

## LUX-БИОСЕНСОРЫ ДЛЯ АНАЛИЗА ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ПУЛА МАКРОЭРГИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ И ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ЭКВИВАЛЕНТОВ

© 2024 г. Р. Н. Аль Ибрахим<sup>1</sup>, С. В. Баженов<sup>1, 2</sup>, М. Ю. Высоких<sup>3, 4</sup>,  
Ю. Э. Лю<sup>1</sup>, А. Д. Власова<sup>1</sup>, С. М. Бухалович<sup>1</sup>, И. В. Манухов<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Московский физико-технический институт, Долгопрудный, 141707 Россия

<sup>2</sup>Российский биотехнологический университет, Москва, 125080 Россия

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,  
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992 Россия

<sup>4</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение “Национальный медицинский  
исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова”  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 117997 Россия

\*e-mail: manukhovi@mail.ru

Поступила в редакцию 19.06.2024 г.

После доработки 26.06.2024 г.

Принята к публикации 27.06.2024 г.

Биосенсорные инструменты для анализа внутриклеточных энергетических процессов активно развиваются в настоящее время. Предложен набор плазмидных конструкций с генами люцифераз из *Luciola mingrelica* и *Photorhabdus luminescens* для получения биосенсорных клеток бактерий и эукариот. За счет использования сигнальных последовательностей реализована возможность направленной экспрессии люциферазы как в цитоплазме, так и в матриксе митохондрий. Показано, что полученные биосенсоры применимы для анализа пула макроэргических соединений и восстановительных эквивалентов, таких как АТФ, НАДН и флавиномононуклеотид (ФМН) в клетке. Предполагается, что данный инструмент будет востребован для анализа активности внутриклеточных шаперонов, а также токсикологических и других исследований.

**Ключевые слова:** биосенсоры, плазида, АТФ, НАДН, флавиномононуклеотид

**DOI:** 10.56304/S0234275824040021

*Lux*-биосенсоры широко используют в работах по генетической инженерии и биотехнологии [1–4]. Традиционно считается, что *lux*-биосенсор – это бактериальная клетка, содержащая гибридную плазмиду, в состав которой встроены два основных элемента: регуляторный участок (промотор и оператор) и *luxCDABE* в качестве репортерного гена [5]. Индуцибельные промоторы позволяют оценивать появление тех или иных биологически активных веществ в среде и клетке по индукции люминесценции и определять класс токсиканта при наличии специфичного рецепторного регулятора [6–8]. Однако применение *lux*-биосенсоров не ограничивается детекцией появления токсикантов и биологически активных веществ. Активность фермента люциферазы может быть использована для наблюдения/визуализации процессов инактивации, фолдинга и рефолдинга белков в клетке, оценки активности внутриклеточных шаперонов и протеаз [9–11]. Корреляция падения люминес-

ценции с числом живых клеток и снижением их жизнеспособности позволяет оценивать общую (интегральную) токсичность [12, 13].

В проведенном исследовании мы расширили спектр *lux*-биосенсоров за счет включения в него эукариотических клеток, экспрессирующих бактериальные *lux*-гены, а также и эукариотические гены люцифераз, используемые в качестве репортерных. Для анализа внутриклеточного пула макроэргических соединений и восстановительных эквивалентов были сконструированы гибридные плазмиды, позволяющие экспрессировать гены *luxAB* бактерий и *luc* светлячков в цитоплазме и митохондриях эукариотических клеток. Кроме того, была исследована чувствительность трансфицированных этими плазмидами клеток к экзогенному введению АТФ и НАДН в присутствии детергента дигитонина.

**Таблица 1.** Праймеры, использованные в работе  
**Table 1.** Primers used in the study

Праймер	Последовательность 5' → 3'	Плазмиды, сконструированные с помощью этих праймеров
Fw_KpnI_Dendra2	tcttggtagcaaacacccccgggaattaacctgatcaagga	pcDNA3.1-4×MTS-Dendra2
rev_Dendra2	ctcaaaagcttctaccacacctggctggcgagg	
lucDir	atggaaatggaaaaggaggagaatg	pcDNA-luc(mito) pcDNA-luc(cyto)
lucRev	tgatcagtcacgactctagaggatcaca	pcDNA-luc(mito)
pc31sig	cctccttttccatttcataagagagtgatcttagccccga	
pc31pol	tagagtcgatgactgatcagcctcgactgtgcct	
RemovSig	ggtagggatccactagtcag	pcDNA-luc(cyto)

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Бактерии и плазмиды

Штамм *Escherichia coli* TG1 K-12 *glnV44thi-1*  $\Delta(lac-proAB)\Delta(mcrB-hsdSM)5(r_{k}^{-}m_{k}^{-})F'[traD36proAB^{+}lacI^{q}lacZ\Delta M15]$  получен из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов.

### Культивирование бактерий

Клетки *E. coli* растили на среде LB, г/л: триптон – 10, экстракт дрожжей – 5, хлорид натрия – 10 (все реактивы производства “Диаэм”, Россия) при 37°C и перемешивании со скоростью 200 об/мин, или в чашках Петри на поверхности агаризованной среды LB с добавлением 1.5% (w/v) бактоагара (“Диаэм”). В среду добавляли антибиотики: ампициллин (Артериум, Украина) в конечной концентрации 100–200 мкг/мл и/или канамицин (“Биохимик АО”, Россия) в концентрации 40 мкг/мл – в зависимости от набора генов резистентности в составе используемой плазмиды.

