

Zaburzenia dynamiki i dystrybucji mitochondriów w komórkach w stwardnieniu zanikowym bocznym (ALS)

STRESZCZENIE

Stwardnienie zanikowe boczne (ALS) jest chorobą o złożonej etiologii, prowadzącą do degradacji neuronów ruchowych. Jednym z pierwszych objawów w rozwoju wielu chorób neurodegeneracyjnych, m. in. w ALS, są zaburzenia funkcjonowania mitochondriów. Już kilka dekad temu obserwowano zmiany morfologii mitochondriów w tkankach pacjentów cierpiących na to schorzenie. Mitochondria są organellami dynamicznymi, ulegają ciągłym procesom fuzji i fragmentacji oraz przemieszczania się w komórce. Prawdopodobny przebieg procesów związanych z dynamiką i dystrybucją mitochondriów jest kluczowy dla funkcjonowania komórek, a w szczególności komórek nerwowych o silnie wydłużonych aksonach. Praca ta stanowi podsumowanie istniejącej wiedzy na temat roli dynamiki i dystrybucji mitochondriów w patofizjologii ALS, formy rodzinnej i sporadycznej.

WPROWADZENIE

Stwardnienie zanikowe boczne (ALS, ang. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*), zwane również chorobą Lou Gherig'a, zostało po raz pierwszy opisane ponad 140 lat temu przez francuskiego neurologa Joan-Martin Charcot. Jest to nieuleczalna choroba neurodegeneracyjna prowadząca do selektywnej degradacji górnych i dolnych neuronów motorycznych [1]. Skutkiem utraty motoneuronów jest postępujące osłabienie mięśni prowadzące do ich zaniku i śmierci pacjenta w przeciągu 3–5 lat od momentu wystąpienia objawów [2]. Zapadalność na tę chorobę wynosi rocznie 1–2 przypadki na 100 000 osobników, a największą liczbę zachorowań obserwuje się u osób w przedziale wiekowym między 45 a 60 rokiem życia [3]. Większość zdiagnozowanych przypadków ALS ma postać sporadyczną (sALS, ang. *sporadic*) o nieznannej etiologii, u około 10% pacjentów choroba ta jest związana z odziedziczoną mutacją i tę postać choroby nazywamy formą rodzinną ALS (fALS, ang. *familial*) [4].

W 1993 roku Daniel Rosen jako pierwszy wykazał, że u części pacjentów ze zdiagnozowaną formą rodzinną ALS występuje mutacja w genie kodującym enzym antyoksydacyjny, dysmutazę ponadtlenkową 1 (SOD1) [5]. Od tamtego czasu zidentyfikowano jeszcze inne geny, których mutacje mogą być przyczyną rodzinnej formy ALS, takie jak: *ALS2*, *SETX*, *FUS*, *VAPB*, *DCNT1*, *TARDBP*, *FIG4* (opis funkcji białek kodowanych przez te geny przedstawiono w tabeli 1) [2,6]. Istnieje wiele hipotez opisujących procesy mogące prowadzić do zaniku neuronów ruchowych w tej chorobie, należą do nich między innymi udział stresu oksydacyjnego, powstawanie agregatów białkowych, ekscytotoksyczność glutaminianu, zaburzenia metabolizmu RNA oraz degradacji białek, zmiany w siateczce śródplazmatycznej (ER, ang. *endoplasmic reticulum*) i cytoszkielecie czy zaburzenia ze strony układu odpornościowego [7,8]. W licznych badaniach przeprowadzonych głównie na biopsjach mięśniowych pobranych od pacjentów lub w pośmiertnych badaniach rdzenia kręgowego i mózgu stwierdzono zaburzenia funkcjonowania mitochondriów zarówno w formie rodzinnej jak i sporadycznej ALS [9].

Mitochondria są organellami zbudowanymi z dwóch błon, z których wewnętrzna jest silnie pofałdowana i tworzy wpuklenia zwane grzebieniami mitochondrialnymi, na których zlokalizowane są białka wchodzące w skład kompleksów łańcucha oddechowego. W wyniku takiej budowy powstaje przestrzeń międzybłonowa oraz przestrzeń wewnętrzna zwana macierzą mitochondrialną. Mitochondria zawierają swój własny genom występujący w postaci kolistej, dwuniciowej cząsteczki DNA, który u ssaków zawiera 37 genów kodujących białka uczestniczące w oksydacyjnej fosforylacji jak również cząsteczki rRNA i tRNA [10]. Mitochondria pełnią wiele funkcji w komórce, z których główną jest dostarczanie energii w postaci ATP. Uczestniczą one

Jarosław Walczak

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

Artykuł otrzymano 12 marca 2015 r.

Artykuł zaakceptowano 17 kwietnia 2015 r.

Słowa kluczowe: ALS, dynamika mitochondriów, transport mitochondriów, neurodegeneracja

Podziękowania: Praca powstała w trakcie realizacji projektu badawczego HARMONIA 2013/08/M/N23/00707 finansowanego ze środków przyznanych przez NCN.

Tabela 1. Mutacje genów związane z rodzinną postacią ALS; według [6].

Gen	Dziedziczenie	Białko	Funkcja
SOD1	AD	dysmutaza ponadtlenkowa 1	enzym antyoksydacyjny
ALS2	AR	alsyna	czynnik wymiany nukleotydów guaninowych dla RAB5A i Rac1
SETX	AD	senataksyna	helikaza, procesowanie RNA
FUS	AR	białko FUS (ang. <i>fused in sarcoma</i>)	białko wiążące DNA/RNA, zaangażowane w proces przetwarzania RNA
VAPB	AD	białko VAPB (ang. <i>vesicle-associated membrane protein-associated protein B</i>)	wchodzi w skład kompleksu SNARE
DCTN1	AD	podjednostka p150 ^{glued} dynaktyny	transport komórkowy
TARDBP	AD	białko TDP-43 (ang. <i>transactive response DNA binding protein 43 kDa</i>)	białko wiążące DNA/RNA, zaangażowane w proces przetwarzania RNA, regulacja transkrypcji
FIG4	AR	białko FIG4	reguluje metabolizm 3,5-bisfosforanu fosfatydyloinozytolu

AD – dziedziczenie autosomalne dominujące, AR – dziedziczenie autosomalne recesywne

również w takich procesach komórkowych jak: utrzymywanie homeostazy wapniowej, w procesie apoptozy i termogenezy oraz są głównym źródłem powstawania reaktywnych form tlenu. W organellach tych zachodzą również liczne procesy metaboliczne między innymi takie jak: cykl kwasów trójkarboksylowych, β -oksydacja kwasów tłuszczowych, biosynteza hemu, centrów żelazo-siarkowych i steroidów [6].

