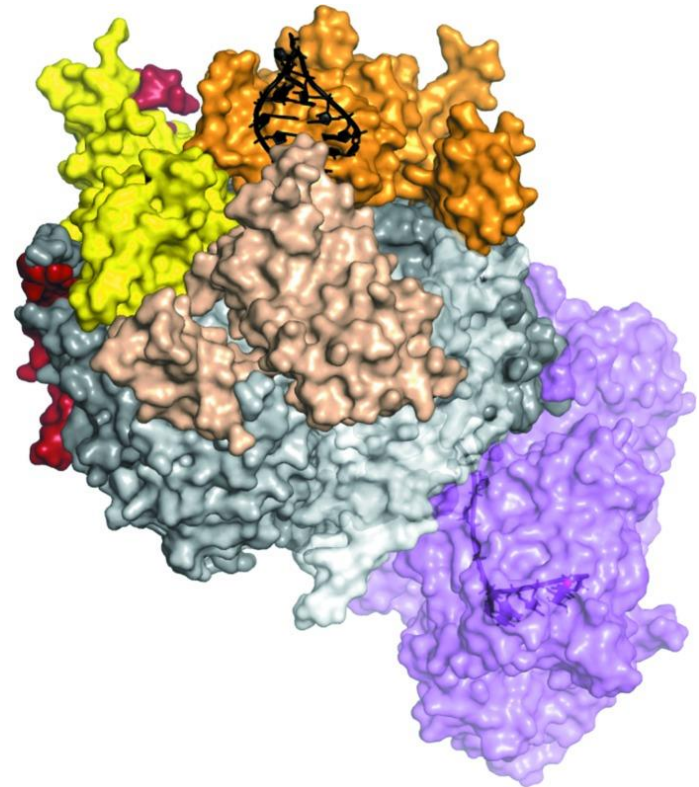


Biochemiczne metody badania aktywności i funkcji enzymów uczestniczących w metabolizmie RNA (ze szczególnym uwzględnieniem kompleksu egzozomu)



Rafał Tomecki

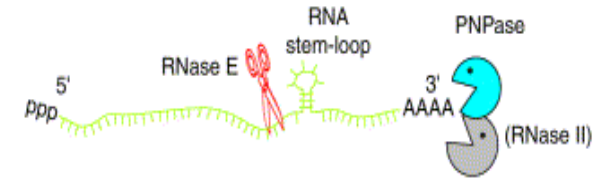
Laboratorium Dojrzewania i Degradacji RNA IBB PAN oraz IGiB UW

Wykład w ramach fakultetu: „Molekularne techniki analizy RNA”; 09.12.2022

RNazy uczestniczące w metabolizmie RNA

Endorybonukleazy: np. RNaza E (bakterie)

Egzorybonukleazy



5'→3': procesywna hydrolityczna Xrn1

3'→5': procesywne (rdzeń egzozomu) lub dystrybutywne (Rrp6p)

- procesywne fosforolityczne: PNPaza (bakterie; organella komórek eukariotycznych) oraz kompleks egzozomu u archebakterii
- procesywne hydrolityczne: rodzina RNazy R / RNazy II

Hydroliza : $\text{RNA} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow$ monofosforany rybonukleozydów (rNMP)

Fosforoliza : $\text{RNA} + \text{PO}_4^- \leftrightarrow$ difosforany rybonukleozydów (rNDP)

H_2O ; PO_4^- - nukleofile atakujące wiązanie fosfodiesterowe

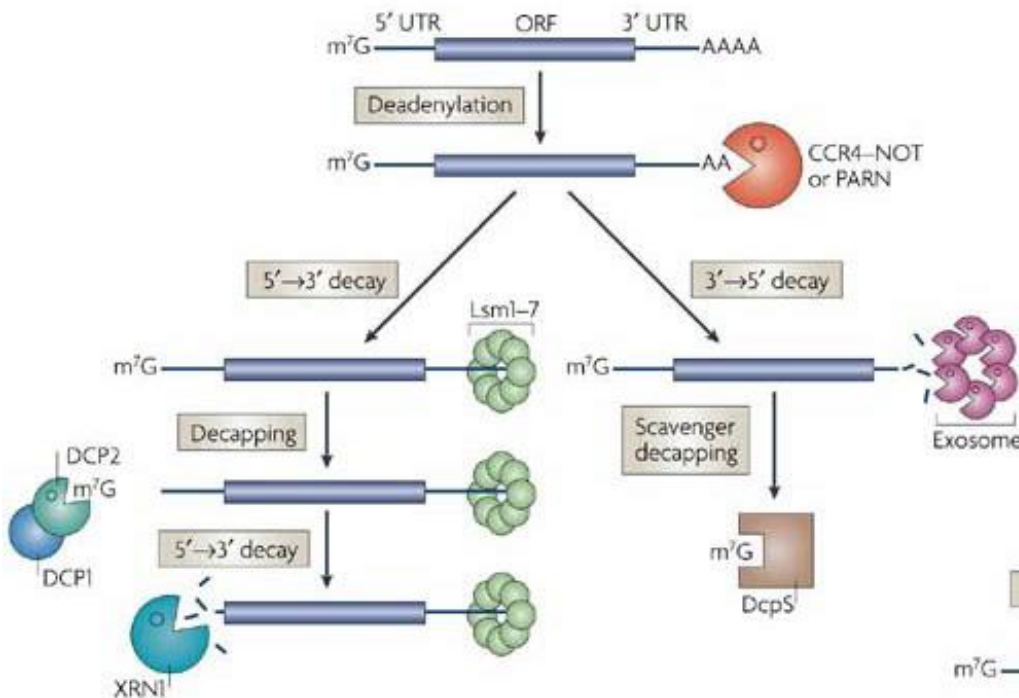
Kataliza odbywa się w obecności jonu dwuwartościowego (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) jako kofaktora (aktywacja ataku nukleofilowego)

Ścieżki metabolizmu eukariotycznych mRNA

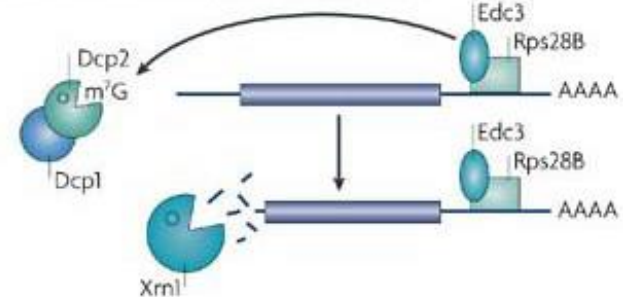
Degradacja mRNA w cytoplazmie jest inicjowana najczęściej poprzez odtrawienie ogona poli(A) z końca 3' (deadenylacja). W procesie tym, który ma charakter dystrybutywny, uczestniczy duży kompleks białkowy Ccr4-Not1. Po deadenylacji mRNA może ulegać degradacji w dwóch różnych ścieżkach:

- w kierunku 3'-5' (kompleks egzozomu)
- w kierunku 5'-3' (kompleks usuwający czapkę z końca 5' oraz aktywność egzonukleazy Xrn1p)

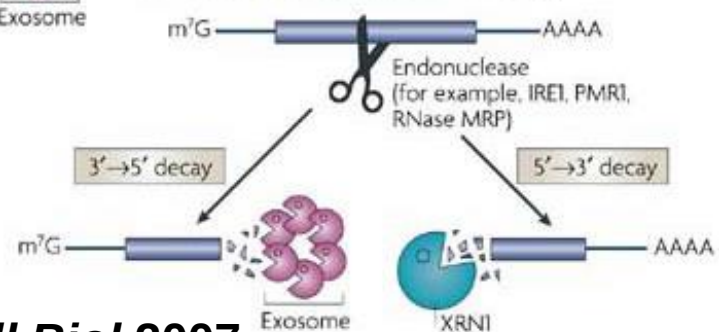
a Deadenylation-dependent mRNA decay



b Deadenylation-independent mRNA decay



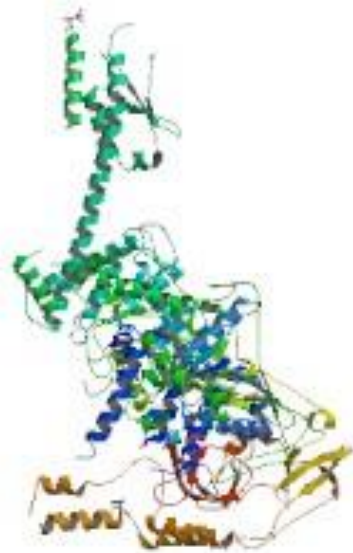
c Endonuclease-mediated mRNA decay



Główne eukariotyczne enzymy degradujące RNA

Xrn1 - 5'-3'

Enzym działający
samodzielnie



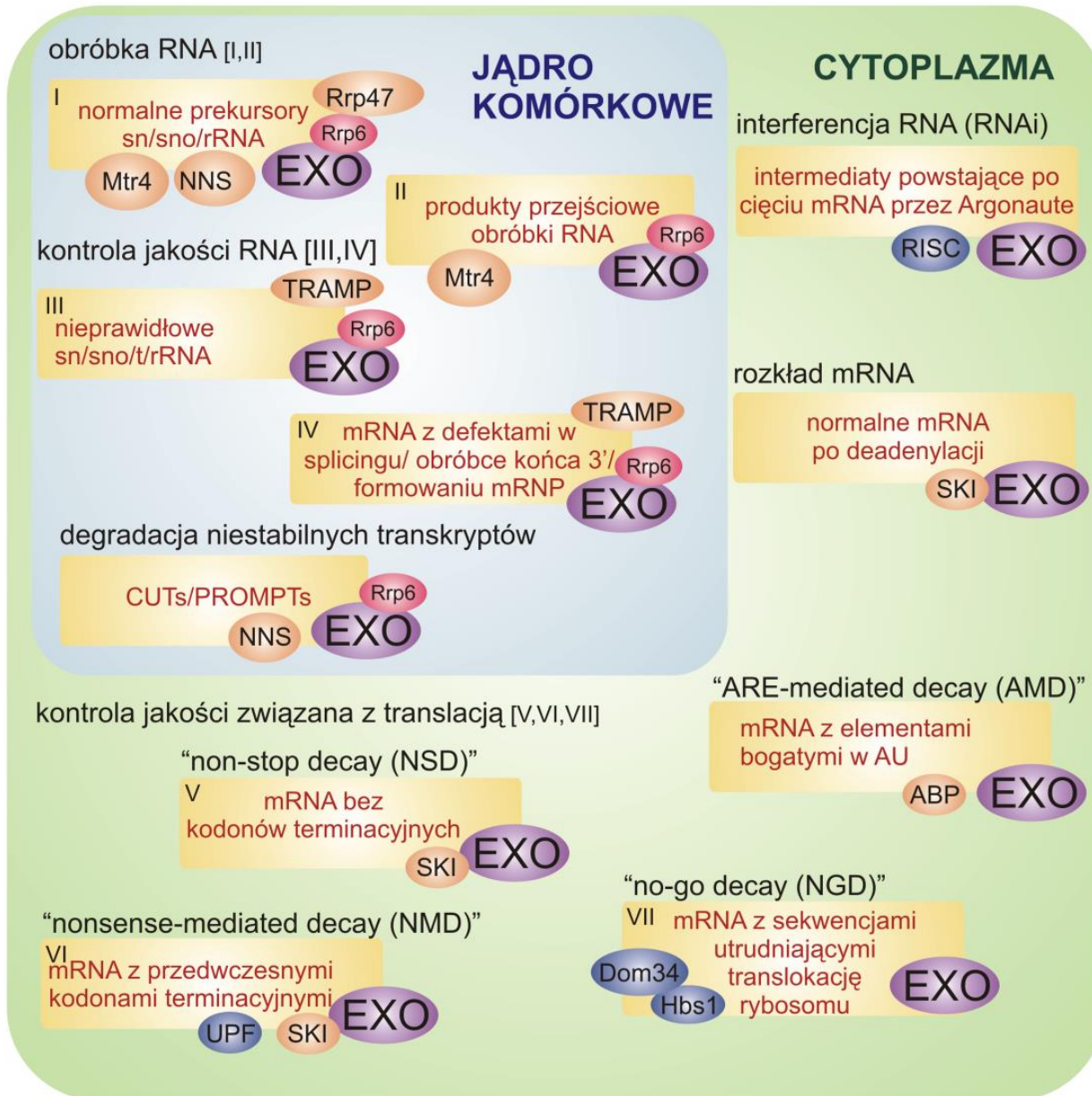
Chang et al.,
Nat Struct Mol Biol 2011

Egzosom - 3'-5'

W jądrze komórkowym drożdży współdziała z kompleksem TRAMP (polimeraza poli(A) Trf4/5, helikaza RNA Mtr4 i białko wiążące RNA Air1/2); analog u ludzi - kompleks NEXT

W cytoplazmie drożdży współdziała z potencjalną GTPazą Ski7p oraz z kompleksem Ski złożonym z helikazy RNA Ski2p i dwóch dodatkowych białek (Ski3p i Ski8p)

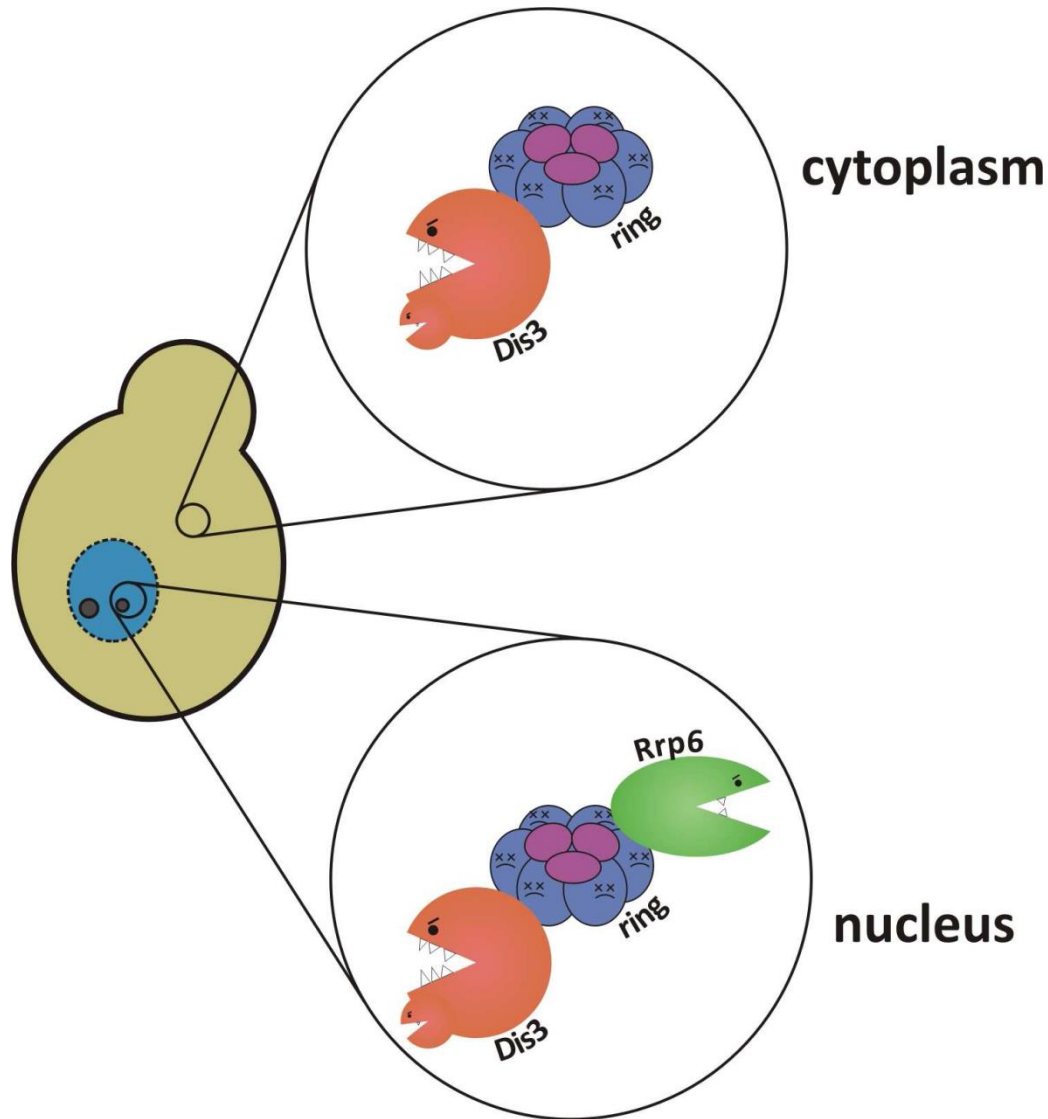
Egzosom to duży 400 kDa kompleks białkowy posiadający aktywność 3'-5' egzorybonukleazy



Jedyna niezbędna egzorybonukleaza 3'-5' u drożdży, zaangażowana w wiele procesów metabolizmu RNA zarówno w jądrze komórkowym, jak i w cytoplazmie

Tomecki et al.,
ChemBiochem 2010

Skład podjednostkowy i lokalizacja wewnątrzkomórkowa kompleksów egzozomu u drożdży

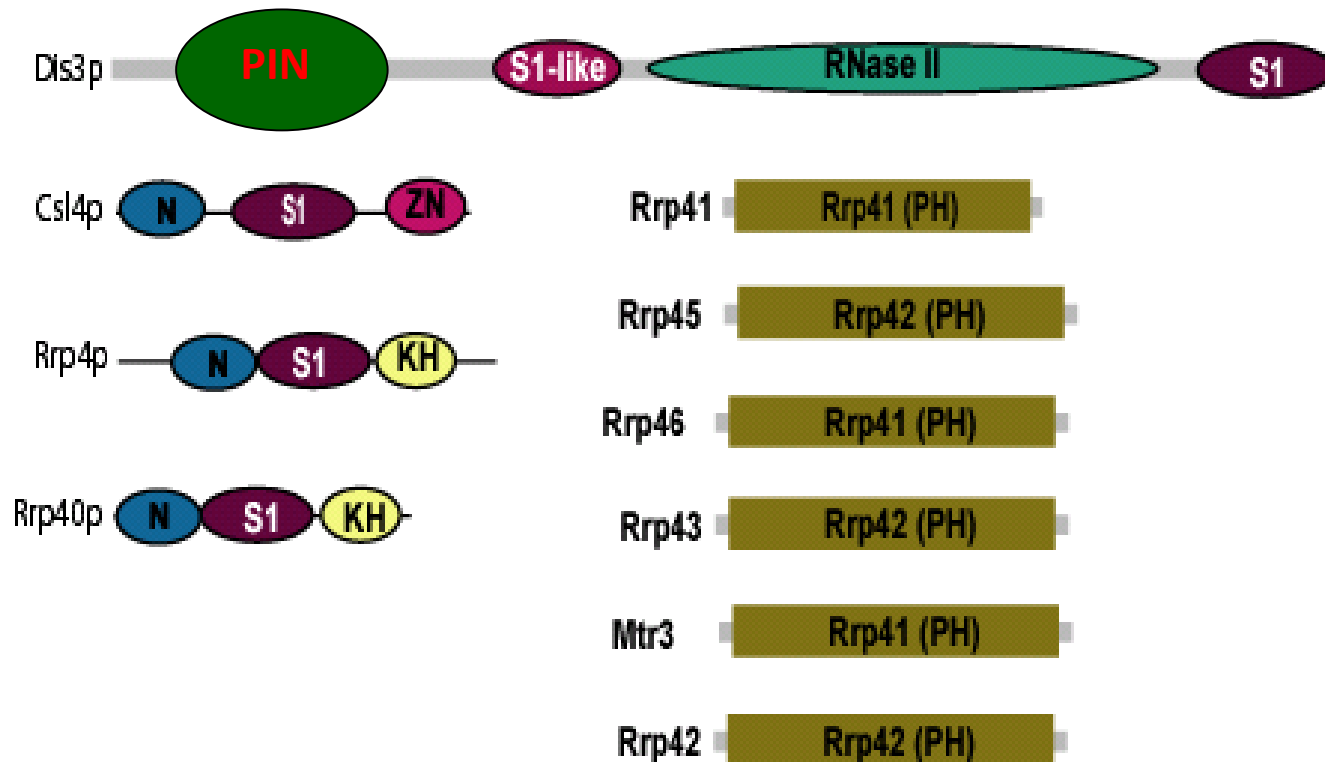


Chlebowski et al.,
w: „RNA exosome”,
ed.: T.H. Jensen;
Landes Bioscience 2010

Rdzeń egzozomu *S. cerevisiae* to chimera złożona z:

- a) 6-podjednostkowego kompleksu przypominającego pierścień RNAzy PH/PNPazy pochodzenia archeobakteryjnego;
- b) 3 podjednostek zawierających domeny wiążące RNA (KH i S1), które występują także w bakteryjnej PNPazie;
- c) Homologa RNAzy II/R **Dis3p/Rrp44** (jedyna podjednostka katalityczna rdzenia)

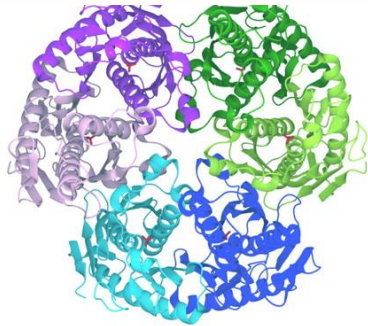
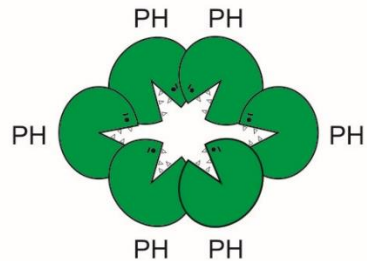
Wszystkie podjednostki rdzenia egzozomu są niezbędne dla drożdży



Nukleazy zawierające domeny RNazy PH uczestniczą w metabolizmie RNA w komórkach organizmów reprezentujących wszystkie królestwa świata żywego

A)

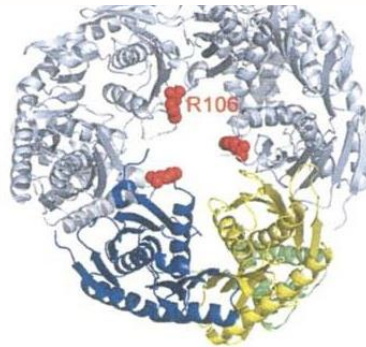
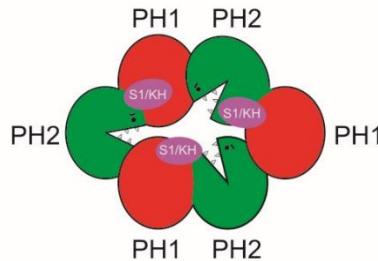
RNase PH



Ishii et al.,
J Biol Chem 2003

B)

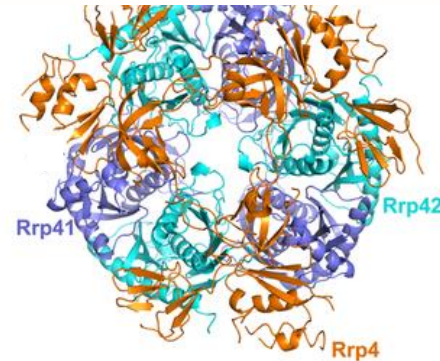
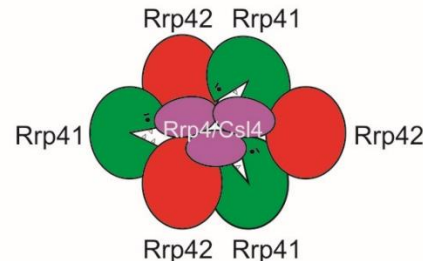
PNPase



Shi et al.,
RNA 2008

C)

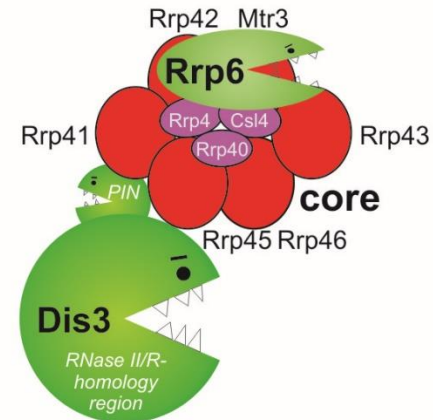
**archaeal
exosome**



Lu et al.,
PLoS One 2008

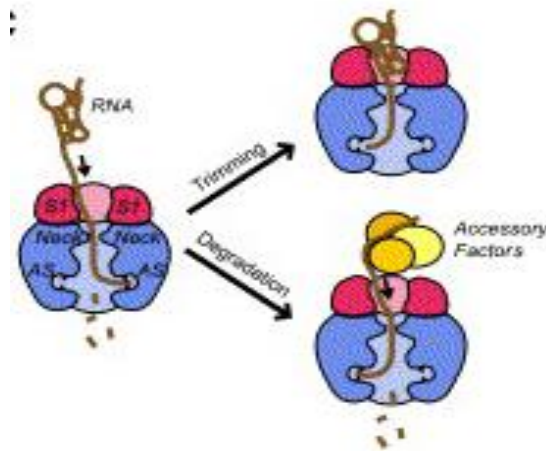
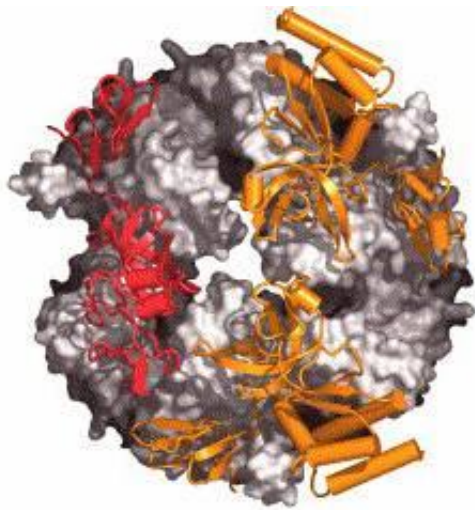
D)

**eukaryotic
exosome**

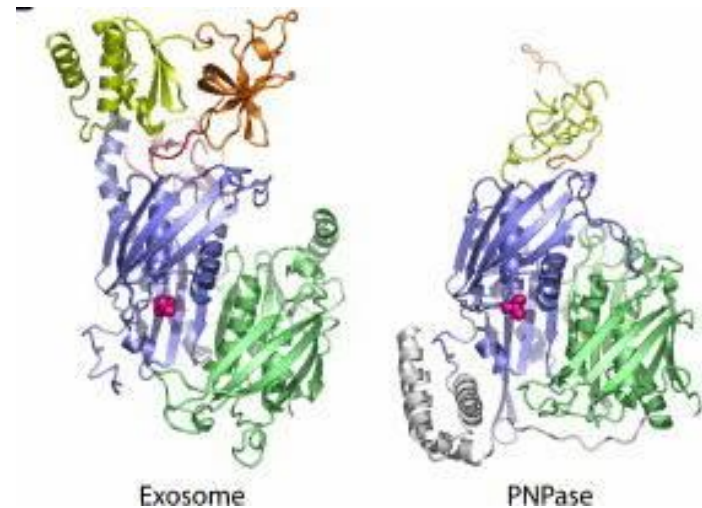


Jaka jest aktywność kompleksu egzozomu ?

