

Karolina Drabik

Dominika Malińska

Jerzy Duszyński

Joanna Szczepanowska ✉

Pracownia Bioenergetyki i Błon Biologicznych,  
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa

✉Pracownia Bioenergetyki i Błon  
Biologicznych, Instytut Biologii  
Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul.  
Pasteura 3, 02-093 Warszawa;  
tel.: (22) 589 23 45,  
e-mail: j.szczepanowska@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 23 maja 2016 r.  
Artykuł zaakceptowano 30 maja 2016 r.

**Słowa kluczowe:** transport mitochondriów,  
kompleks transportujący, regulacja dystrybucji  
mitochondriów

**Podziękowania:** Praca powstała w trakcie  
realizacji projektu badawczego 2013/08/M/  
N23/00707 finansowanego ze środków przy-  
znanych przez NCN.

## STRESZCZENIE

Mitochondria to wewnątrzkomórkowe struktury pełniące wiele funkcji niezbędnych dla życia komórki. Organella te charakteryzują się dynamiczną naturą, podlegając ciągłym procesom fuzji i fragmentacji oraz wewnątrzkomórkowej dystrybucji. Ruch mitochondriów w komórce odbywa się wzdłuż mikrotubul, poprzez kompleks transportujący, którego głównymi elementami są białka adaptorowe i motoryczne. W zależności od kierunku przemieszczania się mitochondriów (w stronę dystalnych części komórki lub regionu okołojądrowego) w transport zaangażowane są różne białka, podlegające odmiennym regulacjom. W poniższej pracy przedstawione zostanie podsumowanie dotychczasowej wiedzy na temat wewnątrzkomórkowego transportu mitochondriów w komórkach ssaków.

## WPROWADZENIE

Mitochondria pełnią wiele funkcji istotnych dla życia komórki. Biorą udział w produkcji ATP, buforowaniu jonów wapnia, produkcji reaktywnych form tlenu oraz w procesie apoptozy [1,2]. Dzięki ich dynamicznej naturze i możliwości przemieszczania się w obrębie komórki mogą spełniać wiele funkcji jednocześnie w różnych przedziałach komórkowych. Odpowiednie rozmieszczenie mitochondriów jest szczególnie istotne w komórkach o spolaryzowanej budowie, takich jak neurony, których aksony mogą mieć nawet kilka metrów długości. Dzięki prawidłowo działającemu systemowi transportującemu możliwe jest utrzymanie puli prawidłowo funkcjonujących mitochondriów w miejscach o dużym zapotrzebowaniu na energię (np. synapsy i kolce dendrytyczne).

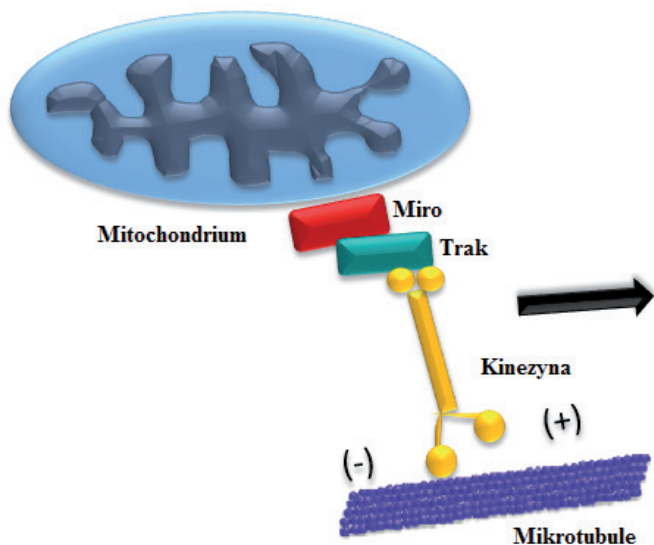
Mitochondria transportowane są wzdłuż mikrotubul, które w aksonach komórek nerwowych są spolaryzowane (koniec plus skierowany jest w kierunku zakończeń aksonalnych). Transport odbywa się przy udziale kompleksu tzw. „transportującego” (ang. *Mitochondrial trafficking complex*), złożonego z dwóch grup białek, adaptorowych („adaptorów”) i motorycznych („motorów”). Białka adaptorowe odpowiedzialne są za umocowanie mitochondriów do białek motorycznych [3-5]. Uważa się, że biogeneza mitochondriów zachodzi w perykarionie, a nowopowstałe organella przemieszczają się w kierunku dystalnych części komórki (w komórkach nerwowych w kierunku synapsy; ang. *anterograde transport*). Natomiast uszkodzone mitochondria są transportowane do obszarów okołojądrowych (ang. *retrograde transport*), gdzie zachodzi ich selektywna degradacja [6-8]. Około 30-40% wszystkich mitochondriów jest w ciągłym ruchu, a ich gęstość w różnych przedziałach komórkowych zależy od aktualnego zapotrzebowania komórki na energię [9].

## TRANSPORT MITOCHONDRIÓW W KIERUNKU DYSTALNYCH CZĘŚCI KOMÓRKI (ANTEROGRADE)

Białka adaptorowe Miro, Trak oraz białko motoryczne kinezyina tworzą najlepiej poznany kompleks transportujący odpowiedzialny za ruch mitochondriów w kierunku dystalnych części komórki (Ryc. 1). W regulacji dystrybucji mitochondriów bierze udział wiele elementów, które oddziałują na poszczególne składowe kompleksu transportującego.

