БИОФИЗИКА, 2024, том 69, № 3, с. 565–573

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 577.332.23

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЛЮЦИФЕРАЗЫ СВЕТЛЯКА *L. mingrelica* ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЙСТВИЯ ГЕНТАМИЦИНА НА ЖИВЫЕ КЛЕТКИ *E. coli*

© 2024 г. Г.Ю. Ломакина*,#, С.С. Каминская*, **, Н.Н. Угарова*

**Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/3, Москва, 119991, Россия*

***Факультет фундаментальных наук Московского государственного технического университета имени Н.Э. Баумана, 2-ая Бауманская ул., 5/1, Москва, 105005, Россия*

#E-mail: lomakinagalina@yahoo.com

Поступила в редакцию 29.02.2024 г.
После доработки 02.05.2024 г.
Принята к публикации 08.05.2024 г.

Продемонстрированы возможности использования тест-системы на основе живых клеток *E. coli* BL-21 (DE3) Codon Plus, экспрессирующих pH-резистентную термостабильную люциферазу светляка *Luciola mingrelica* для изучения кинетики действия аминогликозидов (на примере гентамицина) по изменению содержания АТФ и люциферазы внутри и вне клеток. Показано, что через 3 ч инкубации бактерий с антибиотиком становится возможным оценить изменение жизнеспособности клеток, эффективность действия антибиотика и прогнозировать образование персистеров. Метод перспективен при проведении быстрого первичного высокопроизводительного скрининга антибактериальных агентов и лекарственных форм для оценки их эффективности и механизма их действия.

Ключевые слова: люцифераза светляков, биолюминесценция, аминогликозиды, гентамицин, E. coli.

DOI: 10.31857/S0006302924030138, **EDN:** OEYVCA

Биолюминесцентная люциферин-люциферазная реакция окисления D-люциферина кислородом в присутствии АТФ и ионов магния, катализируемая люциферазой светляков, предоставляет широкие возможности ее использования в биоаналитической химии, не только для определения ультрамалых количеств АТФ [1], но и люциферазы [2, 3].

Биолюминесцентные тест-системы на основе живых прокариотических и эукариотических клеток, продуцирующих мутантную термостабильную люциферазу светляков *L. mingrelica*, перспективны для изучения влияния и быстрой оценки эффективности действия лекарственных средств и изучения функционирования организмов при физиологических условиях в условиях клеточного стресса различной природы, позволяют параллельно изучать кинетику изменения двух биолюминесцентных маркеров – АТФ и люциферазы – внутри и вне клеток [4]. Примеры использования тест-системы для мониторинга клеточного гомеостаза под воздействием внешних стимулов физической и химической природы на живые клетки (прокариоты и эукариоты) приведены в работе [5]. Это удобная, быстрая и надежная модель для изучения эффективности и механизма действия антибактериальных агентов разных классов, поскольку большинство традиционных антибиотиков разрушают АТФ-зависимые мишени. Изучение кинетики изменения концентрации АТФ и люциферазы позволяет определять жизнеспособность, метаболическую активность, цитотоксичность, выживаемость клеток в условиях клеточного стресса, оценивать эффективность литических агентов по изменению проницаемости клеточной мембраны, наблюдать за процессами синтеза/гидролиза АТФ, выявлять стадии образования персистеров и формирования толерантности к антибиотикам. Ранее мы показали возможность использования тест-системы для изучения механизма действия мембрано-активного полипептидного поликатиона колистина [6] и продемонстрировали, что полимиксины вызывают резкое истощение внутриклеточного АТФ за счет остановки его синтеза и

утилизации внутри клетки, что приводит к ее быстрой гибели [4].

Аминогликозидные антибиотики широко используются для лечения многих грамотрицательных и некоторых грамположительных инфекций, а также туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью из-за их высокой эффективности и низкой стоимости. Аминогликозиды состоят из 2-дезоксистрептаминового кольца, к которому присоединены два или более аминомодифицированных сахаров через гликозидные связи. Их мощная бактерицидная активность основана на специфическом связывании с 16S рРНК 30S рибосомальной субъединицы, препятствующем синтезу белка [7]. Проникновение аминогликозидов в цитоплазму происходит в три этапа [8, 9]. На первой энергонезависимой стадии (first energy-dependent phase – EDP-1) поликатионные антибиотики в результате ионных взаимодействий быстро связываются с анионными компонентами клеточной поверхности (липополисахариды, фосфолипиды и белки внешней мембраны) грамотрицательных бактерий, в результате чего происходит вытеснение двухвалентных катионов, образующих поперечные мостики с соседними молекулами липополисахарида. Это приводит к увеличению проницаемости мембраны и проникновению молекул аминогликозида в периплазматическое пространство [10] и затем в цитоплазму посредством механизмов, зависящих от протондвижущей силы, вызывая ошибки в синтезе белка. Данная стадия требует активно функционирующей системы переноса электронов, поэтому анаэробные бактерии, как правило, нечувствительны к этим антибиотикам [11]. Неправильно транслируемые мембранные белки вызывают нарушение целостности цитоплазматической мембраны, вызывая следующий этап, известный как «энергозависимая фаза II» (second energy-dependent phase – EDP-2), что приводит к поглощению большего количества аминогликозида и в конечном итоге к гибели клетки [12]. Вторая энергозависимая фаза (EDP-2) протекает быстрее, чем первая (EDP-1), и требует связывания с рибосомами. Наступление этой фазы соответствует началу ингибирования синтеза белка и потере жизнеспособности клеток. Во время первой фазы поглощения особенно важна протондвижущая сила [13], величина которой определяется эффективностью функционирования дыхательных комплексов – чем выше их активность, тем выше уровень протондвижущей силы, тогда как вторая фаза возникает в ответ на дефектную трансляцию. При снижении энергетического выхода используемой дыхательной цепи наблюдается увеличение степени выживаемости микроорганизмов в присутствии антибиотика [14] и образование персистеров.

