

УДК 577.323.7

АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ЭЛОНГАЦИОННЫХ КОМПЛЕКСОВ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ МЕТОДОМ ФЁРСТЕРОВСКОГО РЕЗОНАНСНОГО ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ

© 2022 г. Н.С. Герасимова*, А.Н. Коровина*, Д.А. Афонин*,
К.В. Шайтан*, А.В. Феофанов*, В.М. Студитский*, **

* Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
119234, Москва, Ленинские горы, 1/12

** Центр исследований рака Фокс Чейз, Филадельфия, PA 19111-2497, США

E-mail: shordome@gmail.com

Поступила в редакцию 10.12.2021 г.

После доработки 13.01.2022 г.

Принята к публикации 14.01.2022 г.

Для изучения структурных особенностей остановленных элонгационных комплексов, формирующихся в ходе транскрипции нуклеосом РНК-полимеразой 2, предложено использовать подход, основанный на измерении эффективности фёрстеровского резонансного переноса энергии в полиакриламидном геле после разделения интермедиатов транскрипции методом электрофореза. Флуоресцентно-меченые нуклеосомы были получены путем введения пары флуорофоров (донора и акцептора) в соседние супервитки нуклеосомной ДНК. Остановленные элонгационные комплексы формировали, проводя транскрипцию нуклеосом в присутствии ограниченного набора нуклеозидтрифосфатов. Сравнительный анализ эффективности фёрстеровского резонансного переноса энергии для свободных нуклеосом и полученных на их основе элонгационных комплексов с РНК-полимеразой 2 выявил изменение структуры нуклеосом в составе элонгационных комплексов. Показано, что элонгационные комплексы с одинаковой длиной РНК могут существовать в различных конформационных состояниях.

Ключевые слова: транскрипция, хроматин, нуклеосома, РНКП 2, FRET, элонгационный комплекс

DOI: 10.31857/S0006302922020028

Эукариотическая ядерная ДНК организована с привлечением большого количества ядерных белков в надмолекулярную нуклеопротеидную структуру – хроматин. Минимальной единицей хроматина является нуклеосома, которая состоит из участка ДНК длиной 145–147 п.н., накрученного на октамер белков-гистонов, включающий центральный тетрамер (H3-H4)₂ и два димера H2A-H2B [1]. Нуклеосомная упаковка затрудняет доступ ферментов и белковых факторов к ДНК, поэтому существуют специальные механизмы взаимодействия белков с нуклеосомой, обеспечивающие успешное протекание процессов транскрипции, репликации и репарации эукариотической ядерной ДНК.

Сокращения: РНКП 2 – РНК-полимераза 2, ЭК – элонгационный комплекс, FRET – фёрстеровский резонансный перенос энергии (Förster resonance energy transfer), ПААГ – полиакриламидный гель, ЭК-5 – элонгационный комплекс с расположением активного центра РНК-полимеразы за 5 п.н. до входа в нуклеосомную ДНК.

Все матричные РНК и большинство клеточных некодирующих регуляторных РНК синтезируются РНК-полимеразой 2 (РНКП 2). Несмотря на то, что хроматин удаляется при активации генов в живых клетках, кодирующие области умеренно транскрибируемых генов остаются упакованными в нуклеосомы [2], таким образом, РНКП 2 встречается с нуклеосомами во время элонгации транскриптов. Нуклеосома представляет собой барьер для РНКП 2 [3–6], для его преодоления транскрипция в хроматине происходит по сложному механизму, включающему формирование внутринуклеосомных петель ДНК и обеспечивающему сохранение тетрамера гистонов (H3-H4)₂ и одного из димеров H2A-H2B на ДНК во время транскрипции [7–9].

Продвижение РНКП 2 вдоль протяженных участков ДНК, организованных в нуклеосомы (более сотен тысяч п.н.), происходит с высокой скоростью (3–4 тысячи п.н. в минуту [10]). Подобная скорость транскрипции наблюдается *in vitro* на ДНК, свободной от гистонов [11, 12].

Это достигается за счет действия белковых факторов. Ключевые данные для понимания механизмов действия факторов позволяют получать структурные исследования [13–16].