## KINEZYNA

U ssaków w transporcie mitochondriów w stronę dystalnych części komórki uczestniczy kinezyina-1, inaczej zwana KHC (ang. *Kinesin heavy chain*) lub KIF5 [11]. Budowa kinezyiny oparta jest na strukturze tetramerycznej, na którą składa się homodimer łańcucha ciężkiego (KHC) oraz dwa łańcuchy lekkie (KLC1, KLC2, ang. *Kinesin light chain*) [12]. Część N-końcowa kinezyiny jest domeną motoryczną, odpowiedzialną za hydrolizę ATP, część C-końcowa odpowiada za



**Rycina 1.** Schemat budowy kompleksu transportującego mitochondria w stronę dystalnych części komórki: białko motoryczne – kinezyzna; białka adaptorowe – Miro i Trak.

oddziaływanie z łańcuchem lekkim kinezyzny (KLC) oraz białkami adaptorowymi dla przenoszonego ładunku (ang. *cargo*). U ssaków występują trzy geny kodujące KIF5. Kodowane przez nie białka różnią się homodimerem łańcucha ciężkiego: dwa z białek KIF5 są specyficzne dla neuronów (KIF5A i KIF5C), trzecie obecne jest we wszystkich tkankach (KIF5B) [13]. Badania ortologów KIF5 zarówno w muszkach owocowych *Drosophila* jak i w myszach wykazały, że mutacja kinezyzny prowadzi do upośledzenia transportu mitochondriów i tworzenia położonych okołojądrowo klastrów mitochondriów, co wskazuje na to, że KIF5 jest niezbędnym elementem kompleksu transportującego [5,9].

Badania prowadzone z wykorzystaniem komórek z mutacjami w genie KHC wykazały, że zahamowanie transportu związane z brakiem funkcjonalnej kinezyzny nie jest całkowite. Sugeruje to, że inne białka motoryczne również biorą udział w transporcie w kierunku dystalnych części komórki. Są to kinezyzny z rodziny III, takie jak KIF1Ba oraz KLP6 (ang. *Kinesin - Like Protein 6*). Pierwsza z nich występuje w wielu tkankach, ale zaangażowana jest przede wszystkim w transport mitochondriów w zróżnicowanych już komórkach nerwowych [9]. Druga z kolei została odkryta dość niedawno i jest specyficzna tylko dla ssaków [11].

## BIAŁKO MIRO

GTPazy z rodziny tzw. „małych GTPaz” uczestniczą w wielu szlakach sygnalizacyjnych mających wpływ na tak ważne procesy biologiczne jak wzrost i podział komórek. Ich kluczowa rola wynika z pełnienia funkcji „przełączników sygnałowych”. Najlepiej poznaną podrodziną GTPaz jest „Rho”, której przypisuje się rolę w regulacji morfogenezy oraz ruchu komórkowym u kręgowców [14].

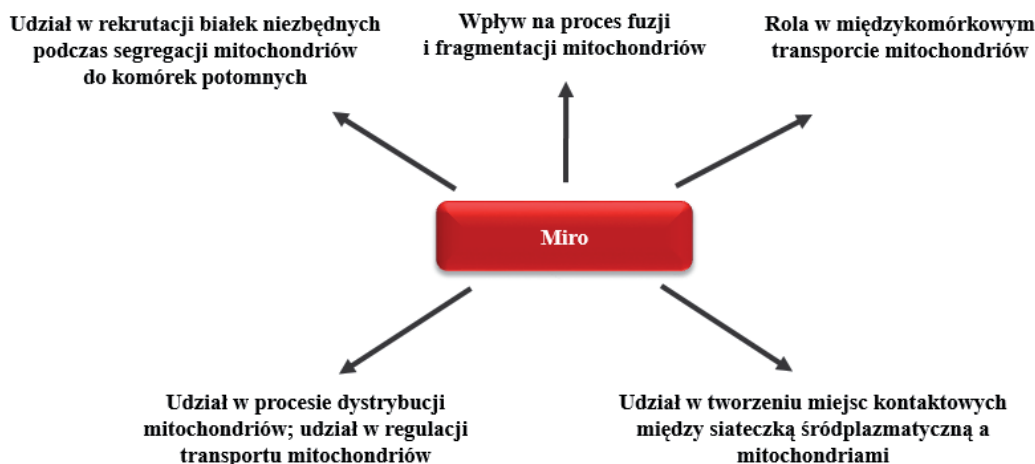
Białko Miro, które jest Rho-podobną małą GTPazą (Miro, ang. *Mitochondrial Rho-like GTPase*) jest ściśle konserwatywne ewolucyjnie. Białko to pełni funkcję adapto-



**Rycina 2.** Schemat budowy białka Miro. N-GTPaza, C-GTPaza, EF1 – pierwszy motyw wiążący wapń; EF2 – drugi motyw wiążący wapń; TM – domena transbłonowa zakotwicząca białko w zewnętrznej błonie mitochondrialnej.

ra, przyczepiając mitochondria do kompleksu transportującego. Szerokie występowanie wśród wielu organizmów eukariotycznych, poczynając od drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, nicieni *Caenorhabditis elegans*, muszek owocowych *Drosophila melanogaster*, na ssakach kończąc, wskazuje na ewolucyjnie wczesne nabycie genów kodujących Miro oraz na jego istotną funkcję w transporcie mitochondriów. We wszystkich grupach organizmów budowa białka pozostaje niezmienna (Ryc. 2). Miro zbudowane jest z dwóch domen GTPazowych, obecnych na N- i C-końcu, które rozdzielone są dwoma powtórzeniami motywów EF-hand wiążących wapń [15]. Dodatkowo na C-końcu białka występuje domena transbłonowa, niezbędna dla zakotwiczenia białka na powierzchni zewnętrznej błony mitochondrialnej [7,16]. U ludzi znaleziono 2 ortologi Miro: Miro1 i Miro2, które są w 60% homologiczne [4]. Białko Miro jest syntetyzowane w wielu tkankach. Poziom białka zależy od rodzaju komórki, w której występuje: najwyższy poziom Miro1 (3 kb) obecny jest w dużych ilościach w sercu i mięśniach szkieletowych, natomiast Miro2 (2,4 kb) w sercu, wątrobie, mięśniach szkieletowych, nerkach i trzustce [14].

