

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.214.32

Пробоподготовка элонгационного комплекса +39 для криоэлектронной микроскопии

Е.В. Осина¹ , А.В. Моисеенко¹ , А.Н. Коровина¹ , Н.С. Герасимова¹ ,
О.И. Волох¹ , В.М. Студитский^{1, 2} , Т.Б. Станишнева-Коновалова^{1, *}

¹Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 73;

²Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave., Philadelphia, 19111, Pennsylvania, USA

*e-mail: stanishneva-konvalova@mail.bio.msu.ru

Транскрипция в клетке осуществляется специализированными ферментами – РНК-полимеразы. РНК-полимеразы транскрибируют ДНК с образованием элонгационных комплексов (ЭК), в том числе участвующих в регуляции транскрипции. Криоэлектронная микроскопия (криоЭМ) позволяет определять структуры этих комплексов и выяснять механизмы транскрипции хроматина. Однако подготовка образцов ЭК, пригодных для изучения методом криоЭМ, представляет определенные сложности. В данной работе проведена разработка протоколов для подготовки образцов ЭК с положением активного центра РНКП в позиции +39 от входа в нуклеосому (ЭК+39). Образование комплексов подтверждалось методами электрофореза и электронной микроскопии негативного контрастирования. Разработанные методы могут быть использованы для изучения ЭК+39 методом криоЭМ.

Ключевые слова: элонгационный комплекс, полимеразы, нуклеосома, хроматин, криоэлектронная микроскопия

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3S-9

Введение

Транскрипция является одним из основных процессов, определяющих реализацию генетической информации в клетке. Она осуществляется посредством синтеза молекул РНК специализированными ферментами – ДНК-зависимыми РНК-полимеразы (РНКП).

У эукариот ядерная ДНК упакована в хроматин – ДНК-белковый комплекс, минимальной структурной единицей которого является нуклеосома. Эукариотическая РНКП II транскрибирует нуклеосомную ДНК с характерными остановками элонгационных комплексов (ЭК). Остановки РНКП не являются случайными и имеют регуляторное значение [1].

Активное развитие криоэлектронной микроскопии (криоЭМ) последних лет позволило использовать этот метод для изучения механизмов транскрипции хроматина путем определения структур ЭК в различных положениях РНКП внутри нуклеосомы. В 2018 г. была опубликована криоЭМ структура ЭК РНКП II *Saccharomyces cerevisiae* с нуклеосомой с разрешением 4,4 Å [2]. В том же году были получены структуры ЭК со

спонтанными остановками РНКП II в четырех суперспиральных положениях внутри нуклеосомной ДНК: SHL(-6), SHL(-2), SHL(-5) и SHL(-1) [3]. Эти структуры проиллюстрировали последовательные этапы откручивания ДНК от поверхности гистоновых октамеров в процессе транскрипции *in vitro*. Создание специальных нуклеосомных ДНК-матриц позволило получить структуры ЭК, в которых РНКП II была остановлена в положениях 42, 49, 58 и 115 пар оснований от входа в нуклеосому (соответствуют SHL(-1), SHL(0), SHL(+1) и SHL(+6)) [4]. Также с помощью криоЭМ была получена структура промежуточного продукта прохождения через нуклеосому – комплекса РНКП II с транскрипционными факторами и гексасомой, в которой отсутствует проксимальный димер H2A–H2B [5]. В 2023 г. была опубликована структура ЭК РНКП II в положении SHL(-3,5) в комплексе с Rad26 – белком, необходимым для репарации ДНК [6]. Также криоЭМ структуры ЭК позволили прояснить механизм промотор-проксимального паузирования (остановки РНКП II между началом транскрипции и первой нуклеосомой) [7] и транскрипции РНКП II ядерного хро-

матина клеток человека (HeLa) [8]. Таким образом, изучение ЭК с помощью криоЭМ является актуальной темой исследований. Наша работа посвящена изучению элонгационного комплекса, где активный центр РНКП находится в позиции +39 от входа в нуклеосому (ЭК+39).

С помощью метода молекулярного докинга было показано, что в ЭК+39 за счет изгиба ДНК может происходить образование небольшой петли — петли нулевого размера или Ø-петли [9]. Предположительно, это структурное образование способствует сохранению положения гистоновых октамеров на матрице ДНК после прохождения РНКП и сохранению эпигенетической информации [9]. В данной работе используется РНКП *E. coli*, которая часто применяется в системах *in vitro*, воспроизводящих важные особенности транскрипции хроматина *in vivo*. Биохимическими методами показано, что этот фермент воспроизводит механизм прохождения эукариотической РНКП II через нуклеосому [10]. В данной работе применяется протокол получения ЭК на модифицированной ДНК-матрице в условиях дефицита определенного типа нуклеотидов, описанный ранее [10, 11]. Полученный при таком подходе препарат содержит значительное количество активных ЭК [12]. Таким образом, РНКП остаются интактными и при добавлении недостающего рибонуклеотида способны продолжать процесс продуктивного удлинения транскрипта РНК, т.е. элонгации. Паузирование РНКП является универсальным процессом, регулирующим длину транскрипта как у бактерий [13], так и у эукариот [14]. Недавно было показано, что статистическое сокращение длины транскрипта у человека коррелирует с возрастом [15]. Изучение транскрипционных нарушений важно также для понимания генезиса и иммунорезистентности рака [16]. Более того, исследование механизма прохождения РНКП через нуклеосому важно в связи с процессом сохранения нуклеосом при транскрипции и его влиянием на эпигенетический «гистоновый код» [9, 17].