Можно ожидать, что изучение кинетики изменения низкомолекулярного маркера АТФ и высокомолекулярной люциферазы позволит оценить процессы, протекающие во времени при действии аминогликозидов на клетки *E. coli*, такие как скорость гибели клетки, влияние на синтез белка и функционирование рибосом, изменение проницаемости клеточной мембраны, способность к образованию персистеров, а также быстро определить минимальную ингибирующую концентрацию антибиотика.

Целью данной работы является изучение кинетики изменения содержания АТФ и люциферазы внутри и вне клеток *E. coli* в присутствии различных концентраций гентамицина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве модельной культуры использовали штамм *E. coli* BL-21 (DE3) Codon Plus (Novagen, США), продуцирующий pH-резистентную термостабильную люциферазу светляков *Luciola mingrelica*. Ночную культуру получали в 3 мл лизогенной среды Luria-Bertani (LB) при 37°C и 230 об/мин в течение 17–18 ч в шейкере-инкубаторе ES-20 (Biosan, Латвия); A_{590} составляла 1.5 ± 0.1. Суспензию клеток разбавляли свежей средой LB до нужной концентрации. 100 мкл раствора гентамицина сульфата в 0.9% физиологическом растворе или физиологический раствор (контроль) добавляли к 800 мкл суспензии клеток. Конечная концентрация гентамицина в реакционной смеси составляла 0.011–71 мкг/мл. Образцы инкубировали в аэрированных условиях при 37°C с орбитальным встряхиванием при 230 об/мин в течение 4 ч в 24-луночных планшетах. В процессе инкубации отбирали пробы для измерения содержания АТФ и активности люциферазы внутри и вне клеток [4].

Через 4 ч инкубации с антибиотиком клеточную культуру центрифугировали при 1000 об/мин в течение 7 мин, отделяли супернатант, содержащий антибиотик, а осадок ресуспендировали в 800 мкл свежей питательной среды LB. Полученную клеточную суспензию инкубировали при перемешивании (18 ч, 37°C, 230 об/мин). Для определения КОЕ методом посевов разведений на агаризованной LB среде (5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л триптона и 10 г/л NaCl, 11 г/л агара) отбирали пробы до добавления антибиотика, сразу после удаления антибиотика и через 18 ч инкубации в среде LB, инкубировали 20 ч при 37°C и подсчитывали образовавшиеся колонии.

Для анализа АТФ использовали АТФ-реагент на основе термостабильной люциферазы светлячка *Luciola mingrelica* (ЗАО «БиоХимМак СТ», Москва, Россия) и определяли содержание АТФ вне клеток ($АТФ_{ex}$) и общее содержание АТФ

($АТФ_{tot}$), как описано в [4]. Для этого к 20 мкл образца клеток (для определения $АТР_{ex}$) или клеточного экстракта, полученного обработкой свежеперегнанным 100%-ным диметилсульфоксидом в соотношении 1:9 (v/v) (для определения $АТР_{tot}$), добавляли 100 мкл АТФ-реагента и регистрировали интенсивность свечения в течение 30 с на люминометре FB-12 (Zulux Corp., Германия), используя фильтр с пропусканием 1.25%. Содержание АТФ внутри клеток ($АТФ_{in}$) рассчитывали по разности $АТФ_{in} = АТФ_{tot} - АТФ_{ex}$. Для измерения активности люциферазы вне клеток (Luc_{ex}) использовали субстратную смесь с pH 7.8, содержащую 4 мМ АТФ, 0.3 мМ D-люциферина, 20 мМ Mg^{2+}, буферные соли и др. компоненты и регистрировали интенсивность свечения в течение 30 с. Для измерения активности люциферазы внутри клеток (Luc_{in}) использовали субстратную смесь, содержащую 2 мМ D-люциферина, 20 мМ Mg^{2+} с pH 5.0 и регистрировали интенсивность свечения в течение 60–80 с. Измерения проводили в микрокюветах вместимостью 240 мкл после добавления 100 мкл соответствующей субстратной смеси к 20 мкл неразбавленной клеточной суспензии.

Представлены средние значения трех независимых экспериментов. Статистический анализ проведен с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Статистическая значимость была определена как $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе использовали клетки *E. coli* BL-21 (DE3) Codon Plus, экспрессирующие мутантную нечувствительную к изменению pH термостабильную люциферазу светляков *L. mingrelica* [15, 16], которая позволяет инкубировать клетки при 37°C без инактивации внутриклеточного фермента. Кроме того, продуцируемая люцифераза нечувствительна к эффекту снижения внутриклеточного pH в процессе экспоненциального роста клеток *E. coli* [17]. Для определения активности люциферазы внутри клеток (Luc_{in}) мы использовали субстратную смесь при pH 5.0, при котором люциферин теряет отрицательный заряд и способен проникать внутрь клетки. Поступающий люциферин инициирует свечение, пропорциональное концентрации эндогенной люциферазы Luc_{in} благодаря тому, что в клетке существуют оптимальные условия для протекания биолюминесцентной реакции (pH ~7.6, насыщающие концентрации АТФ и ионов Mg^{2+}). При pH 5.0 внеклеточная люцифераза мгновенно инактивируется, наблюдаемая активность относится только к Luc_{in}. Для измерения активности Luc_{ex} мы использовали субстратную смесь с pH 7.8, содержащую насыщающие концентрации субстратов. При этом значении pH проницаемость клеточной мембраны не меняется – отрицательный мембранный потенциал клеточной мембраны не позволяет отрицательно заряженному люциферину проникать в клетку, и наблюдаемый биолюминесцентный сигнал соответствует активности только внеклеточной люциферазы Luc_{ex}. В отдельном эксперименте было показано, что гентамицин не влияет на активность люциферазы.

