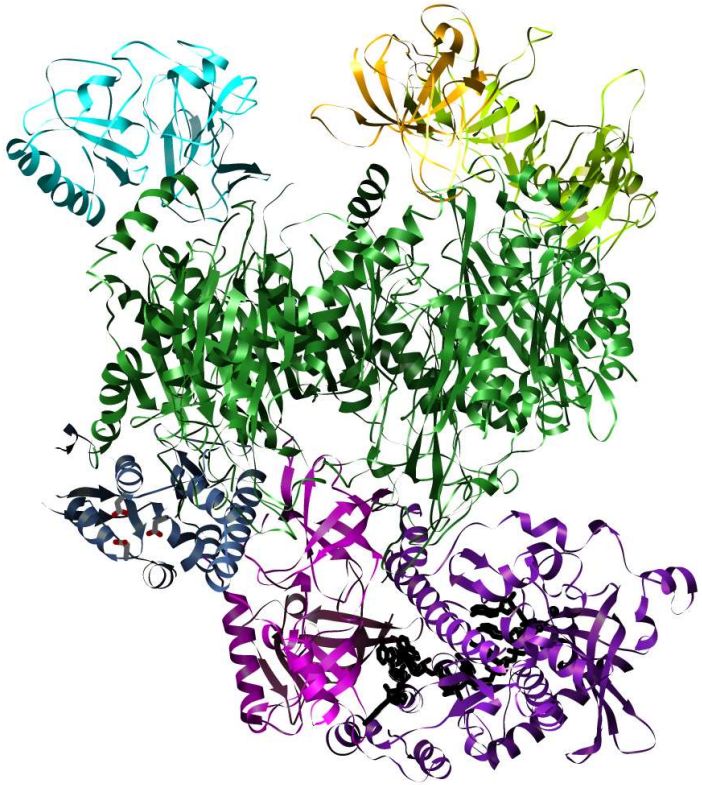
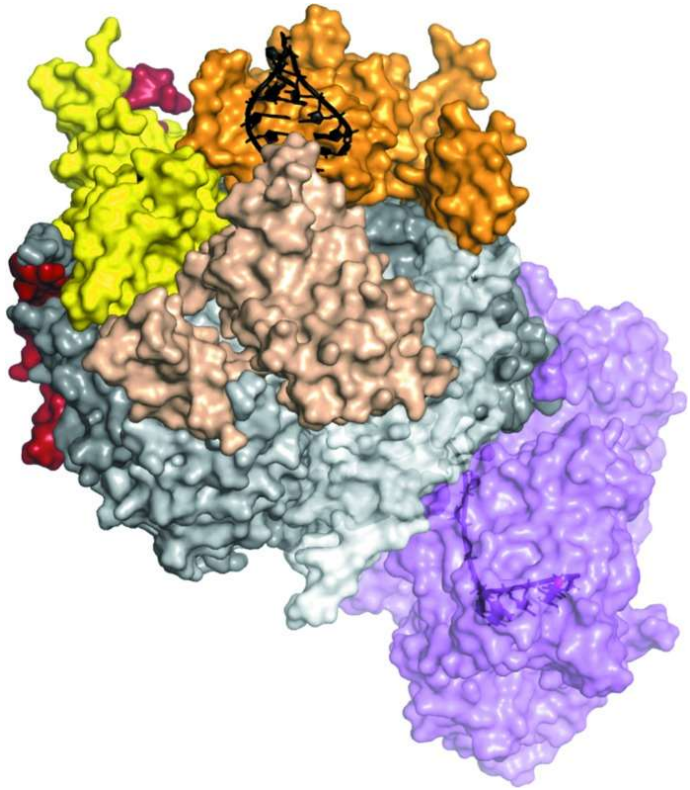
Biochemiczne metody badania aktywności i funkcji enzymów uczestniczących w metabolizmie RNA (ze szczególnym uwzględnieniem kompleksu egzosomu)



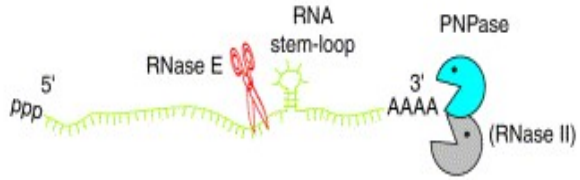


Rafał Tomecki
Pracownia Biologii RNA i Genomiki Funkcjonalnej IBB oraz IGiB UW

Wykład w ramach fakultetu: „Molekularne techniki analizy RNA"; 11.12.2020

RNazy uczestniczące w metabolizmie RNA

Endorybonukleazy: np. RNaza E (bakterie)



Egzorybonukleazy

5′→3′: procesywna hydrolityczna Xrn1
3′→5′: procesywne (rdzeń egzosomu) lub dystrybutywne (Rrp6p)

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

Hydroliza : RNA + H_2O → monofosforany rybonukleozydów (rNMP)

Fosforoliza : RNA + PO_4^- ↔ difosforany rybonukleozydów (rNDP)

