

STRESZCZENIE

Badania prowadzone w ciągu ostatniego ćwierćwiecza pokazały, że z chwilą wyjaśnienia mechanizmów oksydacyjnej fosforylacji nie zakończył się okres przełomowych odkryć związanych z mitochondriami. Między innymi wykazano, że mitochondria mogą tworzyć rozbudowaną sieć, na skutek odwracalnych procesów fuzji i fragmentacji i że sieć ta może ściśle oddziaływać w znaczeniu funkcjonalnym i strukturalnym z siateczką śródplazmatyczną oraz innymi organellami a jej organizacja ma wpływ na przebieg różnych procesów komórkowych. W niniejszym artykule uwaga skupiona jest na mitofuzynie 2, jednym z białek o kluczowym znaczeniu dla utrzymywania właściwej organizacji sieci mitochondrialnej. Mitofuzyna 2 uczestniczy w regulacji procesów metabolicznych zachodzących w mitochondriach, kontroli ilości mtDNA, w utrzymaniu komórkowej homeostazy Ca^{2+} a także regulacji podziałów i różnicowania komórek. Mutacje w genie kodującym mitofuzynę 2 odpowiedzialne są za występowanie neuropatii z kręgu chorób Charcot-Marie-Tooth typu 2A, a zaburzenia w ilości białka wiążą się z procesem nowotworzenia, cukrzycą czy chorobą rozrostową śródbłonna naczyń. Wiele badań wskazuje, że mitofuzyna 2 jest białkiem o plejotropowym działaniu w komórkach.

WPROWADZENIE

Historia badań nad mitochondriami rozpoczęła się pierwszym opisaniem tych organelli przez Richarda Altmanna w 1890 roku a wprowadzona przez Michaelisa technika barwienia mitochondriów Zielenią Janusową pozwoliła na wykazanie powszechnego występowania tych struktur komórkowych. Rozpoczęte w tamtym okresie badania nad mitochondriami zbiegły się w czasie z próbami znalezienia odpowiedzi na pytanie, w jaki sposób komórki pozyskują energię. Kamieniem milowym w tych pionierskich badaniach było ustalenie w 1920 roku przez Otto Warburga, że procesy oksydacyjne w komórce zachodzą w dobrze wydreńbionych strukturach i zaproponowanie, że są one związane z wykorzystaniem tlenu oraz wymagają udziału jonów żelaza. Ta druga sugestia znalazła potwierdzenie w badaniach prowadzonych przez Keilina i dotyczących cytochromów, które chociaż odkryte w 1886 dopiero po 40 latach zostały docenione. Kolejne odkrycia wskazujące na NADH jako donora protonów w reakcjach oksydoredukcyjnych oraz udział flawoprotein w reakcjach utleniania i redukcji zachodzących między NADH a cytochromami i tlenem pozwoliło na stworzenie w roku 1940 koncepcji ciągu reakcji zwanych dzisiaj łańcuchem oddechowym. Badania Szent-Gyorgyi, Matiusa i Knoopa doprowadziły Krebsa do opisanego w roku 1937 cyklu kwasów trikarboksylowych (Nagroda Nobla w 1953 r.). Mniej więcej w tym samym okresie ustalono, że ATP jest przENOŚNIKIEM energii uwalnianej w procesach oksydacyjnych w komórce [1].

Badania pozwalające na połączenie mitochondrialnych procesów oksydoredukcyjnych z wytwarzaniem ATP czyli badania, których celem było wyjaśnienie mechanizmu oksydacyjnej fosforylacji zabrały uczonym kolejne dziesięciolecia i doprowadziły do dwóch przełomowych odkryć. Jedno z nich stało się podstawą teorii chemiczno-osmotycznej sformułowanej przez Petera Michella w 1962 roku (nagroda Nobla w 1978 r.) a drugie doprowadziło do wyjaśnienia mechanizmu przekształcania energii chwilowo zmagazynowanej w postaci potencjału protonowego wewnętrznej błony mitochondrialnej w taki sposób, że jest ona wykorzystywana do fosforylacji ADP poprzez wymuszenie zmiany konformacyjnej mitochondrialnej ATPazy zwanej też, ze względu na zasadniczy kierunek zachodzącej reakcji „syntazą ATP”. To odkrycie, także wyróżnione Nagrodą Nobla (John Walker i Paul Boyer, 1997 r.) zakończyło długi okres badań wyjaśniających podstawowe mechanizmy metabolizmu energetycznego mitochondriów. Rzecz jasna, wiele szczegółów, dodatkowych zjawisk i procesów związanych z mitochondrialnym przekształcaniem energii jest przedmiotem nieustających badań, ale fundament tych mechanizmów wydaje się ustalony w sposób niepodważalny.

Maria Kawalec¹

Małgorzata Beręsewicz¹

Krzysztof Zabłocki²

Barbara Zabłocka^{1,✉}

¹Pracownia Biologii Molekularnej Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego, PAN, Warszawa

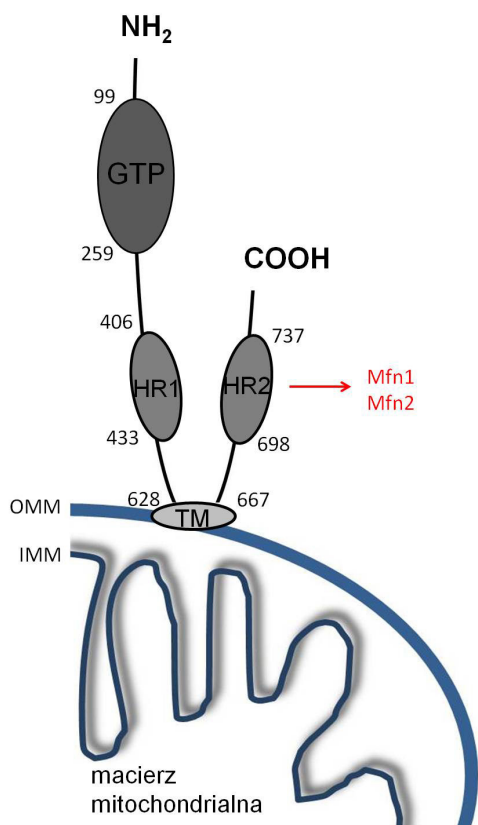
²Pracownia Metabolizmu Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN, Warszawa

✉Pracownia Biologii Molekularnej Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego, PAN, ul. A. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa; e-mail: bzablocka@imdik.pan.pl

Artykuł otrzymano 16 maja 2016 r.
Artykuł zaakceptowano 19 maja 2016 r.

Słowa kluczowe: mitochondria, mitofuzyna 2, sieć mitochondrialna,

Podziękowanie: Publikacja finansowana z grantu Narodowego Centrum Nauki nr 4746/B/P01/2011/40.



Rycina 1. Schemat budowy białka mitofuzyny 2. Mitofuzyna 2 jest białkiem zlokalizowanym w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, w której jest zakotwiczone za pomocą domeny transbłonowej (TM, ang. *transmembrane domain*). Oba końce białka, aminokwasowy i karboksylowy, zwrócone są do cytoplazmy. Szczegółne znaczenie dla aktywności fuzyjnej białka ma domena o aktywności GTPazy (GTP). Zaznaczono także domeny superhelikalne o powtarzających się sekwencjach reszt aminokwasowych o charakterze hydrofobowym (HR1, HR2, ang. *heptads repeated region*), które odpowiadają za oddziaływania pomiędzy mitofuzynami. Liczby odpowiadają kolejnym resztom aminokwasowym w tych fragmentach cząsteczki białka, które tworzą poszczególne domeny [19]. OMM - zewnętrzna błona mitochondrialna (ang. *outer mitochondrial membrane*), IMM - wewnętrzna błona mitochondrialna (ang. *inner mitochondrial membrane*).