В настоящей работе для изучения структурных особенностей элонгационных комплексов (ЭК) РНКП 2 с нуклеосомой применен разработанный ранее метод анализа нуклеосом в полиакриламидном геле методом детекции фёрстеровского резонансного переноса энергии (FRET, Förster resonance energy transfer) [17]. Основным инструментом для детекции структурных перестроек в нуклеосомной ДНК в этих исследованиях были флуоресцентные метки, составляющие пару для наблюдения FRET. Эффективность такого переноса энергии зависит от расстояния между метками. Ранее была показана успешность применения таких нуклеосом для изучения процесса транскрипции с детекцией FRET [18], однако в некоторых случаях анализ невозможен без предварительного разделения комплексов в полиакриламидном геле (ПААГ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Матрица ДНК. Работу проводили на ДНК с позиционирующей нуклеосомой последовательностью 603 [19]: 5'd(CAAGCGACACCGGCACTGGG^CCCCGGTTCGCGCTCCCTCCTTCCGTGTGTTGTCGTCTCTCGGGCGTCTAAGTACGCTTTCACCTCGGGCTTCTAAGTACGCTTAGCGCACGGTAGAGCGCAATCCAAGGCTAACCACCGTGCATCGATGTTGGAAGAGGCCCTCCGTCSTGAATTCTTCAAGTCCCTGGGGTACGGATCCGACG)3' (последовательность 603 подчеркнута, сайт узнавания *TspRI* выделен полужирным шрифтом, место разрезания сахарофосфатного остова указано знаком ^). Плазмида, содержащая последовательность 603 [19], была любезно предоставлена доктором Дж. Видомом.

Аmplификацию фрагментов ДНК проводили методом полимеразной цепной реакции с использованием флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов ProxFw40 (5'd(CAAGCGACACCGGCACTGGGC-CCGGTTCGCGCT*CCCTCCTT-CCGTGTGTTGTCGTCTCTCGGGCGTCTAAGTACGCTT)) и ProxRev (5'd(ACCCAGGGACTTGAAGTAATAAGGACGGAGGGCCTCTTTCAACATCGATGCACGGT#GGTTAG)) (по 0.5 мкМ каждый) (IDT, Германия), где Т* и Т# – соответственно Су3- и Су5-меченые нуклеотиды. В качестве матрицы использована плазмида с модифицированной последовательностью. Реакцию проводили в буфере для Taq-ДНК-полимеразы, содержащем 3 мМ MgCl₂, дезоксирибонуклеотиды (в концентрации 0.2 мМ каждый) и Taq-ДНК-полимеразу (0.05 ед. акт./мкл). Все реактивы производства компании «Евроген» (Россия). Пробы инкубировали 3 мин при 94°C, осу-

ществляли 30 циклов повторения 93°C 10 с, 55°C 10 с, 72°C 15 с и дополнительно выдерживали 3 мин при 72°C в программируемом термостате Veriti Thermal Cycler (Life Technologies, США). Продукты амплификации очищали от компонентов реакции с использованием набора для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей Cleanup Standard («Евроген», Россия).

Для получения «липкого» конца для лигирования элонгационного комплекса РНКП 2 полученную ДНК инкубировали с ферментом *TspRI* в буфере CutSmart (NEB, США). Эффективность реакции определяли методом электрофореза в 8%-м ПААГ (соотношение акриламида и бисакриламида 19 : 1) в денатурирующих условиях в присутствии мочевины в концентрации 8 М в 0.5× буфере TBE (44.5 мМ триса, 44.5 мМ борной кислоты, 1 мМ ЭДТА) в камере для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, США). Определение длин одноцепочечных фрагментов ДНК проводили по сигналу флуоресцентной метки с помощью лазерного сканера Amersham Typhoon RGB (Cytiva, Швеция). ДНК-фрагменты, расщепленные эндонуклеазой с эффективностью не менее 95%, очищали методом препаративного электрофореза. Полученные фрагменты ДНК разделяли в ходе электрофореза (4–6 В/см, 2 ч) в 1.5%-м агарозном геле в 0.5× буфере TBE с добавкой 4 М мочевины в камере для горизонтального электрофореза Mini-Sub Cell GT («Bio-Rad Laboratories», США). Концентрацию ДНК измеряли спектрофотометрически с использованием оборудования Nanodrop 2000c UV-Vis CC (Thermo Fisher Scientific, США).