Rozwiązane struktury krystaliczne archebakteryjnych kompleksów egzozomu wydawały się podobne do PNPazy. Zaproponowano, że mechanizm działania drożdżowego egzozomu może przypominać aktywność PNPazy i egzozomu archebakterii



Büttner et al.,
Mol Cell 2005



Zaproponowano, że każda z 10 podjednostek drożdżowego egzozomu może posiadać jakąś aktywność katalityczną

TO NIEPRAWDA !

Oznaczenia biochemiczne aktywności rybonukleaz na przykładzie kompleksu egzozomu [ENZYMY]

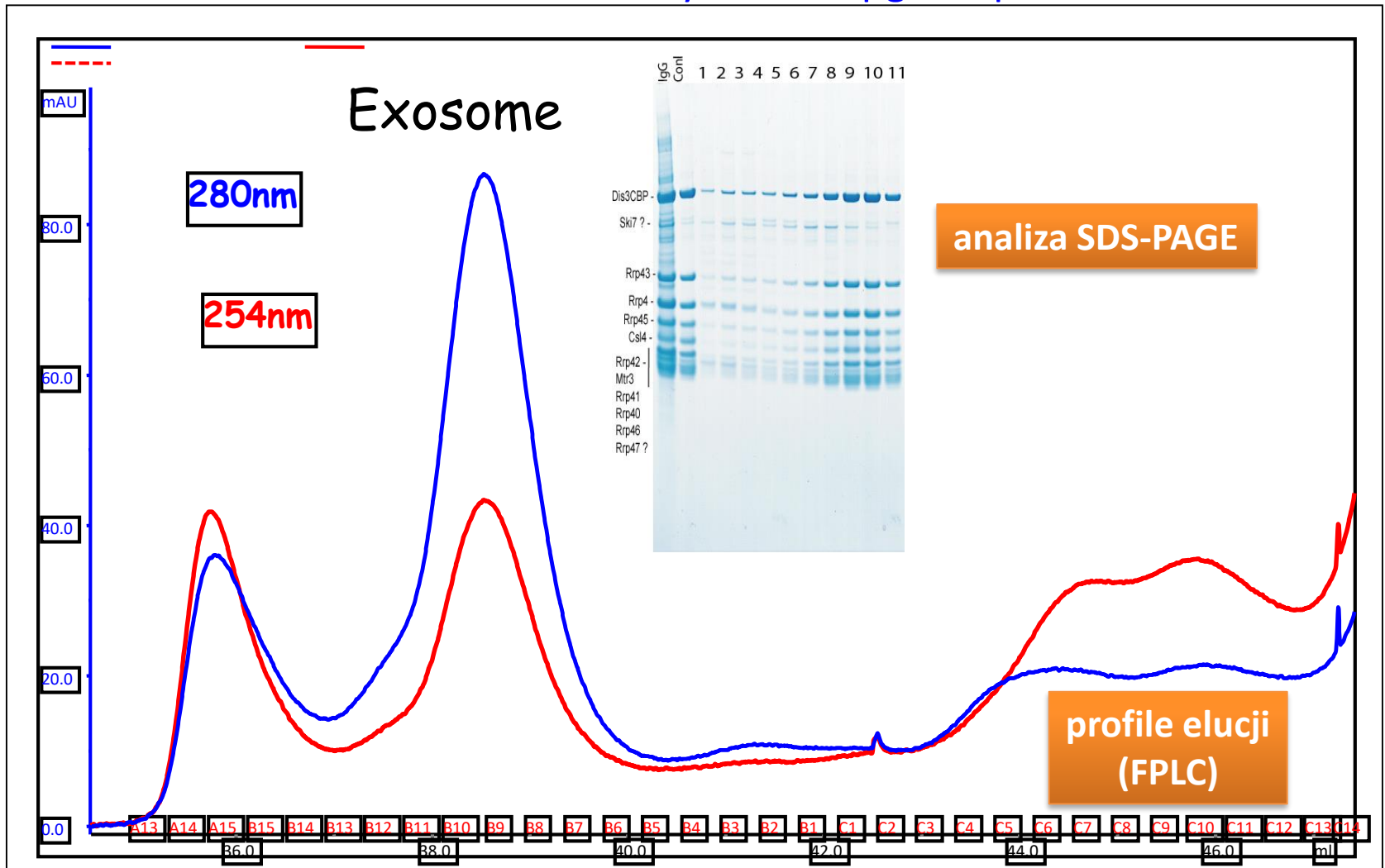
- pozyskanie materiału do badań: oczyszczanie kompleksów lub pojedynczych białek z komórek gospodarza (np. z wykorzystaniem znacznika TAP) **LUB/I** nadprodukcja heterologiczna białek w bakteriach i ich oczyszczanie w formie rekombinowanej (ewentualnie rekonstytucja kompleksu z oczyszczonych białek rekombinowanych)
- optymalizacja warunków reakcji dla konkretnej aktywności: m.in. rodzaj i stężenie kationu dwuwartościowego, czynnik buforujący stężenie soli, temperatura, czas reakcji
- konieczność przygotowania wersji białka z mutacjami w potencjalnych centrach katalitycznych jako kontroli negatywnych
- możliwość zawężenia analizy do przypuszczalnej domeny katalitycznej w przypadku, gdy białko pełnej długości jest nierozpuszczalne

Oznaczenia biochemiczne aktywności rybonukleaz na przykładzie kompleksu egzozomu [SUBSTRATY]

- poddawanie analizie substratów RNA znakowanych w różny sposób (na końcu 5' lub 3'; wewnątrz cząsteczki)
- analizowanie degradacji substratów o różnej strukturze (jednoniciowe liniowe lub koliste; dwuniciowe)
- badanie degradacji zarówno syntetycznych oligorybonukleotydów, jak i naturalnych substratów RNA, uzyskiwanych w wyniku transkrypcji *in vitro*
- **ZESTAWIENIE WYNIKÓW ANALIZ BIOCHEMICZNYCH *in vitro* Z DANymi STRUKTURALNYMI ORAZ WYNIKAMI DOŚWIADCZEŃ *in vivo***

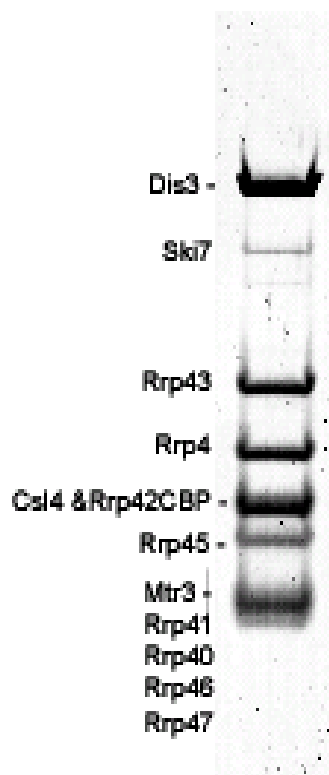
Oczyszczanie egzosomu z drożdży

Oczyszczanie na złożu IgG (białko Dis3p opatrzone znacznikiem TAP jako przynęta) + sączenie molekularne (kolumna Superdex S-200). Z 18 litrów hodowli można otrzymać 200 μ g kompleksu



Oznaczanie aktywności biochemicznej egzosomu

W celu zbadania aktywności rdzenia egzosomu (9-składnikowy pierścień + białko Dis3p), kompleks oczyszczano przy użyciu fuzji Rrp41p-TAP ze szczepu *S. cerevisiae* pozbawionego *RRP6*.



analiza SDS-PAGE

We wstępnych doświadczeniach wykryto bardzo niską aktywność hydrolityczną i nie stwierdzono żadnej aktywności fosforolitycznej. Wymusiło to konieczność optymalizacji parametrów do oznaczania aktywności biochemicznej kompleksu

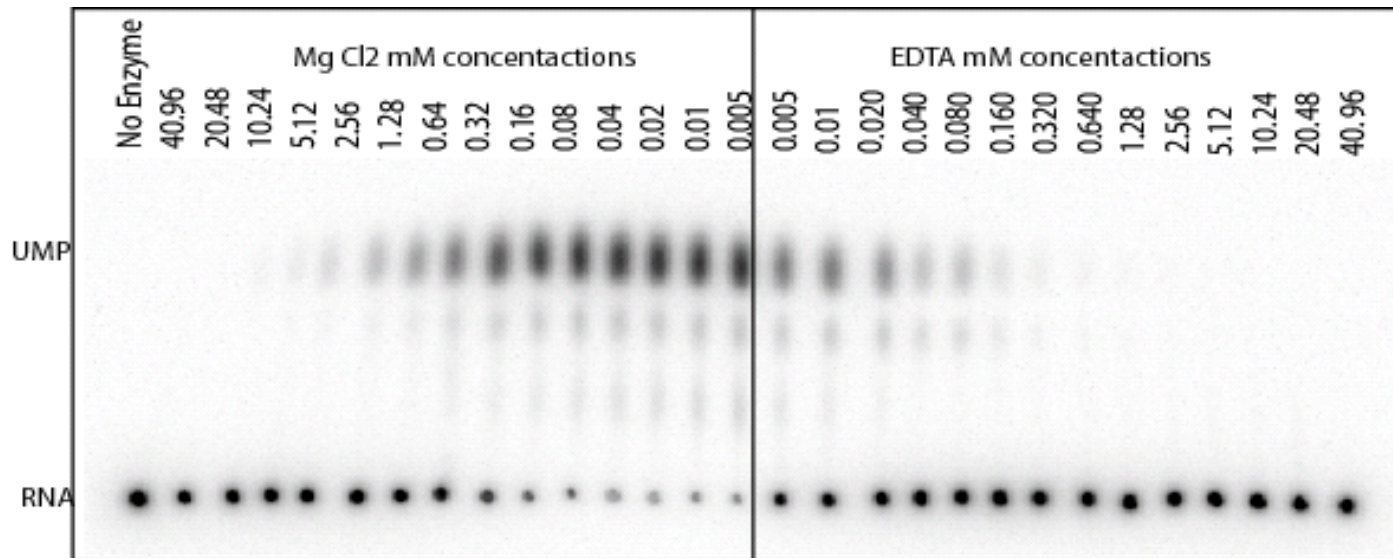
Egzosom jest hydrolazą

Aktywność egzosomu jest zależna od jonów Mg^{2+} , ale silnie hamowana przy stężeniu magnezu powyżej 1 mM.

Przykład optymalizacji stężenia kationu dwuwartościowego stosowanego w reakcji

Wszystkie wcześniejsze doświadczenia *in vitro* wykonywano w warunkach, w których aktywność kompleksu jest około 100-krotnie niższa od warunków optymalnych

Nie wykryto fosforolizy i powstawania UDP



analiza TLC

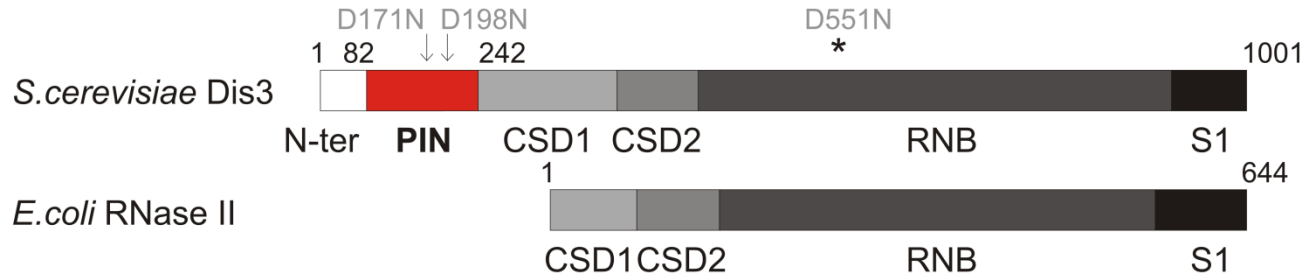
substrat
syntetyzowany w
transkrypcji *in vitro*
z użyciem [^{32}P]-UTP

Analiza aktywności egzosomu metodą TLC (PEI-celuloza) przy różnym stężeniu Mg^{2+} i EDTA (bufor: 10 mM Tris pH=8; 75 mM NaCl; 1 mM β -merkaptoetanol)

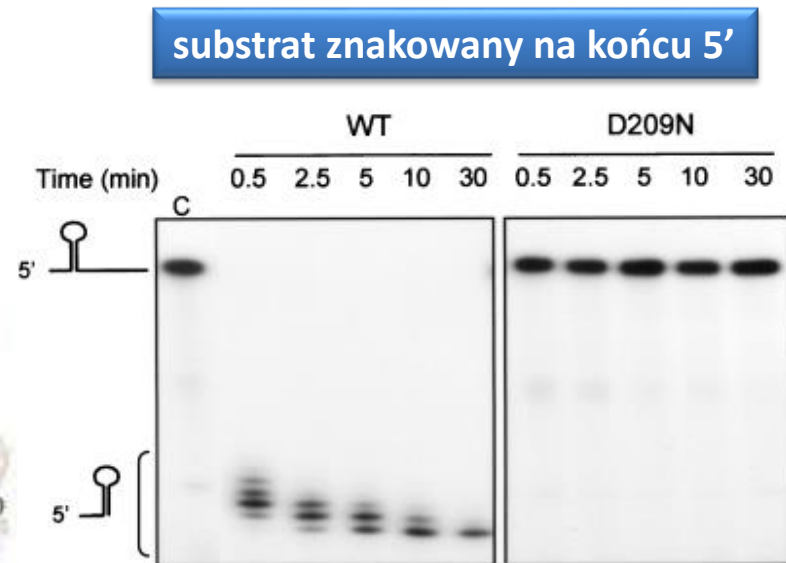
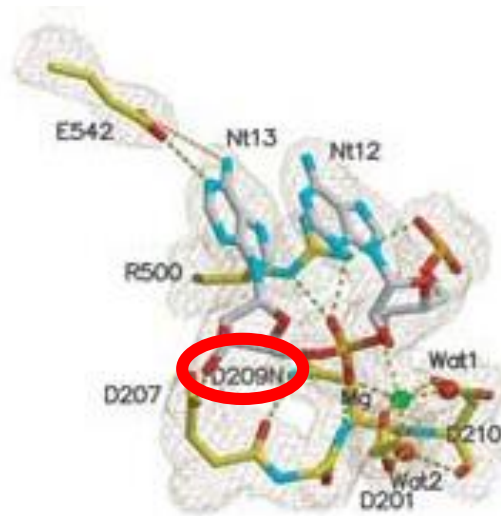
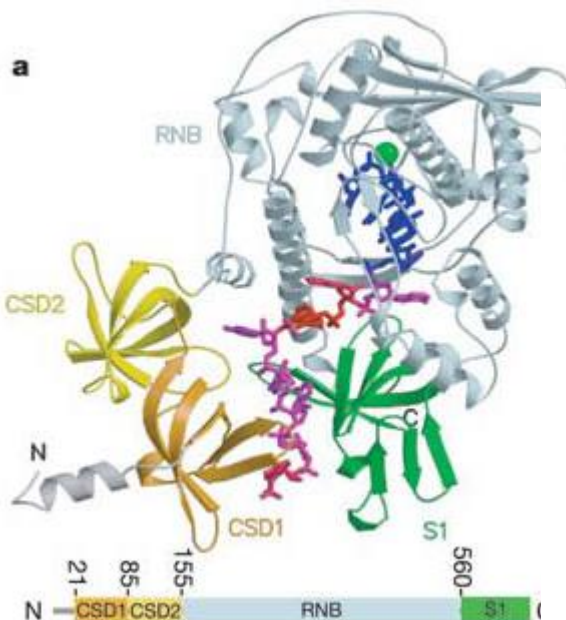
Dziembowski et al., *Nat Struct Mol Biol* 2007

Dis3 – potencjalna podjednostka katalityczna

- Organizacja domen funkcjonalnych białka Dis3

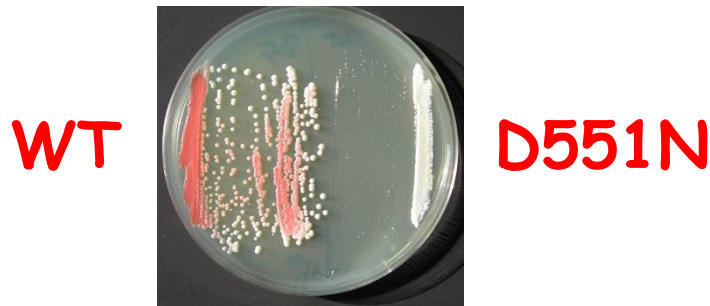


- zidentyfikowano mutację znoszącą aktywność RNazy II *E. coli* (D209N)
[aminokwas D209 bierze udział w koordynacji jonu Mg^{2+}]



Czy analogiczna mutacja białka Dis3p wpływa na przeżywalność drożdży ?

- homologiczny asparaginian (D551) w *DIS3* zmutowano w asparaginę poprzez rekombinację *in vivo* w dwóch szczepach: szczepie dzikim (do analizy fenotypów) oraz w szczepie z delecją *RRP6* ($\Delta rrp6$) (do oczyszczania kompleksu i badania aktywności)

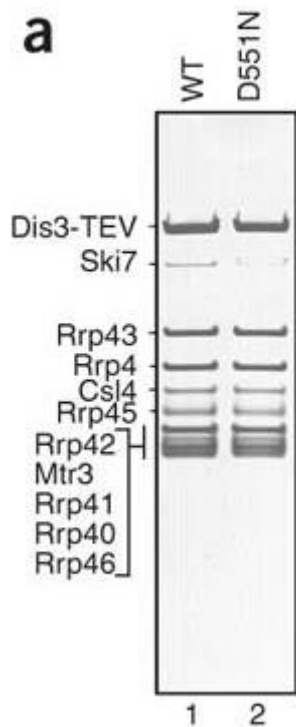


Mutacja *DIS3* D551N powoduje bardzo silny fenotyp wzrostowy

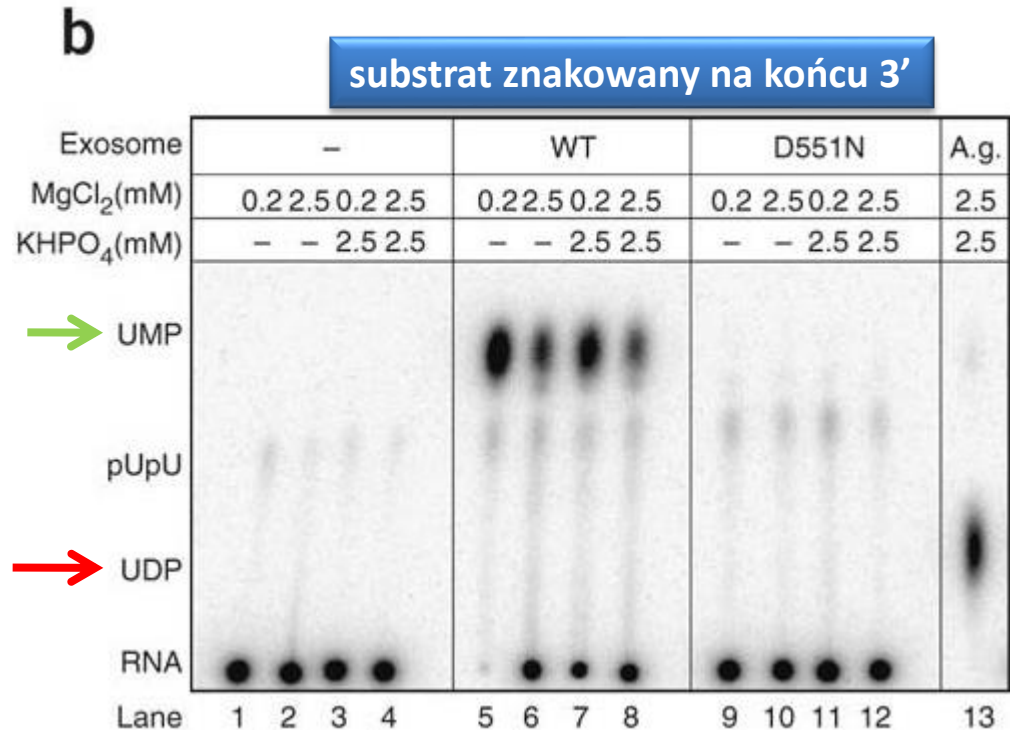
WNIOSEK: Nienaruszony aminokwas D551 jest konieczny dla prawidłowego funkcjonowania komórek

HIPOTEZA: Mutacja D551N w Dis3p znosi aktywność katalityczną egzozomu

Czy mutacja D551N znosi aktywność hydrolityczną egzosomu ?



analiza SDS-PAGE



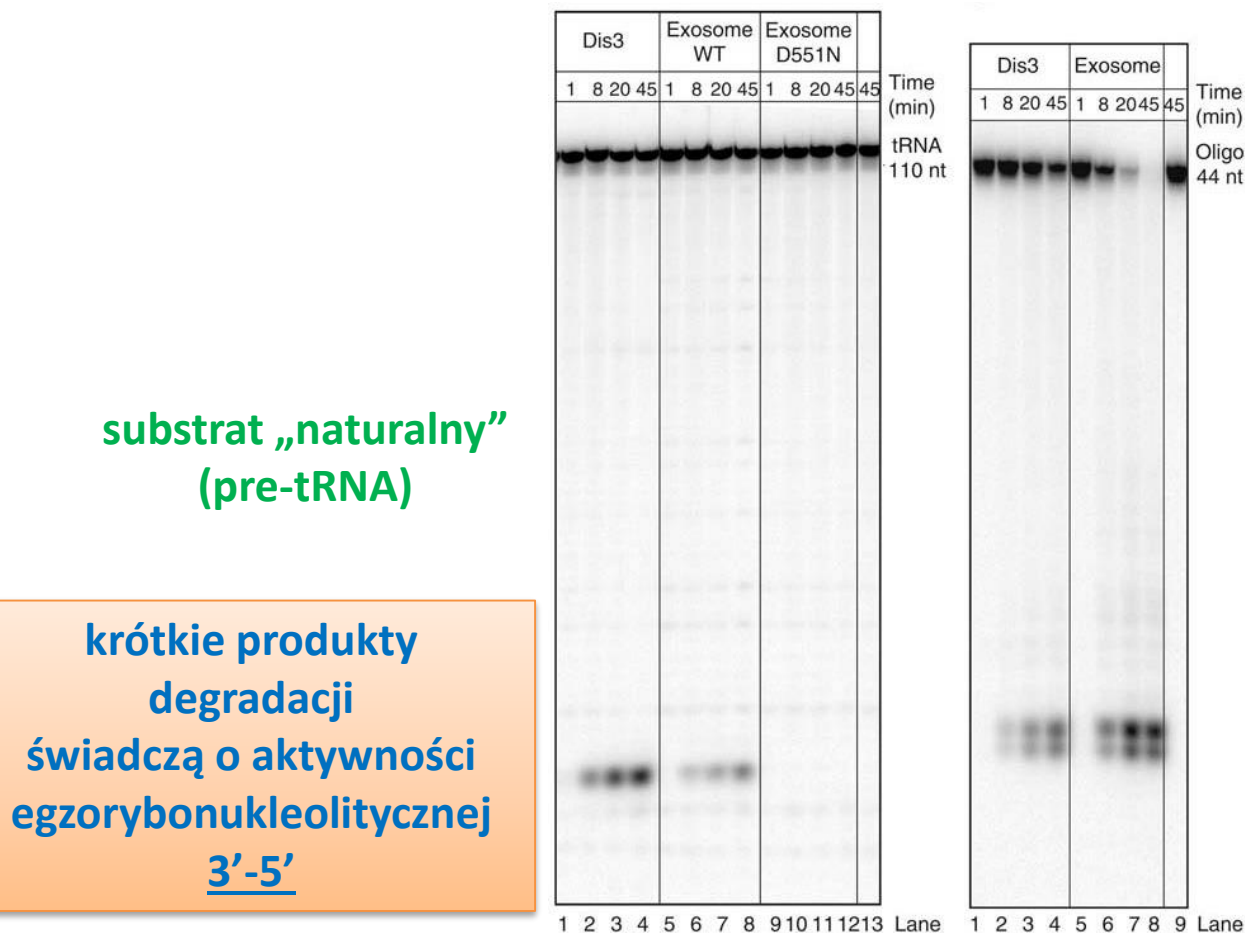
analiza TLC

Analiza aktywności egzorybonukleolitycznej egzosomów zawierających WT Dis3 lub Dis3 D551N w obecności substratu RNA znakowanego [³²P]-pUpU na końcu 3'

WNIOSEK: Obecność nienaruszonego aminokwasu D551 jest warunkiem prawidłowej aktywności nukleolitycznej kompleksu egzosomu

Dziembowski et al., *Nat Struct Mol Biol* 2007

Kompleks egzozomu i białko Dis3p wykazują podobną aktywność względem różnych substratów RNA (jednoniciowych)



analiza PAGE

syntetyczny
oligorybonukleotyd

substraty znakowane
na końcu 5'

krótkie produkty
degradacji
świadczą o aktywności
egzorybonukleolitycznej
3'-5'

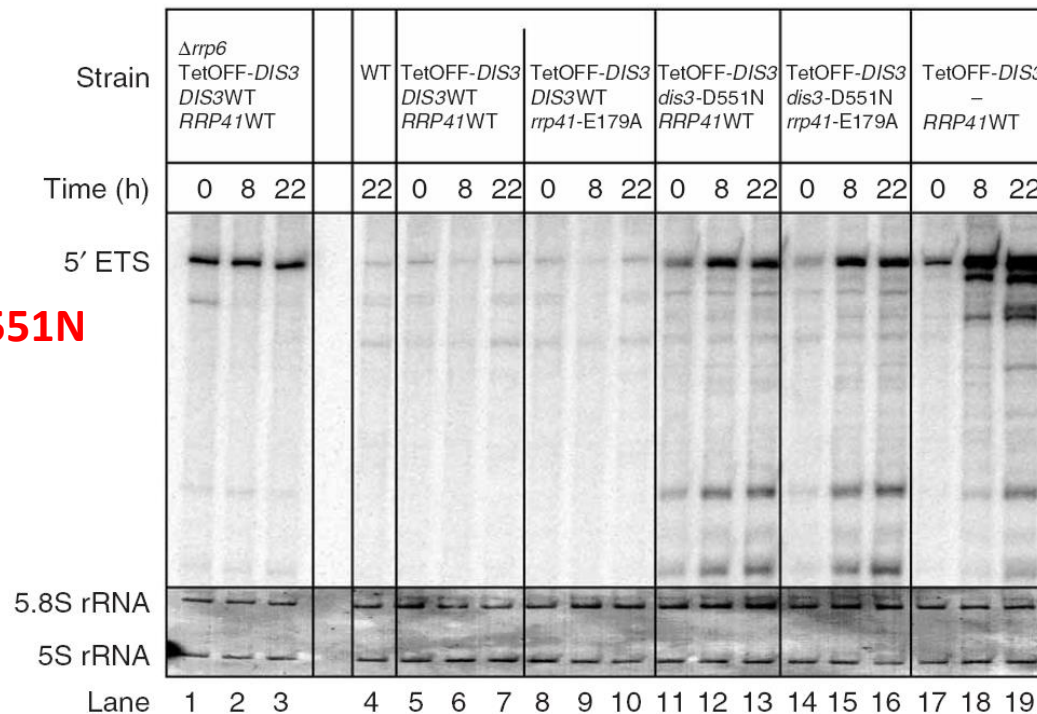
WNIOSEK: Wyniki doświadczeń *in vitro* wskazują, że białko Dis3p jest główną podjednostką katalityczną kompleksu egzozomu

Czy Dis3p jest rzeczywiście jedyną podjednostką katalityczną rdzenia drożdżowego egzozomu ?