Nie oznacza to jednak, że z chwilą wyjaśnienia mechanizmów oksydacyjnej fosforylacji zakończył się etap przełomowych odkryć związanych z mitochondriami. Badania ostatnich mniej więcej 30 lat odsłoniły szereg nowych zjawisk związanych z mitochondriami o fundamentalnym znaczeniu dla komórek. Ustalenie że mitochondria mogą tworzyć rozbudowaną sieć, na skutek odwracalnych procesów fuzyji i fragmentacji, i że sieć ta może ściśle oddziaływać w znaczeniu funkcjonalnym i strukturalnym z siateczką śródplazmatyczną należy do najważniejszych. Zjawiska te są przedmiotem intensywnych badań. Do szczególnie istotnych odkryć należy też wykazanie kluczowej roli mitochondriów w regulacji sygnalizacji i utrzymywaniu homeostazy wapniowej oraz ich udziału w inicjowaniu i wzmacnianiu sygnału prowadzącego do śmierci komórek na drodze apoptozy, autofagii albo nekrozy. Intensywne badania nad genomem mitochondrialnym doprowadziły do zidentyfikowania szeregu chorób zwanych mitochondrialnymi, które są spowodowane mutacjami w obrębie mitochondrialnego DNA albo w szerszym znaczeniu, także w genach jądrowych kodujących białka mitochondrialne. W

niniejszym artykule uwaga skupiona jest na mitofuzynie 2, jednym z białek o kluczowym znaczeniu dla utrzymywania właściwej organizacji sieci mitochondrialnej w komórce i oddziaływania mitochondriów z innymi strukturami.

ROLA FUZJI MITOCHONDRIÓW W UTRZYMANIU SIECI MITOCHONDRIALNEJ I PRAWIDŁOWEJ ZAWARTOŚCI MITOCHONDRIALNEGO DNA

Mitochondria w komórce tworzą dynamiczną sieć, której stopień złożoności zależy od względnych szybkości procesów ich łączenia się (fuzyji) i fragmentacji [2]. Zachwianie proporcji między tymi procesami jest przyczyną niewłaściwej organizacji sieci mitochondrialnej. O kluczowym znaczeniu procesu fuzyji mitochondriów dla komórki świadczy fakt, że przesunięciu równowagi między fuzyją a fragmentacją w kierunku tej drugiej [2-4] towarzyszą liczne zaburzenia metaboliczne [5-8].

Fuzja mitochondriów wydaje się przeciwdziałać nagromadzeniu mutacji w mitochondrialnym DNA (mtDNA) oraz jego degradacji [9]. Podczas łączenia się mitochondriów możliwe jest przekazywanie mitochondrialnego DNA pomiędzy różnymi obszarami rozbudowującej się sieci mitochondrialnej, dzięki czemu dopiero znaczny stopień uszkodzenia mtDNA lub jego znaczny ubytek, (prowadzący do dysfunkcji 60-90% całkowitej puli mtDNA) wpływa na metabolizm mitochondriów [10,11].

Mitochondrialne DNA jest stosunkowo niewielką kolistą cząsteczką kwasu deoksyrybonukleinowego zlokalizowaną w macierzy mitochondrialnej. W pojedynczym mitochondrium (choć definicja pojedynczego mitochondrium, w kontekście sieci mitochondrialnej nie jest oczywista) może znajdować się bardzo wiele kopii mtDNA. Pojedyncza cząsteczka mtDNA człowieka składa się z 16569 par zasad, kodujących 37 genów, spośród których 13 koduje białka wchodzące w skład kompleksów łańcucha oddechowego i syntazy ATP, 22 geny kodują tRNA a pozostałe 2 - mitochondrialne rRNA.

Zwiększenie liczby kopii mtDNA towarzyszy procesowi biogenezy mitochondriów i jest regulowane przez wiele czynników. Jednym z głównych białek zaangażowanych w regulację liczby kopii mtDNA jest kinaza aktywowana przez AMP (AMPK, ang. *AMP-activated kinase*). Aktywność AMPK zmienia się w odpowiedzi na stan energetyczny komórki i za pośrednictwem czynnika transkrypcyjnego PGC-1 α , może wpływać stymulująco na ekspresję mitochondrialnego czynnika transkrypcyjnego A (Tfam) [12]. Z kolei Tfam oddziałuje bezpośrednio z DNA mitochondrialnym regulując jego replikację i transkrypcję znajdujących się tam genów [13].

W badaniach *in vitro* wykazano, że nieprawidłowe procesy fuzyji mitochondriów, związane z brakiem prawidłowej mitofuzyny 2 a także mitofuzyny 1, która jest białkiem homologicznym o podobnej funkcji wpływają na jakość mtDNA. Wykazano, że w komórkach pozbawionych Mfn2 rośnie liczba mutacji w mtDNA [9]. W badaniach na fibroblastach osób dotkniętych chorobą CMT typu 2A, (CMT2A) spowodowaną mutacjami w genie mitofuzyny 2 wykaza-

no obniżenie efektywności naprawy mtDNA [14], a także stwierdzono istnienie związku pomiędzy zaburzeniami potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej a obniżoną ilością mtDNA [15].

Oprócz *MFN2* w rozwój neuropatii wrodzonych zaangażowanych jest wiele innych genów kodujących białka związane z procesem fuzji lub fragmentacji mitochondriów. Mutacje w genie *GDAP1* kodującym białko, które pośrednio uczestniczy w procesie podziału mitochondriów [16], są częstą przyczyną aksonalnych postaci CMT. Natomiast mutacje w genie *OPA-1*, kodującym białko fuzji wewnętrznej błony mitochondrialnej, są przyczyną wrodzonej neuropatii wzrokowej typu Kjera (ADOA) [17]. Postępujące uszkodzenie nerwu wzrokowego towarzyszy także przypadkom *CMT2A* [14,18], co dodatkowo wydaje się podkreślać rolę współdziałania białek fuzyjnych oraz zależność komórek nerwowych od prawidłowej dynamiki sieci mitochondrialnej.

Przyczyna specyficzności występowania objawów ze strony obwodowego układu nerwowego w związku z zaburzeniami fuzji na skutek dysfunkcji mitofuzyny 2 nie została dotąd poznana. Przypuszcza się, że może wynikać ze stosunkowo niskiej zawartości *Mfn1* (która może częściowo kompensować brak *Mfn2*) w nerwach obwodowych i nerwie wzrokowym, przez co są one bardziej narażone na skutki mutacji w *Mfn2* [4,14].

MITOFUZYNĄ 2 I JEJ UDZIAŁ W FUZJI BŁONY MITOCHONDRIÓW

Mitofuzyna 2 jest białkiem o aktywności GTPazy. U człowieka gen *MFN2* znajduje się w locus 1p36.22 i koduje białko składające się z 757 reszt aminokwasowych w, w którym wyróżnia się kilka funkcjonalnych domen [19]. Mitofuzyna 2 jest zakotwiczona w zewnętrznej błonie mitochondrialnej a jej domena transbłonowa złożona jest z dwóch fragmentów: TM1 i TM2 [20]. Oba końce mitofuzyny 2, karboksylowy i aminowy, skierowane są do cytoplazmy. Domena o aktywności GTPazy znajduje się na końcu aminowym. Na obydwu końcach białka występują domeny superhelikalne CC1 i CC2 (ang. *coiled-coil regions*), zawierające powtórzenia 7 hydrofobowych aminokwasów, nazywane również domenami HR1 i HR2 (ang. *heptad repeats*). Domeny te odgrywają kluczową rolę w fuzji błon mitochondrialnych, umożliwiając tworzenie homo- i heterodimerów pomiędzy mitofuzynami [3,21], jak również umożliwiając ich oddziaływanie z innymi białkami, m.in. *Opa-1* [22]. Szczególne znaczenie ma obszar mitofuzyny 2 oddziałujący z białkami Ras. Jest on konieczny m.in. do oddziaływań mitochondriów z siateczką śródplazmatyczną (ER) oraz warunkuje prawidłową morfologię ER [23] a przez to jest kluczowy dla utrzymywania homeostazy wapniowej w komórce.

