

Взаимодействие РНКазы H1 из хлоропластов *A. thaliana* (AtRNH1C) с модельными R-петлями различной структуры

Гаврилова А.*, Косарев Ю., Микушина Е., Кузнецов Н., Кузнецова А.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

* anaroslakova@gmail.com

Ключевые слова: РНКазы H1; *A. thaliana*; конфликт транскрипции-репликации

Мотивация и цель: Транскрипция и репликация являются важнейшими молекулярно-биологическими процессами, постоянно протекающими в клетках. Оба процесса происходят на одной и той же матрице ДНК, в связи с чем вероятность встреч между этими важнейшими клеточными механизмами, ответственными за экспрессию генов и дубликацию генома, достаточно высока, что может вызвать конфликт транскрипции-репликации (Transcription-Replication Conflict, TRC) [1]. Следует отметить, что одним из структурных элементов TRC является формирование R-петель, структур, состоящих из гетеродуплекса ДНК:РНК и содержащих выпетленный одноцепочечный фрагмент ДНК.

Для того, чтобы установить роль отдельных белков, участвующих во взаимодействии с R-петлями, следует учитывать не только процесс транскрипции, в котором эти структуры формируются, но также необходимо отметить биологически важные процессы, на протекание которых эти структуры оказывают влияние [2–4]. Так, с одной стороны, R-петли играют важную роль в регуляции экспрессии генов, влияя на терминацию транскрипции, модификацию ДНК и топологию хроматина, а также участвуют в процессах репликации ДНК, репарации ДНК и рекомбинации с переключением классов иммуноглобулинов. С другой стороны, R-петли могут приводить к повреждению ДНК, поскольку одноцепочечные участки ДНК, образующиеся в результате гибридизации одной из цепей с РНК, подвержены повреждениям, что, в свою очередь, может приводить как к мутагенезу, так и к разрывам цепи, и, таким образом, вызывает нестабильность генома.

Считается, что R-петли являются короткоживущими структурами, однако в некоторых условиях они могут быть значительно стабилизированы [5]. Поскольку R-петли могут приводить к повреждению ДНК и нестабильности генома, уровень R-петель в клетках строго контролируется [6]. Хотя, как прокариотические, так и эукариотические клетки имеют множество механизмов координации процессов транскрипции и репликации, в настоящее время очевидно, что конфликты могут возникать из-за aberrантной регуляции транскрипции и преждевременной пролиферации [7, 8].

Актуальными вопросами в настоящее время остаются как понимание клеточных последствий TRC, так и идентификация клеточных регуляторных механизмов, ответственных за деблокирование репликации в процессе TRC, а также изучение молекулярных механизмов, которые используются клетками для предотвращения негативных эффектов R-петель, формирующихся в TRC. Один из механизмов разрешения TRC в геномной ДНК осуществляется с помощью членов семейства ферментов, обладающих активностью РНКазы H. Показано, что для поддержания

стабильности генома хлоропластов *A. thaliana* и уменьшения негативного эффекта R-петель требуется согласованное действие РНКазы H (AtRNH1C), ДНК-гиразы (AtGyr) и праймазы (ATH) [9–10]. В связи с этим в рамках настоящей работы с целью реконструкции *in vitro* молекулярных взаимодействий между белками-участниками процесса TRC проведен кинетический анализ особенностей взаимодействия РНКазы H1 AtRNH1C из хлоропластов *Arabidopsis thaliana* с модельными R-петлями различной структуры.

Методы и алгоритмы: Созданы модельные синтетические R-петли, содержащие флуоресцентные метки в различных положениях ДНК- и РНК-цепей, для детекции белково-нуклеиновых взаимодействий между отдельными ферментами и/или их комплексами с белками-регуляторами с модельными R-петлями. Методы флуоресцентного титрования и микроскопического термофореза были использованы для определения констант связывания и термодинамических характеристик белково-нуклеиновых взаимодействий между отдельными ферментами, а также комплексами ферментов с другими участниками ферментативного процесса и белками-регуляторами в составе модельных R-петель.

