БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2017, том 43, № 6, с. 637–643

УДК 577.214.32

ОЧИСТКА И КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АФФИННОГО МОНОСЛОЯ[1]

© 2017 г. М. Г. Карлова*, О. И. Волох*, О. В. Чертков*, М. П. Кирпичников*, **, В. М. Студитский*, *, О. С. Соколова*, #**

**Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12*

***Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

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

Поступила в редакцию 21.06.2017 г. Принята к печати 03.07.2017 г.

Знание структур интермедиатов транскрипции хроматина способно пролить свет на функционирование РНК-полимеразы в клетке, что имеет важное значение как для фундаментальной науки, так и для разработки терапевтических подходов при лечении заболеваний, связанных с нарушением транскрипции. В данном исследовании использованы аффинные монослои, сформированные липидами, связанными с ионами Ni, для концентрирования РНК-полимеразы из разбавленного раствора, содержащего глицерин. Была показана принципиальная возможность выделения и концентрирования РНК-полимеразы с помощью Ni-липидного монослоя из раствора, содержащего криопротектор глицерин, который в обычных условиях затрудняет визуализацию при электронной микроскопии. Такой метод выделения позволяет получить более разнообразные пространственные ориентации молекул на подложке, что облегчает трехмерную реконструкцию по данным электронной микроскопии. Полученные результаты могут использоваться для дальнейшего изучения структурных основ процесса транскрипции и идентификации взаимодействий в транскрипционных комплексах, содержащих РНК-полимеразу.

Ключевые слова: электронная микроскопия, обработка изображений, РНК-полимераза, Ni-липиды, монослой липидов.

DOI: 10.7868/S0132342317060069

ВВЕДЕНИЕ

Мультисубъединичные РНК-полимеразы I, II и III катализируют ДНК-зависимый синтез РНК в ядре эукариот. РНК-полимеразы I и III синтезируют соответственно рибосомальную и транспортную РНК, в то время как РНК-полимераза II синтезирует матричную РНК на ДНК, организованной в хроматин. Знание структур интермедиатов транскрипции хроматина способно пролить свет на функционирование РНК-полимеразы в клетке, что имеет важное значение как для фундаментальной науки, так и для разработки терапевтических подходов при лечении заболеваний, связанных с нарушением транскрипции.

Знание пространственных структур макромолекул и их комплексов позволяет интерпретировать конформационные изменения в молекулах в процессе их функционирования. Достоинством методов просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и трехмерной реконструкции является возможность исследовать большие молекулярные машины. РНК-полимераза I изучалась методами крио-ПЭМ [1, 2] и с использованием крио-негативной модификации метода [3]. Для РНК-полимеразы III опубликована трехмерная структура с разрешением 17 Å [4]. РНК-полимераза II является наиболее хорошо изученной в структурном плане. Для нее известны атомные структуры 10-субъединичной коровой части

[1] Статья публикуется по материалам сообщения, представленного на VIII Российском симпозиуме “Белки и пептиды”, 18–22 сентября 2017 г., г. Москва.

Сокращения: ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия; ЭК – элонгационный комплекс; DGS-NTA (Ni) –1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-[(*N*-(5-амино-1-карбоксипентил)иминодиуксусная кислота)сукцинил] (соль никеля); PMSF – фенилметилсульфонилфторид; EDTA – этилендиаминтетраацетат натрия; SDS-PAAG – денатурирующий полиакриламидный гель с додецилсульфатом натрия.

[#] Автор для связи (тел.: +7(495)938-00-05; эл. почта: sokolova@mail.bio.msu.ru).

[5] и полная атомная структура, полученная около 10 лет назад [6]. Кроме того, для РНК-полимеразы II различных организмов и ее элонгационных комплексов (ЭК) опубликованы многочисленные трехмерные структуры, полученные методами ПЭМ [5, 7, 8]. Структура прокариотической РНК-полимеразы *E.coli* с разрешением 11 Å была также получена методом крио-ПЭМ [9].