Przewiduje się, że na skutek różnego składowania mRNA *Mfn2*, u ludzi może również występować krótsza izoforma 2 białka *Mfn2*, złożona z 436 aminokwasów pozbawiona 302 reszt aminokwasowych na końcu aminowym.

U ssaków, w tym także u człowieka, występują dwa typy mitofuzyny, *Mfn1* i *Mfn2*, wykazujące znaczny stopień po-

dobieństwa budowy i funkcji [22]. Gen *Mfn1* znajduje się na chromosomie trzecim w pozycji 3q25-q26, a pomiędzy białkiem *Mfn1* i *Mfn2* występuje ok. 60% homologii. Obie mitofuzyny uczestniczą w procesie fuzji mitochondriów, poprzez tworzenie homo- i heterodimerów na powierzchni sąsiadujących mitochondriów. Jednak wiele badań *in vitro* dowodzi, że *Mfn2* pełni też inne funkcje niezwiązane bezpośrednio z jej aktywnością fuzyjną, których nie wykazano dla *Mfn1*, co szerzej przedstawiono w kolejnych podrozdziałach.

Podstawową funkcją *Mfn2* jest udział w procesie fuzji mitochondriów. Na zjawisko fuzji mitochondriów składają się dwa procesy: fuzja wewnętrznej błony mitochondrialnej, w której uczestniczy białko *Opa1* oraz fuzja błony zewnętrznej, w której pośredniczą *Mfn1* i *Mfn2*. W procesie tym mitofuzyny obecne na powierzchni sąsiadujących mitochondriów tworzą homo- i heterodimery. Oddziaływania pomiędzy mitofuzynami mają charakter hydrofobowy i są możliwe dzięki domenom HR. Jednocześnie, aktywność GTPazowa mitofuzyny jest niezbędna do przeprowadzenia fuzji zewnętrznej błony mitochondrialnej [20,24]. *Mfn1* wykazuje większą aktywność hydrolizy GTP niż *Mfn2*, i dlatego zapewne, większą aktywność w procesie fuzji mitochondriów [25]. O większej aktywności fuzyjnej *Mfn1* świadczy również fakt, że zmutowana *Mfn2* może pośredniczyć w fuzji mitochondriów poprzez oddziaływanie z prawidłową *Mfn1*, ale nie *Mfn2* [4]. Ponadto w regulacji fuzji mitochondriów ważną rolę odgrywają dwa enzymy o aktywności deubikwitynaz (*Ubp2* i *Ubp12*, które katalizują odłączanie ubikwityny (*ubq*) przyłączonej do utrwalonych ewolucyjnie reszt lizyny w cząsteczce *Mfn2*. *Ubp2* odłączając jeden z łańcuchów *Ubq* hamuje proteolizę *Mfn2* i nasila fuzję. *Ubp12* rozpoznaje i hydrolizuje inny łańcuch *Ubq*, który stabilizuje *Mfn2* gdy białko występuje w formie oligomery, który tworzy się w trakcie fuzji błon, a zatem aktywność *Ubp12* obserwowana jest po oligomeryzacji i prowadzi do hamowania fuzji [26].

Mitofuzyna 1 oddziałuje także z białkiem *Opa1* odpowiedzialnym za fuzję wewnętrznej błony mitochondrialnej, uczestnicząc tym samym w koordynacji fuzji obu błon mitochondrialnych. Oddziaływanie *Mfn1* z *Opa1* jest konieczne zarówno do utrzymania prawidłowej struktury mitochondriów, jak i tworzenia prawidłowej sieci mitochondrialnej [27]. Co więcej, wykazano, że zaburzenia fuzji i metabolizmu mitochondriów towarzyszące zahamowaniu ekspresji *Opa1*, jak i obu mitofuzyn jednocześnie [27] są bardzo zbliżone, co potwierdza współdziałanie tych białek.

UDZIAŁ MITOFUZYN 2 W TWORZENIU POŁĄCZEŃ POMIĘDZY MITOCHONDRIAMI A SIATECZKĄ ŚRÓDPLAZMATYCZNĄ

Zjawisko tworzenia dimerów przez mitofuzyny ma również znaczenie dla współwystępowania i oddziaływania mitochondriów z siateczką śródplazmatyczną. W przeciwieństwie do mitochondriów zawierających obie formy mitofuzyny (*Mfn2* i *Mfn1*) w siateczce śródplazmatycznej występuje tylko *Mfn2*. Wydaje się, że o ile rola *Mfn1* jest szczególnie istotna w procesie fuzji mitochondriów, to *Mfn2* ma szereg innych funkcji w komórce [28].

Mfn2 jest niezbędna zarówno dla zachowania prawidłowej morfologii siateczki śródplazmatycznej, jak i jej umiejscowienia względem mitochondriów, czyli wzajemnego oddziaływania tych dwóch organelli [23]. Wykazano, że obszar Mfn2 oddziałujący z białkami Ras jest niezbędny aby Mfn2 mogła pośredniczyć w tworzeniu połączeń pomiędzy mitochondriami a ER, a brak Mfn2 objawia się zaburzeniami struktury ER (powstawanie agregatów i skupisk) oraz znacznym obniżeniem efektywności pobierania jonów wapnia przez mitochondria w odpowiedzi na aktywację receptora inozytolo-1,4,5-trisfosforanu w siateczce śródplazmatycznej [23]. Mutacje w genie Mfn2 prowadzą do zaburzenia oddziaływania pomiędzy błonami ER i błonami mitochondriów [29], co może powodować zaburzenie dynamiki, a zatem czasu trwania i intensywności lokalnego sygnału wapniowego w komórce [28].