Zaangażowanie tego białka w transport mitochondriów po raz pierwszy zostało potwierdzone poprzez doświadczenia z wykorzystaniem komórek NIH3T3 i COS 7 z mutacją Miro. Konstytutywnie aktywne białko (mutacja blokująca domenę GTPazową w konformacji wiążącej jedynie GTP) powodowało agregację mitochondriów w komórce w obszarach okołojądrowych. W komórkach tych zaobserwowano również indukcję procesu apoptozy. Natomiast konstytutywnie nieaktywne Miro (mutacja blokująca domenę GTPazową w konformacji wiążącej jedynie GDP) nie wpływało w tak silnym stopniu na lokalizację i stopień usieciowania mitochondriów [14]. Doświadczenia na mutantach Miro wykazały również zróżnicowany fenotyp sieci mitochondrialnej w zależności od białkowego ortologu. Tylko w przypadku mutantów Miro1 zaobserwowano, oprócz okołojądrowych klastrów, także mitochondria o nitkowatym kształcie [8,16-18]. Miro1 zaangażowane jest również w proces fuzji i fragmentacji mitochondriów (wykazano bowiem, iż mutacja Miro1 prowadzi do zwiększonej fragmentacji tych organelli) [11]. Oprócz udziału w transporcie i regulacji dynamiki mitochondriów, białko Miro bierze udział w tworzeniu miejsc kontaktowych pomiędzy mitochondriami a siateczką śródplazmatyczną. Siateczka śródplazmatyczna przylega do mitochondriów za pośrednictwem kompleksu wiążącego ERMES (ang. *ER-Mitochondria encounter structure*), który umożliwia wymianę fosfolipidów między organellami, a także uczestniczy w koordynacji importu mitochondrialnych białek. Miro wpływa na ilość oraz na rozmiar miejsc kontaktowych ERMES, a degradacja Miro prowadzi do odłączenia siateczki od mitochondriów [15,19-21].



Rycina 3. Zaangażowanie białka Miro w różne procesy komórkowe.

O tym jak istotne jest prawidłowe funkcjonowanie białka Miro w komórce dowiodły badania prowadzone na myszach będących homo- i heterozygotycznymi mutantami typu knock-out genu kodującego Miro1. Zwierzęta te umierały z powodu zaburzeń oddychania, spowodowanymi uszkodzeniami pnia mózgu. Ponadto odnotowano uszkodzenia komórek nerwowych przepony oraz odcinka szyjnego rdzenia kręgowego. Ponieważ są to motoneurony, sugeruje się, iż mutacje w białku Miro1 powodują uszkodzenia głównie tego typu komórek nerwowych [22].

Białko Miro bierze także udział w procesie transferu mitochondriów pomiędzy sąsiadującymi komórkami. W przeprowadzonym doświadczeniu z użyciem mezenchymalnych komórek macierzystych pokazano, że mitochondria mogą przemieszczać się do komórek epitelialnych (czyli uzupełniać pulę mitochondriów). Transfer następuje poprzez międzykomórkowe „nanorurki”, czyli rodzaje tunelów łączących obie komórki [1]. Białko Miro uczestniczy również w procesie rozdziału puli mitochondriów do komórek potomnych, oddziałując z Cenp-F (białkiem związanym z cytoszkieletem) i rekrutując je do mitochondriów. Taki układ „białko adaptorowe mitochondriów i białko cytoszkieletu” pozwala na przeprowadzenie równomiernej segregacji mitochondriów w trakcie podziału do dwóch komórek potomnych (Ryc. 3) [23-24].

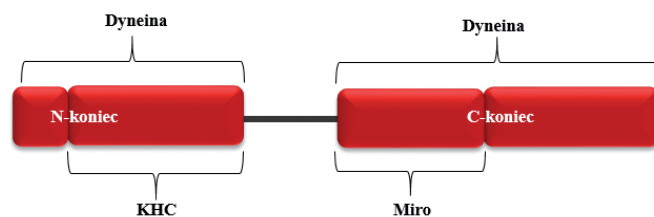
#### BIAŁKO TRAK

Białko adaptorowe Trak występuje u ssaków w postaci dwóch izoform: OIP106 i GRIF (odpowiednio Trak1 i Trak2), które są homologiczne wobec siebie w 58% pod względem składu aminokwasowego [18,25]. Białko Trak oddziałuje z Miro poprzez C-kończącą domenę (Ryc. 4). Oddziaływanie obu białek jest niezależne od stanów konformacyjnych GTPaz ani od zdolności wiązania jonów wapnia przez motyw EF-hand białka Miro. W oddziaływaniu wystarczająca jest zaledwie pierwsza domena GTPazowa [7,16]. Natomiast białko Trak i KHC oddziałują ze sobą bezpośrednio, wymagając C-końcowej części kinezy, odpowiedzialnej za wiązanie mitochondriów

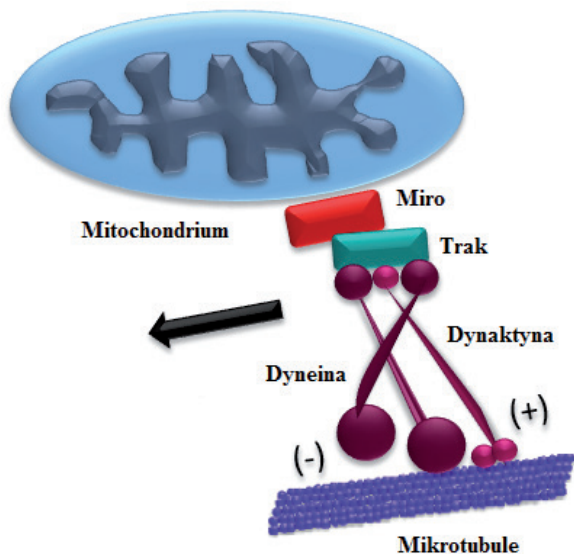
[18,26]. Rolę białek Trak w kompleksie transportującym, uwidoczniły badania prowadzone na hodowlach neuronów. Komórki z mutacjami w genach kodujących białka Trak charakteryzowały się zaburzeniami transportu mitochondriów (mutacja ta nie wpływa na transport innych organelli, pomimo iż białko związane jest również z innymi niż mitochondria organellami komórkowymi) [5,8]. Wykazano również ich udział w dynamice mitochondriów, poprzez oddziaływania Trak1 i Trak2 z białkami odpowiedzialnymi za proces fuzji mitochondriów (mitofuzyną 1 i mitofuzyną 2) [18].