### Конструирование плазмид для экспрессии люцифераз бактерий и светлячка в эукариотических клетках

Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием набора Plasmid Miniprep (“Евроген”, Россия). Амплификацию для клонирования проводили с использованием полимеразы Q5 Hot-Start (NEB, США), а лигирование – лигазой T4 (Promega, США). Олигонуклеотидные последовательности, используемые в качестве праймеров при конструировании рекомбинантных плазмид и секвенировании ДНК, приведены в табл. 1. Секвенирование проводили в компании “Евроген”.

Сборку плазмид из нескольких фрагментов ДНК с комплементарными концевыми последовательностями (перекрытие областей ~20 нуклеотидов) проводили с использованием ферментов для

смешивания Gibson Assembly® Master Mix (NEB) по методике, описанной Gibson с соавт [14].

pcDNA3.1-4×MTS-Dendra2 – плаزمида для направленной в митохондриальный матрикс экспрессии флуоресцентного белка Dendra2. Последовательность 4×MTS, содержащая стартовый кодон и кодирующую сигнальную последовательность из четырех тандемных повторов по 29 аминокислот CoXVIII [15], была приобретена у Eurofins Genomics (Германия). Методом ПЦР сайт рестрикции для *Bam*HI был добавлен перед стартовым кодоном, а два сайта рестрикции *Kpn*I и *Hind*III – после сигнальной последовательности. Этот фрагмент был вставлен в вектор pcDNA3.1 с использованием сайтов рестрикции *Bam*HI и *Hind*III, а после сигнальной последовательности – кодирующая флуоресцентный белок Dendra2, для чего были использованы эндонуклеазы рестрикции *Kpn*I и *Hind*III и лигаза T4 (Thermo Fisher Scientific, США). Встраиваемый в плазмиду фрагмент был получен методом ПЦР с праймерами Fw\_KpnI\_Dendra2 и rev\_Dendra2, в качестве матрицы была использована плазмиды pMC-MTS-Dendra2 [16]. Полученная в результате плазмиды названа pcDNA3.1-4×MTS-Dendra2.

pcDNA-luc(mito) – плазмиды для экспрессии люциферазы светлячка в матриксе митохондрий, которая была сконструирована путем амплификации гена *luc* с гибридной плазмиды pLR [17] праймерами lucDir и LucRev и вставки его в вектор pcDNA3.1-4×MTS-Dendra2, линейризованный праймерами pc31sig и pc31pol. Полученная в результате плазмиды pcDNA-luc(mito) содержала трансляционное слияние гена люциферазы, *luc*, с последовательностью сигнального пептида (4 повтора MTS) для экспрессии в митохондриальном матриксе под CMV-промотором.

pcDNA-luc(cyto) – плазмиды для экспрессии люциферазы светлячка в цитоплазме эукариотических клеток, которая была сконструирована путем удаления сигнального пептида из pcDNA-luc(mito) с

**Таблица 2.** Плазмиды, использованные в работе  
**Table 2.** Plasmids used in the study

Плаزمида	Описание
pLR3*	Плазмида на основе pBluescript с геном <i>luc</i> под промотором гена <i>luxI Aliivibrio fischeri</i> , Ap <sup>r</sup>
pcDNA3.1-4×MTS-Dendra2	Плазмида на основе pcDNA3.1, Ap <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup> /Kan <sup>r</sup> , содержит ген направляемого в митохондрию белка Dendra2 под промотором CMV
pcDNA-luc(mito)	Как pcDNA3.1-4×MTS-Dendra2, но ген <i>dendra2</i> заменен на <i>luc</i>
pcDNA-luc(cyto)	Как pcDNA-luc(mito), но удален сигнал митохондриальной локализации
pUC18-LuxAB- frp	Вектор pUC18 с генами <i>luxAB Photorhabdus luminescens</i> и <i>frp Vibrio harveyi</i> под Плаc-промотором, Ap <sup>r</sup>
pLuxAB-frp(cyto)	Вектор pcDNA3.1 с кассетой <i>luxAB-frp</i> под CMV-промотором, Ap <sup>r</sup>
pLuxAB-frp(mito)	Как pLuxAB-frp(cyto), но с сигналом митохондриальной локализации 4×MTS

\* *Примечание:* Эта плазмида описана в работе [17], остальные получены в этой работе.

\* *Note:* This plasmid was described by M. Koksharov & N. Ugarova [17], while the others were obtained in this work.

