

## НУЖЕН ЛИ ТРАНСМЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ДЛЯ СЛИЯНИЯ МИТОХОНДРИЙ?

### Обзор

© 2015 Ю.Е. Караваева<sup>1</sup>, К.В. Шехирева<sup>1</sup>,  
Ф.Ф. Северин<sup>2</sup>, Д.А. Кнорре<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991 Москва;  
факс: +7(495)939-3181, электронная почта: knorre@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 23.12.14  
После доработки 13.01.15

Снижение трансмембранного потенциала митохондрий подавляет их способность к слиянию, что, в свою очередь, позволяет предотвратить воссоединение нефункциональных органелл с митохондриальной сетью клетки и приводит к деградации митохондрий, содержащих поврежденные макромолекулы, путем аутофагии. Однако является ли трансмембранный потенциал непосредственно тем фактором, который регулирует процесс слияния или его влияние лишь косвенно? В литературе есть множество свидетельств о том, что ингибирование АТФ-синтазы нарушает равновесие процессов деления и слияния и приводит к фрагментации митохондрий. В то же время митохондрии дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, лишенные функциональной дыхательной цепи или обработанные разобщителем, сохраняют способность к слиянию. Деполяризованные митохондрии многоклеточных животных также сохраняют способность к слиянию в течение некоторого времени. Эти данные свидетельствуют о том, что сам по себе трансмембранный потенциал не является лимитирующим фактором при слиянии митохондрий. Кроме того, регуляция, основанная на непосредственном измерении трансмембранного потенциала, предполагает, что митохондрии с нефункциональной АТФ-синтазой, но с работающей дыхательной цепью не будут отбраковываться в результате митофагии. Это должно приводить к накоплению мтДНК с мутациями в генах, кодирующих субъединицы АТФ-синтазы. Мы предполагаем, что трансмембранный потенциал митохондрий не играет непосредственной роли в регуляции слияния митохондрий, но влияет на другие параметры, в частности на соотношение NTP/NDP в межмембранном пространстве митохондрий, которое, в свою очередь, регулирует их слияние.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** митохондрии, деление, слияние, трансмембранный потенциал, мтДНК, регуляция.

Митохондрии присутствуют практически во всех метаболически активных клетках эукариот, за исключением эритроцитов млекопитающих [1], клеток эпителия хрусталика глаза животных [2] и одноклеточных паразитических организмов микроспоридий, утративших митохондрии в процессе эволюции [3]. В клетке митохондрии образуют ретикулум (сеть), топология которого постоянно меняется из-за того, что отдельные

элементы этой сети – митохондрии – регулярно сливаются и делятся. Соотношение частот этих процессов определяет структуру митохондриального ретикулума [4–6]. Замедление или полная остановка процесса деления приводит к образованию одной общей митохондриальной сети, а нарушение слияния – к фрагментации митохондрий (рис. 1). Какова роль динамики митохондрий в клетке? За счет слияния или деления митохондрий клетка может решать различные задачи.

1. Разделение цитоплазмы во время клеточного деления предполагает также распределение митохондрий между двумя образующимися клетками. Для этого, очевидно, необходимо деление митохондрий, предшествующее цитокинезу. Было показано, что в некоторых типах кле-

Принятые сокращения: мтДНК – митохондриальная ДНК; NDP – нуклеотид-дифосфат; NTP – нуклеотид-трифосфат; СССР – карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон (carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone); FCCP – карбонилцианид-4-трифторметокси-фенилгидразон (carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazine).

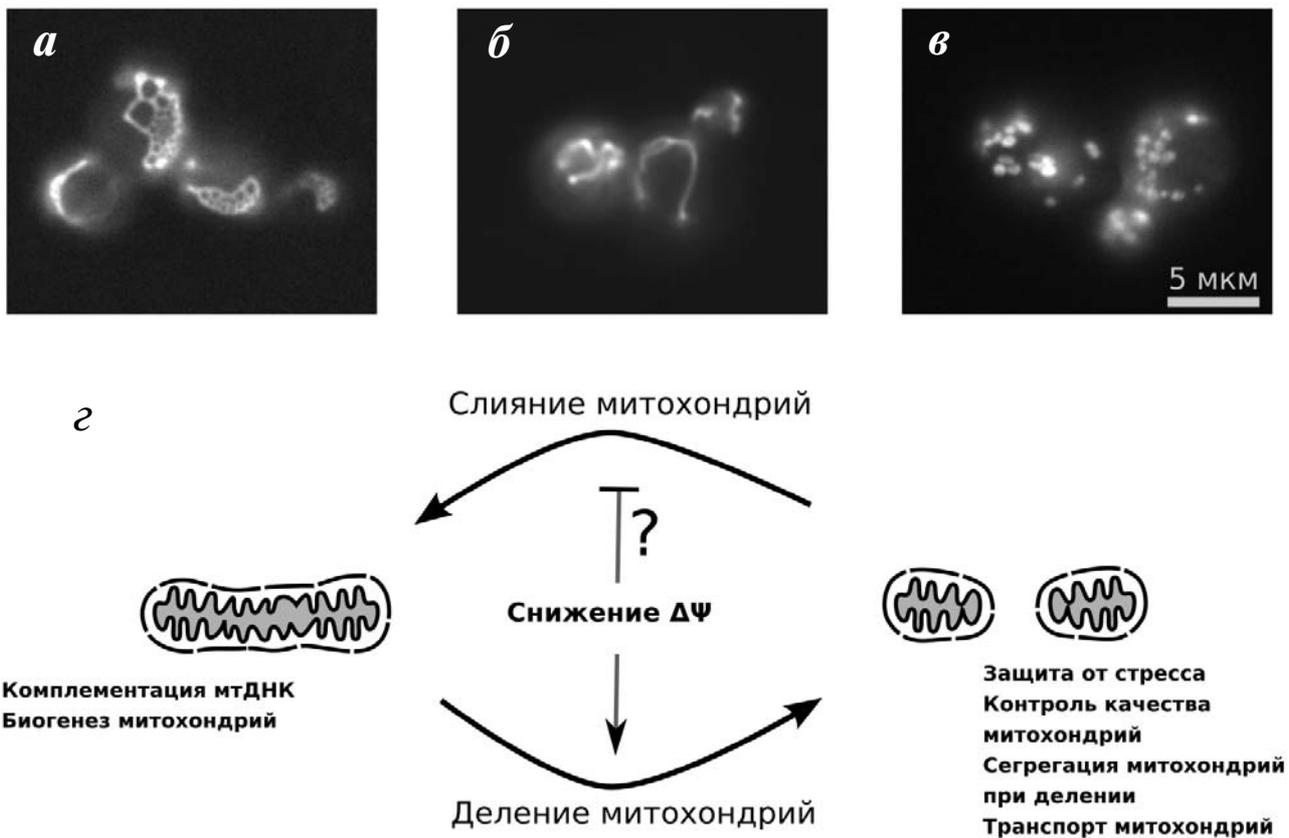
\* Адресат для корреспонденции.

ток структура митохондриального ретикулума меняется в зависимости от фазы клеточного цикла [7, 8], а средняя длина митохондриальных филаментов несколько больше в течение интерфазы, чем во время митоза [9]. В клетках почки крысы, экспрессирующих митохондриально адресованный флуоресцентный белок, можно наблюдать фрагментацию митохондриального ретикулума во время митоза [10], которая может быть необходима для равного распределения митохондрий между двумя новообразованными клетками [11].