W celu poznania molekularnych mechanizmów leżących u podstaw rozwoju ALS i roli mitochondriów w tej chorobie, badania prowadzi się na modelach zwierzęcych i komórkowych oraz pozyskanych od pacjentów tkanek i komórkach [1,7,11]. W komórkach pobranych od pacjentów chorych na ALS mitochondria mają zmienioną morfologię, obniżony potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej oraz niższą aktywność kompleksów łańcucha oddechowego [12-15]. Stwierdzono także obniżony poziom ATP, zaburzenia w poziomie Ca^{2+} oraz podniesiony poziom reaktywnych form tlenu w wielu modelach zwierzęcych (transgeniczne myszy i szczury z nadprodukcją zmutowanego białka SOD1) oraz w modelach komórkowych [7,16-19]. Coraz więcej uwagi poświęca się ostatnio badaniom zaburzeń dynamiki i transportu mitochondriów, ponieważ w komórkach nerwowych ich położenie i prawidłowe przemieszczanie się odgrywają zasadniczą rolę. Dlatego w tym artykule postanowiliśmy podsumować dotychczasową wiedzę na temat dynamiki i dystrybucji mitochondriów w ALS.

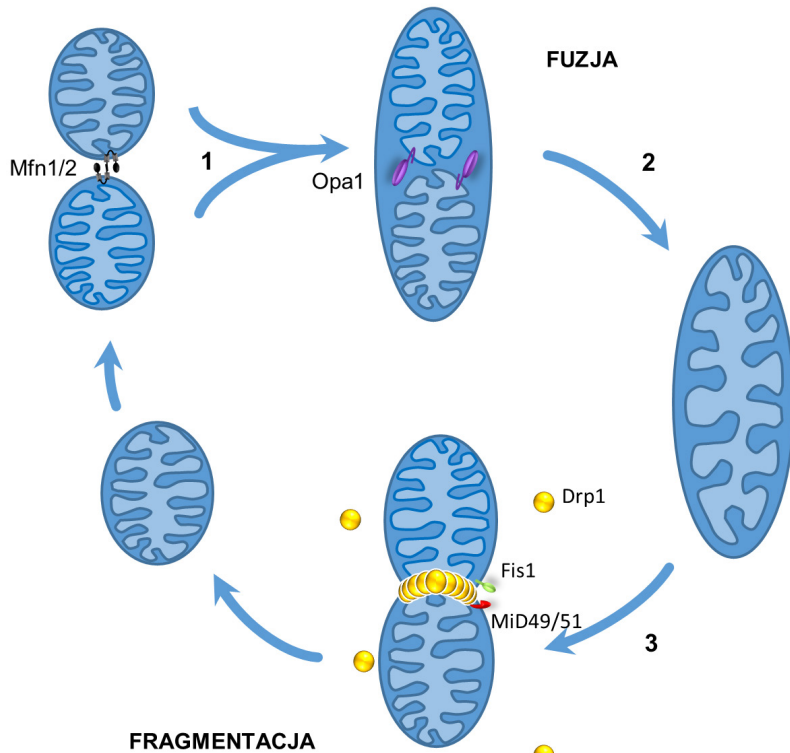
FUZJA I FRAGMENTACJA MITOCHONDRIOW

Mitochondria są niezwykle dynamicznymi organellami, które nieustannie podlegają procesom fragmentacji i fuzji w odpowiedzi na różnego rodzaju bodźce środowiskowe oraz metaboliczne [20]. Zmiany morfologii mitochondriów dokonują się także podczas procesów rozwoju i różnicowania oraz w trakcie podziałów komórkowych [21]. Fuzja mitochondriów pozwala na wymianę zawartości macierzy mitochondrialnej, czyli m. in. cząsteczek mitochondrialnego DNA, enzymów, lipidów czy metabolitów. Uważa się, że dzięki fuzji mitochondriów możliwe jest utrzymanie puli funkcjonalnych i „zdrowych” mitochondriów w komórce. Natomiast fragmentacja mitochondriów niezbędna jest do ich dystrybucji w komórce

oraz pozwala na równomierną ich segregację do dwóch potomnych komórek podczas podziału komórkowego. Proces fragmentacji jest istotny również w apoptozie i autofagii, umożliwiając selektywne usuwanie niefunkcjonalnych mitochondriów [22,23]. W procesy fuzji i fragmentacji mitochondriów zaangażowane są liczne białka, z których najważniejszą grupę stanowią GTPazy o dużej masie cząsteczkowej należące do rodziny dynein [20,24].

Fuzja mitochondriów jest procesem dwuetapowym, wymagającym połączenia zewnętrznej, a następnie wewnętrznej błony mitochondrialnej. W komórkach ssaków głównymi białkami zaangażowanymi w proces fuzji są zakotwiczone w zewnętrznej błonie mitochondrialnej mitofuzyny (Mfn1, Mfn2) oraz białko wewnętrznej błony mitochondrialnej Opa1 (ang. *Optic atrophy 1*) (Fig. 1) [24]. Mitofuzyny posiadają dwie domeny transbłonowe, dzięki którym zarówno C- jak i N-koniec białka jest skierowany do cytoplazmy. Na N-końcu białka znajduje się domena GTP-azowa, odpowiedzialna za hydrolizę GTP, oraz domena typu *coiled coil* zbudowana z siedmiu hydrofobowych reszt aminokwasowych zwana HR1 (ang. *heptad repeat region*). Dodatkowa domena HR2 (typu *coiled coil*), jest zlokalizowana na karboksylowym końcu białka [25]. Dzięki domenom HR możliwe jest tworzenie homo- (Mfn1-Mfn1, Mfn2-Mfn2) i heterodimerów (Mfn1-Mfn2) mitofuzyny (tworzenie dimerów umożliwia zbliżenie i wiązanie zewnętrznych błon mitochondriów). Natomiast domena GTP-azowa jest niezbędna do przeprowadzenia procesu fuzji zewnętrznych błon (Ryc. 2) [21,26]. Należy nadmienić, że Mfn2 jest również zlokalizowana na błonie siateczki śródplazmatycznej. Reguluje ona oddziaływanie ER z zewnętrzną błoną mitochondriów ułatwiający wychwyt Ca^{2+} [27,28].