помощью амплификации праймерами lucDir и RemovSig с последующим самолигированием.

pUC18-luxAB-frp – плазмида, несущая синтетическую последовательность, кодирующую бактериальную люциферазу и флавиномононуклеотид-редуктазу (ФМН-редуктазу) в единой рамке считывания. Гены *luxAB P. luminescens* и *frp V. harveyi* с оптимизированным составом кодонов для экспрессии как в клеточных линиях человека, так и в клетках *E. coli*, были шиты через линкеры, кодирующие гибкие глицин/сериновые участки с промежуточными вирусными элементами 2A [18, 19]. Сайты рестрикции *Bam*HI и *Kpn*I были добавлены к 5'-концу, а *Hind*III – к 3'-концу последовательности так, чтобы полученную последовательность можно было встраивать в рамку считывания при переклонировании *luxAB-frp*. Последовательность *luxAB-frp* была синтезирована *de novo* (“Евроген”) и клонирована в векторе pUC18. Полученная плазмида названа pUC18-luxAB-frp.

pLuxAB-frp(mito) и pLuxAB-frp(cyto) – плазмиды для экспрессии бактериальной люциферазы в клетках эукариот. Фрагмент *luxAB-frp* был рестриктирован из pUC18-luxAB-frp с помощью *Kpn*I и *Hind*III и лигирован по этим же сайтам с pcDNA-luc(mito). Полученная в результате плазмиды pLuxAB-frp(mito) экспрессирует в эукариотических клетках бактериальную люциферазу с лидерным пептидом для митохондриального матрикса.

Плазмиды pLuxAB-frp(cyto) получены путем переклонирования *luxAB-frp* по сайтам *Bam*HI, *Hind*III в pcDNA-luc(cyto), что позволило экспрессировать бактериальную люциферазу в цитоплазме эукариотических клеток.

Последовательности и карты полученных в результате плазмид: pcDNA-luc(mito), pcDNA-luc(cyto), pLuxAB-frp(mito) и pLuxAB-frp(cyto) – приведены в Дополнительных материалах (файлы S1–S4).

Все используемые в работе плазмиды и их характеристики представлены в табл. 2.

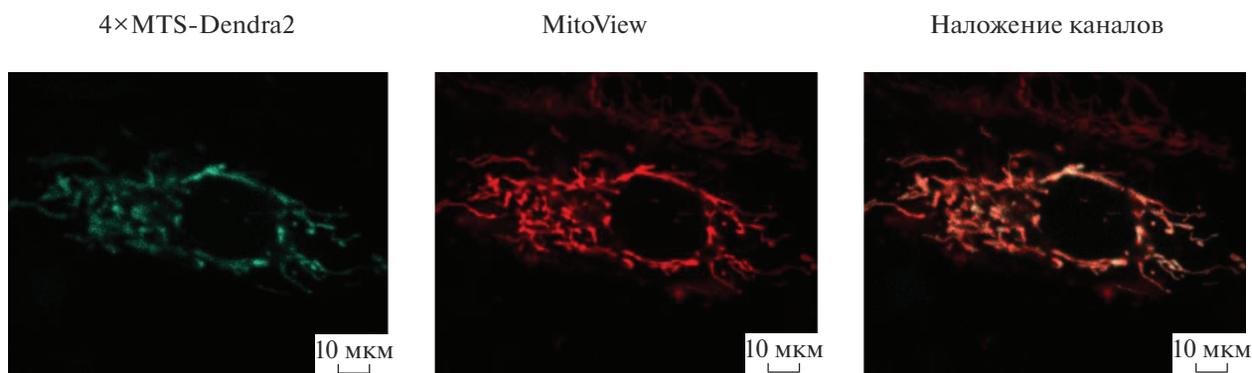
Все используемые в работе плазмиды и их характеристики представлены в табл. 2.

#### Культивирование и трансфекция клеток HEK293T

Клеточную линию HEK293T, полученную от European Collection of Authenticated Cell Cultures ECACC (Sigma-Aldrich, США), поддерживали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS), 20 мМ HEPES, 2 мМ L-глутамин, 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (все реактивы фирмы Gibco, США) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе Binder C150 E2 (Binder GmbH, Германия) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Транзientную трансфекцию проводили за 2 сут до эксперимента по следующему протоколу: в микропробирку (Eppendorf, Германия) вносили 200 мкл среды Opti-MEM (Gibco), 2 мкг плазмидной ДНК, 4 мкл реагента Lipofectamine™ LTX вместе с 2 мкл PLUSreagent (Invitrogen, США) и инкубировали в течение 15 мин. Смесь равномерно распределяли по клеткам, высеванным в 6-луночные планшеты, не касаясь стенок или дна планшетов. Через 2 сут после трансфекции число клеток HEK293T достигало (1–3) × 10<sup>6</sup> в лунке, их промывали и переносили в DMEM перед использованием. Клетки снимали с планшета с использованием TрупLE™ Express Enzyme (Gibco) в течение 5 мин.

#### Конфокальная микроскопия

Конфокальную лазерную сканирующую микроскопию проводили на инвертированном микроскопе LSM 780 (Carl Zeiss, Германия), оснащенном масляным объективом Arochromat 63× (числовая апертура (NA) = 1.4; Carl Zeiss). Интенсивность



**Рис. 1.** Колокализация 4×MTS-Dendra2 с митохондриальным красителем MitoView 633 в клетках HEK293T.  
**Fig. 1.** Colocalization of 4×MTS-Dendra2 with the mitochondrial dye MitoView 633 in HEK293T cells.