2. Интенсивное дробление митохондрий является одним из этапов активации программы самоубийства клеток многоклеточных животных – апоптоза [12, 13]. В межмембранном пространстве митохондрий содержатся белки-трансдукторы каскада активации апоптоза: цитохром *c* [14], AIF [15], SMAC и некоторые другие [16, 17]. При образовании пор во внешней мембране митохондрий эти белки выходят из

межмембранного пространства в цитоплазму, где связываются со своими рецепторами, инициируя дальнейшие события каскада. Однако выход вышеупомянутых белков может быть частично ограничен из-за образования внутренней мембраной митохондрий складок (крист), в полости которых и содержится большая часть данных белков [18]. Можно предположить, что деление митохондрий способствует перестройке внутренней структуры митохондрий и тем самым облегчает выход иммобилизованных в кристах белков. С другой стороны, возможна и непрямая связь между дроблением митохондрий и активацией апоптоза: недавно было показано, что изменение структуры митохондрий при делении способствует олигомеризации проапоптотического белка Вах, в конечном счете приводящей к пермеабиллизации внутренней мембраны митохондрий [19].

3. Слияние митохондрий происходит при слиянии гамет некоторых микроорганизмов, кото-



**Рис. 1.** Структура митохондриального ретикулума определяется балансом процессов деления и слияния митохондрий. *a* – Клетки дрожжей с делетированным геном *DNM1* (*W303 MATa dnm1::KanMX4*); *б* – клетки дикого типа (*W303 MATa*); *в* – клетки с делетированным геном митофузина *FZO1* (*W303 MATa fzo1::KanMX4*). Структуру митохондрий визуализировали, экспрессируя в клетках белок GFP, слитый с сигналом митохондриальной локализации; *з* – схема иллюстрирует возможный эффект деполаризации внутренней мембраны митохондрий и функциональную роль слитого и фрагментированного митохондриального ретикулума

рые, в отличие от большинства многоклеточных, получают мтДНК от обоих родителей. Примером таких организмов являются пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. мтДНК, полученная при слиянии гаплоидных клеток дрожжей, быстро рекомбинирует в образовавшейся диплоидной клетке [20, 21]. В результате у потомков этой клетки за счет случайной сегрегации различных вариантов мтДНК будут возникать все возможные комбинации аллелей митохондриального генома, которые можно получить из двух его вариантов, унаследованных от слившихся гаплоидных гамет. Таким образом, из двух мтДНК, содержащих различные «вредные» мутации в белок-кодирующих генах, может быть получен полностью функциональный вариант митохондриального генома [22]. Предполагают, что подобная комплементация мтДНК происходит в мышечных клетках многоклеточных животных [23]. Было показано, что подавление процессов слияния митохондрий приводит к мышечной атрофии и быстрому накоплению мутаций в мтДНК мышечных клеток [24].

4. Перестройка структуры митохондриальной сети может быть ассоциирована с изменениями метаболизма клетки: в эмбриональных фибробластах мышцы, синтезирующих большую часть АТФ путем гликолиза, митохондрии представлены преимущественно в виде небольших отдельных органелл. В то же время, если эти клетки поместить в условия, способствующие интенсивному окислительному фосфорилированию, средняя протяженность отдельных митохондрий значительно увеличивается [25]. Можно также предположить, что в условиях стресса, при котором возможны нарушение работы комплексов дыхательной цепи и утечка протонов через внутреннюю мембрану, митохондрии делятся на более короткие фрагменты, чтобы локализовать возникшие повреждения в одной митохондрии. Было показано, что точечное повреждение участка протяженного митохондриального филамента лазером приводит к деполяризации большого участка митохондриальной сети [26]. Очевидно, что более раздробленная структура митохондрий может препятствовать этому и предотвращать нежелательное рассеивание энергии клеткой [27].

5. Процессы слияния и деления митохондрий необходимы для контроля качества их содержимого [28]. Показано, что с определенной вероятностью от митохондриальной сети отделяется фрагмент – небольшая по размерам митохондрия, которая впоследствии деполяризуется [29]. Можно предположить, что сам процесс дробления митохондрий приводит к временно увеличению проводимости внутренней

мембраны. После этого митохондрия либо реэнергизуется и вновь сливается с митохондриальной сетью, либо поглощается с аутофагосомой и переваривается [29–31]. Совокупность этих процессов позволяет избавляться от поврежденных макромолекул, которые не могут быть удалены другим способом [32], и, как недавно предположили, препятствует накоплению и распространению мутантных форм мтДНК [33, 34].

Выполнение всех этих задач требует тщательной регуляции процессов слияния и деления митохондрий. В своем обзоре мы рассматриваем биоэнергетические аспекты регуляции митохондриальной динамики, уделяя особое внимание роли трансмембранного потенциала на внутренней мембране митохондрий в процессах их слияния и деления.

### ДЕЛЕНИЕ МИТОХОНДРИЙ: МЕХАНИЗМ И СПОСОБЫ РЕГУЛЯЦИИ

Деление митохондрий в клетках животных осуществляется динамин-подобным белком Drp1, который образует олигомеры на поверхности наружной мембраны митохондрий [35]. Доменная структура этого белка достаточно консервативна, он содержит четыре домена: GTPазный, срединный, вариабельный и GTP-связывающий эффекторный домен (GED) [36]. Ранее подобный белок – Dnm1 – был обнаружен у грибов [37]. Dnm1 способен связываться с липидной мембраной и олигомеризоваться на ее поверхности, образуя спираль, которая может несколько раз опоясывать мембранную везикулу. В роли данной везикулы может выступать как митохондрия [38], так и искусственная липосома [39]. Белок может связываться с поверхностью мембран в свободной форме [39], но *in vivo* этого, по всей видимости, не происходит – константа диссоциации GTP значительно ниже его физиологической концентрации [36]. Кроме того, в системах *in vitro* добавление негидролизующих аналогов GTP индуцирует полимеризацию Dnm1 и усиливает его взаимодействие с липосомами, что также свидетельствует о том, что в клетке к внешней мембране митохондрии присоединяется уже GTP-связанная форма белка [40]. Гидролиз GTP вызывает конформационную перестройку белка, приводящую к изменению параметров образованной им спирали: диаметр спирали уменьшается с ~80 нм до ~25 нм [39]. Предполагают, что такого сужения диаметра митохондриальной везикулы должно быть достаточно для ее разделения на две части, однако подробности дальнейших этапов деления

остаются на данный момент неизученными. Возможно, что для дальнейшего разделения митохондрий необходим их активный транспорт вдоль элементов цитоскелета: было показано, что растягивание мембранных везикул под действием белка динамина способствует их дроблению [41].