Результаты: Анализ конформационной подвижности фермента и субстрата при их взаимодействии в случае изучения взаимодействий между AtRNH1C и модельными R-петлями представляет собой нетривиальную задачу, требующую дизайна гибридного гетеродуплекса ДНК:РНК, содержащего выпетленный одноцепочечный фрагмент ДНК и флуоресцентный маркер конформационных изменений. На первом этапе работы нами создан набор ДНК-дуплексов, содержащих в центральной части некомплементарный участок (пузырь) длиной 10, 11, 12, 16, 21 и 31 нуклеотидов. При этом с транскрибируемой цепью формировали гетеродуплекс с помощью рибоолигонуклеотида длиной от 10 до 37 нуклеотидов, таким образом, чтобы 3'-концевой нуклеотид РНК-праймера располагался в разных положениях относительно некомплементарного участка ДНК-дуплекса. На 3'-конце РНК-праймера был расположен либо аденозин, либо его флуоресцентный аналог – 2-аминопурин (aPu). Кроме того, был синтезирован ряд матричных и нематричных цепей ДНК-дуплекса, содержащих остаток aPu на разном расстоянии от некомплементарного участка. Остаток aPu был выбран в качестве флуоресцентного маркера конформационных превращений в R-петле на основании его чувствительности к окружению. Так, по сравнению со свободным нуклеотидом интенсивность флуоресценции aPu в составе олигонуклеотида снижается из-за стэкинга с соседними основаниями, кроме того, образование дуплексной структуры из одноцепочечных олигонуклеотидов, как правило, приводит к дополнительному уменьшению интенсивности флуоресценции aPu за счет стабилизации стэкинг-взаимодействий с соседними азотистыми основаниями. Несмотря на то, что aPu является аналогом аденозина и способен формировать две водородные связи с тиминном в комплементарной цепи, не приводя к структурным изменениям дуплекса, для всех разработанных РНК-праймеров, содержащих 3'-концевой остаток aPu, в качестве контроля использовали олигонуклеотид, содержащий 3'-концевой аденозин.

Для формирования R-петель РНК-праймеры отжигались с матричной цепью ДНК в буферном растворе 40 mM Tris-HCl pH 7.9, 40 mM KCl и инкубировались с нематричной цепью ДНК 35 мин при 37 °C либо 30 мин при 25 °C в том же буферном растворе. Конечная смесь содержала 1 мкМ РНК-праймер, 1.1 мкМ

матричную цепь ДНК, 5 мкМ нематричную цепь ДНК. Была проверена стабильность модельных R-петель в экспериментальных условиях, необходимых для исследования ферментативной активности РНКазы H.

Для анализа процесса деградации РНК-праймера в полиакриламидном геле использовали рибоолигонуклеотиды 5'-FAM-CUCACAUCCAGAGAGCX (X – аденозин либо аРу), содержащие на 5'-конце краситель флуоресцеин (FAM), позволяющий визуализировать продукты деградации РНК-праймера ферментом AtRNH1C.

Все разработанные модельные R-петли использовали для определения кинетических параметров взаимодействия РНКазы H1 AtRNH1C из хлоропластов *Arabidopsis thaliana*. Для каждого субстрата получена серия кинетических кривых, в которой концентрация субстратов была постоянной, а концентрацию фермента варьировали, что позволило оценить эффективность деградации РНК-праймера. Поскольку общая эффективность расщепления РНК-праймера зависит как от скорости формирования фермент-субстратного комплекса, так и от скорости каталитической стадии в рамках работы определены константы связывания AtRNH1C с модельными R-петлями методом микроскопического термофореза.

Выводы: В работе проведен кинетический анализ процесса взаимодействия РНКазы H1 AtRNH1C из хлоропластов *Arabidopsis thaliana* с модельными R-петлями различной структуры. Полученные данные выявили особенности формирования фермент-субстратного комплекса и каталитической стадии в зависимости от структуры модельных R-петель.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РФФИ № 23-44-00064.

Interaction of chloroplast RNase H1 from *A. thaliana* (AtRNH1C) with model R-loops of different structure

Gavrilova A.*, Kosarev Y., Mikushina E., Kuznetsov N., Kuznetsova A.