Сборку нуклеосом на анализируемых фрагментах ДНК проводили методом ступенчатого диализа против буферных растворов с понижающейся ионной силой. В качестве источника октамеров гистонов использовали хроматин без линкерных гистонов, выделенный из эритроцитов цыплят согласно протоколу, подробно описанному в работе [20]. Так, в буфере, содержащем 10 мМ трис-НСl, рН 7.5, 0.1% NP-40, 0.2 мМ ЭДТА, 5 мМ бета-меркаптоэтанол и 1 М NaCl, смешивали фрагменты ДНК и хроматин в соотношении 1 : 4 по массе ДНК (например, 2 мкг синтетических фрагментов и 8 мкг хроматина). Диализ проводили при температуре 4°C против буферных растворов, содержащих 10 мМ трис-НСl, рН 7.5, 0.1% NP-40, 0.2 мМ ЭДТА, 5 мМ бета-меркаптоэтанол и хлористый натрий в понижающейся концентрации (1 М в первом буфере, инкубация 1 ч; 0.75 М – 1 ч; 0.5 М – 2.5 ч; 0.01 М – в течение ночи). Анализ продуктов сборки проводили методом электрофоретического разделения в 4.5%-м ПААГ в 0.5× буфере TBE в камере для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, США).

Очистку РНК-полимеразы 2 *Saccharomyces cerevisiae* проводили по методике, описанной в работе [21].

Транскрипцию нуклеосом РНК-полимеразой 2 начинали со сборки элонгационных комплексов РНКП 2 (200 нМ), дуплекса матричной ДНК и РНК и нематричной цепи ДНК при 25°C в течение 15 мин в транскрипционном буфере ТВ40 (20 мМ трис HCl, pH 7.9, 5 мМ MgCl₂, 40 мМ KCl и 1 мМ бета-меркаптоэтанол) (номер ТВ обозначает концентрацию KCl, процесс сборки элонгационного комплекса с указанием используемых олигонуклеотидов подробно описан в работе [22]). Полученный ЭК лигировали с нуклеосомным фрагментом (40 нМ) в присутствии 0.2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 1% полиэтиленгликоля-8000, 0.5 мМ АТФ и ДНК-лигазы бактериофага Т4 в течение 16 ч при 4°C. Добавляли ГТФ и АТФ до концентрации 10 мкМ, ЦТФ до концентрации 2 мкМ и инкубировали 15 мин при 25°C. Таким образом получали ЭК с расположением активного центра РНКП 2 на расстоянии 5 нт до входа в нуклеосомную ДНК (ЭК-5). После добавления всех нуклеозидтрифосфатов в концентрации 400 мкМ и KCl до 150 мМ элонгацию транскрипта продолжали 10 мин при 25°C. Реакцию останавливали добавлением ЭДТА (pH 8.0) до концентрации 20 мМ. Продукты анализировали электрофоретическим разделением в 4.5%-м ПААГ (соотношение акриламида и бисакриламида 39 : 1) в нативных условиях (в 8 М мочевины) в 0.5× буфере TBE в камере для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN Tetra Cell при 4°C. Пробы растворяли в буфере, содержащем 40% сахарозы. Распределение продуктов в геле анализировали с помощью системы детекции флуоресцентного сигнала лазерного сканера Amersham Turphoon RGB (Cytiva, Швеция). Было проведено по три независимых эксперимента. Количественный анализ проводили с использованием программного обеспечения Fiji ImageJ, как описано ранее [17], предел погрешностей определяли как стандартное отклонение значений в выборке.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальная система транскрипции хроматина *in vitro*. В данной работе процесс транскрипции хроматина изучали в экспериментальной системе, состоящей из собранных на коротких фрагментах ДНК одиночных нуклеосом и высокоочищенных белков [19]. Для точного позиционирования октамера гистонов в ДНК была внесена высокоаффинная последовательность 603 [23]. Такие нуклеосомы представляют собой асимметричный барьер для РНКП 2 [24], то есть его высота зависит от ориентации последовательности относительно промотора. Здесь была ис-