Целью данной работы является создание протокола получения препарата ЭК+39, пригодного для изучения методом криоЭМ.

Материалы и методы

Получение рекомбинантной ДНК-матрицы T7A1-s603-40A-One_step. Фрагменты ДНК-матриц, полученные из матрицы T7A1-s603-40A [10] в результате сайт-направленного мутагенеза были амплифицированы, очищены из агарозного геля с помощью коммерческого набора Cleanup Standard (Евроген, Россия) и вставлены в плазмиду pGEM 3zf(+). Отбор плазмид с целевой вставкой T7A1-s603-40A-One_step осуществлялся с помощью селекции в клетках *E. coli* (XL1-Blue) и секвенирования полученной ДНК (выполнено в центре коллективного пользования «Геном», Россия).

Последовательность ДНК-матрицы T7A1-s603-40A-One_step от сайта старта транскрипции до +39 положения от входа в нуклеосому:

TCAAAAAGAGTATTGACTTAAAGTCTAACCTA
TAGGATACTTACAGCCATCGAGAGGGACACG
GCGAAAAGCCAACCCAAGCGACACCGGCACA
GGGGCCCAGAACGCGCGCCACCAACCGAG
AGAAGACGACACATGGGCTTCTAAGTACGCT
TAGGCCACGGTAGAGGGCAATCCAAGCTAAC
CACCGTGCATCGATGTTGAAAGAGGCCCTCC
GTCCTTATTCTTC.

После проверки того, что последовательность ДНК-матрицы T7A1-s603-40A-One_step не содержит оснований цитозина до 11-ого положения и оснований тимина до 89-ого положения относительно старта транскрипции (отмечены жирным шрифтом), данная матрица была наработана методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью Taq ДНК-полимеразы (Евроген, Россия) в амплификаторе Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, США) и очищена из агарозного геля, как описано выше. Поскольку эффективность ПЦР с плазмиды pGEM 3zf(+)-T7A1-s603-40A-One_step была очень низка, целевой фрагмент вставили в плазмиду pTZ57R и повторно секвенировали (центр коллективного пользования «Геном», Россия). Для представленного в статье эксперимента транскрипционная матрица была получена методом ПЦР с плазмиды pTZ57R-T7A1-s603-40A-One_step с использованием Q5 Hot Start High-Fidelity ДНК-полимеразы (NEB, Великобритания) и праймеров 282_For_whst (5' – CCG GGA TCC AGA TCC CGA AAA TTT A – 3'), 282_Rev_whst (5' – CGT CGG ATC CGT ACC CCA GGG ACT T – 3') в амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, США). ПЦР-продукт очищали из агарозного геля с использованием коммерческого набора, как описано выше.

Получение и очистка РНК-полимеразы *E. coli*.

Клетки *E. coli* BL21 (DE3) трансформировали методом электропорации экспрессионной плазмидой pSV10, кодирующей субъединицы корового фермента РНК-полимеразы *E. coli* (альфа (α), бета (β), бета-штрих (β') и омега (ω)) и гексагистидиновый фрагмент (His₆) [18]. Культуру клеток наращивали при температуре 32°C в течение 8 ч в термостатируемом шейкере New Brunswick™ Excella E24 (Eppendorf, Германия) до оптической плотности OD₆₀₀ = 0,6 (спектрофотометр Biophotometer plus (Eppendorf, Германия)). Далее для аутоиндукции экспрессии 0,5 мл культуры переносили в 500 мл среды LB, содержащей 150 мкг/мл ампициллина и инкубировали в течение 16–18 ч при 32°C до итогового значения OD₆₀₀ = 4–5. Затем культуру осаждали в центрифуге с охлаждением 5810R (Eppendorf, Германия) на 6000 об./мин при 4°C в течение 10 мин и промывали клеточный осадок охлажденным 10 мМ фосфатно-солевым буфером (PBS, Phosphate-Buffered Saline). Выделе-

ние проводили с помощью хроматографической системы АКТА Purifier 10 в три стадии: металл-аффинная хроматография (колонка для хроматографии с Ni-NTA сефарозой (Seпах, Китай)), хроматография на гепариновом носителе (колонка для хроматографии со смолой Heparin Huper D (набита самостоятельно)) и анионообменная хроматография (колонка MonoQ (Cytiva, США)) [18]. Концентрацию белка измеряли с помощью флуориметра Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США). В данной статье использовали фракцию холофермента РНКП *E. coli* с концентрацией 6,27 мкМ.

