

Биосенсоры на основе люциферазы для выявления активности шаперонов и отслеживания биоэнергетики митохондрий

Аль Ибрахим Р.Н.^{1*}, Алексеева М.Г.², Баженов С.В.¹, Фомин В.В.^{1,4},
Кессених А.Г.⁴, Мавлетова Д.А.², Нестеров А.А.^{2,3}, Полуэктова Е.Ю.²,
Даниленко В.Н.², Манухов И.В.¹

¹ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, МО, Россия

² Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

³ Институт инженерной экологии РУДН, Москва, Россия

⁴ Лаборатория микробиологии Росбиотех, Москва, Россия

* rahaf.alebrahim6@mail.ru

Ключевые слова: биосенсоры; шапероны; митохондрии; болезнь Паркинсона

В этом исследовании мы создали набор конструкций с генами люциферазы из различных источников, таких как *Luciola mingrelica*, *Photorhabdus luminescens* и *Aliivibrio fischeri*, для экспрессии в бактериальных и эукариотических клетках. Реципиентные клетки с этими конструкциями позволяют анализировать внутриклеточную активность шаперонов, оценивать пул восстановленных эквивалентов и проводить токсикологические исследования.

Пара генов люцифераз из *A. fischeri* и *P. luminescens*, различающихся по термостабильности (оптимум люминесценции при 25 и 38 °C соответственно), применялись для исследования дезагрегационной активности штамма *Limosilactobacillus fermentum* U-21. Этот штамм секретирует шапероны в среду и рассматривается как кандидат для разработки лекарств, известных как дезагрегазы, для терапии болезни Паркинсона [1]. Мы показали, что секретируемый белок, кодируемый локусом C0965_000195, согласно анализу последовательности и структуры, является ClpL. С помощью вышеописанной пары люцифераз показано, что ClpL в гетерологичной системе, в клетках *Escherichia coli*, может компенсировать дефицит гена *clpB* и улучшать рефолдинг белков. Эксперименты *in vitro* продемонстрировали, что культуральная среда, содержащая секретируемые клетками штамма U-21 белки, включая ClpL, может предотвращать термоденатурацию люцифераз. Эти результаты позволяют предположить, что ClpL, обладающий свойствами дезагрегазы, может значительно способствовать фармбиотическим свойствам *L. fermentum* U-21, что делает его перспективным кандидатом для разработки терапевтических стратегий против нейродегенеративных заболеваний.

Гены светлячковой люциферазы *L. mingrelica* и бактериальной из *P. luminescens*, оптимизированной для экспрессии в млекопитающих были успешно трансфицированы в клетки HEK293t. Конструкции с геном *luc* *L. mingrelica* для экспрессии люциферазы как в цитоплазме, так и в митохондриальном матриксе позволили анализировать внутриклеточный пул АТФ и влияние работы дыхательной цепи митохондрий на него. Конструкции с генами *luxAB* *P. luminescens* позволяют анализировать внутриклеточный пул восстановленного ФМН. Оксидоредуктаза LuxG дополнительно позволяет оценивать пул НАДН в

клетке. Локализация в цитоплазме и матриксе митохондрий бактериальной и светлячковой люцифераз позволяет оценивать влияние различных биологически активных веществ на энергетические процессы в разных компартментах клетки.

Финансирование: Конструирование биосенсоров и исследование шаперонной активности поддержано РФФ 22-14-00124.

Клонирование гена *clpL* и работа с *L. fermentum* U-21 проведены в ИОГен РАН за счёт ГЗ 122022600163-7.

Влияние биологически активных веществ на биосенсоры исследовано при поддержке Минобрнауки РФ, проект FSMF-2023-0010.

Luciferases based biosensors for detecting chaperone activity and monitoring mitochondrial bioenergetics

Al Ebrahim R.N.^{1*}, Alekseeva M.G.², Bazhenov S.V.¹, Fomin V.V.^{1,4}, Kessenikh A.G.⁴, Mavletova D.A.², Nesterov A.A.^{2,3}, Poluektova E.U.², Danilenko V.N.², Manukhov I.V.¹

¹ Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow region, Russia

² Laboratory of Genetics of Microorganisms, Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ Institute of Environmental Engineering, RUDN University, Moscow, Russia

⁴ Laboratory of Microbiology BIOTECH University, Moscow, Russia

* rahaf.alebrahim6@mail.ru

Key words: biosensors; chaperones; mitochondria; Parkinson's disease

In this study, we developed a series of constructs with luciferase genes from various sources, such as *Luciola mingrelica*, *Photobacterium luminescens*, and *Aliivibrio fischeri*, for expression in bacterial and eukaryotic cells. Recipient cells with these constructs allow for the analysis of intracellular chaperone activity, assessment of the reduced equivalents pool, and toxicological studies.

A pair of luciferase genes from *A. fischeri* and *P. luminescens*, differing in thermostability (optimal luminescence at 25 and 38 °C respectively), were used to investigate the disaggregase activity of the *Limosilactobacillus fermentum* U-21 strain. This strain secretes chaperones into the medium and is considered a candidate for the development of disaggregase drugs for Parkinson's disease therapy [1]. We showed that the secreted protein encoded by the C0965_000195 locus, according to sequence and structural analysis, is ClpL. Using the above-mentioned pair of luciferases, it was shown that ClpL in a heterologous system, in *Escherichia coli* cells, can compensate for the *clpB* gene deficiency and improve protein refolding. *In vitro* experiments demonstrated that the culture medium containing proteins secreted by the U-21 strain, including ClpL, can prevent the thermal denaturation of luciferases. These results suggest that ClpL, possessing disaggregase properties, can significantly contribute to the pharmacobiotic properties of *L. fermentum* U-21, making it a promising candidate for the development of therapeutic strategies against neurodegenerative diseases.

The luciferase genes from the firefly *L. mingrelica* and the bacterium *P. luminescens*, optimized for expression in mammals, were successfully transfected into HEK 293T cells. Constructs with the *luc* gene from *L. mingrelica* for luciferase expression in both

the cytoplasm and mitochondrial matrix allowed for the analysis of the intracellular ATP pool and the impact of mitochondrial respiratory chain activity on it. Constructs with the *luxAB* genes from *P. luminescens* enable the analysis of the intracellular reduced FMN pool. The *LuxG* oxidoreductase further allows for the assessment of the NADH pool in the cell. Localization of bacterial and firefly luciferases in the cytoplasm and mitochondrial matrix makes it possible to evaluate the effects of various bioactive substances on the energy processes in different cell compartments.

Funding: The construction of biosensors and the investigation of chaperone activity were supported by the Russian Science Foundation (grant number 22-14-00124).

Cloning of the *clpL* gene and work with *L. fermentum* U-21 were carried out at the Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, funded by State Assignment 122022600163-7.

The study of the effects of bioactive substances on biosensors was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, project FSMF-2023-0010.

Список литературы/References

1. Stavrovskaya A.V., Voronkov D.N., Marsova M.V. et al. Effects of the pharmabiotic U-21 in a combined neuroinflammatory model 476 of Parkinson's disease in Rats. *Bull Exp Biol Med.* 2024;177(2):193-199. doi 10.47056/0365-9615-2024-177-2-193-199