Кинетика изменения $АТФ_{in}$ и $АТФ_{ex}$. Влияние гентамицина на растущие клетки *E. coli,* продуцирующие люциферазу, изучали при начальных концентрациях клеток в 25, 131 и 233 млн КОЕ/мл в аэрированных условиях при 37°C в среде LB при орбитальном перемешивании, концентрацию антибиотика варьировали в диапазоне 0.01–0.07 мкг/мл.

Изучение кинетики изменения внутриклеточного $АТФ_{in}$ показало, что в присутствии низких концентраций антибиотика (0.1–0.6 мкг/мл реакционной смеси, см. рис. 1, кривые *4* и *5*) кривые роста клеток сопоставимы с контрольным экспериментом и через 4 ч инкубации концентрация $АТФ_{in}$ в этих образцах возросла в 12 раз.

При высоких концентрациях гентамицина (14–71 мкг/мл, кривые *1* и *2* на рис. 1) рост клеток отсутствовал – через 3.5 ч уровень $АТФ_{in}$ снизился на 10% ниже исходного и вышел на постоянное значение, что свидетельствует о снижении метаболической активности и жизнеспособности клеток и проявлении преимущественно бактерицидного действия гентамицина.

При концентрации гентамицина 2.8 мкг/мл (кривая *3*) максимальное значение $АТФ_{in}$ наблюдалось через 2 ч, клетки продолжали расти, хотя скорость деления клеток была в 1.7–4.0 раза ниже по сравнению с контролем, причем чем выше была исходная концентрация клеток, тем большее количество клеток сохранили способность к делению. Таким образом, эффективность действия гентамицина зависела от исходной концентрации клеток и, соответственно, от удельного содержания антибиотика в расчете на одну клетку. При исходной концентрации клеток 25 млн КОЕ/мл для этой концентрации антибиотика его удельное содержание в расчете на 1 клетку *E. coli* составляет 0.11 пг/КОЕ, уровень $АТФ_{in}$ практически не менялся и наблюдался бактериостатический эффект. При концентрациях клеточной суспензии 131 и 233 млн КОЕ/мл удельное содержание антибиотика уменьшилось до значений соответственно 0.02 и 0.01 пг/КОЕ и его эффективность снизилась – на начальном этапе наблюдался рост $АТФ_{in}$, клетки еще продолжали функционировать и делиться, далее уровень АТФ снижался и

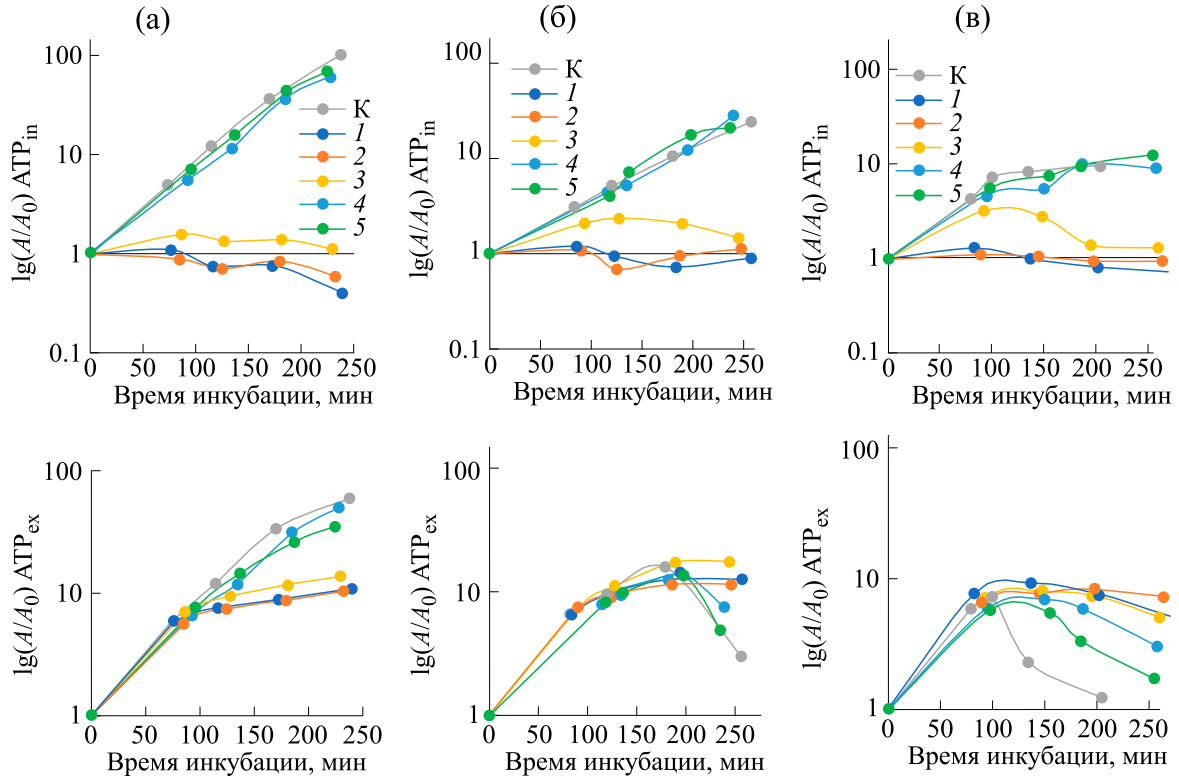

Рис. 1. Кинетика изменения концентрации $АТФ_{in}$ (верхний ряд графиков) и $АТФ_{ex}$ (нижний ряд графиков) в процессе инкубации клеток *E. coli* в присутствии гентамицина в полулогарифмических координатах. Исходная концентрация клеток, млн КОЕ/мл среды LB: 25 (а), 131 (б) и 233 (в). Концентрации гентамицина, мкг/мл: кривая *1* – 71, кривая *2* – 14, кривая *3* – 2.8, кривая *4* – 0.6, кривая *5* – 0.1, кривая «К» – 0. Условия инкубации: 37°C, 230 об/мин.

