

## 16S рРНК *E. coli* ЗНАЧИТЕЛЬНО СТИМУЛИРУЕТ ТРАНСЛЯЦИЮ РЕПОРТЕРНОЙ мРНК В БЕСКЛЕТОЧНОЙ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ

© 2022 г. Н.В. Зырина\*, \*\*, #, С.Ч. Агаларов\*

\*Институт белка РАН, Институтская ул., 4, Пущино Московской области, 142290, Россия

\*\*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: zyrina.nv@gmail.com

Поступила в редакцию 01.07.2022 г.

После доработки 01.07.2022 г.

Принята к публикации 20.07.2022 г.

Методом мониторинга люминесценции в режиме реального времени обнаружен эффект существенной стимуляции трансляции репортерных мРНК в бесклеточной системе WGE (бесклеточная эукариотическая система на основе экстракта зародышей пшеницы) при добавлении 16S рибосомной РНК *E. coli*. Эффект стимуляции трансляции мРНК люциферазы оказался специфичным именно для бесклеточной системы WGE и проявлялся вне зависимости от природы 5'-нетранслируемой области репортерной мРНК. Определен класс нетранслируемой РНК, не оказывающий стимулирующего эффекта. На величину эффекта стимуляции трансляции репортерных мРНК в системе WGE влияли концентрация и тип 5'-нетранслируемой области репортерной мРНК, а также момент внесения 16S РНК в работающую систему. Изучение явления стимуляции трансляции позволит оптимизировать бесклеточную систему WGE для применения в методах с использованием репортерных генов и решения различных научно-прикладных задач.

*Ключевые слова:* биолюминесценция, трансляция, бесклеточная система WGE

DOI: 10.31857/S0006302922050027, EDN: J1DBYR

Бесклеточные системы трансляции — одна из фундаментальных технологий, которая открывает широкие возможности в области изучения механизмов биосинтеза белка, функциональной геномики, скрининга и масштабного получения активных белков, разработки лекарственных препаратов, изучения метаболических путей и др. [1–3]. Для решения различных задач с применением этих систем разработан ряд методов на основе репортерных мРНК. Одним из таких методов является метод мониторинга синтеза фермента люциферазы светлячка (*Photinus pyralis*) в режиме реального времени в бесклеточных системах трансляции, впервые предложенный в нашей лаборатории для изучения механизмов биосинтеза белка [4]. В основе метода лежит катализ люциферазой реакции окисления люциферина, сопровождаемой излучением кванта света в области 540–600 нм [5, 6]. Окисляемый субстрат добавляется непосредственно в реакционную смесь, активность синтеза люциферазы характеризуют

количественно, измеряя люминесценцию непосредственно во время трансляции мРНК люциферазы в системе. Анализ крайне чувствителен, так как реакция имеет высокий квантовый выход при отсутствующей фоновой люминесценции [7]. Так, в оптимальных условиях реакции можно обнаружить около 10 фг люциферазы [8].

Проводя мониторинг синтеза люциферазы в бесклеточной эукариотической системе трансляции на основе экстракта зародышей пшеницы (система WGE) мы обнаружили неожиданный эффект стимуляции трансляции репортерной мРНК люциферазы при добавлении в систему нетранслируемой 16S рибосомной РНК *E. coli*. Целью настоящей работы было определение факторов, влияющих на обнаруженный эффект.

### МЕТОДЫ

**Плазмиды и получение матриц для транскрипции.** Плазмиды pTZ10OmegaLuc [9], pSP36Tβ-globin-Luc-GAPDH-A50 [10] и pCrPV-Fluc [11], содержащие кодирующую последовательность лю-

Сокращение: 5'-НТО — 5'-нетранслируемая область.

Таблица 1. ДНК и репортерные мРНК

Плазмидный вектор	мРНК	5'-НТО (лидеры)	Способ инициации трансляции	Размер транскрипта, п.о.
pTZ10Omega-Luc-TMV	5'UTR <sub>Omega</sub> -Luc-3'UTR <sub>TMV</sub>	5'-НТО РНК ВТМ (омега-лидер)	Кэп- и eIF4F-независимый	2049
pSP36T-β-globin-Luc-GAPDH-A50	5'UTR <sub>βGlobin</sub> -Luc-3'UTR <sub>GAPDH-A50</sub>	5'-НТО мРНК белка –глобина лягушки <i>Xenopus</i>	Кэп-зависимый	1866
pCrPV-Fluc	5'UTR <sub>CrPV</sub> -Luc-3'UTR <sub>A50</sub>	Межгенная последовательность геномной РНК вируса паралича сверчка (CrPV IRES)	IRES-опосредованный (кэп- и фактор независимый)	2089

циферазы светлячка (*Photinus pyralis*) и различные 5'-НТО (табл. 1) нарабатывали в *E. coli* DH5α (ThermoFisher Scientific, США) и выделяли с помощью набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher Scientific, США).