Как происходит выбор участка митохондрии, с которым связываются динамин-подобные белки и по которому в дальнейшем осуществляется разделение органеллы? Drp1 связывается со специализированными рецепторами, локализованными на наружной мембране: Mid49, Mid51 [42] или Mff [43]. В клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* используется другой рецептор – Fis1, который через адаптерные белки Caf4 и Mdv1 связывает Dnm1 [44, 45]. У животных динамин-подобный белок Drp1 также может связываться с белком Fis1 [46], однако его делеция не влияет на способность митохондрий к делению [47]. Предполагают, что наличие или отсутствие белка Fis1 в сайте дробления митохондрий может определять ее дальнейшую судьбу в клетке [48]. При этом роль рецепторов динамин-подобных белков не ограничивается привлечением своих лигандов на поверхность мембраны: было показано, что кополимеризация Mid51 с Drp1 позволяет уменьшить диаметр спирали еще сильнее, чем в случае гомоолигомера – до ~15 нм [49]. Кроме того, согласно недавним исследованиям, белок Mid51 содержит домен, специфически связывающий пуриновые динуклеотиды: GDP и ADP [50]. Наличие такого домена указывает на возможную регуляцию процесса деления митохондрий в зависимости от метаболического статуса клетки, однако данный вопрос требует дальнейшего изучения, т.к. мутация в нуклеотид-связывающем домене Mid51 не предотвращает его связывание с Drp1 [50].

Регуляция связывания Drp1 происходит также на уровне его посттрансляционных модификаций. Было показано, что добавление разобщителя FCCP вызывает фрагментацию митохондрий в клетках дикого типа, но не в клетках, экспрессирующих нефункциональный мутантный вариант белка Drp1 – Drp1 K38A [51, 52]. Оказалось, что разобщитель вызывает снижение уровня фосфорилирования Ser-637, что препятствует связыванию Drp1 с Mff1 [53]. Данный эффект обусловлен выходом из митохондрии ионов кальция [54], которые активируют протеин-фосфатазу кальцинеурин [55]. Таким образом, добавление разобщителей дыхания и окислительного фосфорилирования способствует делению митохондрий.

Следует отметить, что белки-рецепторы Drp1/Dnm1 колокализуются с сайтами контакта ми-

тохондрии с эндоплазматическим ретикуломом, где обычно и происходит деление органеллы [56].

## СЛИЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ

Слияние митохондрий происходит в три этапа: 1) «докинг» – состыковка (сближение) двух отдельных органелл внешними мембранами, 2) слияние наружных мембран, 3) слияние внутренних мембран. За первые два этапа отвечают белки митофузины: Mfn1 и Mfn2 у животных [57, 58] и Fzo1 у пекарских дрожжей [59]. Белки Mfn1, Mfn2 и Fzo1 представляют собой динамин-подобные GTPазы, однако молекулярный механизм их работы изучен заметно хуже, чем в случае Drp1. Показано, что белок Fzo1 встраивается во внешнюю мембрану митохондрии, связывает GTP, после чего димеризуется. В таком виде он способен образовывать *транс*-димеры – комплексы из двух димеров митофузинов, локализованных во внешней мембране разных митохондрий [60]. Образование *транс*-димера сопряжено с появлением дисульфидных мостиков между белками, встроенными во внешние мембраны осуществляющих докинг митохондрий [61]. Далее происходит гидролиз GTP, что вызывает цепь последующих событий: конформационную перестройку митофузина, его убиквитинилирование и протеолитическую деградацию [60]. Добавление негидролизующих аналогов GTP блокирует способность митохондрий к слиянию [62]. За следующий этап – слияние внутренних мембран митохондрий – отвечает GTPаза OPA1 (Mgm1 у дрожжей) [63, 64], этот белок связывается с внешней поверхностью внутренней мембраны митохондрий и процессируется протеазами, локализованными в межмембранном пространстве [65]. В зависимости от сайта протеолиза процессинг приводит либо к созреванию функциональной формы белка [25], либо к его инактивации [65, 66].

Процессы слияния наружных и внутренних мембран митохондрий в системах *in vitro* могут быть разделены во времени [25, 62]. При этом происходит появление необычных структур, в которых несколько митопластов оказываются окружены общей внешней мембраной. Такие митохондрии также наблюдали в интактных клетках животных [67, 68] и дрожжей [27, 69]. Важную роль в слиянии митохондрий играет их липидный состав. Так, на примере пекарских дрожжей было показано, что одновременное подавление синтеза кардиолипина и фосфатидилэтаноламина приводит к ингибированию процесса слияния митохондрий [70].

## РОЛЬ ТРАНСМЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА В ПРОЦЕССЕ СЛИЯНИЯ МИТОХОНДРИЙ

Добавление разобщителей дыхания и окислительного фосфорилирования вызывает фрагментацию митохондриального ретикулула, что обычно объясняют ингибированием процесса слияния митохондрий [71, 72]. Аналогичный эффект может быть вызван и другими причинами, приводящими к снижению трансмембранного потенциала митохондрий, а именно: воздействием ингибиторов дыхательной цепи митохондрий [73–81], мутациями в генах, кодирующих ферменты дыхательной цепи [74, 82, 83], и потерей мтДНК [72, 81, 84, 85]. Согласно наблюдениям, в экспериментах в системе *in vitro* добавление разобщителя предотвращает слияние мембран митохондрий [62, 86]. Аналогичный эффект обнаружен при индукции слияния клеток HeLa полиэтиленгликолем: слияние митохондрий, следующее за объединением цитоплазм клеток, было ингибировано добавлением СССР, но не других веществ, вызывающих снижение концентрации АТР [72].

На основе этих данных было сделано предположение о том, что способность мембран митохондрий к слиянию регулируется их потенциалом. Действительно, такая регуляция представляется разумной: присоединение митохондрии с сильной утечкой протонов к митохондриальной сети может привести к избыточному рассеиванию энергии в клетке.

Но как изменение трансмембранного потенциала может влиять на работу белковых комплексов, отвечающих за слияние митохондрий? Предполагают существование по крайней мере двух механизмов.

1. При деполяризации митохондрий замедляется импорт в них белков. Примером белка, для которого показана остановка импорта в митохондрию, является РТЕН-индуцируемая киназа (PINK) многоклеточных животных. В результате снижения трансмембранного потенциала PINK остается заякоренной на поверхности наружной мембраны [87]. Это приводит к связыванию с ней убиквитин-лигазы Parkin, которая убиквитинилирует белки на поверхности наружной мембраны митохондрий. Показано, что одной из приоритетных мишеней Parkin являются митофузины [88, 89]. Убиквитинилирование митофузинов приводит к их протеолитической деградации, что, в свою очередь, блокирует слияние внешних мембран митохондрий [90]. Можно предположить, что само по себе убиквитинилирование митофузинов приводит к потере ими способности образовывать *трансаммеры* и обеспечивать слияние митохондрий.

2. Второй механизм был предложен на основании того факта, что добавление разобщителей индуцирует протеолиз GTPазы OPA1 [91] и, таким образом, приводит к ее инактивации. Расщепление OPA1 осуществляют протеазы Yme1 и OMA1, интегрированные во внутреннюю мембрану митохондрий [65, 91], что предполагает возможную функциональную взаимосвязь между трансмембранным потенциалом и их активностью. Однако является ли  $\Delta\Psi$  непосредственно тем параметром, который определяет способность митохондрий к слиянию? Очевидно, что действие разобщителей не ограничивается снижением  $\Delta\Psi$ . Одновременно с этим может происходить изменение соотношения уровня NTP/NDP как в матриксе митохондрий, так и в межмембранном пространстве и цитоплазме. Снижение трансмембранного потенциала должно влиять на степень восстановленности редокс-кофакторов дыхательной цепи митохондрий, а также на распределение ионов и метаболитов клетки, транспорт которых требует  $\Delta\Psi$ , между матриксом и межмембранным пространством митохондрий. Кроме того, ряд экспериментов плохо согласуется с гипотезой о том, что непосредственно трансмембранный потенциал регулирует слияние митохондрий.