через 4 ч инкубации выходил на постоянное значение – значительная часть клеток сохранила жизнеспособность.

Уровень внеклеточного АТФ$_{ex}$ является более сложным для анализа индикатором – он характеризует протекание двух параллельных процессов – накопление внеклеточного $АТФ_{ex}$ как за счет изменения проницаемости клеточной мембраны под действием литического агента, так и в результате деления клеток, в процессе которого может происходить механическая утечка АТФ при делении клетки на две дочерние. В отсутствие гентамицина в контрольном образце наличие линейных участков $\lg A/A_0(t)$ для $АТФ_{ex}$ и $АТФ_{in}$ протяженностью не менее 100 мин, независимо от исходной концентрации клеток, свидетельствует о протекании экспоненциальной фазы роста. При этом, несмотря на наблюдаемое 10-кратное повышение уровня $АТФ_{ex}$, его доля среди общего пула АТФ ($АТФ_{tot}$) составляет не более 3%. Можно ожидать, что при нарушении проницаемости клеточной мембраны в присутствии эффектора будет наблюдаться увеличение уровня $АТФ_{ex}$.

При достижении насыщающей концентрации клетки перестают делиться, и наблюдается переход в стационарную фазу – уровень $АТФ_{ex}$ снижается, что связано, по-видимому, с изменением состава культуральной жидкости и pH среды в процессе деления и роста клеток. Чем выше активность микроорганизма, тем раньше меняются физико-химические показатели среды, в результате чего скорость гидролиза внеклеточного $АТФ_{ex}$ увеличивается. Этот эффект особенно заметен при высокой концентрации клеток (233 млн КОЕ/мл, см. рис. 1в).

Таким образом, аналитическим показателем эффективности действия антибиотика является отсутствие снижения $АТФ_{ex}$ через 3–4 ч инкубации, свидетельствующее, как минимум, о бактериостатическом действии антибиотика – деление клеток не происходит и как следствие, состав инкубационной среды не изменяется.

Баланс по АТФ ($АТФ_{tot}$, $АТФ_{in}$ и $АТФ_{ex}$) приведен в качестве примера для высокой концентрации гентамицина (71 мкг/мл) при различных концентрациях клеток (см. рис. 2).

Через 1 ч инкубации наблюдается незначительное увеличение исходного уровня $АТФ_{in}$, соответствующее стадии взаимодействия гентамицина с компонентами клеточной поверхности,

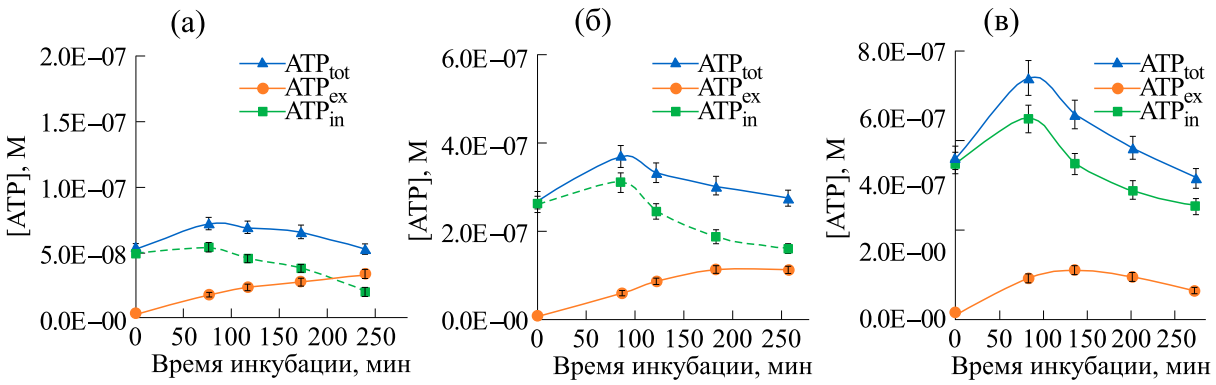

Рис. 2. Кинетика изменения концентрации $АТФ_{tot}$, $АТФ_{in}$ и $АТФ_{ex}$ в процессе инкубации клеток *E. coli* с гентамицином (71 мкг/мл). Начальные концентрации клеток, млн КОЕ/мл среды LB: 25 (а), 131 (б) и 233 (в). Условия инкубации: 37°C, 230 об/мин.

диффузии внутрь клетки и связывания с мишенью, что, по-видимому, отражает протекание стадии EDP-1. Действительно, известно, что поглощение аминогликозидов клетками протекает быстро и эффективно – по данным авторов работы [9], через 60 мин при средней концентрации 2.0 мкг/мл в питательной среде соотношение внутриклеточного и внеклеточного гентамицина составляет примерно 1500:1. Можно ожидать, что к этому моменту практически весь антибиотик находится в клетках. Как видно, гентамицин не влияет на АТФазную активность, фермент продолжает функционировать и синтезирующийся АТФ расходуется на адаптацию и выживаемость в присутствии химического стрессора. На этом этапе средняя скорость накопления $АТФ_{ex}$, в отличие от скорости накопления $АТФ_{in}$, слабо зависит от концентрации гентамицина (см. рис. 3) и концентрации клеточной суспензии.