сигналов флуоресцентного белка Dendra2 (конструкция 4×MTS-Dendra2, закодированная в плазмиде pcDNA3.1-4×MTS-Dendra2), и митохондриального красителя MitoView™ 633 (Biotium, США) измеряли при длине волны возбуждения 488 и 561 нм соответственно. Во время конфокальной микроскопии клетки помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор INUBG2H-ELY (Tokai Hit, Япония). Изображения обрабатывали с использованием программного обеспечения Zen (Carl Zeiss) и ImageJ (НИН, США).

#### *Измерение интенсивности биолюминесценции*

Биолюминесценцию клеток измеряли на высокочувствительном кюветном люминометре Bio-tox-72K (Калиниченко, Россия) при комнатной температуре. Клетки *E. coli* культивировали в пробирках до достижения оптической плотности 0.1–0.2 при 600 нм.

Во время измерений клетки HEK293T переносили в чистые микропробирки, разводили в PBS с 10% DMEM так, чтобы в образце было около  $7 \times 10^3$  клеток. В образцы вносили люциферин (10 мкг/мл) или деканаль (1 мкг/мл) – в качестве субстратов люцифераз светлячка и бактерий соответственно. Общий объем образца составлял 120 мкл; его перемешивали и переносили в люминометр с последующим периодическим измерением люминесценции с усреднением сигнала 1 раз в секунду. По мере необходимости добавляли другие вещества.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Локализация репортерного белка в митохондриальном матриксе*

Функционирование сигнала митохондриальной локализации (MTS) для доставки белков в матрикс митохондрий было проверено с помощью добавления сигнала 4×MTS. Это 4 тандемных повтора по 29 аминокислот субъединицы цитохро-

моксидазы-8 (CoXVIII) на N-конце флуоресцентного белка Dendra2 (конструкция 4×MTS-Dendra2). Митохондриальная локализация Dendra2 с сигналом 4×MTS была подтверждена исследованием колокализации с потенциалзависимым митохондриальным красителем MitoView™ 633 (рис. 1).

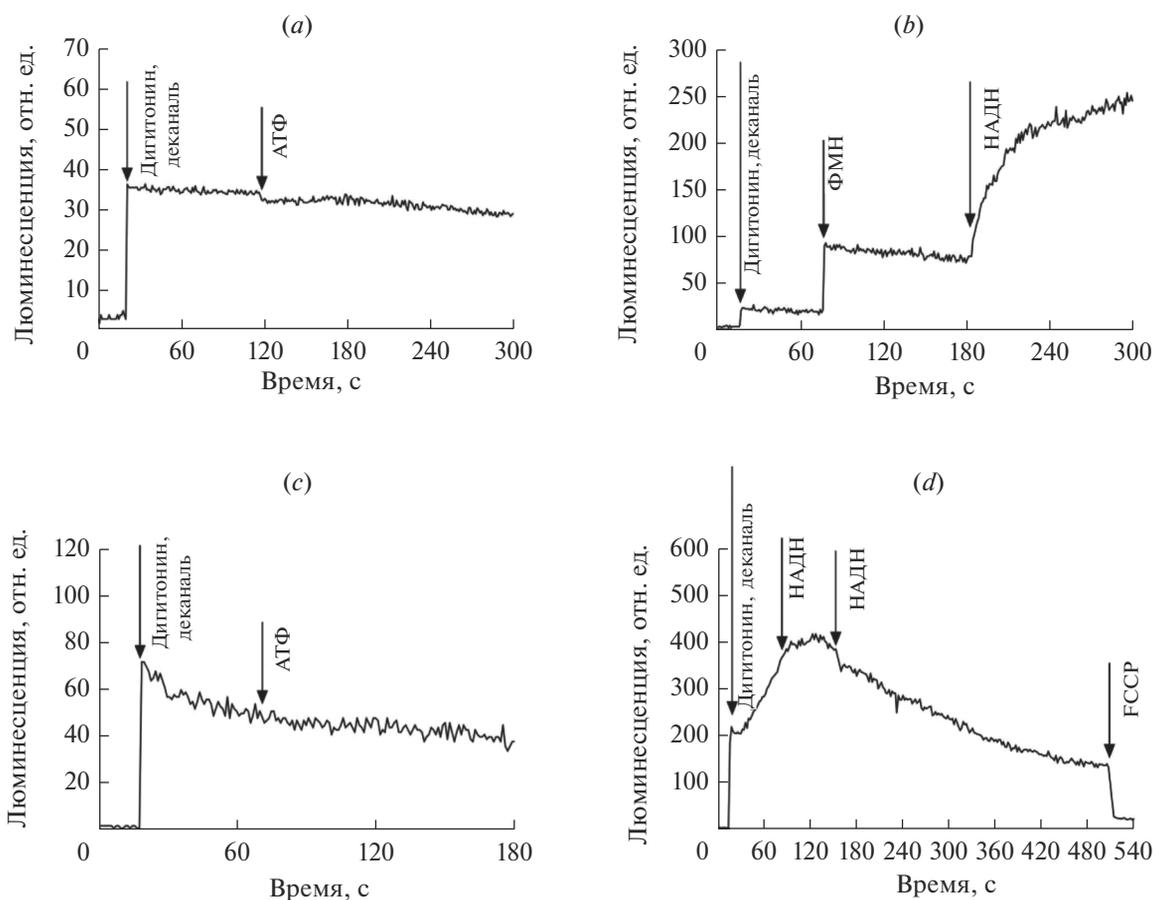
Таким образом, в экспериментах с использованием эукариотических клеток HEK293T, трансфицированных плазмидной конструкцией pcDNA3.1-4×MTS-Dendra2, показано, что лидерный пептид 4×MTS позволяет эффективно экспрессировать гетерологичные белки в матриксе митохондрий. Именно этот вариант лидерной последовательности далее использован нами для направления люцифераз светлячка и бактерий в митохондриальный матрикс эукариотических клеток.