Institute of chemical biology and fundamental medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

* anaroslakova@gmail.com

Key words: RNase H1; *Arabidopsis thaliana*; R-loops; transcription-replication conflict

Motivation and Aim: Transcription and replication are the most important molecular biological processes that occur at high frequency in cells. As they share the same DNA template, a high incidence of encounters is expected between these most important cellular machineries responsible for gene expression and genome duplication, which can cause a transcription-replication conflict (TRC) [1]. It should be noted that one of the structural elements of TRC is the formation of R-loops, structures consisting of a DNA:RNA heteroduplex and containing a looped single-stranded DNA fragment. It is necessary to take into account the role of individual proteins involved in interaction with R-loops as well as influence of which these structures at the course of the biologically important processes [2–4].

Thus, on the one hand, R-loops play an important role in the regulation of gene expression, influencing transcription termination, DNA modification and chromatin topology, and also participate in the processes of DNA replication, DNA repair and recombination with immunoglobulin class switching. On the other hand, R-loops can lead to DNA damage, since single-stranded DNA regions formed as a result of

hybridization of one of the strands with RNA are susceptible to damage, which, in turn, can lead to both mutagenesis and strand breaks, and thus causing genomic instability. It is believed that R-loops are short-lived structures, but under certain conditions they can be significantly stabilized [5]. Since R-loops can lead to DNA damage and genome instability, the level of R-loops in cells is strictly controlled [6]. Although both prokaryotic and eukaryotic cells have multiple mechanisms to coordinate transcription and replication processes, it is now clear that conflicts can arise due to aberrant transcriptional regulation and premature proliferation [7, 8].

Current issues remain both understanding the cellular consequences of TRC and identifying the cellular regulatory mechanisms responsible for unblocking replication in the TRC process, as well as studying the molecular mechanisms that cells use to prevent the negative effects of R-loops formed in TRC. One of the mechanisms for resolving TRC in genomic DNA is carried out with the help of members of a family of enzymes with RNase H activity. It has been shown that to maintain the stability of the genome of *A. thaliana* chloroplasts and reduce the negative effect of R-loops, the coordinated action of RNase H1 (AtRNH1C), DNA gyrase (AtGyr) and primase (ATH) is required [9–10]. In this regard, within the framework of this work, in order to reconstruct *in vitro* molecular interactions between proteins participating in the TRC process, a kinetic analysis of the interaction features of RNase H1 AtRNH1C from *Arabidopsis thaliana* chloroplasts with model R-loops of various structures was carried out.

Methods and Algorithms: Model synthetic R-loops containing fluorescent tags in various positions of DNA and RNA chains have been created to detect protein-nucleic acid interactions between individual enzymes and/or their complexes with regulatory proteins with model R-loops. Fluorescent titration and microscopic thermophoresis methods were used to determine binding constants and thermodynamic characteristics of protein-nucleic acid interactions between individual enzymes, as well as complexes of enzymes with other participants in the enzymatic process and regulatory proteins in model R-loops.

Results: Analysis of the conformational mobility of the enzyme and substrate during their interaction in the case of studying interactions between AtRNH1C and model R-loops is a non-trivial task that requires the design of a hybrid DNA:RNA heteroduplex containing a looped single-stranded DNA fragment and a fluorescent marker of conformational changes. At the first stage of our work, we created a set of DNA duplexes containing in the central part a non-complementary region (bubble) with a length of 10, 11, 12, 16, 21 and 31 nucleotides. In this case, a heteroduplex was formed with the transcribed strand using a ribooligonucleotide from 10 to 37 nucleotides in length, so that the 3'-terminal nucleotide of the RNA primer was located in different positions relative to the non-complementary region of the DNA duplex. At the 3' end of the RNA primer, either adenosine or its fluorescent analogue, 2-aminopurine (aPu), was located. In addition, a number of template and non-template strands of the DNA duplex were synthesized, containing an aPu residue at different distances from the non-complementary region. The aPu residue was chosen as a fluorescent marker of conformational transformations in the R-loop based on its sensitivity to the environment. Thus, compared to a free nucleotide, the fluorescence intensity of aPu in the oligonucleotide decreases due to stacking with neighboring bases; in addition, the formation of a duplex structure from single-stranded oligonucleotides, as a rule, leads to an additional decrease in the fluorescence intensity of aPu due to the stabilization of stacking interactions with neighboring bases. Despite the fact that aPu is an analogue of

adenosine and is capable of forming two hydrogen bonds with thymine in the complementary strand without leading to structural changes in the duplex, for all designed RNA primers containing the 3'-terminal residue of aPu, an oligonucleotide containing 3'-terminal adenosine.