Через 80 мин АТФ-синтазы не способны компенсировать потери АТФ, и наблюдается плавное снижение уровня $АТФ_{in}$ во многом за счет его транспорта из поврежденных клеток (стадия EDP-2). Через 4 ч инкубации с гентамицином уровень $АТФ_{in}$ снизился в 1.3–2.5 раза ниже исходного в зависимости от концентрации клеток, и наблюдалось преимущественно бактерицидное действие гентамицина. Таким образом, изучение кинетики распределения АТФ внутри и вне клеток позволяет сделать выводы о степени бактерицидного/бактериостатического действия агента, наблюдать не только за гибелью клеток во времени, но и образованием персистеров.

Кинетика изменения Luc_{in} и Luc_{ex}. *Анализ кинетических кривых Luc_{in}* показал, что в области низких концентраций гентамицина (0.1–0.6 мкг/мл) и контрольном образце (рис. 4, кривые *4*, *5* и K) начальная скорость синтеза фермента практически одинакова, однако через 2 ч инкубации в присутствии гентамицина синтез люциферазы замедляется. Рост люциферазной активности свидетельствует о сохранении в образце большого количества метаболически активных клеток, способных к делению. Действительно, результаты определения АТФ внутри и вне клетки (см. рис. 1) полностью повторяют эту картину, кривые на-

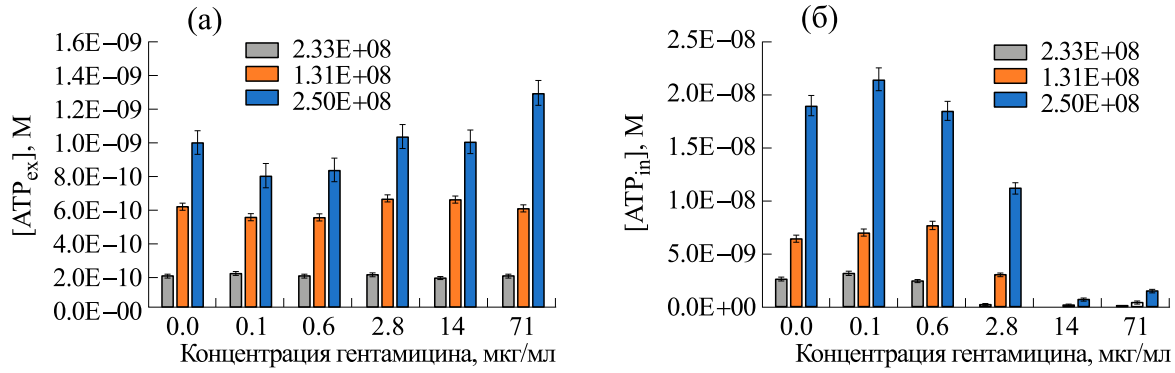

Рис. 3. Зависимость средних начальных скоростей изменения концентрации $АТФ_{ex}$ (а) и $АТФ_{in}$ (б) от концентрации гентамицина при различных концентрациях клеточной суспензии *E. coli* (25, 131 и 233 млн КОЕ/мл).