Сборка нуклеосом на ДНК-матрице и октамерах рекомбинантных гистонов *Homo sapiens*. Сборка нуклеосом проводилась в объеме 50 мкл с 8,5 мкг очищенной ДНК-матрицы T7A1s603-40A ($M_w = 173731,12$ г/моль). Реконституция нуклеосом проводилась методом ступенчатого диализа против буферов с убывающей концентрацией NaCl, начиная с 2 М, при температуре 4°C, как показано Люгер и соавт. [19]. Для сборки нуклеосом в качестве донора гистонов использовали препарат октамеров гистонов человека (hOct) с концентрацией 2 мг/мл, полученный на основе описанных ранее протоколов [19, 20]. После этого проводили электрофорез полученных комплексов в нативных условиях в полиакриламидном геле (ПААГ; 4% АА:БА (39:1)) в 1× NEPERES-буфере (5 мМ NEPERES pH 8,0, 1 мМ ЭДТА) в вертикальной камере для электрофореза Mini-Protean Tetra (Bio-Rad, США). ПААГ окрашивали флуоресцентным красителем для нуклеиновых кислот SYBR Gold (Thermo Fisher Scientific, США), что позволило производить детекцию в канале флуоресценции Cy3 с помощью флуоресцентного ридера Amersham Imager 680 (GE, США). Молярное соотношение ДНК-матрица:hOct составило 1:1. Итоговая концентрация образца нуклеосом составила 170 нг/мкл в расчете на ДНК.

Получение ЭК+39 на нуклеосоме методом *in vitro* транскрипции РНК-полимеразой *E. coli*. Для сборки ЭК+39 методом транскрипции *in vitro* использовали образец нуклеосомы с концентрацией 170 нг/мкл и холофермент РНКП *E. coli* с концентрацией 6,27 мкМ, полученные ранее. Транскрипцию *in vitro* проводили в стерильных безнуклеазных пробирках с низкой адгезией к белкам и нуклеиновым кислотам (НК) (USA Scientific, США). Для получения открытого комплекса в 5 мкл реакционной смеси на льду добавляли РНКП *E. coli* до концентрации 0,125 мкл на 100 нг (примерное молярное соотношение моонуклеосом: РНКП *E. coli* = 1:2) и 0,25 мкл на 100 нг (примерное молярное соотношение моонуклеосом: РНКП *E. coli* = 1:4) в 1× буфере НТВ40 (20 мМ NEPERES-HCl pH 8,0, 5 мМ MgCl₂, 2 мМ β-меркаптоэтанол, 40 мМ KCl). ЭК+39 с РНКП *E. coli*, остановленной в -39 положении матрицы относительно входа в нуклеосому, получали путем

добавления 20 мкМ РНК-затравки 5'-ArUpC (гAUC, АУЦ), 40 мкМ АТФ, 40 мкМ ГТФ. Для получения комплекса ЭК+39 концентрацию KCl в пробе, содержащей ЭК+39, доводили до 150 мМ, а затем добавляли 20 мкг/мл рифампицина и 5 мкМ ЦТФ. Открытый комплекс получали в течение 5 мин при 37°C в термостате Термит (ДНК-технология, Россия), а получение ЭК+39 и +39 проводили в течение 10 минут при 20°C и 25°C соответственно.

Очистка и анализ длины РНК-продуктов. РНК-продукты были очищены из препаратов ЭК с использованием реагента для выделения суммарной РНК ExtractRNA (Евроген, Россия). К пробам добавляли по 165 мкл реагента, инкубировали 5 мин при 25°C, добавляли по 35 мкл хлороформа, встряхивали и центрифугировали при температуре 4°C в течение 10 мин при максимальных оборотах в настольной центрифуге с охлаждением 5810R (Eppendorf, Германия). Супернатант отбирали, для осаждения НК добавляли 1/10 объема 3М ацетата натрия (pH 5,2), 1 мкл гликогена 20 мг/мл и 3 объема 96%-ного этилового спирта; пробы инкубировали при -20°C, затем НК осаждали центрифугированием при температуре 4°C в течение часа в центрифуге с охлаждением 5810R (Eppendorf, Германия) при максимальных оборотах. Осадок промывали 80%-ным охлажденным этанолом, высушивали и растворяли в 3 мкл безнуклеазной воды. Распределение транскриптов по длине анализировали методом денатурирующего электрофореза в ПААГ (8% АА:БА (38:2), 8 М мочевины, 1× Трис-боратный буфер, TBE – Tris-Borate-EDTA) в системе для секвенирующего электрофореза Sequi-Gen GT System (Bio-Rad, США). Перед нанесением к пробам добавляли равный объем денатурирующего буфера (95% (v/v) формамид, 0,1%-ный додецилсульфат натрия, 1× TBE) и прогревали в термостате Термит (ДНК-технология, Россия) при 98°C в течение 5 мин. Электрофорез прогретых проб проводили при 60 Вт в 1× буфере TBE в геле, предварительно разогретом в ходе предварительного электрофореза до 60–70°C. Визуализацию флуоресцентно-окрашенных транскриптов проводили на сканере Typhoon RGB (Cytiva, США).