Транскрипция РНК-полимеразой – это многоплановый процесс, протекающий с участием многих белковых факторов и сопровождающийся образованием различных динамических комплексов. Это осложняет структурные исследования транскрипционных интермедиатов. ЭК представляют собой динамические структуры, включающие РНК-полимеразу, матричную ДНК, гистоновый октамер и вновь синтезированный фрагмент РНК. В 2017 г. была опубликована крио-ПЭМ структура элонгационного комплекса РНК-полимеразы *E.coli* с разрешением ~4Å [10]. Для изучения в электронном микроскопе авторы добавили к образцу лиганд колифага HK022 Nun, который специфически останавливает транскрипцию путем блокировки ДНК с РНК в активном центре РНК-полимеразы.

Помимо большого размера, сложного и подвижного состава комплексов РНК-полимеразы, их структурные исследования осложняются длительностью и трудоемкостью очистки, а также низкой стабильностью образцов. Для хранения образцов при –80 °C к ним добавляют криопротекторы, в том числе глицерин. Однако глицерин мешает получению хороших изображений в электронной микроскопии как с негативным контрастированием, так и при замораживании в витрифицированном льду.

Мы использовали аффинные монослои, сформированные липидами, связанными с ионами Ni, для концентрирования РНК-полимеразы из разбавленного раствора, содержащего глицерин. Мы показали, что этот метод позволяет получить чистый концентрированный препарат РНК-полимеразы, подходящий для изучения методом электронной микроскопии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью электронной микроскопии макромолекул мы рассчитали и сравнили друг с другом две 3D-реконструкции РНК-полимеразы *E.coli*. Этот белок недавно был исследован в крио-ПЭМ [10] и поэтому был выбран для исследования влияния метода пробоподготовки на качество реконструкции. Ранее нами было показано, что РНК-полимераза *E. coli* воспроизводит основные черты транскрипции хроматина РНК-полимеразой II [11].

Общая схема строения прослеживается для всех ДНК-зависимых РНК-полимераз прокариот и эукариот. Холофермент РНК-полимеразы *E.coli* состоит из “корового” фермента и сигма-фактора. “Коровый” фермент включает 5 субъединиц (β, β’, 2 α, ω). Он обладает каталитической активностью, но не способен распознавать точку начала транскрипции; для этого требуется сигма-фактор [12, 13]. Архитектура всех известных к настоящему моменту структур ДНК-зависимых РНК-полимераз оказалась консервативной: область активного центра внешне напоминает клешню и характеризуется присутствием иона магния и консервативными мотивами. На основании кристаллографических данных в 3D-структуре РНК-полимераз выделяют “спиральный мостик” (bridge helix), разделяющий “основной” и “вторичный” каналы (main, secondary channels), “петлю-триггер” для синтеза и отделения РНК (trigger loop) и “переключатели” для размещения ДНК и РНК в активном центре фермента [5, 14–17]. Трехмерная структура корового фермента РНК-полимеразы *E.coli* была получена методом крио-электронной микроскопии [9].

Реконструкция трехмерной структуры белка возможна, если молекулярные комплексы находятся на подложке в виде изолированных частиц, отличающихся по своей ориентации. Это, как правило, справедливо для крио-ПЭМ, где частицы оказываются замороженными в сквозных отверстиях углеродной подложки. В случае негативного контрастирования, при котором применяется непрерывная углеродная подложка, довольно часто частицы располагаются на подложке преимущественно в какой-то одной ориентации. Недостаточное разнообразие проекций белка сильно затрудняет реконструкцию, особенно если молекула не обладает симметрией [18].

В данном исследовании для очистки препарата РНК-полимеразы от глицерина мы применили концентрирование с помощью аффинного монослоя липидов. Этот метод был разработан и применен ранее для очистки из клеточного лизата рибосом, несущих 6His-таг, и рецептора трансферина из среды для культивирования клеток [19]. Метод заключается в наслаивании смеси липидов (фосфатидилхолина и DGS-NTA(Ni) в различных соотношениях) на раствор, содержащий целевой рекомбинантный белок. Соотношение липидов определяется экспериментально и, как правило, липиды, несущие ион Ni, составляют от 10 до 20%. Липиды формируют монослой, обращенный заряженными группами, в том числе с ионами Ni, к поверхности раствора, в котором находятся белки, несущие 6His-таг. Специфическое связывание осуществляется за счет наличия на поверхности белка свободных электронодонорных групп.