Для дальнейшего использования в транскрипции плазмиду pTZ10OmegaLuc расщепляли эндонуклеазой рестрикции Bsp120I (Psp OMI) (ThermoFisher Scientific, США), плазмиду pSP36T-β-globin-Luc-GAPDH-A50 – эндонуклеазой HpaI (ThermoFisher Scientific, США) в условиях, рекомендованных производителями. Плазмиду pCrPV-Fluc использовали в качестве матрицы для синтеза ДНК-фрагмента с 5'-НТО вируса паралича сверчка CrPV в ПЦР (см. табл. 1). Праймеры для реакции – T7 (прямой) 5'CGCCGTAATAC-GACTCACTATAGGGAAAGCAAAAATGTGATC-TTGCTTG, последовательность промотора T7 РНК-полимеразы подчеркнута) и FLA50a (обратный) 5'(T)<sub>48</sub>AACTTGTTTATTGCAGCTTAT) – были синтезированы Научно-производственной компанией «Синтол» (Россия). Реакционную смесь объемом 100 мкл, содержащую 1.6 нг/мкл плазмиды, 0.3 мкМ каждого из праймеров, 0.025 ед/мкл Taq-полимеразы (Roche, Германия), 0.2 мМ каждого из дНТФ, 2.5 мМ MgCl<sub>2</sub> и 1× буфер High Fidelity Buffer (Roche, Германия), помещали в амплификатор Biometra Personal Cyler (Analytik Jena, Германия) и амплифицировали целевой ДНК-фрагмент в режиме: стартовая денатурация (1 мин), 3 цикла денатурации (15 сек, 94°C), отжига (30 сек, 50°C) и элонгации (72°C, 2 мин), 29 циклов денатурации (15 сек, 94°C), отжига (30 сек, 65°C) и элонгации (72°C, 2 мин) и финальная элонгация (7 мин).

После расщепления плазмидные ДНК или продукт ПЦР очищали фенольной депротеинизацией с последующим спиртовым осаждением. Все этапы работы контролировали электрофорезом в 1%-й агарозе в нативных условиях с визуализацией бромистым этидием. Концентрацию

ДНК (при A<sub>260</sub> нм), а также дополнительную оценку чистоты препарата (соотношение A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>) определяли на спектрофотометре SmartSpec™ Plus (Bio-Rad).

**Получение мРНК.** Матричные РНК, кодирующие люциферазу светлячка (*Photinus pyralis*) 5'UTR<sub>Omega</sub>-Luc-3'UTR<sub>TMV</sub>, и 5'UTR<sub>CrPV</sub>-Luc-3'UTR<sub>A50</sub>, были получены транскрипцией соответствующих ДНК (см. табл. 1) с использованием РНК-полимеразы фага T7 (NEB) в условиях, рекомендованных производителем фермента, добавляя MgCl<sub>2</sub> до 22 мМ и 1 ед/мкл ингибитора РНКазы RiboLock™ (ThermoFisher Scientific, США). Концентрация каждого НТР составляла 4 мМ, линейаризованной плазмиды pTZ10Omega-Luc или очищенного продукта ПЦР pCrPV-Fluc – 0.02 мкг/мкл. Реакционную смесь инкубировали в течение 2 ч, после этого сразу проводили депротеинизацию смесью фенол с pH 5.5 : хлороформ (1 : 1) и ряд спиртовых осадений с использованием насыщенного раствора хлорида лития (1/3 объема) 4 М NH<sub>4</sub>OAc (1/2 объема) и 3 М NaOAc с pH 5.5 (1/10 объема). Для получения мРНК 5'UTR<sub>cap-βGlobin</sub>-Luc-3'UTR<sub>GAPDH-A50</sub> проводили реакцию с РНК полимеразой фага SP6 (ThermoFisher Scientific, США) в условиях, рекомендованных производителем фермента. Концентрации добавленных MgCl<sub>2</sub>, и других компонентов реакции, а также время инкубации и очистка были такими же, как указано выше. Кэпирование полученной мРНК проводили с помощью набора ScriptCap™m7G Capping System (CellScript), после этого мРНК экстрагировали смесью фенол: хлороформ 1 : 1 и очищали на колонке Illustra MicroSpin G50 (GE Healthcare) согласно рекомендациям производителя.

Качество полученного препарата РНК анализировали в 1%-й агарозе в 0.5× ТВЕ с визуализацией бромистым этидием, а также в 6% ПААГ с

7 М мочевиной и окрашиванием толуидиновым синим.

**Препараты РНК и ДНК.** 16S и 23S рибосомные РНК выделяли из препаратов 30S и 50S субчастиц рибосом *E. coli* MRE600. К препаратам добавляли двукратный объем деионизированной воды и 0.2%-й раствор SDS в объемном соотношении 1 : 5 при интенсивном перемешивании. После этого проводили депротеинизацию РНК с использованием фенола с рН 5.5 на первой стадии. Экстрагированную РНК осаждали из водной фазы, добавляя 3М NaOAc и этанол, осадок растворяли в деионизированной воде и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . При выделении 23S РНК не отделяли 5S РНК.

В работе использовали тотальную нетранслируемую РНК (тРНК) *E. coli* MRE600 40 мкг/мл (Roche, Германия), РНК фага MS2 0.8 мкг/мл (Roche, Германия) и ДНК тимуса теленка, обработанную ультразвуком до фрагментов размером 200–6000 п.о., с конц. 500 мкг/мл (Cytiva). К 100 мкг каждого препарата добавляли  $\text{MgCl}_2$  до 10 мМ, переводили в буфер, содержащий 10 мМ трис-НСl, 100 мМ KCl, 10 мМ  $\text{MgCl}_2$  (рН 7.5) и очищали на колонке NAP<sup>TM</sup>5 (Amersham, Великобритания) согласно рекомендациям производителя. РНК и ДНК осаждали добавлением 3М NaOAc и этанола, осадок растворяли в деионизированной воде и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Трансляция в бесклеточных системах с непрерывным мониторингом синтеза люциферазы.** Трансляцию в бесклеточной системе на основе экстракта зародышей пшеницы WGE проводили в стационарном режиме при  $25^{\circ}\text{C}$ : 10 мкл реакционной смеси содержали  $1\times$  буфер для трансляции WGE (25 мМ HEPES-КОН (рН 8.0), 0.4 мМ GTP, 1 мМ АТФ, 0.1 мМ спермидина, 0.05 мг/мл тотальной тРНК дрожжей, 1.5 мМ дитиотреитола), 0.2 мМ каждой аминокислоты (смесь), 1.5 мМ  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$  (до 3 мМ с учетом магния экстракта WGE), 0.02 мМ KOAc (до 65 мМ с учетом магния экстракта WGE), 2% глицерина, 0.15 мМ спермидина, 0.01 мМ NP40, 16 мМ креатинфосфата, 30% экстракта зародышей пшеницы, 0.1 мг/мл креатинфосфокиназы (Boehringer Mannheim, Германия), 0.5 ед/мкл ингибитора РНКаз RiboLock<sup>TM</sup> (ThermoFisher Scientific, США). Для непрерывного мониторинга синтеза люциферазы реакционная смесь содержала 0.10 мМ люциферина. Конечные концентрации мРНК, а также добавленных 16S и других РНК указаны в разделе «Результаты». Экстракт зародышей пшеницы (WGE) получали, как описано в работе [12]. Трансляцию мРНК люциферазы 5'UTR<sub>Omega</sub>-Luc-3'UTR<sub>TMV</sub> проводили также в бесклеточной системе на основе лизата ретикулоцитов кролика (RRL) с использованием набора Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate System (Promega, США) при  $30^{\circ}\text{C}$