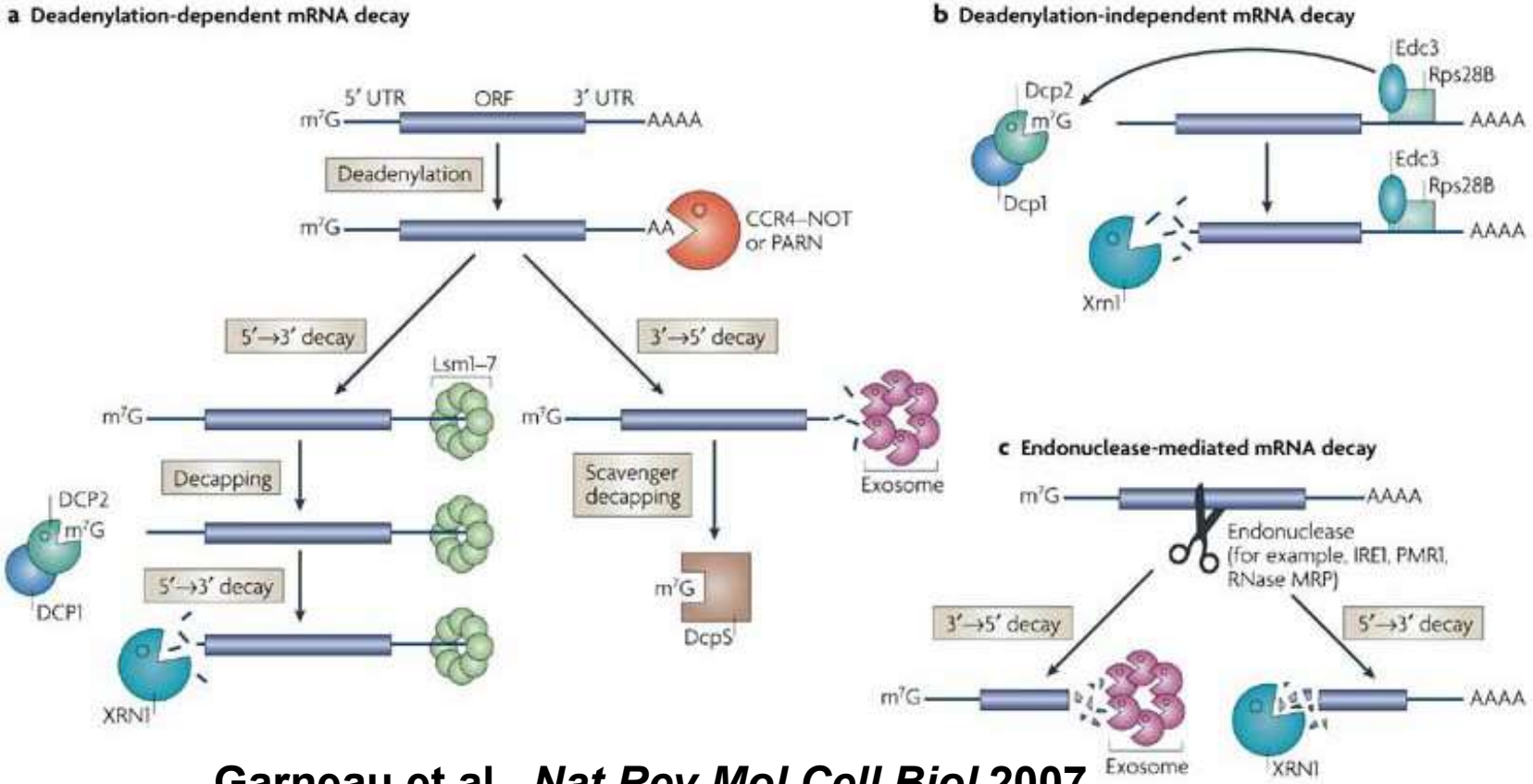
H_2O; PO_4^- - nukleofile atakujące wiązanie fosfodiestrowe
Kataliza odbywa się w obecności jonu dwuwartościowego (Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}) jako kofaktora (aktywacja ataku nukleofilowego)

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 egzosomu)

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

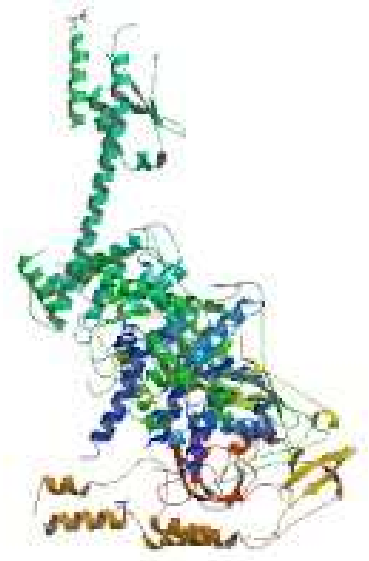


Garneau et al., *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007

Główne eukariotyczne enzymy degradujące RNA

Xrn1 – 5'-3'

Enzym działający samodzielnie



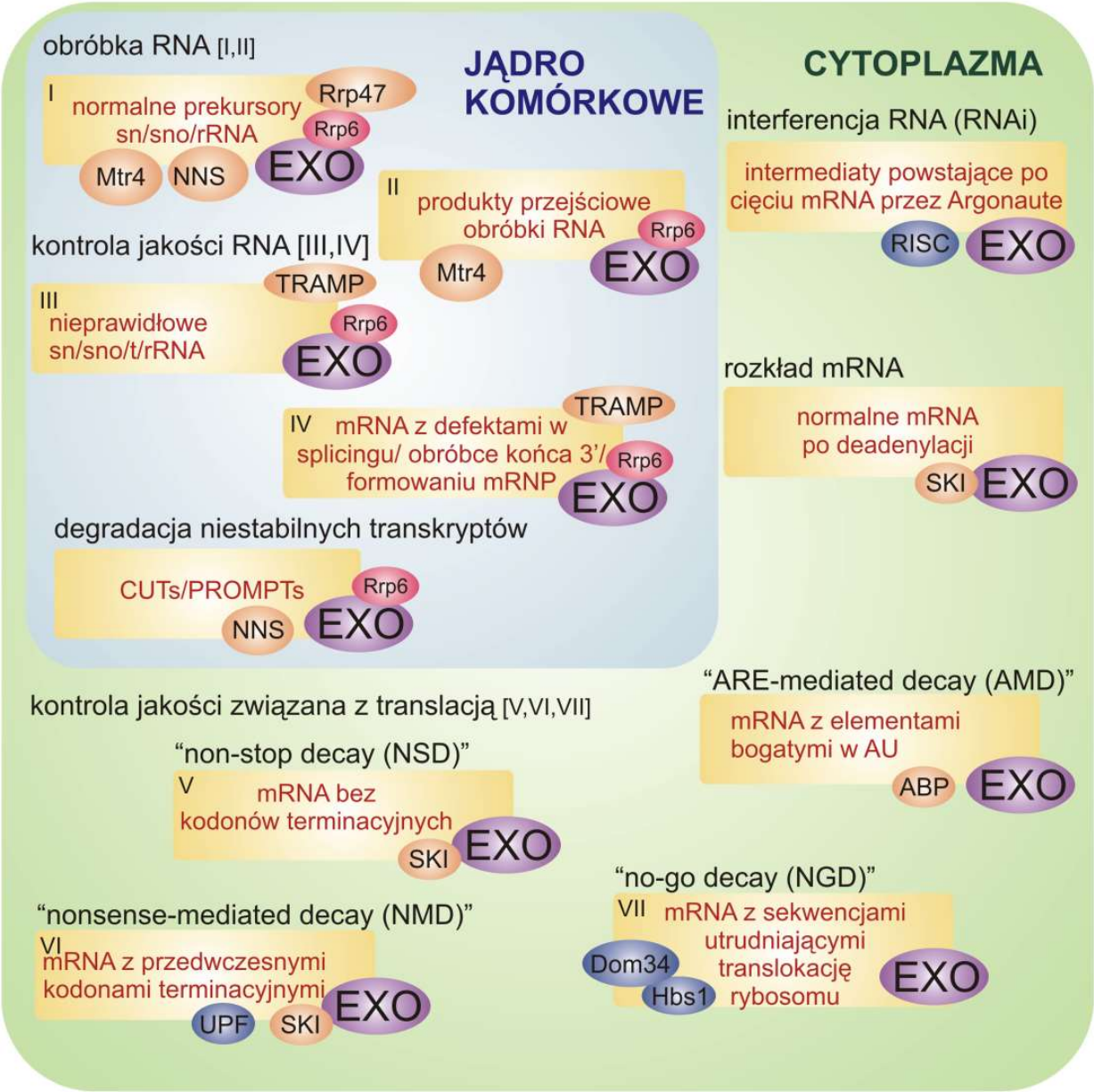
Chang et al.,
***Nat Struct Mol Biol* 2011**