Mutacja katalityczna Dis3 D551N powoduje fenotyp charakterystyczny dla deplecji poszczególnych podjednostek egzozomu:

- akumulacja prekursora 7S obróbki 5.8S rRNA
- akumulacja 5'-ETS
- inhibicja degradacji mRNA przy jednoczesnym zahamowaniu ścieżki degradacji w kierunku 5'-3'

**akumulacja 5'-ETS
w mutancie Dis3 D551N**



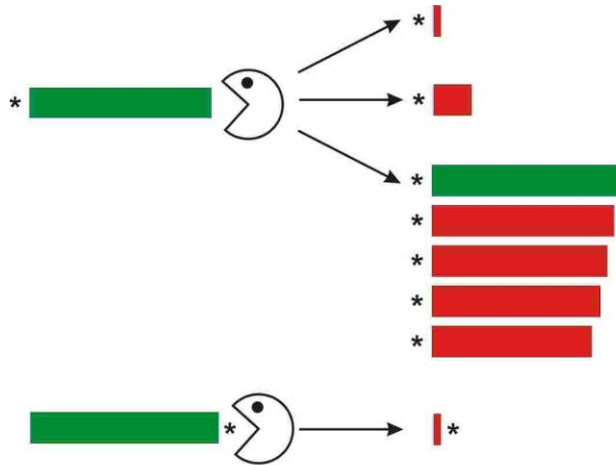
analiza
hybrydizacyjna
typu northern

Obserwacje z doświadczeń *in vivo* dostarczają silnego poparcia dla wyników eksperymentów biochemicznych

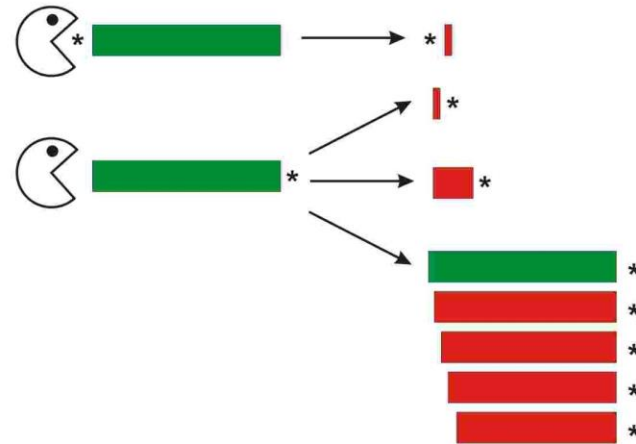
Dziembowski et al., *Nat Struct Mol Biol* 2007

W jaki sposób określa się kierunek działania rybonukleazy ?

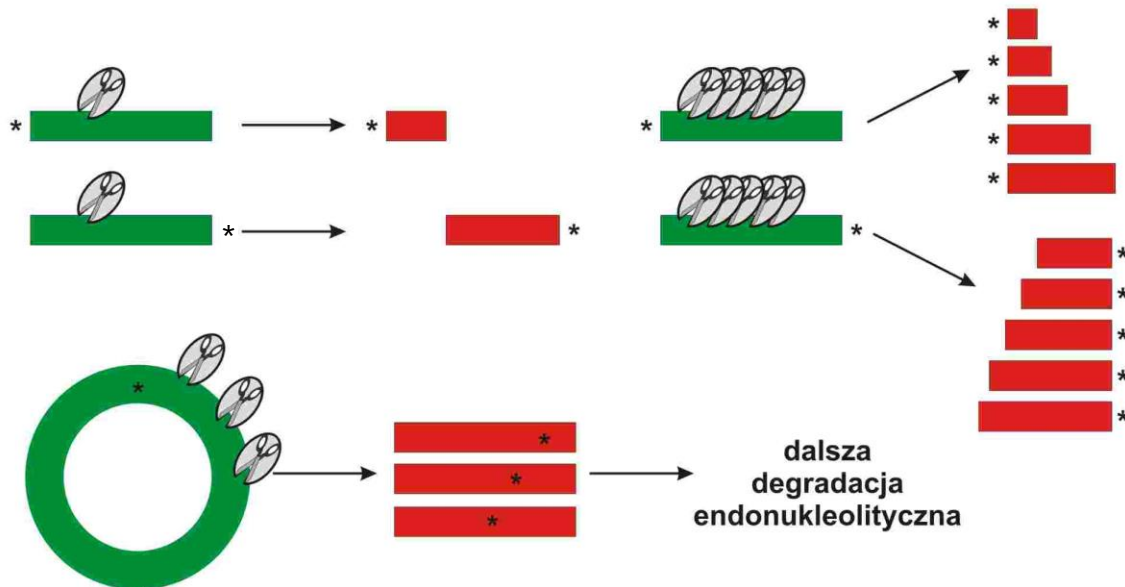
egzorybonukleazy 3'-5'



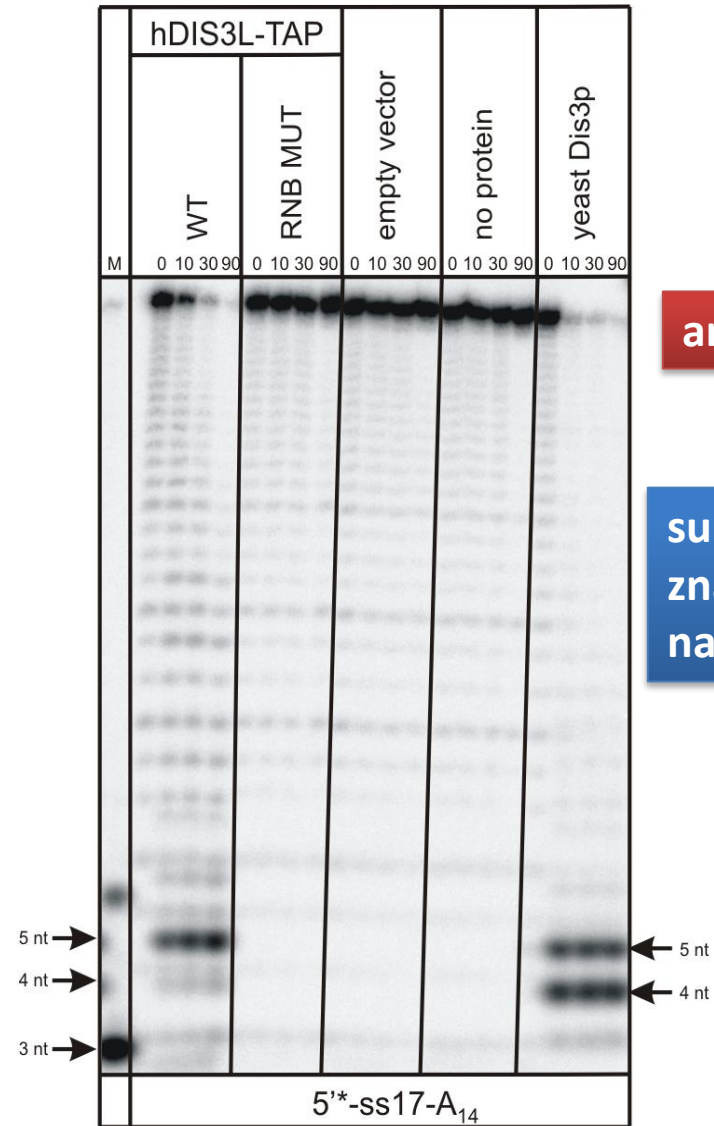
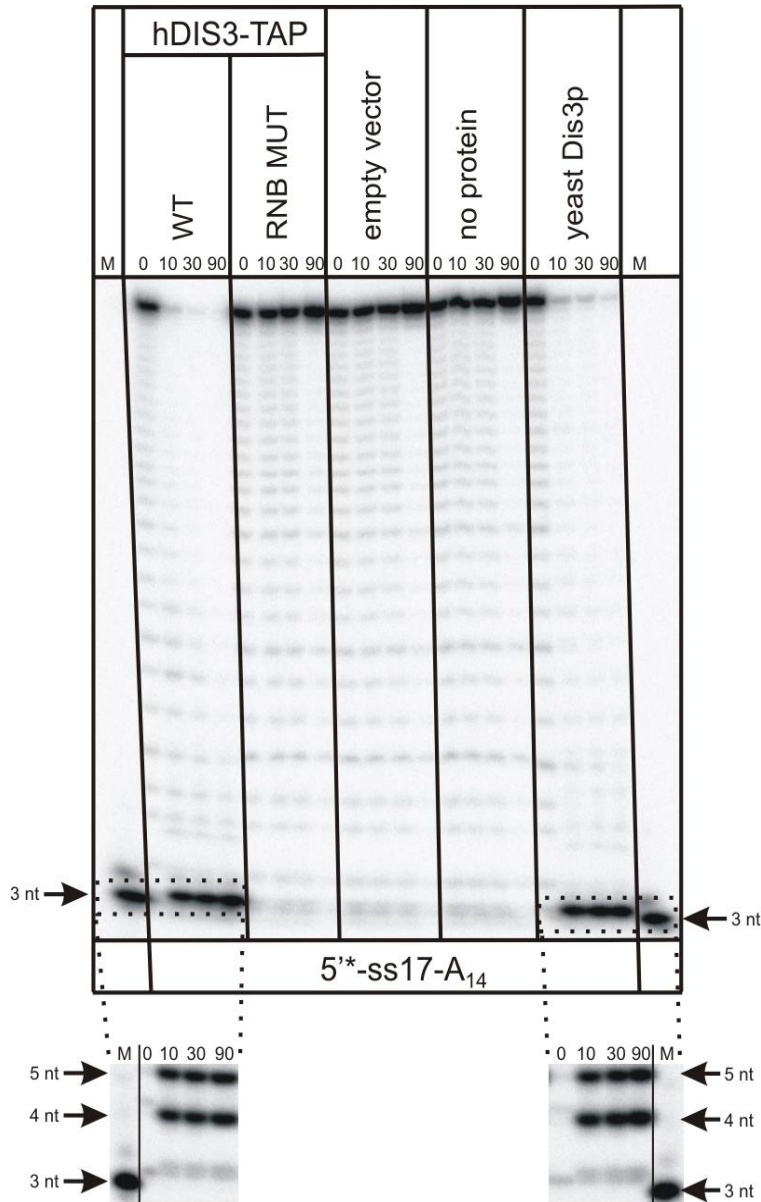
egzorybonukleazy 5'-3'



endorybonukleazy



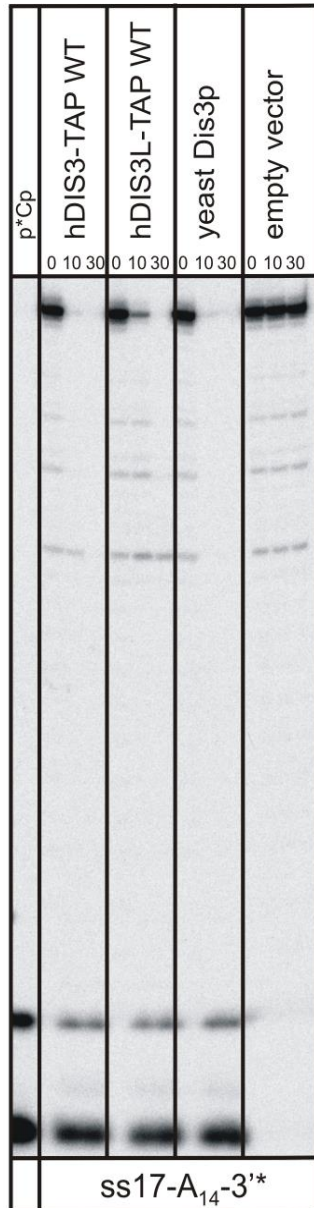
Czy ludzkie homologi Dis3p – hDIS3 i hDIS3L – są również egzonukleazami 3'-5' ?



analiza PAGE

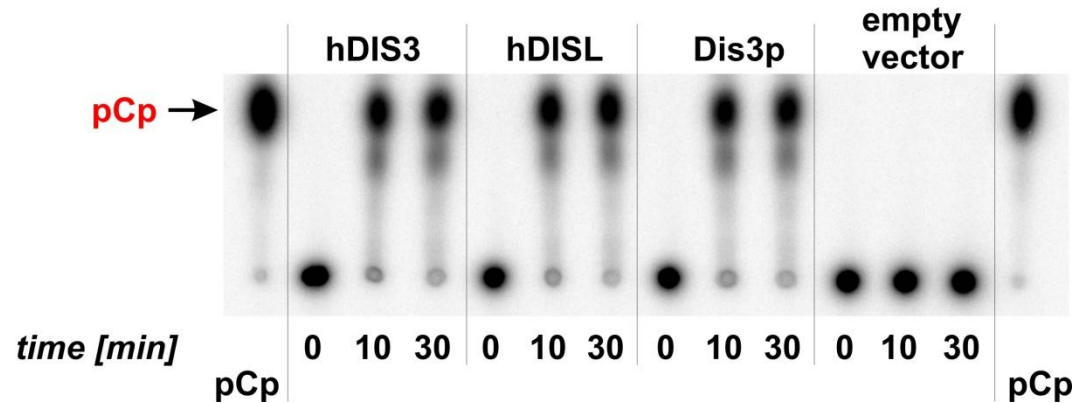
substrat
znakowany
na końcu 5'

Dla pewności trzeba zbadać substrat wyznakowany na przeciwnym końcu



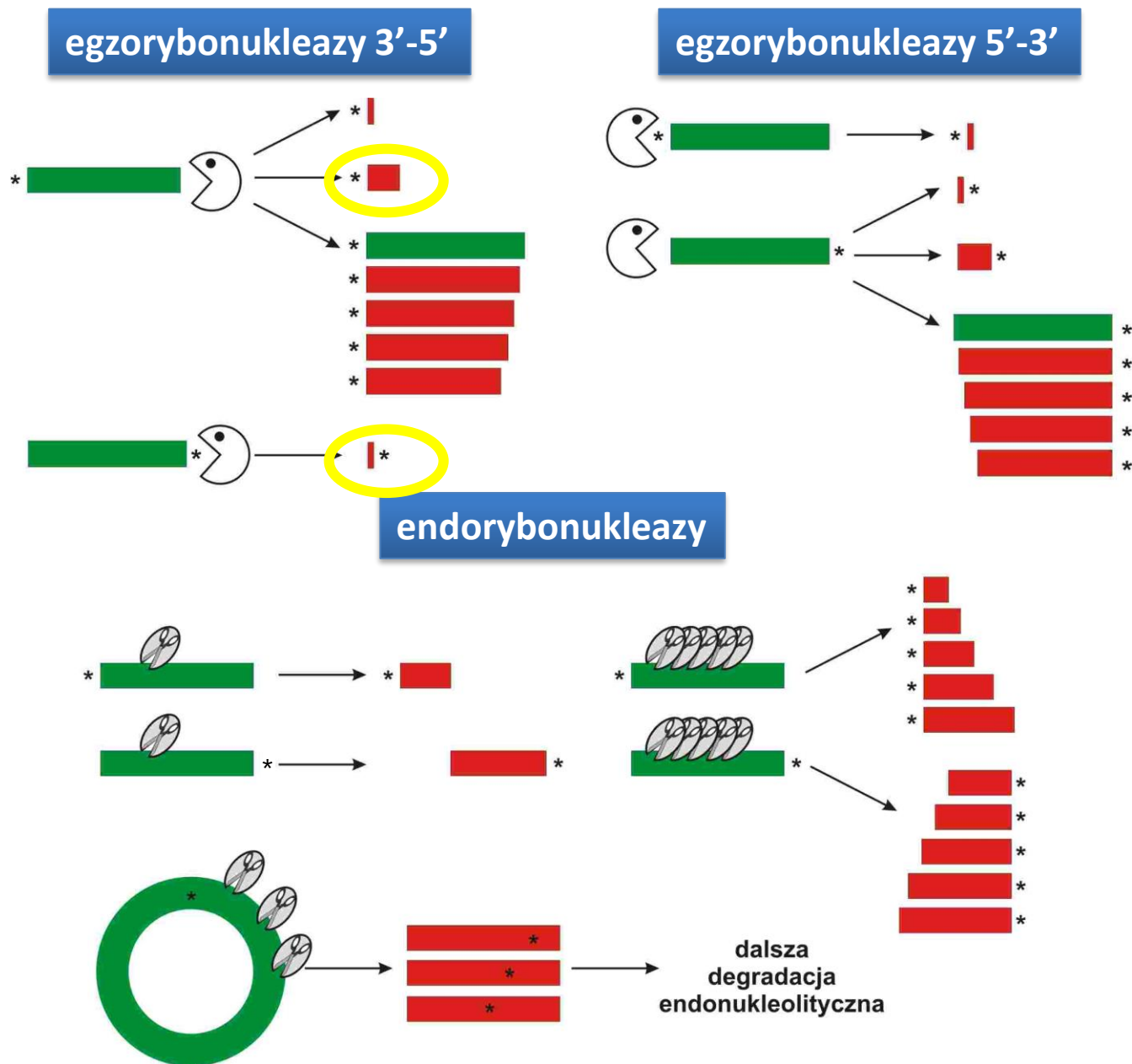
substrat
znakowany
na końcu 3'

analiza PAGE



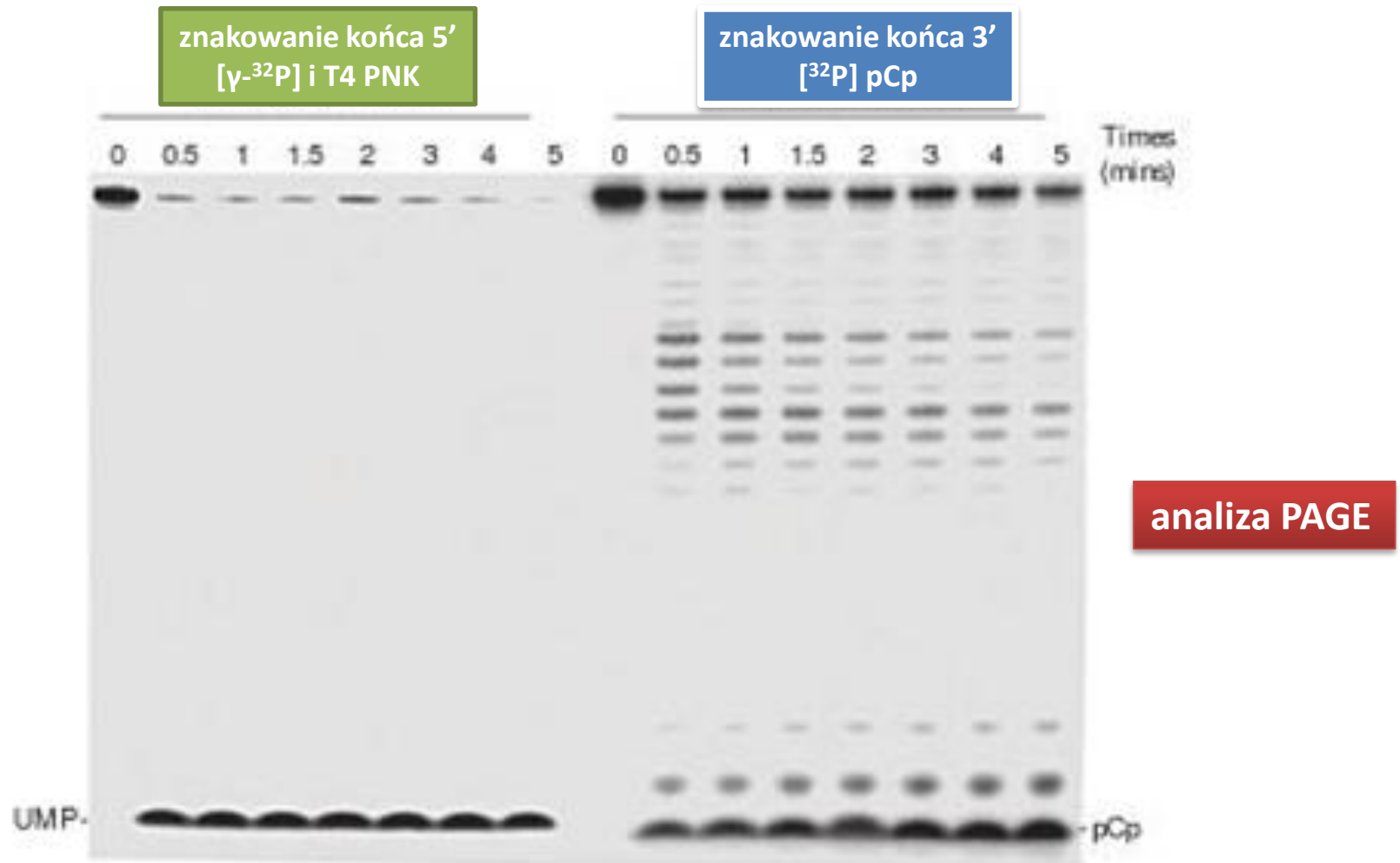
analiza TLC

Ludzkie homologi Dis3 są egzorybonukleazami 3'-5'



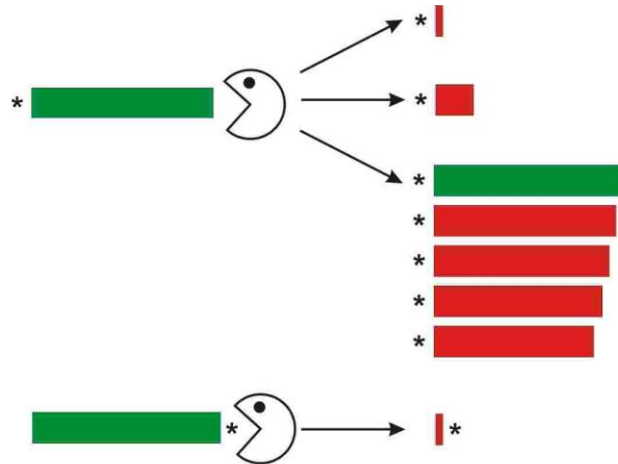
A jak to wygląda w przypadku egzonukleaz 5'-3' ?