1. Добавление ингибитора АТР-синтазы олигомицина вызывает дробление митохондриального ретикулула во многих типах клеток многоклеточных животных [72, 73, 75, 80]. Добавление олигомицина или снижение активности АТР-синтазы не должно приводить к снижению трансмембранного потенциала митохондрий при условии нормальной работы дыхательной цепи и отсутствия утечки протонов. Было высказано предположение о том, что эффект олигомицина может быть обусловлен его ингибирующим действием на другой фермент —  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазу [79]. Однако аналогичный эффект — фрагментацию митохондриального ретикулула — наблюдали в клетках, содержащих мутацию в гене субъединицы АТР-синтазы — АТР6, кодируемой в митохондриальном геноме [82]. Более того, было напрямую показано, что добавление олигомицина блокирует процесс слияния внутренних мембран митохондрий в системе *in vitro* в отсутствие АТР-регенерирующей системы [25]. Это может быть связано с тем, что инактивация OPA1 происходит при снижении уровня АТР: известно, что протеолитическая инактивация OPA1 происходит не только в ответ на добавление разобщителя или ингибитора дыхательной цепи азидата натрия, но и при воздействии олигомицина, что указывает на роль нуклеотидов, а не трансмембранного потенциала, в этом процессе [92].

2. Было показано, что добавление окисленного глутатиона индуцирует слияние митохондрий *in vitro* [61]. Увеличение его концентрации в клетке свидетельствует, скорее, об окислительном стрессе, который может служить как причиной, так и следствием дезэнергизации митохондрий. В то же время добавление антиоксиданта Trolox может сдвигать равновесие процессов слияния и деления митохондрий в сторону образования более протяженных органелл и вместе с тем индуцировать экспрессию гена митофузина Mfn2 [93]. Можно предположить, что трансмембранный потенциал имеет разнонаправленные эффекты на динамику митохондрий, проявляющиеся с разной скоростью: быстрый, на уровне регуляции редокс-статуса клетки, направленный на слияние митохондрий, и медленный, направленный на их деление.

3. Клетки дрожжей *S. cerevisiae*, лишенные мтДНК (*Rho0*), не способны генерировать трансмембранный потенциал за счет работы дыхательной цепи, вместо этого мембраны митохондрий поляризуются до значения +55 мВ за счет работы антипортера ATP/ADP [94]. Тем не менее такие митохондрии способны к слиянию, хотя и с меньшей эффективностью, чем митохондрии дикого типа (*Rho+*) [95]. Кроме того, мы обнаружили, что добавление разобщителя FCCP не приводит к полному ингибированию слияния митохондрий клеток дрожжей двух респираторно компетентных (способных к окислительному фосфорилированию) штаммов при скрещивании (рис. 2). Аналогичный эффект наблюдали даже в том случае, если клетки дикого типа скрещивали в присутствии разобщителя с клетками дрожжей, содержащими мутантный вариант мтДНК (данные не приведены). Следует отметить, что клетки дрожжей, лишенные функциональной мтДНК, гиперчувствительны к действию разобщителей [94]. Используемая нами концентрация разобщителя была достаточна для того, чтобы стимулировать дыхание клеток дрожжей более чем в 2 раза [96].

4. Наконец, прижизненное наблюдение за митохондриями клеток животных показало, что добавление разобщителя вызывает выход потенциал-зависимого флуоресцентного зонда из митохондрий, но не предотвращает слияние митохондрий, которое происходило вскоре после деполаризации [97].

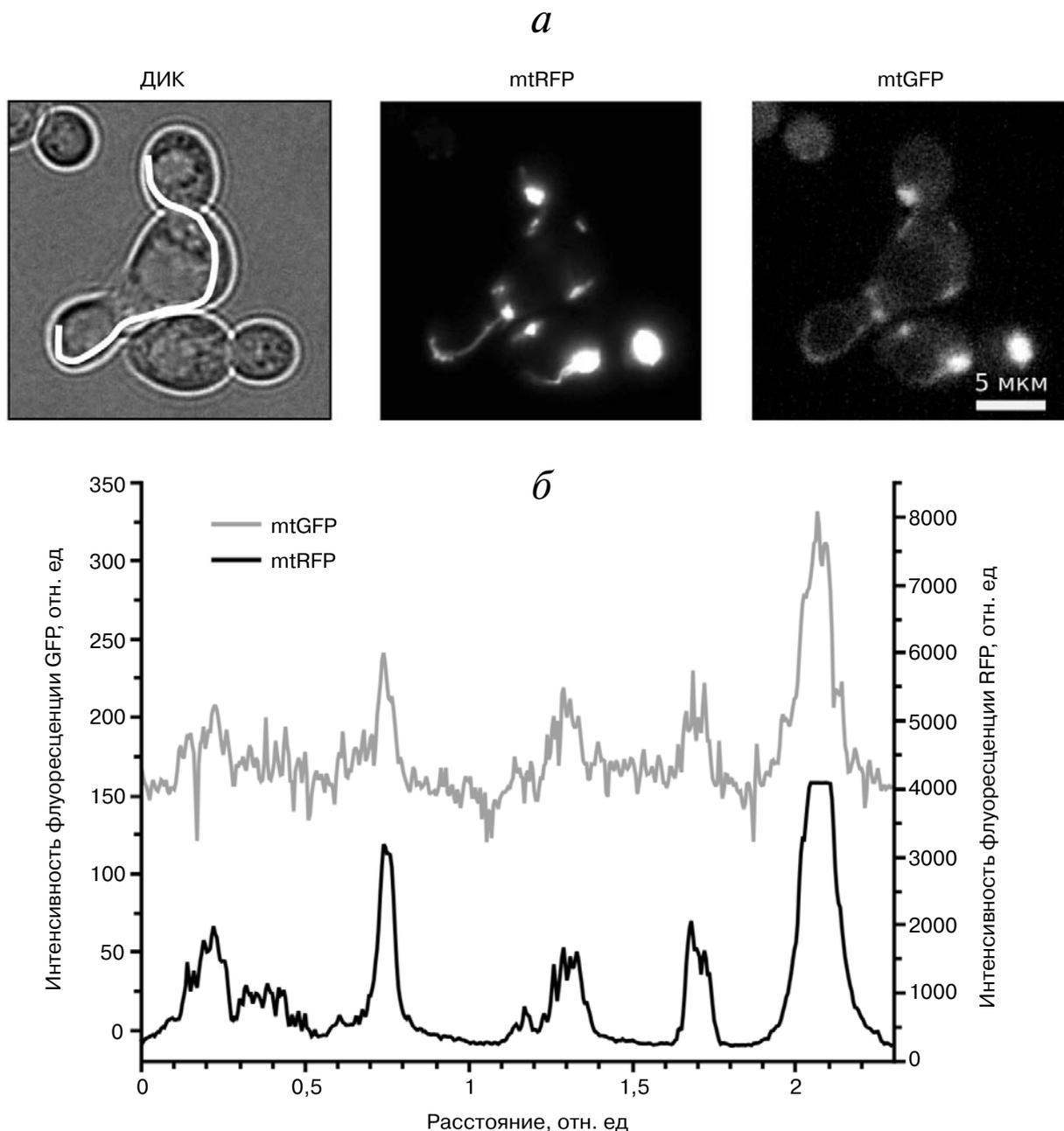
Помимо экспериментальных данных существует и логическая предпосылка, ставящая под сомнение роль мембранного потенциала как регулятора слияния митохондрий. Одной из задач, решаемых при делении и слиянии митохондрий, является контроль их качества. При этом с помощью аутофагии устраняются митохондрии,