### *Люминесценция клеток HEK293T*

Возможность применения эукариотических клеток в качестве биосенсоров для исследования молекул, влияющих на пул макроэнергетических соединений и восстановительных эквивалентов клеток, продемонстрирована с использованием НАДН, ФМН и АТФ. Гликозид дигитонин использовали в качестве детергента для нарушения целостности внешней мембраны клетки – с целью добиться ее проницаемости для этих соединений.

На рис. 2 представлены результаты анализа люминесценции клеток с генами бактериальной люциферазы с цитоплазматической или митохондриальной локализацией. Разобшитель дыхания FCCP (20 мкМ) добавляли к клеткам вместе с плазмидой pLuxAB-frp(mito) – с целью оценить степень сопряжения дыхательной цепи и окислительного фосфорилирования и эффективность продукции АТФ в присутствии НАДН и ФМН, добавленных к клеткам.

Как видно из приведенных данных, клетки HEK293T, трансфицированные плазмидными конструкциями pLuxAB-frp(mito) и pLuxAB-frp(cyto),



**Рис. 2.** Люминесценция клеток НЕК293Т, содержащих плазмиду, экспрессирующую ген *luxAB* люциферазы бактерий. Представлены графики изменения во времени интенсивности люминесценции клеток с плазмидой pLuxAB-frp(cyto), экспрессирующей люциферазу с цитоплазматической локализацией (a, b), или с плазмидой pLuxAB-frp(mito), экспрессирующей целевой белок с митохондриальной локализацией (c, d). В процессе измерений ко всем клеткам добавляли дигитонин и деканаль, а также АТФ (a, c) или ФМН, НАДН (b) и FCCP (d). Приведены типичные графики, построенные на основании трех повторов в одном эксперименте.

**Fig. 2.** Analysis of luminescence in HEK293T cells containing a plasmid expressing the bacterial luciferase gene *luxAB*. The time-dependent changes of luminescence intensity for cells containing the pLuxAB-frp(cyto) plasmid expressing cytoplasmically localized luciferase (a, b) or the pLuxAB-frp(mito) plasmid expressing the target protein with mitochondrial localization (c, d) are shown. During measurements, digitonin and decanal, as well as ATP (a, c) or FMN, NADH (b), and FCCP (d), were added to all cells. Representative graphs based on three replicates in a single experiment are provided.

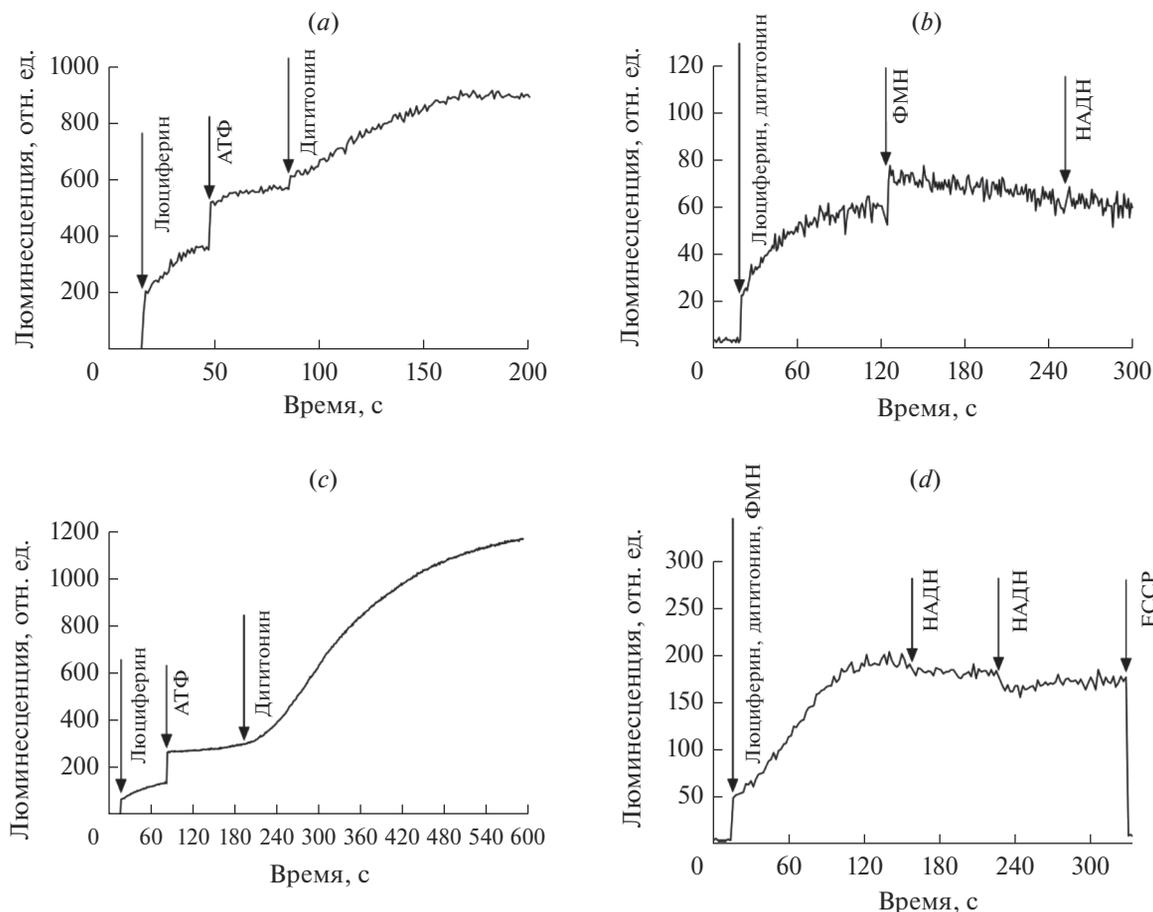
реагируют увеличением люминесценции при добавлении в среду НАДН и ФМН, но не АТФ. Следует отметить, что клетки с цитоплазматической локализацией люциферазы отвечают на добавление НАДН и ФМН более резко, с большей амплитудой, чем таковые с митохондриальной локализацией фермента.

