

ВИМЕНТИНОВЫЕ И ДЕСМИНОВЫЕ ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ ФИЛАМЕНТЫ ПОДДЕРЖИВАЮТ МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МИТОХОНДРИЙ

© 2024 А.А. Даял¹, О.И. Парфентьева¹, Ван Хуэйин¹, А.С. Шахов^{1,2},
И.Б. Алиева^{1,2}, А.А. Минин^{1*}

¹ Институт белка РАН,
142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: alexminin@gmail.com

² НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия

Поступила в редакцию 28.08.2024

После доработки 04.10.2024

Принята к публикации 09.10.2024

Промежуточные филаменты (ПФ) – один из трёх компонентов цитоскелета животных клеток, характерной особенностью которого является многообразие белков, представляющих эти филаменты в различных клетках. Они обеспечивают механическую прочность клеток, а также внутриклеточную локализацию ядер и различных органелл. Десмин представляет собой белок ПФ, характерный для мышечных клеток, а близкий ему по структуре виментин встречается во многих клетках мезенхимальной природы. В процессе миогенеза, а также при регенерации повреждённой мышечной ткани в клетках могут экспрессироваться оба этих белка, образуя смешанную сеть ПФ. Известно, что каждый из этих белков контролирует функции митохондрий в соответствующих клетках, отвечает за их локализацию и поддержание мембранного потенциала. Вместе с тем неясно, как осуществляется контроль митохондриальных функций в клетках со смешанными ПФ. Чтобы выяснить, какое влияние на митохондриальный потенциал оказывают эти белки, находясь в клетке одновременно, были использованы клетки ВНК21, содержащие виментиновые и десминовые ПФ. Экспрессию одного из них или обоих этих белков одновременно подавляли при помощи нокаута их генов и/или РНК-интерференции. Оказалось, что при удалении любого из них мембранный потенциал митохондрий оставался на том же уровне, что и в присутствии двух белков. Удаление двух белков одновременно приводило к снижению потенциала на 20%. Таким образом, виментин и десмин играют одинаковую роль в поддержании мембранного потенциала митохондрий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: митохондрии, виментин, десмин, мембранный потенциал митохондрий.

DOI: 10.31857/S0320972524110157 EDN: IJWAPW

ВВЕДЕНИЕ

Митохондрии выполняют важнейшие функции в эукариотических клетках как в нормальных условиях, так и при различных патологических состояниях. Они участвуют в синтезе АТФ, образовании активных форм кислорода, регуляции апоптоза и концентрации кальция и во многих других функциях в клетках [1–4]. На уровне организма они связаны с иммунным ответом, реакцией на стресс, адаптацией к нагрузкам, а также играют ключевую роль в раз-

витии различных патологий, раковых опухолей и в процессе старения [5–10]. Большинство этих функций митохондрий напрямую зависит от их мембранного потенциала, за образование которого отвечают комплексы дыхательной цепи, локализованные в их внутренней мембране [11]. Транспорт электронов и перенос протонов в процессе дыхания создаёт электрический потенциал около –180 мВ относительно цитозоля [11]. На то, что поддержание мембранного потенциала на достаточно высоком уровне имеет критическое значение, указывает тот факт, что деполяризованные митохондрии (в которых потенциал снизился до недопустимого уровня) селективно разрушаются в результате митофагии [12]. В случае массовой деполяризации митохондрий в клетке

Принятые сокращения: ПФ – промежуточные филаменты.

* Адресат для корреспонденции.

включается процесс апоптоза, и вся клетка разрушается [13].

К настоящему времени известны многие внутриклеточные факторы, участвующие в регуляции мембранного потенциала митохондрий [14], важное место среди которых занимают белки промежуточных филаментов (ПФ) [15]. Так, было показано, что мутации кератинов приводят к фрагментации митохондрий в гепатоцитах, их агрегации и нарушению дыхательной функции [16–18]. Виментин, белок III типа ПФ, регулирует митохондриальный потенциал в фибробластах, и его удаление приводит к снижению потенциала на 20% [19]. Роль другого белка ПФ, десмина, характерного для мышечных клеток, в дыхательной функции митохондрий также была продемонстрирована в ряде работ [20–24]. Ранее мы обнаружили, что виментин и десмин, экспрессированные в бактериях, способны напрямую связываться с митохондриями *in vitro* [25, 26] и, следовательно, могли бы непосредственно участвовать в регуляции свойств митохондрий.

Хотя виментин характерен для различных клеток мезенхимальной природы, а десминовые ПФ обнаруживаются в мышечных клетках, в определённых условиях эти белки могут образовывать смешанные сети ПФ. Например, на ранних стадиях дифференцировки и при регенерации мышечных волокон наблюдается одновременная экспрессия виментина и десмина [27]. Таким образом, виментин может сосуществовать с десмином в одной клетке, и оба белка, в принципе, могут взаимодействовать с митохондриями, влияя на их свойства.

Роль виментина в регуляции мембранного потенциала митохондрий в ситуации, когда кроме него присутствует десмин, не исследована. Более того, несмотря на убедительные данные из нескольких лабораторий, указывающие на то, что десмин участвует в распределении митохондрий, определении их морфологии и дыхательной функции [20–23], его роль в регуляции их мембранного потенциала изучена мало. Чтобы исследовать участие виментина и десмина в этом процессе при одновременной их экспрессии в клетках, в качестве модели были использованы клетки ВНК21, в которых эти белки избирательно удалялись при помощи РНК-интерференции и/или системы CRISPR–Cas9. Оказалось, что каждый из этих двух белков способен поддерживать потенциал митохондрий независимо от другого.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток. В работе использовали линию клеток ВНК21 и полученные из неё при помощи системы CRISPR–Cas9 две линии – ВНК21(Vim^{-/-})

и ВНК21(Des^{-/-}). Клетки культивировали в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 10%-ной эмбриональной бычьей сыворотки («Биолот», Россия), пенициллина (100 мкг/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл) («Sigma-Aldrich», США) при температуре 37 °С в атмосфере насыщенных водяных паров с содержанием 5% CO₂. Для микроскопии клетки выращивали на стерильных покровных стёклах в течение 16–20 ч.