пользована так называемая «пропускающая» транскрипционная ориентация, которая лучше воспроизводит основные свойства транскрипции хроматина РНКП 2 *in vivo*, такие как сохранение тетрамера гистонов H3/H4 на ДНК и потерю части димеров гистонов H2A/H2B [25, 26]. В ходе амплификации в ДНК в составе синтетических олигонуклеотидов (затравок для ПЦР) внесены флуоресцентные метки, которые при сборке нуклеосом оказываются в соседних супервитках ДНК и составляют FRET-пару (Су3 в качестве донора энергии и Су5 — в качестве акцептора) (рис. 1а). Такие нуклеосомы позволяют наблюдать за конформационными изменениями в ДНК (рис. 1б), сопутствующими различным процессам, например, транскрипции нуклеосомной ДНК.

Схема эксперимента по транскрипции представлена на рис. 1в. Элонгационный комплекс собирали из РНКП 2, дуплекса матричной ДНК и РНК и нематричной цепи ДНК, лигировали с нуклеосомным фрагментом, добавляли ограниченный набор рибонуклеозидтрифосфатов (АТФ, ЦТФ, ГТФ). Так получали ЭК с расположением активного центра РНКП 2 за 5 нт до входа в нуклеосомную ДНК (ЭК-5). После добавления всех НТФ в концентрации 400 мкМ элонгацию транскрипта продолжали. ЭК разделяли методом электрофореза в ПААГ в нативных условиях и изучали методом «FRET-в-геле» [17].

FRET в свободных нуклеосомах. Согласно схеме эксперимента методом ПЦР были получены фрагменты ДНК, включающие небольшой участок ДНК для лигирования элонгационного комплекса и модифицированную для получения остановленных в определенном положении элонгационных комплексов последовательность 603 (рис. 1а, дорожка «ДНК»). На полученных фрагментах ДНК методом ступенчатого диализа против растворов с понижающейся ионной силой в присутствии донорного хроматина без линкерных гистонов были собраны нуклеосомы (рис. 1а, дорожка «Нуклеосома»). Условия процедуры подбирали так, чтобы минимизировать количество свободной ДНК. В дальнейшей работе использовали только смеси, содержащие не менее 90% мононуклеосом.

Эффективность FRET (E_{FRET}) свободных нуклеосом (рис. 1а и 2а) была определена по методике, описанной в работе [17], и составила $51.4 \pm 1.3\%$ (рис. 2б). Полученное значение близко к тому, которое ранее получали этим методом для нуклеосом с тем же расположением флуоресцентных меток и другой структурой линкерной ДНК [17].

Элонгационные комплексы с одинаковой длиной РНК могут иметь различную конформацию. Была проведена транскрипция полученных нуклеосом