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)

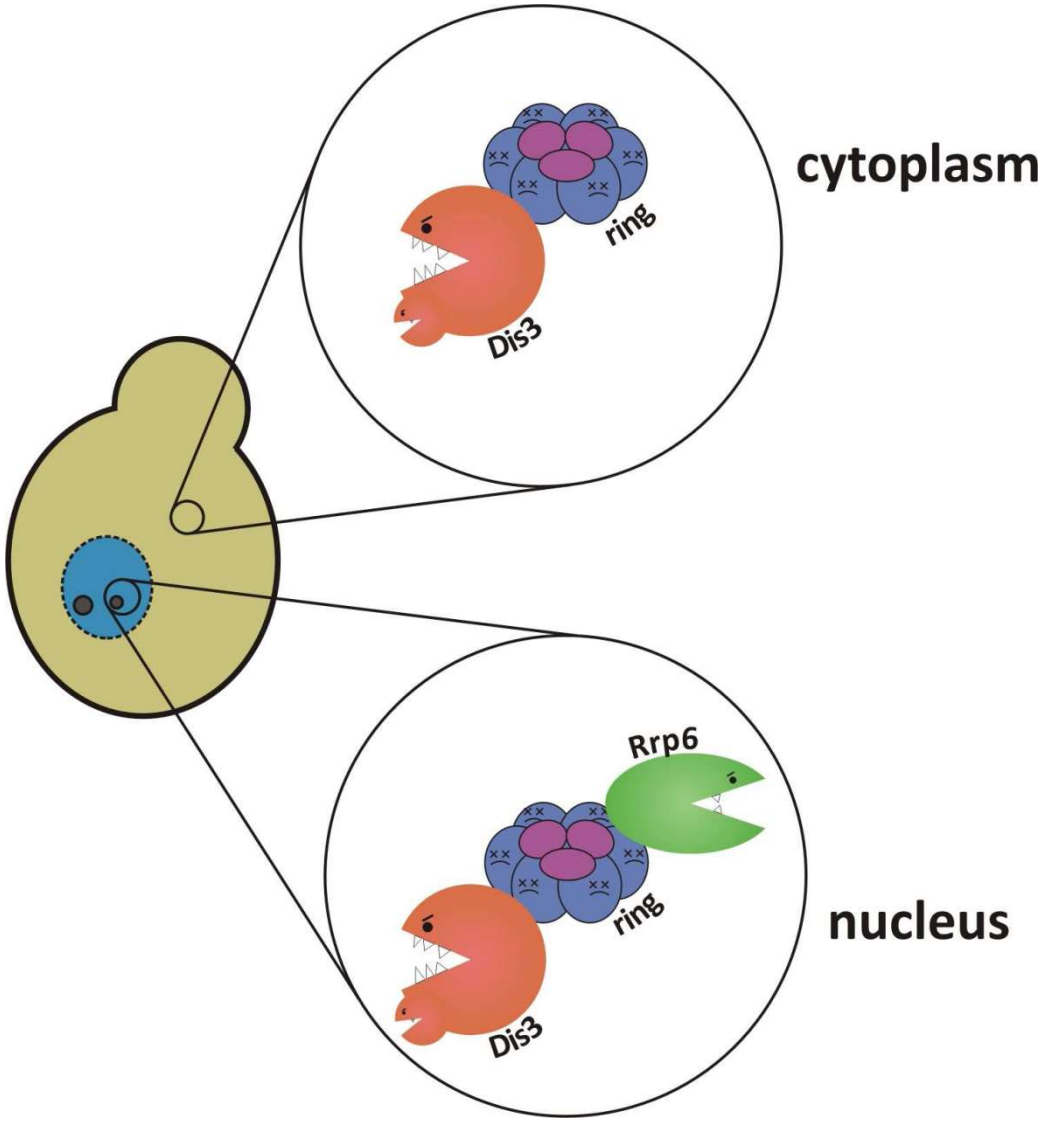
Egzosom to duży 400 kDa kompleks białkowy posiadający aktywność 3'-5' egzorybonukleazy