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) с негативным контрастированием. Для исследования с использованием ПЭМ образцы комплексов наносились на поверхность медной сеточки, покрытой подложкой из аморфного углерода (EMCN, Китай), предварительно гидрофилизированной с помощью тлеющего разряда на установке EasyGlow (TedPella, США). Негативное контрастирование производилось 1%-ным раствором уранилацетата в течение 30 с. ПЭМ-изображения получены с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-2100 (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 200 кВ, при дефокусировке объективной линзы -1,8 мкм,

при увеличении, соответствующем калиброванному размеру пикселя 1,4 Å на камере DE-20 (Direct Electron, США). Автоматизированная съемка больших наборов изображений производилась с помощью программного обеспечения SerialEM версии 3.8 [21]. Структура комплексов анализировалась с помощью кластерного анализа большого количества проекций отдельных наблюдаемых на изображениях объектов (частиц). Для этого в программном обеспечении Relion 3.1 [22] определялись координаты таких объектов на исходных изображениях и вырезались соответствующие им фрагменты. Затем производились последовательные двумерные классификации, а получаемые классовые суммы оценивались визуально.

Результаты и обсуждение

Сборка ЭК+39 методом транскрипции *in vitro*.

Протокол транскрипции *in vitro* был аналогичен представленному ранее с некоторыми изменениями [23]. Получение ЭК+39 проводилась при 20°C, с увеличенной в два раза концентрацией рНТФ (40 мкМ АТФ, 40 мкМ ГТФ) с целью увеличения доли популяции продуктивных ранних иницирующих комплексов [24, 25]. Ранее ЭК+39 был получен с использованием нуклеосом, собранных с использованием донорного хроматина, лишённого H1 [23, 26]. В данной работе для получения более гомогенных нуклеосом вместо донорного хроматина из куриных эритроцитов использовали рекомбинантные очищенные октамеры гистонов человека (human Oct, hOct). Реконституцию hOct-нуклеосом проводили на ДНК-матрице T7A1-s603-40A-OneStep, позволяющей достигать

положения +39 без дополнительной остановки в положении –5 в процессе элонгации. Получение ЭК+39 без промежуточной элонгационной паузы и смены набора нуклеотидов после достижения положения –5 позволяет увеличить концентрацию ЭК в итоговом образце [23]. В результате сборка ЭК+39 осуществлялась с одной остановкой при ранней элонгации в положении –39 относительно входа в нуклеосому, которая требуется для синхронного старта РНКП во всех ЭК, и одной элонгационной целевой остановкой в положении +39 (рис. 1А).

Получение проб ЭК+39 при разных молярных соотношениях нуклеосома:РНКП. Для подтверждения сборки ЭК+39 путем *in vitro* транскрипции и оценки ее эффективности использовалась визуализация РНК-транскриптов целевой длины методом электрофореза в денатурирующих условиях (рис. 1В). Для ЭК+39 характерная длина транскрипта составляет 89 нуклеотидов. 89-нуклеотидные транскрипты получены для подтверждения сборки ЭК+39 как на нуклеосоме, так и на интактной ДНК в качестве контроля (рис. 1В).

С учетом образования динуклеосом (комплексов с двумя октамерами гистонов) как побочных продуктов реконституции концентрация целевых комплексов с одним октамером гистонов, или мононуклеосом, составила примерно половину от общей концентрации, добавленной ДНК (рис. 1Б). Исходя из этого, ЭК+39 собирали при двух эмпирически подобранных молярных соотношениях мононуклеосома:РНКП (1:4 и 1:2), не изменяя другие условия. Так, открытый комплекс (ОК) и ЭК+39 в обоих случаях были получены при