Co ważne, niektóre mutacje w obrębie rejonów HR2 mitofuzyny 2, związane z CMT2A, a zatem interesujące z punktu widzenia patofizjologii tej choroby, zaburzą oddziaływania między mitochondriami i ER oraz istotnie zmieniają architekturę siateczki śródplazmatycznej. To powoduje oddalenie się tych struktur od siebie i wpływa na intensywność i profil sygnału wapniowego. W efekcie może to być przyczyną niewłaściwej transmisji synaptycznej [21]. Buforowanie Ca^{2+} jest jedną z ważnych funkcji mitochondriów, która ma kluczowe znaczenie w regulacji lokalnego stężenia tych jonów. Bliskie sąsiedztwo i oddziaływanie magazynów wapniowych w siateczce śródplazmatycznej i z mitochondriami, wymagające obecności prawidłowej mitofuzyny 2 jest warunkiem wydajnego pobierania Ca^{2+} uwalnianego z magazynów wapniowych, co może sprzyjać ich opróżnianiu. Jest to warunkiem koniecznym do aktywacji tzw. napływu pojemnościowego jonów wapnia do komórki. Podobnie buforowanie Ca^{2+} wnikających do komórki, zapobiega zwrotnemu hamowaniu kanału wapniowego w błonie plazmatycznej przez nagromadzające się w jego pobliżu jony Ca^{2+} i podtrzymuje napływ pojemnościowy [30]. Jednakże samo buforowanie Ca^{2+} (obok oczywistego dla utrzymywania homeostazy wapniowej wytwarzania ATP) chociaż niewątpliwie istotne nie wyczerpuje wszystkich możliwości wpływania mitochondriów na homeostazę wapniową komórki. W przypadku napływu pojemnościowego kluczowymi etapami są: (i) opróżnienie magazynów wapniowych prowadzące do horyzontalnego przemieszczania się białka STIM1 w błonie siateczki śródplazmatycznej i tworzenia agregatów; (ii) przemieszczenie się tych agregatów do miejsc kontaktu ER i błony plazmatycznej; (iii) oddziaływanie białka STIM1 z białkiem Orai w błonie plazmatycznej, co powoduje otwarcie kanałów wapniowych w PM. Obecnie wydaje się, że drugi z tych etapów czyli migracja agregatów STIM1 w błonie siateczki śródplazmatycznej wymaga udziału Mfn2 w mitochondriach oraz jest zależny od potencjału błony mitochondrialnej, natomiast nie zależy ani od ATP ani od zdolności mitochondriów do buforowania jonów wapnia [31].

W mięśniach szkieletowych charakteryzujących się szczególnym uporządkowaniem mitochondriów warunkowa eliminacja Mfn 2 powoduje zaburzenia ich lokalizacji i morfologii a także metabolizmu, co w efekcie prowadzi do zmniejszenia potencjału błony mitochondrialnej oraz

w efekcie osłabionego pobierania Ca^{2+} przez mitochondria [32].

Oddziaływania między mitochondriami i innymi organellami z udziałem Mfn2 nie ograniczają się do siateczki śródplazmatycznej. Wykazano bowiem, że Mfn2 uczestniczy w oddziaływaniach z melanosomami i powstawanie takich oddziaływań, podobnych w swojej strukturze do oddziaływań mitochondriów z siateczką śródplazmatyczną jest związane z biogenezą tych organelli. Niewykluczone, że rola mitochondriów podobnie jak w przypadku ich oddziaływań z ER polega na buforowaniu Ca^{2+} uwalnianego z melanosomów w czasie ich dojrzewania. Pozbawienie genu mitofuzyny 2 (podobnie jak zahamowanie wytwarzania ATP w mitochondriach) uniemożliwia tworzenie takich oddziaływań i dojrzewanie melanosomów [35, 36].

WPLYW MITOFUZYNY 2 NA TEMPO PODZIAŁU I PROCES RÓŻNICOWANIA KOMÓREK

Obecność obszaru oddziałującego z białkami Ras w strukturze Mfn2 wskazuje na udział tego białka w szlakach sygnałowych związanych z cyklem komórkowym, co potwierdzają badania *in vitro* i *in vivo*. U szczurów szczepu SHR (ang. *spontaneously hypertensive rat*) zaobserwowano, że rozrostowi mięśni gładkich naczyń krwionośnych towarzyszy zmniejszona ekspresja genu mitofuzyny 2 podczas gdy nadekspresja tego genu powodowała zmniejszenie tempa proliferacji, natomiast zwiększała proapoptotyczny wpływ H_2O_2 . Pierwotnie, gen mitofuzyny 2 badany był w kontekście patologii nadciśnienia tętniczego i znany był pod nazwą HSG (ang. *hyperplasia suppressor gene*) [37].

Antyproliferacyjne działanie mitofuzyny 2 związane jest z hamowaniem szlaku kinaz ERK/MAPK i może być niezależne od aktywności fuzyjnej tego białka [37]. Co więcej, wpływ Mfn 2 na ten szlak wymaga udziału zarówno końca aminowego, jak i karboksylowego mitofuzyny 2. Koniec aminowy może oddziaływać z białkiem Raf-1 i efekt ten wydaje się niezależny od lokalizacji białka w komórce. Natomiast koniec karboksylowy może zmieniać aktywność szlaku ERK/MAPK poprzez oddziaływanie z białkiem Ras [38].

Wykazano, że oddziaływanie Mfn2 z białkiem Ras odgrywa znaczącą rolę w miogenezie zależnej od insuliny. Na skutek aktywacji kinazy PI3-K dochodzi do wzmożonej aktywności mitochondriów i nasilenia ich fuzji. Insulina wydaje się stymulować ekspresję genu Mfn2, która poprzez związanie z białkiem Ras hamuje szlak sygnałowy zależny od kinazy MEK, co w efekcie powoduje zahamowanie podziału mioblastów i ich ukierunkowanie na różnicowanie [39].

Zmiany ekspresji genu kodującego Mfn2 towarzyszą także rozrostowi nowotworów. W 2010 roku wykazano, metodą analizy informatycznej sekwencji genu i białka poprzez badania *in vitro* i *in vivo*, że białko p53 może oddziaływać z promotorem genu mitofuzyny 2, wpływając na jego ekspresję [40]. W ostatnich latach zaobserwowano, że w komórkach nowotworowych ekspresja genu Mfn2 jest obniżona [41], a jej przywrócenie hamuje wzrost guzów co

obserwowano zarówno w hodowlach *in vitro* [42] jak i w układzie *in vivo* u myszy [43].

Badania ostatnich lat wykazały również udział mitofuzyny w procesie różnicowania komórek macierzystych. Pokazano, że zahamowanie ekspresji obu mitofuzyn powoduje odróżnicowanie komórek somatycznych poprzez oddziaływanie ze szlakiem p53-p51, a przemianom tym towarzyszy zmiana metabolizmu energetycznego komórki z fosforylacji oksydacyjnej na glikolityczny, co odbywa się poprzez zmiany aktywności szlaku Ras-Raf oraz z udziałem czynnika HIF-1a [44].

Udział Mfn2 w tworzeniu oddziaływań mitochondriów z siateczką śródplazmatyczną i w efekcie w buforowaniu jonów wapnia ma istotne znaczenie w regulacji aktywności czynnika NFAT w komórkach układu odpornościowego. Dysfunkcja Mfn2 powoduje nadmierny wzrost stężenia Ca^{2+} w cytosolu, aktywację kalcyneuryny i w efekcie NFAT, co sprzyja różnicowaniu komórek hematopoetycznych. A zatem, Mfn2 ma kluczowe znaczenie w procesie hematopoezy i w utrzymaniu puli hematopoetycznych komórek macierzystych o zachowanym potencjale do różnicowania w limfocyty. W komórkach tych właściwy poziom ekspresji genu Mfn2 jest utrzymywany dzięki krótkiej formie koaktywatora transkrypcji Prdm 16, który jest selektywnie wytwarzany w macierzystych komórkach hematopoetycznych [32].

ROLA MITOFUZYN 2 W TRANSPORCIE MITOCHONDRIOW

Wykazano, że Mfn2 umożliwia kotwiczenie mitochondriów do komórkowego systemu transportującego oparte o białka motoryczne: kinezyne i dyneinę. Transport mitochondriów wzdłuż neurofilamentów odbywa się poprzez oddziaływanie mitofuzyny z kompleksem białek Miro i Milton [45]. Wydaje się, że obie mitofuzyny mogą oddziaływać z białkami transportującymi, jednak w neuronach wykazano, że zaburzenia ekspresji genu Mfn2 w większym stopniu upośledzały ruchliwość mitochondriów. Podejrzewa się, że mniejsza rola Mfn1 w transporcie mitochondriów w aksonach może wynikać z jej stosunkowo niskiej ekspresji w nerwach obwodowych [4, 45].