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 egzosomu u drożdży



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

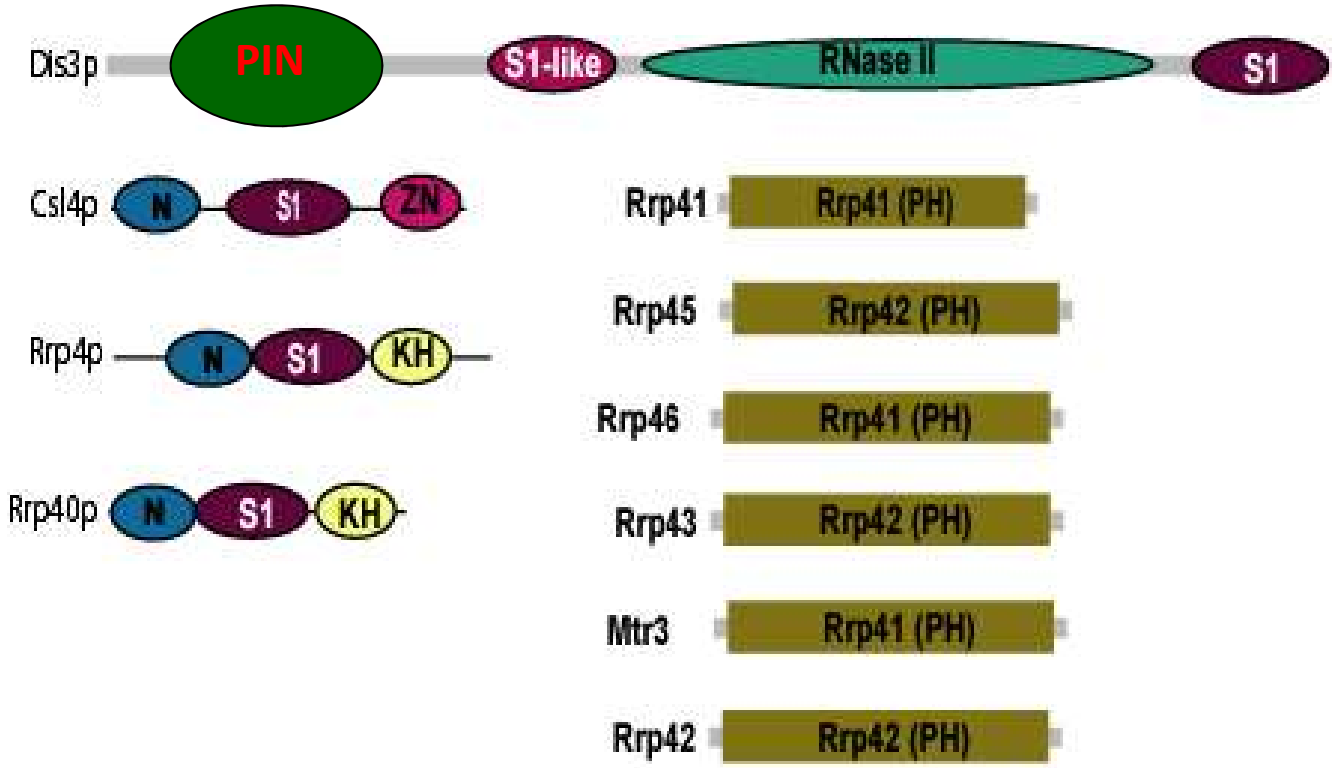
Rdzeń egzosomu *S. cerevisiae* to chimera złożona z:

a) 6-podjednostkowego kompleksu przypominającego pierścień RNAzy PH/PNPazy pochodzenia archebakteryjnego;

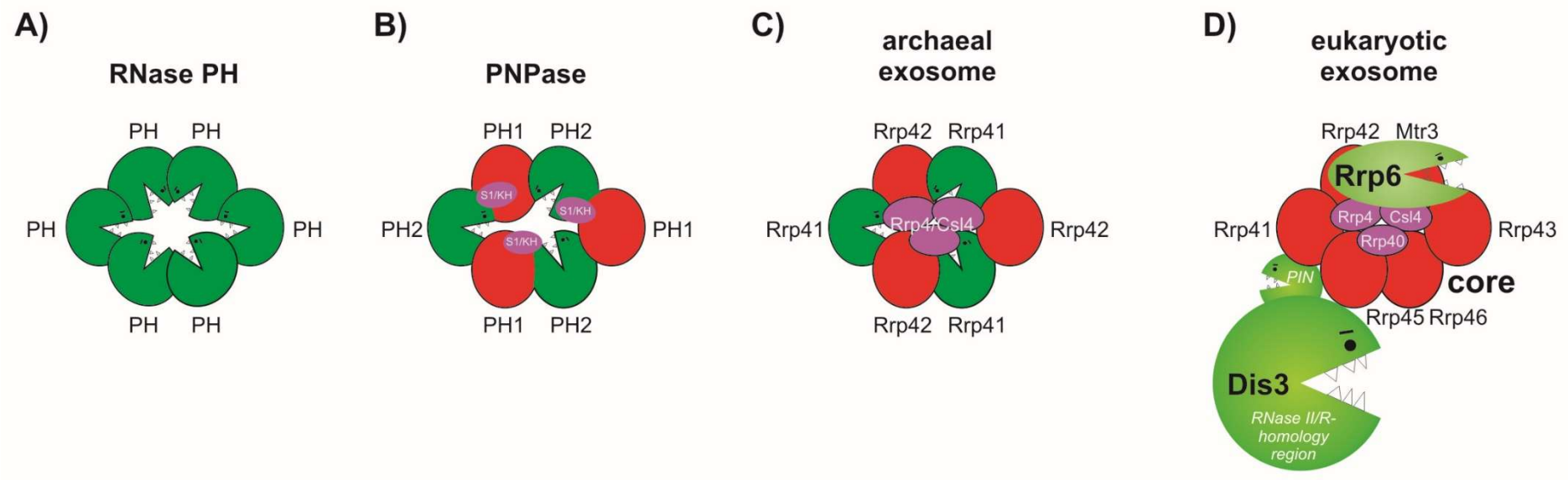
b) 3 podjednostek zawierających domeny wiążące RNA (KH i S1), które występują także w bakteryjnej PNPazie;