На рис. 3 представлены измерения люминесценции клеток с *lux*-геном *L. mingrelica*, кодирующим люциферазу с цитоплазматической и митохондриальной локализацией.

Как видно из рис. 3, клетки, экспрессирующие ген люциферазы светлячка, реагируют усилением люминесценции на добавление АТФ, но не НАДН и ФМН. Отметим, что в экспериментах с разобщителем (рис. 3d) люминесценция практически пол-

ностью определяется работой дыхательной цепи и АТФ-синтазой и не зависит от экзогенных НАДН и ФМН. В то же время, как видно из данных, представленных на рис. 3c, экзогенный АТФ, проникающий в митохондрии после воздействия дигитонина, стимулирует люминесценцию в несколько раз.

В проведенном исследовании мы показали принципиальную возможность детекции кинетики изменения внутриклеточного пула АТФ и восстановительных эквивалентов НАДН и ФМН с помощью набора *lux*-биосенсоров, основанных на люциферазе бактерии и люциферазе светлячка. Экспрессия люциферазы светлячка в клетках млекопитающих давно и активно используется [20, 21]. Однако добиться эффективной экспрессии бактериальной люциферазы в эукариотических клетках удалось только при использовании



**Рис. 3.** Люминесценция клеток HEK293T, содержащих плазмиду, кодирующую люциферазу светлячка. Представлены графики изменения во времени интенсивности люминесценции клеток с плазмидой pcDNA-luc(cyto), экспрессирующей люциферазу с цитоплазматической локализацией (a, b), или с плазмидой pcDNA-luc(mito), экспрессирующей целевой белок с митохондриальной локализацией (c, d). В процессе измерений ко всем клеткам добавляли дигитонин и люциферин, а также АТФ (a, c) или ФМН, НАДН (b) и FCCP (d). Приведены типичные графики, построенные на основании трех повторов в одном эксперименте.

**Fig. 3.** Analysis of luminescence in HEK293T cells containing a plasmid encoding *L. mingrelica* luciferase. The time-dependent changes of luminescence intensity for cells containing the pcDNA-luc(cyto) plasmid expressing cytoplasmically localized luciferase (a, b) or the pcDNA-luc(mito) plasmid expressing the target protein with mitochondrial localization (c, d) are presented. During measurements, digitonin and luciferin, as well as FMN, NADH (b) and FCCP (d), were added to all cells. Representative graphs based on three replicates in a single experiment are provided.

вирусных элементов типа 2A, позволяющих экспрессировать полицистронные гены [18].

Один из важных результатов, полученных нами, – впервые экспрессирован ген *luxAB*, кодирующий бактериальную люциферазу, направляемую в митохондриальный матрикс. За счет этого был получен комплекс *lux*-биосенсоров на основе люциферазы бактерии и люциферазы светлячка, локализующихся как в цитоплазме, так и в митохондриях эукариотических клеток, и применен для анализа пула восстановительных эквивалентов. Такие важные для энергетики клетки молекулы, как АТФ, НАДН и ФМН теперь можно не только определять с использованием предложенного набора люцифераз в клеточной суспензии, но также исследовать их внутриклеточное рас-

пределение. Подобные измерения возможны, потому что люцифераза светлячка использует для реакции АТФ и люциферин в качестве субстрата, в то время как бактериальная люцифераза – восстановленный ФМН и жирный альдегид. В качестве последнего мы использовали деканаль, который легко проникает через клеточную мембрану. Для эффективного восстановления ФМН внутри клетки в биосенсорную плазмиду был введен ген *fpr*, кодирующий флавинредуктазу *V. harveyi*. Так как для восстановления ФМН используется НАДН, биосенсор становится чувствительным к количеству как восстановленного флавина, так и НАДН. Следует заметить, что клетки *E. coli*, трансформированные разработанными плазмидами, способны к люминесценции так же, как и эукариотиче-

ские. Это позволит проводить сравнение реакций про- и эукариотических клеток на исследуемые биологически активные соединения.