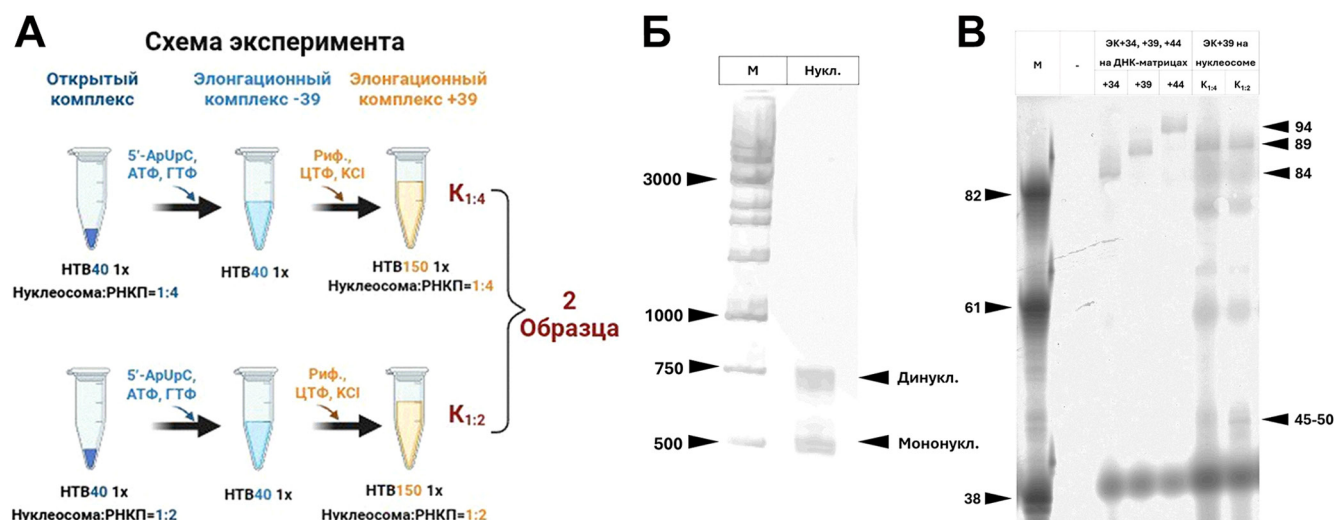


Рис. 1. Транскрипция hOct-нуклеосомы *in vitro*. **А** – схема эксперимента. $K_{1:4}$ – ЭК+39, полученный при соотношении мононуклеосома:РНКП равном 1:4 и при концентрации KCl 150 мМ; $K_{1:2}$ – ЭК+39, полученный при соотношении мононуклеосома:РНКП равном 1:2 и при концентрации KCl 150 мМ. **Б** – нативный гель-электрофорез нуклеосом, используемых для сборки ЭК+39. М – ДНК-маркер Thermo Scientific GeneRuler 1kb DNA Ladder, Нукл. – проба, полученная после реконституции нуклеосом; Динукл. – динуклеосома (комплекс ДНК-матрицы и двух октамеров гистонов), Мононукл. – мононуклеосома (комплекс ДНК-матрицы и одного октамера гистонов). Черными стрелками с цифрами отмечены положения и длины характерных фрагментов ДНК-маркера. **В** – анализ РНК-транскриптов, полученных в результате сборки ЭК+39, в денатурирующих условиях. +34, +39, +44 – ЭК с активным центром РНКП в положениях ДНК-матрицы +34, +39, +44 соответственно; $K_{1:4}$, $K_{1:2}$ – см. рис. 1А. Черными стрелками с цифрами отмечены положения и длины характерных фрагментов РНК-маркера.

концентрации 40 мМ KCl, а ЭК+39 — при концентрации 150 мМ KCl, как и в использованном ранее протоколе [23]. Контрольный образец ($K_{1:4}$), полученный при соотношении 1:4, продемонстрировал наиболее высокое относительное содержание ЭК+39 в денатурирующих условиях (рис. 1В). Для контрольного образца с соотношением моонуклеосома:РНКП равном 1:2 ($K_{1:2}$) эффективность образования транскрипта ЭК+39 оказалась ниже в сравнении с $K_{1:4}$. Также для этого образца наблюдалась дополнительная остановка в области $-(5-0)$ нуклеотидов от входа в нуклеосому, которой соответствуют РНК-транскрипты длиной 45–50 нт, что скорее всего обусловлено популяцией ЭК, не преодолевших нуклеосомный барьер (рис. 1В).

Структурное исследование ЭК+39 методом ПЭМ с негативным контрастированием. Для анализа структуры комплексов использовалась ПЭМ в негативном контрасте. На изображениях, полученных с образцов $K_{1:2}$ и $K_{1:4}$, были обнаружены как свободные РНКП и нуклеосомы, так и ЭК. Для повышения соотношения сигнал-шум и визуализации структуры транскрипционных ЭК была произведена двумерная классификация. С помощью 2D-классификации удалось выявить характерные усредненные проекции РНКП, нуклеосом и ЭК, представленные на рис. 2, а также оценить долю ЭК среди общего числа частиц. РНКП, нуклеосомы и ЭК входят в состав образца $K_{1:2}$ в процентных соотношениях 48%, 32% и 20%; а в состав образца $K_{1:4}$ — в соотношениях