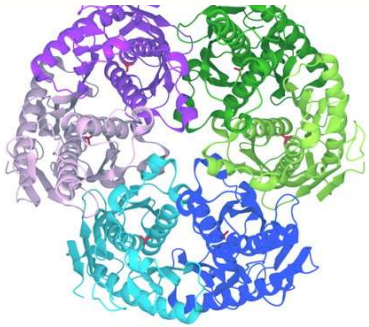
c) Homologa RNazy II/R **Dis3p/Rrp44** (jedyna podjednostka katalityczna rdzenia)

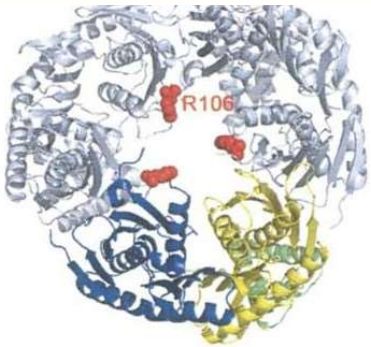
Wszystkie podjednostki rdzenia egzosomu są niezbędne dla drożdży

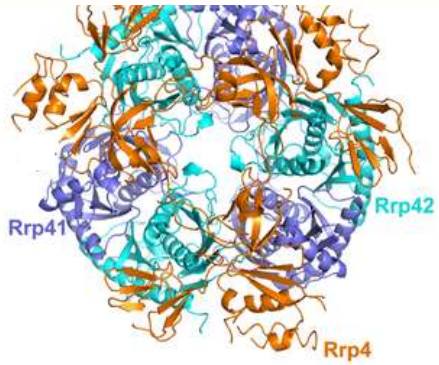


Nukleazy zawierające domeny RNazy PH uczestniczą w metabolizmie RNA w komórkach organizmów reprezentujących wszystkie królestwa świata żywego









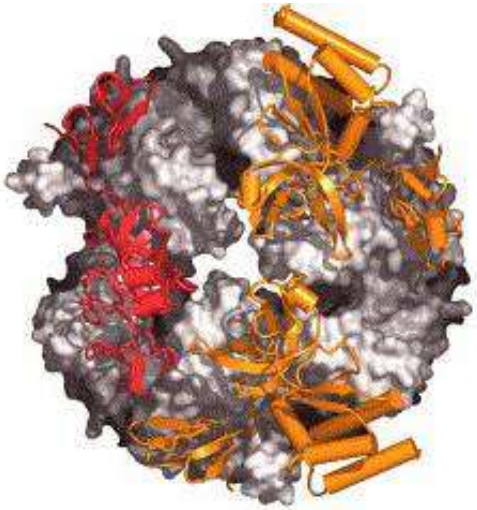
Ishii et al.,
***J Biol Chem* 2003**

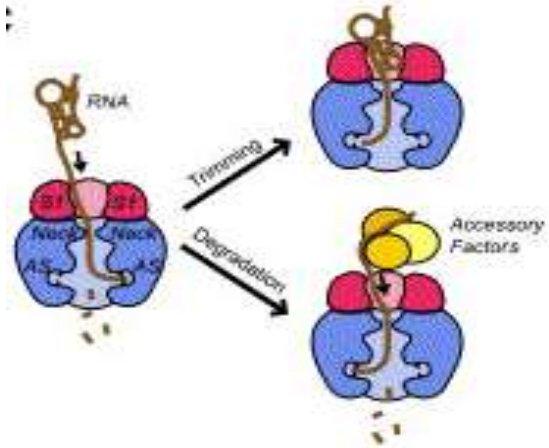
Shi et al.,
***RNA* 2008**

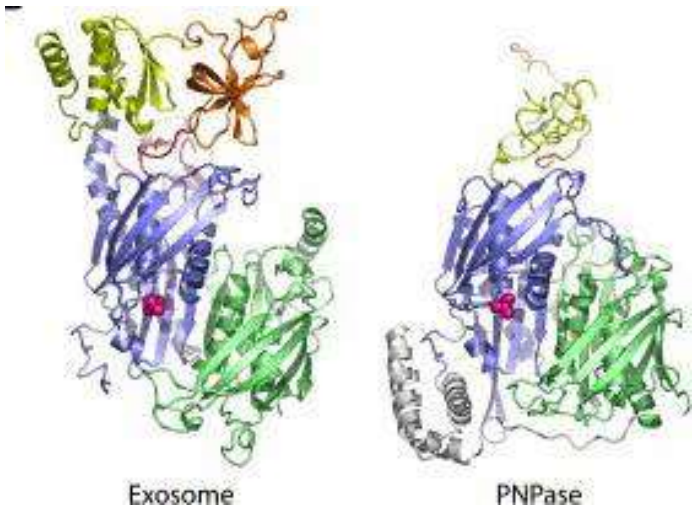
Lu et al.,
***PLoS One* 2008**

Jaka jest aktywność kompleksu egzosomu ?

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







Büttner et al.,
***Mol Cell* 2005**

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

TO NIEPRAWDA !

Oznaczenia biochemiczne aktywności rybonukleaz na przykładzie kompleksu egzosomu [1]

- 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 egzosomu [2]

- poddawanie analizie substratów RNA znakowanych w różny sposób (na końcu 5’ lub 3’; wewnątrz cząsteczki)