Białka Trak1 i Trak2 w komórkach nerwowych pełnią odmienne funkcje. Trak1 uczestniczy w transporcie aksonalnym, oddziałując z kinezyną i dyneiną, Trak2 natomiast, występuje częściej w dendrytach, uczestnicząc w transporcie razem z dyneiną oraz białkiem Miro1 [5,7,18].

Budowa Trak jest bardziej złożona niż Miro. Białko to posiada 3 różne i mało poznane warianty potranslacyjne (ang. *splicingowe*). U muszek owocowych *Drosophila* występują 4 warianty potranslacyjne Trak (nazwane od A do D), które różnią się jedynie N-kończącą częścią białka odpowiedzialną za oddziaływanie z kinezyną [5]. Każdy z wariantów pełni prawdopodobnie inną rolę w transporcie. Sugeruje się, iż wariant A uczestniczy w transporcie poprzez oddziaływanie z kinezyną, natomiast wariant B prawdopodobnie oddziałuje z dyneiną. Białko to tworzy również potencjalnie różnorodne dimery, w wyniku czego w jednej komórce może występować wiele różnych kombinacji dimeru (6 w przypadku ssaków i 10 kombinacji dimeru w przypadku *Drosophila*) [9,27].



Rycina 4. Schemat budowy białka Trak. Na rycinie zaznaczono fragmenty odpowiedzialne za oddziaływanie z białkami kompleksu transportującego.



Rycina 5. Schemat budowy kompleksu transportującego mitochondria wzdłuż mikrotubul w stronę rejonów okołojądrowych z udziałem białka motorycznego dyneiny. Białka adaptorowe – dynaktyna (p150), Miro i Trak.

## TRANSPORT W KIERUNKU OBSZARÓW OKOŁOJĄDROWYCH (RETROGRADE)

Wykazano, że 90% mitochondriów o wysokim potencjale wewnętrznej błony mitochondrialnej (a więc dobrze funkcjonujących) porusza się w stronę dystalnych części komórki, natomiast 80% charakteryzujących się niskim potencjałem (przypuszczalnie uszkodzonych) porusza się w stronę obszarów okołojądrowych [10,28].

Białkiem motorycznym uczestniczącym w transporcie mitochondriów w kierunku jądra jest dyneina (Ryc. 5). W przeciwieństwie do mechanizmu transportu mitochondriów w kierunku części dystalnych komórki, poniżej opisany transport jest mniej poznany [11].

### DYNEINA

Dyneina jest białkiem motorycznym o dość skomplikowanej budowie. Składa się z dwóch ciężkich łańcuchów (DHC) pełniących funkcje motoryczne i oddziałujących z mikrotubulami oraz kilku łańcuchów pośrednich (DIC), lekkich pośrednich (DLIC) oraz łańcuchów lekkich (DLC), które odpowiedzialne są za regulację dyneiny oraz przyłączenie mitochondriów przeznaczonych do transportu [5,29-30]. W skład kompleksu transportującego wchodzi dodatkowo dynaktyna, która łączy się z dyneiną poprzez swoją największą podjednostkę p150 oraz 11 podjednostek pomocniczych. Dynaktyna zwiększa procesywność dyneiny. Wykazano, że białko to wpływa również na transport w przeciwnym kierunku (w stronę obrzeży komórki) prawdopodobnie poprzez oddziaływania z kinezyną [4]. Funkcje pozostałych jednostek pomocniczych są nieznane. Nie jest do końca jasne, jak dyneina rozpoznaje swoje ładunki. Wykazano, że dyneina może oddziaływać także z Trak poprzez N- i C-koniec białka adaptorowego [5,22,31]. Możliwe jest także, że dyneina i kinezyzna oddziałują ze sobą, utrzymując równowagę pomiędzy transportem w obu kierunkach, po-

nieważ mutacja w genie kodującym kinezynę wpływa także na transport w kierunku obszarów okołojądrowych [7,9].

## REGULACJA TRANSPORTU MITOCHONDRIÓW

### ZATRZYMYWANIE MITOCHONDRIÓW W OKREŚLONYCH MIEJSCACH KOMÓRKI

Uważa się, że większość mitochondriów (ok. 60-70%) w neuronach jest nieruchoma, pozostając zakotwiczona w miejscach o dużym zapotrzebowaniu energetycznym. Ruch mitochondriów wzdłuż mikrotubul nie jest ciągły, tzn. charakteryzuje się etapami mobilności oraz postojami. Istnieją zatem mechanizmy, które pozwalają na zatrzymywanie mitochondriów w określonych miejscach komórki. Jak dotąd zaproponowano dwa różne mechanizmy regulacji ruchu mitochondriów: pierwszy, w którym mitochondria odłączają się od mikrotubul, drugi, w którym mitochondria pozostają doczepione do kompleksu transportującego, a zatrzymywane są przez tzw. „molekularne kotwice”. Białko syntafilina pełni funkcję „molekularnej kotwicy”, która zatrzymuje mitochondria w określonym miejscu, jednak bez ich odłączenia od białek motorycznych i mikrotubul [32]. Wykazano, że nadekspresja syntafiliny prowadzi do wstrzymania ruchu mitochondriów, nie wpływając przy tym na inny transport w komórce. Działanie syntafiliny opiera się prawdopodobnie na konkurencji z adaptorem Trak2 w łączeniu się z kinezyną, co prowadzi do zatrzymania ruchu wskutek rozpadu kompleksu transportującego [5, 13]. W stabilizacji oddziaływań między syntafiliną (C-końcem białka) i mikrotubulami uczestniczy lekki łańcuch dyneiny, zwany L8. Syntafilina zbudowana jest w 12% z reszt serynowych, które mogą podlegać fosforylacji, postuluje się więc udział kinaz w regulacji funkcji syntafiliny [11]. Ostatnie badania wskazują również, że działanie syntafiliny opierać się może na inaktywowaniu ATPaz białek motorycznych, tym samym uniemożliwiając przemieszczanie się mitochondriów wzdłuż mikrotubul [9]. Ponadto aktywność syntafiliny może być też uzależniona od wiązania jonów wapnia przez białko Miro [12].