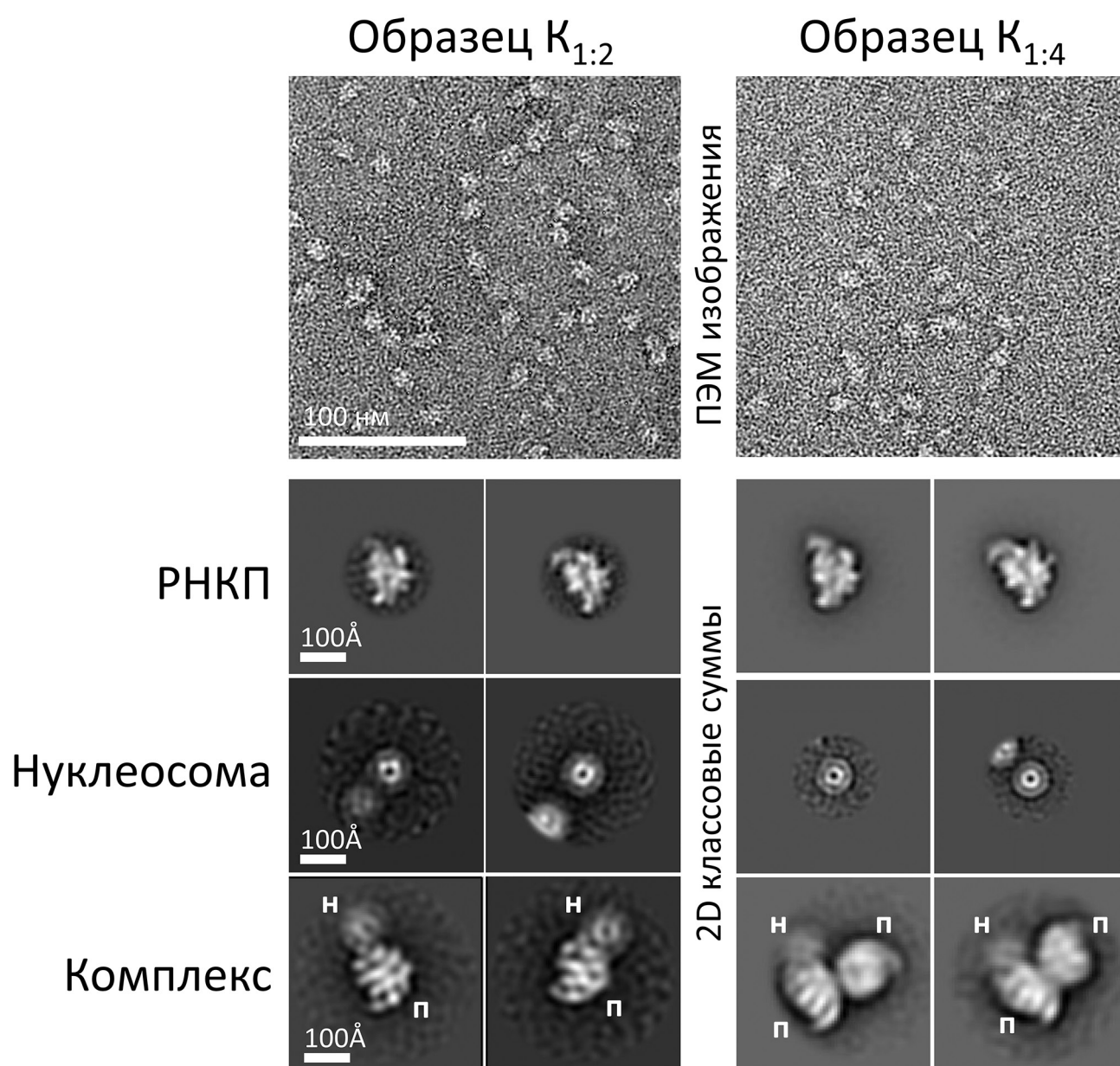


Рис. 2. Анализ структуры комплексов с помощью просвечивающей электронной микроскопии в негативном контрасте. 2D-классовые суммы получены в результате усреднения большого количества проекций отдельных объектов, представленных на ПЭМ-изображениях. Буквами отмечены: «н» — нуклеосома, «п» — РНК-полимераза.

88%, 7% и 5% соответственно. На классовых суммах образца $K_{1:2}$ видно, что РНКП с нуклеосомой образуют комплекс, при этом оба этих компонента одинаково четко разрешены, что свидетельствует о конформационной стабильности комплексов. Структура комплексов в образце $K_{1:4}$ включает в состав две РНКП и нуклеосому, при этом плотность, соответствующая нуклеосоме, разрешена слабо, что означает высокую подвижность нуклеосомы в таком комплексе. Наличие двух РНКП объясняется недостаточной инактивацией свободных РНКП рифампицином в условиях повышенной концентрации фермента и посадкой на нуклеосомную ДНК второй РНКП на стадии образования ЭК+39. На основании этих данных можно сделать выводы, что биохимические условия, использованные для сборки $K_{1:2}$ являются наиболее подходящими для исследования ЭК+39 методом ПЭМ из изученных. Наблюдаемые в обоих образцах комплексы гомогенны с точки зрения их состава и обладают высокой степенью чистоты, что делает возможным их дальнейшее исследование методами криоЭМ. Следующим этапом является оптимизация пробоподготовки, в частности витрификации в аморфном льду. Известно, что при витрификации макромолекулярные комплексы могут диссоциировать вследствие взаимодействия с границей раздела фаз жидкость–газ. Полученные в данной работе комплексы продемонстрировали стабильность при контакте с углеродной подложкой, поэтому имеются высокие шансы на сохранение их целостности и в условиях криоЭМ. Планируется проведение контрольных экспериментов с одновременной подготовкой проб для криоЭМ и для