РНК-интерференция. Для удаления десмина в клетках ВНК21 при помощи РНК-интерференции мы использовали плазмиду рG-SHIN2-des, кодирующую shРНК (малую РНК, образующую шпильку) 5'-AAGCAGGAGAUGAUGGAGU-3' [28], и GFP в качестве маркера. Для удаления виментина использовалась плазида рG-SHIN2-vim, кодирующая shРНК 5'-CAGACAGGAUGUUGACAAU-3' [29, 30], любезно предоставленная проф. Р. Голдманом (Северо-Западный университет, Чикаго). В контрольных экспериментах использовали плазмиду рG-SHIN2-scr, кодирующую shРНК 5'-AUGUACUGCGCGUGGAGA-3' того же размера со случайной последовательностью.

Нокаут генов. Чтобы разрушить ген виментина в клетках ВНК21, использовали транзитную трансфекцию при помощи плазмиды рSpCas9n(BB)-Puro-(1+2)Vim, кодирующей две гидовых РНК: 5'-CACCGAACUCGGUGUUGAUGGCGU-3' и 5'-CACCGAACCCCGACCAACGAGA-3' [31]. Для нокаута гена десмина использовали плазмиду рSpCas9(BB)-Puro-Des, кодирующую гидовую РНК 5'-CACCGCGCGACCCGGUCGGCUCG-3'. Линии клеток ВНК21(Vim^{-/-}) и ВНК21(Des^{-/-}) получали при помощи селекции в среде DMEM, содержащей 2 мкг/мл пурамицина и 10 мкг/мл верапамила.

Трансфекция. Трансфекцию клеток проводили плазмидами при помощи реагента Transfectin («Евроген», Россия). Для этого 1 мг ДНК смешивали с 1 мкл реагента в 100 мкл среды DMEM без сыворотки и добавляли к клеткам в 1 мл полной среды DMEM.

Флуоресцентная микроскопия живых клеток. Для окрашивания митохондрий клетки инкубировали с 5 нМ TMRM («Molecular Probes», США) в присутствии 2,2 мкМ верапамила в течение 30 мин при 37 °С. Стёкла с клетками помещали в герметичную камеру со средой DMEM и фотографировали при помощи микроскопа Keyence BZ-9000 («Keyence», США), снабжённого инкубатором для наблюдения живых клеток («ReCon», Германия), в котором поддерживали температуру 36 ± 2 °С. Съёмку проводили при помощи объектива PlanApo 63× и 12-битной цифровой CCD-камеры. Изображение передавали на компьютер с помощью программного обеспечения BZ II Viewer («Keyence») и записывали в виде 12-битных графических файлов.

Иммунофлуоресценция и иммуноблоттинг.

Для окрашивания ПФ в клетках использовали фиксацию метанолом при температуре -20°C в течение 10 мин и метод непрямой иммунофлуоресценции при помощи моноклональных мышинных антител V9 против виментина («Sigma-Aldrich») и моноклональных мышинных антител DE-U-10 против десмина («Sigma-Aldrich»). В качестве вторых антител использовали FITC- и TRITC-меченые антимышинные антитела («Jackson», США). Микрофотографии получали при помощи микроскопа Keyence BZ-9000 с объективом PlanApo 63 \times и 12-битной цифровой CCD-камеры.

Для получения изображений методом микроскопии сверхвысокого разрешения (SIM-микроскопии) использовали микроскоп Nikon N-SIM («Nikon», Япония) с иммерсионным объективом $\times 100/1.49$ NA и диодным лазером 561 нм. Z-стопки кадров через каждые 0,12 нм получали при помощи камеры EMCCD (iXon 897, «Andor», Япония). Условия экспозиции были подобраны таким образом, чтобы средние показания яркости составляли около 5000 с минимальным выгоранием. Изображения получали при помощи программы NIS-Elements 5.1 («Nikon»).

Электрофорез клеточных лизатов проводили по методу Лэммли [32], а дальнейшую процедуру иммуноблоттинга – как описано ранее [26]. Для выявления белков на нитроцеллюлозном фильтре использовали антитела V9 против виментина, DE-U-10 против десмина, моноклональные мышинные антитела DM1A против тубулина и вторые антимышинные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена («Jackson»). В качестве субстрата пероксидазы использовалась перекись водорода и диаминобензидин, дающий при проявлении коричневую окраску.

Анализ мембранного потенциала митохондрий. Уровень трансмембранного потенциала

митохондрий в клетках определяли по интенсивности флуоресценции красителя TMRM, как было описано ранее [19]. Измерения проводили с помощью программы ImageJ. Последовательность действий при анализе изображений была следующей: 1) на выбранном участке клетки с митохондриями, расположенными в один слой, определяли контуры каждой митохондрии с помощью «анализатора частиц» из программы ImageJ, и 2) измеряли среднее значение интенсивности флуоресценции по всем пикселям, попавшим в контур. В каждом опыте обсчитывали 10–15 участков, содержащих по 15–40 митохондрий. Данные представляли как средние значения интенсивности флуоресценции всех митохондрий с указанием стандартной ошибки. Для проверки на нормальность использовали тест Шапиро–Уилка. Для проверки однородности дисперсии использовали F-тест. Значимость различий определяли с помощью парного *t*-теста Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Фибробластоподобные клетки ВНК21 содержат ПФ, образованные двумя белками III типа виментином и десмином с небольшой примесью нестина, белка VI типа [33]. Иммунофлуоресцентный анализ сети ПФ в этих клетках при помощи микроскопии высокого разрешения показывает, что она состоит из филаментов, образованных в результате кополимеризации виментина и десмина. Как видно на рис. 1, распределение этих белков не полностью совпадает, что свидетельствует, по-видимому, об их разном соотношении в индивидуальных филаментах. Можно заметить, что в околоядерной зоне больше ПФ, обогащённых десмином, а на периферии клеток выше уровень виментина в филаментах. Общая картина ПФ