Za fuzję wewnętrznej błony mitochondrialnej (ale także za regulację tworzenia grzebieni mitochondrialnych) odpowiedzialna jest GTP-aza zwana Opa1 (Ryc. 2) [27]. Białko Opa1 występuje u ssaków w przynajmniej ośmiu wariantach powstających w procesie alternatywnego składania mRNA [21,28]. Różnice pomiędzy poszczególnymi izoformami tego białka wynikają z obecności lub braku krótkiego fragmentu w jego N-końcowej części, który zawiera sekwencje rozpoznawane przez specyficzne proteazy mitochondrialne [24]. Długa forma białka



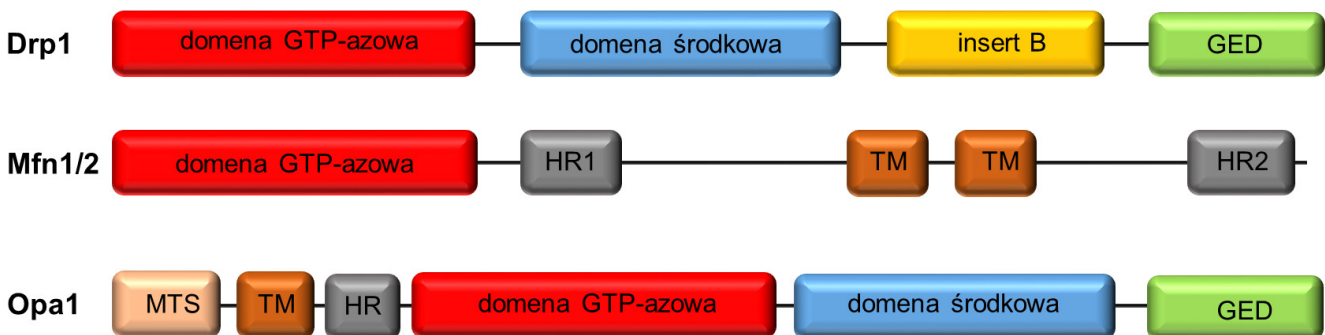
Rycina 1. Schemat procesu fuzji i fragmentacji mitochondriów. Podczas fuzji mitochondriów mitofuzyny (Mfn1/2) umiejscowione na zewnętrznej błonie mitochondrialnej dimeryzują prowadząc do zbliżenia zewnętrznych błon tych organelli i ich połączenia (1). Białko Opa1 zlokalizowane na wewnętrznej błonie mitochondrialnej prowadzi do fuzji tych błon (2). Aby mitochondria mogły ulec fragmentacji białko Drp1 musi zostać przetransportowane z cytoplazmy do zewnętrznej błony mitochondrialnej gdzie z udziałem białek adaptorowych (Fis1, MiD 49/51) tworzy pierścieniowe struktury wyższego rzędu i w procesie zależnym od hydrolizy GTP przeprowadza proces fragmentacji mitochondriów (3).

(tzw. L-Opa1), jest związana z wewnętrzną błoną mitochondrialną i może być trawiona przez mitochondrialne proteazy prowadząc do powstania rozpuszczalnych, krótszych form zwanych S-Opa1 [27]. W normalnych warunkach proteolityczne cięcie prekursorowego białka Opa1 prowadzi do powstania zrównoważonego poziomu krótkich i długich form białka, co pozwala na prawidłową fuzję mitochondriów. Obniżenie potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej, na przykład w skutek zaburzeń w funkcjonowaniu mitochondriów, prowadzi do urucho-

mienia aktywności mitochondrialnych proteaz, które trawią białko L-Opa1 prowadząc do powstania przewagi krótkich form (S-Opa1), a to powoduje zahamowanie fuzji mitochondriów [21,28,29].

Procesy fuzji mitochondriów zachodzące w komórce muszą być precyzyjnie uruchamiane w odpowiedzi na specyficzne jej wymagania, co wiąże się z koniecznością ścisłej regulacji tych procesów. Białka związane z fuzją zewnętrznej błony mitochondrialnej (Mfn1, Mfn2) podlegają regulacji głównie poprzez ubiquitylację i proteolizę [24]. W komórkach ssaków mitofuzyny mogą być ubiquitylowane przez ligazy March5 i Parkin [27]. Natomiast przeprowadzające fuzję wewnętrznej błony mitochondrialnej białko Opa1 jest regulowane poprzez proteolityczne cięcia w specyficznych miejscach, przez proteazy mitochondrialne takie jak AFG3L2, paraplegina, YME1L czy OMA1 [26,29,30].

W proces fragmentacji mitochondriów zaangażowana jest grupa innych białek z rodziny GTP-az, jednym z nich jest białko Drp1 (ang. *Dynamin related protein 1*). Białko to zbudowane jest z domeny GTP-azowej położonej w N-końcowej części białka, domeny środkowej (biorącej udział w organizowaniu się Drp1 w struktury wyższego rzędu), domeny zmiennej zwanej również insertem B (o nieznanym funkcji) oraz domeny efektorowej GED (ang. *GTPase effector domain*) (Ryc. 2) [31,32]. Drp1 jest białkiem cytosolowym występującym głównie w postaci dimerów i tetramerów, które podczas fragmentacji mitochondriów, w miejscu gdzie ma odbyć się ten proces, organizują się na zewnętrznej błonie mitochondrialnej, w oligomeryczne, pierścieniowe struktury. Takie struktury zacieśniają się wokół mitochondriów, a do tego procesu wykorzystywana jest energia pochodząca z hydrolizy GTP [22,28,32,33]. Dokładny mechanizm wiązania Drp1 na powierzchni mi-



Rycina 2. Schemat budowy domenowej białek zaangażowanych w proces fuzji i fragmentacji mitochondriów; GED – domena efektorowa (ang. *GTP effector domain*); HR1/2 – domena typu coiled-coil (ang. *heptad repeat region*); MTS – sekwencja kierująca do mitochondriów (ang. *mitochondria targeting signal*); TM – domena transbłonowa (ang. *transmembrane domain*).

tochondriów jest nadal przedmiotem intensywnych badań. Zidentyfikowano kilka homologicznych białek pełniących funkcję receptorową dla Drp1. Pierwszym z nich jest białko Fis1 (ang. *Fission 1*), które jest równomiernie rozmieszczone na zewnętrznej błonie mitochondrialnej, jednak funkcja tego białka jako bezpośredniego receptora dla GTP-azy Drp1 jest coraz bardziej wątpliwa [32]. Z czasem odkryto inne białka, które bardziej bezpośrednio są zaangażowane w proces rekrutacji Drp1 z cytoplazmy do miejsc podziału mitochondriów takie jak: Mff (ang. *Mitochondrial fission factor*) czy MiD 49/51 (ang. *Mitochondrial Dynamics*) znany również pod nazwą MIEF1 (ang. *Mitochondrial elongation factor 1*) [21,33,34].