микроскопии в негативном контрасте, что позволит оценить возможную диссоциацию комплексов и при необходимости скорректировать условия пробоподготовки. Применение криоэлектронной микроскопии откроет возможность более детального исследования структуры ЭК+39, в том числе в присутствии противораковых интеркаляторов.

Заключение

В данной работе сравнивалась эффективность сборки ЭК+39 при различном соотношении концентраций моонуклеосом и РНКП (1:2 или 1:4). Образцы были проанализированы методами денатурирующего электрофореза и просвечивающей электронной микроскопии с негативным контрастированием. Результаты указывают на то, что наиболее подходящими условиями для изучения ЭК методом электронной микроскопии являются соотношение моонуклеосом:РНКП равное 1:2. При увеличении этого соотношения наблюдается образование комплексов, в состав которых входят две РНКП и нуклеосома.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-24-00111 (<https://rscf.ru/project/24-24-00111/>). Исследования методом просвечивающей электронной микроскопии проводились на базе центра коллективного пользования «Электронная микроскопия в науках о жизни» с использованием уникальной научной установки «Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия». Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Landick R. The regulatory roles and mechanism of transcriptional pausing. *Biochem. Soc. Trans.* 2006;34(Pt. 6):1062–1066.
2. Farnung L., Vos S.M., Cramer P. Structure of transcribing RNA polymerase II-nucleosome complex. *Nat. Commun.* 2018;9(1):5432.
3. Kujirai T., Ehara H., Fujino Y., Shirouzu M., Sekine S.I., Kurumizaka H. Structural basis of the nucleosome transition during RNA polymerase II passage. *Science*. 2018;362(6414):595–598.
4. Ehara H., Kujirai T., Shirouzu M., Kurumizaka H., Sekine S. ichi. Structural basis of nucleosome disassembly and reassembly by RNAPII elongation complex with FACT. *Science*. 2022;377(6611):eabp9466.
5. Farnung L., Ochmann M., Garg G., Vos S.M., Cramer P. Structure of a backtracked hexasomal intermediate of nucleosome transcription. *Mol. Cell*. 2022;82(17):3126–3134.e7.
6. Osumi K., Kujirai T., Ehara H., Ogasawara M., Kinoshita C., Saotome M., Kagawa W., Sekine S.I., Takizawa Y., Kurumizaka H. Structural basis of damaged nucleotide recognition by transcribing RNA polymerase II in the nucleosome. *J. Mol. Biol.* 2023;435(13):168130.
7. Naganuma M., Kujirai T., Ehara H., Uejima T., Ito T., Goto M., Aoki M., Henmi M., Miyamoto-Kohno S., Shirouzu M., Kurumizaka H., Sekine S. ichi. Structural insights into promoter-proximal pausing of RNA polymerase II at +1 nucleosome. *Sci. Adv.* 2025;11(10):eadu0577.
8. Kujirai T., Kato J., Yamamoto K., Hirai S., Fujii T., Maehara K., Harada A., Negishi L., Ogasawara M., Yamaguchi Y., Ohkawa Y., Takizawa Y., Kurumizaka H. Multiple structures of RNA polymerase II isolated from human nuclei by ChIP-CryoEM analysis. *Nat. Commun.* 2025;16(1):4724.
9. Kulaeva O.I., Gaykalova D.A., Pestov N.A., Golovastov V.V., Vassilyev D.G., Artsimovitch I., Studitsky V.M. Mechanism of chromatin remodeling and recovery during passage of RNA polymerase II. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009;16(12):1272–1278.