Szacuje się, że w neuronach około 30% wszystkich mitochondriów jest w stałym ruchu, przy czym połowa z tej liczby przemieszcza się w stronę „od ciała komórki”, druga połowa w stronę „do ciała komórki”. Jednym z ważnych sygnałów regulujących transport mitochondriów jest cytozolowy poziom wapnia. Zarówno w komórkach nerwowych jak i nienerwowych transport mitochondriów jest hamowany podwyższonym stężeniem jonów wapnia. Przy stężeniu 400 nM ruch zostaje zahamowany w 40%, natomiast stężenia mikromolarne hamują transport mitochondriów w 100% [33]. Powszechnie wiadomo, iż stężenie jonów wapnia w komórce jest niejednorodne. W neuronach różnice w lokalnych stężeniach jonów wapnia są jeszcze bardziej widoczne. W synapsach i kolcach dendrytycznych stężenie jonów wapnia podlega dużym lokalnym wahaniom. Mitochondria transportowane do synaps są tam zatrzymywane i zakotwiczone w określonym miejscu w zależności od poziomu jonów wapnia. Białko Miro aktywnie w tym uczestniczy, bowiem po związaniu jonów wapnia zmienia się jego konformacja, co prowadzi do rozpadu kompleksu transportującego i zatrzymania mitochondriów [9]. Obecnie opisane są

2 mechanizmy zatrzymania mitochondrialnego transportu, w którym główną rolę pełnią jony wapnia. W pierwszym z nich zwiążanie jonów wapnia przez domenę EF-hand Miro powoduje oddysocjowanie N-końcowej (motorycznej) części kinezyiny od mikrotubul i w zamian tego przyłączenie jej do białka Miro. Następnie cały kompleks transportujący jest odłączany od mikrotubul, uniemożliwiając dalsze przemieszczanie się. W drugim modelu zatrzymanie transportu mitochondriów odbywa się poprzez odłączenie tylko białka motorycznego od kompleksu transportującego zaraz po zwiążaniu wapnia przez domenę EF-hand [34].

Najnowsze badania wskazują, że domeny EF-hand Miro biorą udział w pobieraniu jonów wapnia przez mitochondria do wnętrza macierzy. Pokazano, że w komórkach nerwowych hipokampa ze zmutowanym białkiem Miro w domenach EF-hand nie było napływów jonów wapnia do wnętrza mitochondriów. Sugeruje to występowanie zależności pomiędzy transportem mitochondriów i buforowaniem przez nie wapnia [35]. Badania na modelach mysich z różnymi kombinacjami mutacji białek Miro wskazują, że ortologi Miro w różnym stopniu wiążą wapń lub mogą przejmować swoje funkcje. Doświadczenia z wykorzystaniem komórek, których całkowicie pozbawiono białek Miro sugerują istnienie innych regulatorów transportu mitochondriów, których sposób działania także zależny jest od jonów wapnia. Okazało się, że transport mitochondriów może być wstrzymany tylko poprzez wysokie stężenie jonów wapnia w komórce, dlatego też uważa się, że regulacja dystrybucji mitochondriów poprzez lokalne zmiany stężenia jonów wapnia zależy od aktualnego stanu fizjologicznego w danym przedziale komórkowym [22].

Drugi typ regulacji transportu zachodzi poprzez kaskadę sygnałową PINK1/Parkin. PINK1 (ang. *PTEN Induced Kinase 1*) jest kinazą serynowo-treoninową, która zawiera sekwencję kierującą ją do mitochondriów (na N-końcu). Białko to może lokalizować się zarówno na mitochondrialnej błonie zewnętrznej jak i wewnętrznej, w zależności od potencjału błonowego. Parkin to ligaza ubikwitynowa E3, która dołącza do swych substratów reszty ubikwitynowe, naznaczając białka do procesu degradacji przez proteasomy. Ścieżka PINK1/Parkin jest aktywowana poprzez depolaryzację lub uszkodzenia mitochondriów [36]. PINK1/Parkin oddziałują z mitochondrialnym kompleksem transportującym Miro/Trak/kinezyina. Przy spadku potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej PINK1 rekrutuje białko Parkin z cytozolu, następuje degradacja białka Miro i rozpad kompleksu transportującego [9,37-38]. Ten sposób regulacji transportu mitochondriów jest nieodwracalny [9].

Kolejny typ regulacji dystrybucji mitochondriów związany jest z działaniem białka Trak. Białko to regulowane jest poprzez modyfikacje potranslacyjne. Z białkiem Trak może oddziaływać białko OGT (ang. *O-linked N-acetylglucosamine transferase*). Transferaza OGT odpowiedzialna jest za dołączanie małych reszt cukrowych, UDP-GlcNAc (ang. *Uridinediphosphate N-acetylglucosamine*), do swoich substratów w miejscach występowania reszt seryny lub treoniny. Aktywność OGT zależy od m.in. dostępności małych cukrów, które są pochodnymi glukozy. Dlatego też uważa się, iż transport mitochondriów zależny jest od poziomu glukozy,

poprzez wpływ białka OGT na kompleks transportujący, a dokładnie oddziaływanie z białkiem Trak [9]. Aktywacja OGT powoduje obniżenie mobilności mitochondriów [39].