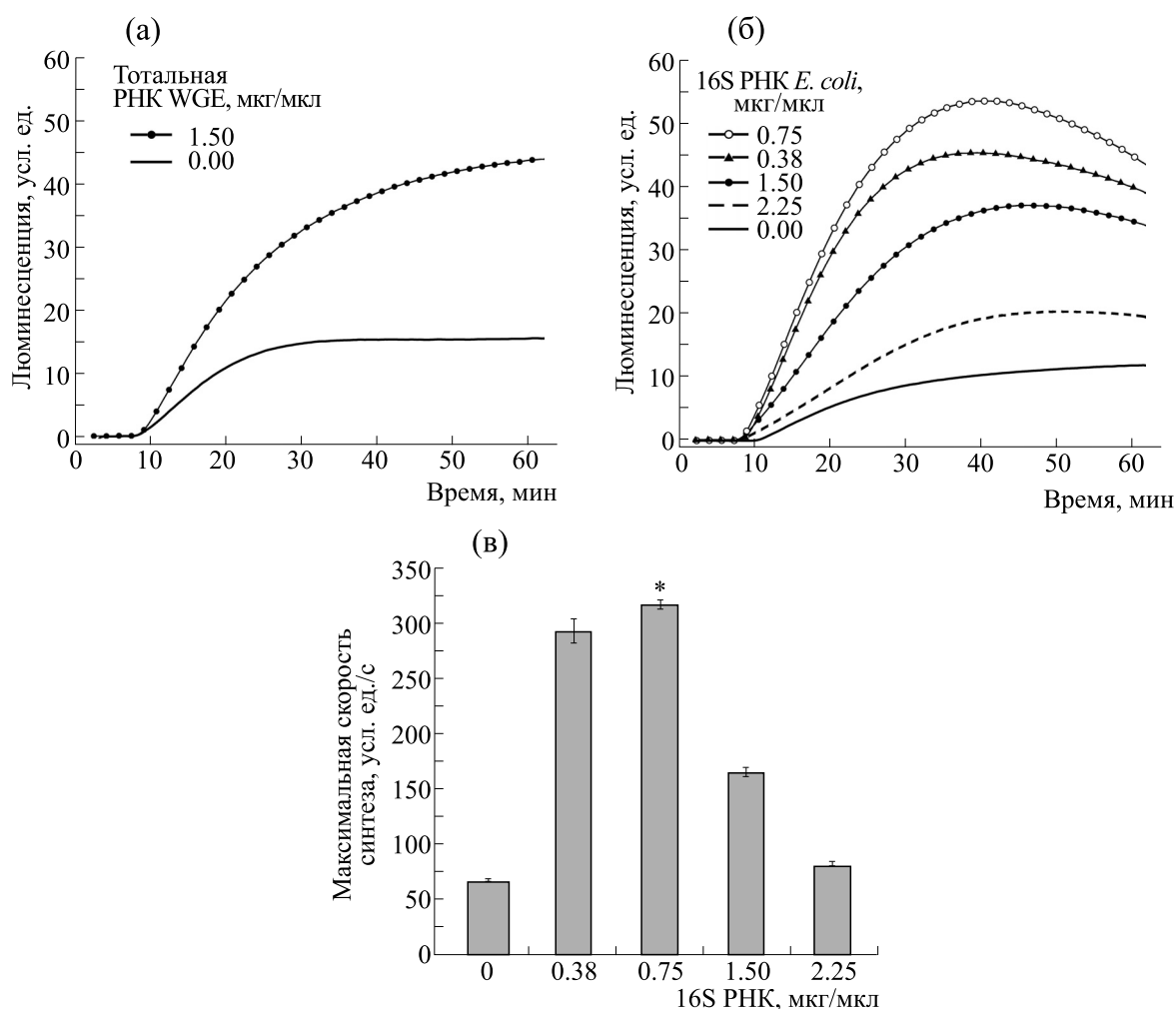
по протоколу производителя. Приготовление экстракта S-100 *E. coli* и трансляцию в бесклеточной системе на его основе 0.5 мкг/мкл мРНК люциферазы 5'UTR<sub>SD</sub>-Luc-3'UTR<sub>N64</sub> (5'-НТО Шайн–Дальгарно) проводили по ранее опубликованным протоколам [12, 13].