Przykład 1: Xrn1 z *S. cerevisiae*

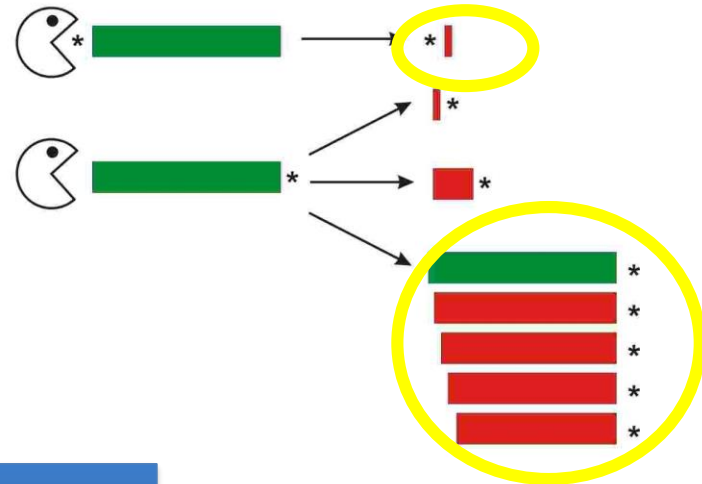


Xrn1 jest egzorybonukleazą 5'-3'

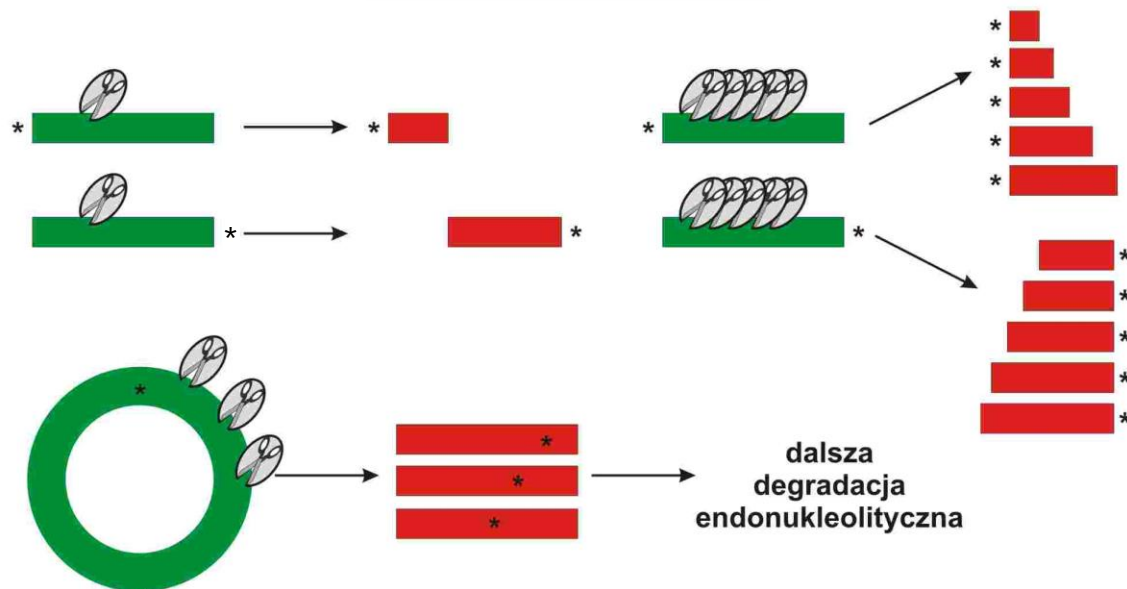
egzorybonukleazy 3'-5'



egzorybonukleazy 5'-3'



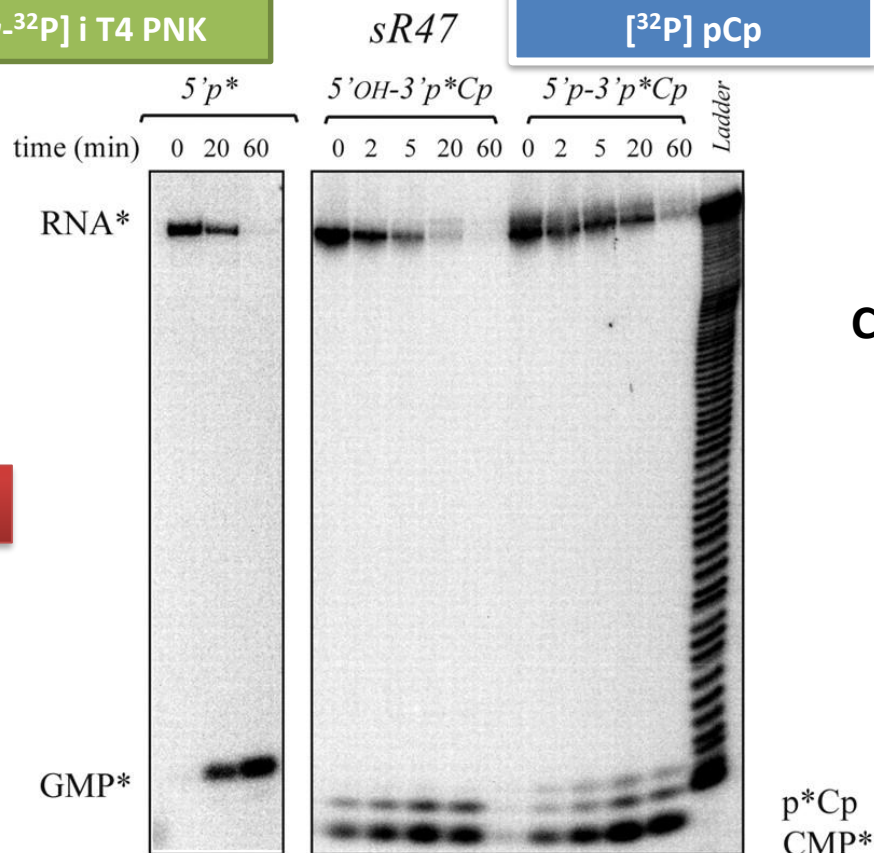
endorybonukleazy



Czy RNaza J1 działa w kierunku 3'-5', czy 5'-3' ?

znakowanie końca 5'
[γ - ^{32}P] i T4 PNK

znakowanie końca 3'
[^{32}P] pCp

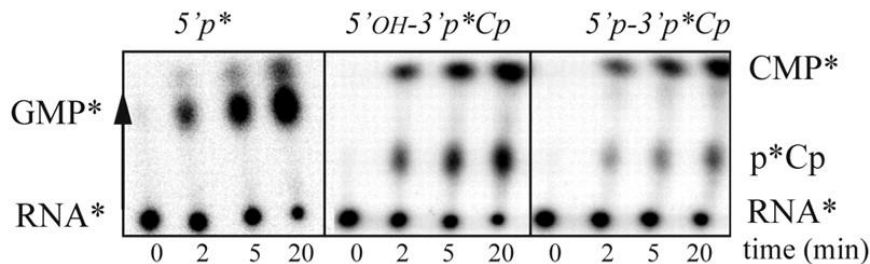


Clouet-d'Orval et al.,
J Biol Chem 2010

analiza PAGE

G – pierwszy nukleotyd
substratu *sR47*

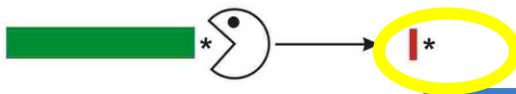
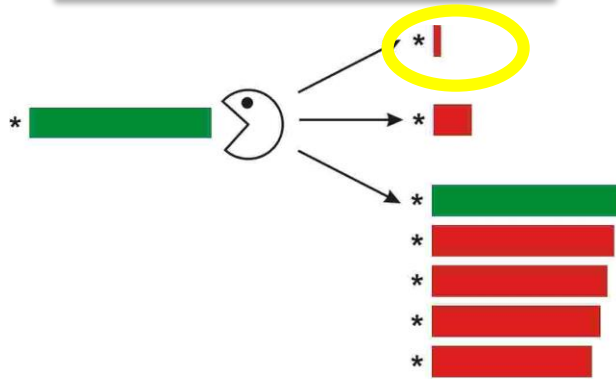
analiza TLC



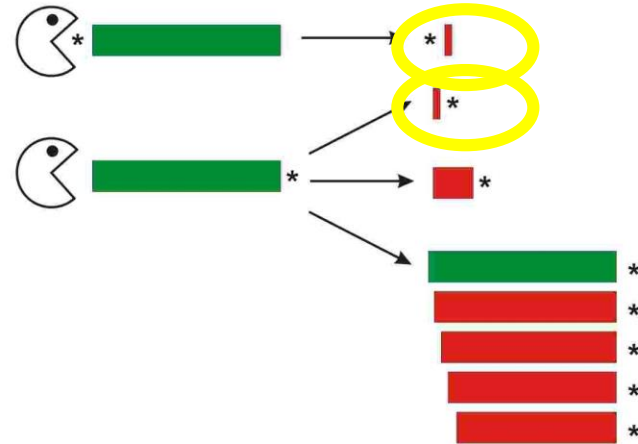
Nie można stwierdzić na podstawie powyższych wyników

Nie zawsze jest to oczywiste

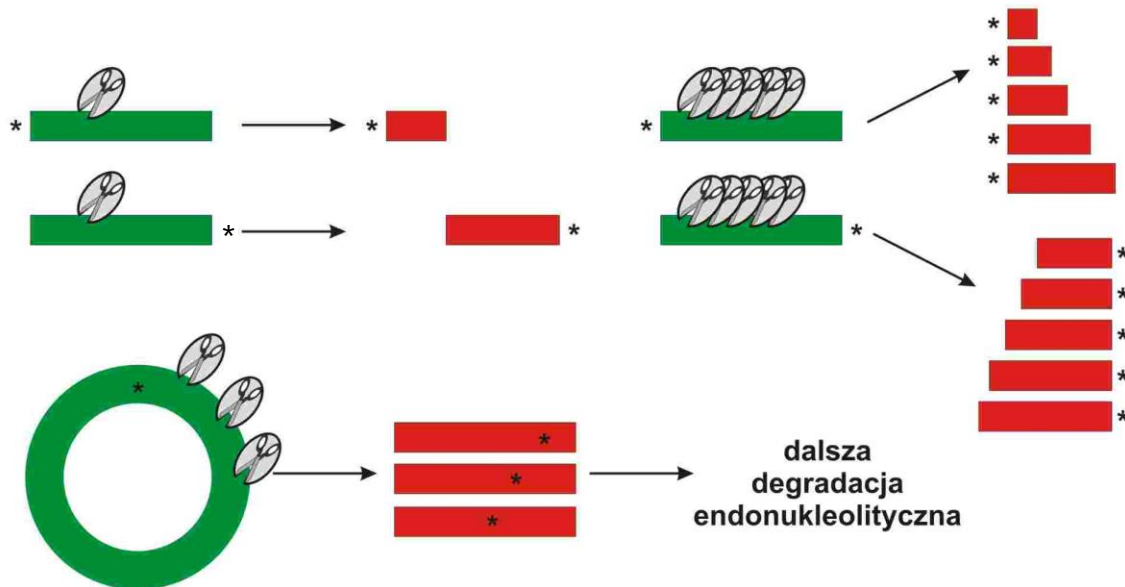
egzorybonukleazy 3'-5'



egzorybonukleazy 5'-3'



endorybonukleazy

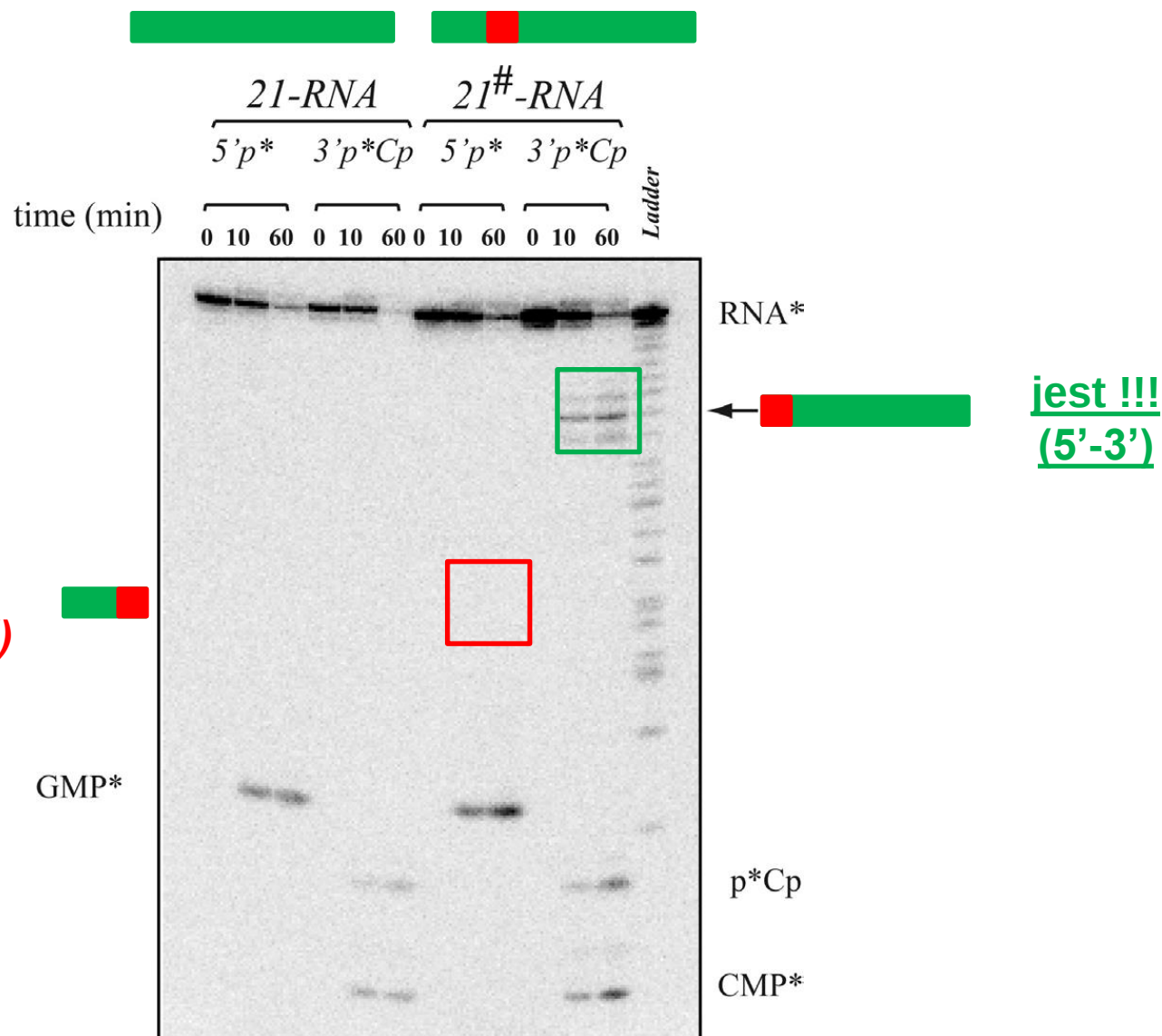


Jak to ostatecznie stwierdzić ?

Asymetryczne wprowadzenie do substratu elementu spowalniającego aktywność nukleolityczną

analiza PAGE

*brak
(nie 3'-5')*



Aktywność wielu rybonukleaz zależy od statusu fosforylacji końca 5' – jak badać to zjawisko ?

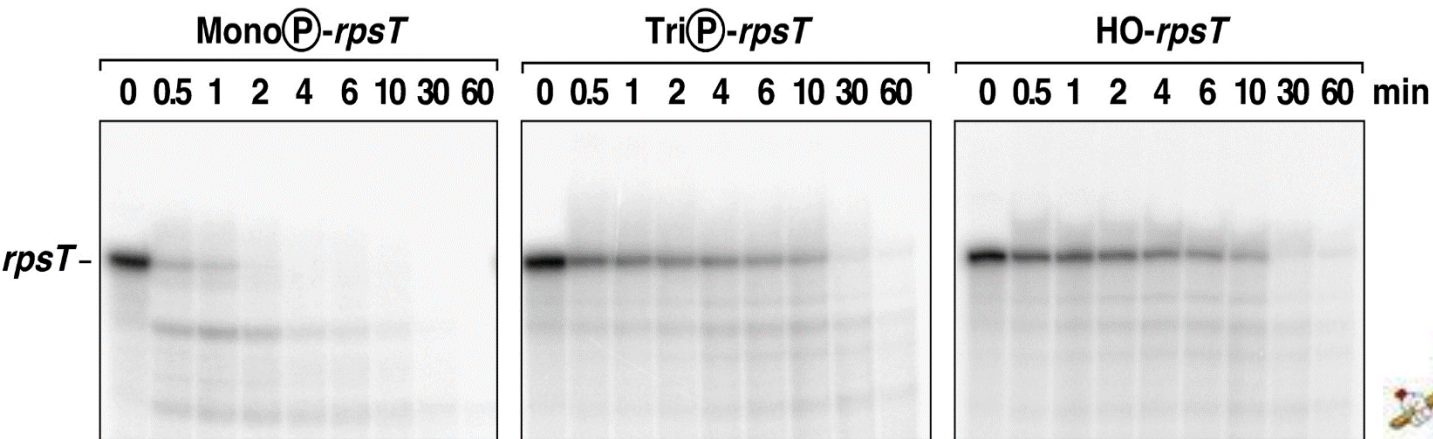
Przygotowanie substratów z różnym końcem 5':

Transkrypcja *in vitro* w obecności [α - 32 P]UTP:

- 1) równe stężenia wszystkich NTP – trifosforan
- 2) nadmiar NMP odpowiadającego 1. nukleotydowi substratu – monofosforan
- 3) potraktowanie substratu fosfatazą alkaliczną – grupa hydroksylowa
- 4) nadmiar analogu czapeczki (transkrypty eukariotyczne) – czapeczka

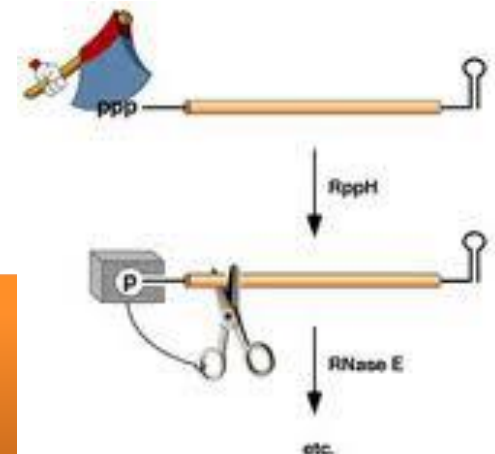
B RNase E cleavage *in vitro*:

Escherichia coli



analiza PAGE

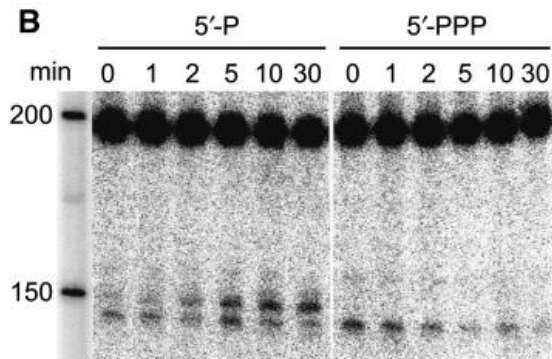
Celesnik et al.,
Mol Cell 2007



Za usuwanie pirofosforanu u *E. coli* odpowiada pirofosfohydrolaza RppH. Jest to krok inicjujący degradację, który poprzedza trawienie RNA przez RNazę E !

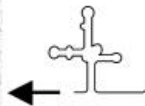
Inne przykłady rybonukleaz zależnych od „czujnika 5”

- RNaza J1 *Bacillus subtilis* i *Archaea* (patrz powyżej)
- RNaza Y *Bacillus subtilis*

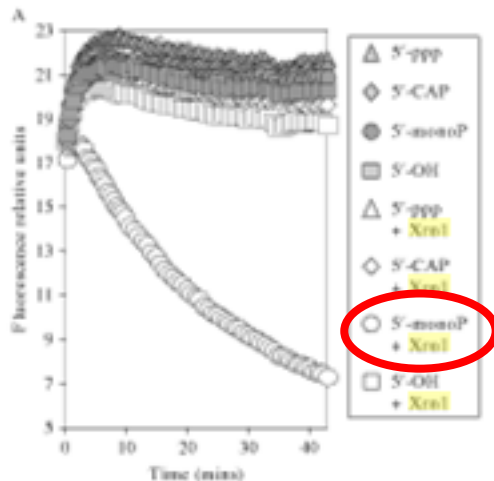


analiza PAGE

Shahbadian et al.,
EMBO J 2009

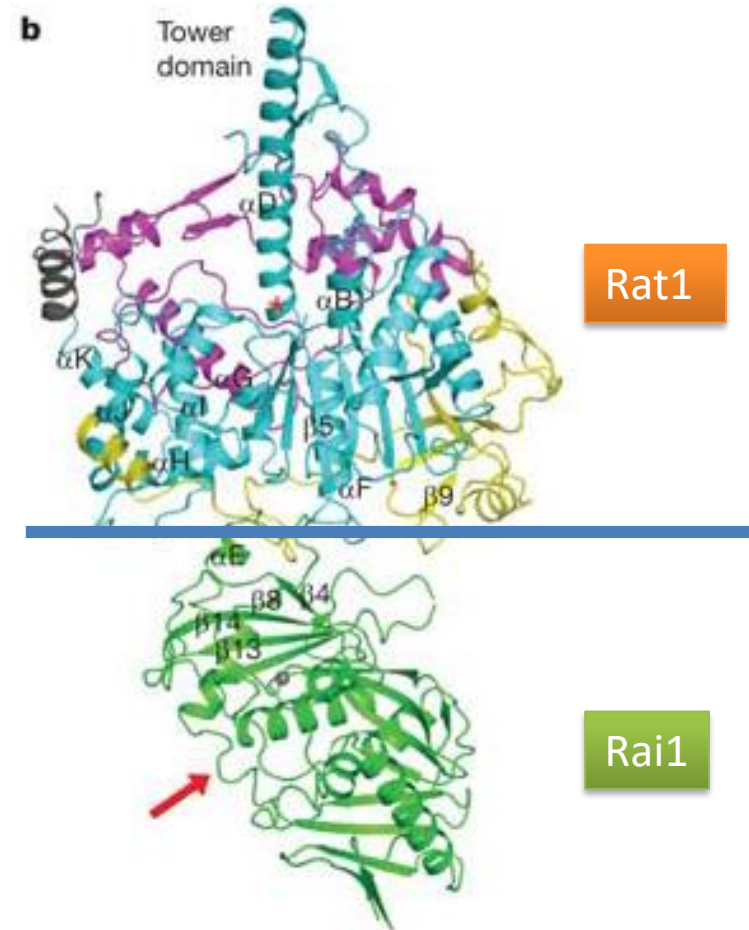


- Xrn1 (stąd konieczne usunięcie czapeczki)



Pellegrini et al., *Methods enzymol* 2008

- Rat1 (współdziała z pirofosfohydrolazą Rai1)

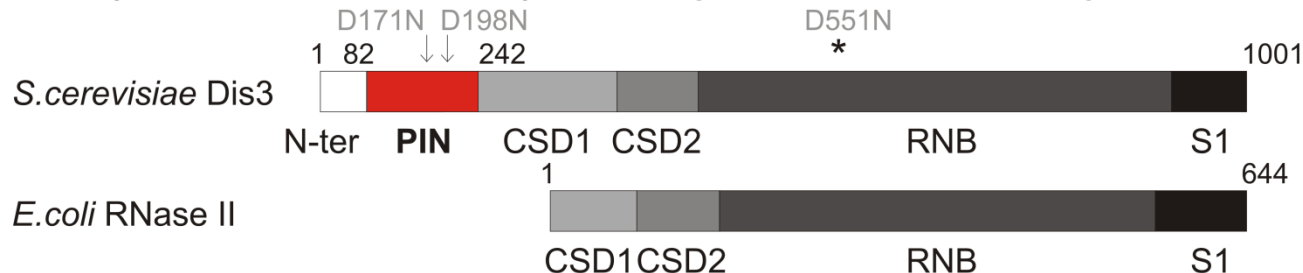


Xiang et al.,
Nature 2009

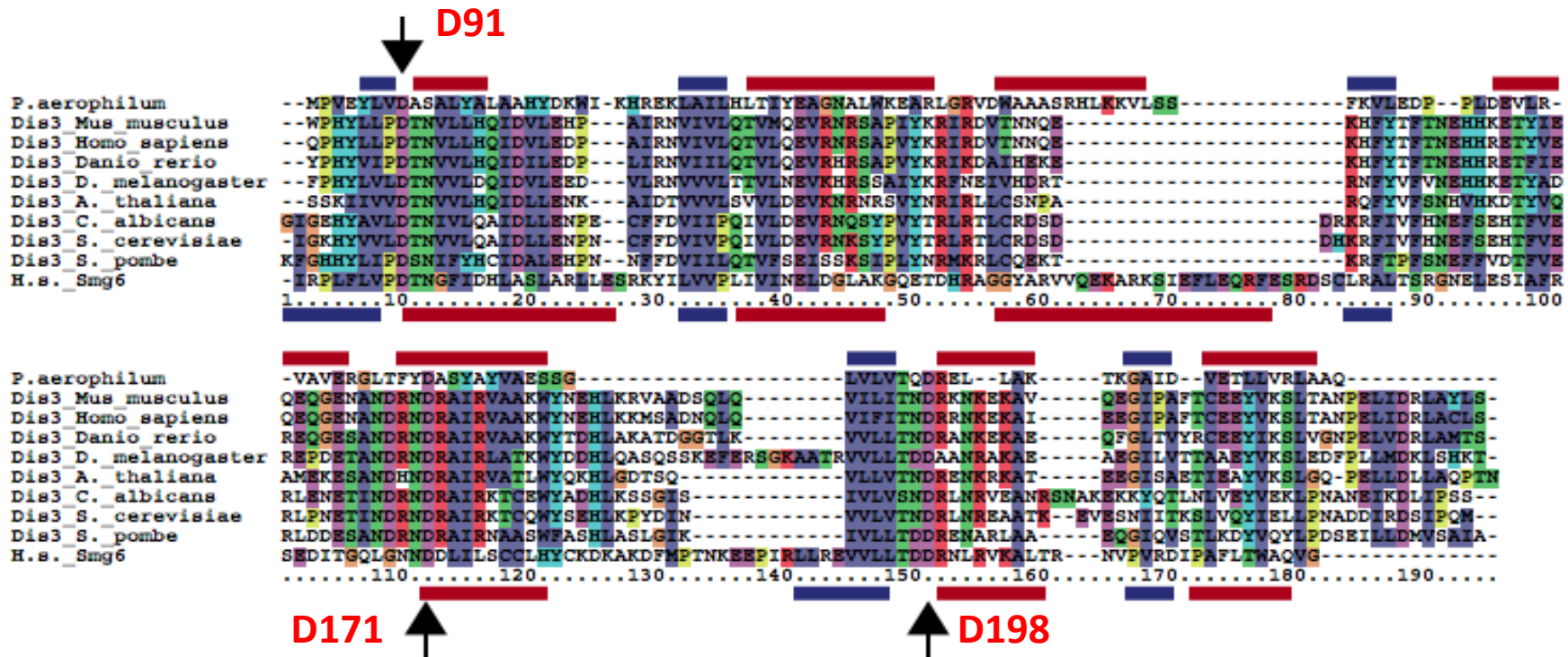
Czy Dis3p jest wyłącznie egzorybonukleazą 3'-5'?