Głównym mechanizmem regulacji fragmentacji mitochondriów są modyfikacje potranslacyjne białka Drp1 takie jak fosforylacja, S-nitrozylacja, ubikwitylacja czy SUMOylacja [26,31,32,35]. Prowadzą one do różnych zmian właściwości tego białka wpływając tym samym na zmianę jego lokalizacji w komórce (cytoplazma lub mitochondria), możliwość tworzenia oligomerów lub na zmianę aktywności GTP-azowej [32].

ZABURZENIA PROCESU FUZJI I FRAGMENTACJI MITOCHONDRIÓW W ALS

Mimo, że coraz większą uwagę w ostatnich latach przywiązuje się do badań funkcji mitochondriów w ALS, to wyników badań odnośnie dynamiki mitochondriów w rozwoju tej choroby neurodegeneracyjnej (zwłaszcza postaci sporadycznej) jest jeszcze niewiele. Ogromna większość prac na temat nieprawidłowego funkcjonowania mitochondriów w ALS opiera się na badaniach rodzinnej formy tego schorzenia, ponieważ tylko takie modele badawcze są dostępne.

W motoneuronach transgenicznych myszy z nadprodukcją zmutowanej SOD1 wykazano napeężniałe, mniej rozgałęzione, krótsze i silniej pofragmentowane mitochondria, nierównomiernie rozmieszczone wzdłuż aksonów w odniesieniu do motoneuronów myszy kontrolnych [36,37]. Badania ultrastrukturalne wykazały również silną wakuolizację mitochondriów oraz wzrost liczby grzebieni mitochondrialnych jeszcze przed pojawieniem się symptomów neurodegeneracji [38]. Nadprodukcja białka Drp1 (dominującego negatywnego mutanta) w komórkach zwierząt ze zmutowaną SOD1, prowadziła do przywrócenia prawidłowej morfologii mitochondriów, co wskazuje na to, że podłożem tych zmian mogły być zaburzenia ich dynamiki [37]. Pofragmentowane, nierównomiernie rozmieszczone i spleźnione mitochondria są także charakterystyczne dla komórek NSC-34 z nadprodukcją zmutowanej formy SOD1 oraz innego, zmutowanego białka powodującego rodzinną formę ALS – TDP43 (ang. *transactive response DNA binding protein 43 kDa*) [39-41].

Podsumowując, zarówno w modelach komórkowych, jak i zwierzęcych rodzinnej formy ALS, wykazano zmiany w poziomie białek zaangażowanych w dynamikę mitochondriów. W komórkach linii SH-SY5Y i NSC-34 z nadekspresją zmutowanego genu białka SOD1 stwierdzono

zmiany w poziomie białek zarówno fuzji jak i fragmentacji mitochondriów (Opa1 i Drp1) [42]. Podwyższony poziom białek Mfn1, Opa1, Drp1 oraz Fis1 zaobserwowano również u myszy z ekspresją zmutowanej formy genu białka SOD1 [43]. Z kolei w myszach z nadprodukcją białka TDP43 dzikiego typu zaobserwowano zmiany morfologii i dynamiki mitochondriów, którym towarzyszył wzrost poziomu białka Fis1 i fosforylowanej formy Drp1 oraz obniżenie poziomu syntezy mitofuzyny 1 [44].

W przypadku formy sporadycznej ALS badania morfologii i dynamiki mitochondriów prowadzone były w preparatach tkanki nerwowej pośmiertnie izolowanej od pacjentów, w biopsjach mięśniowych, skórnych i na komórkach krwi pacjentów. Wyniki badań histopatologicznych biopsji rdzenia kręgowego i mięśni wykazały zaburzenia morfologii mitochondriów przejawiające się ich pęcznieniem, rozrostem grzebieni mitochondrialnych i ogólną fragmentacją sieci mitochondrialnej [45-47]. Analiza ultrastrukturalna zakończeń presynaptycznych neuronów w rogu przednim lędźwiowego odcinka rdzenia kręgowego pacjentów z sALS wykazała gęste, ciemne skupiska mitochondriów ze zwiększoną ilością grzebieni i zgrubień zewnętrznej błony mitochondrialnej [48-50].

Przytoczone powyżej przykłady pokazują, że zmiany w morfologii i dynamice mitochondriów należą do wczesnych symptomów rozwoju zarówno rodzinnej jak i sporadycznej formy stwardnienia zanikowego bocznego.

TRANSPORT MITOCHONDRIÓW

Ważnym aspektem dynamiki mitochondriów, poza zmianami morfologicznymi, jest ich transport w obrębie komórki. Umożliwia on odpowiednią dystrybucję i rozmieszczanie mitochondriów w odpowiedzi na zmieniające się zapotrzebowanie energetyczne poszczególnych przedziałów komórkowych. Sprawny transport jest również niezbędny dla utrzymywania prawidłowo funkcjonujących mitochondriów umożliwiając ich fuzję i odpowiednie rozmieszczenie w komórce. W przypadku gdy mitochondria są nieodwracalnie uszkodzone, transport pozwala na ich przemieszczanie w miejsce gdzie zostaną usunięte poprzez selektywną degradację [26]. Odpowiednia dystrybucja mitochondriów jest szczególnie istotna w komórkach silnie spolaryzowanych takich jak neurony, których aksony w nerwach obwodowych mogą osiągać nawet 1 metr długości [51,52]. Ponieważ uważa się, że biogeneza mitochondriów ma miejsce głównie w perykarionie, to nowo powstałe mitochondria muszą być sprawnie transportowane do dystalnych części neuronów, gdzie jest największe zapotrzebowanie na ATP, oraz gdzie mitochondria są silnie zaangażowane w regulację poziomu jonów wapnia, a także procesie tworzenia kolców dendrytycznych i synaptogenezy [26,50]. Ruch mitochondriów na duże odległości odbywa się głównie poprzez zależne od ATP białka motoryczne poruszające się po mikrotubulach, które w neuronach są spolaryzowane (koniec plus skierowany w stronę zakończeń aksonalnych) [53]. Około 20-30% mitochondriów w neuronach jest w ciągłym ruchu, który odbywa się w dwóch kierunkach: czyli do zakończenia aksonu (ang. *anterograde trans-*

Tabela 2. Rodzaje transportu aksonalnego mitochondriów.