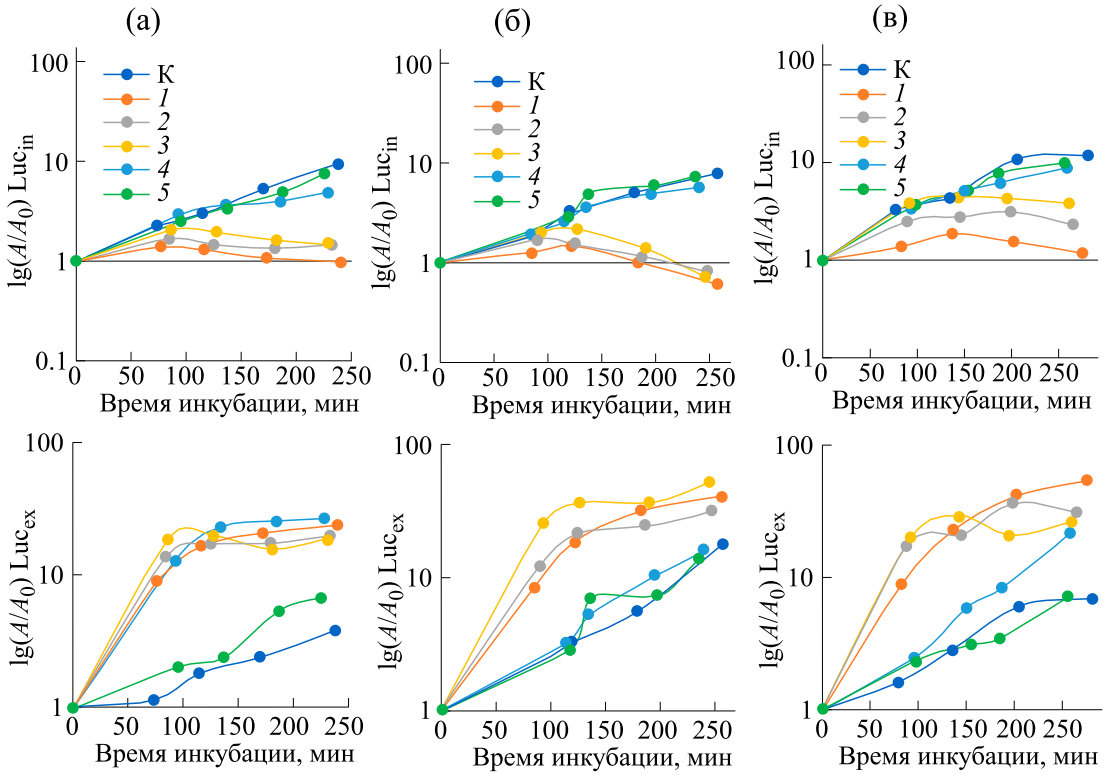

Рис. 4. Кинетика изменения относительной активности Luc_{in} (верхний ряд графиков) и Luc_{ex} (нижний ряд графиков) в процессе инкубации клеток *E. coli* в присутствии гентамицина в полулогарифмических координатах. Исходная концентрация клеток, млн КОЕ/мл среды LB: 25 (а), 131 (б) и 233 (в). Концентрации гентамицина, мкг/мл: кривая *1* – 71, кривая *2* – 14, кривая *3* – 2.8, кривая *4* – 0.6, кривая *5* – 0.1, кривая «К» – 0. Условия инкубации: 37°С, 230 об/мин.

копления $АТФ_{in}$ практически не отличаются от контроля. Очевидно, что указанные концентрации антибиотика лежат ниже минимальной ингибирующей концентрации.

В области высоких концентраций антибиотика (2.8–71 мкг/мл) уже на начальном этапе проявляется ингибирующее действие гентамицина на рибосомы – скорость синтеза активной Luc_{in} снижается по сравнению с контролем (кривые *1*–*3*). Через 80 мин наблюдается максимум Luc_{in}, величина которого зависит от концентрации добавленного агента, с последующим дальнейшим снижением активности Luc_{in}, что подтверждает данные, полученные для $АТФ_{in}$, об отсутствии деления клеток и их гибели.

Накопление внеклеточной люциферазы Luc_{ex} происходит в результате деления клеток, а также свидетельствует о протекании необратимых изменений мембраны и увеличении доступности эндогенного фермента в результате действия гентамицина. При делении клеток лишь малая часть люциферазы попадает во внеклеточное пространство – в контрольном образце наблюдается незначительное накопление Luc_{ex}, уровень биолюминесцентного сигнала, характеризующего активность фермента, вырос всего с 0.5 до 2000 RLU, что согласуется с данными для $АТФ_{ex}$, в то время как сигнал для Luc_{in} за 250 мин увеличился существенно больше – с 7 до 240000. При малых концентрациях антибиотика сохраняется схожая картина, его присутствие не отражается на функционировании клеток – они продолжают делиться и синтезировать люциферазу. При высоких концентрациях наблюдается значительное увеличение скорости накопления Luc_{ex}, которая более чем на порядок превышает скорость накопления Luc_{in}, что связано с необратимым повреждением клеточной мембраны, за которую отвечает вторая энергозависимая фаза EDP-2, в процессе которой происходит связывание гентамицина с рибосомами [9, 11]. Наступление этой фазы соответствует началу ингибирования синтеза белка и потере жизнеспособности клеток [8, 11].

Таким образом, внутриклеточная люцифераза может служить стабильным высокомолекулярным маркером скорости трансляции и проницаемости клеточной мембраны.

Определение минимальной ингибирующей концентрации гентамицина. Минимальную ингибирующую концентрацию гентамицина рассчитывали

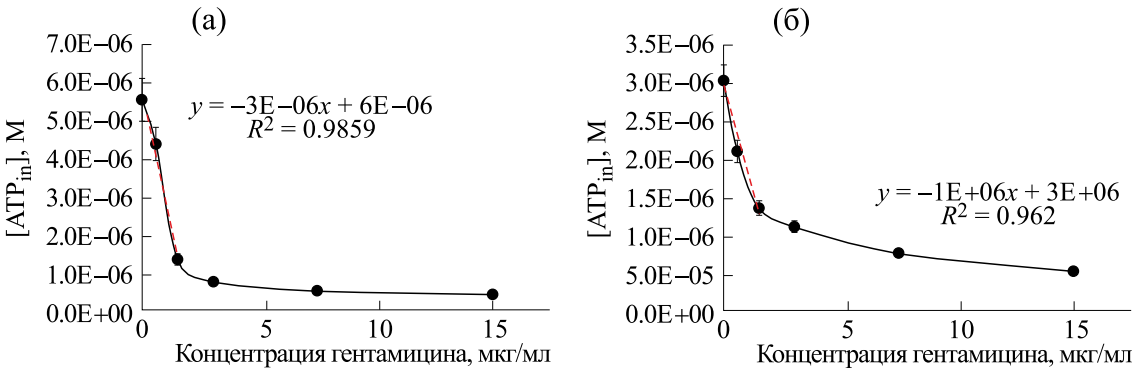

Рис. 5. Зависимость концентрации АТФ$_{in}$ (а) и величины биолюминесцентного сигнала для Luc$_{in}$ (б) от концентрации гентамицина через 180 мин инкубации. Исходная концентрация клеточной суспензии *E. coli* – 200 млн КОЕ/мл. Условия инкубации: 37°C, 230 об/мин.

по начальному линейному участку графиков зависимости концентрации АТФ$_{in}$ (рис. 5а) и активности Luc$_{in}$ (рис. 5б) от концентрации гентамицина через 180 мин инкубации клеток с антибиотиком, по АТФ она составила 3 мкг/мл, по Luc$_{in}$ – 2 мкг/мл. Эти результаты находятся в соответствии с литературными данными [14], где минимальная ингибирующая концентрация гентамицина для штаммов *E. coli* дикого типа составила 2 мкг/мл. Таким образом, люцифераза является чувствительным индикатором функционирования рибосом – мишени действия гентамицина, поскольку синтез фермента напрямую зависит от их активности, в то время как изменение АТФ$_{in}$ является результатом многих разнонаправленных внутриклеточных процессов и отвечает за суммарную жизнеспособность клетки в целом.