O tym, że warto poświęcić dłuższą chwilę wnikliwej analizie sekwencji aminokwasowej badanego białka

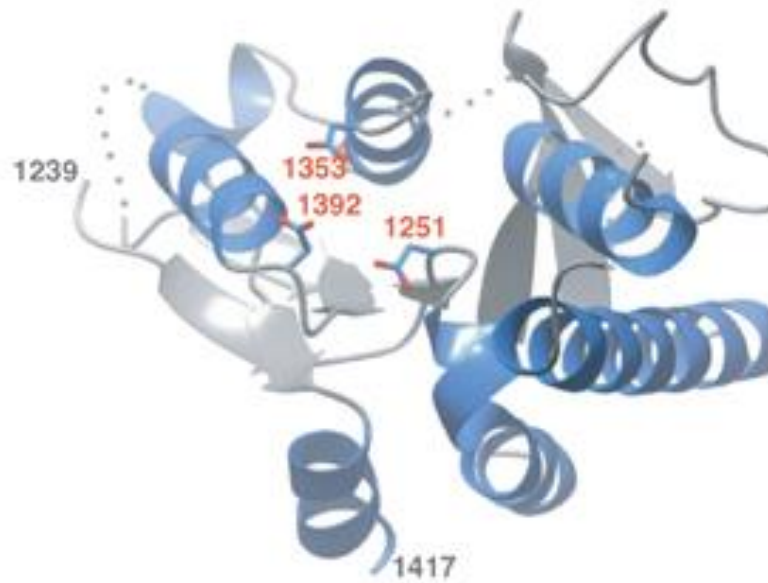
• Organizacja domen funkcjonalnych białka Dis3p



• N-końcowa domena PIN jest silnie zachowana w ewolucji



Białka zawierające domenę PIN są nukleazami

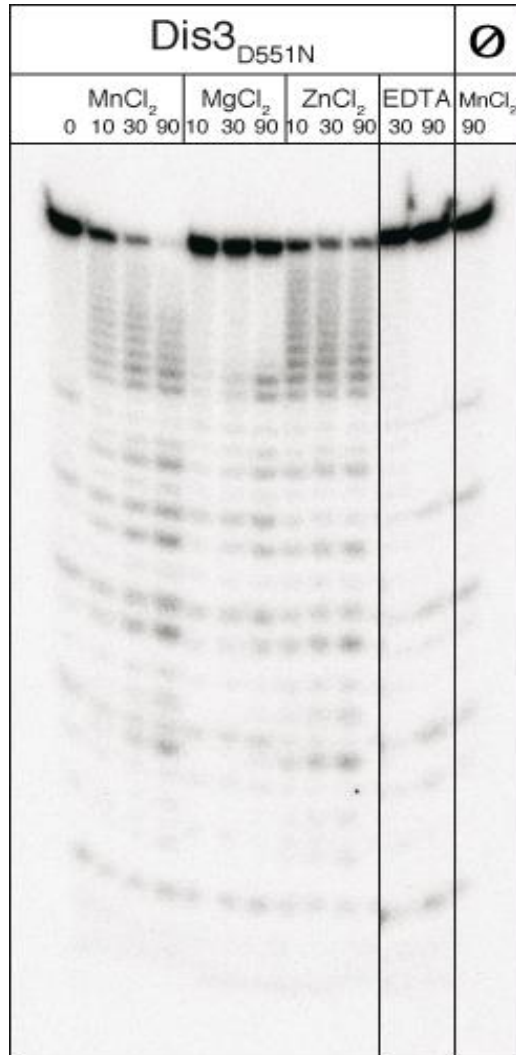


Struktura białka hSMG6 (Glavan *et al.*, EMBO J, 2006)

- RNAza H bakteriofaga T4
- endonukleaza FEN1
- białko Nob1p uczestniczy w endonukleolitycznej obróbce 20S pre-rRNA
- białko hSmg6 będące elementem maszynerii NMD, wykazuje aktywność endonukleolityczną

Mutant Dis3p D551N pozbawiony aktywności egzorybonukleolitycznej degraduje RNA *in vitro*

Przykład optymalizacji rodzaju kationu dwuwartościowego stosowanego w reakcji



Wymagania odnośnie kofaktorów:

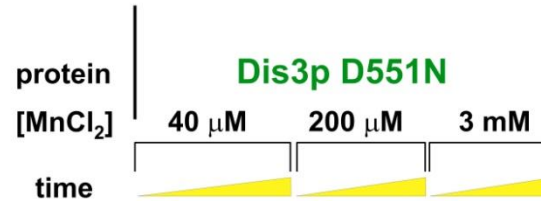
$$[\text{Mn}^{2+}] > [\text{Zn}^{2+}] > [\text{Mg}^{2+}]$$

substrat znakowany na końcu 5'

analiza PAGE

Aktywność nukleolityczna mutantu Dis3p D551N wymaga wysokiego stężenia Mn^{2+}

Przykład optymalizacji stężenia kationu dwuwartościowego stosowanego w reakcji

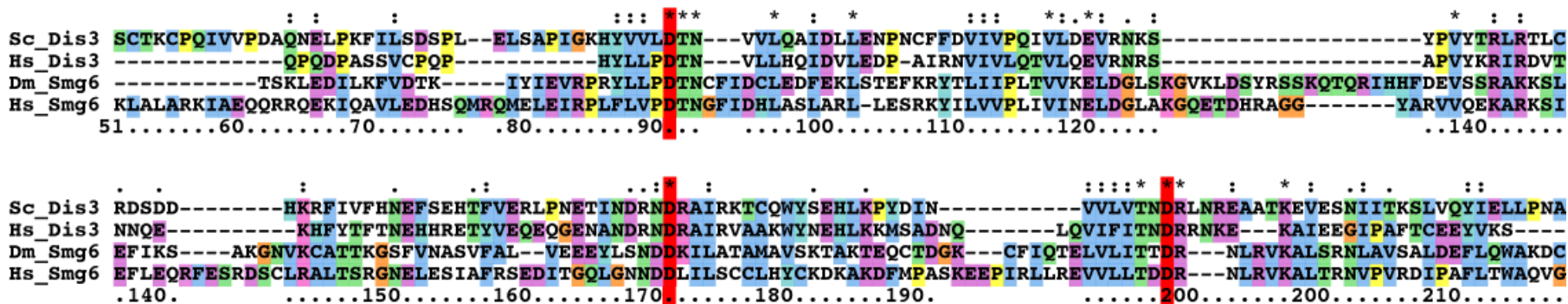


substrat znakowany na końcu 5'

analiza PAGE

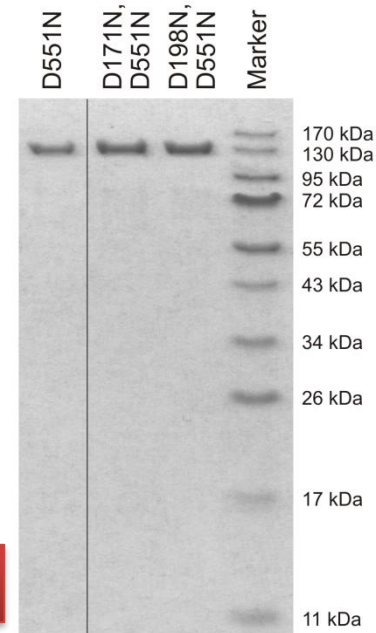
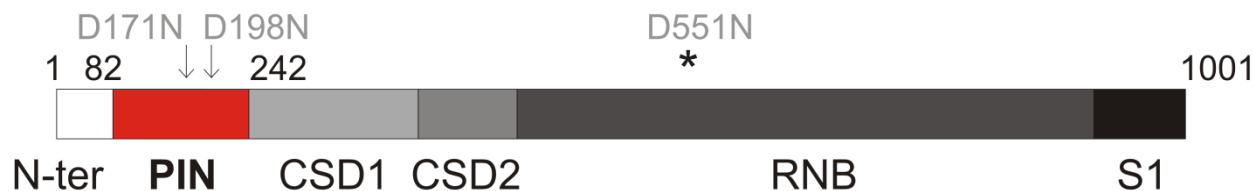
Czy obserwowana aktywność nukleolityczna jest związana z N-końcową domeną PIN?

Dodatkowe mutacje konserwowanych reszt asparagianu w obrębie triady katalitycznej domeny PIN



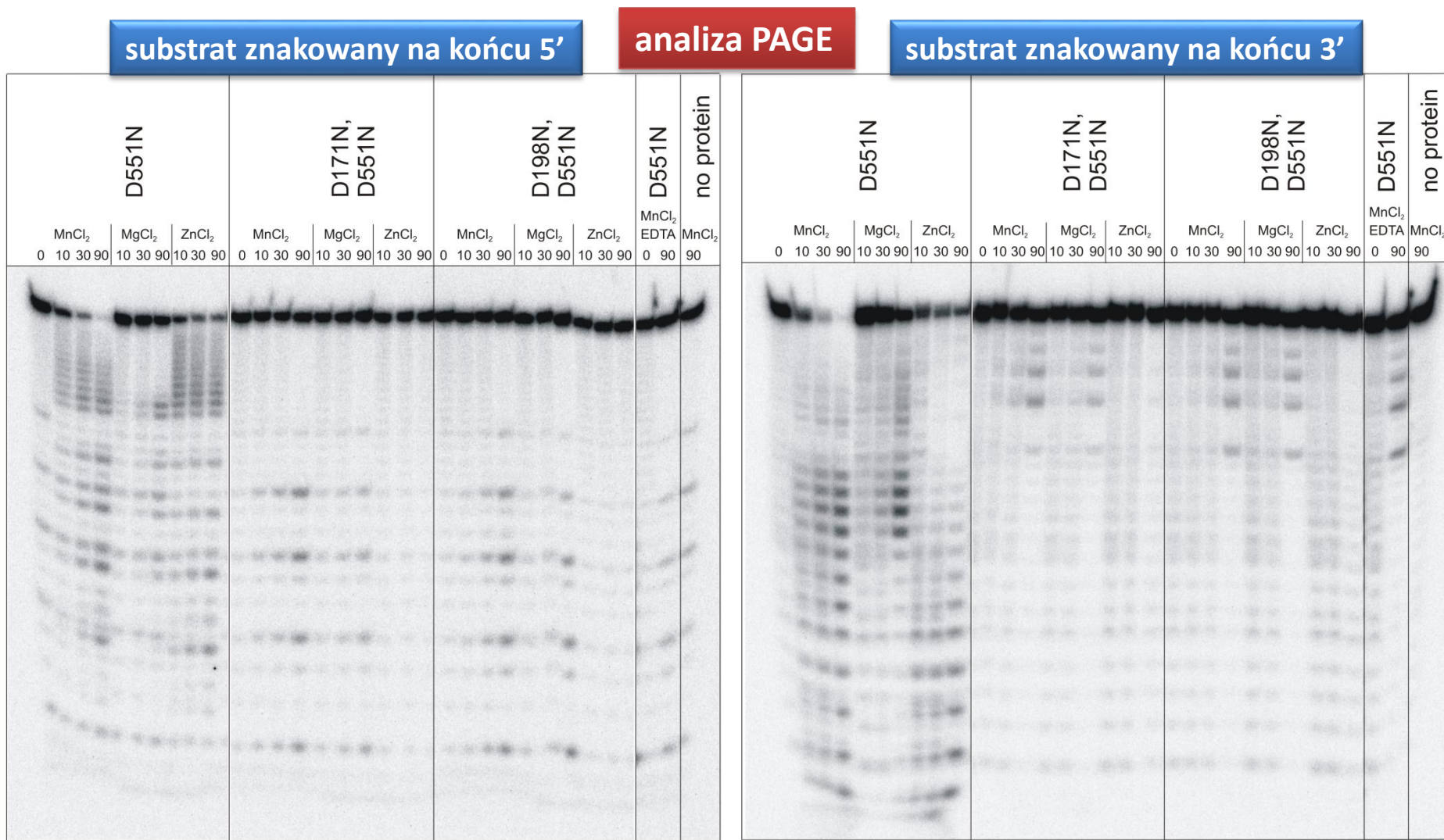
D171

D198



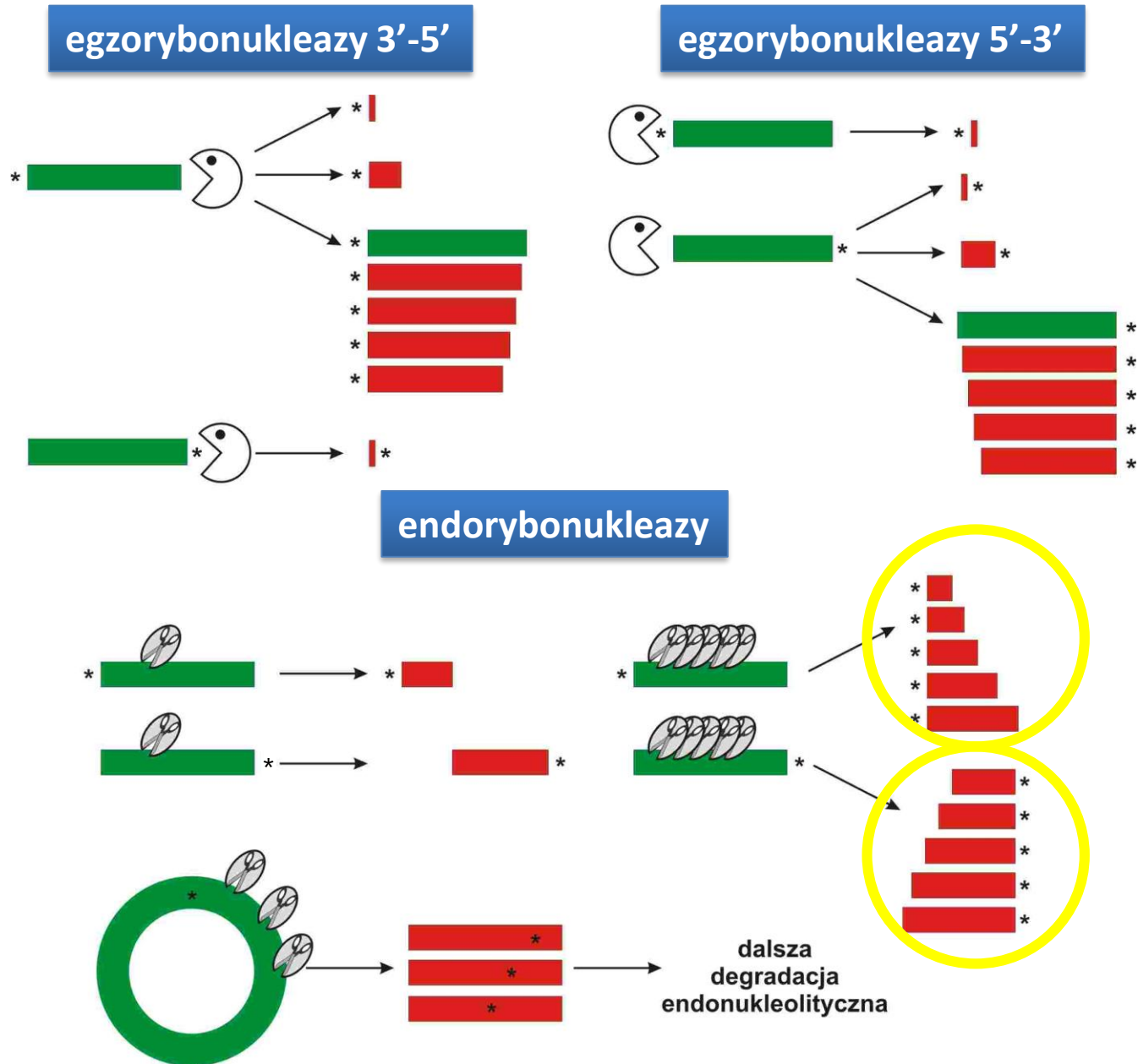
analiza SDS-PAGE

Obecność katalitycznych reszt asparaginianu w Dis3_{PIN} jest konieczna dla degradacji RNA *in vitro*



„drabinka” produktów degradacji w przypadku substratów znakowanych na różnych końcach sugeruje, że obserwujemy aktywność endorybonukleolityczną

Przykład wzoru degradacji endorybonukleolitycznej



Jak jednoznacznie potwierdzić, że domena PIN jest związana z aktywnością endorybonukleazy?

Badanie aktywności enzymu wobec substratu RNA pozbawionego wolnych końców (czyli ... KOLISTEGO)



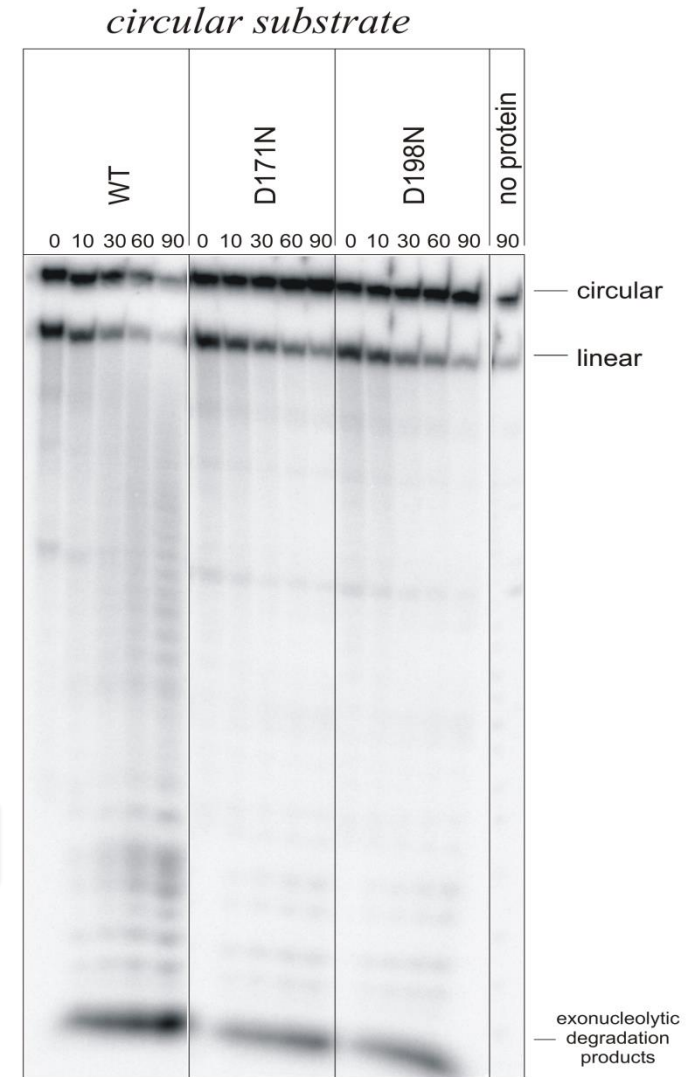
Domena PIN jest związana z nowo odkrytą aktywnością nukleolityczną białka Dis3, zdolną do degradacji różnego rodzaju substratów:

- znakowanych na końcu 5'
- znakowanych na końcu 3'
- kolistych

analiza PAGE

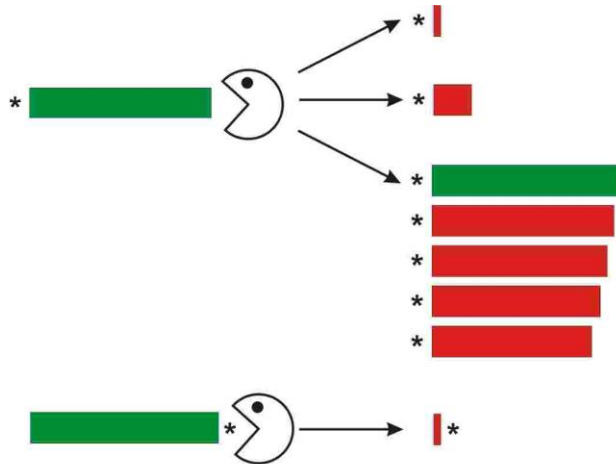
... co świadczy o tym, że jest endonukleazą !

Lebreton, Tomecki et al., *Nature* 2008

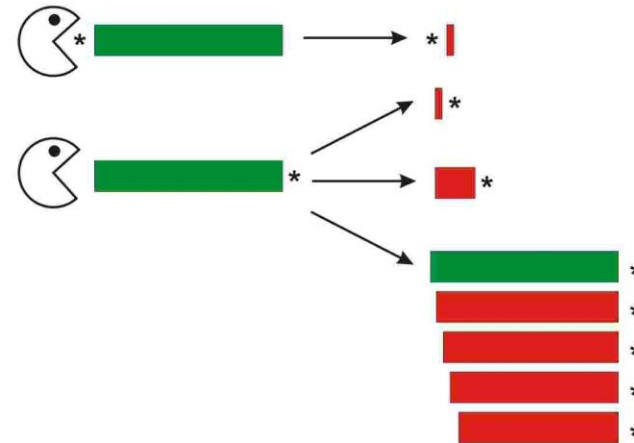


Degradacja substratu kolistego – tylko endonukleazy

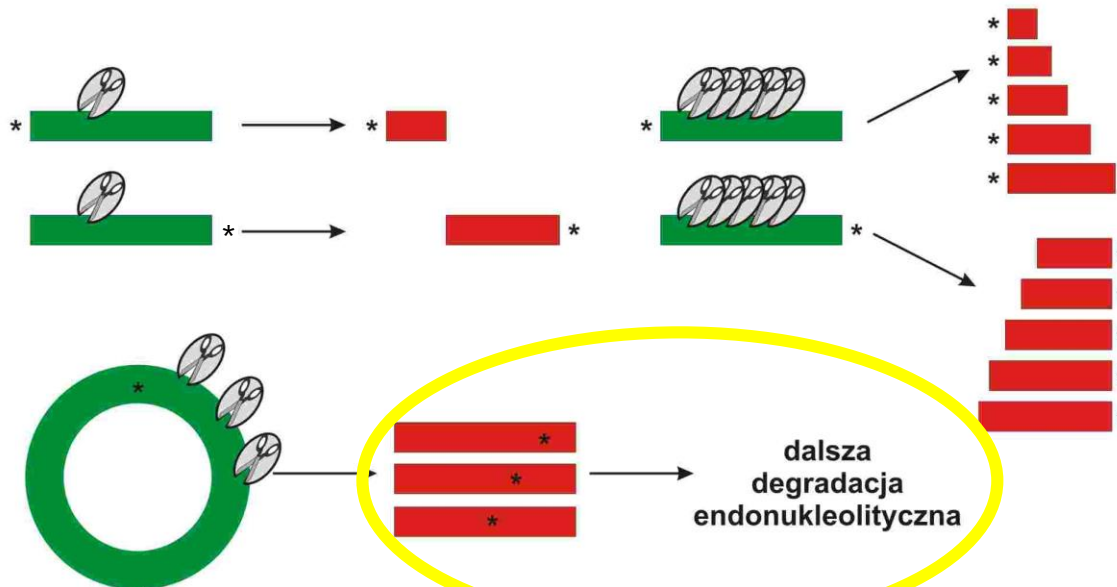
egzorybonukleazy 3'-5'



egzorybonukleazy 5'-3'

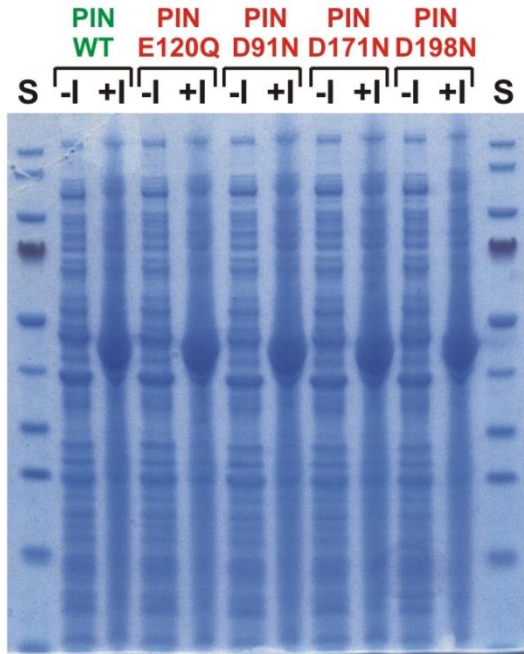


endorybonukleazy



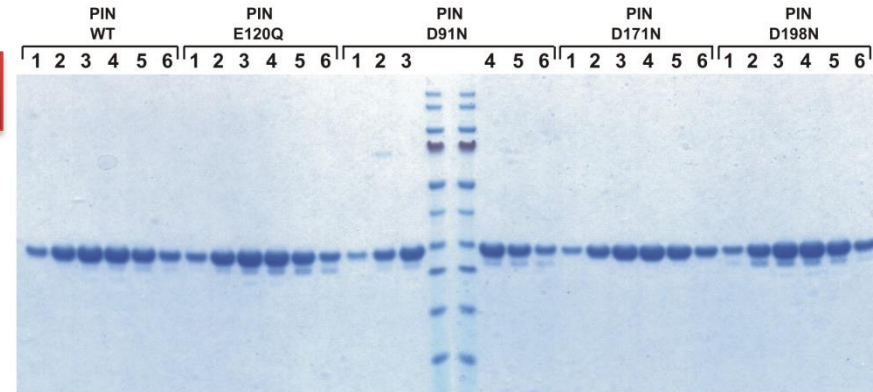
Czy aktywność endorybonukleolityczna domeny PIN jest zależna od reszty białka Dis3p?