Предложенная система *lux*-биосенсоров может быть использована для оценки эффективности генотерапии заболеваний, связанных с нарушением переноса электронов в дыхательной цепи митохондрий и синтезе АТФ. Так, А. Hanaford & S. Johnson [22] считают, что для генотерапии синдрома Ли (Leigh syndrome), обусловленного поломкой генов ядерной и митохондриальной локализации (известно более сотни вариантов), можно использовать доставку ненарушенной копии каждого гена в клетки пациента. В этом случае биосенсорная система может быть использована как детектор терапевтической эффективности генно-инженерной конструкции при восстановлении функции митохондрий.

Мы надеемся, что полученный набор эукариотических *lux*-биосенсоров найдет применение в исследованиях по биоэнергетике и при тестировании препаратов, действие которых связано с работой дыхательной цепи митохондрий и активностью АТФ-синтазы.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работы по конструированию биосенсорных плазмид и измерению люминесценции поддержана Российским научным фондом (грант № 22-14-00124); работы по проверке функциональности лидерного пептида и оценке применимости биосенсоров для тестирования препаратов выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект FSMF-2023-0010).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МАТЕРИАЛ

Электронная версия статьи содержит дополнительный материал, доступный безвозмездно на сайте: <https://sciencejournals.ru/journal/biotech/>

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bazhenov S.V., Novoyatlova U.S., Scheglova E.S., Prazdnova E.V., Mazanko M.S., Kessenikh A.G., Kononchuk O.V., Gnuchikh E.Y., Liu Y., Al Ebrahim R., Zavlilgelsky G.B., Chistyakov V.A., Manukhov I.V.* Bacterial *lux*-biosensors: constructing, applications, and prospects. *Biosens. Bioelectron.*: X, 2023, 13, 100323. <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2023.100323>
2. *Cheng Vollmer A., Van Dyk T.K.* Stress responsive bacteria: biosensors as environmental monitors. *Adv. Microb. Physiol.*, 2004, 49, 131–174. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(04\)49003-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(04)49003-1)
3. *Havrychenko Y.Y., Katsev A.M., Safronyuk S.L., Vashisht D.* The applicability of bioluminescent bacteria for preliminary screening of antibacterial activity: comparative analysis of aqueous and ethanol extracts from plant raw material. *Acta Pharm. Sci.*, 2024, 62(2), 355–372. <https://doi.org/10.23893/1307-2080.APS6223>
4. *Khmelevtsova L., Klimova M., Karchava S., Azhogina T., Polienko E., Litsevich A., Chernyshenko E., Khammami M., Sazykin I., Sazykina M.* Biosensor-based assessment of pesticides and mineral fertilizers' influence on ecotoxicological parameters of soils under soya, sunflower and wheat. *Chemosensors*, 2024, 12(5), 73. <https://doi.org/10.3390/chemosensors12050073>
5. *Kotova V.Y., Manukhov I. V., Zavlilgelskii G.B.* *Lux*-biosensors for detection of SOS-response, heat shock, and oxidative stress. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2010, 46(8), 781–788. <https://doi.org/10.1134/S0003683810080089>
6. *Kessenikh A., Gnuchikh E., Bazhenov S., Bermeshev M., Pevgov V., Samoilo V., Shorunov S., Maksimov A., Yaguzhinsky L., Manukhov I.* Genotoxic effect of 2,2'-bis(bicyclo[2.2.1] heptane) on bacterial cells. *PLoS One*, 2020, 15(8), e0228525. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228525>
7. *Marsova M., Abilev S., Poluektova E., Danilenko V.* A bioluminescent test system reveals valuable antioxidant properties of *Lactobacillus* strains from human microbiota. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2018, 34, 27. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2410-2>
8. *Горянин И.И., Котова В.Ю., Краснопеева Е.Д., Чубуков П.А., Балабанов В.П., Пустовойт К.С., Чалкин С.Ф., Шатров Я.Т., Завильгельский Г.Б., Манухов И.В.* Определение генотоксического действия 1,1-диметилгидразина алкилирующими соединениями, возникающими при его окислении, и перекисью водорода. *Труды МФТИ*, 2013, 5(1), 103–111.
9. *Gnuchikh E., Baranova A., Schukina V., Khaliullin I., Zavlilgelsky G., Manukhov I.* Kinetics of the thermal inactivation and the refolding of bacterial luciferases in *Bacillus subtilis* and in *Escherichia coli* differ. *PLoS One*, 2019, 14(12), e0226576. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226576>
10. *Schröder H., Langer T., Hartl F.U., Bukau B.* DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *EMBO J.*, 1993, 12(11), 4137–4144. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb06097.x>
11. *Zavlilgelsky G.B., Kotova V.Yu., Mazhul' M.M., Manukhov I.V.* Role of Hsp70 (DnaK-DnaJ-GrpE) and Hsp100 (ClpA and ClpB) chaperones in refolding and increased thermal stability of bacterial luciferases in *Escherichia coli* cells. *Biochemistry (Mosc.)*, 2002, 67(9), 986–992. <https://doi.org/10.1023/a:1020565701210>
12. *Danilov V.S., Ismailov A.D.* Bacterial luciferase as a biosensor of biologically active compounds. *Biotechnology*, 1989, 11, 39–78.
13. *Nazarov P.A., Khrulnova S.A., Kessenikh A.G., Novoyatlova U.S., Kuznetsova S.B., Bazhenov S.V., Sorochkina A.I., Karakozova M.V., Manukhov I.V.* Observation of cytotoxicity of phosphonium derivatives is explained: metabolism inhibition and adhesion alteration. *Antibiotics*