Все компоненты системы, кроме мРНК, смешивали при  $4^{\circ}\text{C}$ , предварительно инкубировали при температуре реакции в течение 2 мин, затем добавляли мРНК, помещали микроцентрифужную пробирку с реакционной смесью в термостабируемую ячейку 12-ячеечного роторного люцинометра Хемилум-12 (Россия) и инкубировали в течение часа. Мониторинг синтеза люциферазы проводили, регистрируя интенсивность биолюминесценции в непрерывном режиме в течение указанного времени с автоматическим выводом потока данных в виде кинетической кривой. Каждое измерение проводили в трех повторностях.

**Обработка данных.** Активность трансляции репортерной мРНК оценивали по максимальной скорости синтеза люциферазы, которую определяли как максимальное значение производной по времени на участке от конца лаг-периода до начала выхода кривой на плато. Обработку и анализ данных проводили с использованием программного обеспечения OriginPro 8 SR0, результаты представляли в виде среднего арифметического (*Mean*) и среднеквадратичного отклонения (*SD*).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Эффект стимуляции трансляции репортерной мРНК люциферазы в присутствии 16S РНК *E. coli*.** Проводя мониторинг синтеза люциферазы в бесклеточной системе WGE, транслирующую небольшие количества (0.35–0.70 мкг/мкл) мРНК люциферазы с омега-лидером вируса табачной мозаики 5'UTR<sub>Omega</sub>-Luc-3'UTR<sub>TMV</sub>, мы обнаружили любопытное явление: внесение в бесклеточную систему выделенной из экстракта зародышей пшеницы тотальной РНК значительно стимулировало трансляцию (рис. 1а). Известно, что около 80% тотальной РНК WGE составляет рибосомная РНК. Мы решили проверить, будет ли рибосомная РНК из другого организма стимулировать подобным образом трансляцию мРНК люциферазы при внесении в таких же количествах, что и в первоначальных экспериментах с тотальной РНК из WGE, т.е. в диапазоне 0.38–2.25 мкг/мкл. Оказалось, что добавление 16S РНК *E. coli* стимулировало синтез люциферазы в бесклеточной системе WGE так же существенно и не менее эффективно (рис. 1б), значительно увеличивая накопление активной люциферазы. Максимальный стимулирующий эффект достигался при добавлении 0.75 мкг/мкл 16S РНК, при

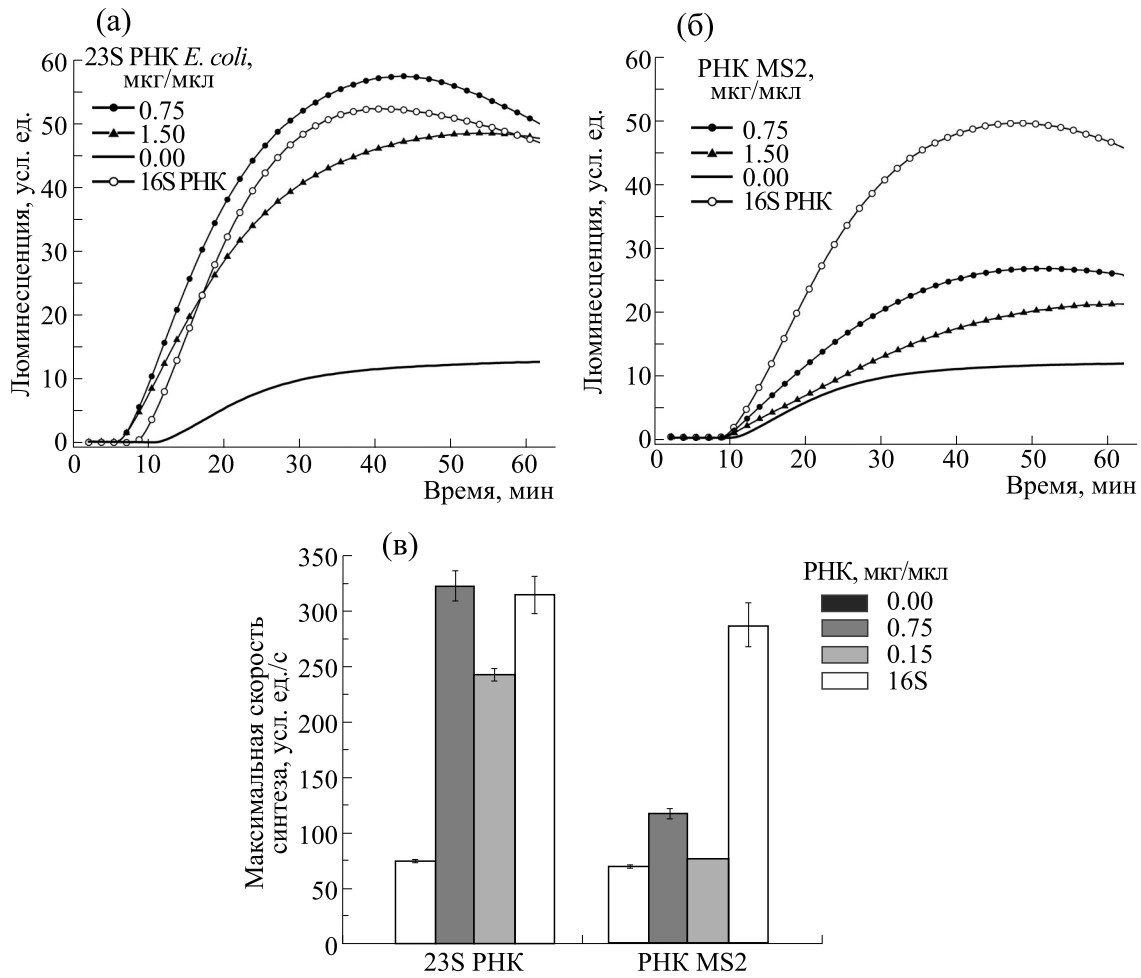


**Рис. 1.** Присутствие тотальной РНК из WGE и 16S РНК *E. coli* стимулирует синтез люциферазы в бесклеточной системе трансляции на основе экстракта зародышей пшеницы: (а) – эффект внесения тотальной РНК из WGE; (б) – кинетические кривые накопления активной люциферазы при добавлении разных концентраций 16S РНК *E. coli*; (в) – максимальная скорость синтеза люциферазы в присутствии разных концентраций 16S РНК. Звездочкой отмечен максимальный эффект стимуляции, данные представлены в виде  $Mean \pm SD$ . Трансляция мРНК люциферазы в концентрации 0.70 мкг/мкл с омега-лидером 5'UTR<sub>Omega</sub>-Luc-3'UTR<sub>TMV</sub>.