## TRANSPORT A DYNAMIKA MITOCHONDRIÓW

Wiadomo, że istnieją ściśle powiązania pomiędzy procesami dystrybucji i dynamiki mitochondriów. Na zewnętrznej błonie mitochondrialnej znajdują się, oprócz wcześniej opisanego Miro, także inne GTPazy, z rodziny tzw. „dużych GTPaz”. Białka te odpowiedzialne są za fuzję (mitofuzyna oraz Opa1, ang. *Optic atrophy*) i fragmentację (Drp1, ang. *Dynamamin like protein1*) mitochondriów [9]. Okazało się, że w komórkach nerwowych, w których było zmutowane i nieaktywne białko Drp1, mitochondria były pofragmentowane i skupione wokół jądra komórkowego. Natomiast zmutowana mitofuzyna 2 powodowała upośledzenie transportu mitochondriów, wywierając wpływ głównie na transport w stronę obszarów okołojądrowych [5,11,40-41].

## INNE MECHANIZMY MAJĄCE WPŁYW NA DYSTRYBUCJĘ MITOCHONDRIÓW W KOMÓRCIE

W ostatnim czasie odkryto białko Alex3 z rodziny Armcx, która jest unikalna dla ssaków łożyskowych. Białko to lokuje się na zewnętrznej błonie mitochondrialnej i wpływa na funkcjonowanie kompleksu transportującego Miro/Trak. Dokładny mechanizm regulacji transportu nie został poznany, jednak przeprowadzone badania wskazują, że działanie białka zależne jest od poziomu jonów wapnia w komórce. Wykazano, że Alex3 w neuronach powodowało agregację mitochondriów w okolicach przyjądrowych [42-43].

Kolejnym białkiem, które ma wpływ na kompleks transportujący jest HUMMR (ang. *Hypoxia up-regulated mitochondria movement regulator*). Delecja genu HUMMR w neuronach poddanych hipoksji hamuje transport w stronę dystalnych części komórki, promując transport w stronę obszarów okołojądrowych. Poziom białka HUMMR ma wpływ na kierunek transportu mitochondriów. Podczas hipoksji, towarzyszącej udarowi niedokrwiennemu, mitochondria transportowane są do aksonów w celu buforowania ogromnych ilości jonów wapnia pojawiających się w synapsach w wyniku ekscytotoksycznego działania glutaminianu. Gdy poziom białka HUMMR jest zbyt niski transport mitochondriów w kierunku dystalnych części komórki zostaje wstrzymany i w konsekwencji następują uszkodzenia neuronów [44].

Niektóre cząsteczki, jak neurotransmitery, pełnią podwójną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu układu nerwowego. Okazuje się, że biorą udział w regulacji dystrybucji mitochondriów w komórce, np. dopamina hamuje transport mitochondriów, działając antagonistycznie do serotoniny, która wzmacnia mitochondrialny transport. Ostatnie badania, ujawniły, że również inne sygnały i małe cząsteczki wpływają na ruch mitochondriów [45], np. traktowanie hodowli neuronów czynnikiem wzrostu NGF (ang. *nerve growth factor*) może powodować akumulację mitochondriów w miejscu jego podania. Efekt ten wydawał się być zależny od aktywności i specyficzności wobec neuronów [46].

Wykazano także zależność transportu mitochondriów od właściwości mikrotubul. Za stabilizację mikrotubul i ich wiązanie z neurofilamentami w komórkach nerwowych odpowiedzialne jest białko tau. Powinowactwo tau do mikrotubul zależne jest od poziomu jego fosforylacji, podwyższony poziom tego białka powoduje mniejsze powinowactwo. Hiperfosforylacja białka tau (np. obserwowana w przypadku choroby Alzheimera) prowadzi do jego nadmiernej agregacji i powstawania helikalnych sparowanych filamentów, tworzących splątki neurofibrylarne, które w sposób fizyczny hamują dystrybucję mitochondriów w komórce [47-48]. Zaburzenia stabilności mikrotubul związane są również z oddziaływaniem białka Miro, ponieważ status fosforylacji tau zmienia się pod wpływem mutacji Miro [49].

Ostatnio odkrytym, interesującym czynnikiem mającym wpływ na regulację transportu mitochondriów w komórce jest toksyna, annonacyna (z owoców flaszowca miękko-cier-nistego, *Annona muricata*), która nie tylko hamuje aktywność kompleksu I mitochondrialnego łańcucha oddechowego, ale wpływa również bezpośrednio na dystrybucję mitochondriów. Mechanizm działania toksyny jest jednak jak dotąd nieznan [50].

## PODSUMOWANIE

Transport mitochondriów jest niezwykle ważnym procesem umożliwiającym aktywne rozprzeczanie mitochondriów do różnych przedziałów komórkowych, pozwalając na prawidłowe funkcjonowanie komórki. Dokładne poznanie czynników i mechanizmów mających wpływ na dystrybucję i lokalizację mitochondriów w komórce, zwłaszcza nerwowej, może służyć lepszemu zrozumieniu patogenezy i patofizjologii wielu chorób neurodegeneracyjnych, w których obserwuje się lub może występować zaburzony transport mitochondriów [51-55]. Ilość elementów uczestniczących w mitochondrialnej dystrybucji oraz mnogość sposobów regulujących mitochondrialny transport wskazują na złożoność całego procesu. Dotychczasowa wiedza dotycząca tych procesów wciąż jest niepełna.