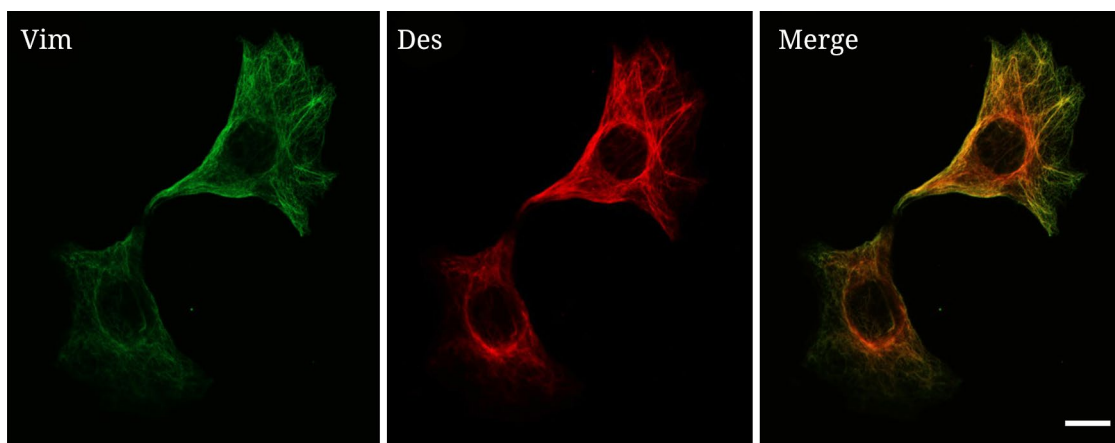


Рис. 1. Виментиновые (зелёный) и десминовые (красный) ПФ в клетках ВНК21, выявленные при помощи соответствующих антител. Изображения получены при помощи микроскопии высокого разрешения. Шкала 10 мкм

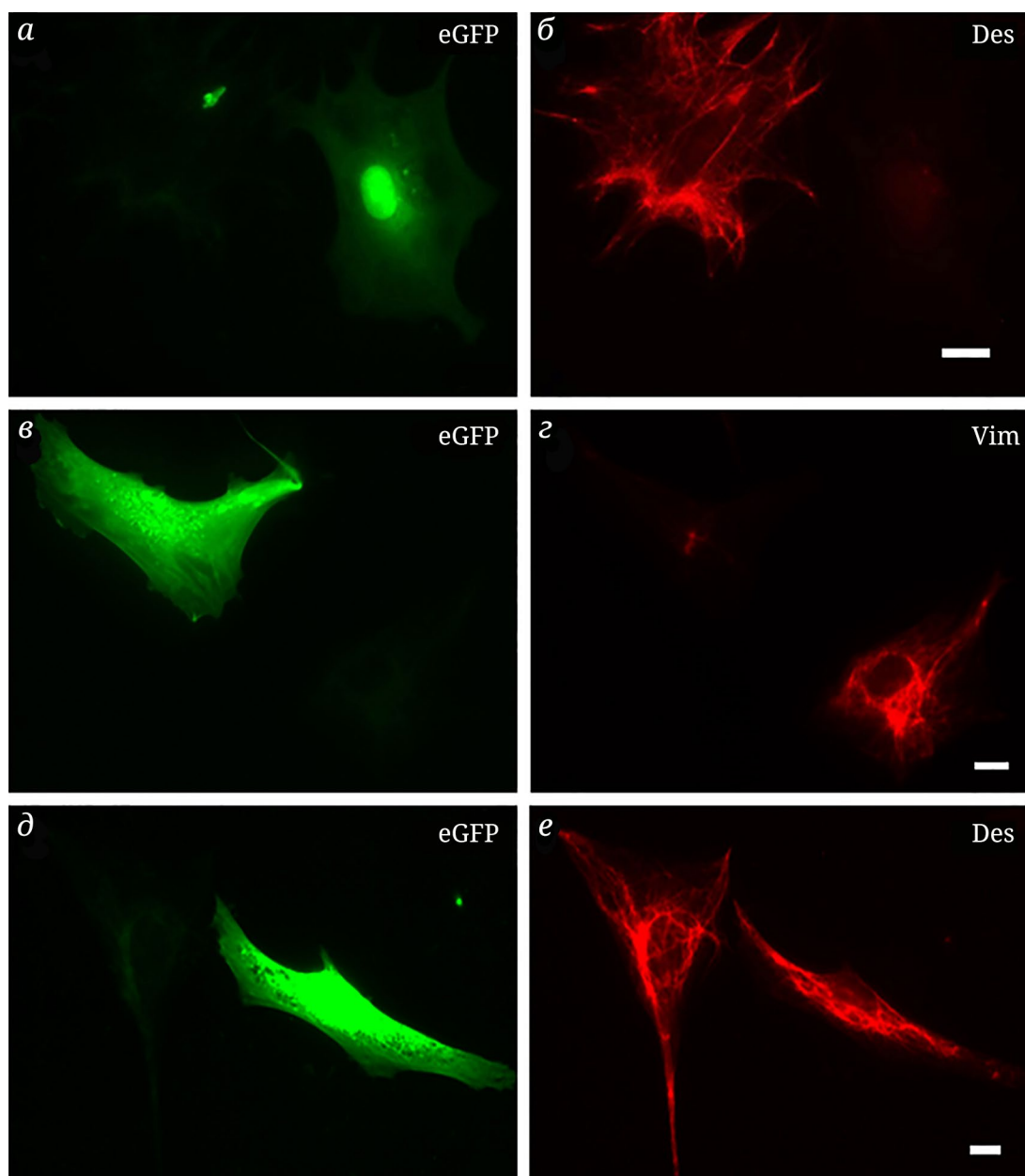


Рис. 2. Разрушение десминовых (а, б) и виментиновых (в, г) ПФ при помощи РНК-интерференции в клетках ВНК21, трансфицированных плазмидами pG-SHIN2-des и pG-SHIN2-vim соответственно. Контрольные клетки (д, е) трансфицировали плазмидой pG-SHIN2-scr. ПФ окрашены при помощи антител против десмина (Des) и виментина (Vim). Трансфицированные клетки выявляли по экспрессии GFP. Масштаб 10 мкм

представляет собой радиально расположенную сеть, что указывает на вероятное участие транспортной системы микротрубочек в её внутриклеточном распределении. Чтобы исследовать роль двух белков ПФ в регуляции функций митохондрий в этих клетках, мы решили избирательно удалить каждый из них.

