stem cell specific mitochondrial protein, re-expressed in cancer cells, that functions as dominant negative for the ubiquitous ATAD3A. Mitochondrion. 12. 441-8. 10.1016/j.mito.2012.05.005.

Pickles S, Vigié P, Youle RJ. Mitophagy and Quality Control Mechanisms

in Mitochondrial Maintenance. Curr Biol. 2018 Feb 19;28(4):R170-R185. doi: 10.1016/j.cub.2018.01.004. PMID: 29462587; PMCID: PMC7255410.

Durcan TM, Fon EA. The three 'P's of mitophagy: PARKIN, PINK1, and post-translational modifications. Genes Dev. 2015 May 15;29(10):989-99. doi: 10.1101/gad.262758.115. PMID: 25995186; PMCID: PMC4441056.