- (Basel), 2023, 12(4), 720.  
<https://doi.org/10.3390/antibiotics12040720>
14. Gibson D.G., Young L., Chuang R.Y., Venter J.C., Hutchison C.A., Smith H.O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods*, 2009, 6(5), 343–345.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
  15. Tkatch T., Greotti E., Baranauskas G., Pendin D., Roy S., Nita L.I., Wettmarshausen J., Prigge M., Yizhar O., Shirihai O.S., Fishman D., Hershfield M., Fleidervish I.A., Perocchi F., Pozzan T., Sekler I. Optogenetic control of mitochondrial metabolism and Ca<sup>2+</sup> signaling by mitochondria-targeted opsins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2017, 114(26), E5167–E5176.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1703623114>
  16. Bogorodskiy A., Okhrimenko I., Maslov I., Maliar N., Burkatovskii D., von Ameln F., Schulga A., Jakobs P., Altschmied J., Haendeler J., Katranidis A., Sorokin I., Mishin A., Gordeliy V., Büldt G., Voos W., Gensch T., Borschhevskiy V. Accessing mitochondrial protein import in living cells by protein microinjection. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2021, 9, 698658.  
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.698658>
  17. Кокшаров М.И., Угарова Н.Н. Случайный мутагенез люциферазы светляков *Luciola mingrelica*. Мутантные формы фермента, спектры биолюминесценции которых малочувствительны к изменению рН. *Биохимия*, 2008, 73(8), 1071–1080.
  18. Szymczak A.L., Vignali D.A. Development of 2A peptide-based strategies in the design of multicistronic vectors. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2005, 5(5), 627–638.  
<https://doi.org/10.1517/14712598.5.5.627>
  19. Xu T., Ripp S., Saylor G.S., Close D.M. Expression of a humanized viral 2A-mediated lux operon efficiently generates autonomous bioluminescence in human cells. *PLoS One*, 2014, 9(5), e96347.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096347>
  20. Pazzagli M., Devine J.H., Peterson D.O., Baldwin T.O. Use of bacterial and firefly luciferases as reporter genes in DEAE-dextran-mediated transfection of mammalian cells. *Anal. Biochem.*, 1992, 204(2), 315–323.  
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90245-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90245-3)
  21. Tinikul R., Thotsaporn K., Thaveekarn W., Jitrapakdee S., Chaiyen P. The fusion *Vibrio campbellii* luciferase as a eukaryotic gene reporter. *J. Biotechnol.*, 2012, 162(2–3), 346–353.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.08.018>
  22. Hanaford A., Johnson S.C. The immune system as a driver of mitochondrial disease pathogenesis: a review of evidence. *Orphanet J. Rare Dis.*, 2022, 17(1), 335.  
<https://doi.org/10.1186/s13023-022-02495-3>

## **Lux-Biosensors for Analyzing the Intracellular Pool of Macroergic Compounds and Reducing Equivalents**

**R. N. Al Ebrahim<sup>a</sup>, S. V. Bazhenov<sup>a, b</sup>, M. Yu. Vyssokikh<sup>c, d</sup>, Y. E. Liu<sup>a</sup>,  
A. D. Vlasova<sup>a</sup>, S. M. Bukhalovich<sup>a</sup>, and I. V. Manukhov<sup>a, #</sup>**

<sup>a</sup>*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow oblast, 141701 Russia*

<sup>b</sup>*Laboratory of Microbiology, BIOTECH University, Moscow, 125080 Russia*

<sup>c</sup>*A.N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, M.V. Lomonosov State University, Moscow, 119992 Russia*

<sup>d</sup>*National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after academician V.I. Kulakov, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, 117997 Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: manukhovi@mail.ru*

**Abstract**—At present, biosensor tools for analyzing intracellular energy processes are actively being developed. In this work, a set of plasmid constructs with luciferase genes from *Luciola mingrelica* and *Photobacterium luminescens* was proposed for obtaining biosensor cells based on bacteria and eukaryotes. The possibility of targeted expression of luciferase both in the cytoplasm and in the mitochondrial matrix was realized due to the use of signal sequences. It was shown that the resulting biosensors are applicable for the analysis of the cell pool of macroergic compounds and reducing equivalents, such as ATP, NADH and flavin mononucleotide (FMN). We hope that this tool will be in demand for the analysis of the activity of intracellular chaperones, as well as toxicological and other investigations.

**Keywords:** biosensors, plasmid, ATP, NADH, flavin mononucleotide