Konieczność oczyszczenia pojedynczej domeny białka i zbadania jej aktywności



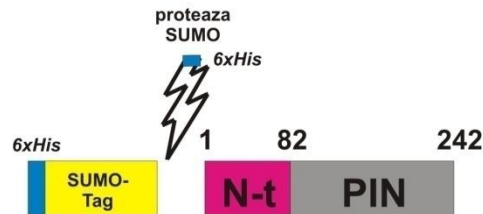
(A) eluat po 1. czyszczeniu na złożu niklowym i trawieniu proteazą SUMO

analizy SDS-PAGE

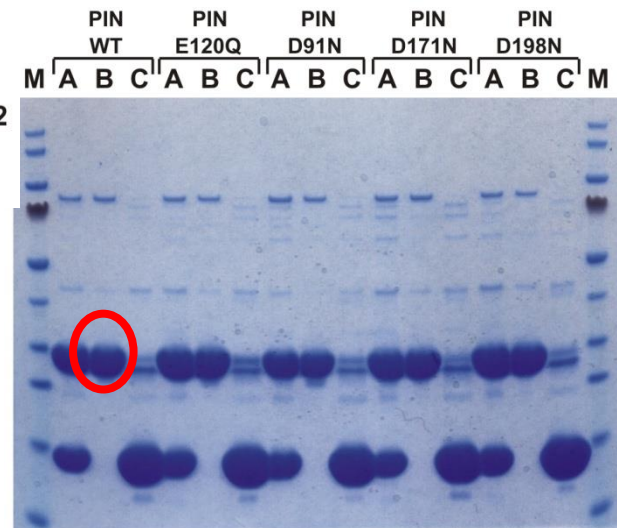
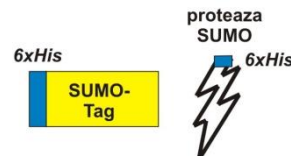


↑
sączenie
molekularne

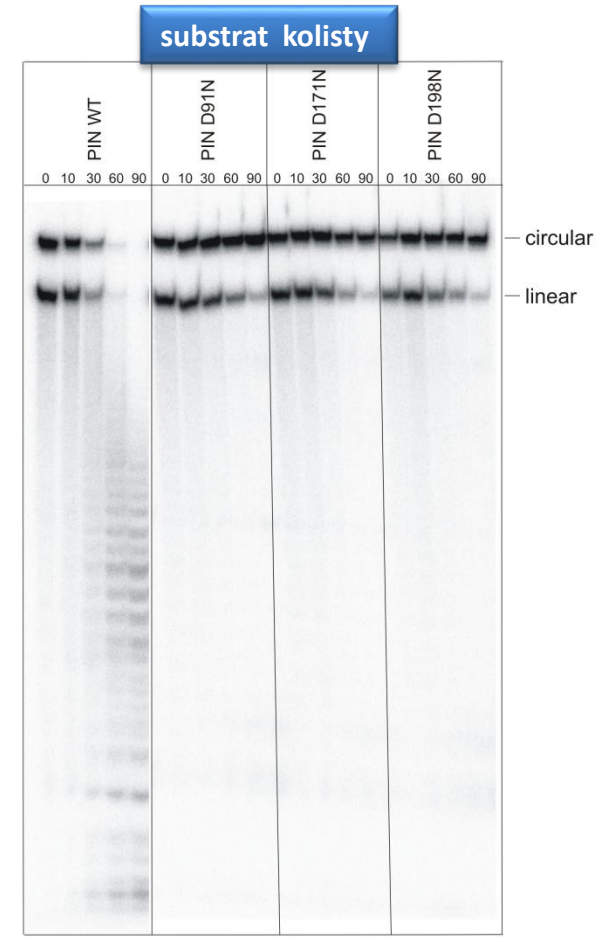
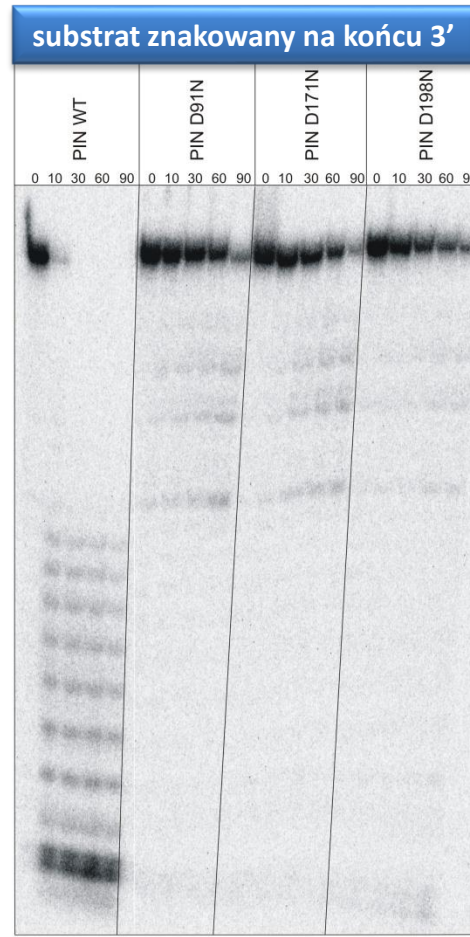
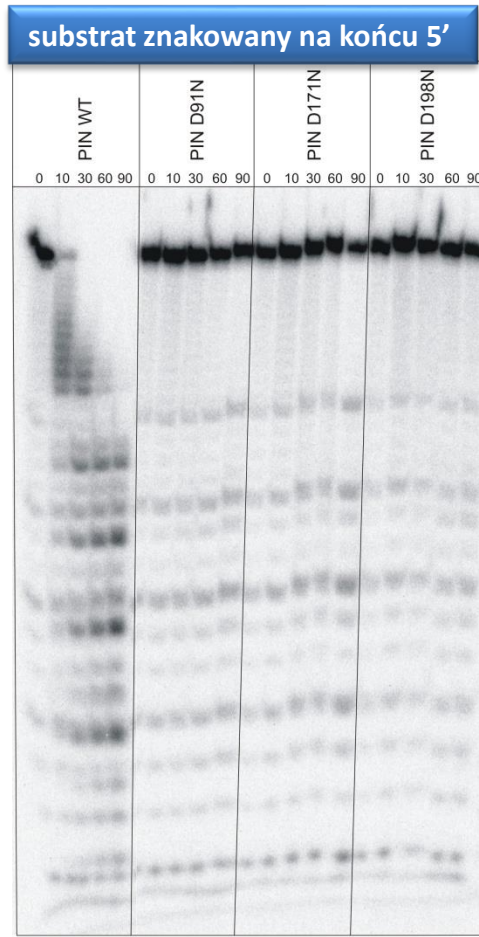
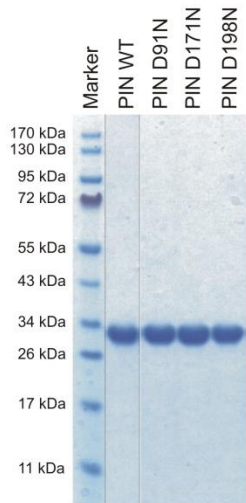
(B) wypłukane białka nie wiążące się ze złożem niklowym podczas 2. czyszczenia (TU: badane białko)



(C) eluat po 2. czyszczeniu na złożu niklowym (pozostałości)

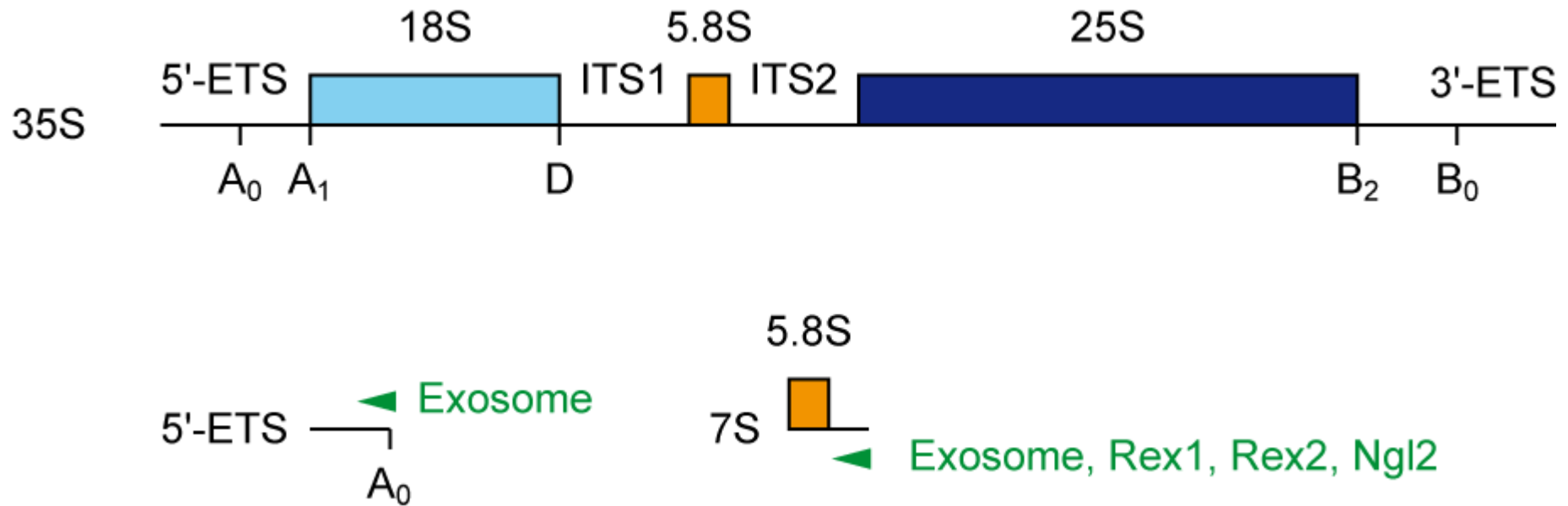


Sama domena PIN wykazuje aktywność endonukleolityczną, która jest znoszona przez mutacje konserwowanych reszt asparaginianu w centrum aktywnym

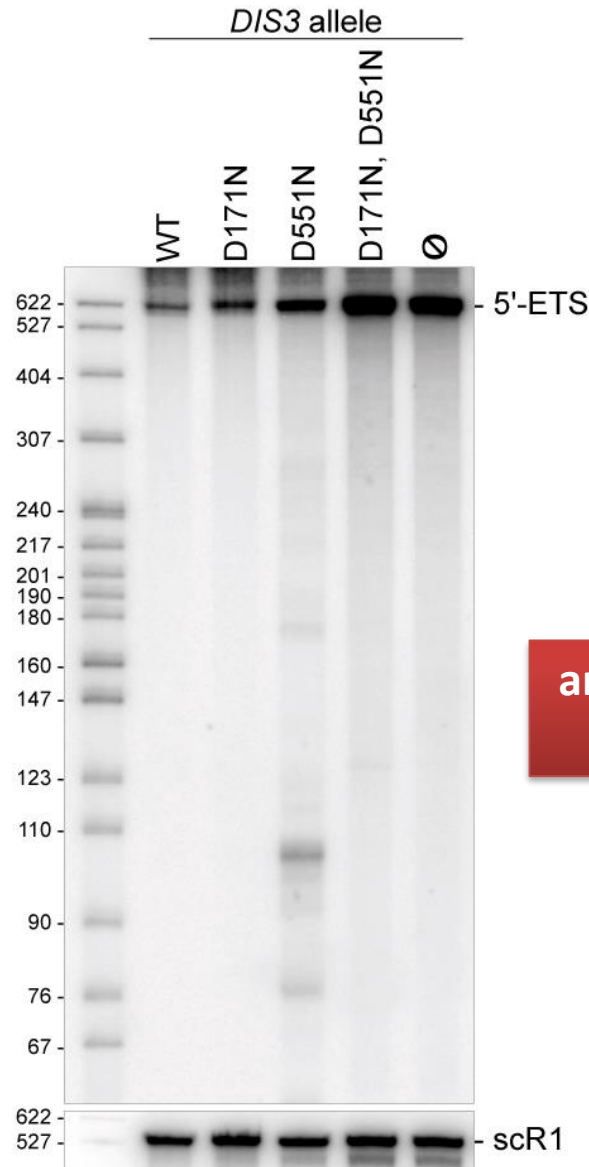


analiza PAGE

Substraty egzozomu w ścieżce obróbki rRNA



Wpływ mutacji w Dis3 na substrat egzozomu: 5'-ETS



analiza hybrydacyjna
typu northern

Lebreton, Tomecki et al.,
Nature 2008

Cięcie 5'-ETS przez PIN zostało potwierdzone *in vitro*

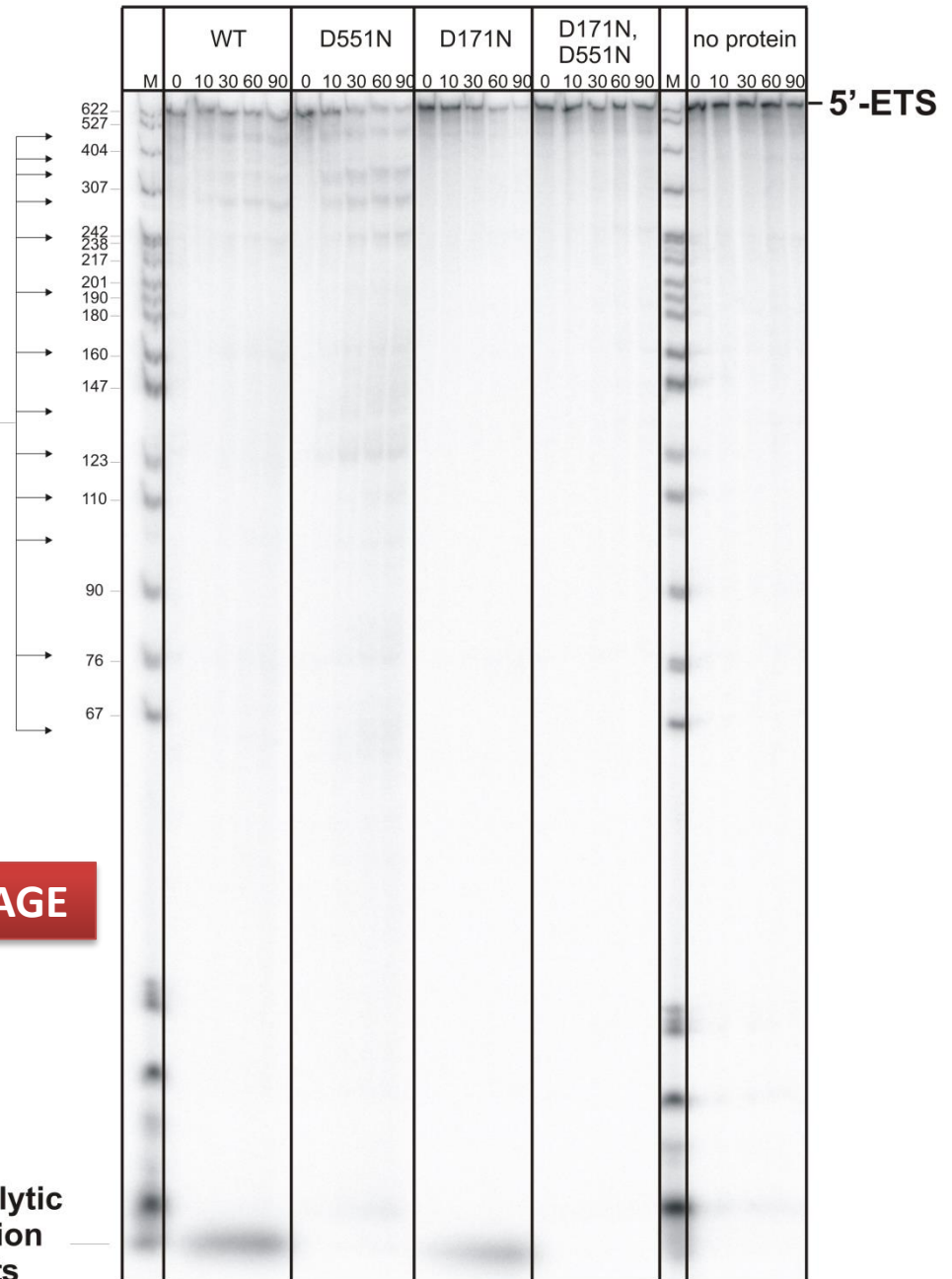
5'-ETS otrzymany
w reakcji transkrypcji
in vitro w obecności
[α - 32 P]UTP

marker wielkości –
pBR322/MspI
znakowany na końcu 5'
przy pomocy T4 PNK
i [γ - 32 P]ATP

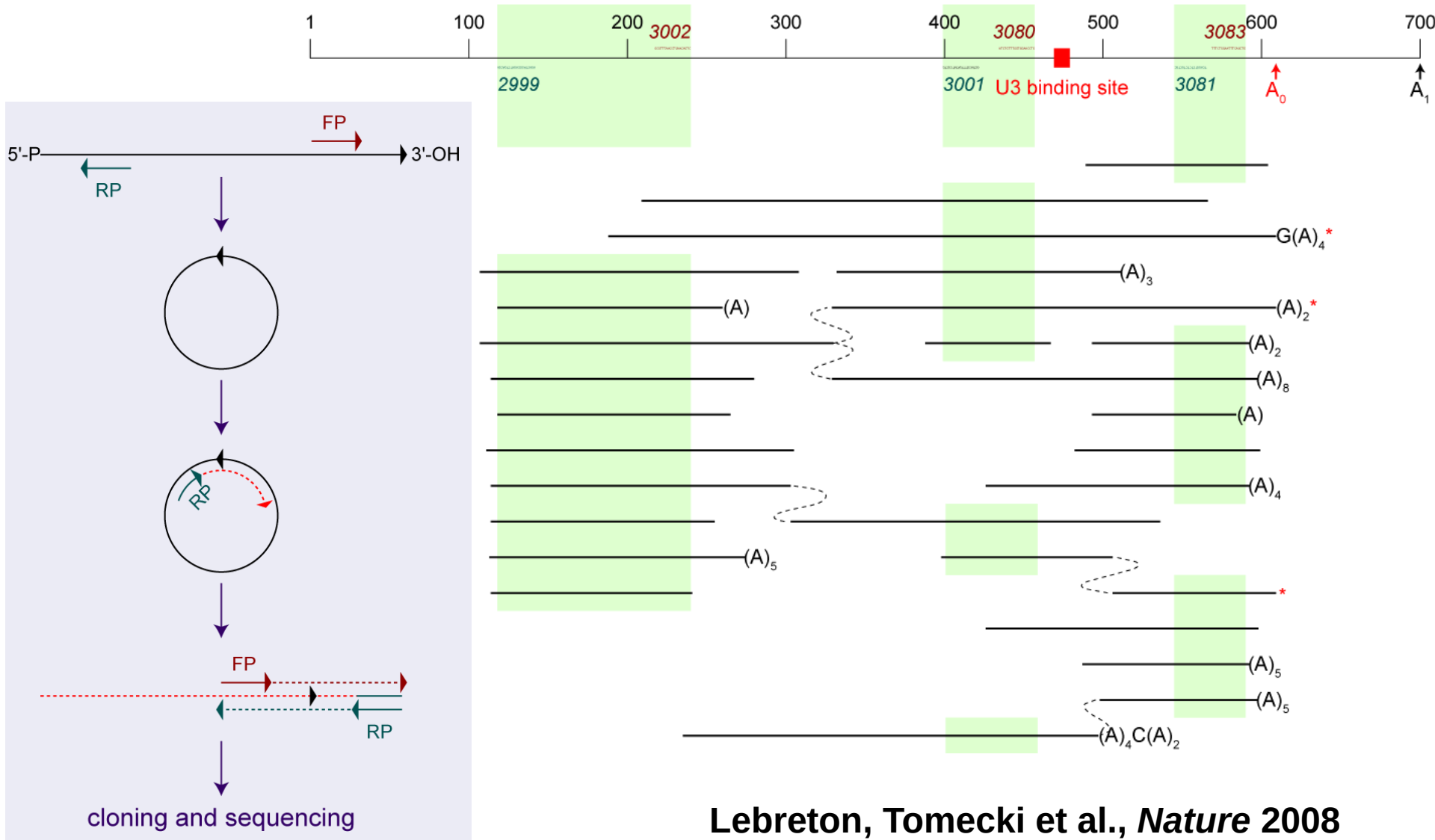
endonucleolytic
cleavage
intermediates

analiza PAGE

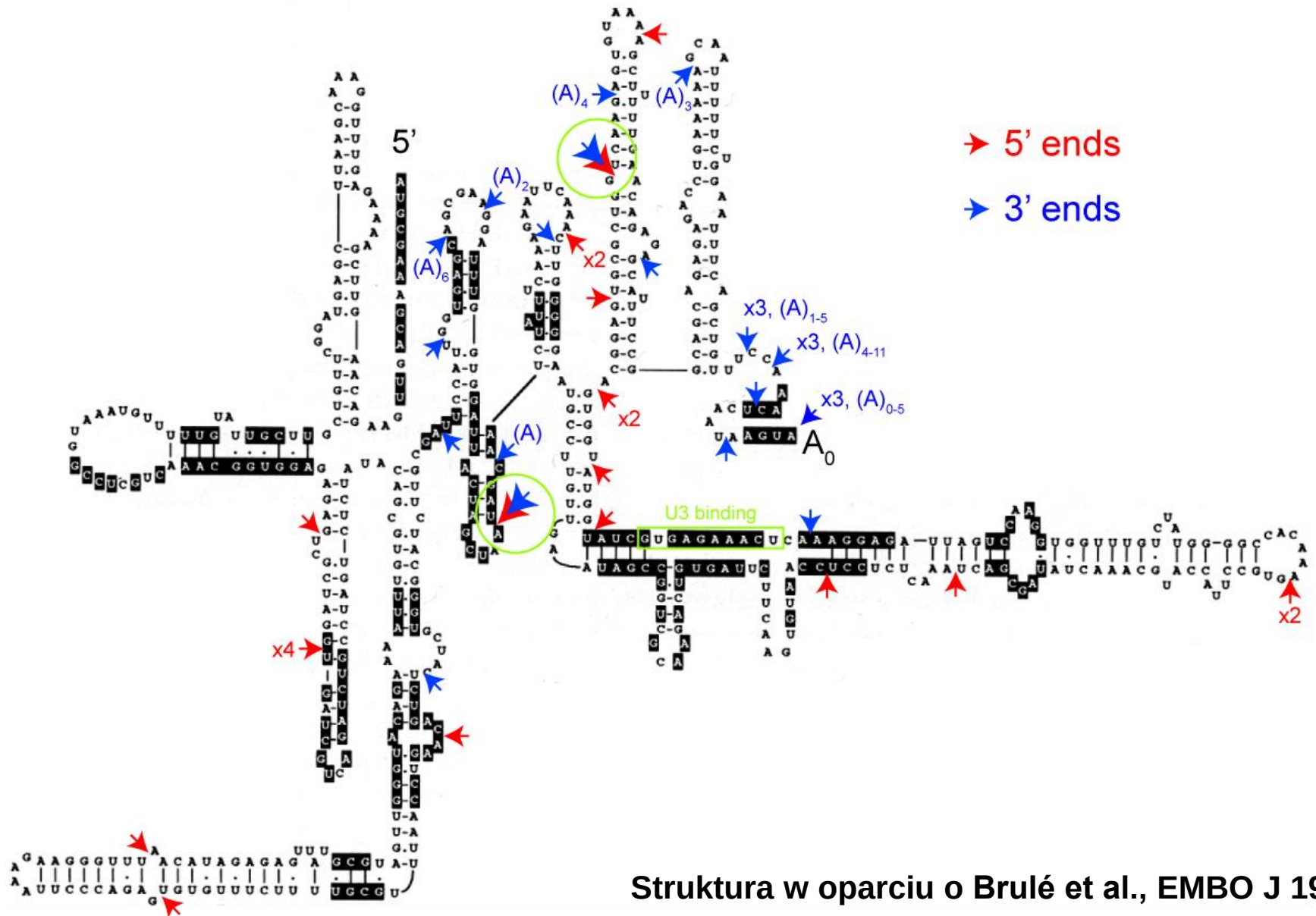
exonucleolytic
degradation
products



Mapowanie intermediatów degradacji w cRT-PCR popiera hipotezę cięcia endonukleolitycznego *in vivo*

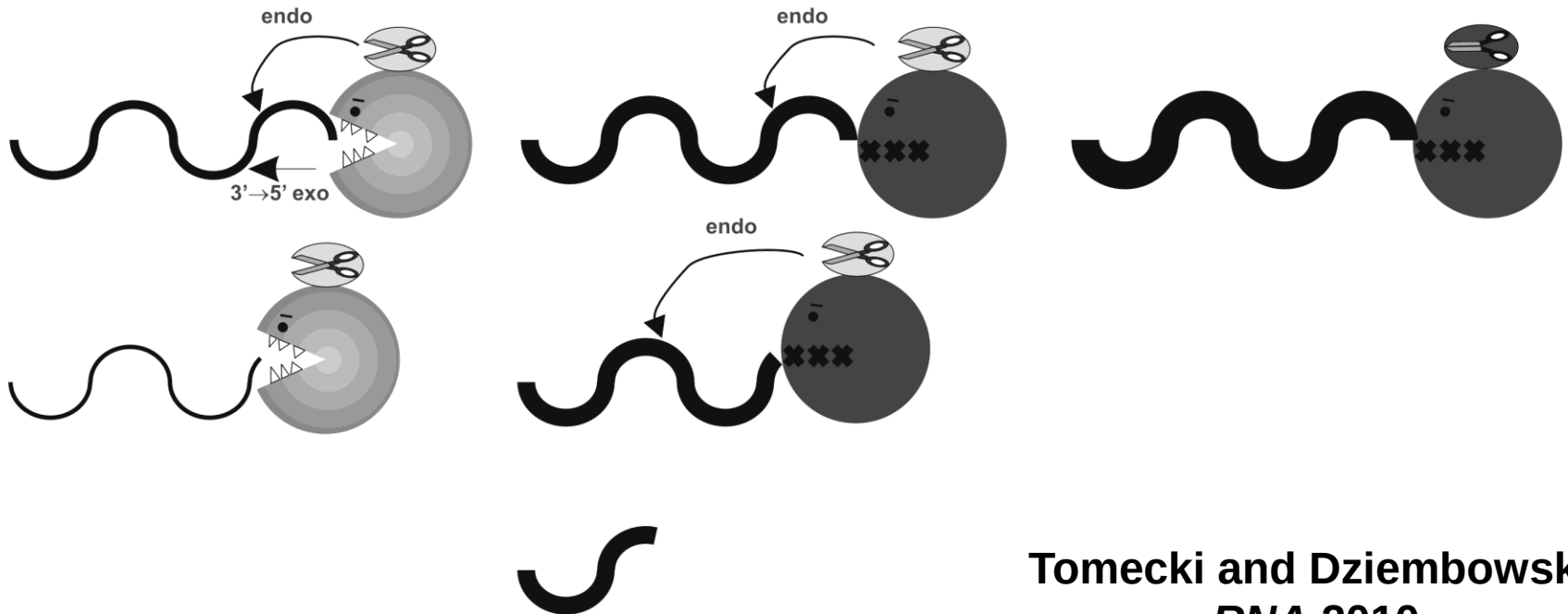


Dis3_{PIN} wprowadza cięcia preferencyjnie w obrębie pętli



Jak obie aktywności współpracują ze sobą ? – model

Hipoteza na podstawie danych z doświadczeń biochemicznych i eksperymentów *in vivo*