Zaburzenia transportu mitochondriów wykazano także *in vitro* w hodowli neuronów czuciowych obwodowego układu nerwowego, w których wywołano nadekspresję genu kodującego Mfn2 z mutacją sprawczą CMT2A [46]. Obserwowano obniżenie ruchliwości mitochondriów, ich agregację oraz zaburzenia w rozlokowaniu, zarówno w ciele komórki nerwowej, jak i w aksonie. Nierównomierne rozmieszczenie mitochondriów obserwowano także w biopsjach nerwów chorych z CMT2A. Skupiska mitochondriów obserwowano we wszystkich obszarach komórek nerwowych, z tym, że najsilniej były one zaznaczone w miejscach tworzenia połączeń nerwowych [19].

WPLYW MITOFUZYN 2 NA METABOLIZM

Pomimo dużej homologii w budowie pomiędzy Mfn1 i Mfn2, wykazano, że Mfn2 może pełnić dodatkowe funk-

cje, nie związane z jej funkcją fuzyjną [47]. Związek między Mfn2 a metabolizmem zaproponował po raz pierwszy Zorzano w kontekście badań nad cukrzycą [5]. Obniżenie ekspresji genu Mfn2 opisano zarówno u otyłych szczurów, jak i u chorych z cukrzycą typu II. Zahamowaniu aktywności Mfn2 w wątrobie szczurów towarzyszyły zaburzenia metaboliczne objawiające się m. in. nietolerancją glukozy i nasiloną glukoneogenezą oraz zaburzeniem procesów regulowanych przez insulinę [8].

W komórkach mięśni szkieletowych, których metabolizm jest szczególnie ważny dla utrzymywania właściwego stężenia glukozy w osoczu, zmniejszenie ekspresji genu Mfn2 i związane z tym nieprawidłowe funkcjonowanie mitochondriów powodują zwiększenie wytwarzania H_2O_2 , zaburzenie homeostazy wapniowej, co w efekcie doprowadza do rozwoju stresu siateczkowego, aktywacji kinazy JNK oraz insulinooporności [8]. Istotnie, obniżoną ekspresję Mfn2 opisano także w mięśniach szkieletowych i w wątrobie w warunkach cukrzycy typu 2 [8,33,38]. Uważa się także, że zmniejszone oddziaływanie siateczki śródplazmatycznej i mitochondriów może być przyczyną apoptozy oraz zaburzonej syntezy lipidów, przekazywania synaptycznego i innych procesów, których przebieg zależy od jonów wapnia [8, 34]. Powyższe przykłady i cytowane prace wskazują na bardzo złożone relacje pomiędzy mitochondriami a ER konieczne dla zachowaniu homeostazy wapniowej i poważne skutki ich zaburzenia.

W komórkach, w których ekspresja genu Mfn2 była zahamowana obserwowano obniżenie wartości potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej oraz aktywności cyklu Krebsa, dodatkowo obserwowano zmniejszenie utleniania glukozy oraz wykorzystania tlenu [7]. W komórkach mięśni szkieletowych stan ten sprzyjał nasileniu beztlenowej glikolizy w odpowiedzi na energetyczne zapotrzebowanie komórki oraz znacznie zmniejszał utlenianie glukozy, potencjał błony mitochondrialnej, zużycie tlenu, wywołane brakiem Mfn2 [5].

Poprzez udział w tworzeniu prawidłowej sieci mitochondrialnej oraz pośredniczenie w oddziaływaniu mitochondriów z siateczką śródplazmatyczną mitofuzyna 2 jest istotna w regulacji procesów bioenergetycznych. Mfn2 może również wpływać na procesy bioenergetyczne niezależnie od udziału w fuzji mitochondriów, m.in. poprzez wpływ na ekspresję genów kodujących w genomie jądrowym białka łańcucha oddechowego [7]. W badaniach *in vitro* wykazano, że brak Mfn2 znacząco obniża syntezę kodowanych jądrowo białek podjednostek kompleksów I, II, III i V, natomiast nadekspresja jej genu powoduje zwiększoną syntezę białek kompleksu I, IV i V, pozostając bez wpływu na kompleks II i III. Mechanizm tej zależności nie został w pełni poznany.

Wykazano, że mitochondria izolowane z mózgowi myszy transgenicznych zawierających ludzką Mfn2 z mutacją R49Q stwierdzaną u chorych na CMT charakteryzują się zmniejszeniem aktywności kompleksów oddechowych II i V i w efekcie zmniejszoną wydajnością oksydacyjnej fosforylacji. Intrygującą obserwacją było cofanie tych efektów w obecności inhibitora mitochondrialnego kanału potasowego hamowanego ATP (mKATP) a także ich wywołanie

przez podanie aktywatora tego kanału niezależnie od mutacji w genie mitofuzyny 2. Obserwacje te nie tylko sugerują ściśle oddziaływanie między kompleksami łańcucha oddechowego i mKATP, ale także rzucają nowe światło na patogenezę choroby CMT [27]

W badaniach na fibroblastach chorych z CMT2A również obserwowano zaburzenia aktywności kompleksów oddechowych oraz wynikające z tego obniżenie potencjału błonowego mitochondriów [15]. Ponadto wiele badań potwierdza, że wpływ Mfn2 na metabolizm może być niezwiązany z jej aktywnością fuzyjną. Wykazano to m. in. w badaniach z udziałem zmodyfikowanej Mfn2, pozbawionej domen kotwiczących to białko w błonie mitochondrium. Mitofuzyna 2 pozbawiona domeny transbłonowej nie może pośredniczyć w fuzji mitochondriów, jednak wykazano związek pomiędzy ekspresją genu tak zmodyfikowanej mitofuzyny 2 a nasileniem metabolizmu komórkowego [48].

UDZIAŁ MITOFUZYN 2 W KONTROLI JAKOŚCI MITOCHONDRIOW I MITOFAGII

Procesem przeciwnym z punktu widzenia skutków do biogenezy mitochondriów jest mitofagia. Jest to proces prowadzący do eliminacji wadliwych mitochondriów poprzez ich połączenie z autofagosomem. Rozważania o zależnościach dynamiki mitochondriów i kontroli ich jakości można znaleźć w pracy przeglądowej [49]. Najlepiej poznanym mechanizmem mitofagii u ssaków jest eliminacja mitochondriów z udziałem kinazy PINK1 (ang. *PTEN-induced kinase 1*) oraz zależnej od PINK1 rekrutacji ligazy E3 ubikwityny, Parkiny. Kinaza PINK1 ma domenę kierującą białko do mitochondriów w związku z czym jest transportowana przez błony mitochondrialne a następnie degradowana. Natomiast w mitochondriach o zaburzonym potencjale błonowym, kinaza PINK1 kumuluje się w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Kinaza PINK1 rekrutuje Parkinę, która po ufosforylowaniu przez PINK1 odpowiada za ubikwitynylację wybranych białek na powierzchni mitochondrium, a powstałe łańcuchy ubikwityny są sygnałem do dalszych etapów degradacji w systemie UPS (ang. *ubiquitin proteasome system*).

Do niedawna sądzono, że w procesie mitofagii mitofuzyna 2 podlega ubikwitynylacji przez aktywowaną przez PINK1 Parkinę, podobnie jak szereg innych białek zewnętrznej błony mitochondrialnej. Badania ostatnich lat wykazały jednak szczególną rolę Mfn2 w tym procesie. W początkowym etapie mitofagii, PINK1 fosforyluje reszty treoniny 111 i seryny 442 w cząsteczce Mfn2, która w tej formie bezpośrednio uczestniczy w przyłączeniu Parkiny, stanowiąc niejako jej receptor, a całkowity brak Mfn2 hamuje translokację Parkiny do mitochondriów [50].