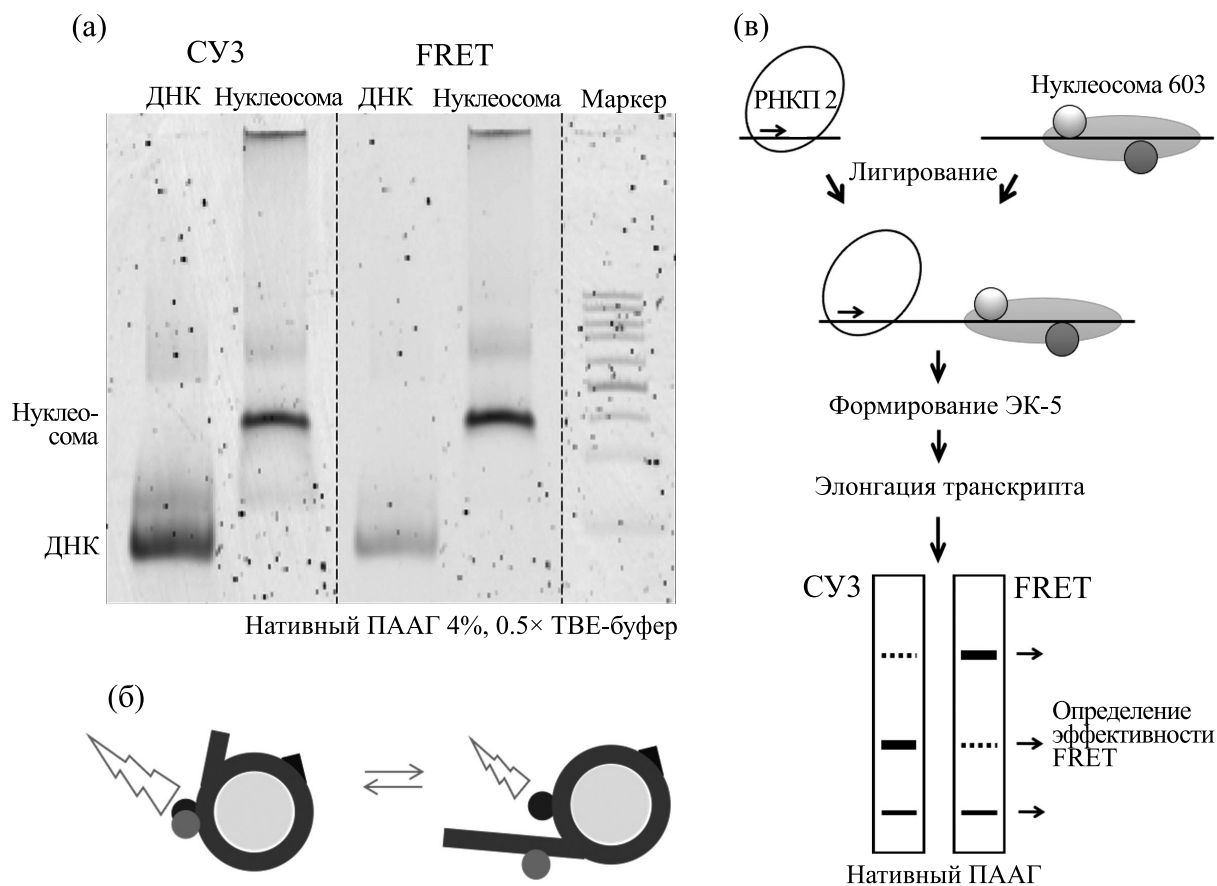


Рис. 1. Экспериментальная система для изучения структурных особенностей элонгационных комплексов, формирующихся в ходе транскрипции нуклеосом РНКП 2. (а) – Получение флуоресцентно-меченых нуклеосом. В соседние супервитки нуклеосомной ДНК введены флуоресцентные метки Су3 и Су5, представляющие собой донор-акцепторную пару при фёрстеровском резонансном переносе энергии. В свободной ДНК метки находятся далеко друг от друга, и FRET между ними не происходит (слабый сигнал от ДНК при детекции FRET и высокий при детекции сигнала от Су3). При формировании нуклеосомы метки оказываются сближенными, и между ними происходит перенос энергии (интенсивности сигналов близки при детекции FRET и Су3 от нуклеосомы). (б) – Когда под действием какого-либо фактора нуклеосомная ДНК отворачивается от октамера гистонов, происходит расхождение флуоресцентных меток в пространстве и наблюдаемый сигнал FRET снижается. (в) – Схема транскрипционного эксперимента. Элонгационный комплекс собирается из РНКП 2, ДНК-олигонуклеотидов, представляющих собой матричную и нематричную цепи дуплекса ДНК, и затравочного РНК-олигонуклеотида, по последовательности комплементарного матричному ДНК-олигонуклеотиду. К полученному ЭК лигируется нуклеосома. При добавлении ограниченного набора нуклеотидов происходит формирование ЭК-5, в котором активный центр РНКП 2 расположен на расстоянии 5 п.н. до входа в нуклеосому. После добавления всех рибонуклеозидтрифосфатов транскрипция продолжается. На любом этапе реакции продукты могут быть проанализированы методом электрофореза в полиакриламидном геле с последующим определением эффективности FRET.

РНКП 2 по схеме, приведенной на рис. 1в. После разделения методом ЭФ в 4%-м ПААГ в нативных условиях продукты проанализированы методом «FRET-в-геле». Результаты эксперимента для одной из повторностей приведены на рис. 2а.

