

**Разработка метода получения структуры элонгационного комплекса +39 с помощью криоэлектронной микроскопии**

**Научный руководитель – Соколова Ольга Сергеевна**

*Осина Елизавета Васильевна*

*Студент (магистр)*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биоинженерии, Москва, Россия

*E-mail: osina.elizaveta00@mail.ru*

Транскрипция - это процесс синтеза молекулы РНК на матрице ДНК, осуществляемый ДНК-зависимыми РНК-полимеразами (РНКП). РНКП *E. coli* является классическим модельным объектом для структурных исследований [3]. У эукариот нуклеосомы представляют собой значительный барьер для транскрипции РНКП II [1]. РНКП II проходит нуклеосомную ДНК с характерными паттернами паузирования, образуя промежуточные элонгационные комплексы (ЭК) [2]. Показано, что РНКП *E. coli* и РНКП II имеют общий механизм транскрипции хроматина [5]. При прохождении этими ферментами определённых позиций нуклеосомы, в том числе +39 позиции относительно входа в нуклеосому (ЭК+39), образуется петля малого размера с восстановлением исходных ДНК-гистоновых контактов - так называемая, Ø-петля [1]. Установление точного механизма этого процесса и структур ЭК необходимо для понимания регуляции экспрессии генов.

Цель данного исследования - определить структуру ЭК +39 и подтвердить образование Ø-петли с помощью биохимических подходов и электронной микроскопии. Первым шагом была разработка протокола структурного исследования РНКП *E. coli* методом криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ), а затем протокола эффективной сборки ЭК +39. После очистки РНКП *E. coli* чистота и гомогенность полученного образца были подтверждены методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). Далее образец исследовали методом крио-ЭМ с предварительным подбором условий. Исследования методами ТЭМ и крио-ЭМ проводили на базе ЦКП "Электронная микроскопия в науках о жизни" МГУ. С помощью программного обеспечения cryoSPARC была получена предварительная 3D-модель фермента в нативной конформации с разрешением 13 Å, что позволяет использовать данный протокол для определения структуры ЭК +39. Для остановки РНКП в +39 позиции в отсутствие УТФ была сконструирована 603 нуклеосом-позиционирующая последовательность, не содержащая остатков АМФ до позиции 40. Нуклеосомы с октамерами гистонов человека были собраны на данной матрице путем диализа. ЭК +39 с нуклеосомой и РНКП в положении +39 был получен путем *in vitro* транскрипции. Заключительный этап работы предполагает исследование структуры ЕС +39 методом крио-ЭМ. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-24-00111, <http://rscf.ru/project/24-24-00111/>

### **Источники и литература**

- 1) Kulaeva, O. I., Gaykalova, D. A., Pestov, N. A., Golovastov, V. V., Vassylyev, D. G., Artsimovitch, I., Studitsky, V. M. Mechanism of chromatin remodeling and recovery during passage of RNA polymerase II // *Nature structural & molecular biology*, 16(12), 1272–1278.
- 2) Landick R. The regulatory roles and mechanism of transcriptional pausing // *Biochemical Society transactions*, 34(Pt 6), 1062–1066.

- 3) Murakami, K. S., Darst, S. A. Bacterial RNA polymerases: the whole story // *Current opinion in structural biology*, 13(1), 31–39.
- 4) Walter, W., Kireeva, M. L., Studitsky, V. M., & Kashlev, M. Bacterial polymerase and yeast polymerase II use similar mechanisms for transcription through nucleosomes // *The Journal of biological chemistry*, 278(38), 36148–36156.