В первую очередь необходимо было проверить, как повлияет удаление каждого из двух белков на сеть ПФ в клетках ВНК21. Используя РНК-интерференцию для удаления белков ПФ при помощи плазмид на основе pG-SHIN2, содержащей в качестве репортера ген GFP [29, 30], нам удалось

получить клетки ВНК21, в которых ПФ состояли из одного белка – виментина или десмина. На рис. 2 видно, что трансфицированные клетки, выявляемые при помощи коэкспрессии GFP, практически не содержали десмина (а, б) или виментина (в, г), если в них экспрессировали соответствующие интерферирующие РНК. В контрольных клетках, трансфицированных плазмидой pG-SHIN2-scr, не наблюдалось изменений в содержании ни десмина (рис. 2, д, е), ни виментина (не показано).

Ранее мы обнаружили, что нокаун виментина в фибробластах приводил к снижению митохондриального потенциала [16], и решили

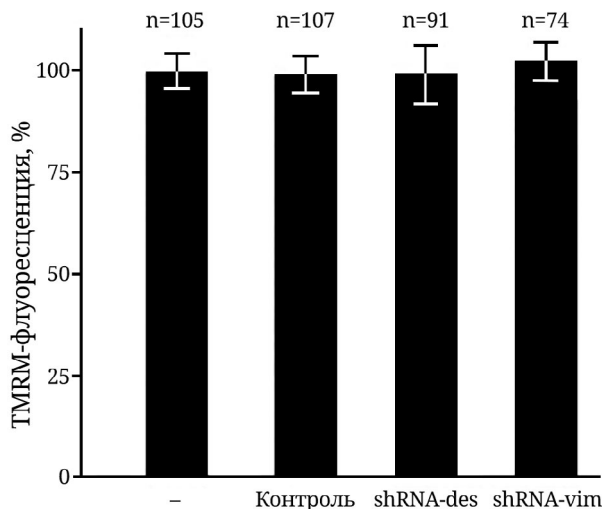


Рис. 3. Отсутствие изменений мембранного потенциала митохондрий в клетках ВНК21 после нокаута десмина (shRNA-des) и виментина (shRNA-vim) при помощи РНК-интерференции. Контрольные клетки трансфицировали плазмидой pG-SHIN2-scr. Данные представлены в виде средних значений флуоресценции митохондрий в указанном числе клеток со стандартной ошибкой в процентах от среднего значения в нетрансфицированных клетках (-)

проверить, каков будет эффект удаления виментина в клетках ВНК21, если в них остаётся только десмин. Анализ мембранного потенциала мито-

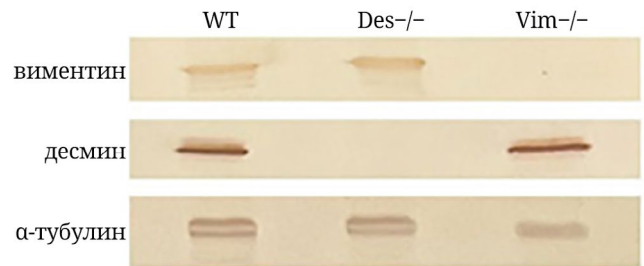


Рис. 4. Иммуноблоттинг гомогенатов клеток исходной линии ВНК21 (WT) и линий ВНК21(Des^{-/-}) и ВНК21(Vim^{-/-}), полученных в результате нокаута генов десмина и виментина соответственно. Альфа-тубулин использовали как контроль

хондрий в таких клетках показал (рис. 3), что нокаун виментина не вызывал каких-либо изменений уровня мембранного потенциала. Это означает, что оставшийся в клетках десмин может, подобно виментину, поддерживать потенциал митохондрий на высоком уровне. Нокаун десмина также не приводил к снижению митохондриального потенциала (рис. 3), предположительно благодаря виментину, который присутствовал в этих клетках. Эти данные позволили предположить, что и виментин и десмин независимо друг от друга контролируют потенциал митохондрий в клетках ВНК21.