10. Walter W., Kireeva M.L., Studitsky V.M., Kashlev M. Bacterial polymerase and yeast polymerase II use similar mechanisms for transcription through nucleosomes. *J. Biol. Chem.* 2003;278(38):36148–36156.
11. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Pestov N.A., Hsieh F.K., Studitsky V.M. Experimental analysis of the mechanism of chromatin remodeling by RNA polymerase II. *Nucleosomes, Histones and Chromatin Part A. Methods in Enzymology*, vol. 512. Eds. C. Wu and C.D. Allis. Academic Press; 2012:293–314.
12. Saba J., Chua X.Y., Mishanina T.V., Nayak D., Windgassen T.A., Mooney R.A., Landick R. The elemental mechanism of transcriptional pausing. *eLife*. 2019;8:e40981.
13. Song E., Hwang S., Munasingha P.R., Seo Y.S., Kang J.Y., Kang C., Hohng S. Transcriptional pause extension benefits the stand-by rather than catch-up Rho-dependent termination. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(6):2778–2789.
14. Gromak N., West S., Proudfoot N.J. Pause sites promote transcriptional termination of mammalian RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 2006;26(10):3986–3996.
15. Stoeger T., Grant R.A., McQuattie-Pimentel A.C., et al. Aging is associated with a systemic length-associated transcriptome imbalance. *Nat. Aging*. 2022;2(12):1191–1206.
16. Modur V., Singh N., Mohanty V., et al. Defective transcription elongation in a subset of cancers confers immunotherapy resistance. *Nat. Commun.* 2018;9(1):4410.
17. Chang H.W., Kulaeva O.I., Shaytan A.K., Kibanov M., Kuznedelov K., Severinov K.V., Kirpichnikov M.P., Clark D.J., Studitsky V.M. Analysis of the mechanism of nucleosome survival during transcription. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(3):1619–1627.
18. Artsimovitch I., Svetlov V., Murakami K.S., Landick R. Co-overexpression of *Escherichia coli* RNA polymerase subunits allows isolation and analysis of mutant enzymes lacking lineage-specific sequence insertions. *J. Biol. Chem.* 2003;278(14):12344–12355.
19. Luger K., Rechsteiner T.J., Richmond T.J. Preparation of nucleosome core particle from recombinant histones. *Chromatin. Methods in Enzymology*, vol. 304. Eds. P.M. Wassarman and A.P. Wolffe. Academic Press. 1999;304:3–19.
20. Klinker H., Haas C., Harrer N., Becker P.B., Mueller-Planitz F. Rapid purification of recombinant histones. *PLoS One*. 2014;9(8):e104029.
21. Mastronarde D.N. Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements. *J. Struct. Biol.* 2005;152(1):36–51.
22. Scheres S.H.W. RELION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *J. Struct. Biol.* 2012;180(3):519–530.
23. Chertkov O.V., Karlova M.G., Gerasimova N.S., Sokolova O.S. Purification of RNA polymerase elongation complexes for cryoelectron microscopy investigation. *Mosc. Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018;73(3):142–145.
24. Kubori T., Shimamoto N. A branched pathway in the early stage of transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 1996;256(3):449–457.
25. Plaskon D.M., Henderson K.L., Felth L.C., Molzahn C.M., Evensen C., Dyke S., Shkel I.A., Record M.T. Temperature effects on RNA polymerase initiation kinetics reveal which open complex initiates and that bubble collapse is stepwise. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2021;118(30):e2021941118.
26. Chertkov O.V., Karlova M.G., Studitsky V.M., Sokolova O.S. The three-dimensional structure of (+39) RNA-polymerase elongation complex determined by cryo-electron microscopy. *Microsc. Microanal.* 2019;25(S2):1332–1333.

Поступила в редакцию 30.06.2025

После доработки 19.08.2025

Принята в печать 23.08.2025

RESEARCH ARTICLE

Sample preparation of the elongation complex +39 for cryo-electron microscopy

**E.V. Osina¹ , A.V. Moiseenko¹ , A.N. Korovina¹ , N.S. Gerasimova¹ , O.I. Volokh¹ ,
V.M. Studitsky^{1, 2} , T.B. Stanishneva-Konovalova^{1, *} **

¹Department of Bioengineering, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–73 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia;

²Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave., Philadelphia, 19111, Pennsylvania, USA

*e-mail: stanishneva-konovalova@mail.bio.msu.ru

Transcription in the cell is carried out by specialized enzymes – RNA polymerases. RNA polymerases transcribe DNA with the formation of elongation complexes (EC), which have a regulatory significance. Cryo-electron microscopy (cryo-EM) allows obtaining the structures of these complexes and clarifying the mechanisms of transcription stages. However, the preparation of

EC samples suitable for cryo-EM studies presents certain challenges. In this work, a selection of protocols for the preparation of EC+39 samples was carried out. The formation of complexes is confirmed by the results of electrophoresis and negative stain electron microscopy. The results obtained can be used to study EC+39 by the cryo-EM method.

Keywords: *elongation complex, polymerase, nucleosome, chromatin, cryo-electron microscopy*

Funding: This research was supported by the Russian Science Foundation (project no. 24-24-00111).

Сведения об авторах

Осина Елизавета Васильевна — мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-59; e-mail: osina.elizaveta00@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-0617-9019>

Моисеенко Андрей Владимирович — науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-59; e-mail: postmoiseenko@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1112-2356>

Коровина Анна Николаевна — канд. биол. наук, мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: anna.korovina@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9240-9054>

Герасимова Надежда Сергеевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: shordome@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5048-0378>

Волох Олеся Игоревна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: olesyavolokh@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2261-9587>

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7389-7993>

Станишнев-Коновалова Татьяна Борисовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: stanishneva-konovalova@mail.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8427-8178>