Ранее монослои липидов применялись в электронной микроскопии макромолекул для двумерной кристаллизации [20, 21] и для адсорбции

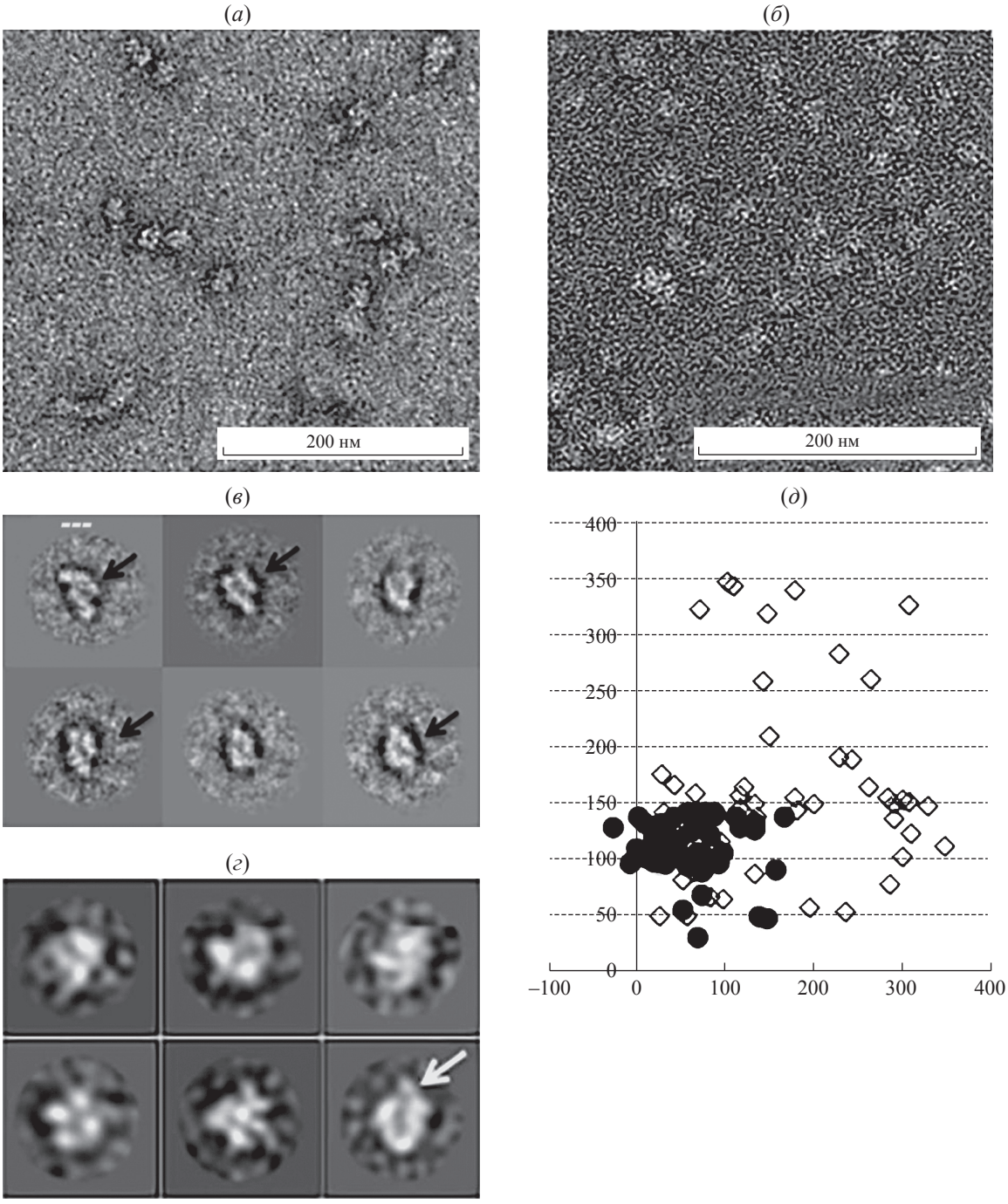

Рис. 1. Электронная микроскопия и анализ РНК-полимеразы *E.coli*. Типичное поле зрения при окраске уранилацетатом и увеличении ×40000 препарата РНК-полимеразы *E.coli*, полученного по стандартной методике (*а*) и препарата РНК-полимеразы *E.coli*, сконцентрированного на Ni-липидном монослое (*б*); классификация изображений контрольной РНК-полимеразы *E.coli*, черные стрелки указывают на классы частиц в боковой ориентации (*в*) и РНК-полимеразы *E.coli*, сконцентрированной на Ni-липидном монослое, белая стрелка указывает на класс частиц в боковой ориентации (*г*); (*д*) распределение углов Эйлера для частиц контрольной РНК-полимеразы *E.coli* (черные круги) и РНК-полимеразы *E.coli*, сконцентрированной на Ni-липидном монослое (белые ромбы).

комплексов на положительно заряженные липидные монослои [22].

Исследуемая молекула РНК-полимеразы не имеет симметрии, поэтому для получения трехмерной реконструкции необходимо было собрать не менее нескольких тысяч индивидуальных изображений. При приготовлении контрольного образца РНК-полимеразы было собрано 4916 отдельных частиц (рис. 1*а*), которые были помещены в один файл для дальнейшей классификации и анализа.