Kierunek transportu mitochondriów	Białko motoryczne	Białko adaptorowe
postępowy (ang. <i>anterograde</i>) perykarion → zakończenie aksonu	kinezyzna	Miro1, TRAK1, TRAK2
wsteczny (ang. <i>retrograde</i>) perykarion ← zakończenie aksonu	dyneina	dynaktyna

port – transport postępowy) lub w kierunku perykarionu (ang. *retrograde transport* – transport wsteczny) (Tab. 2).

Za transport mitochondriów od ciała komórki w kierunku obwodowym, odpowiedzialne są białka motoryczne z rodziny kinezyn takie jak KIF5A, KIF5B i KIF5C. Zbudowane są one z dwóch splecionych spiralnie łańcuchów ciężkich (KHC, ang. *Kinesin Heavy Chain*) oraz dwóch łańcuchów lekkich (KLC, ang. *Kinesin Light Chain*). Na końcach N łańcuchów ciężkich znajdują się tzw. głowy będące katalitycznymi domenami motorycznymi odpowiedzialnymi za hydrolizę ATP oraz wiązanie mikrotubul. Koniec karboksylowy białka odpowiada z kolei za wiązanie transportowanego ładunku [54]. Kinezyzny połączone są z mitochondriami poprzez białka adaptorowe Miro1 i Miro2 oraz Trak1 i Trak2 [53,53]. Białka Trak oddziałują zarówno z łańcuchem ciężkim kinezyzny jak również ze zlokalizowanym na zewnętrznej błonie mitochondrialnej białkiem Miro [50]. Białko Miro posiada domenę GTP-azową oraz domenę wiążącą wapń z czterema motywami EF-hand. Taka budowa czyni je potencjalnie ważnym regulatorem transportu mitochondriów [45]. Zaproponowano mechanizm regulacji transportu przez białko Miro, wedle którego, wysokie lokalne stężenie jonów wapniowych w rejonie synaps sprzyja wiązaniu się tego białka bezpośrednio z łańcuchem ciężkim kinezyzny z pominięciem białek adaptorowych Trak. Zapobiega to wiązaniu się kinezyzny z mikrotubulami i prowadzi do unieruchomienia mitochondriów w tym obszarze komórki, gdzie mogą spełniać swoją rolę w dostarczaniu energii i buforowaniu jonów wapnia [50,55]. Do zahamowania transportu prowadzi również O-GlcNAcyłacja białek Trak przez transferazę N-acetyloglukozaminową (OGT, ang. *O-GlcNAc transferase*), która jest aktywowana wzrostem zewnątrzkomórkowego stężenia glukozy, co z kolei wiąże transport mitochondriów z dostępnością składników odżywczych [55].

Mitochondria, które nieprawidłowo funkcjonują (wyselekcjonowane mitochondria z bardzo obniżonym potencjałem wewnętrznej błony mitochondrialnej) są transportowane do perykarionu, gdzie ulegają degradacji w procesie mitofagii. W ten transport mitochondriów zaangażowane jest inne białko motoryczne, dyneina. Dyneina jest kompleksowym białkiem o dużej masie cząsteczkowej zbudowanym z dwóch łańcuchów ciężkich (DHC, ang. *Dynein heavy chain*,) zakończonych globularnymi głowami i odpowiedzialnych za generowanie ruchu oraz kilku łańcuchów lekkich. Specyficzność transportowanych cząsteczek bądź organelli jest uzależniona od różnych izoform pośrednich i lekkich łańcuchów wcho-

dzących w skład dyneiny [56]. Do transportu mitochondriów dyneina potrzebuje obecności wielkocząsteczkowego kompleksu białkowego o nazwie dynaktyna. Białko to funkcjonuje jako cząsteczka adaptorowa pomiędzy dyneiną i mitochondriami, ale również zwiększa aktywność motoryczną dyneiny [53,57].

Procesy fuzji i fragmentacji mitochondriów oraz transport aksonalny są ze sobą funkcjonalnie powiązane. Białko motoryczne dyneina poza udziałem w transporcie mitochondriów jest również zaangażowane w proces ich fuzji poprzez udział w rekrutacji białka Drp1 [58]. Z kolei uczestnicząca w fuzji mitochondriów mitofuzyna 2 wchodzi w interakcję z białkiem adaptorowym kinezyzny – Miro 2, regulując w ten sposób transport aksonalny w obu kierunkach [52]. Prawidłowo przebiegające procesy fragmentacji prowadzą do powstawania mitochondriów o rozmiarach pozwalających na ich transport do dystalnych części komórki. Z drugiej zaś strony wydajny transport mitochondriów jest potrzebny do ich fuzji. Te powiązane ze sobą procesy, wspólnie określane mianem dynamiki mitochondriów, są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórek, a w szczególności silnie spolaryzowanych komórek o wysokim zapotrzebowaniu energetycznym jakimi są neurony.

ZABURZENIA TRANSPORTU AKSONALNEGO MITOCHONDRIÓW W ALS

W niektórych chorobach neurodegeneracyjnych transport aksonalny mitochondriów jest zaburzony, a jest to spowodowane mutacją w genie kodującym białko motoryczne kinezyne (na przykład u pacjentów z dziedziczną paraplegią spastyczną oraz chorobą Charcot-Marie-Tooth typu 2). Z kolei mutacje w genie kodującym dyneinę (*DYNC1H1*, łańcuch ciężki dyneiny) wykazano w rdzeniowym zaniku mięśni (SMA, ang. *Spinal muscular atrophy*). Mutacja w genie kodującym jedną z podjednostek dynaktyny (*DCTN1*, białko adaptorowe dyneiny) prowadzi do dziedzicznej neuropatii ruchowej typu 7B (HMN7B, ang. *Hereditary motor neuropathy 7B*) [56]. Przytoczone powyżej przykłady pokazują, iż zaburzenia transportu aksonalnego spowodowane mutacjami bezpośrednio w białkach motorycznych są przyczyną tych chorób neurodegeneracyjnych. Jednak podobne zaburzenia mają miejsce również w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych nie związanych z mutacjami w białkach motorycznych zaangażowanych w transport mitochondriów.