Jak wykazano w badaniach kardiomiocytów *in vitro*, możliwość eliminacji mitochondriów na drodze mitofagii jest istotna w przemianie metabolicznej komórek o charakterze płodowym, które pozyskują energię głównie z metabolizmu węglowodanów w dojrzałe kardiomiocyty wykorzystujące metabolizm kwasów tłuszczowych [51]. O znaczeniu prawidłowego procesu mitofagii dla losów komórek świadczy wiele zjawisk, m.in. fakt, że mutacje w genie

PINK1 oraz Parkiny są bezpośrednią przyczyną rodzinnych postaci choroby Parkinsona [52].

MFN2 W KARDIOPROTEKCJI I NEUROPROTEKCJI

W innych badaniach z udziałem kardiomiocytów wykazano, że całkowite usunięcie Mfn2 z mitochondriów opóźnia otwarcie megakanalu mitochondrialnego (MPTP) oraz zwiększa tolerancję komórek dla wysokich stężeń jonów wapnia i reaktywnych form tlenu. W efekcie przeżywalność tych komórek po epizodzie ischemiczno-reperfuzyjnym jest znacząco zwiększona. Doświadczenia prowadzono na izolowanych mitochondriach w związku z czym przypuszcza się, że udział oddziaływań mitochondrialnych z siateczką śródplazmatyczną ma niewielki udział w tym zjawisku. Natomiast wpływ Mfn2 na utworzenie megakanalu mitochondrialnego, a jednocześnie regulowanie stężenia jonów wapnia w cytoplazmie oraz tworzeniu reaktywnych form tlenu, może stanowić element między mitochondrialnego przekazywania sygnału, umożliwiającą skoordynowanie mitochondrialnego potencjału błonowego z całym szeregiem zjawisk komórkowych np. depolaryzacją błony komórkowej. Ponieważ Mfn2 nie musi bezpośrednio uczestniczyć w powstaniu MPTP przypuszcza się, że jej modulujący wpływ na powstanie megakanalu mitochondrialnego może wynikać pośrednio z jej funkcji fuzyjnej i modelującej błonę mitochondrialną. Mfn2 może także oddziaływać z białkami Bax i Bad, które uczestniczą w powstaniu porów w zewnętrznej błonie mitochondrialnej (MOMP, ang. *mitochondria outer membrane permeabilization*) [53].

Natomiast przeciwny, anty-apoptotyczny efekt mitofuzyny 2 wykazano w badaniach na komórkach hipokampa [54,55]. W modelach *in vivo* i *in vitro* wykazano, że na skutek hipoksji dochodzi do obniżenia ekspresji genu Mfn2 oraz aktywacji szlaku sygnałowego zależnego od kinazy ERK1/2. Nadekspresja genu kodującego Mfn2 w neuronach hipokampa zwiększała przeżywalność komórek, czemu towarzyszyło zahamowanie fragmentacji mitochondriów oraz wzrost stosunku białek Bcl-2/Bax, który ulega obniżeniu na skutek hipoksji. Dodatkowo wykazano, że Mfn2 w komórkach HEK293 bezpośrednio oddziałuje z białkami z rodziny Bcl-xl, co może sugerować, że anty-apoptotyczna rola Mfn2 odbywa się poprzez jej oddziaływanie z białkami rodziny Bcl-2 [55].

Powyższe obserwacje wyraźnie wskazują, że wpływ Mfn2 na proces apoptozy jest bardzo złożony i zależy od wielu czynników, m.in. typu komórki. Jednocześnie prace ostatnich lat rzucają nowe światło zarówno na rolę Mfn2 w mitofagii jak i neuroprotekcijną rolę mitofagii w uszkodzeniu niedokrwiennym.

Przypuszcza się, że neuroprotekcynny efekt mitofagii może wynikać z eliminacji uszkodzonych mitochondriów, dzięki czemu ograniczeniu ulega wypływ cytochromu c z mitochondriów, a co za tym idzie ograniczenie aktywacji zależnej od mitochondriów apoptozy. Jednocześnie rola białek zaangażowanych w dynamikę sieci mitochondrialnej m.in. Mfn1 i Mfn2 oraz Drp1 (ang. *dynamamin related protein 1*) w uszkodzeniu ischemiczno-re-

perfuzyjnym mózgu jest intensywnie badana, biorąc pod uwagę fakt, że podział mitochondriów sprzyja inicjacji mitofagii i może być elementem neuroprotekcijnym. A zatem lepsze poznanie mechanizmów mitofagii w ischemicznym uszkodzeniu mózgu, jak również roli Mfn2 w tym procesie może przyczynić się do opracowania strategii terapeutycznych.

MUTACJE W GENIE MITOFUZyny 2

Locus genu Mfn2 w genomie jądrowym człowieka zlokalizowano, na krótkim ramieniu chromosomu pierwszej pary (w pozycji 1p36.22). Zawiera on 19 obszarów kodujących (eksonów), których sekwencja nukleotydowa jest zachowana ewolucyjnie.

Mitofuzyna 2, wraz ze swoim analogiem, mitofuzyną 1, stanowią odpowiednik (ortolog) białka Fzo1 (ang. *Fuzzy Onion Protein*) drożdży oraz białka Fzo muszki owocówki *Drosophila melanogaster* [20]. Stwierdzono także wysoki stopień podobieństwa genu Mfn2 u ludzi i gryzoni, wynoszący odpowiednio 95% w odniesieniu do genu Mfn2 szczura [5] oraz 90% w odniesieniu do genu Mfn2 myszy [56].

Dotychczas zidentyfikowano ponad 100 mutacji w genie Mfn2 o prawdopodobnym charakterze patogennym [57]. Większość z nich jest mutacjami punktowymi zmiany sensu, prowadzącymi do zamiany jednego z aminokwasów budujących białko Mfn2. Zdecydowana większość mutacji spotykanych u ludzi w genie Mfn2 lokalizuje się w domenie hydrolizującej GTP [22]. Najczęściej spotykaną mutacją wśród niespokrewnionych chorych z CMT2A jest mutacja 94-ego kodonu, czyli argininy. Kodon ten znajduje się na skraju domeny GTPazowej, w regionie ewolucyjnie zachowanym.

Mutacje w genie Mfn2 są dziedziczone w sposób autosomalny dominujący. Jednak w ostatnich latach opisano pojedyncze niespokrewnione rodziny, w których dziedziczenie mutacji Mfn2 odbywa się w sposób recesywny lub o domniemanym recesywnym charakterze [58].

Jak dotąd nie udało się stwierdzić prawidłowości pomiędzy rodzajem i miejscem wystąpienia mutacji a nasileniem objawów choroby CMT2A. Zaobserwowano, że formy CMT2A, w których na skutek mutacji w genie Mfn2 dochodzi także do uszkodzenia nerwu wzrokowego charakteryzuje cięższy przebieg [18]. Z kolei u wszystkich rodzin, u których stwierdzono recesywny sposób dziedziczenia mutacji Mfn2, notowano wczesne pojawienie się pierwszych symptomów choroby [58].