содержащие повреждения, которые невозможно исправить другими способами [28]. Предполагают, что последовательное слияние и деление митохондрий приводит к перераспределению молекул мтДНК внутри митохондриальной сети, позволяя избавляться от нефункциональных вариантов в результате селективной дегградации митохондриальных фрагментов, содержащих поврежденные молекулы [33, 34]. Такая селекция возможна при условии, что комплексы дыхательной цепи медленно диффундируют в мембране и незначительно удаляются от того сайта мембраны, на котором закорена молекула мтДНК, послужившая матрицей для их синтеза. Было показано, что большая часть комплексов дыхательной цепи действительно не выходит в результате латеральной диффузии за пределы одной кристы [98]. Еще одним важным условием для возможности осуществления такой селекции является запрет на реинтеграцию митохондрий, содержащих мутантную мтДНК, с остальными митохондриями клетки. Однако если процесс слияния митохондрий положительно регулируется трансмембранным потенциалом, то неблагоприятные мутации в генах митохондриально кодируемых субъединиц АТФ-синтазы будут избегать подобной селекции, поскольку ингибирование АТФ-синтазы скорее должно приводить ко временному повышению трансмембранного потенциала митохондрий. Нам неизвестны работы, в которых бы было обнаружено специфическое накопление мутантов по митохондриально-кодируемым генам АТФ-синтазы.

Таким образом, возникает вопрос: какой параметр функционального состояния митохондрий используется для контроля молекулярного механизма, обеспечивающего их слияние? Мы предполагаем, что наиболее вероятным фактором, лимитирующим способность митохондрий к слиянию, является соотношение NTP/NDP в межмембранном пространстве. Такая регуляция представляется возможной, поскольку наружная мембрана митохондрий является диффузионным барьером для обмена нуклеотидов между цитоплазмой и межмембранным пространством [99], а  $K_m$  белка Mgm1 по GTP достаточно велика и составляет 0,3 мМ [100]. Наша гипотеза не противоречит тому, что добавление разобщителей ингибирует слияние митохондрий: снижение трансмембранного потенциала митохондрий при работающей АТФ-синтазе должно в конечном счете приводить к снижению отношения NTP/NDP. С другой стороны, NTP/NDP — не менее важный параметр с точки зрения функционирования клетки в целом, чем величина трансмембранного потенциала митохонд-

рии. Митохондрия выполняет множество функций [101], одной из которых является трансформация энергии, поэтому было бы логично добавляться и от митохондрий, не способных синтезировать АТФ.

Если наше предположение верно, то добавление «мягких» разобщителей не должно приводить к замедлению процессов слияния: эффективность действия «мягких» разобщителей уменьшается со снижением трансмембранного



**Рис. 2.** Разобщитель не предотвращает слияние митохондрий дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. *a* – Репрезентативная фотография, иллюстрирующая колоколизацию сигнала от mtGFP и mtRFP в зиготе, образованной в присутствии 1 мкМ FCCP. Клетки штаммов дрожжей противоположных типов спаривания, один из которых экспрессирует белок GFP, слитый с сигналом митохондриальной локализации (mtGFP), а другой – RFP, слитый с сигналом митохондриальной локализации (mtRFP), выращивали на синтетической селективной среде и скрещивали в условиях, ингибирующих экспрессию флуоресцентных белков. К клеткам добавляли разобщитель FCCP. Через 8 ч локализацию белков mtGFP и mtRFP визуализировали с помощью флуоресцентной микроскопии. ДИК – дифференциальный интерференционный контраст; *b* – профиль интенсивности флуоресценции белков mtGFP и mtRFP. Линия профиля, вдоль которой анализировали интенсивность флуоресценции, обозначена на фотографии с ДИК

потенциала, поэтому они способны предотвращать гиперполяризацию митохондрий, но не должны оказывать значительного влияния на скорость синтеза АТФ [102]. Действительно, совсем недавно были поставлены эксперименты, показавшие, что длительная инкубация клеток в присутствии низких концентраций динитрофенола или додецилтрифенилфосфония, который может выступать в роли «мягкого» разобщителя [103], приводит к увеличению средней

протяженности митохондрий (статья Ромашенко с соавт. в данном выпуске) [104]. Мы ожидаем, что эксперименты с «мягкими» разобщителями также будут поставлены в системе *in vitro*, и это позволит прояснить роль соотношения NTP/NDP и трансмембранного потенциала в динамике митохондрий.

Работа выполнена при поддержке РФФ (грант 14-14-00181).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mortensen, M., Ferguson, D.J.P., and Simon, A.K. (2010) Mitochondrial clearance by autophagy in developing erythrocytes: clearly important, but just how much so, *Cell Cycle*, **9**, 1901–1906.
- Bassnett, S., and Beebe, D.C. (1992) Coincident loss of mitochondria and nuclei during lens fiber cell differentiation, *Dev. Dyn.*, **194**, 85–93.
- Bullerwell, C.E., and Lang, B.F. (2005) Fungal evolution: the case of the vanishing mitochondrion, *Curr. Opin. Microbiol.*, **8**, 362–369.
- Westermann, B. (2010) Mitochondrial dynamics in model organisms: what yeasts, worms and flies have taught us about fusion and fission of mitochondria, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **21**, 542–549.
- Zhao, J., Lendahl, U., and Nister, M. (2013) Regulation of mitochondrial dynamics: convergences and divergences between yeast and vertebrates, *Cell Mol. Life Sci.*, **70**, 951–976.
- Van der Blik, A.M., Shen, Q., and Kawajiri, S. (2013) Mechanisms of mitochondrial fission and fusion, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**, a011072.
- Dewey, W.C., and Fuhr, M.A. (1976) Quantification of mitochondria during the cell cycle of Chinese hamster cells, *Exp. Cell Res.*, **99**, 23–30.
- Mitra, K. (2013) Mitochondrial fission-fusion as an emerging key regulator of cell proliferation and differentiation, *Bioessays*, **35**, 955–964.
- Lee, S., Kim, S., Sun, X., Lee, J.-H., and Cho, H. (2007) Cell cycle-dependent mitochondrial biogenesis and dynamics in mammalian cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **357**, 111–117.
- Mitra, K., Wunder, C., Roysam, B., Lin, G., and Lippincott-Schwartz, J. (2009) A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 11960–11965.
- Taguchi, N., Ishihara, N., Jofuku, A., Oka, T., and Mihara, K. (2007) Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission, *J. Biol. Chem.*, **282**, 11521–11529.
- Skulachev, V.P., Bakeeva, L.E., Chernyak, B.V., Domnina, L.V., Minin, A.A., Pletjushkina, O.Y., Saprunova, V.B., Skulachev, I.V., Tsyplenkova, V.G., Vasiliev, J.M., Yaguzhinsky, L.S., and Zorov, D.B. (2004) Thread-grain transition of mitochondrial reticulum as a step of mitoptosis and apoptosis, *Mol. Cell Biochem.*, **256–257**, 341–358.
- Lee, Y., Jeong, S.-Y., Karbowski, M., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2004) Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opal in apoptosis, *Mol. Biol. Cell*, **15**, 5001–5011.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome *c*, *Cell*, **86**, 147–157.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebbersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., and Kroemer, G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor, *Nature*, **397**, 441–446.
- Ola, M.S., Nawaz, M., and Ahsan, H. (2011) Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis, *Mol. Cell Biochem.*, **351**, 41–58.
- Gulbins, E., Dreschers, S., and Bock, J. (2003) Role of mitochondria in apoptosis, *Exp. Physiol.*, **88**, 85–90.
- Scorrano, L., Ashiya, M., Buttler, K., Weiler, S., Oakes, S.A., Mannella, C.A., and Korsmeyer, S.J. (2002) A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome *c* during apoptosis, *Dev. Cell*, **2**, 55–67.
- Montessuit, S., Somasekharan, S.P., Terrones, O., Lucken-Ardjomande, S., Herzig, S., Schwarzenbacher, R., Manstein, D.J., Bossy-Wetzell, E., Basanez, G., Meda, P., and Martinou, J.C. (2010) Membrane remodeling induced by the dynamin-related protein Drp1 stimulates Bax oligomerization, *Cell*, **142**, 889–901.
- Dujon, B., Slonimski, P.P., and Weill, L. (1974) Mitochondrial genetics IX: A model for recombination and segregation of mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*, **78**, 415–437.
- Fritsch, E.S., Chabbert, C.D., Klaus, B., and Steinmetz, L.M. (2014) A genome-wide map of mitochondrial DNA recombination in yeast, *Genetics*, **198**, 755–771.
- Кочмак С.А., Кнорре Д.А., Соколов С.С., Северин Ф.Ф. (2011) Физиологические сценарии запрограммированной потери функции митохондриальной ДНК и смерти дрожжей, *Биохимия*, **76**, 205–210.
- Hom, J., and Sheu, S.-S. (2009) Morphological dynamics of mitochondria – a special emphasis on cardiac muscle cells, *J. Mol. Cell Cardiol.*, **46**, 811–820.
- Chen, H., Vermulst, M., Wang, Y.E., Chomyn, A., Prolla, T.A., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2010) Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations, *Cell*, **141**, 280–289.
- Mishra, P., Carelli, V., Manfredi, G., and Chan, D.C. (2014) Proteolytic cleavage of Opal stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation, *Cell Metab.*, **19**, 630–641.
- Amchenkova, A.A., Bakeeva, L.E., Chentsov, Y.S., Skulachev, V.P., and Zorov, D.B. (1988) Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes, *J. Cell Biol.*, **107**, 481–495.