этом максимальная скорость синтеза люциферазы увеличивалась в 4.8 раз (рис. 1в). Дальнейшее увеличение концентрации 16S РНК приводило к снижению стимулирующего эффекта, и внесение 16S РНК в концентрации 2.25 мкг/мкл стимулировало скорость синтеза белка лишь на 20% (рис. 1в).

Для того чтобы определить, обладают ли другие РНК способностью стимулировать синтез люциферазы, были проверены 23S рРНК и тРНК *E. coli*, так как РНК этих классов содержатся в тотальной РНК WGE. Кроме того, в качестве образца еще одного класса РНК (геномной) была взята РНК бактериофага MS2. Для проверки возможности ДНК стимулировать трансляцию синтез люциферазы провели также в присутствии ДНК тимуса теленка. Эти эксперименты показали, что

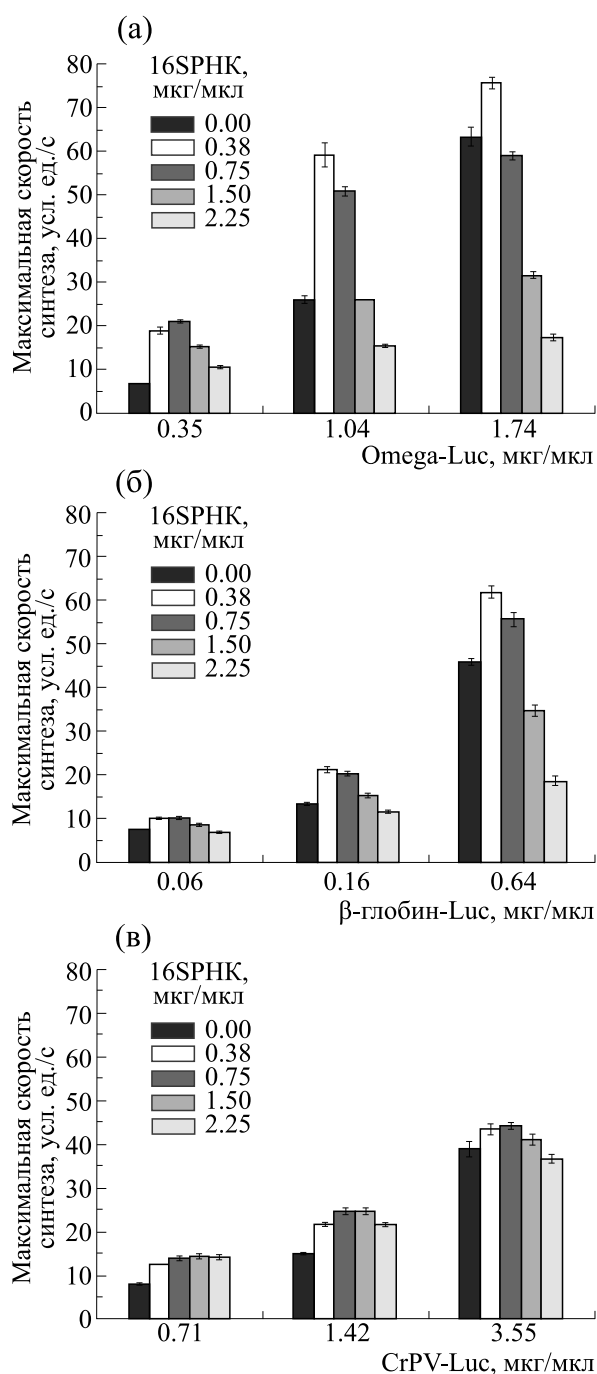
добавление 23S рРНК оказало стимулирующее влияние на трансляцию репортерной мРНК, сопоставимое с 16S РНК (рис. 2а,в). Внесение РНК фага MS2 тоже стимулировало трансляцию репортерной мРНК, однако эффект был значительно менее выражен (рис. 2б,в). Так, внесение РНК фага MS2 в максимальной стимулирующей концентрации 0.75 мкг/мкл вызывало увеличение скорости синтеза люциферазы на 70%. В то же время внесение 23S РНК, так же как и 16S РНК, увеличивало максимальную скорость синтеза более чем в четыре раза. Добавление тРНК и ДНК в указанных концентрациях в реакционную смесь не стимулировало трансляцию, а приводило к увеличению времени лаг-периода и уменьшению максимальной скорости синтеза люциферазы (данные не представлены).



**Рис. 2.** 23S РНК и РНК фага MS2 также стимулируют трансляцию. Трансляция мРНК люциферазы в концентрации 0.70 мкг/мкл с 5'UTR<sub>Omega</sub>-Luc-3'UTR<sub>TMV</sub> при добавлении: (а) – 23S рРНК *E. coli*; (б) – РНК фага MS2; (в) – максимальная скорость синтеза люциферазы в отсутствие (черные столбики) и в присутствии разных концентраций 23S РНК и РНК фага MS2 (указаны в легенде), концентрация 16S РНК – 0.75 мкг/мкл.