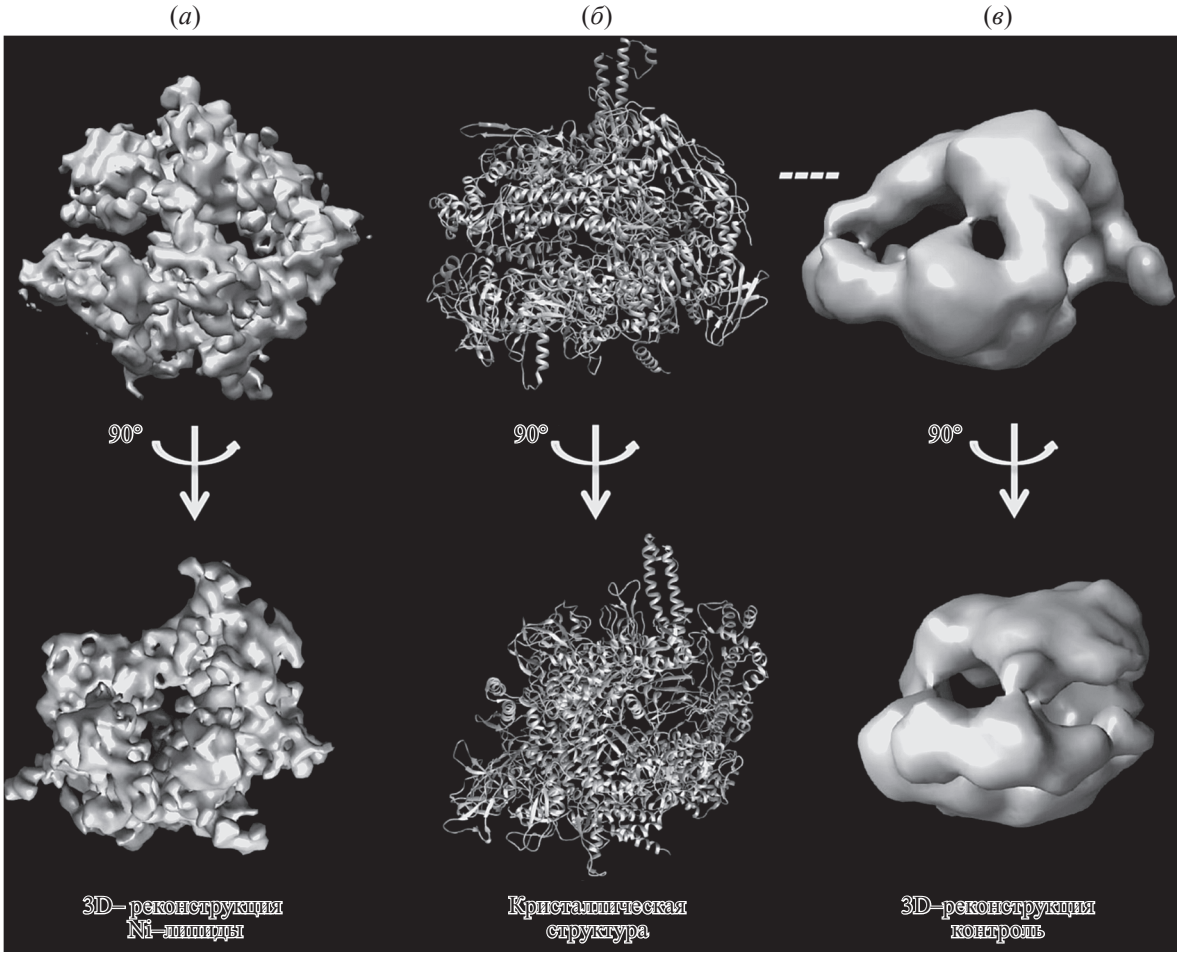

Рис. 2. Сравнение 3D-реконструкций, полученных с использованием частиц РНК-полимеразы *E.coli*, сконцентрированной на Ni-липидном монослое (*а*), и контрольной РНК-полимеразы *E.coli* (*в*) с атомной структурой РНК-полимеразы *E.coli* (*б*). PDB-код атомной структуры: 5UP6 [10].

Для исследования с применением Ni-липидных монослоев, мы собрали 1730 отдельных частиц (рис. 1*б*).

Изображения РНК-полимеразы выравнивали относительно ротационной суммы всех частиц и суммировали для улучшения контраста. Линейные размеры полученных двумерных изображений (рис. 1*в*, *г*) сравнимы с размерами кристаллической структуры РНК-полимеразы [10] (рис. 2*б*), что свидетельствует об отсутствии принципиальных нарушений в структуре молекулы при приготовлении препарата для ПЭМ.

Однако было отмечено различие в ориентации молекул в контрольных препаратах, и препаратах, полученных при концентрировании на монослое Ni-липидов. В первом случае молекулы располагаются на подложке, в основном, в боковой ориентации (рис. 1*в*, черные стрелки). После концентрирования на Ni-липидном монослое молекулы чаще располагаются в произвольных ориентациях. Наличие произвольных ориентаций значительно упрощает работу по получению трехмерной реконструкции молекулы, так как в этом случае при изучении в электронном микроскопе не требуется поворачивать образец на углы 50–60 градусов в поисках отсутствующих пространственных конформаций [22].

Для характеристики позиции частицы в пространстве используют модельный объект – сферу Эйлера. Углы Эйлера определяют ориентацию частицы относительно центра сферы. При этом угол альфа описывает поворот частицы в плоскости подложки от 0 до 360 градусов, а угол бета – наклон частицы относительно плоскости подложки.

Мы заметили, что у большинства проекционных структур РНК-полимеразы (~80%), приготовленных по стандартной методике, хорошо видно углубление, соответствующее области активного центра (черные стрелки на рис. 1*в*); это свидетельствует о преимущественно боковой ориентации молекул на подложке. Об этом же свидетельствуют рассчитанные величины углов Эйлера, которые

выражают тенденцию к кластеризации около 90 градусов (черные круги на рис. 1*д*).