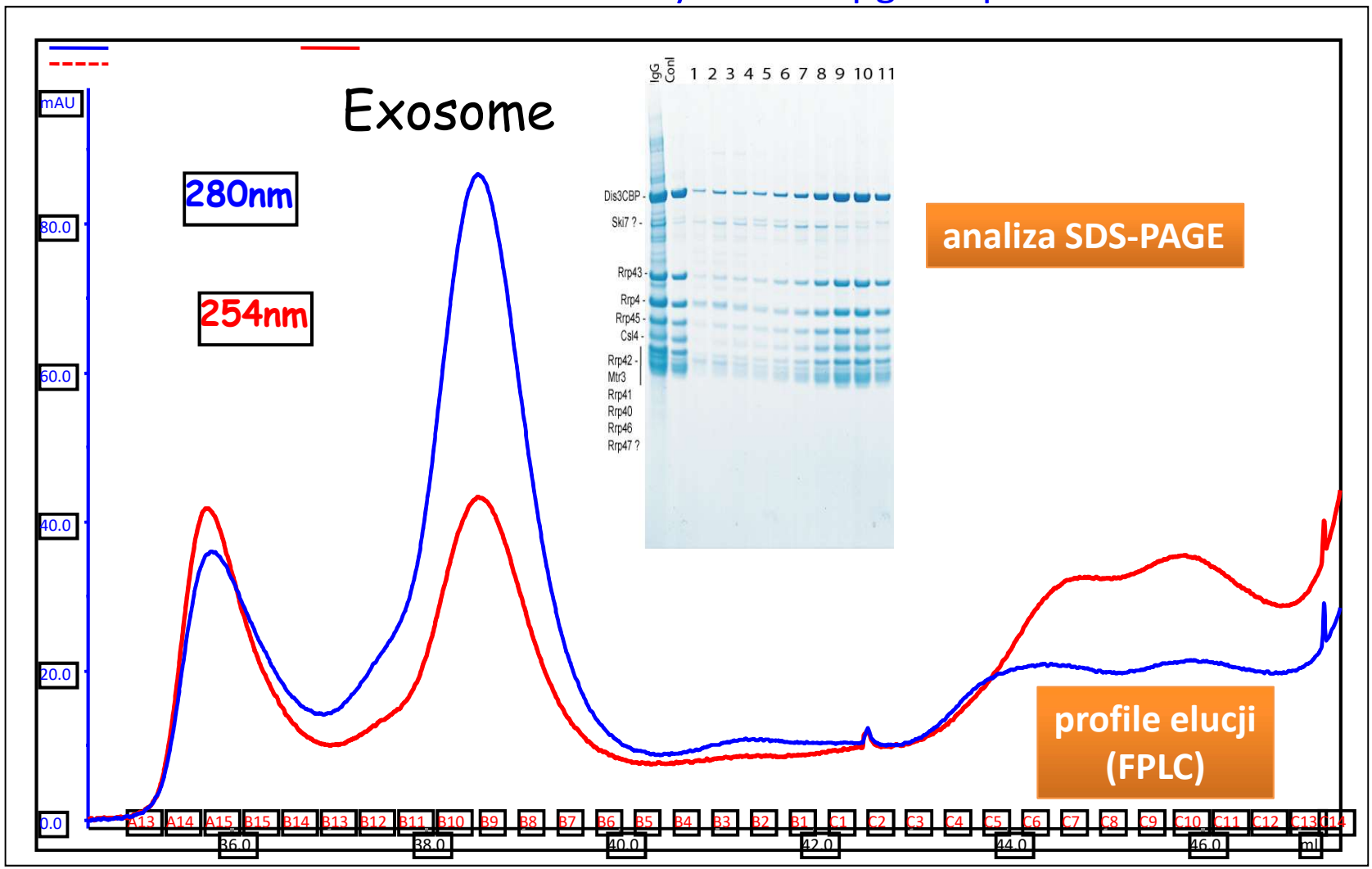
- analizowanie degradacji substratów o różnej strukturze (jednoniciowe liniowe lub koliste; dwuniciowe)