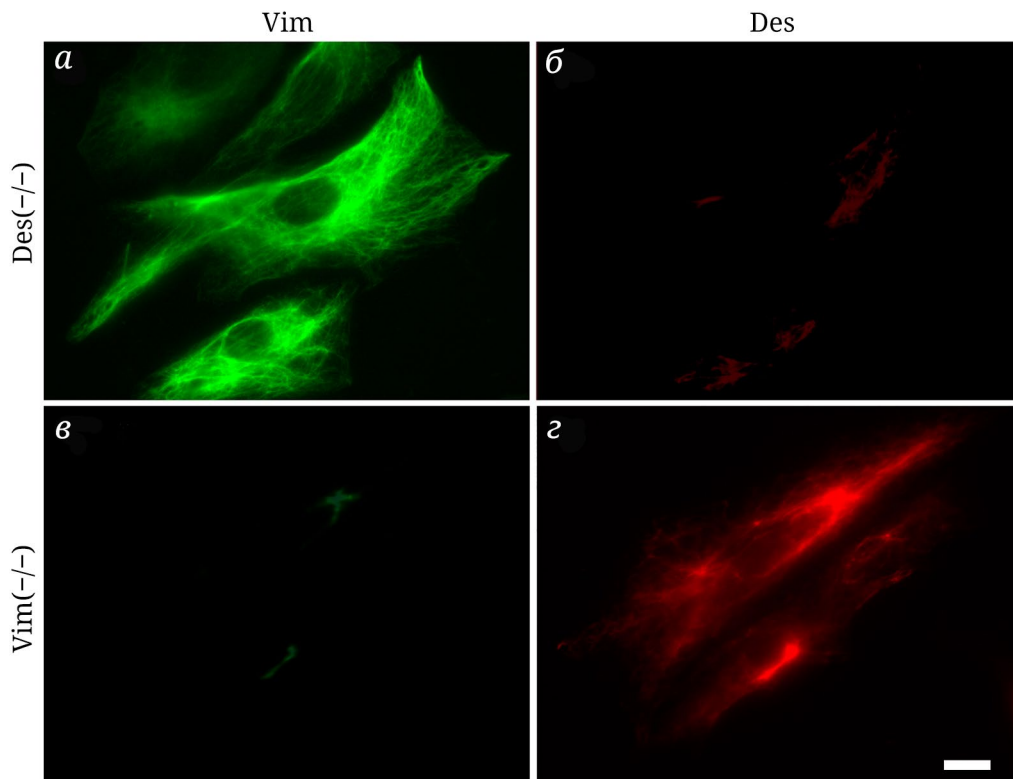


Рис. 5. ПФ в клетках линий ВНК21(Des^{-/-}) (а, б) и ВНК21(Vim^{-/-}) (в, г), полученных в результате нокаута генов десмина и виментина соответственно, выявленные при помощи иммунофлуоресценции с антителами против виментина (а, в) или десмина (б, г). Масштаб 10 мкм

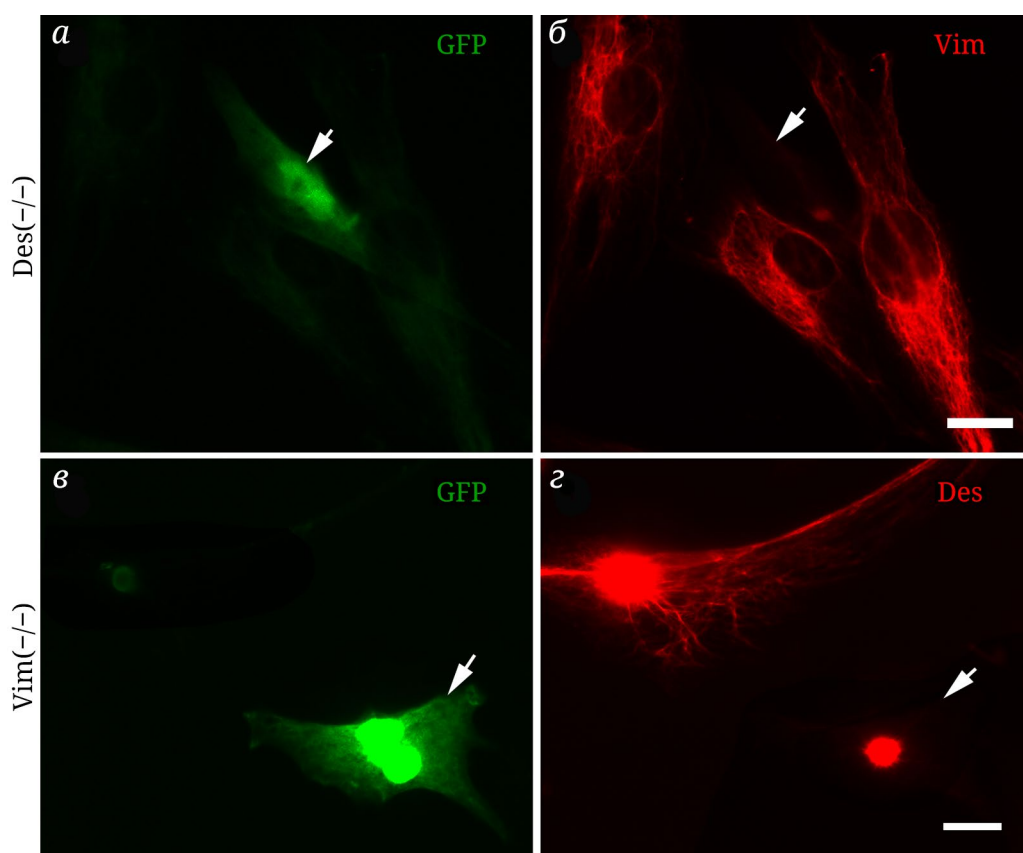


Рис. 6. Удаление виментина (а, б) в клетках ВНК21(Des^{-/-}) и десмина (в, з) в клетках ВНК21(Vim^{-/-}), трансфицированных плазмидами pG-SHIN2-vim и pG-SHIN2-des соответственно, при помощи РНК-интерференции. ПФ окрашены при помощи антител против виментина (б) и десмина (з). Трансфицированные клетки выявляли по экспрессии GFP (а, в, показаны стрелками). Масштаб 10 мкм

Следующим шагом для проверки нашего предположения было определение потенциала митохондрий в клетках, лишённых обоих белков. Чтобы получить клетки ВНК21, лишённые ПФ, мы использовали последовательно два подхода: во-первых, при помощи системы CRISPR-Cas9 получили линии клеток, содержащие только виментин или десмин, и, во-вторых, используя РНК-интерференцию, удаляли в них другой исследуемый белок. Данные иммуоблоттинга, представленные на рис. 4, показывают, что в полученных линиях клеток ВНК21(Des^{-/-}) и ВНК21(Vim^{-/-}) не детектируются десмин и виментин соответственно. Анализ этих клеток при помощи иммуофлуоресцентной микроскопии демонстрирует, что ПФ в них образованы только одним белком, виментином (рис. 5, а, б) или десмином (рис. 5, в, з) соответственно. Виментиновые ПФ в клетках ВНК21(Des^{-/-}) представляют собой нормальную, равномерно расположенную радиальную сеть, в то время как десминовые ПФ в клетках ВНК21(Vim^{-/-}) частично агрегированы. Можно предположить, что нормальное распределение десминовых ПФ зависит от присутствия виментина.