**Трансляция мРНК люциферазы с разными способами инициации.** Напомним, что в экспериментах, описанных выше, эффект стимуляции был обнаружен при трансляции небольших количеств некэпированной мРНК. На следующем этапе работы необходимо было установить, как внесение 16S РНК будет влиять на трансляцию мРНК с разными типами 5'-НТО и, следовательно, отличающихся по способу инициации (см. табл. 1). Для этого, кроме мРНК люциферазы с омега-лидером, в системе WGE транслировали мРНК с классическим кэпированным лидером мРНК глобина, а также с 5'-НТО IRES (табл. 1). Эти мРНК транслировали в WGE в трех концентрациях («низкой», «средней» и «высокой») и добавляли 16S РНК до конечной концентрации 0.38–2.25 мкг/мкл в реакционной смеси.

Эксперименты показали, что стимуляция трансляции мРНК люциферазы в экстракте WGE происходила вне зависимости от природы ее 5'-НТО (или способа инициации) (рис. 3). Однако величина эффекта зависела от 5'-НТО и концентрации репортерных мРНК. В случае трансляции «низкой» концентрации (0.35 мкг/мкл) мРНК люциферазы с омега-лидером добавление 16S РНК вызывало такой же эффект стимуляции, как описано выше (рис. 3б,в), с увеличением максимальной скорости синтеза люциферазы в 8.6 раз. Иной эффект вызывало добавление 16S РНК на трансляцию «средней» и «высокой» концентрации – 1.04 и 1.74 мкг/мкл мРНК соответственно. Во-первых, стимулирующий эффект 16S РНК был заметно слабее. Так, максимальная скорость синтеза белка при внесении 0.38 мкг/мкл 16S РНК превышала всего лишь в 2.6 и 1.2 раза



**Рис. 3.** Трансляция мРНК люциферазы с различными 5'НТО при внесении разных концентраций 16S РНК *E. coli*. Максимальная скорость синтеза люциферазы: (а) – мРНК с омега-лидером 5'UTR<sub>Omega</sub>-Luc-3'UTR<sub>TMV</sub>; (б) – мРНК с глобиновым лидером 5'UTR<sub>βGlobin</sub>-Luc-3'UTR<sub>GAPDH-A50</sub>; (в) – мРНК с CrPV IRES 5'UTR<sub>CrPV</sub>-Luc-3'UTR<sub>A50</sub>. Данные представлены в виде *Mean* ± *SD*.

«контрольную» (рис. 3а). Во-вторых, увеличение 16S РНК в системе WGE до 1.50 мкг/мкл или практически не влияло, или сильно замедляло

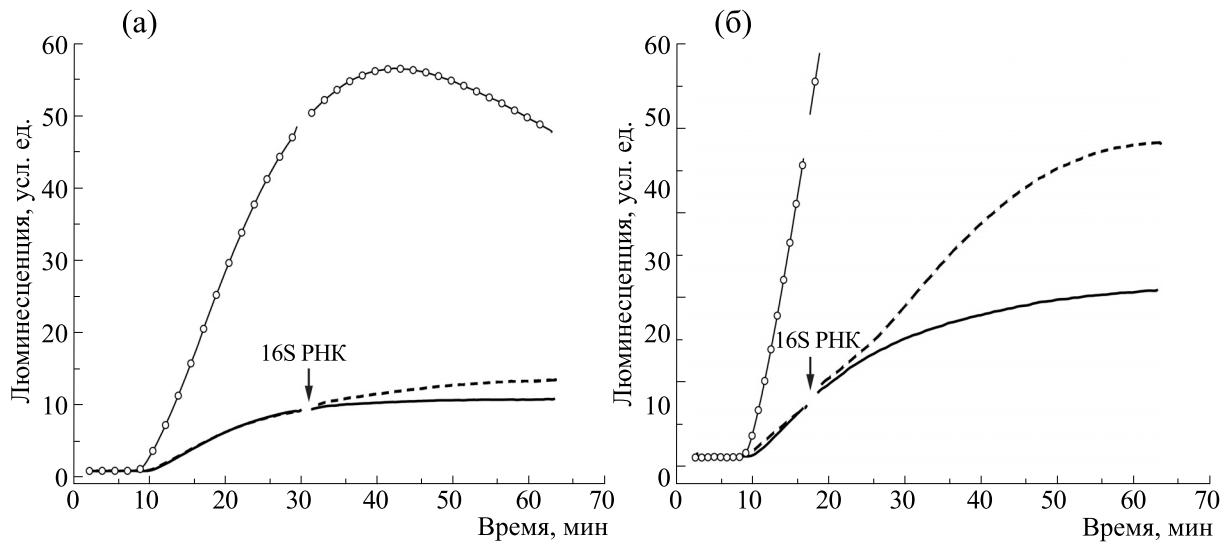
максимальную скорость синтеза белка, а дальнейшее увеличение концентрации 16S РНК замедляло скорость синтеза люциферазы в 2–5 раз (рис. 3а). Кроме того, в WGE, транслирующей 1.74 мкг/мкл репортерной мРНК, максимальная скорость синтеза начинала уменьшаться уже при внесении 0.75 мкг/мкл 16S РНК.

Иным было влияние добавления 16S РНК на трансляцию мРНК с экпированным лидером мРНК глобина (рис. 3б). Проявление ингибирующего влияния 2.25 мкг/мкл 16S РНК начиналось уже с малых концентраций (0.06 мкг/мкл) мРНК. Стимулирующий эффект на трансляцию мРНК с глобиновым лидером был менее выраженным по сравнению с мРНК с омега-лидером. Так, максимальная скорость реакции увеличивалась в лучшем случае в 1.9 раза (см. 0.06 и 0.16 мкг/мкл мРНК и 0.38 мкг/мкл 16S РНК, рис. 3б).