Z uwagi na brak prawidłowości pomiędzy typem mutacji a obrazem klinicznym nie można wykluczyć, że do uszkodzenia aksonalnego towarzyszącego chorobie CMT2A przyczyniają się różne zjawiska, wynikające zarówno z zaburzenia sieci mitochondrialnej, metabolizmu mitochondriów, jak i ich transportu wzdłuż aksonów. Niemniej jednak, specyficzność objawów ograniczona do nerwów obwodowych skłania do poszukiwań wspólnego mechanizmu uszkodzenia.

PODSUMOWANIE

Przedstawione powyżej przykłady nie wyczerpują wszystkich procesów komórkowych, w których uczestniczy mitofuzyna 2. Celem było wskazanie, że mitofuzyna 2 jest białkiem o wielu funkcjach. Większość z nich, ale nie wszystkie, jest związanych z jej udziałem w fuzji mitochondriów, tworzeniem sieci mitochondrialnej i jej oddziaływaniem z siateczką śródplazmatyczną, co ściśle wiąże się z homeostazą wapniową komórki. Udział mitofuzyny 2 w przebiegu CMT typu 2A oraz w innych stanach chorobowych nie będących neuropatiami podkreśla znaczenie tego białka w komórkach różnych typów. Jego badanie może mieć istotne znaczenie dla poznania patofizjologii wielu chorób.

PIŚMIENNICTWO

1. Tzagoloff A (1982) Mitochondria. Plenum Press, New York, 1-342
2. Chen H, Chomyn A, Chan DC (2005) Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* 280: 26185-26192
3. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 160: 189-200
4. Detmer SA, Chan DC (2007) Complementation between mouse Mfn1 and Mfn2 protects mitochondrial fusion defects caused by CMT2A disease mutations. *J Cell Biol* 176: 405-414
5. Bach D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, Daugaard JR, Lloberas J, Camps M, Zierath JR, Rabasa-Lhoret R, Wallberg-Henriksson H, Laville M, Palacin M, Vidal H, Rivera F, Brand M, Zorzano A (2003) Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem* 278: 17190-17197
6. Cartoni R, Leger B, Hock MB, Praz M, Crettenand A, Pich S, Ziltener JL, Luthi F, Deriaz O, Zorzano A, Gobelet C, Kralli A, Russell AP (2005) Mitofusins 1/2 and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *J Physiol* 567: 349-358
7. Pich S, Bach D, Briones P, Liesa M, Camps M, Testar X, Palacin M, Zorzano A (2005) The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum Mol Genet* 14: 1405-1415
8. Sebastian D, Hernandez-Alvarez MI, Segales J, Soriano E, Munoz JP, Sala D, Waget A, Liesa M, Paz JC, Gopalacharyulu P, Oresic M, Pich S, Burcelin R, Palacin M, Zorzano A (2012) Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 5523-5528
9. Cartoni R, Martinou JC (2009) Role of mitofusin 2 mutations in the pathophysiology of Charcot-Marie-Tooth disease type 2A. *Exp Neurol* 218: 268-273
10. Chen H, McCaffery JM, Chan DC (2007) Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* 130: 548-562
11. Chen H, Vermulst M, Wang YE, Chomyn A, Prolla TA, McCaffery JM, Chan DC (2010) Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell* 141: 280-289
12. Jornayvaz FR, Shulman GI (2010) Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem* 47: 69-84
13. Bestwick ML, Shadel GS (2013) Accessorizing the human mitochondrial transcription machinery. *Trends Biochem Sci* 38: 283-291
14. Rouzier C, Bannwarth S, Chaussonnet A, Chevrollier A, Verschueren A, Bonello-Palot N, Fragaki K, Cano A, Pouget J, Pellissier JF, Procaccio V, Chabrol B, Paquis-Flucklinger V (2012) The MFN2 gene is responsible for mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotype. *Brain* 135: 23-34