Трансфекция клеток линии ВНК21(Des^{-/-}) при помощи плазмиды, кодирующей интерферирующую РНК против виментина, позволила значительно снизить содержание оставшегося виментина в трансфицированных клетках и, таким образом, получить клетки ВНК21, лишённые ПФ. На микрофотографии (рис. 6, а, б) хорошо видно, что трансфицированная клетка практически не содержала виментиновых ПФ. Добиться полного удаления десминовых ПФ в клетках ВНК21(Vim^{-/-}) оказалось сложнее. Как видно на рис. 6, в, з, в трансфицированных клетках оставались агрегаты десмина, хотя сеть филаментов на периферии клеток полностью отсутствовала. В клетках, трансфицированных контрольной плазмидой, сеть ПФ сохранялась (не показано).

Уровень потенциала митохондрий в клетках ВНК21(Des^{-/-}) после удаления виментина оказался ниже, чем в контрольных клетках (рис. 7, а), что свидетельствует об участии виментиновых ПФ в его поддержании. Оказалось, что подобный эффект наблюдается и при подавлении экспрессии десмина в клетках ВНК21(Vim^{-/-}), несмотря на неполное его удаление. По-видимому, остающиеся агрегаты десмина не влияют на потенциал

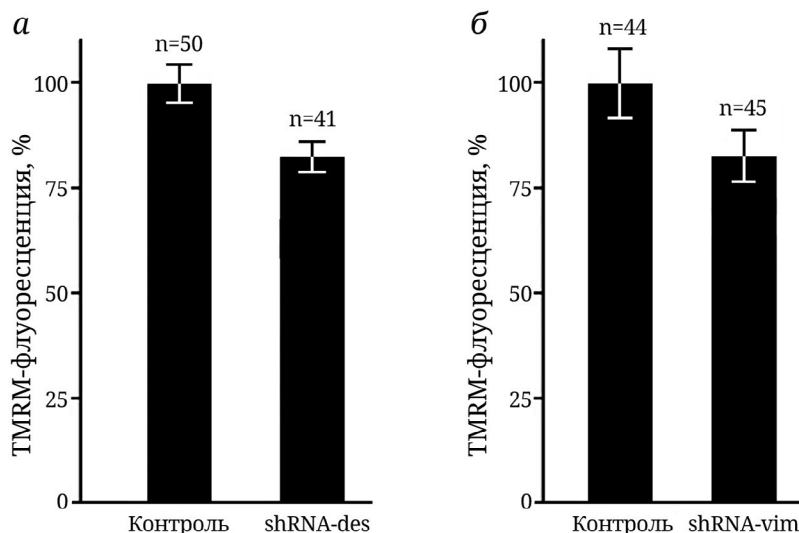


Рис. 7. Снижение мембранного потенциала митохондрий в клетках BHK21(Vim^{-/-}) (а) и в клетках BHK21(Des^{-/-}) (б) в результате РНК-интерференции десмина или виментина соответственно. В качестве контроля использовали клетки, трансфицированные плазмидой рG-SHIN2-scr. Данные представлены в виде средних значений флуоресценции митохондрий в указанном числе клеток со стандартной ошибкой в процентах от среднего значения в нетрансфицированных клетках

митохондрий. Интересно, что снижение уровня потенциала митохондрий в двух линиях клеток при нокадауне виментина и десмина было одинаковым, порядка 20%. Таким образом, оба белка ПФ в клетках BHK21 участвуют в поддержании мембранного потенциала митохондрий независимо друг от друга.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Различные белки ПФ, обнаруженные в разных типах клеток, участвуют в определении подвижности, формы и во многих функциях митохондрий [34, 35]. Однако пока мало изучены молекулярные основы взаимодействия белков ПФ с митохондриями. Анализ аминокислотной последовательности белков ПФ позволил предсказать в некоторых из них участки, способные играть роль сигналов митохондриальной локализации [19, 25, 26]. Таким образом, по крайней мере некоторые ПФ могут напрямую, без посредников связываться с митохондриями, как и показали наши опыты *in vitro* с виментином и десмином [25, 26]. В настоящей работе, используя клетки BHK21, содержащие одновременно виментин и десмин, мы демонстрируем, что десмин может поддерживать высокий уровень митохондриального потенциала, как и виментин, для которого такая способность была показана ранее [19]. На основе этих данных можно заключить, что митохондрии в мышечных клетках могут нормально функционировать как в присутствии десминовых ПФ, так и в условиях дополнительной экспрессии гена

виментина. По-видимому, экспрессия гена виментина в мышечных клетках не связана с изменением функций митохондрий, по крайней мере, не влияет на их потенциал.

Пока неясно, каким образом взаимодействие митохондрий с виментиновыми или десминовыми ПФ приводит к увеличению их мембранного потенциала. Можно предположить, что, несмотря на относительно небольшое действие ПФ на уровень потенциала, их влияние на свойства митохондрий играет важную роль [35]. Данные, полученные в этой работе, свидетельствуют о том, что оба белка или каждый из них по отдельности оказывают на уровень потенциала одинаковое воздействие. Возможно, это указывает, что виментин и десмин действуют по одному механизму. В противном случае можно было бы ожидать их аддитивного эффекта. Как было сказано выше, оба белка имеют в своём составе участки, которые могут играть роль сигналов митохондриальной локализации [19, 25, 26], т.е. могут узнаваться митохондриальными комплексами, отвечающими за импорт белков. Могут ли эти комплексы участвовать в регуляции мембранного потенциала митохондрий, покажут новые исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши данные позволяют предположить, что экспрессия виментина в мышечных клетках в процессе дифференцировки или при регенерации после повреждения способствует формированию нормальной сети десминовых ПФ. Частичная

агрегация десминовых ПФ при нокауте виментина может указывать на такую возможность. Но это предположение необходимо проверить в ходе дополнительных исследований.