В отличие от предыдущих мРНК, трансляция всех концентраций мРНК с 5'-НТО IRES стимулировалась всеми концентрациями 16S РНК (рис. 3в). Лишь внесение 2.25 мкг/мкл замедляло скорость синтеза люциферазы на 10% при максимальном количестве мРНК 3.55 мкг/мкл (рис. 3в). Максимальное увеличение скорости синтеза белка (в 3.3 раза) наблюдали также при трансляции «низкой» концентрации 0.71 мкг/мкл мРНК при добавлении 1.5 мкг/мкл 16S РНК в систему WGE.

Таким образом, мы выявили, что добавление 16S РНК влияет по-разному на трансляцию репортерной мРНК в зависимости от 5'-НТО и ее концентрации в системе WGE. Однако эффект стимуляции синтеза люциферазы не является специфическим свойством мРНК с омега-лидером, а проявляется вне зависимости от природы 5'-НТО мРНК. Максимальный стимулирующий эффект наблюдали при внесении 16S РНК в систему WGE при трансляции небольших количеств репортерных мРНК. Наибольший эффект стимуляции внесения 16S РНК оказывало на трансляцию неэкпированной мРНК с омега-лидером.

**Изменение хода кинетической кривой трансляции при внесении 16S РНК на разных этапах работы системы.** Для определения зависимости эффекта стимуляции трансляции мРНК люциферазы от момента внесения 16S рРНК в систему WGE, мы добавляли 0.75 мкг/мкл 16S РНК на разных этапах работы системы: перед лаг-периодом, на линейном участке кинетической кривой, а также на этапе начала выхода кинетической кривой на плато (рис. 4). Лаг-период соответству-



**Рис. 4.** Изменение хода кинетической кривой трансляции при внесении 16S РНК. Трансляция 0.70 мкг/мкл мРНК люциферазы 5'UTR<sub>Omega</sub>-Luc-3'UTR<sub>TMV</sub> и внесение 0.75 мкг/мкл 16S РНК *E. coli* в момент начала выхода кинетической кривой на плато (а) и на линейном участке кинетической кривой (стрелка) (б). Кривая с кружками – 16S РНК добавлена в начале реакции, пунктирная кривая – 16S РНК добавлена на определенном этапе реакции, сплошная кривая – контроль, добавлена деионизированная вода.

ет так называемому времени пробега (transit time), в течение которого происходит инициация трансляции и синтез полноразмерной люциферазы, линейный участок кинетической кривой соответствует максимальной синтетической активности трансляционного аппарата, а начало выхода кинетической кривой на плато соответствует замедлению процессов синтеза люциферазы при условии избытка субстратов реакции и отсутствии процессов дегградации/агрегации фермента.

Анализ изменения хода кинетических кривых синтеза позволил выявить, что добавление 16S рРНК на всех этапах работы системы WGE вызывало стимуляцию трансляции (рис. 4, пунктирные кривые). Однако максимальный эффект наблюдали при добавлении 16S РНК в момент начала реакции (рис. 4а,б, кривые со светлыми кружками). Добавление 16S рРНК в реакцию при начинающемся выходе кинетической кривой на плато проявлялось лишь в незначительном увеличении люминесценции (рис. 4а). Внесение 16S РНК на линейном участке кинетической кривой влияло на ход синтеза люциферазы иначе (рис. 4б, пунктирная кривая). Оказалось, что сначала реакция в течение 6–7 мин продолжала идти в линейном режиме с такой же с максимальной скоростью (46 усл. ед./с), как до внесения 16S рРНК. После этого происходил скачок люминесценции и реакция снова продолжала идти в линейном режиме в течение 13 мин с большей максимальной скоростью (59 усл. ед.). В то же время кинетиче-

ская кривая контрольной реакции после продолжала свой ход как обычно, со скоростью 46–48 усл. ед./с, после чего происходило замедление и выход на плато. Временной интервал между добавлением 16S РНК и скачком люминесценции приблизительно соответствует времени пробега, что позволило сделать вывод о стимуляции трансляции на стадии инициации, тем самым исключив влияние на процесс элонгации.

**Влияние 16S РНК на синтез люциферазы в других бесклеточных системах трансляции.** Для ответа на вопрос, универсально ли обнаруженное влияние 16S РНК на синтез люциферазы во всех бесклеточных системах трансляции или же является специфическим свойством системы WGE, была проведена трансляция соответствующих репортерных мРНК в системах, полученных из клеток бактерий (*E. coli*) и млекопитающих (ретикулоцитов кролика). Оказалось что внесение 16S РНК в диапазоне 0.38–2.25 мкг/мкл в обе эти бесклеточные системы подавляло трансляцию репортерных мРНК пропорционально внесенному количеству (данные не представлены). Эффект стимуляции трансляции репортерных мРНК оказался специфичным именно для бесклеточной системы WGE.

Таким образом, метод мониторинга люминесценции синтеза люциферазы в режиме реального времени позволил обнаружить эффект существенной стимуляции трансляции репортерной мРНК в бесклеточной эукариотической системе WGE при добавлении 16S РНК *E. coli*. Определен класс нетранслируемой РНК (тРНК), не оказы-



вающий стимулирующего эффекта. В данной работе удалось определить ряд факторов, влияющих на эффект стимуляции трансляции репортерных мРНК в системе WGE: количество добавляемой 16S РНК, концентрация и тип 5'-НТО репортерной мРНК, а также момент внесения 16S рРНК в работающую систему WGE. Максимальный стимулирующий эффект оказывало добавление 16S РНК при трансляции малых концентраций репортерных мРНК вне зависимости от природы 5'-НТО. Резкий подъем люминесценции, наблюдаемый через промежуток времени, соответствующий времени пробега, позволяет утверждать о влиянии добавленной 16S РНК на стадию инициации трансляции. Интересно, что среди протестированных нами бесклеточных систем трансляции, эффект стимуляции трансляции репортерных мРНК наблюдался только в системе WGE.