В образце после концентрирования на Ni-липидном монослое доля частиц с преимущественной ориентацией на подложке составляла всего около 20% (рис. 1*г*, белая стрелка). Величины углов Эйлера для этого образца распределены более равномерно (белые ромбы на рис. 1*д*), что позволяет рассчитать трехмерную структуру белковой молекулы с большей точностью (рис. 2*а*), несмотря на то, что для построения контрольной 3D-структуры (рис. 2*в*) было использовано почти в три раза больше частиц.

Таким образом, нами была показана принципиальная возможность выделения и концентрирования РНК-полимеразы из раствора, содержащего криопротекторы, которые в обычных условиях затрудняют визуализацию с помощью электронной микроскопии. Такой метод выделения позволяет получить более разнообразные пространственные ориентации молекул на подложке, что облегчает трехмерную реконструкцию по данным ПЭМ. Полученные результаты могут использоваться для дальнейшего изучения структурных основ процесса транскрипции и идентификации взаимодействий в транскрипционных комплексах, содержащих РНК-полимеразу.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экспрессия и очистка РНК-полимеразы

Для экспрессии РНК-полимеразы использовали вектор pVS10, содержащий открытые рамки считывания четырех субъединиц ядра РНК-полимеразы *rpoA* (α), *rpoB*(β), *rpoC*(β'), и *rpoZ*(ω).

Единичная колония штамма BL21 DE3, трансформированная плазмидой pVS10, была перенесена в 150 мл среды LB, содержащей ампициллин в концентрации 100 мМ. Клетки наращивали в течение 6 ч при 32 °C при непрерывном перемешивании до оптической плотности OD_{600} = 0.6. После чего 0.5 мл клеток иннокулировали в 500 мл среды LB, содержащей дополнительные реагенты для ночной экспрессии целевого белка. Состав реагентов был следующим: 1 мМ $MgSO_4$, 0.5% глицерол, 0.05% глюкоза, 0.2% альфа-лактоза, 25 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 50 мМ KH_2PO_4, 50 мМ Na_2HPO_4, 0.1 мг/мл карбенициллина. Клетки наращивали в течение 21 ч при 32 °C при непрерывном перемешивании до оптической плотности OD_{600} = 7.3. Клетки осаждали центрифугированием при 4 °C и 6000 *g* в течение 15 мин. Осадок клеток ресуспендировали в 50 мл лизис-буфера (500 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl (pH 6.9), 5% глицерол, 0.5 мМ β-меркаптоэтанол, 0.2% Tween, 0.2 M PMSF и 1 мг/мл лизоцима), полученную смесь инкубировали во льду в течение 60 мин. Клетки разрушали ультразвуком, используя импульсы 10 с и перерыв 10 с, общее время составляло 5 мин. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при 4 °C и 27000 *g* в течение 15 мин.

Очистку проводили на хроматографе ÄKTA purifier 10 (GE Healthcare) в три этапа: (1) Ni-хелатная смола, (2) гепариновая смола с последующим диализом, (3) сильная анионообменная смола MonoQ (GE Healthcare). Все процедуры выполняли при 4 °C. Полученный раствор наносили на колонку HiTrap NiNTA 5мл, предварительно уравновешенную лизис-буфером, со скоростью 0.5 мл/мин. Затем промывали 20 мл буфера HLB (50 мМ Tris-HCl, pH 6.9, 5% глицерол, 1 мМ β-меркаптоэтанол) с добавлением 10 мМ имидазола. Элюцию проводили также буфером HLB с увеличенной концентрацией имидазола до 250 мМ. Колонку, содержащую 10 мл смолы HeparinHyperD, уравновешивали буфером HLB с добавлением 0.5 мМ EDTA. Затем на нее нанесли пул фракций, содержащих РНК-полимеразу, со скоростью 0.5 мл/мин, промыли 4 объемами колонки буфером для нанесения. Элюцию производили, используя линейный градиент NaCl в буфере для нанесения (от 0 до 1.5 М в течение 120 мин при скорости 1 мл/мин). Собирали фракции по 2 мл. Наличие РНК-полимеразы определяли на 12% SDS-PAAG. Полученные фракции объединили и обессолили диализом против буфера HLB с EDTA и увеличенной концентрацией глицерина (50 мМ Tris-HCl, pH 6.9, 10% глицерол, 1 мМ β-меркаптоэтанол, 0.5 мМ EDTA) в течение ночи при постоянном перемешивании при 4 °C. Объединенный пул фракций после диализа нанесли на колонку MonoQ, объемом 1 мл, при скорости 0.5 мл/мин. Элюцию проводили так же, как и на предыдущем шаге, используя линейный градиент NaCl в буфере для нанесения, при скорости 0.5 мл/мин. Собирали фракции по 1 мл. Фракции, соответствующие пику, анализировали на 12% SDS-PAAG. Фракции, содержащие очищенную РНК-полимеразу, проверяли на активность, разливали по 10 мкл и замораживали в 50% глицерине.