Функционирование клеток *E. coli* после отделения антибиотика. Образцы клеток (концентрация гентамицина 71, 2.8 и 0.1 мкг/мл), обработанные гентамицином в течение 4 ч, центрифугировали для отделения антибиотика, помещали в свежую питательную среду LB, инкубировали 18 ч (37°C, 230 об/мин) и анализировали на содержание АТФ$_{in}$ и Luc$_{in}$ по стандартной схеме. Сравнение АТФ$_{in}$ и Luc$_{in}$ до отделения гентамицина (через 4 ч инкубации) и после (через 18 ч) представлено на рис. 6. Как видно, при инкубации образца с высокой концентрацией гентамицина (71 мкг/мл), где после обработки гентамицином наблюдалось снижение АТФ$_{in}$ ниже исходного уровня, после отделения антибиотика содержание АТФ снизилось в 5 раз, клетки утратили жизнеспособность, гибель клеток продолжилась, деление клеток не возобновилось. В образце с низкой концентрацией гентамицина (0.1 мкг/мл), где погибло ~25% клеток, этой концентрации оказалось недостаточно для массовой гибели клеток, остальные продолжили функционировать и возобновили деление. В образце с концентрацией гентамицина 2.8 мкг/мл 10% клеток сохранили способность к делению и после отделения анти-

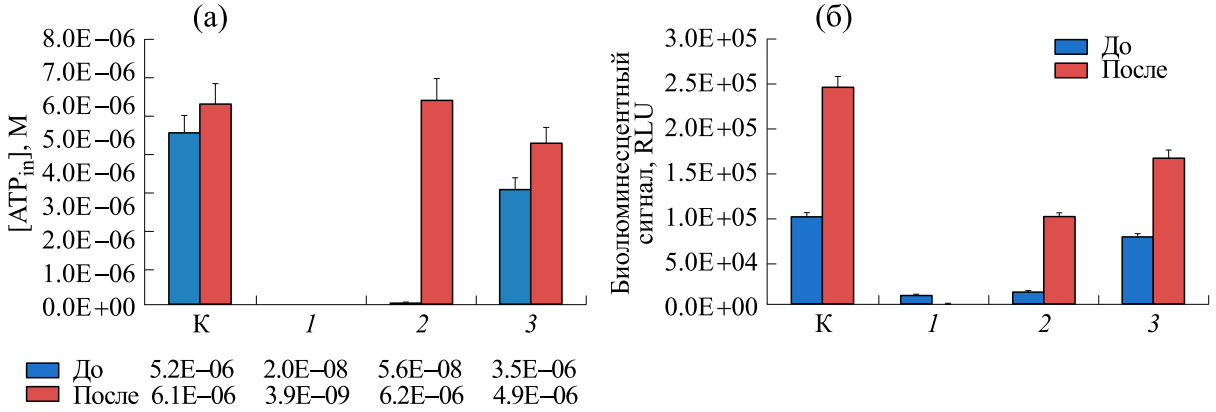

Рис. 6. Концентрации АТФ$_{in}$ (а) и величины биолюминесцентного сигнала для Luc$_{in}$ (б) до (через 4 ч инкубации с гентамицином) и после отделения гентамицина и инкубации в жидкой питательной среде LB, 18 ч, 37°C, 230 об/мин. Концентрации гентамицина, мкг/мл: *1* – 71, *2* – 2.8, *3* – 0.1, «К» – 0.