## PIŚMIENNICTWO

- Ahmad T, Mukherjee S, Pattnaik B, Kumar M, Singh S, Kumar M, Rehman R, Tiwari BK, Jha KA, Barhanpurkar AP, Wani MR, Roy SS, Mabalirajan U, Ghosh B, Agrawal A (2014) Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport & enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy. *EMBO J* 33: 994-1010
- Burté F, Carelli V, Chinnery PF, Yu-Wai-Man P (2015) Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol* 11: 11-24
- Lee KS, Lu B (2014) The myriad roles of Miro in the nervous system: axonal transport of mitochondria and beyond. *Front Cell Neurosci* 8: 330
- Lin MY, Sheng ZH (2015) Regulation of mitochondrial transport in neurons. *Exp Cell Res* 334: 35-44
- Sheng ZH (2014) Mitochondrial trafficking and anchoring in neurons: New insight and implications. *J Cell Biol* 204: 1087-1098
- Matenia D, Mandelkow EM (2014) Emerging modes of PINK1 signaling: another task for MARK2. *Front Mol Neurosci* 7: 37
- van Spronsen M, Mikhaylova M, Lipka J, Schlager MA, van den Heuvel DJ, Kuijpers M, Wulf PS, Keijzer N, Demmers J, Kapitein LC, Jaarsma D, Gerritsen HC, Akhmanova A, Hoogenraad CC (2013) TRAK/

Milton motor-adaptor proteins steer mitochondrial trafficking to axons and dendrites. *Neuron* 77: 485-502

- MacAskill AF, Brickley K, Stephenson FA, Kittler JT (2009) GTPase dependent recruitment of Grif-1 by Miro1 regulates mitochondrial trafficking in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 40: 301-312
- Lovas JR, Wang X (2013) The meaning of mitochondrial movement to a neuron's life. *Biochim Biophys Acta* 1833: 184-194
- Saxton WM, Hollenbeck PJ (2012) The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* 125: 2095-2104
- Sheng ZH, Cai Q (2012) Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 13: 77-93
- Chen Y, Sheng ZH (2013) Kinesin-1-syntrophin coupling mediates activity-dependent regulation of axonal mitochondrial transport. *J Cell Biol* 202: 351-364
- Randall TS, Moores C, Stephenson FA (2013) Delineation of the TRAK binding regions of the kinesin-1 motor proteins. *FEBS Lett* 587: 3763-3769
- Fransson A, Ruusala A, Aspenström P (2003) Atypical Rho GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis. *J Biol Chem* 278: 6495-6502
- Niescier RF, Chang KT, Min KT (2013) Miro, MCU, and calcium: bridging our understanding of mitochondrial movement in axons. *Front Cell Neurosci* 7: 148
- Fransson S, Ruusala A, Aspenström P (2006) The atypical Rho GTPases Miro-1 and Miro-2 have essential roles in mitochondrial trafficking. *Biochem Biophys Res Commun* 344: 500-510
- MacAskill AF, Rinholm JE, Twelvetrees AE, Arancibia-Carcamo IL, Muir J, Fransson A, Aspenstrom P, Attwell D, Kittler JT (2009) Miro1 is a calcium sensor for glutamate receptor-dependent localization of mitochondria at synapses. *Neuron* 61: 541-555
- Brickley K, Stephenson FA (2011) Trafficking kinesin protein (TRAK)-mediated transport of mitochondria in axons of hippocampal neurons. *J Biol Chem* 286: 18079-18092
- Kane LA, Youle RJ (2011) PINK1 and Parkin flag Miro to direct mitochondrial traffic. *Cell* 147: 721-723
- Hajnóczky G, Booth D, Csordás G, Debattisti V, Golenár T, Naghdi S, Niknejad N, Paillard M, Seifert EL, Weaver D (2014) Reliance of ER-mitochondrial calcium signaling on mitochondrial EF-hand Ca<sup>2+</sup> binding proteins: Miro, MICUs, LETM1 and solute carriers. *Curr Opin Cell Biol* 29: 133-141
- Kornmann B, Osman C, Walter P (2011) The conserved GTPase Gem1 regulates endoplasmic reticulum-mitochondria connections. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 14151-14156
- Nguyen TT, Oh SS, Weaver D, Lewandowska A, Maxfield D, Schuler MH, Smith NK, Macfarlane J, Saunders G, Palmer CA, Debattisti V, Koshiba T, Pulst S, Feldman EL, Hajnóczky G, Shaw JM (2014) Loss of Miro1-directed mitochondrial movement results in a novel murine model for neuron disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: E3631-3640
- Kanfer G, Courthéoux T, Peterka M, Meier S, Soste M, Melnik A, Reis K, Aspenström P, Peter M, Picotti P, Kornmann B (2015) Mitotic redistribution of the mitochondrial network by Miro and Cenp-F. *Nat Commun* 6: 8015
- Kanfer G, Kornmann B (2016) Dynamics of the mitochondrial network during mitosis. *Biochem Soc Trans* 44: 510-516
- Loss O, Stephenson FA (2015) Localization of the kinesin adaptor proteins trafficking kinesin proteins 1 and 2 in primary cultures of hippocampal pyramidal and cortical neurons. *J Neurosci Res* 93: 1056-1066
- Randall TS, Moores C, Stephenson FA (2013) Delineation of the TRAK binding regions of the kinesin-1 motor proteins. *FEBS Lett* 587: 3763-3769
- Fu MM, Holzbaur EL (2014) Integrated regulation of motor-driven organelle transport by scaffolding proteins. *Trends Cell Biol* 24: 564-574
- Ashrafi G, Schwarz TL (2015) PINK1- and PARK2-mediated local mitophagy in distal neuronal axons. *Autophagy* 11: 187-189