27. Кнорре Д.А., Ожован С.М., Сапрунова В.Б., Соколов С.С., Бакеева Л.Е., Северин Ф.Ф. (2008) Фрагментация матрикса митохондрий как защитный механизм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, *Биохимия*, **73**, 1561–1568.
28. Youle, R.J., and van der Bliek, A.M. (2012) Mitochondrial fission, fusion, and stress, *Science*, **337**, 1062–1065.
29. Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J.A., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B.F., Yuan, J., Deeney, J.T., Corkey, B.E., and Shirihai, O.S. (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy, *EMBO J.*, **27**, 433–446.
30. Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F., and Youle, R.J. (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy, *J. Cell Biol.*, **183**, 795–803.
31. Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, C.A., Sou, Y.-S., Saiki, S., Kawajiri, S., Sato, F., Kimura, M., Komatsu, M., Hattori, N., and Tanaka, K. (2010) PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy, *J. Cell Biol.*, **189**, 211–221.
32. Ashrafi, G., and Schwarz, T.L. (2013) The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria, *Cell Death Differ.*, **20**, 31–42.
33. Vidoni, S., Zanna, C., Rugolo, M., Sarzi, E., and Lenaers, G. (2013) Why mitochondria must fuse to maintain their genome integrity, *Antioxid. Redox Signal.*, **19**, 379–388.
34. Knorre, D.A., Popadin, K.Y., Sokolov, S.S., and Severin, F.F. (2013) Roles of mitochondrial dynamics under stressful and normal conditions in yeast cells, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2013**, 139491.
35. Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.L., and van der Bliek, A.M. (2001) Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells, *Mol. Biol. Cell*, **12**, 2245–2256.
36. Bui, H.T., and Shaw, J.M. (2013) Dynamin assembly strategies and adaptor proteins in mitochondrial fission, *Curr. Biol.*, **23**, 891–899.
37. Otsuga, D., Keegan, B.R., Brisch, E., Thatcher, J.W., Hermann, G.J., Bleazard, W., and Shaw, J.M. (1998) The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast, *J. Cell Biol.*, **143**, 333–349.
38. Ingerman, E., Perkins, E.M., Marino, M., Mears, J.A., McCaffery, J.M., Hinshaw, J.E., and Nunnari, J. (2005) Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria, *J. Cell Biol.*, **170**, 1021–1027.
39. Mears, J.A., Lackner, L.L., Fang, S., Ingerman, E., Nunnari, J., and Hinshaw, J.E. (2011) Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission, *Nature Struct. Mol. Biol.*, **18**, 20–26.
40. Frohlich, C., Grabiger, S., Schwefel, D., Faelber, K., Rosenbaum, E., Mears, J., Rocks, O., and Daumke, O. (2013) Structural insights into oligomerization and mitochondrial remodeling of dynamin 1-like protein, *EMBO J.*, **32**, 1280–1292.
41. Roux, A., Uyhazi, K., Frost, A., and De Camilli, P. (2006) GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission, *Nature*, **441**, 528–531.
42. Palmer, C.S., Osellame, L.D., Laine, D., Koutsopoulos, O.S., Frazier, A.E., and Ryan, M.T. (2011) MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery, *EMBO Rep.*, **12**, 565–573.
43. Gandre-Babbe, S., and van der Bliek, A.M. (2008) The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells, *Mol. Biol. Cell*, **19**, 2402–2412.
44. Tieu, Q., and Nunnari, J. (2000) Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division, *J. Cell Biol.*, **151**, 353–366.
45. Griffin, E.E., Graumann, J. and Chan, D.C. (2005) The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria, *J. Cell Biol.*, **170**, 237–248.
46. James, D.I., Parone, P.A., Mattenberger, Y., and Martinou, J.-C. (2003) hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery, *J. Biol. Chem.*, **278**, 36373–36379.
47. Otera, H., Wang, C., Cleland, M.M., Setoguchi, K., Yokota, S., Youle, R.J., and Mihara, K. (2010) Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells, *J. Cell Biol.*, **191**, 1141–1158.
48. Shen, Q., Yamano, K., Head, B.P., Kawajiri, S., Cheung, J.T.M., Wang, C., Cho, J.-H., Hattori, N., Youle, R.J., and van der Bliek, A.M. (2014) Mutations in Fis1 disrupt orderly disposal of defective mitochondria, *Mol. Biol. Cell*, **25**, 145–159.
49. Koirala, S., Guo, Q., Kalia, R., Bui, H.T., Eckert, D.M., Frost, A., and Shaw, J.M. (2013) Interchangeable adaptors regulate mitochondrial dynamin assembly for membrane scission, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 1342–1351.
50. Richter, V., Palmer, C.S., Osellame, L.D., Singh, A.P., Elgass, K., Stroud, D.A., Sesaki, H., Kvansakul, M., and Ryan, M.T. (2014) Structural and functional analysis of MiD51, a dynamin receptor required for mitochondrial fission, *J. Cell Biol.*, **204**, 477–486.
51. Cereghetti, G.M., Stangherlin, A., Martins de Brito, O., Chang, C.R., Blackstone, C., Bernardi, P., and Scorrano, L. (2008) Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 15803–15808.
52. Stavru, F., Palmer, A.E., Wang, C., Youle, R.J., and Cossart, P. (2013) Atypical mitochondrial fission upon bacterial infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 16003–16008.
53. Loson, O.C., Song, Z., Chen, H., and Chan, D.C. (2013) Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission, *Mol. Biol. Cell*, **24**, 659–667.
54. Crompton, M. (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death, *Biochem. J.*, **341**, 233–249.
55. Cribbs, J.T., and Strack, S. (2007) Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death, *EMBO Rep.*, **8**, 939–944.
56. Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., and Voeltz, G.K. (2011) ER tubules mark sites of mitochondrial division, *Science*, **334**, 358–362.
57. Santel, A. and Fuller, M.T. (2001) Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin, *J. Cell Sci.*, **114**, 867–874.
58. Rojo, M., Legros, F., Chateau, D., and Lombes, A. (2002) Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo, *J. Cell Sci.*, **115**, 1663–1674.
59. Hermann, G.J., Thatcher, J.W., Mills, J.P., Hales, K.G., Fuller, M.T., Nunnari, J., and Shaw, J.M. (1998) Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p, *J. Cell Biol.*, **143**, 359–373.
60. Anton, F., Fres, J.M., Schauss, A., Pinson, B., Praefcke, G.J.K., Langer, T., and Escobar-Henriques, M. (2011) Ugo1 and Mdm30 act sequentially during Fzo1-mediated mitochondrial outer membrane fusion, *J. Cell Sci.*, **124**, 1126–1135.