При добавлении ограниченного набора рибонуклеотидов – АТФ, ГТФ и ЦТФ – РНКП 2 занимает положение за 5 нт до входа в нуклеосому (рис. 2а, дорожка «ЭК-5»). При формировании ЭК-5 наблюдается два ЭК, обладающих разной электрофоретической подвижностью. Следует

отметить, что в связи с использованным в реакции избытком мононуклеосом большое количество их сохранилось в реакционной смеси (рис. 2в, высокие пики на графиках), однако в данном случае за счет разделения ЭК в геле они не влияли на интерпретацию полученных данных. Это является преимуществом применяемого метода.

Обнаружено, что один из двух комплексов не отличается по эффективности FRET от свободной нуклеосомы ($51.7 \pm 0.8\%$) и мигрирует с за-

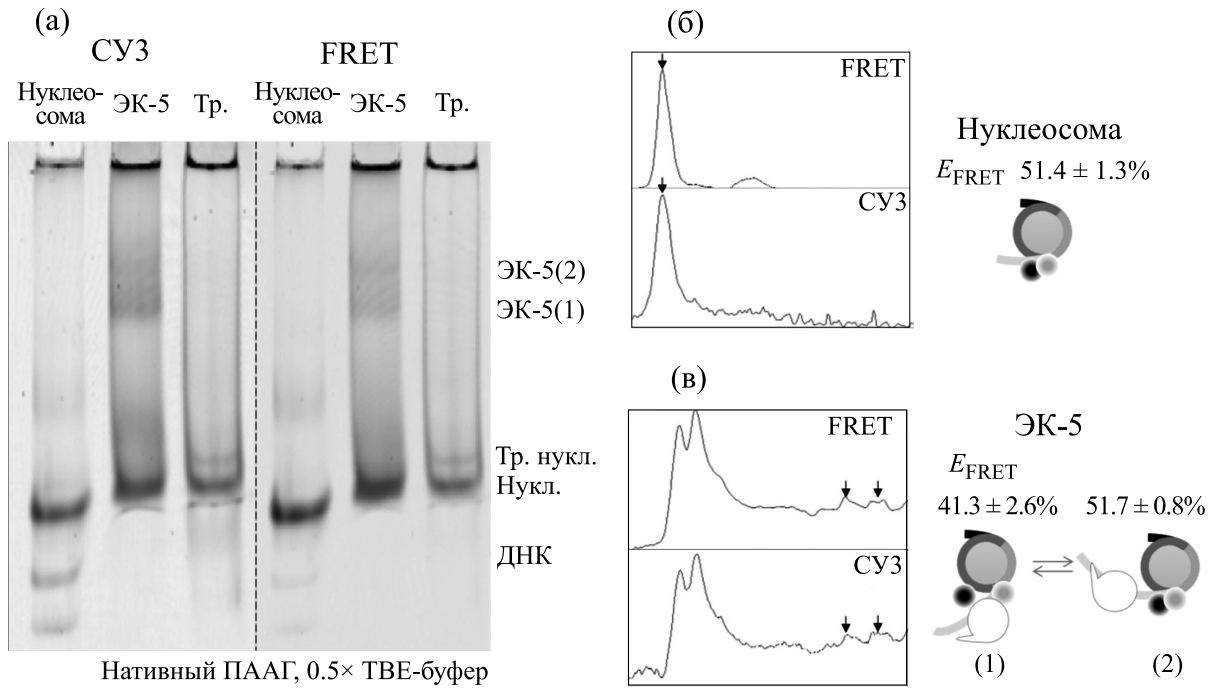


Рис. 2. Изучение структуры элонгационных комплексов (ЭК) методом FRET в полиакриламидном геле. (а) – По схеме, приведенной на рис. 1в, на флуоресцентно-меченых нуклеосомах получены ЭК и разделены методом электрофореза в нативном ПААГ. (б, в) – Интенсивности флуоресцентных сигналов в геле, измеренные с помощью флуоресцентного сканера, были проанализированы с помощью программы ImageJ. Проведен анализ интенсивностей флуоресценции Cy3 и Cy5 при возбуждении флуорофора Cy3, рассчитана эффективность FRET в нуклеосомах и ЭК-5. Справа на рисунке приведена интерпретация полученных данных: схематично показаны предполагаемые структуры двух комплексов ЭК-5 (комплекс 1 и комплекс 2) с указанием среднего значения FRET.