Tomecki and Dziembowski,
RNA 2010

Dis3p WT
(exo+ endo+)

Dis3p D551N
(exo- endo+)

Dis3p D171N D551N
(exo- endo-)

Trzecia aktywność w egzosomie

Dis3_{PIN} jest endonukleazą specyficzną względem ssRNA

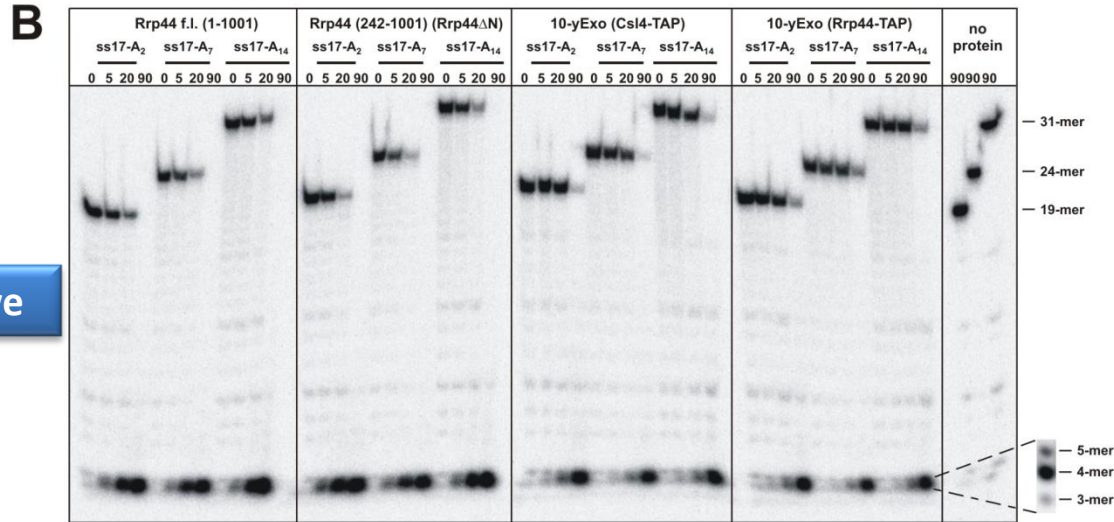
- *In vitro*, tnie zarówno liniowe, jak i koliste substraty RNA
- *In vivo*, uczestniczy w degradacji naturalnych substratów egzosomu
- Mutacje katalityczne domeny PIN skutkują synergicznymi fenotypami w połączeniu z mutacjami aktywności egzonukleolitycznych

Aktywność endonukleolityczna PIN może pomagać egzonukleazom

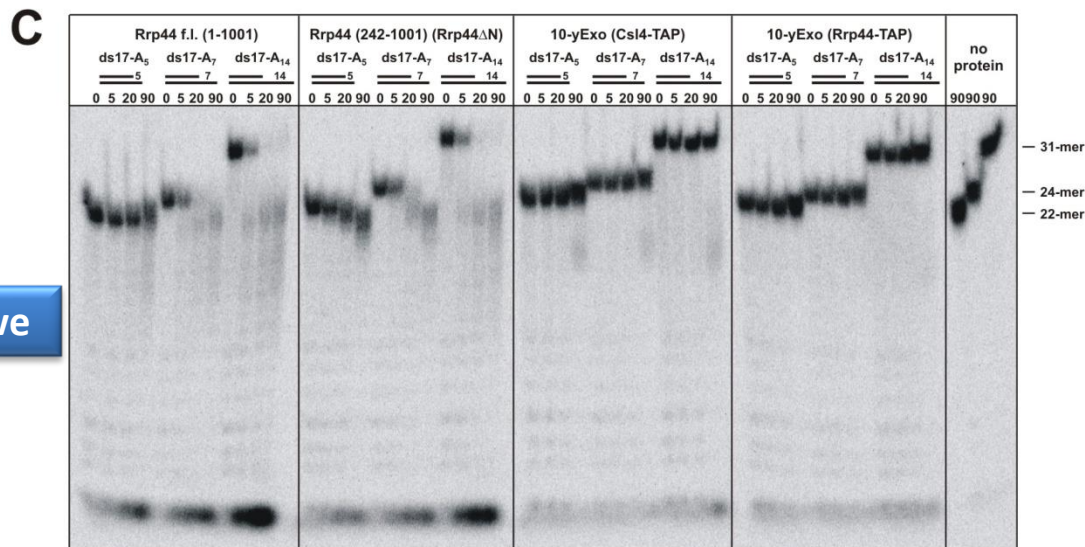
- Dostarczając alternatywnych miejsc startu degradacji jeśli droga egzosomu jest zablokowana przez obecność struktur drugorzędowych w substracie RNA

Aktywność Dis3p a aktywność egzozomu – o czym nam mówią takie porównania ?

O tym, że warto badać wzór degradacji substratów o różnej strukturze



substraty jednoniciowe



analiza PAGE

substraty dwuniciowe

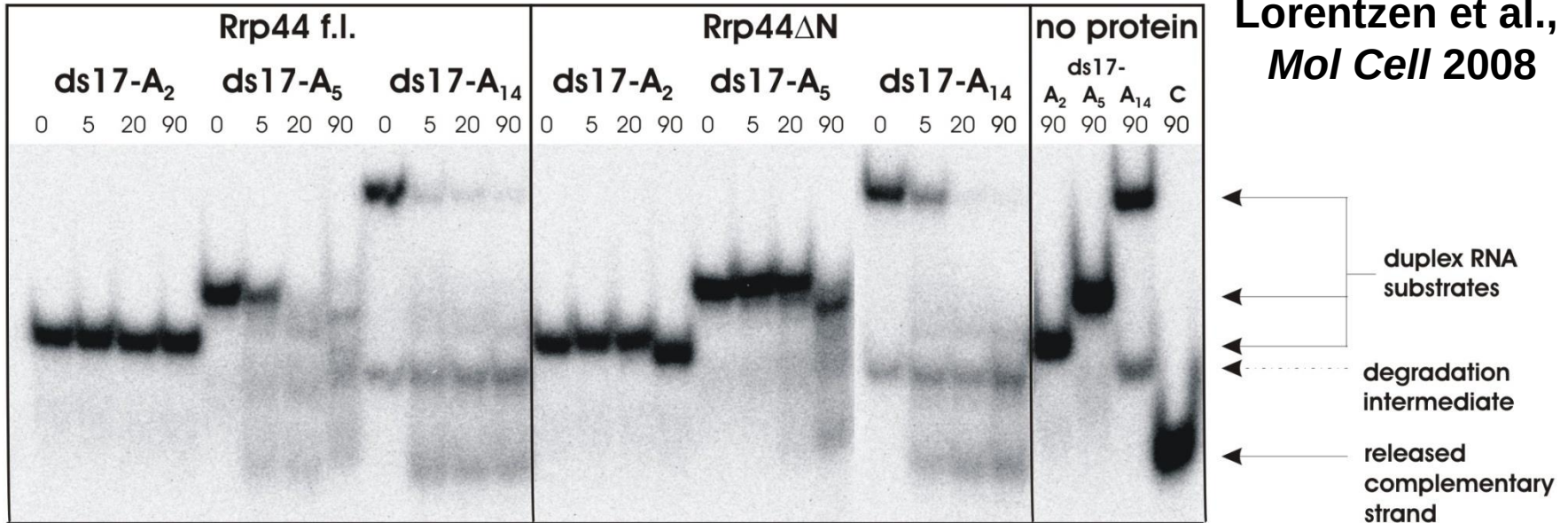
*

Lorentzen et al.,
Mol Cell 2008

Jakieś właściwości egzozomu powodują, że wydajność degradacji substratów dwuniciowych jest niższa niż w przypadku wolnego Dis3p

Czy Dis3p wykazuje własności helikazy RNA ?

substraty dwuniciowe



elektroforeza produktów degradacji w natywnym żelu poliakrylamidowym

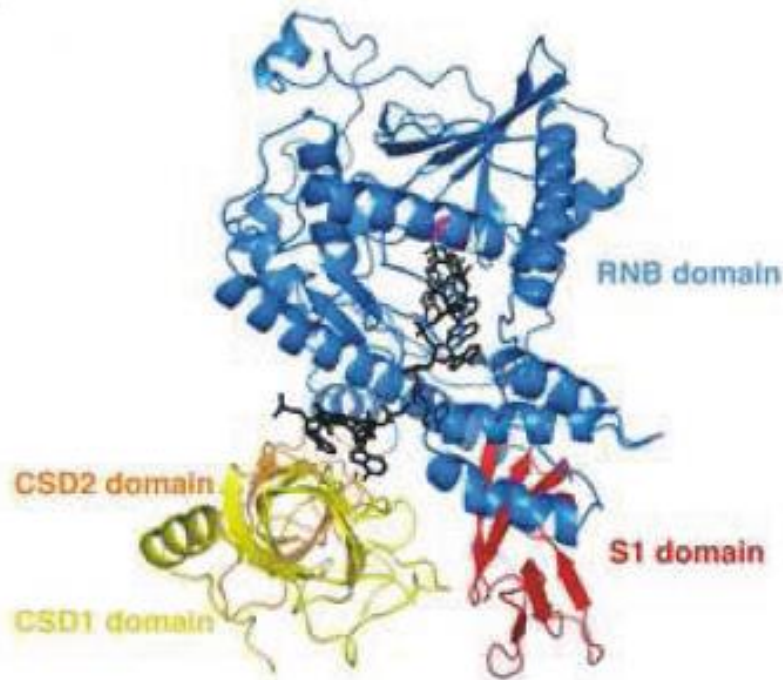
Dis3p ma zdolność rozplatania dwuniciowych substratów RNA

- pod warunkiem obecności jednoniciowego fragmentu o odpowiedniej długości na końcu 3' jednej z nici
- brak domeny PIN obniża wydajność rozplatania substratów dwuniciowych z elementem jednoniciowym o „średniej” długości

Podłoże różnic we właściwościach biochemicznych Dis3p i RNazy II tkwi w różnym usytuowaniu przestrzennym domen wiążących RNA

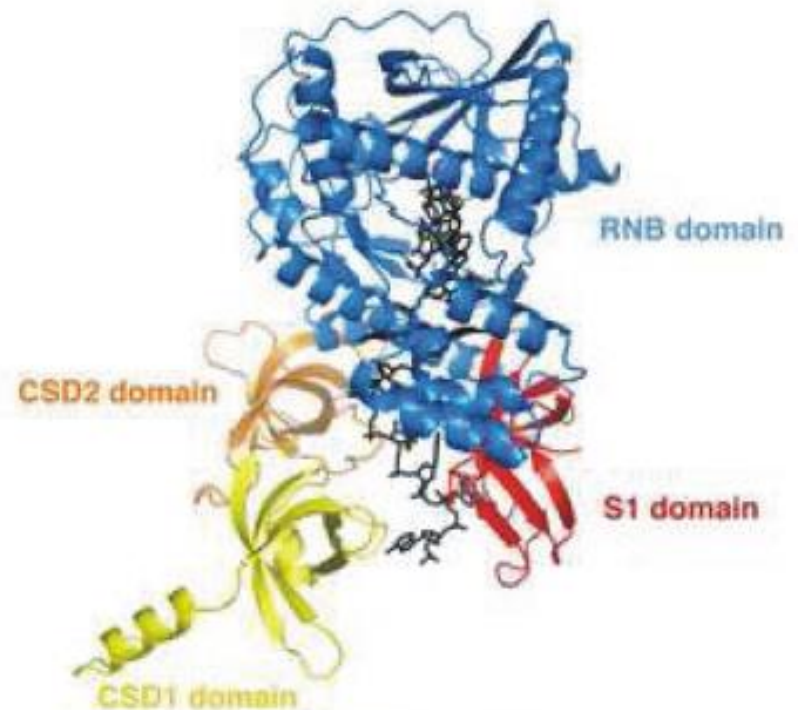
O tym, jak ważne jest zestawianie danych biochemicznych z informacjami strukturalnymi

Dis3p



**degraduje
dsRNA**

RNase II

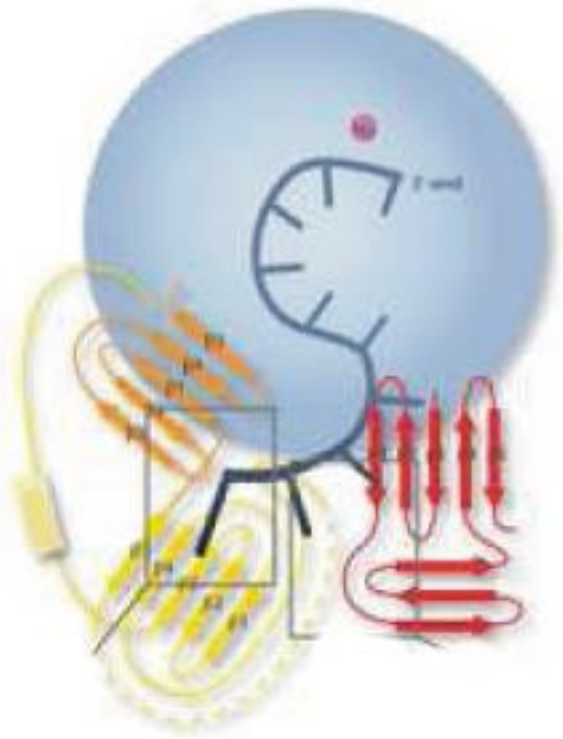


**zatrzymuje się
po napotkaniu
struktury
dwuniciowej**

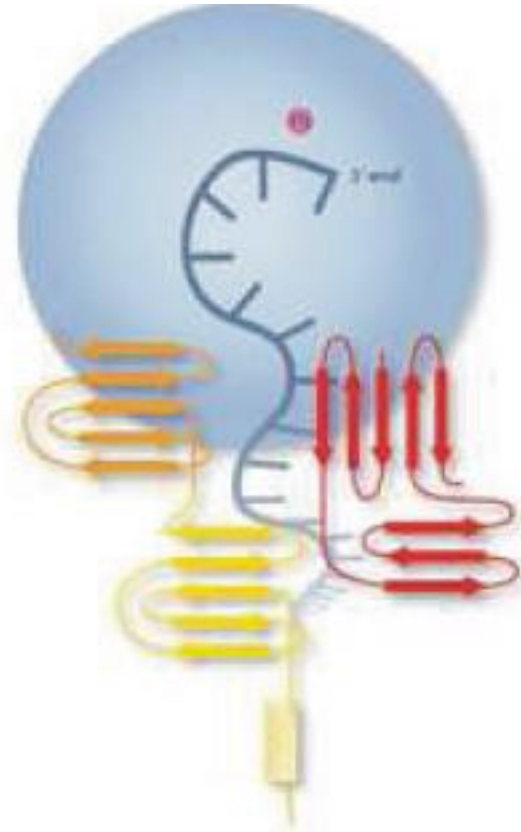
Lorentzen et al.,
Mol Cell 2008

Dane strukturalne wyjaśniają zdolność Dis3p do rozplatania dwuniciowych substratów RNA podczas ich trawienia

Dis3p



RNase II

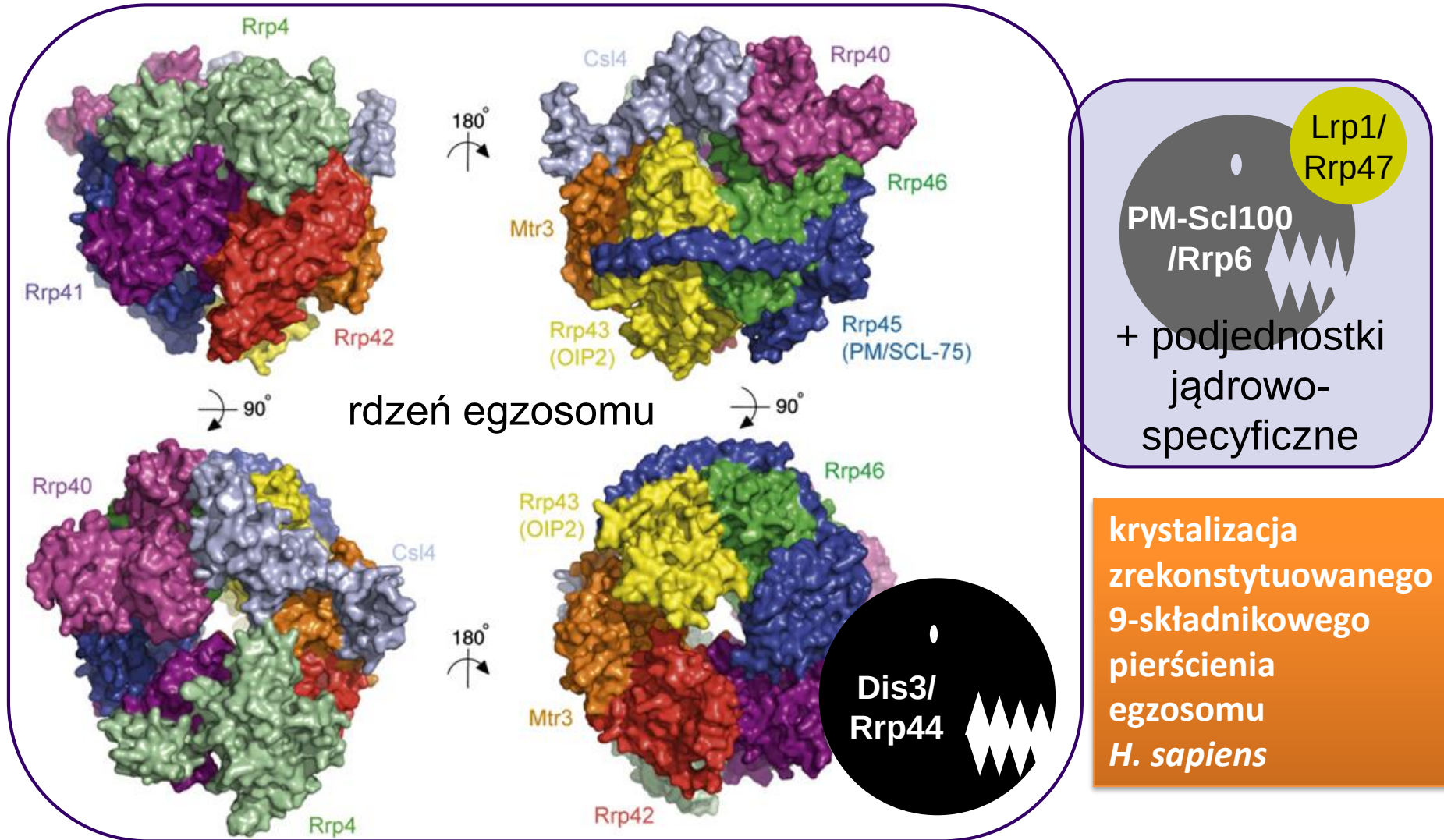


Lorentzen et al.,
Mol Cell 2008

Hydroliza RNA prowadzi do rotacji łańcucha RNA, co dostarcza energii pozwalającej na rozplatanie nici podczas kolejnych rund katalizy

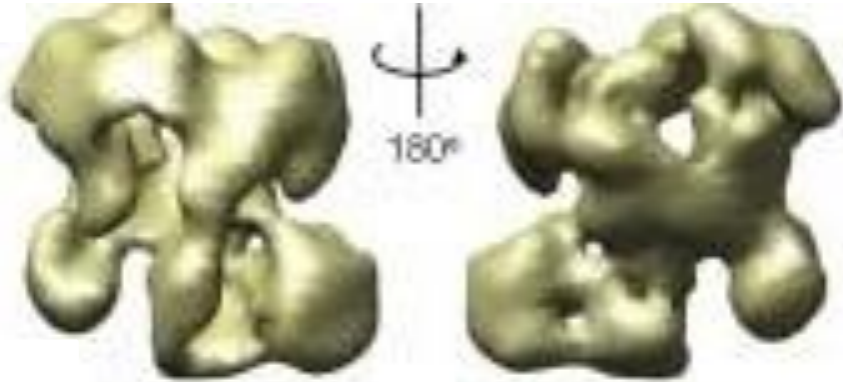
Czy tajemnica różnic między aktywnościami Dis3p i egzozomu tkwi w strukturze kompleksu ?

Gdzie lokalizuje się Dis3p względem pierścienia ?



Dis3p lokalizuje się pod pierścieniem egzozosomu (po przeciwnej stronie niż trimer podjednostek KH/S1)

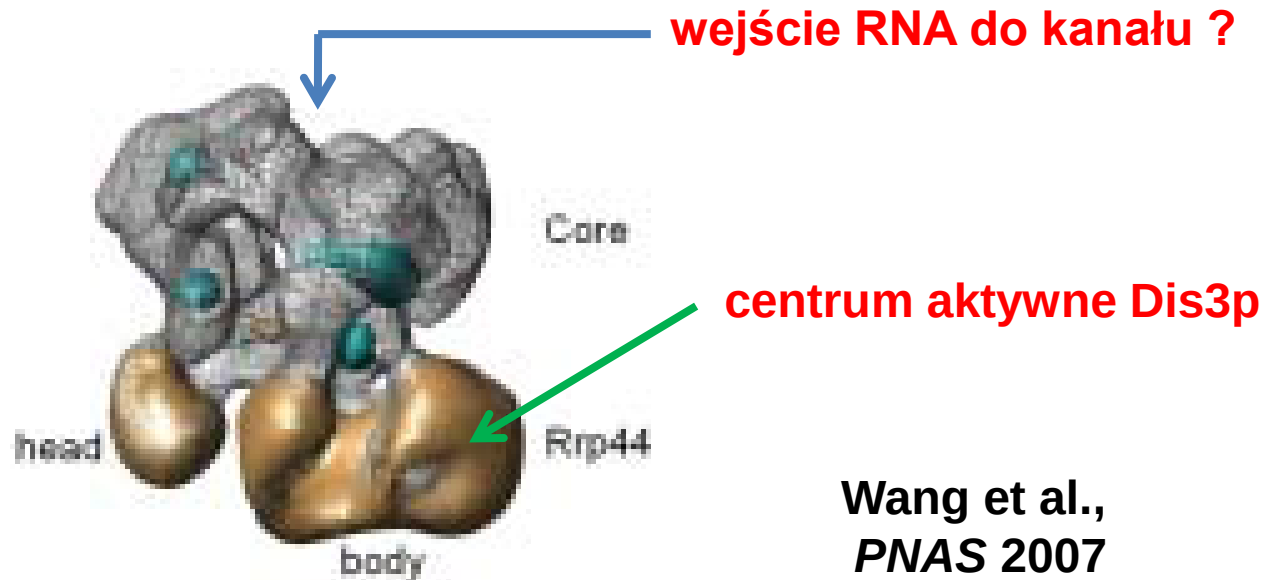
rdzeń z Dis3p



rdzeń bez Dis3p

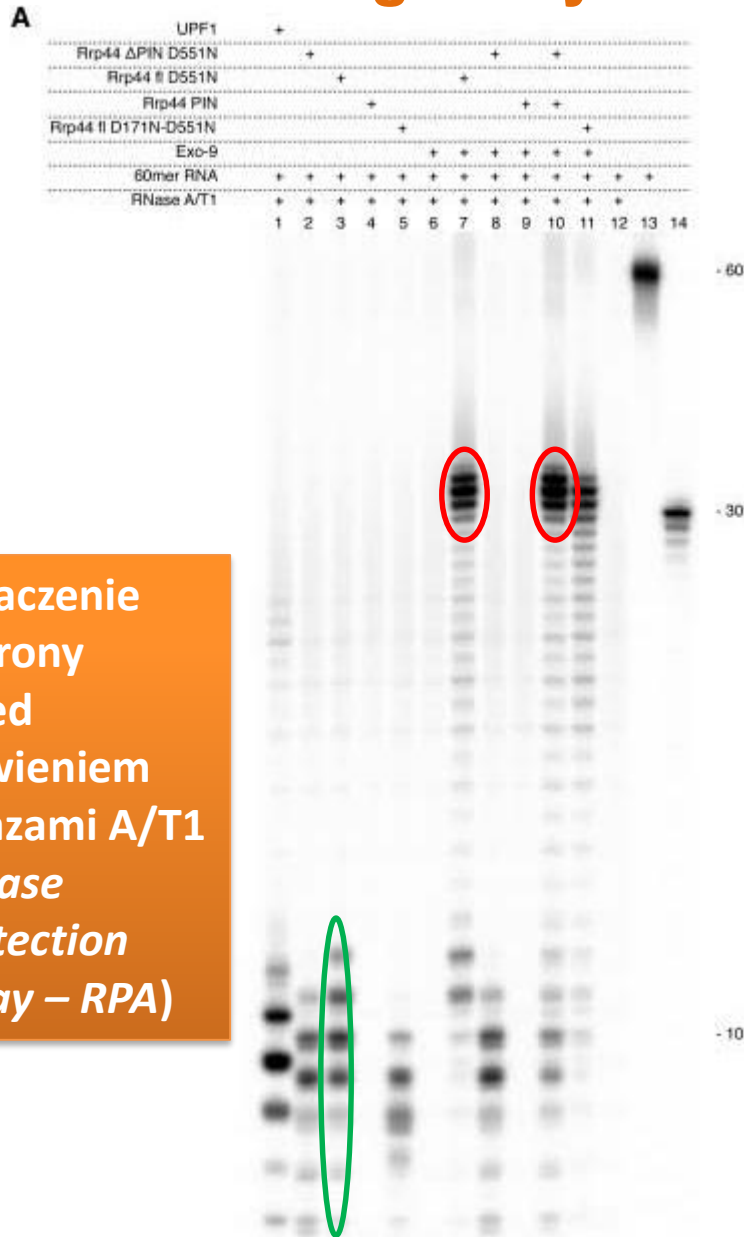


struktura rdzenia
egzozosomu
(9-składnikowy
pierścień + Dis3p)
rozwiązana przy
użyciu mikroskopii
elektronowej
(*negative staining*)