61. Shutt, T., Geoffrion, M., Milne, R., and McBride, H.M. (2012) The intracellular redox state is a core determinant of mitochondrial fusion, *EMBO Rep.*, **13**, 909–915.
62. Meeusen, S., McCaffery, J.M., and Nunnari, J. (2004) Mitochondrial fusion intermediates revealed *in vitro*, *Science*, **305**, 1747–1752.
63. Cipolat, S., Martins de Brito, O., Dal Zilio, B., and Scorrano, L. (2004) OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 15927–15932.
64. Sesaki, H., Southard, S.M., Yaffe, M.P., and Jensen, R.E. (2003) Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane, *Mol. Biol. Cell*, **14**, 2342–2356.
65. Song, Z., Chen, H., Fiket, M., Alexander, C., and Chan, D.C. (2007) OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L, *J. Cell Biol.*, **178**, 749–755.
66. Anand, R., Wai, T., Baker, M.J., Kladt, N., Schauss, A.C., Rugarli, E., and Langer, T. (2014) The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission, *J. Cell Biol.*, **204**, 919–929.
67. Malka, F., Guillery, O., Cifuentes-Diaz, C., Guillou, E., Belenguer, P., Lombes, A., and Rojo, M. (2005) Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes, *EMBO Rep.*, **6**, 853–859.
68. Song, Z., Ghochani, M., McCaffery, J.M., Frey, T.G., and Chan, D.C. (2009) Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion, *Mol. Biol. Cell*, **20**, 3525–3532.
69. Meeusen, S., DeVay, R., Block, J., Cassidy-Stone, A., Wayson, S., McCaffery, J.M., and Nunnari, J. (2006) Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1, *Cell*, **127**, 383–395.
70. Joshi, A.S., Thompson, M.N., Fei, N., Huttemann, M., and Greenberg, M.L. (2012) Cardiolipin and mitochondrial phosphatidylethanolamine have overlapping functions in mitochondrial fusion in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **287**, 17589–17597.
71. Ishihara, N., Jofuku, A., Eura, Y., and Mihara, K. (2003) Regulation of mitochondrial morphology by membrane potential, and DRP1-dependent division and FZO1-dependent fusion reaction in mammalian cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **301**, 891–898.
72. Legros, F., Lombes, A., Frachon, P., and Rojo, M. (2002) Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins, *Mol. Biol. Cell*, **13**, 4343–4354.
73. Guillery, O., Malka, F., Frachon, P., Milea, D., Rojo, M., and Lombes, A. (2008) Modulation of mitochondrial morphology by bioenergetics defects in primary human fibroblasts, *Neuromuscul. Disord.*, **18**, 319–330.
74. Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T., and Rossignol, R. (2007) Mitochondrial bioenergetics and structural network organization, *J. Cell Sci.*, **120**, 838–848.
75. De Vos, K.J., Allan, V.J., Grierson, A.J., and Sheetz, M.P. (2005) Mitochondrial function and actin regulate dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission, *Curr. Biol.*, **15**, 678–683.
76. Barsoum, M.J., Yuan, H., Gerencser, A.A., Liot, G., Kushnareva, Y., Graber, S., Kovacs, I., Lee, W.D., Waggoner, J., Cui, J., White, A.D., Bossy, B., Martinou, J.-C., Youle, R.J., Lipton, S.A., Ellisman, M.H., Perkins, G.A., and Bossy-Wetzel, E. (2006) Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related GTPases in neurons, *EMBO J.*, **25**, 3900–3911.
77. Pham, N.-A., Richardson, T., Cameron, J., Chue, B., and Robinson, B.H. (2004) Altered mitochondrial structure and motion dynamics in living cells with energy metabolism defects revealed by real time microscope imaging, *Microsc. Microanal.*, **10**, 247–260.
78. Liot, G., Bossy, B., Lubitz, S., Kushnareva, Y., Sejbuk, N., and Bossy-Wetzel, E. (2009) Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway, *Cell Death Differ.*, **16**, 899–909.
79. Pletjushkina, O.Y., Lyamzaev, K.G., Popova, E.N., Nepryakhina, O.K., Ivanova, O.Y., Domnina, L.V., Chernyak, B.V., and Skulachev, V.P. (2006) Effect of oxidative stress on dynamics of mitochondrial reticulum, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 518–524.
80. Полякова И.А., Зоров Д.Б., Лейкина М.И. (1995) Структурно-функциональные изменения хондриома культивируемых клеток при нарушении энергетического метаболизма, *ДАН СССР*, **342**, 553–555.
81. Vorobjev, I.A., and Zorov, D.B. (1983) Diazepam inhibits cell respiration and induces fragmentation of mitochondrial reticulum, *FEBS Lett.*, **163**, 311–314.
82. Szczepanowska, J., Zablocki, K., and Duszynski, J. (2004) Influence of a mitochondrial genetic defect on capacitative calcium entry and mitochondrial organization in the osteosarcoma cells, *FEBS Lett.*, **578**, 316–322.
83. Koopman, W.J., Visch, H.-J., Verkaar, S., van den Heuvel, L.W., Smeitink, J.A., and Willems, P.H. (2005) Mitochondrial network complexity and pathological decrease in complex I activity are tightly correlated in isolated human complex I deficiency, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **289**, 881–890.
84. Van den Ouweland, J.M., Maechler, P., Wollheim, C.B., Attardi, G., and Maassen, J.A. (1999) Functional and morphological abnormalities of mitochondria harbouring the tRNA(Leu)(UUR) mutation in mitochondrial DNA derived from patients with maternally inherited diabetes and deafness (MIDD) and progressive kidney disease, *Diabetologia*, **42**, 485–492.
85. Legros, F., Malka, F., Frachon, P., Lombes, A., and Rojo, M. (2004) Organization and dynamics of human mitochondrial DNA, *J. Cell Sci.*, **117**, 2653–2662.
86. Schauss, A.C., Huang, H., Choi, S.-Y., Xu, L., Soubeyrand, S., Bilodeau, P., Zunino, R., Rippstein, P., Frohman, M.A., and McBride, H.M. (2010) A novel cell-free mitochondrial fusion assay amenable for high-throughput screenings of fusion modulators, *BMC Biol.*, **8**, 100.
87. Jin, S.M., Lazarou, M., Wang, C., Kane, L.A., Narendra, D.P., and Youle, R.J. (2010) Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL, *J. Cell Biol.*, **191**, 933–942.
88. Glauser, L., Sonnay, S., Stafa, K., and Moore, D.J. (2011) Parkin promotes the ubiquitination and degradation of the mitochondrial fusion factor mitofusin 1, *J. Neurochem.*, **118**, 636–645.
89. Sarraf, S.A., Raman, M., Guarani-Pereira, V., Sowa, M.E., Huttlin, E.L., Gygi, S.P., and Harper, J.W. (2013) Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization, *Nature*, **496**, 372–376.
90. Gegg, M.E., Cooper, J.M., Chau, K.-Y., Rojo, M., Schapira, A.H., and Taanman, J.-W. (2010) Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy, *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 4861–4870.
91. Head, B., Griparic, L., Amiri, M., Gandre-Babbe, S., and van der Blik, A.M. (2009) Inducible proteolytic inactivation of OPA1 mediated by the OMA1 protease in mammalian cells, *J. Cell Biol.*, **187**, 959–966.
92. Baricault, L., Segui, B., Guegand, L., Olichon, A., Valette, A., Larminat, F., and Lenaers, G. (2007) OPA1 cleavage