Электронная микроскопия

Для формирования аффинного липидного монослоя 1 мкл смеси липидов (80% POPC (Avanti), 1 мг/мл в хлороформе, 20% DGS-NTA(Ni) (Avanti), 1 мг/мл в хлороформе) был добавлен на 25-мл каплю раствора белка в буфере с глицерином (25%) и инкубирован на тефлоновой подложке во влажной камере при 4 °C в течение 1 ч (методика более подробно описана в работе [18]). Затем полученные монослои были перенесены на медные сетки,

покрытые слоем аморфного углерода, усиленного слоем формвара (SPI, США). Образцы окрашивали 1% раствором уранилацетата в течение 2 × 30 с.

Для подготовки контрольных образцов РНК-полимеразы замороженный раствор белка, содержащий в качестве криопротектора 50% глицерина, размораживали на льду, разбавляли низкосолевым буфером (50 мМ Tris-HCl, pH 6.9, 1 мМ β-меркаптоэтанол) до концентрации ~100 нг/мкл и наносили на сетки, покрытые слоем аморфного углерода (SPI, США), предварительно обработанные в атмосфере тлеющего разряда в установке Emitech K100X (QuorumTechnologies, Великобритания) при силе тока 20 мА в течение 45 с.

Исследование образцов производили в просвечивающем электронном микроскопе JEOL 2100 (JEOL, Япония) на базе Межкафедральной лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ (Москва, Россия). Использовали ускоряющее напряжение 200 кВ в условиях низкой дозы (<10–20 электронов на Å^2 в секунду) для уменьшения повреждения образца под воздействием электронного пучка. Изображения получали с увеличением ×40000 с помощью ПЗС-камеры с размером матрицы 2000 × 2000 пикселей (Gatan, США). Размер пикселя на микрофотографиях составил 2.9 Å. Сбор частиц и дальнейшую обработку изображений производили в программе RELION [24, 25].