- 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***

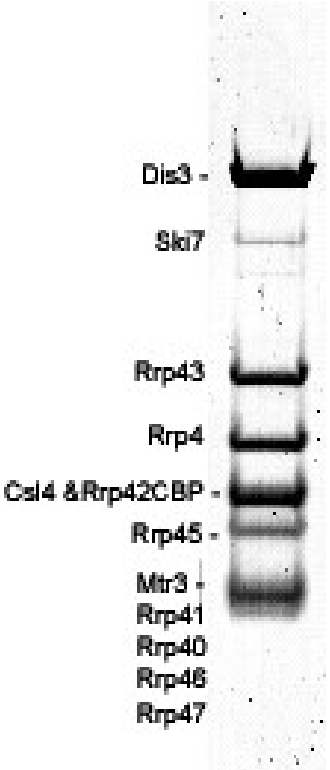
Oczyszczanie egzosomu z drożdży

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

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

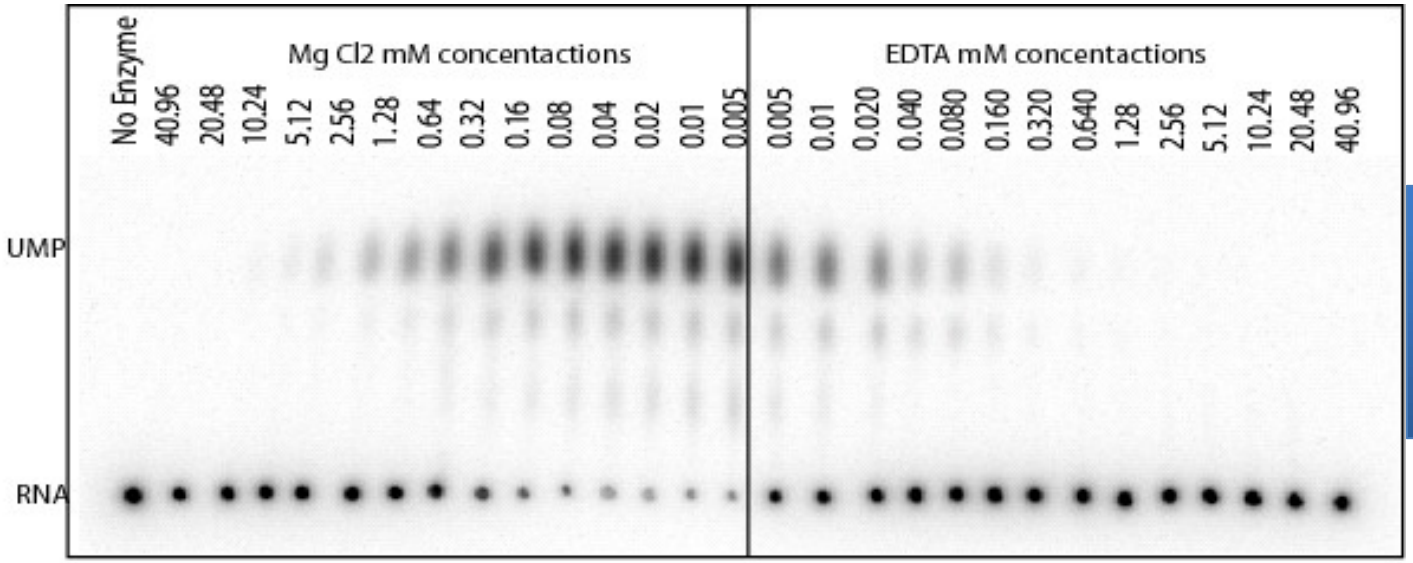
Egzosom jest hydrolazą

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

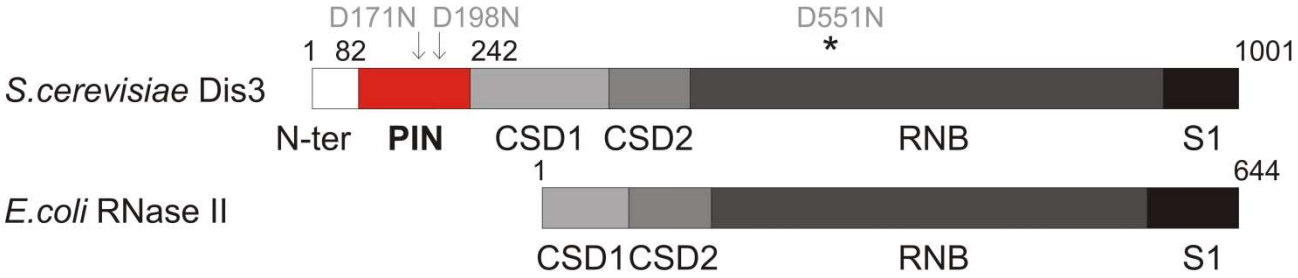
substrat syntetyzowany w transkrypcji *in vitro* z użyciem [^{32}P]-UTP

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

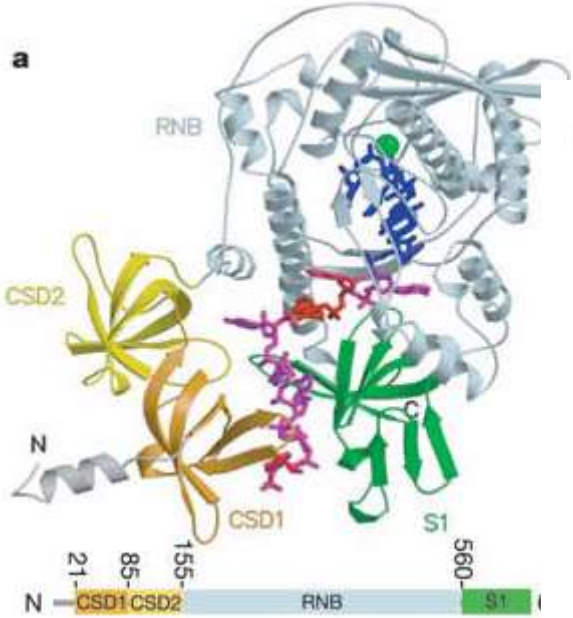
Dis3 – potencjalna podjednostka katalityczna

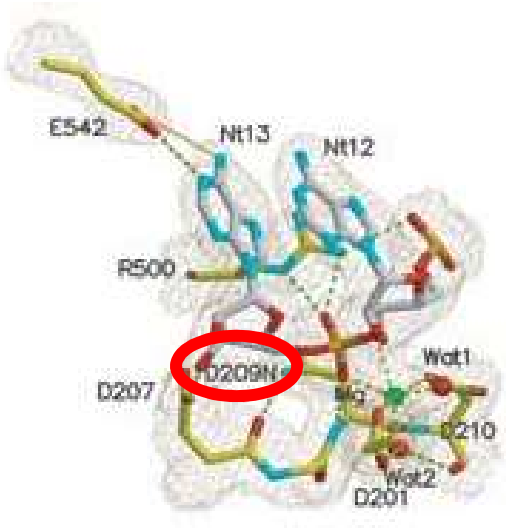
- **Organizacja domen funkcjonalnych białka Dis3**



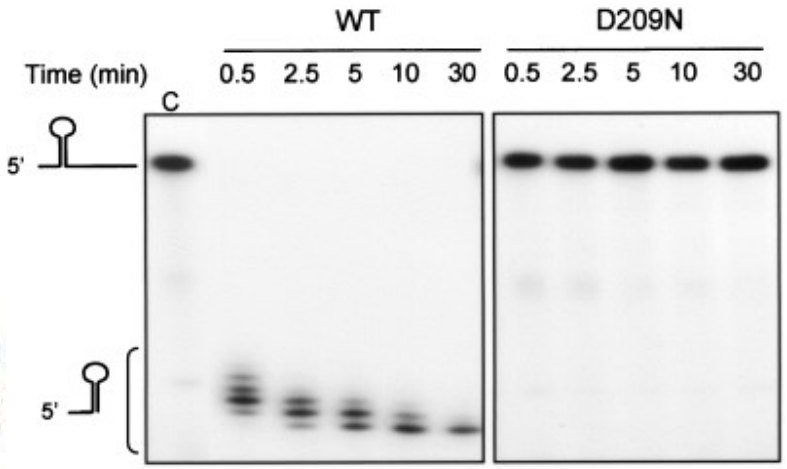
- zidentyfikowano mutację znoszącą aktywność RNazy II *E. coli* (D209N)

[aminokwas D209 bierze udział w koordynacji jonu Mg^{2+}]





substrat znakowany na końcu 5'



Frãzao et al., *Nature* 2006

analiza PAGE

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* (Δ*rrp6*) (do oczyszczania kompleksu i badania aktywności)