Wang et al.,
PNAS 2007

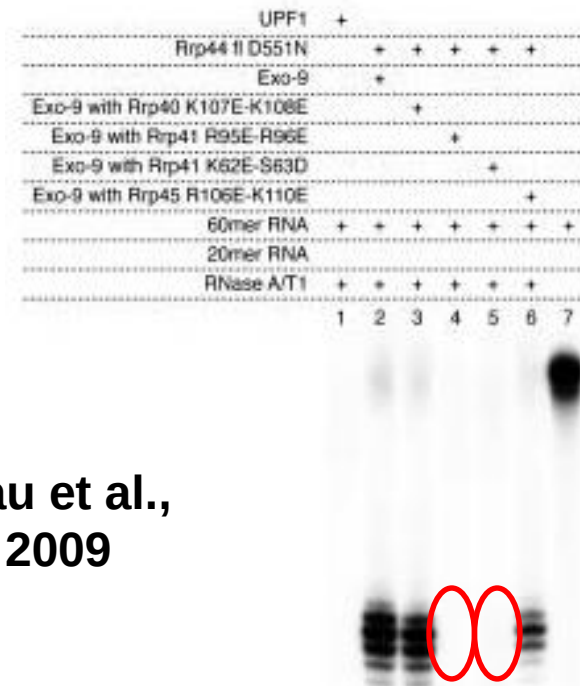
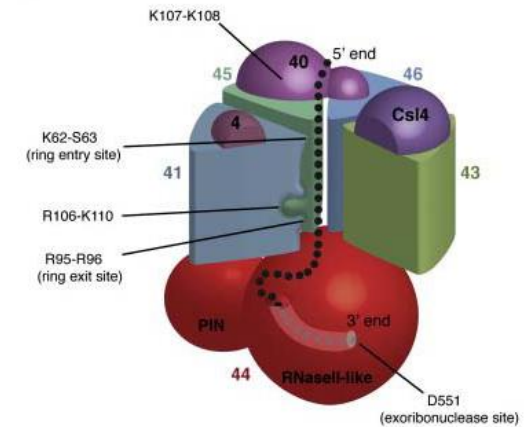
Wolne białko Dis3p i egzosom wiążą jednoniciowe fragmenty RNA bardzo różnej długości



oznaczenie
ochrony
przed
trawieniem
RNazami A/T1
(*RNase
protection
assay – RPA*)

wejście do kanału

wyjście z kanału



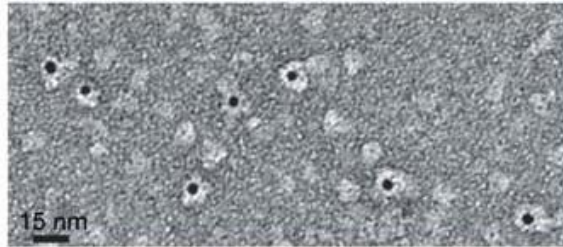
Bonneau et al.,
Cell 2009

WNIOSEK: RNA przechodzi przez kanał przed dotarciem do centrum aktywnego Dis3p

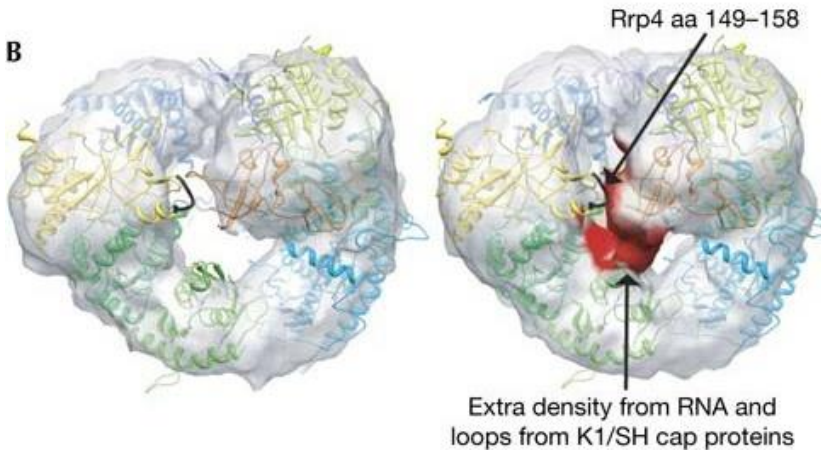
Droga substratu wiodąca przez kanał pierścienia jest rzeczywiście zachowana ewolucyjnie

Malet
et al.,
EMBO Rep
2010

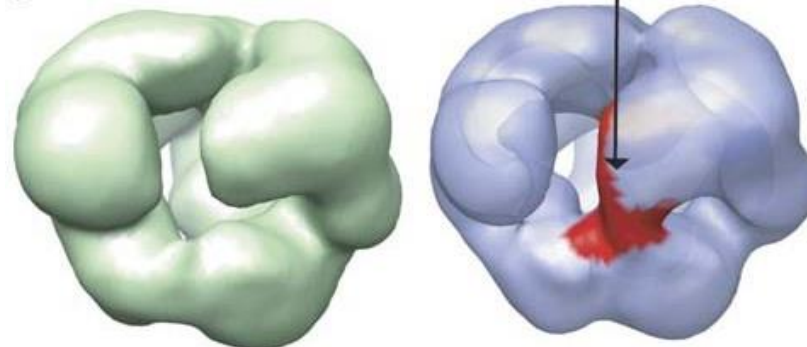
A



B



C



struktura „apo”

struktura z RNA

oligonukleotyd RNA (częściowo dwuniciowy, z ~35 nt odcinkiem jednoniciowym) biotynylowany na końcu 5', sprzężony ze streptawidyną wyznakowaną złotem koloidalnym (5 nm) – CZARNE KROPKI

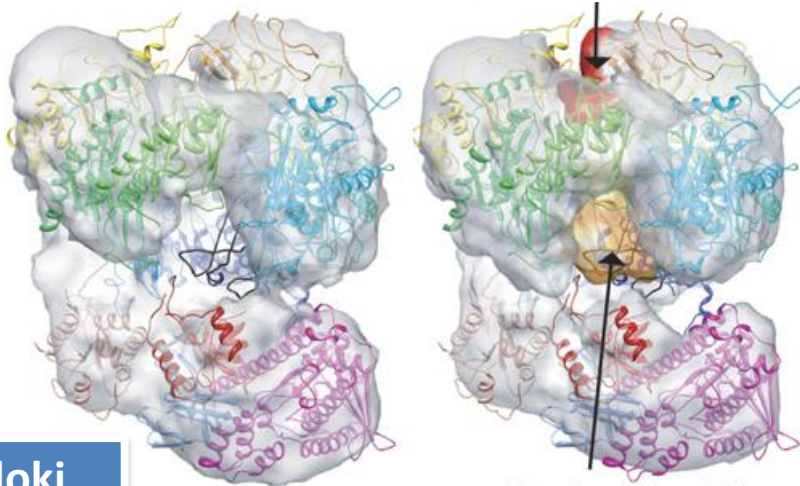
struktura rdzenia
egzozomu
rozwiązana przy
użyciu kriomikroskopii
elektronowej

struktura rdzenia
egzozomu
rozwiązana przy
użyciu mikroskopii
elektronowej
(*negative staining*)

widoki
„z góry”

Czy ta droga jest wykorzystywana zarówno w przypadku kierowania substratu do domeny RNB, jak i do domeny PIN ?

Malet
et al.,
EMBO Rep
2010

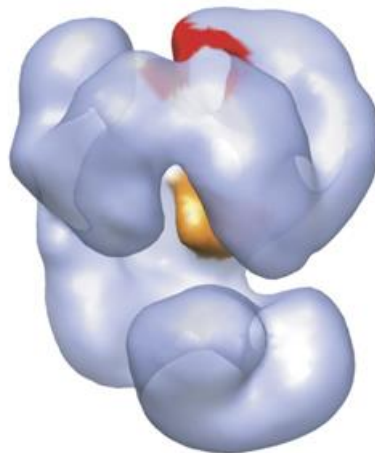


Extra density from RNA,
Rrp41, Rrp45, (Rrp44_{CSD2})

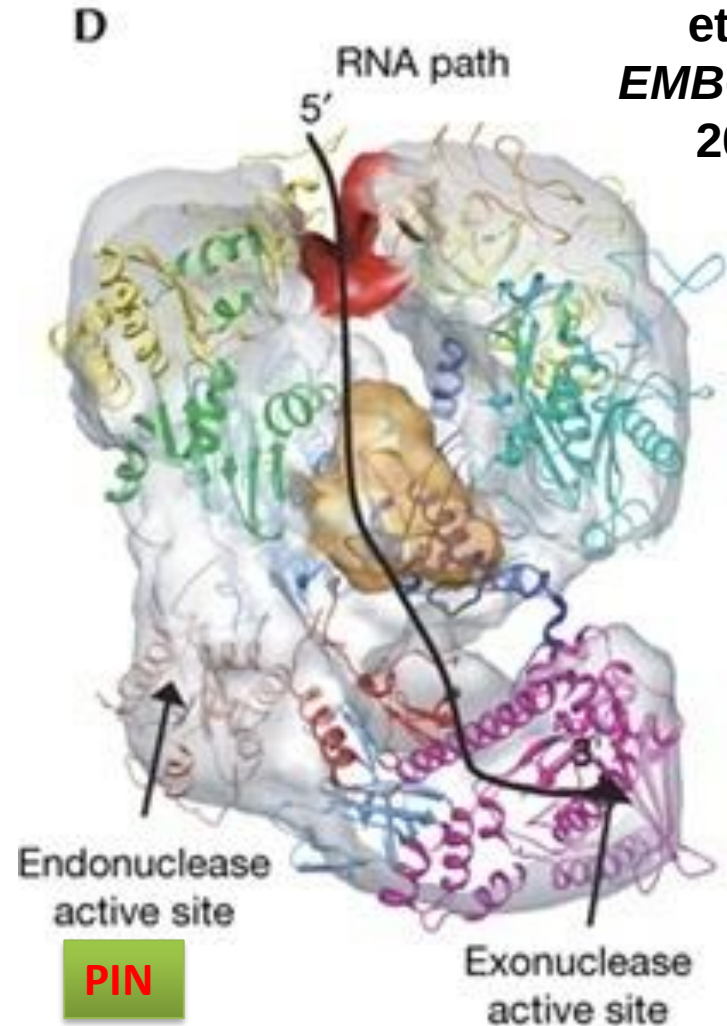
widoki
„z boku”



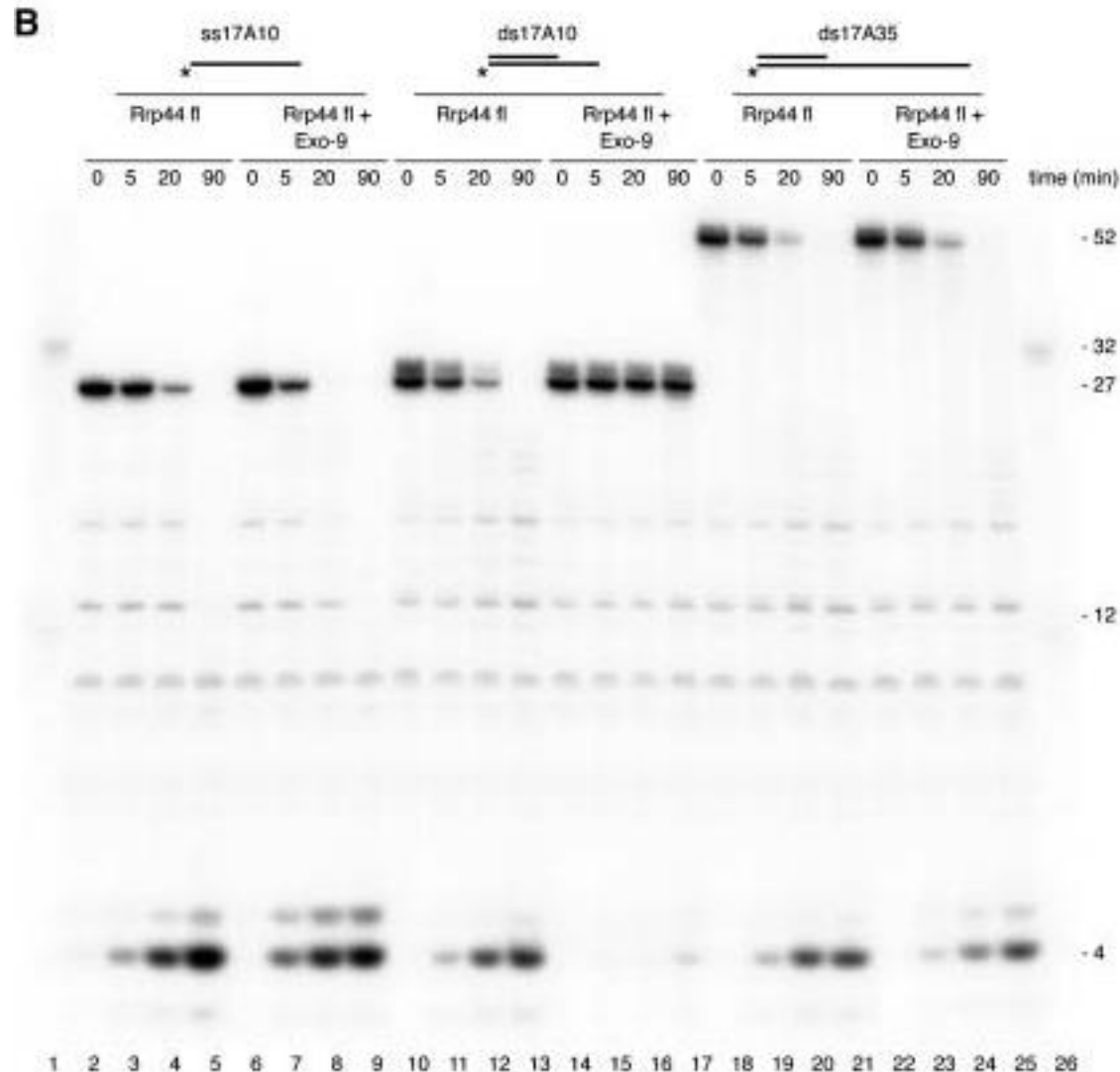
struktura „apo”



struktura z RNA



Dwuniciowe substraty RNA są degradowane przez domenę RNB w kontekście rdzenia egzozomu pod warunkiem obecności odpowiednio długiego odcinka jednoniciowego

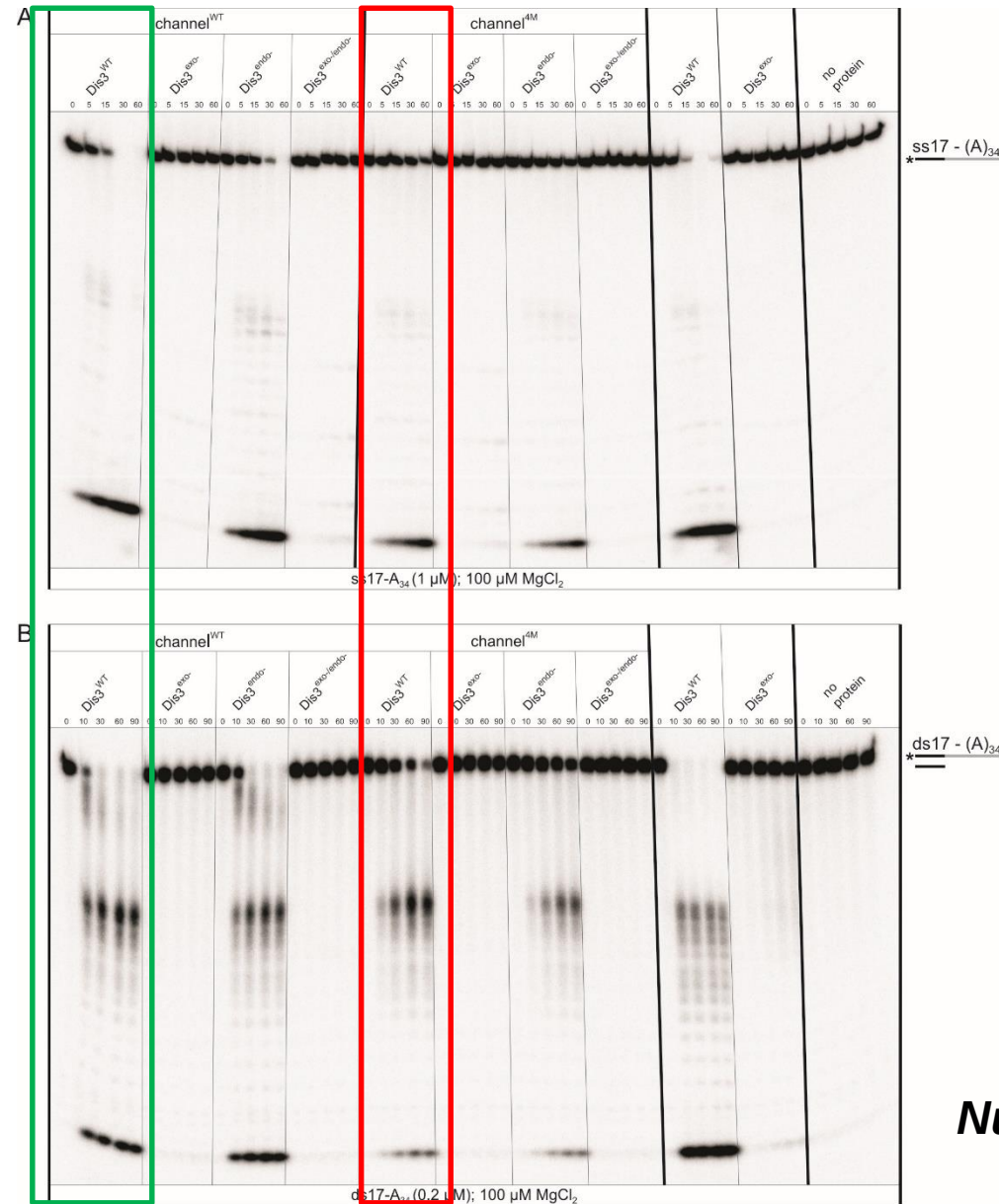


analiza
PAGE

Bonneau
et al.,
Cell 2009

Zablokowanie kanału obniża wydajność degradacji substratów RNA, zarówno jedno- jak i dwuniciowych

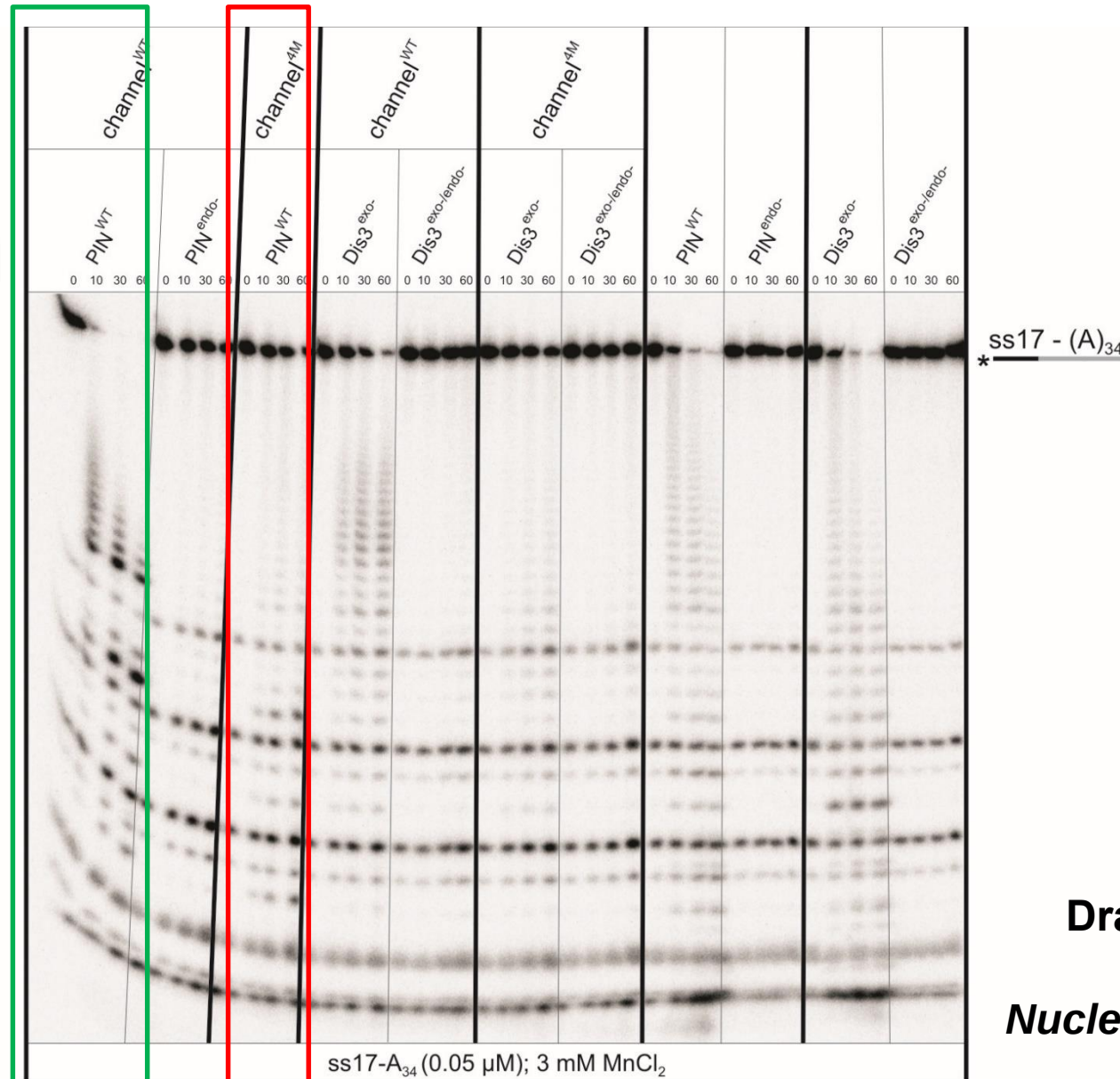
analizy
PAGE



Drażkowska
et al.,
Nucleic Acids Res
2013

Zablokowanie kanału hamuje również aktywność endonukleolityczną domeny PIN !

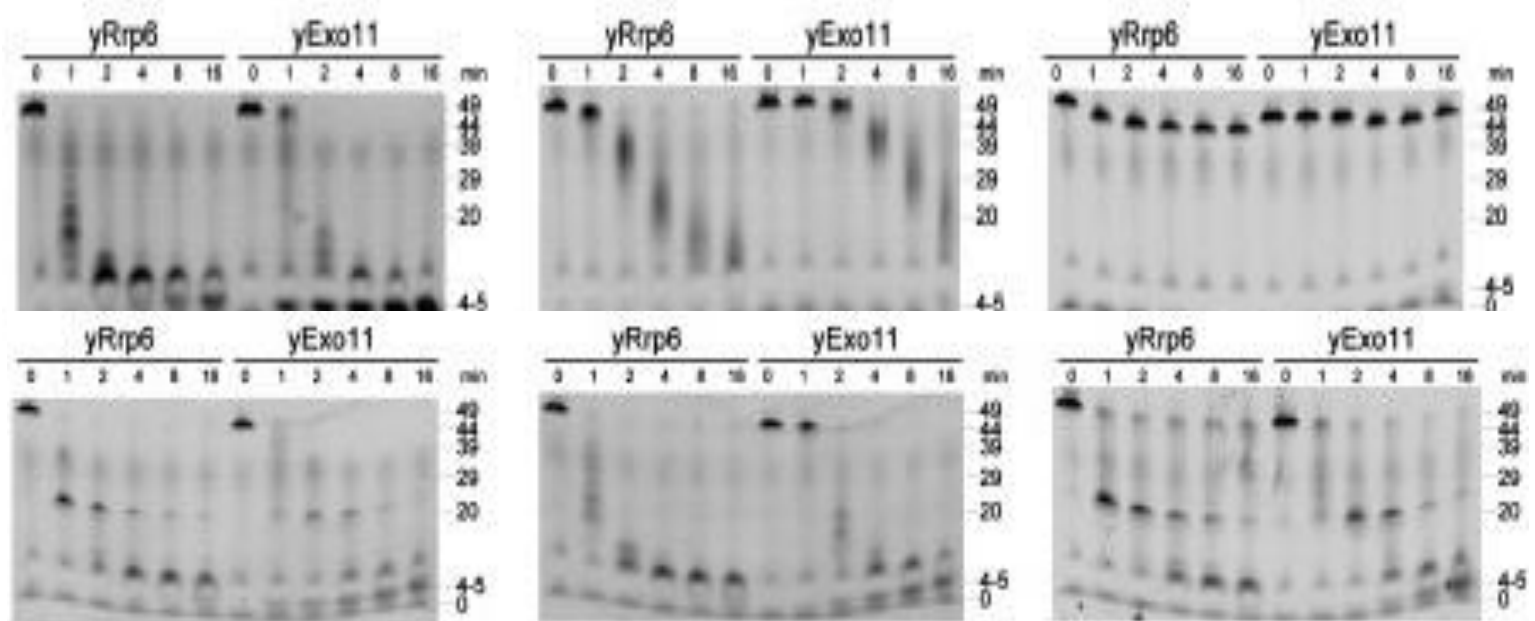
analiza
PAGE



Drażkowska
et al.,
Nucleic Acids Res
2013

Wydaje się, że centralny kanał nie bierze udziału w regulacji aktywności Rrp6

analizy
PAGE



Liu
et al.,
Cell 2006

Podsumowanie, czyli o czym należy pamiętać

1. Wychodzić zawsze od szczegółowej analizy sekwencji badanego białka i dostępnych informacji na temat homologów
2. Testować możliwie dużą liczbę warunków reakcji (różne substraty, różne kofaktory, różne bufory) i pamiętać o wszystkich możliwych kontrolach, jakie nam przyjdą do głowy (zarówno negatywne – w szczególności mutanty w potencjalnych miejscach katalitycznych, jak i pozytywne)
3. Porównywać aktywności pojedynczych białek oraz całych kompleksów lub subkompleksów – przeważnie prowadzi to do ujawnienia interesujących informacji
4. Dążyć do uzyskania struktury badanego białka/kompleksu, bo dopiero jej posiadanie pomoże nam poprawnie zinterpretować wyniki naszych „mokrych” doświadczeń, ale ...
5. ... sama struktura niewiele nam powie bez danych biochemicznych
6. Próbować zweryfikować dane strukturalne i biochemiczne przez doświadczenia na żywym układzie – czy to, co odkryliśmy w probówce rzeczywiście działa podobnie w komórce i ma istotne znaczenie biologiczne ?