метно меньшей подвижностью, чем нуклеосома. Другой комплекс отличается несколько большей подвижностью и сниженным FRET ($41.3 \pm 2.6\%$) (рис. 2, дорожка «ЭК-5»). Предположительно, ЭК-5 может существовать в двух формах – с компактной нуклеосомой и отдаленным расположением РНКП 2 (возможно, с откатом фермента назад по матрице ДНК) и с небольшим отворачиванием проксимального к промотору участка ДНК. Так, достижение положения 5 относительно нуклеосомы может быть связано с отворачиванием ДНК.

При добавлении всех рибонуклеотидов РНКП 2 продолжает элонгацию через нуклеосомную ДНК. Через 10 мин транскрипции происходит эффективное высвобождение нуклеосом из элонгационных комплексов. Процесс также сопровождается образованием свободной ДНК. В таком случае флуоресцентные метки удалены друг от друга, и эффективность FRET падает до исходной, наблюдаемой в свободной ДНК. Через 10 с после начала транскрипции из активных элонгационных комплексов высвобождается 8% свободной ДНК, через 10 мин – 24%. Эти резуль-

таты согласуются с полученными ранее данными о характерных особенностях транскрипции хроматина РНКП 2 *in vitro* [27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе для определения структурных особенностей остановленных элонгационных комплексов, формирующихся в ходе транскрипции нуклеосом РНК-полимеразой 2 был использован подход, основанный на измерении эффективности FRET в полиакриламидном геле после разделения интермедиатов транскрипции методом электрофореза. Такой подход может быть успешно применен для анализа длительно живущих элонгационных комплексах, спонтанно образующихся в ходе транскрипции в течение ограниченного времени, а также для остановленных комплексов, образуемых в ходе транскрипции специально сконструированных матриц в присутствии ограниченного набора рибонуклеозидтрифосфатов.

Необходимо отметить, что полученные данные не могут быть использованы для точного