Bezpośrednie dowody świadczące o zmianach w funkcjonowaniu transportu aksonalnego mitochondriów u pacjentów cierpiących na choroby neurodegeneracyjne są ograniczone ze względu na brak możliwości uzyskiwania materiału biopsyjnego oraz trudności w badaniu transportu mitochondrialnego w materiale autopsyjnym [59]. Badania pośmiertnie przeprowadzone na neuronach motorycznych pacjentów z ALS, jak również na modelach zwierzęcych rodzinnej formy tego schorzenia, wskazują

na upośledzenie zarówno postępowego jak i wstecznego transportu mitochondriów [57].

W hodowlach komórkowych pierwotnych neuronów motorycznych, wyprowadzonych z embrionów transgenicznym myszy, z nadprodukcją zmutowanej formy SOD1, wykazano spowolniony transport mitochondriów do zakończeń aksonów oraz ich akumulację w perykaryonie [60]. Zmniejszona szybkość i czas trwania transportu wstecznego charakteryzuje również mitochondria neuronów transgenicznych szczurów z nadprodukcją zmutowanej formy białka VAPB (ang. *Vesicle-associated membrane protein B*) odpowiedzialnego za dziedziczną formę ALS typu 8 [61]. W transfekowanych (zmutowaną formą SOD1) komórkach linii NSC34, zróżnicowanych w kierunku neuronów motorycznych, ruch mitochondriów był z kolei zaburzony w obu kierunkach [45]. Podobne wyniki uzyskano monitorując transport mitochondriów w neuronach motorycznych, wyizolowanych z myszy z nadprodukcją zmutowanej formy SOD1, hodowanych w kokulturze z astrocytami rdzenia kręgowego [37]. Nadprodukcja zmutowanej formy białka TDP-43 także prowadziła do znacznego zmniejszenia ruchliwości mitochondriów w obu kierunkach, zarówno w aksonach jak i dendrytach neuronów motorycznych wyizolowanych z embrionów transgenicznych myszy [62]. Ponieważ, opisane powyżej badania *in vitro* nie pozwalają w pełni odtworzyć warunków panujących w organizmie, Magrane i współpracownicy opracowali metodę obrazowania transportu mitochondriów *in vivo* w myszach z nadprodukcją zmutowanego białka SOD1 lub TDP-43, u których wyznakowano fluorescencyjnie mitochondria neuronów białkiem Dendra. Również w tym przypadku wykazano zaburzenia transportu mitochondriów w obu kierunkach we wczesnej fazie rozwoju choroby zarówno w przypadku myszy z nadprodukcją zmutowanej formy SOD1 jak i TDP-43 [63].

Zaburzenia transportu aksonalnego mitochondriów, prowadzące do nieprawidłowego ich rozmieszczenia w komórkach neuronów motorycznych mogą odgrywać istotną rolę w patogenezie stwardnienia zanikowego bocznego.

PODSUMOWANIE

Wiedza na temat dokładnego mechanizmu selektywnego obumierania neuronów motorycznych w przebiegu stwardnienia zanikowego bocznego jest nadal ograniczona. Przyniesione w tej pracy wyniki rozlicznych badań wskazują, że zaburzenia dynamiki, dystrybucji i funkcjonowania mitochondriów mają tu duże znaczenie. Wiadomo, że zaburzony transport mitochondriów może wpływać na nieprawidłową morfologię i redystrybucję mitochondriów, prowadząc do zmniejszenia ich ilości w zakończeniach neuronów, co oznacza obniżenie poziomu ATP w tym rejonie oraz prowadzi do zaburzeń w buforowaniu wapnia przez mitochondria. Co więcej upośledzony transport może prowadzić do zmiany fuzji i fragmentacji mitochondriów [50]. W przypadku formy rodzinnej ALS wielokrotnie wykazano, iż zmutowane białka takie jak SOD1 czy TDP43 są zdolne wiązać się do zewnętrz-

nej błony mitochondrialnej lub oddziaływać z białkami transportu aksonalnego, wpływając tym samym na dynamikę tych organelli. Jednak dokładny scenariusz, według którego dochodzi do tego typu zaburzeń pozostaje nadal kwestią do wyjaśnienia [64]. Obniżony potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej, czy podniesiony poziom jonów wapnia w cytosolu, które wielokrotnie wykazywano w przebiegu ALS mogą również wpływać na proces transportu mitochondriów [50].

Stwardnienie zanikowe boczne jest uznawane za chorobę o złożonej etiologii, do której powstania przyczynia się wiele, niejednokrotnie współdziałających ze sobą procesów [65]. Należą do nich z pewnością zaburzenia związane z funkcjonowaniem i dynamiką mitochondriów. Nadal jednak nierozstrzygniętą kwestią pozostaje czy zmiany te są przyczyną degradacji neuronów motorycznych, czy jedynie konsekwencją innych procesów patofizjologicznych. Z tego względu niezwykle ważne jest ustalenie prawidłowego łańcucha zdarzeń w przebiegu ALS, co pozwoliłoby na opracowanie diagnostyki i potencjalnych celów terapeutycznych.