В системе из зародышей пшеницы эффекты ускорения синтеза белка были показаны и ранее [9, 14]. Однако в работе [9] авторами подробно был изучен эффект «разгона белкового синтеза», происходящий только при высоких концентрациях некэпированной мРНК, транслирующейся в системе. В работе [14] было описано явление взаимной стимуляции трансляции «в одной пробирке» двух разных транслируемых матриц. В отличие от этой работы, в рамках нашего исследования показано, что рибосомная РНК, которая считается нетранслируемой, значительно стимулирует трансляцию мРНК с 5'-НТО различной природы. Иными словами, обнаружено явное влияние нетранслируемой РНК на трансляцию репортерной мРНК. Ранее небольшой эффект добавления нетранслируемой РНК (некэпированная РНК с глобиновым лидером) был показан в работе [15].

Обнаруженные факты позволяют предполагать, что в основе возможного механизма эффекта стимуляции синтеза люциферазы при добавлении 16S РНК может лежать следующее. Предположительно, в экстракте зародышей пшеницы содержатся неспецифические РНК-связывающие белки, ингибирующие трансляцию. Находясь в системе, 16S РНК как бы «вытитровывает» эти белки и тем самым снимает ингибирование и стимулирует трансляцию [14]. Для выяснения молекулярного механизма эффекта стимуляции трансляции репортерных мРНК в бесклеточной системе WGE в присутствии 16S РНК необходимы дальнейшие исследования. Понимание этого механизма позволит оптимизировать бесклеточную систему WGE для применения в методах с использованием репортерных мРНК, а также решения различных научно-прикладных задач.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят зав. лабораторией механизмов биосинтеза белка Института белка РАН В.А. Колба за поддержку, постоянный интерес к работе и обсуждение результатов, а также сотрудников лаборатории: К.С. Василенко — за предоставление плазмиды рTZ10OmegaLuc, А.А. Коммера и И.Г. Дашкову — за предоставление 30S и 50S субчастиц рибосом *E. coli*, экстракта S-100 *E. coli* и мРНК люциферазы 5'UTR<sub>SD</sub>-Luc-3'UTR<sub>N64</sub>.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Данная работа не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. N. E. Gregorio, M. Z. Levine, and J. P. Oza, *Methods Protoc.*, **2** (1), 24 (2019).
2. Y. Endo, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.*, **97** (5), 261 (2021).
3. M. L. Fogeron, L. Lecoq, L. Cole, et al., *Front. Mol. Biosci.*, **8**, 639587 (2021).
4. V. A. Kolb, E. V. Makeyev, and A. S. Spirin, *EMBO J.*, **13** (15), 3631 (1994).
5. J. W. Hastings, and C. H. Johnson, in *Methods in Enzymology*, Ed. by G. Marriott and I. Parker (Acad. Press, 2003), V. **360**, pp. 75–104.
6. S. M. Marques and J. C. Esteves da Silva, *IUBMB Life*, **61** (1), 6 (2009).
7. K. V. Wood, *Promega Notes*, **28** (1990).
8. K. V. Wood, Y. A. Lam, and W. D. McElroy, *J. Biolumin. Chemilumin.*, **4** (1), 289 (1989).
9. O. M. Alekhina, K. S. Vassilenko, and A. S. Spirin, *Nucleic Acids Res.* **35** (19), 6547 (2007).
10. D. N. Lyabin, I. A. Eliseeva, L. P. Ovchinnikov, *PLoS One*, **7** (12), e52527 (2012).
11. I. V. Prokhorova, K. A. Akulich, D. S. Makeeva, et al., *Sci. Rep.*, **6**, 27720 (2016).
12. V. A. Shirokov, A. Kommer, V. A. Kolb, et al., in *Methods Mol. Biol.*, Ed. by G. Grandi (Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 2007), V. **375**, pp. 19–55.
13. L.M. Gold and M. Schweiger, in *Methods in Enzymology*, Ed. by K. Moldave and L. Grossman (Acad. Press, 1971) **20**, pp. 537–542.
14. Е. А. Согорин и С. Ч. Агаларов, *Молекулярная биология*, **52** (1), 19 (2018).
15. Е. А. Согорин, С. С. Агаларов, and А. С. Spirin, *Sci. Rep.*, **6**, 24518 (2016).



## 16S rRNA Significantly Stimulates Translation of a Reporter mRNA in a Eucaryotic Cell-Free System

N.V. Zyrina\*, \*\* and S.Ch. Agalarov\*

\* *Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 4, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

\*\* *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Puschino, Moscow Region, 142290 Russia*

Real-time monitoring of bioluminescence in a cell-free system originated from wheat germ extracts (WGE) revealed significant stimulation of reporter mRNA translation after addition of 16S rRNA *Escherichia coli*. The effect observed was specific to WGE cell-free system and did not depend on the 5'-UTR of the reporter mRNA. A class of untranslated RNA (tRNA) that does not have a stimulating effect has been identified. The magnitude of an effect of translation stimulation of reporter mRNAs in the WGE system depended on the concentration and the type of 5'-UTR of a reporter mRNA and on a particular moment in time when 16S RNA was added to the system during translation. Further research of translation stimulation is required to optimize the use of the WGE cell-free system for reporter gene technology and find solutions to different applied research challenges.

*Keywords: bioluminescence, translation, WGE cell-free system*