определения расстояния между флуоресцентными метками и построения молекулярных моделей, так как расчет эффективности FRET производится без учета квантовых выходов флуоресценции и влияния белков на эффективность FRET. На основе полученных данных можно сделать выводы относительно изменения конформации нуклеосомной ДНК и соответственно общей структуры ЭК. Так, в настоящем исследовании было обнаружено, что ЭК-5 может существовать в различных конформационных состояниях.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено с использованием инфраструктурных возможностей Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-44-02013).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. K. Luger, A. W. Mäder, R. K. Richmond, et al., *Nature* **389**, 251 (1997). DOI: 10.1038/38444
2. G. A. Hartzog, J. L. Speer, and D. L. Lindstrom, *Biochim. Biophys. Acta* **1577**, 276 (2002).
3. M. G. Izban and D. S. Luse, *Genes Dev.* **6**, 1342 (1992).
4. M. L. Kireeva, W. Walter, V. Tchernajenko, et al., *Mol. Cell* **9**, 541 (2002). DOI: 10.1016/j.molcel.2005.02.027.
5. L. S. Churchman and J. S. Weissman, *Nature* **469**, 368 (2011). DOI: 10.1038/nature09652
6. C. M. Weber, S. Ramachandran, and S. Henikoff, *Mol. Cell* **53**, 819 (2014). DOI: 10.1016/j.molcel.2014.02.014
7. O. I. Kulaeva, D. A. Gaykalova, N. A. Pestov, et al., *Nature Struct. Mol. Biol.* **16**, 1272 (2009). DOI: 10.1038/nsmb.1689
8. N. A. Pestov, N. S. Gerasimova, O. I. Kulaeva, and V. M. Studitsky, *Sci. Adv.* **1**, e1500021 (2015). DOI: 10.1126/sciadv.1500021
9. N. S. Gerasimova, N. A. Pestov, O. I. Kulaeva, et al., *Transcription* **7**, 91 (2016). DOI: 10.1080/21541264.2016.1182240
10. J. Singh and R. A. Padgett, *Nature Struct. Mol. Biol.* **16**, 1128 (2009). DOI: 10.1038/nsmb.1666
11. M. G. Izban and D. S. Luse, *J. Biol. Chem.* **267**, 13647 (1992).
12. B. Cheng and D. H. Price, *J. Biol. Chem.* **282**, 21901 (2007). DOI: 10.1074/jbc.M702936200
13. H. Ehara, T. Kujirai, Y. Fujino, et al., *Science* **363**, 744 (2019). DOI: 10.1126/science.aav8912
14. W. Kobayashi and H. Kurumizaka, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **59**, 107 (2019). DOI: 10.1016/j.sbi.2019.07.011
15. T. Kujirai, H. Ehara, Y. Fujino, et al., *Science* **362**, 595 (2018). DOI: 10.1126/science.aau9904
16. D. A. Gaykalova, O. I. Kulaeva, O. Volokh, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, E5787 (2015). DOI: 10.1073/pnas.1508371112
17. O. V. Chertkov, M. E. Valieva, N. V. Malyuchenko, and A. V. Feofanov, *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* **72**, 196 (2017). DOI: 10.3103/S0096392517040034.
18. K. S. Kudryashova, O. V. Chertkov, D. V. Nikitin, et al., in: *Chromatin Protocols (Methods in Molecular Biology, vol. 1288)*, Ed. by S. Chellappan (Humana Press, New York, 2015), pp. 395–412. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2474-5_23
19. A. Thastrom, P. T. Lowary, H. R. Widlund, et al., *J. Mol. Biol.* **288**, 213 (1999).
20. W. Walter, M. L. Kireeva, V. Tchernajenko, et al., *Methods Enzymol.* **371**, 564 (2003). DOI: 10.1016/S0076-6879(03)71042-8
21. M. L. Kireeva, N. Komissarova, D. S. Waugh, and M. Kashlev, *J. Biol. Chem.* **275**, 6530 (2000).
22. H. W. Chang, F. K. Hsieh, S. S. Patel, and V. M. Studitsky, *Methods* **159–160**, 90 (2019). DOI: 10.1016/j.ymeth.2019.01.016
23. P. T. Lowary and J. Widom, *J. Mol. Biol.* **276**, 19 (1998). DOI: 10.1006/jmbi.1997.1494
24. V. A. Bondarenko, L. M. Steele, A. Ujvari, et al., *Mol. Cell* **24**, 469 (2006). DOI: 10.1016/j.molcel.2006.09.009
25. H. W. Chang, O. I. Kulaeva, A. K. Shaytan, et al., *Nucl. Acids Res.* **42**, 1619 (2014). DOI: 10.1093/nar/gkt1120
26. O. I. Kulaeva, D. A. Gaykalova, N. A. Pestov, et al., *Nature Struct. Mol. Biol.* **16**, 1272 (2009). DOI: 10.1038/nsmb.1689
27. D. A. Gaykalova, V. Nagarajavel, V. A. Bondarenko, et al., *Nucl. Acids Res.* **39**, 3520 (2011). DOI: 10.1093/nar/gkq1273

Analysis of Structure of Elongation Complexes in Polyacrylamide Gel with Förster Resonance Energy Transfer Technique

N.S. Gerasimova*, **A.N. Korovina***, **D.A. Afonin***, **K.V. Shaytan***,
A.V. Feofanov*, and **V.M. Studitsky***, **

**Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia*

***Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA 19111-2497, USA*

To study the structural features of elongation complexes formed during nucleosome transcription by RNA polymerase 2, it was proposed to use an approach based on the measurement of the efficiency of Förster resonance energy transfer in polyacrylamide gel after separation of transcription intermediates by electrophoresis. Fluorescently labeled nucleosomes were obtained by introducing a pair of fluorophores (donor and acceptor) into adjacent gyres of nucleosomal DNA. Stalled elongation complexes were formed by transcription of nucleosomes in the presence of a limited set of nucleoside triphosphates. Comparative analysis of the efficiency of Förster resonance energy transfer for free nucleosomes and elongation complexes with RNA polymerase 2 obtained on their basis revealed changes in the structure of nucleosomes in elongation complexes. It was found that elongation complexes with the same RNA length could exist in different conformational states.

Keywords: transcription, chromatin, nucleosome, RNA polymerase 2, FRET, elongation complex