15. Loiseau D, Chevrollier A, Verny C, Guillet V, Gueguen N, Pou de Crescenzo MA, Ferre M, Malinge MC, Guichet A, Nicolas G, Amati-Bonneau P, Malthiery Y, Bonneau D, Reynier P (2007) Mitochondrial coupling defect in Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Ann Neurol* 61: 315-323
16. Niemann A, Ruegg M, La P, V, Schenone A, Suter U (2005) Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol* 170: 1067-1078
17. Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E, Astarie-Dequeker C, Lasquelles L, Arnaud B, Ducommun B, Kaplan J, Hamel CP (2000) Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 26: 207-210
18. Zuchner S, De Jonghe P, Jordanova A, Claeys KG, Guergueltcheva V, Cherninkova S, Hamilton SR, Van Stavern G, Krajewski KM, Stajich J, Tournev I, Verhoeven K, Langerhorst CT, de Visser M, Baas F, Bird T, Timmerman V, Shy M, Vance JM (2006) Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin 2. *Ann Neurol* 59: 276-281
19. Verhoeven K, Claeys KG, Zuchner S, Schroder JM, Weis J, Ceuterick C, Jordanova A, Nelis E, De Vriendt E, Van Hul M, Seeman P, Mazanec R, Saifi GM, Szigeti K, Mancias P, Butler IJ, Kochanski A, Ryniewicz B, De Bleecker J, Van den BP, Verellen C, Van Coster R, Goemans N, Auer-Grumbach M, Robberecht W, Milic R, V, Nevo Y, Tournev I, Guergueltcheva V, Roelens F, Vierregge P, Vinci P, Moreno MT, Christen HJ, Shy ME, Lupski JR, Vance JM, De Jonghe P, Timmerman V (2006) MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2. *Brain* 129: 2093-2102
20. Santel A, Fuller MT (2001) Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci* 114: 867-874
21. Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, Chan DC (2004) Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 305: 858-862
22. Zorzano A, Liesa M, Sebastian D, Segales J, Palacin M (2010) Mitochondrial fusion proteins: Dual regulators of morphology and metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 6: 566-574
23. de Brito OM, Scorrano L (2009) Mitofusin-2 regulates mitochondrial and endoplasmic reticulum morphology and tethering: the role of Ras. *Mitochondrion* 9: 222-226
24. Santel A, Frank S, Gaume B, Herrler M, Youle RJ, Fuller MT (2003) Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci* 116: 2763-2774
25. Ishihara N, Eura Y, Mihara K (2004) Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions *via* GTPase activity. *J Cell Sci* 117: 6535-6546
26. Anton F, Dittmar G, Langer T, Escobar-Henriques M (2013) Two deubiquitylases act on mitofusin and regulate mitochondrial fusion along independent pathways. *Mol Cell* 49: 487-498
27. Cipolat S, Martins de BO, Dal ZB, Scorrano L (2004) OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15927-15932
28. de Brito OM, Scorrano L (2008) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456: 605-610
29. Merkwirth C, Langer T (2008) Mitofusin 2 builds a bridge between ER and mitochondria. *Cell* 135: 1165-1167
30. Duszynski J, Koziel R, Brutkowski W, Szczepanowska J, Zablocki K (2006) The regulatory role of mitochondria in capacitative calcium entry. *Biochim Biophys Acta* 1757: 380-387
31. Singaravelu K, Nelson C, Bakowski D, de Brito OM, Ng SW, Di CJ, Powell T, Scorrano L, Parekh AB (2011) Mitofusin 2 regulates STIM1 migration from the Ca²⁺ store to the plasma membrane in cells with depolarized mitochondria. *J Biol Chem* 286: 12189-12201
32. Ainbinder A, Boncompagni S, Protasi F, Dirksen RT (2015) Role of Mitofusin-2 in mitochondrial localization and calcium uptake in skeletal muscle. *Cell Calcium* 57: 14-24
33. Bach D, Naon D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Rieusset J, Laville M, Guillet C, Boirie Y, Wallberg-Henriksson H, Manco M, Calvani M, Castagneto M, Palacin M, Mingrone G, Zierath JR, Vidal H, Zorzano A (2005) Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *Diabetes* 54: 2685-2693
34. Mattson MP, Gleichmann M, Cheng A (2008) Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron* 60: 748-766
35. Daniele T, Hurbain I, Vago R, Casari G, Raposo G, Tacchetti C, Schiaffino MV (2014) Mitochondria and melanosomes establish physical contacts modulated by Mfn2 and involved in organelle biogenesis. *Curr Biol* 24: 393-403
36. Daniele T, Schiaffino MV (2014) Organelle biogenesis and interorganelle connections: Better in contact than in isolation. *Commun Integr Biol* 7: e29587
37. Chen KH, Guo XM, Ma DL, Guo YH, Li QA, Yang DM, Li PF, Qiu XY, Wen SJ, Xiao RP, Tang JA (2004) Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders. *Nature Cell Biology* 6: 872-883
38. Chen KH, Dasgupta A, Ding J, Indig FE, Ghosh P, Longo DL (2014) Role of mitofusin 2 (Mfn2) in controlling cellular proliferation. *FASEB J* 28:382-394
39. Pawlikowska P, Gajkowska B, Orzechowski A (2007) Mitofusin 2 (Mfn2): a key player in insulin-dependent myogenesis *in vitro*. *Cell Tissue Res* 327: 571-581
40. Wang W, Cheng X, Lu J, Wei J, Fu G, Zhu F, Jia C, Zhou L, Xie H, Zheng S (2010) Mitofusin-2 is a novel direct target of p53. *Biochem Biophys Res Commun* 400: 587-592
41. Cheng X, Zhou D, Wei J, Lin J (2013) Cell-cycle arrest at G2/M and proliferation inhibition by adenovirus-expressed mitofusin-2 gene in human colorectal cancer cell lines. *Neoplasma* 60: 620-626
42. Wang W, Lu J, Zhu F, Wei J, Jia C, Zhang Y, Zhou L, Xie H, Zheng S (2012) Pro-apoptotic and anti-proliferative effects of mitofusin-2 via Bax signaling in hepatocellular carcinoma cells. *Med Oncol* 29: 70-76
43. Wang W, Zhu F, Wang S, Wei J, Jia C, Zhang Y, Zhou L, Xie H, Zheng S (2010) HSG provides antitumor efficacy on hepatocellular carcinoma both *in vitro* and *in vivo*. *Oncol Rep* 24: 183-188
44. Son MJ, Kwon Y, Son MY, Seol B, Choi HS, Ryu SW, Choi C, Cho YS (2015) Mitofusins deficiency elicits mitochondrial metabolic reprogramming to pluripotency. *Cell Death Differ* 22: 1957-1969
45. Misko A, Jiang S, Wegorzewska I, Milbrandt J, Baloh RH (2010) Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex. *J Neurosci* 30: 4232-4240
46. Baloh RH, Schmidt RE, Pestronk A, Milbrandt J (2007) Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations. *J Neurosci* 27: 422-430
47. de Brito OM, Scorrano L (2008) Mitofusin 2: a mitochondria-shaping protein with signaling roles beyond fusion. *Antioxid Redox Signal* 10: 621-633
48. Segales J, Paz JC, Hernandez-Alvarez MI, Sala D, Munoz JP, Noguera E, Pich S, Palacin M, Enriquez JA, Zorzano A (2013) A form of mitofusin 2 (Mfn2) lacking the transmembrane domains and the COOH-terminal end stimulates metabolism in muscle and liver cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305: E1208-E1221
49. Shutt TE, McBride HM (2013) Staying cool in difficult times: mitochondrial dynamics, quality control and the stress response. *Biochim Biophys Acta* 1833: 417-424
50. Chen Y, Dorn GW (2013) PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. *Science* 340: 471-475
51. Gong G, Song M, Csordas G, Kelly DP, Matkovich SJ, Dorn GW (2015) Parkin-mediated mitophagy directs perinatal cardiac metabolic maturation in mice. *Science* 350: aad2459
52. McNaught KS, Belzair R, Isacson O, Jenner P, Olanow CW (2003) Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Exp Neurol* 179: 38-46
53. Papanicolaou KN, Khairallah RJ, Ngoh GA, Chikando A, Luptak I, O'Shea KM, Riley DD, Lugus JJ, Colucci WS, Lederer WJ, Stanley WC, Walsh K (2011) Mitofusin-2 maintains mitochondrial structure and contributes to stress-induced permeability transition in cardiac myocytes. *Mol Cell Biol* 31: 1309-1328

54. Yuan Y, Zhang X, Zheng Y, Chen Z (2015) Regulation of mitophagy in ischemic brain injury. *Neurosci Bull* 31: 395-406
55. Peng C, Rao W, Zhang L, Wang K, Hui H, Wang L, Su N, Luo P, Hao YL, Tu Y, Zhang S, Fei Z (2015) Mitofusin 2 ameliorates hypoxia-induced apoptosis *via* mitochondrial function and signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 69: 29-40
56. Zuchner S, Mersyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schroder JM, Vance JM (2004) Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 36: 449-451
57. Bergamin G, Boaretto F, Briani C, Pegoraro E, Cacciavillani M, Martinuzzi A, Muglia M, Vettori A, Vazza G, Mostacciuolo ML (2014) Mutation analysis of MFN2, GJB1, MPZ and PMP22 in Italian patients with axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med* 16: 540-550
58. Polke JM, Laura M, Pareyson D, Taroni F, Milani M, Bergamin G, Gibbons VS, Houlden H, Chamley SC, Blake J, Devile C, Sandford R, Sweeney MG, Davis MB, Reilly MM (2011) Recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease due to compound heterozygous mitofusin 2 mutations. *Neurology* 77: 168-173

Mitofusin 2 and mitochondrial dynamics in norm and pathology

Maria Kawalec¹, Małgorzata Beręsewicz¹, Krzysztof Zabłocki², Barbara Zabłocka^{1,✉}

¹Molecular Biology Unit, Mossakowski Medical Research Centre, PAS, 5 A. Pawińskiego St., 02-106 Warsaw, Poland

²Cell Metabolism Laboratory, Nencki Institute of Experimental Biology, PAS, 3 Pasteura St., 02-093 Warsaw, Poland

✉e-mail: bzablocka@imdik.pan.pl

Key words: mitochondria, mitochondrial network, Mitofusin 2

ABSTRACT

Results of an intensive research performed during last 25 years have revealed that an understanding of biochemical and molecular principles of oxidative phosphorylation has not finished the streak of ground-breaking discoveries of newly identified mitochondrial functions in numerous cellular processes. Among other things it has been shown that mitochondria undergo reversible fission and fusion processes, and may form a complex network which functionally and structurally interacts with the endoplasmic reticulum membranes and probably also other organelles. An organization of mitochondrial network is closely controlled and is of high importance for numerous intracellular processes to occur properly. In this review, mitofusin 2 – one of a few proteins involved in a maintenance of an appropriate mitochondrial architecture, and in the consequence in the regulation of mitochondrial metabolism and calcium signalling, the controlling of the mitochondrial DNA level, and the regulation of cell proliferation and differentiation is the focus. Mutations within mitofusin 2-encoding gene are a cause of Charcot-Marie-Tooth 2A – type neuropathies while an affected expression of this protein seems to be related to neoplasia, type 2 diabetes, or vascular hyperplasia. Numerous experimental data confirm pleiotropic effects of mitofusin 2 in animal cells.