- depends on decreased mitochondrial ATP level and bivalent metals, *Exp. Cell Res.*, **313**, 3800–3808.
93. Distelmaier, F., Valsecchi, F., Forkink, M., van Erst-de Vries, S., Swarts, H.G., Rodenburg, R.J., Verwiél, E.T., Smeitink, J.A., Willems, P.H., and Koopman, W.J. (2012) Trolox-sensitive reactive oxygen species regulate mitochondrial morphology, oxidative phosphorylation and cytosolic calcium handling in healthy cells, *Antioxid. Redox Signal.*, **17**, 1657–1669.
  94. Dupont, C.H., Mazat, J.P., and Guerin, B. (1985) The role of adenine nucleotide translocation in the energization of the inner membrane of mitochondria isolated from rho + and rho degree strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **132**, 1116–1123.
  95. Sauvanet, C., Duvezin-Caubet, S., Salin, B., David, C., Massoni-Laporte, A., di Rago, J.-P., and Rojo, M. (2012) Mitochondrial DNA mutations provoke dominant inhibition of mitochondrial inner membrane fusion, *PLoS One*, **7**, e49639.
  96. Antonenko, Y.N., Khailova, L.S., Knorre, D.A., Markova, O.V., Rokitskaya, T.I., Pyasova, T.M., Severina, I.I., Kotova, E.A., Karavaeva, Y.E., Prikhodko, A.S., Severin, F.F., and Skulachev, V.P. (2013) Penetrating cations enhance uncoupling activity of anionic protonophores in mitochondria, *PLoS One*, **8**, e61902.
  97. Liu, X., Weaver, D., Shirirhai, O., and Hajnoczky, G. (2009) Mitochondrial «kiss-and-run»: interplay between mitochondrial motility and fusion-fission dynamics, *EMBO J.*, **28**, 3074–3089.
  98. Muster, B., Kohl, W., Wittig, I., Strecker, V., Joos, F., Haase, W., Bereiter-Hahn, J., and Busch, K. (2010) Respiratory chain complexes in dynamic mitochondria display a patchy distribution in life cells, *PLoS One*, **5**, e11910.
  99. Gellerich, F.N., Trumbeckaite, S., Opalka, J.R., Seppet, E., Rasmussen, H.N., Neuhoff, C., and Zierz, S. (2000) Function of the mitochondrial outer membrane as a diffusion barrier in health and diseases, *Biochem. Soc. Trans.*, **28**, 164–169.
  100. Meglei, G., and McQuibban, G.A. (2009) The dynamin-related protein Mgm1p assembles into oligomers and hydrolyzes GTP to function in mitochondrial membrane fusion, *Biochemistry*, **48**, 1774–1784.
  101. Zorov, D.B., Krasnikov, B.F., Kuzminova, A.E., Vysokikh, M.Yu., and Zorova, L.D. (1997) Mitochondria revisited. Alternative functions of mitochondria, *Biosci. Rep.*, **17**, 507–520.
  102. Skulachev, V.P. (1996) Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants, *Q. Rev. Biophys.*, **29**, 169–202.
  103. Severin, F.F., Severina, I.I., Antonenko, Y.N., Rokitskaya, T.I., Cherepanov, D.A., Mokhova, E.N., Vysokikh, M.Y., Pustovidko, A.V., Markova, O.V., Yaguzhinsky, L.S., Korshunova, G.A., Sumbatyan, N.V., Skulachev, M.V., and Skulachev, V.P. (2010) Penetrating cation/fatty acid anion pair as a mitochondria-targeted protonophore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 663–668.
  104. Ромашенко В.П., Зиновкин Р.А., Галкин И.И., Захарова В.В., Пантелева А.А., Токарчук А.В., Лямзаев К.Г., Плетюшкина О.Ю., Черняк Б.В., Попова Е.Н. (2015) Низкие концентрации разобщителей окислительного фосфорилирования предотвращают воспалительную активацию эндотелиальных клеток, вызванную фактором некроза опухоли, *Биохимия*, **80**, в печати.

## DOES MITOCHONDRIAL FUSION REQUIRE TRANSMEMBRANE POTENTIAL?

I. E. Karavaeva<sup>1</sup>, K. V. Shekhireva<sup>1</sup>, F. F. Severin<sup>2</sup>,  
D. A. Knorre<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow 119991, Russia

<sup>2</sup> M. V. Lomonosov Moscow State University, A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow 119991, Russia;  
fax: +7(495)939-3181, E-mail: knorre@belozersky.msu.ru

Received December 23, 2014  
Revision received January 13, 2015

Dissipation of transmembrane potential inhibits mitochondrial fusion and thus prevents reintegration of damaged mitochondria into the mitochondrial network. As a result, damaged mitochondria are removed by autophagy. Does transmembrane potential directly regulate the mitochondrial fusion machinery? It was shown in the literature that inhibition of ATP synthase induces fragmentation of mitochondria while preserving transmembrane potential. Moreover, mitochondria of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* preserve their ability to fuse even in the absence of transmembrane potential. Mitochondria of metazoans in some cases retain ability to fuse for a short period even in a depolarized state. It also seems unlikely that transmembrane potential-based regulation of mitochondrial fusion would prevent reintegration of mitochondria with damaged ATP synthase into the mitochondrial network. Such reintegration could lead to clonal expansion of mtDNAs harboring deleterious mutations in ATP synthase. Thus, we suggest that transmembrane potential is not directly involved in regulation of mitochondrial fusion but affects mitochondrial NTP/NDP ratio, which in turn regulates their fusion.

**Key words:** mitochondria, fusion, fission, transmembrane potential, mtDNA, regulation