PIŚMIENNICTWO

1. McGoldrick P, Joyce PI, Fisher EMC, Greensmith L (2013) Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1832: 1421-1436
2. Blokhuis AM, Groen EJM, Koppers M, van der Berg LH, Pasterkamp RJ (2013) Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 125: 777-794
3. Boillée S, Vande Velde C, Cleveland DW (2006) ALS: A Disease of Motor Neurons and Their Nonneuronal Neighbors. *Neuron* 53: 39-59
4. Kawamata H, Manfredi G (2010) Mitochondrial dysfunction and intracellular calcium dysregulation in ALS. *Mech Aging Dev* 362: 59-62
5. Rosen DR, Siddigie T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX et al. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362: 59-62
6. Martin LJ (2012) Biology of Mitochondria in Neurodegenerative Diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci* 107: 355-415
7. Carri MT, Cozzolino M (2011) SOD1 and mitochondria in ALS: a dangerous liaison. *J Bioenerg Biomembr* 43: 593-599
8. Shaw PJ (2005) Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neuron disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76: 1046-1057
9. Panov A, Kubalik N, Zinchenko N, Hemendinger R, Dikalov S, Bonkovsky HL (2011) Respiration and ROS production in brain and spinal cord mitochondria of transgenic rats with mutant G93A Cu/Zn-superoxide dismutase gene. *Neurobiol Dis* 44: 53-62
10. Wojtczak L, Zabłocki K (2008) Mitochondria in cell life, death and disease. *Postepy Biochem* 54: 129-141
11. Tan W, Pasinelli P, Trotti D (2014) Role of mitochondria in mutant SOD1 linked amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1842: 1295-1301
12. Muyderman H, Chen T (2014) Mitochondrial dysfunction in ALS - a valid pharmacological target. *Br J Pharmacol* 171: 2191-205
13. Petrozzi L, Ricci G, Giglioli NJ, Siciliano G, Mancuso M (2007) Mitochondria and Neurodegeneration. *Biosci Rep* 27: 87-104
14. Shi P, Wei Y, Zhang J, Gal J, Zhu H (2010) Mitochondrial dysfunction is a converging point of multiple pathological pathways in amyotrophic lateral sclerosis. *J Alzheimers Dis* 20: 311-324
15. Wiedemann FR, Winkler K, Kuznetsov AV, Bartels C, Vielhaber S, Feistner H, Kunz WS (1998) Impairment of mitochondrial function in skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurological Sci* 156: 65-72

16. Carri MT, Ferri A, Battistoni A, Famhy L, Gabbianelli R, Poccia F, Rotilio G (1997) Expression of Cu,Zn superoxide dismutase typical of familial amyotrophic lateral sclerosis induces mitochondrial alteration and increase of cytosolic Ca²⁺ concentration in transfected neuroblastoma SH-SY5Y cells. *FEBS letters* 414: 365-368
17. Cousse E, De Smet P, Bogaert E, Elens I, Van Damme P, Willems P, Koopman W, Van Den Bosch L, Callewaert G (2011) G37R SOD1 mutant alters mitochondrial complex I activity, Ca²⁺ uptake and ATP production. *Cell Calcium* 49: 217-225
18. Li Q, Vande Velde C, Israelson A, Xie J, Bailey AO, Dong MQ, Chun SJ, Roy T, Winer L, Yates JR, Capaldi RA, Cleveland DW, Miller TM (2010) ALS-linked mutant superoxide dismutase 1 (SOD1) alters mitochondrial protein composition and decreases protein import. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 21146-21151
19. Menzies FM, Cookson MR, Taylor RW, Turnbull DM, Chrzanowska-Lightowlers ZMA, Dong L, Figlewicz DA, Shaw PJ (2002) Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 125: 1522-1533
20. Youle RJ, van der Bliek AM (2012) Mitochondrial Fission, Fusion and Stress. *Science* 337: 1062-1065
21. Ishihara N, Otera H, Oka T, Mihara K (2013) Regulation and physiologic functions of GTPases in mitochondrial fusion and fission in mammals. *Antiox Redox Signal* 19: 389-399
22. Detmer SA, Chan DC (2007) Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 870-879
23. Chan DC (2012) Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu Rev Genet* 46: 265-287
24. Van der Bliek AM, Shen Q, Kawajiri S (2013) Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: a011072
25. Chan DC (2006) Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Ann Rev Cell Dev Biol* 22: 79-99
26. Palmer CS, Osellame LD, Stojanovski D, Ryan MT (2011) The regulation of mitochondrial morphology: Intricate mechanisms and dynamic machinery. *Cell Signal* 23: 1534-1545
27. Ugarte-Urbe B, García-Sáez AJ (2014) Membranes in motion: mitochondrial dynamics and their role in apoptosis. *Biol Chem* 395: 297-311
28. Otera H, Mihara K (2011) Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial dynamics. *J Biochem* 149: 241-251
29. Baker MJ, Lampe PA, Stojanovski D, Korwitz A, Anand R, Tatsutu T, Langer T (2014) Stress-induced OMA1 activation and autocatalytic turnover regulate OPA1-dependent mitochondrial dynamics. *EMBO J* 33: 578-593
30. Ehses S, Raschke I, Mancuso G, Bernacchia A, Geimer S, Tondera D, Martinou JC, Westermann B, Rugarli EI, Langer T (2009) Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1. *J Cell Biol* 28: 1023-1036
31. Chang CR, Blackstone C (2010) Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Ann N Y Acad Sci* 1201: 34-39
32. Otera H, Ishihara N, Mihara K (2013) New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta* 1833: 1256-1268
33. Elgass K, Pakay J, Ryan MT, Palmer CS (2013) Recent advances into the understanding of mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta* 1833: 150-161
34. Dikov D, Reichert AS (2011) How to split up: lessons from mitochondria. *EMBO J* 30: 2751-2753
35. Santel A, Frank S (2008) Shaping mitochondria: the complex posttranslational regulation of the mitochondrial fission protein DRP1. *IUBMB Life* 60: 448-455
36. Vande Velde C, McDonald KK, Boukhedimi Y, McAlonis-Downes M, Lobsiger CS, Bel Hadji S, Zandona A, Julien JP, Shah SB, Cleveland DW (2011) Misfolded SOD1 associated with motor neuron mitochondria alters mitochondrial shape and distribution prior to clinical onset. *PLoS One* 6: e22031
37. Song W, Song Y, Kincaid B, Bossy B, Bossy-Wetzel E (2013) Mutant SOD1G93A triggers mitochondrial fragmentation in spinal cord motor neurons: neuroprotection by SIRT3 and PGC-1 alpha. *Neurobiol Dis* 51: 74-81
38. Sasaki S, Warita H, Murakami T, Abe K, Iwata M (2004) Ultrastructural study of mitochondria in the spinal cord of transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Acta Neuropathol* 107: 461-474
39. Magrane J, Hervias I, Henning MS, Damiano M, Kawamata H, Manfredi G (2009) Mutant SOD1 in neuronal mitochondria causes toxicity and mitochondrial dynamics abnormalities. *Hum Mol Genet* 18: 4552-4564
40. Hong K, Li Y, Duan W, Guo Y, Jiang H, Li W et al. (2012) Full-length TDP-43 and its C-terminal fragments activate mitophagy in NSC34 cell line. *Neurosci Lett* 530: 144-149
41. Lu J, Duan W, Guo Y, Jiang H, Li Z, Huang J, Hong K, Li C (2012) Mitochondrial dysfunction in human TDP-43 transfected NSC34 cell lines and the protective effect of dimethoxy curcumin. *Brain Res Bull* 89: 185-190
42. Ferri A, Fiorenzo P, Nencini M, Cozzolino M, Pesaresi MG, Valle C, Sepe S, Moreno S, Carri MT (2010) Glutaredoxin 2 prevents aggregation of mutant SOD1 in mitochondria and abolishes its toxicity. *Hum Mol Genet* 19: 4529-4542
43. Liu W, Tian F, Morimoto N, Yamashita T, Ikeda Y, Deguchi K, Abe K (2013) Mitochondrial fusion and fission proteins expression dynamically change in a murine model of amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Neurovasc Res* 10: 222-230
44. Xu YF, Gendron TF, Zhang YJ, Lin WL, D'Alton S, Sheng H, Castanedes Casey M, Tong J, Knight J, Yu X, Rademakers R, Boylan K, Hutton M, McGowan E, Dickson DW, Lewis J, Petrucelli L (2010) Wild-Type Human TDP-43 Expression Causes TDP-43 Phosphorylation, Mitochondrial Aggregation, Motor Deficits, and Early Mortality in Transgenic Mice. *J Neurosci* 30: 10851-10859
45. Magrane J, Manfredi G (2009) Mitochondrial Function, Morphology, and Axonal Transport in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Antioxid Redox Sign* 11: 1615-1626
46. Reddy PH, Reddy TP, Manczak M, Calkins MJ, Shirendeb U, Mao P (2011) Dynamin-related protein 1 and mitochondrial fragmentation in neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 67: 103-118
47. Chaturvedi RK, Flint Beal M (2013) Mitochondrial Diseases of the Brain. *Free Radical Bio Med* 63: 1-29
48. Sasaki S, Iwata M (1996) Ultrastructural study of synapses in the anterior horn neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 204: 53-56
49. Sasaki S, Iwata M (2007) Mitochondrial alterations in the spinal cord of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 66: 10-16
50. Shi P, Gal J, Kwinter DM, Liu X, Zhu H (2010) Mitochondrial Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1802: 45-51
51. Chen H, Chan DC (2009) Mitochondrial dynamics - fusion, fission, movement, and mitophagy - in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* 18: 169-176
52. Sheng ZH (2014) Mitochondrial trafficking and anchoring in neurons: New insight and implications. *J Cell Biol* 204: 1087-1098
53. Hirokawa N, Shinsuke N, Tanaka Y (2010) Molecular Motors in Neurons: Transport Mechanisms and Roles in Brain Function, Development, and Disease. *Neuron* 68: 610-638
54. Chudy A, Gajewska B, Gutowicz M, Barańczyk-Kuźma A (2011) Białka transportu wewnątrzkomórkowego: klasyfikacja, budowa i funkcje kinezyn. *Postepy Hig Med Dosw*: 65: 588-596
55. 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
56. Hinkelmann MV, Zala D, Saudou F (2013) Releasing the brake: restoring fast axonal transport in neurodegenerative disorders. *Trends Cell Biol* 23: 634-643
57. Ström AL, Gal J, Shi P, Kasarskis EJ, Hayward LJ, Zhu H (2008) Retrograde axonal transport and motor neuron disease. *J Neurochem* 106: 495-505