29. Birsa N, Norkett R, Higgs N, Lopez-Domenech G, Kittler JT (2013) Mitochondrial trafficking in neurons and the role of the Miro family of GTPase proteins. *Biochem Soc Trans* 41: 1525-1531
30. Eschbach J, Dupuis L (2011) Cytoplasmic dynein in neurodegeneration. *Pharmacol Ther* 130: 348-363
31. Tang BL (2015) MIRO GTPases in mitochondrial transport, homeostasis and pathology. *Cells* 5 pii: E1
32. Kang JS, Tian JH, Pan PY, Zald P, Li C, Deng C, Sheng ZH (2008) Docking of axonal mitochondria by syntrophin controls their mobility and affects short-term facilitation. *Cell* 132: 137-148
33. Schwarz TL (2013) Mitochondrial trafficking in neurons. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5 pii: a011304
34. Devine MJ, Birsa N, Kittler JT (2015) Miro sculpts mitochondrial dynamics in neuronal health and disease. *Neurobiol Dis* 90: 27-34
35. Chang KT, Niescier RF, Min KT (2011) Mitochondrial matrix Ca<sup>2+</sup> as an intrinsic signal regulating mitochondrial motility in axons. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 15456-15461
36. Birsa N, Norkett R, Wauer T, Mevissen TE, Wu HC, Foltyniec T, Bhatia K, Hirst WD, Komander D, Plun-Favreau H, Kittler JT (2014) Lysine 27 ubiquitination of the mitochondrial transport protein Miro is dependent on serine 65 of the Parkin ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 289: 14569-14582
37. Wang X, Winter D, Ashrafi G, Schlehe J, Wong YL, Selkoe D, Rice S, Steen J, LaVoie MJ, Schwarz TL (2011) PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. *Cell* 147: 893-906
38. Liu S, Sawada T, Lee S, Yu W, Silverio G, Alapatt P, Millan I, Shen A, Saxton W, Kanao T, Takahashi R, Hattori N, Imai Y, Lu B (2012) Parkinson's disease-associated kinase PINK1 regulates Miro protein level and axonal transport of mitochondria. *PLoS Genet* 8: e1002537
39. Pekkurnaz G, Trinidad JC, Wang X, Kong D, Schwarz TL (2014) Glucose regulates mitochondrial motility via Milton modification by O-GlcNAc transferase. *Cell* 158: 54-68
40. 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
41. Chapman AL, Bennett EJ, Ramesh TM, De Vos KJ, Grierson AJ (2013) Axonal transport defects in a mitofusin 2 loss of function model of Charcot-Marie-Tooth disease in Zebrafish. *PLoS One* 8: e67276
42. López-Doménech G, Serrat R, Mirra S, D'Aniello S, Somorjai I, Abad A, Vituriera N, García-Arumí E, Alonso MT, Rodríguez-Prados M, Burgaya F, Andreu AL, García-Sancho J, Trullas R, Garcia-Fernández J, Soriano E (2012) The Eutherian *Armcx* genes regulate mitochondrial trafficking in neurons and interact with Miro and Trak2. *Nat Commun* 3: 814
43. Serrat R, López-Doménech G, Mirra S, Quevedo M, Garcia-Fernández J, Ulloa F, Burgaya F, Soriano E (2013) The non-canonical Wnt/PKC pathway regulates mitochondrial dynamics through degradation of the arm-like domain-containing protein Alex3. *PLoS One* 8: e67773
44. Li Y, Lim S, Hoffman D, Aspenstrom P, Federoff HJ, Rempel DA (2009) HUMMR, a hypoxia- and HIF-1 $\alpha$ -inducible protein, alters mitochondrial distribution and transport. *J Cell Biol* 185: 1065-1081
45. Chada SR, Hollenbeck PJ (2004) Nerve growth factor signaling regulates motility and docking of axonal mitochondria. *Curr Biol* 14: 1272-1276
46. Chen S, Owens GC, Edelman DB (2008) Dopamine inhibits mitochondrial motility in hippocampal neurons. *PLoS One* 3: e2804
47. Krishnan KJ, Ratnaik TE, De Gruyter HL, Jaros E, Turnbull DM (2012) Mitochondrial DNA deletions cause the biochemical defect observed in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33: 2210-2214
48. Shahpasand K, Uemura I, Saito T, Asano T, Hata K, Shibata K, Toyoshima Y, Hasegawa M, Hisanaga S (2012) Regulation of mitochondrial transport and inter-microtubule spacing by tau phosphorylation at the sites hyperphosphorylated in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 32: 2430-2441
49. Wang ZX, Tan L, Yu JT (2015) Axonal transport defects in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 51: 1309-1321
50. Chaturvedi RK, Flint Beal M (2013) Mitochondrial diseases of the brain. *Free Radic Biol Med* 63: 1-29
51. Sai Y, Zou Z, Peng K, Dong Z (2012) The Parkinson's disease-related genes act in mitochondrial homeostasis. *Neurosci Biobehav Rev* 36: 2034-2043
52. Errea O, Moreno B, Gonzalez-Franquesa A, Garcia-Roves PM, Villoslada P (2015) The disruption of mitochondrial axonal transport is an early event in neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 12: 152
53. Perlson E, Maday S, Fu MM, Moughamian AJ, Holzbaur EL (2010) Retrograde axonal transport: pathways to cell death? *Trends Neurosci* 33: 335-344
54. Dehesi S, Pasqualotto BA, Rintoul GL (2013) Mitochondrial trafficking in neuropsychiatric diseases. *Neurobiol Dis* 51: 66-71
55. Zhu X, Perry G, Smith MA, Wang X (2013) Abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 33 Suppl 1: S253-262

## Mechanisms of mitochondrial transport and distribution within the cell

Karolina Drabik, Dominika Malińska, Jerzy Duszyński, Joanna Szczepanowska ✉

Laboratory of Bioenergetics and Biomembranes, Nencki Institute of Experimental Biology, 3 Pasteur St., 02-093 Warszawa, Poland

✉ e-mail: j.szczepanowska@nencki.gov.pl

**Key words:** mitochondrial transport, trafficking complex, regulation of mitochondrial distribution.

### ABSTRACT

Mitochondria are multifunctional, dynamic organelles, which are continuously undergoing fusion and fission and are actively distributed within the cell. Mitochondria travel along microtubules together with a mitochondrial trafficking complex, formed by motor and adaptor proteins. Proper mitochondrial movements are crucial for neurons, in which mitochondria translocate in two directions. Anterograde transport is an outward movement of mitochondria from the cell body to the synapse, whereas retrograde is an inward movement away from the synapse or plasma membrane toward the cell body. This article presents a summary of current knowledge about the intracellular transport of mitochondria and its regulation in mammalian cells.