Вклад авторов. И.Б. Алиева, А.А. Минин – концепция и руководство работой; А.А. Даял, О.И. Парфентьева, Ван Хуэйин – проведение экспериментов; А.А. Даял, О.И. Парфентьева, А.С. Шахов – обсуждение результатов исследования; А.А. Даял, А.А. Минин – написание текста; И.Б. Алиева, А.С. Шахов – редактирование текста статьи.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Дж. Агнетти (Болонья, Италия) за любезно

предоставленные антитела против десмина, Р. Голдману (Чикаго, США) за генетические конструкции, И.И. Кирееву за помощь в работе с микроскопом высокого разрешения, Н.В. Мининой за квалифицированную техническую помощь.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-74-00036 ААМ).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kennedy, E. P., and Lehninger, A. L. (1949) Oxidation of fatty acids and tricarboxylic acid cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **179**, 957-972.
2. Muller, F. (2000) The nature and mechanism of superoxide production by the electron transport chain: its relevance to aging, *J. Am. Aging Assoc.*, **23**, 227-253, <https://doi.org/10.1007/s11357-000-0022-9>.
3. Thayer, S. A., and Miller, R. J. (1990) Regulation of the intracellular free calcium concentration in single rat dorsal root ganglion neurones *in vitro*, *J. Physiol.*, **425**, 85-115, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1990.sp018094>.
4. Wolvetang, E. J., Johnson, K. L., Krauer, K., Ralph, S. J., and Linnane, A. W. (1994) Mitochondrial respiratory chain inhibitors induce apoptosis, *FEBS Lett.*, **339**, 40-44, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)80380-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)80380-3).
5. Nakahira, K., Haspel, J. A., Rathinam, V. A., Lee, S. J., Dolinay, T., Lam, H. C., Englert, J. A., Rabinovitch, M., Cernadas, M., Kim, H. P., Fitzgerald, K. A., Ryter, S. W., and Choi, A. M. (2011) Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome, *Nat. Immunol.*, **12**, 222-230, <https://doi.org/10.1038/ni.1980>.
6. Cavalli, L. R., Varella-Garcia, M., and Liang, B. C. (1997) Diminished tumorigenic phenotype after depletion of mitochondrial DNA, *Cell Growth Differ.*, **8**, 1189-1198.
7. Morais, R., Zinkewich-Péotti, K., Parent, M., Wang, H., Babai, F., and Zollinger, M. (1994) Tumor-forming ability in athymic nude mice of human cell lines devoid of mitochondrial DNA, *Cancer Res.*, **54**, 3889-3896.
8. Manoli, I., Alesci, S., Blackman, M. R., Su, Y. A., Rennert, O. M., and Chrousos, G. P. (2007) Mitochondria as key components of the stress response, *Trends Endocrinol. Metab.*, **18**, 190-198, <https://doi.org/10.1016/j.tem.2007.04.004>.
9. Davies, K. J. A., Packer, L., and Brooks, G. A. (1981) Biochemical adaptation of mitochondria, muscle, and whole-animal respiration to endurance training, *Arch. Biochem. Biophys.*, **209**, 539-554, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(81\)90312-x](https://doi.org/10.1016/0003-9861(81)90312-x).
10. Linnane, A. W., Marzuki, S., Ozawa, T., and Tanaka, M. (1989) Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases, *Lancet*, **333**, 642-645, [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(89\)92145-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(89)92145-4).
11. Mitchell, P. D. (1981) *Chemiosmotic Proton Circuits in Biological Membranes* (Skulachev, V. P., and Hinkle, P. C., eds), Addison-Wesley, Advanced Book Program/World Science Division, University of Michigan, pp. 633.
12. Tanaka, A., Cleland, M. M., Xu, S., Narendra, D. P., Suen, D. F., Karbowski, M., and Youle, R. J. (2010) Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin, *J. Cell Biol.*, **191**, 1367-1380, <https://doi.org/10.1083/jcb.201007013>.
13. Green, D. R., and Reed, J. C. (1998) Mitochondria and apoptosis, *Science*, **281**, 1309-1312, <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1309>.
14. Vasan, K., Clutter, M., Fernandez Dunne, S., George, M. D., Luan, C. H., Chandel, N. S., and Martínez-Reyes, I. (2022) Genes involved in maintaining mitochondrial membrane potential upon electron transport chain disruption, *Front. Cell Dev. Biol.*, **10**, 781558, <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.781558>.
15. Begum, H. M., and Shen, K. (2023) Intracellular and microenvironmental regulation of mitochondrial membrane potential in cancer cells, *WIREs Mech. Dis.*, **15**, e1595, <https://doi.org/10.1002/wsbm.1595>.
16. Uttam, J., Hutton, E., Coulombe, P. A., Anton-Lamprecht, I., Yu, Q. C., Gedde-Dahl, T., Fine, J. D., and Fuchs, E. (1996) The genetic basis of epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 9079-9084, <https://doi.org/10.1073/pnas.93.17.9079>.