58. Varadi A, Johnson-Cadwell LI, Cirulli V, Yoon Y, Allan VJ, Rutter GA (2014) Cytoplasmic dynein regulates the subcellular distribution of mitochondria by controlling the recruitment of the fission factor dynamin-related protein-1. *J Cell Sci* 117: 4389-4400
59. Schon EA, Przedborski S (2011) Mitochondria: The Next (Neurode) Generation. *Neuron* 70: 1033-1053
60. De Vos KJ, Chapman AL, Tennant ME, Manser C, Tudor EL, Lau KF, Brownlee J, Ackerley S, Shaw PJ, McLoughlin DM, Shaw CE, Leigh PN, Miller CCJ, Grierson AJ (2007) Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Hum Mol Genet* 16: 2720-2728
61. Mórotz GM, De Vos KJ, Vagnoni A, Ackerley S, Shaw CE, Miller CC (2012) Amyotrophic lateral sclerosis-associated mutant VAPBP56S perturbs calcium homeostasis to disrupt axonal transport of mitochondria. *Hum Mol Genet* 21: 1979-1988
62. Wang W, Li L, Li WL, Dickson DW, Petrucelli L, Zha T, Wang X (2013) The ALS disease-associated mutant TDP-43 impairs mitochondrial dynamics and function in motor neurons. *Hum Mol Genet* 22: 4706-4719
63. Magrané J, Cortez C, Gan WB, Manfredi G (2014) Abnormal Mitochondrial Transport and Morphology are Common Pathological Denominators in SOD1 and TDP43 ALS Mouse Models. *Hum Mol Genet* 23: 1413-1424
64. Karbowski M, Neutzner A (2012) Neurodegeneration as a consequence of failed mitochondrial maintenance. *Acta Neuropathol* 123: 157-171
65. Duffy LM, Chapman AL, Shaw PJ, Grierson AJ (2011) The role of mitochondria in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropath Appl Neuro* 37: 336-352

Dysfunction of mitochondrial dynamic and distribution in Amyotrophic Lateral Sclerosis

Jarosław Walczak, Joanna Szczepanowska✉

Laboratory of Bioenergetics and Biomembranes, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, 3 Pasteur Str., 02-093 Warsaw, Poland

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

Key words: ALS, mitochondrial dynamics, mitochondrial transport, neurodegeneration

ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a complex disease leading to degradation of motor neurons. One of the early symptoms of many neurodegenerative disorders are mitochondrial dysfunctions. Since few decades mitochondrial morphology changes have been observed in tissues of patients with ALS. Mitochondria are highly dynamic organelles which constantly undergo continuous process of fusion and fission and are actively transported within the cell. Proper functioning of mitochondrial dynamics and distribution is crucial for cell survival, especially neuronal cells that have long axons. This article summarizes the current knowledge about the role of mitochondrial dynamics and distribution in pathophysiology of familial and sporadic form of ALS.