биотика наблюдалось бурное деление выживших клеток – наличие гентамицина внутри клетки не мешало росту популяции и возобновлению синтеза люциферазы. Таким образом, эффективность действия аминогликозида зависит от его насыщающей концентрации внутри клетки. При низких концентрациях антибиотика он титрует только часть большого числа рибосом и клетки продолжают функционировать. При более высоких концентрациях происходит ингибирование большинства рибосом и синтез белка нарушается. Эти данные подтверждают результаты, полученные для Luc_{in} – в образце *1* люциферазная активность отсутствовала, в контроле и образцах *2* и *3* люциферазная активность внутри клетки увеличилась более чем в 2 раза, что согласуется с данными о росте $АТФ_{in}$ – клетки метаболически активны и синтезирующийся АТФ расходуется на функционирование рибосом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы показали возможность использования тест-системы на основе живых клеток *E. coli*, продуцирующих термостабильную pH-нечувствительную люциферазу светляков для изучения эффективности действия аминогликозидов. В присутствии аминогликозидов не наблюдалось снижения $АТФ_{in}$ до нулевых значений, остаточное содержание свидетельствует о сохранении клетками жизнеспособности и способности к делению (образование персистеров); увеличение $АТФ_{ex}$ и Luc_{ex} свидетельствует о необратимых повреждениях клеточной мембраны, изменение скорости синтеза Luc_{in} является прямым маркером функционирования рибосом, которые являются мишенью действия аминогликозидов и в, конечном итоге, жизнеспособности клеточной популяции.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова (тема № 121041500039-8).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lomakina G. Y., Modestova Y., and Ugarova N. N. Bioluminescence assay for cell viability. *Biochemistry (Moscow)*, **80** (6), 701–713 (2015). DOI: 10.1134/s0006297915060061
2. Lomakina G. Y., Fomina A. D., and Ugarova N. N. Kinetics of interaction of digitonin and its analogues with HEK293 cells studied by the bioluminescence method. *Moscow Univer. Chem. Bull.*, **75** (3), 186–194 (2020). DOI: 10.3103/S0027131420030086
3. Lomakina G. Y. and Ugarova N. N. *Luciola mingrelica* firefly luciferase as a marker in bioluminescent immunoassays. *Biophys. Rev.,* **15**, 955–962 (2023), DOI: 0.1007/s12551-023-01115-z
4. Lomakina G. Y., Ugarova N. N. Application of bioluminescent methods to study the effect of the membrane-active antibiotic colistin on bacterial cells. *Photochem. Photobiol.*, **98** (5), 1077–1083 (2022). DOI: 10.1111/php.13606
5. Lomakina G. Yu., Ugarova N. N. Bioluminescent test systems based on firefly luciferase for studying stress effects on living cells. *Biophys. Rev.*, **14**, 887–892 (2022). DOI: 10.1007/s12551-022-00978-y
6. Lomakina G. Y. and Ugarova N. N. Kinetics of the inter-action of colistin with live Escherichia coli cells by the bioluminescence method. *Moscow Univer. Chem. Bull.,* **77** (1), 42–47 (2022). DOI: 10.3103/S0027131422010059
7. Garneau-Tsodikova S. and Labby K. J. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. *Med. Chem. Comm.*, **7** (1), 11–27 (2016). DOI: 10.1039/C5MD00344J
8. Bryan L. E. and Van Den Elzen H. M. Gentamicin accumulation by sensitive strains of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa *J. Antibiot.* (Tokyo), **28** (9), 696–703 (1975).
9. Heller A. H., Spector R., and Aalyson M. Effect of sodium chloride on gentamicin accumulation by *Escherichia coli*: correlation with bacterial growth and viability. *J Antibiot. (Tokyo),* **33** (6), 604–613 (1980).
10. Vanhoof R., Sonck P., and Hannecart-Pokorni E. The role of lipopolysaccharide anionic binding sites in aminoglycoside uptake in *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*. *J. Antimicrob. Chemother.*, **35** (1), 167–171 (1995).
11. Bryan L. and van der Elzen H. Effects of membrane-energy mutations and cations on streptomycin and gentamicin accumulation by bacteria: a model for entry of streptomycin and gentamicin in susceptible and resistant bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **12** (2), 163–177 (1977).
12. Ramirez M. S. and Tolmasky M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat.*, **13** (6), 151–171 (2010). DOI: 10.1016/j.drup.2010.08.003
13. Eisenberg E.S., Mandel L.J., Kaback H.R., Miller M.H. 1984. Quantitative association between electrical potential across the cytoplasmic membrane and early gentamicin uptake and killing in Staphylo-

coccus aureus. *J. Bacteriol.,* **157** (3), 863–867 (1984). DOI: 10.1128/jb.157.3.863-867.1984

14. El Khoury J. Y., Zamarreño Beas J., Huguenot A., Py B., and Barras F. Bioenergetic state of escherichia coli controls aminoglycoside susceptibility. *mBio*, **14** (1), e03302-22 (2023). DOI: 10.1128/mbio.03302-22
15. Koksharov M. I. and Ugarova N. N. Thermostabilization of firefly luciferase by in vivo directed evolution. *Protein Eng. Des. Sel.,* **24** (11), 835–844 (2011). DOI: 10.1093/protein/gzr044
16. Smirnova D. V., Samsonova J. V., and Ugarova N. N. The bioluminescence resonance energy transfer from firefly luciferase to a synthetic dye and its application for the rapid homogeneous immunoassay of progesterone. *Photochem. Photobiol.,* **92** (1), 158–165 (2016). DOI: 10.1111/php.12556
17. Pu Y., Li Y., Jin X., Tian T., Ma Q., Zhao Z., Lin S. Y., Chen Z., Li B., Yao G., Leake M. C., Lo C. J., and Bai F. ATP-Dependent dynamic protein aggregation regulates bacterial dormancy depth critical for antibiotic tolerance. *Mol Cell.*, **73** (1), 143–156 (2019). DOI: 10.1016/j.molcel.2018.10.022
18. Shan Y., Brown Gandt A, Rowe S. E., Deisinger J. P., Conlon B. P., and Lewis K. ATP-Dependent persister formation in *Escherichia coli*. *mBio,* **8** (1), e02267-16 (2017). DOI: 10.1128/mBio.02267-16

Bioluminescent Test System Based on Recombinant *L. mingrelica* Firefly Luciferase as a Means of Investigating the Efficacy of Gentamicin Effect on *E. coli* Living Cells

G.Yu. Lomakina*, S.S. Kaminskaya*, **, and N.N. Ugarova*

**Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/3, Moscow, 119991 Russia*

***Department of Fundamental Sciences, N.E. Bauman Moscow State Technical University, 2-ya Baumanskaya ul. 5/1, Moscow, 105005 Russia*

This paper highlights the possibilities of applicability of a test system based on *E. coli* BL-21 Codon Plus (DE3) living cells expressing pH-tolerant thermostable *Luciola mingrelica* firefly luciferase to study the kinetic mechanism by which aminoglycosides, such as gentamicin used in this study, act taking into account changes in the ATP and firefly luciferase levels inside and outside the cells. It has been shown that it is possible to evaluate the changes in cell viability, assess the effectiveness of the antibiotic action, and predict the formation of persisters after incubation of bacteria with antibiotic for 3 hours. The method is promising for rapid primary high-throughput screening of antibacterial agents and dosage forms to assess their effectiveness and mechanism of action.

Keywords: firefly luciferase, bioluminescence, aminoglycosides, gentamicin, E. coli