To form R-loops, RNA primers were annealed to the template DNA strand in a buffer solution of 40 mM Tris-HCl pH 7.9, 40 mM KCl and incubated with the non-template DNA strand for 35 min at 37 °C or 30 min at 25 °C, including the same buffer solution. The final mixture contained 1 µM RNA primer, 1.1 µM template DNA strand, and 5 µM non-template DNA strand. The stability of model R-loops was tested under experimental conditions necessary for studying the enzymatic activity of RNase H.

To analyze the process of RNA primer degradation in a polyacrylamide gel, we used ribooligonucleotides 5'-FAM-CUCACAUCCAGAGAGCX (X – adenosine or aPu), containing the fluorescein dye (FAM) at the 5' end, which allows visualization of the products of RNA primer degradation by the AtRNH1C enzyme.

All developed model R-loops were used to determine the kinetic parameters of the interaction of RNase H1 AtRNH1C from *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. For each substrate, a series of kinetic curves was obtained in which the concentration of the substrates was constant, and the concentration of the enzyme was varied, which made it possible to evaluate the efficiency of degradation of the RNA primer. Since the overall efficiency of RNA primer cleavage depends both on the rate of formation of the enzyme-substrate complex and on the rate of the catalytic stage, the binding constants of AtRNH1C to model R-loops were determined using microscopic thermophoresis.

Conclusion: The work carried out a kinetic analysis of the interaction of RNase H1 AtRNH1C from *Arabidopsis thaliana* chloroplasts with model R-loops of various structures. The data obtained revealed the peculiarities of the formation of the enzyme-substrate complex and the catalytic stage depending on the structure of the model R-loops.

Funding: The study is supported by the Russian Science Foundation, grant No. 23-44-00064.

Список литературы/References

1. García-Muse T., Aguilera A. Transcription–replication conflicts: how they occur and how they are resolved. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17:553-563. doi 10.1038/nrm.2016.88
2. Costantino L, Koshland D. The Yin and Yang of R-loop biology. *Curr Opin Cell Biol.* 2015;34:39-45. doi 10.1016/j.ceb.2015.04.008
3. Brambati A., Zardoni L., Nardini E., Pelliccioli A., Liberi G. The dark side of RNA:DNA hybrids. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2020;784:108300. doi 10.1016/j.mrrev.2020.108300
4. Mackay R.P., Xu Q., Weinberger P.M. R-Loop Physiology and Pathology: A Brief Review. *DNA Cell Biol.* 2020;39:1914-1925. doi 10.1089/dna.2020.5906
5. Crossley M.P., Bocek M., Cimprich K.A. R-Loops as Cellular Regulators and Genomic Threats. *Mol Cell.* 2019;73:398-411. doi 10.1016/j.molcel.2019.01.024
6. Belotserkovskii B.P., Tornaletti S., D'Souza A.D., Hanawalt P.C. R-loop generation during transcription: Formation, processing and cellular outcomes. *DNA Repair.* 2018;71:69-81. doi 10.1016/j.dnarep.2018.08.009
7. Goehring L., Huang T.T., Smith D.J. Transcription-replication conflicts as a source of genome instability. *Annu Rev Genet.* 2023;57:157-179. doi 10.1146/annurev-genet-080320-031523
8. Lalonde M., Trauner M., Werner M., Hamperl S. Consequences and Resolution of Transcription – Replication Conflicts. *Life (Basel).* 2021;11(7):637
9. Zhao H., Zhu M., Limbo O., Russell P. RNase H eliminates R-loops that disrupt DNA replication but is nonessential for efficient DSB repair. *EMBO Rep.* 2018;19:e45335. doi 10.15252/embr.201745335
10. Zhang W., Yang Z., Wang W., Sun Q. Primase promotes the competition between transcription and replication on the same template strand resulting in DNA damage. *Nat Comm.* 2024;15:73. doi 10.1038/s41467-023-44443-0