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00031). Электронную микроскопию проводили с использованием уникальной научной установки "Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия" биологического факультета МГУ в составе ЦКП МГУ "Электронная микроскопия в науках о жизни".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bischler N., Brino L., Carles C., Riva M., Tschochner H., Mallouh V., Schultz P.* // EMBO J. 2002. V.21. P. 4136–4144.
2. *Peyroche G., Levillain E., Siaut M., Callebaut I., Schultz P., Sentenac A., Riva M., Carles C.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 14670–14675.
3. *De Carlo S., Carles C., Riva M., Schultz P.* // J. Mol. Biol. 2003. V.329. P. 891–902.
4. *Fernández-Tornero C., Böttcher B., Riva M., Carles C., Steuerwald U., Ruigrok R.W., Sentenac A., Müller C.W., Schoehn G.* // Mol Cell. 2007. V. 25. P. 813–823.
5. *Cramer P., Bushnell D.A., Kornberg R.D.* // Science. 2001. V. 292. P. 1863–1876.
6. *Armache K.-J., Mitterweger S., Meinhart A., Cramer P.* // J Biol Chem. 2005. V. 280. P. 7131–7134.
7. *Martinez-Rucobo F.W., Kohler R., van de Waterbeemd M., Heck A.J.R., Hemann M., Herzog F., Stark H., Cramer P.* // Mol Cell. 2015. V. 58. P. 1079–1089.
8. *Gnatt A.L., Cramer P., Fu J., Bushnell D.A., Kornberg R.D.* // Science. 2001. V. 292. P. 1876–1882.
9. *Finn R.D., Orlova E.V., Gowen B., Buck M., van Heel M.* // EMBO J. 2000. V. 19. P. 6833–6844.
10. *Kang J.Y., Olinares P.D.B., Chen J., Campbell E.A., Mustaev A., Chait B.T., Gottesman M.E., Darst S.A.* // Elife. 2017. V. 6. e25478.
11. *Walter W., Kireeva M.L., Studitsky V.M., Kashlev M.* // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 36148–36156.
12. *Murakami K.S., Darst S.A.* // Curr. Opin. Struct. Biol. 2003. V. 13. P. 31–39.
13. *Jun S.H., Warner B.A. Murakami K.S.* // Encycl. Biol. Chem. 2013. P. 167–172.
14. *Fernández-Tornero C., Moreno-Morcillo M., Rashid U.J., Taylor N.M., Ruiz F.M., Gruene T., Legrand P., Steuerwald U., Müller C.W.* // Nature. 2013. V. 502. P. 644–649.
15. *Engel C., Sainsbury S., Cheung A.C., Kostrewa D., Cramer P.* // Nature. 2013. V. 502. P. 650–655.
16. *Hirata A., Klein B.J., Murakami K.S.* // Nature. 2008. V. 451. P. 851–854.
17. *Murakami K.S.* // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. P. 9126–9134.
18. *Ohi M., Li Y., Cheng Y., Walz T.* // Biol. Proced Online. 2004. V. 6. P. 23–34.
19. *Kelly D.F., Dukovski D., Walz T.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. P. 4703–4708.
20. *Uzgiris E.E., Kornberg R.D.* // Nature. 1983. V.3 01. P. 125–129.
21. *Kubalek E.W., Le Grice S.F.J., Brown P.O.* // J. Struct. Biol. 1994. V. 113. P. 117–123.
22. *Medalia O., Typke D., Hegerl R., Angenitzki M., Sperling J., Sperling R.* // J. Struct. Biol. 2002. V. 138. P. 74–84.
23. *Asturias F.J., Chung W.-H., Kornberg R.D., Lorch Y.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 13477–13480.
24. *Scheres S.H.W.* // J. Mol. Biol. 2012. V. 415. P. 406–418.
25. *Scheres S.H.W.* // J. Struct. Biol. 2012. V. 180. P. 519–530.

Purification and Concentration of RNA-Polymerase Onni-Lipid Monolayers

M. G. Karlova*, O. I. Volokh*, O. V. Chertkov*, M. P. Kirpichnikov*, **, V. M. Studitsky*, *, O. S. Sokolova*, #**

#Phone: +7(495)938-00-05; e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru
**Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234, Russia, Moscow, Leninskiye Gory, 1, str. 12.*
***M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow;*
**** Fox Chase Cancer Center, 19111, Philadelphia, PA, USA*

Knowledge of the chromatin transcription intermediates structures can shed light on the functioning of RNA polymerase in the cell, which is important both for basic science and for the development of therapeutic approaches for the treatment of diseases associated with transcription disorders. In this study, we used affinity monolayers formed by lipids bound to Ni to concentrate RNA polymerase from a dilute solutions containing glycerin. It has been shown that RNA polymerase can be isolated and concentrated on a Ni-lipid monolayer from a solution containing cryoprotectants, which under normal conditions make it difficult to visualize the samples by electron microscopy. This method of isolation allowed to obtain more diverse spatial orientations of molecules on the carbon film, which facilitates three-dimensional reconstruction from TEM data. The results obtained can be used in further structural studies of the transcription processes to identify interactions in transcriptional complexes containing RNA polymerase.

Keywords: electron microscopy, image processing, RNA polymerase, Ni-lipids, lipid monolayer