17. Kumar, V., Bouameur, J.-E., Bär, J., Rice, R. H., Hornig-Do, H.-T., Roop, D. R., Schwarz, N., Brodesser, S., Thiering, S., Leube, R. E., et al. (2015) A keratin scaffold regulates epidermal barrier formation, mitochondrial lipid composition, and activity, *J. Cell Biol.*, **211**, 1057-1075, <https://doi.org/10.1083/jcb.201404147>.
18. Kumemura, H., Harada, M., Yanagimoto, C., Koga, H., Kawaguchi, T., Hanada, S., Taniguchi, E., Ueno, T., and Sata, M. (2008) Mutation in keratin 18 induces mitochondrial fragmentation in liver-derived epithelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **367**, 33-40, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.12.116>.
19. Chernovivanenko, I. S., Matveeva, E. A., Gelfand, V. I., Goldman, R. D., Minin, A. A. (2015) Mitochondrial membrane potential is regulated by vimentin intermediate filaments, *FASEB J.*, **29**, 820, <https://doi.org/10.1096/fj.14-259903>.
20. Capetanaki, Y. (2002) Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function, *Trends Cardiovasc. Med.*, **12**, 339-348, [https://doi.org/10.1016/s1050-1738\(02\)00184-6](https://doi.org/10.1016/s1050-1738(02)00184-6).
21. Guichard, J. L., Rogowski, M., Agnetti, G., Fu, L., Powell, P., Wei, C. C., Collawn, J., and Dell'Italia, L. J. (2017) Desmin loss and mitochondrial damage precede left ventricular systolic failure in volume overload heart failure, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **313**, H32-H45, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00027.2017>.
22. Milner, D. J., Weitzer, G., Tran, D., Bradley, A., and Capetanaki, Y. (1996) Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin, *J. Cell Biol.*, **134**, 1255-1270, <https://doi.org/10.1083/jcb.134.5.1255>.
23. Milner, D. J., Mavroidis, M., Weisleder, N., and Capetanaki, Y. (2000) Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function, *J. Cell Biol.*, **150**, 1283-1298, <https://doi.org/10.1083/jcb.150.6.1283>.
24. Vrabie, A., Goldfarb, L. G., Shatunov, A., Nägele, A., Fritz, P., Kaczmarek, I., and Goebel, H. H. (2005) The enlarging spectrum of desminopathies: new morphological findings, eastward geographic spread, novel exon 3 desmin mutation, *Acta Neuropathol.*, **109**, 411-417, <https://doi.org/10.1007/s00401-005-0980-1>.
25. Dayal, A. A., Medvedeva, N. V., and Minin, A. A. (2022) N-Terminal fragment of vimentin is responsible for binding of mitochondria *in vitro*, *Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.*, **16**, 151-157, <https://doi.org/10.1134/S1990747822030059>.
26. Dayal, A. A., Medvedeva, N. V., Nekrasova, T. M., Duhalin, S. D., Surin, A. K., and Minin, A. A. (2020) Desmin interacts directly with mitochondria, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8122, <https://doi.org/10.3390/ijms21218122>.
27. Bornemann, A., and Schmalbruch, H. (1992) Desmin and vimentin in regenerating muscles, *Muscle Nerve*, **15**, 14-20, <https://doi.org/10.1002/mus.880150104>.
28. Mohamed, J. S., and Boriak, A. M. (2012) Loss of desmin triggers mechanosensitivity and up-regulation of Ankrd1 expression through Akt-NF- κ B signaling pathway in smooth muscle cells, *FASEB J.*, **26**, 757-765, <https://doi.org/10.1096/fj.10-160291>.
29. Mendez, M. G., Kojima, S., and Goldman, R. D. (2010) Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition, *FASEB J.*, **24**, 1838-1851, <https://doi.org/10.1096/fj.09-151639>.
30. Kojima, S., Vignjevic, D., and Borisy, G. G. (2004) Improved silencing vector co-expressing GFP and small hairpin RNA, *Biotechniques*, **36**, 74-79, <https://doi.org/10.2144/04361ST02>.
31. Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., and Zhang, F. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems, *Science*, **339**, 819-823, <https://doi.org/10.1126/science.1231143>.
32. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-695, <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
33. Steinert, P. M., Chou, Y. H., Prahlad, V., Parry, D. A., Marekov, L. N., Wu, K. C., Jang, S. I., and Goldman, R. D. (1999) A high molecular weight intermediate filament-associated protein in BHK-21 cells is nestin, a type VI intermediate filament protein. Limited co-assembly *in vitro* to form heteropolymers with type III vimentin and type IV alpha-internexin, *J. Biol. Chem.*, **274**, 9881-9890, <https://doi.org/10.1074/jbc.274.14.9881>.
34. Schwarz, N., and Leube, R. (2016) Intermediate filaments as organizers of cellular space: how they affect mitochondrial structure and function, *Cells*, **5**, 30, <https://doi.org/10.3390/cells5030030>.
35. Alieva, I. B., Shakhov, A. S., Dayal, A. A., Parfenteva, O. I., Minin, A. A. (2024) Unique role of vimentin in the intermediate filament proteins family, *Biochemistry (Moscow)*, **89**, 726-736, <https://doi.org/10.1134/S0006297924040114>.

**VIMENTIN AND DESMIN INTERMEDIATE FILAMENTS MAINTAIN
MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL****A. A. Dayal¹, O. I. Parfenteva¹, W. Huiying¹, A. S. Shakhov^{1,2},
I. B. Alieva^{1,2}, and A. A. Minin^{1*}**

¹ *Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: alexminin@gmail.com*

² *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119992 Moscow, Russia*

Intermediate filaments (IF) are one of the three main components of the cytoskeleton in animal cells, characterized by the diverse range of proteins that represent them in different cell types. They provide mechanical strength to cells and help position the nucleus and various organelles within the cell. Desmin is an IF protein characteristic of muscle cells, while vimentin, which has a similar structure, is found in many mesenchymal cells. During myogenesis and the regeneration of damaged muscle tissue, both of these proteins can be expressed, forming a mixed IF network. Each protein is known to regulate mitochondrial function in the cells where it is present, including mitochondrial localization and the maintenance of mitochondrial membrane potential. However, the regulation of mitochondrial function in cells with mixed IFs remains unclear. To investigate how the simultaneous presence of these proteins affects mitochondrial membrane potential, we utilized BHK21 cells as a model system, expressing both vimentin and desmin IFs. The expression of either protein individually or both proteins simultaneously was suppressed using gene knockout and/or RNA interference. It was found that removal of either protein did not affect the mitochondrial membrane potential, which remained unchanged compared to when both proteins were present. Simultaneous removal of both proteins resulted in a 20% reduction in mitochondrial membrane potential, indicating that vimentin and desmin both play a critical role in its maintenance.

Keywords: mitochondria, vimentin, desmin, mitochondrial membrane potential