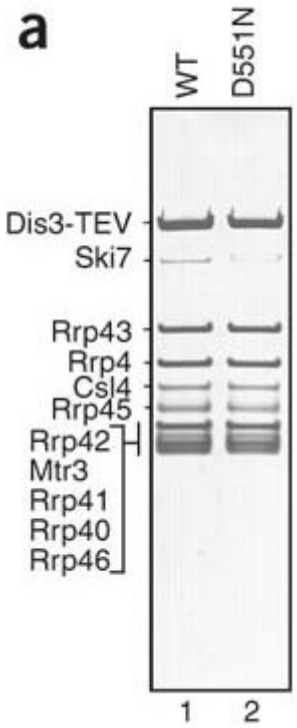
WT **D551N**

Mutacja DIS3 D551N powoduje bardzo silny fenotyp wzrostowy

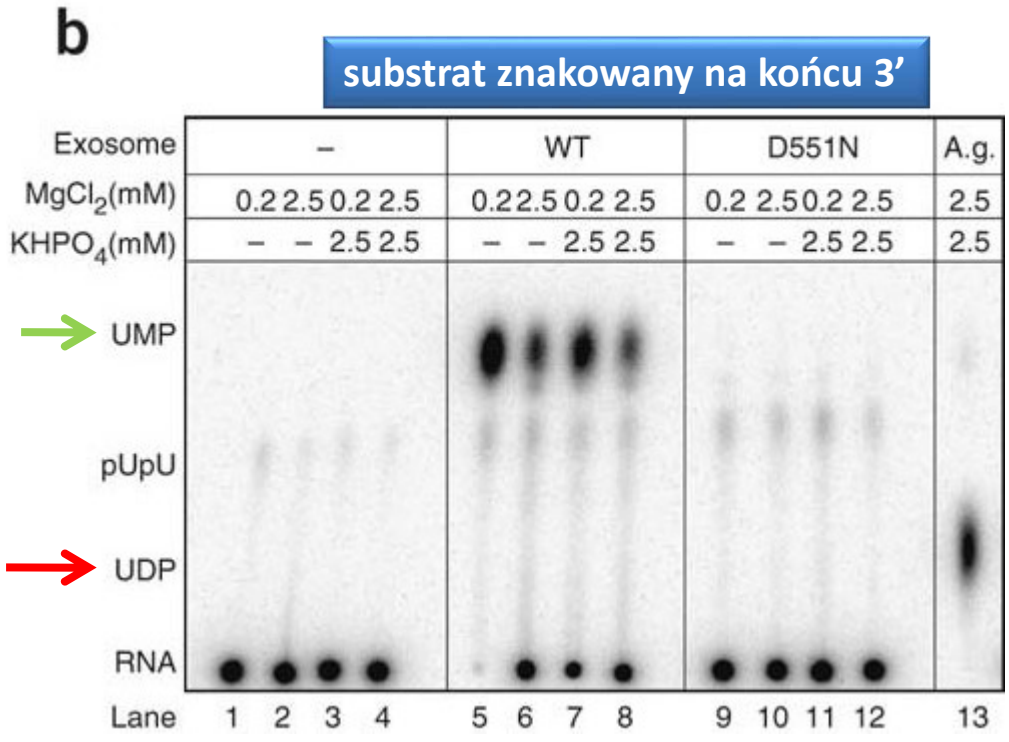
WNIOSEK: Nienaruszony aminokwas D551 jest konieczny dla prawidłowego funkcjonowania komórek

HIPOTEZA: Mutacja D551N w Dis3p znosi aktywność katalityczną egzosomu

Czy mutacja D551N znosi aktywność hydrolityczną egzosomu ?



analiza SDS-PAGE



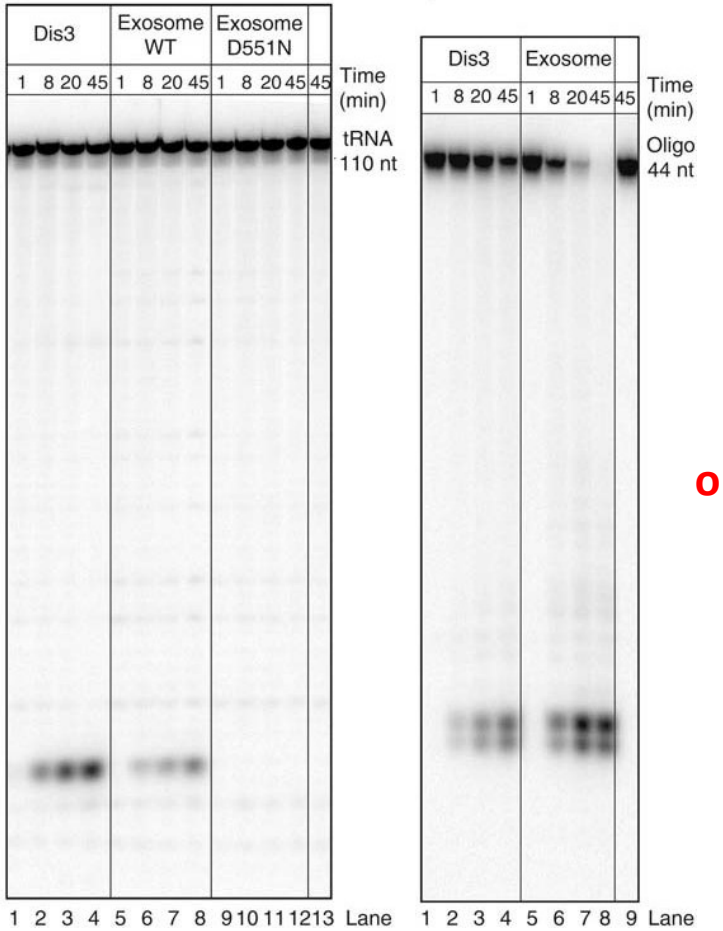
analiza TLC

Analiza aktywności egzorybonukleolitycznej egzosomów zawierających WT Dis3 lub Dis3 D551N w obecności substratu RNA znakowanego [^{32}P]-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 egzosomu i białko Dis3p wykazują podobną aktywność względem różnych substratów RNA (jednoniciowych)



analiza PAGE

substrat „naturalny” (pre-tRNA)

syntetyczny oligorybonukleotyd

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

substraty znakowane na końcu 5’

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

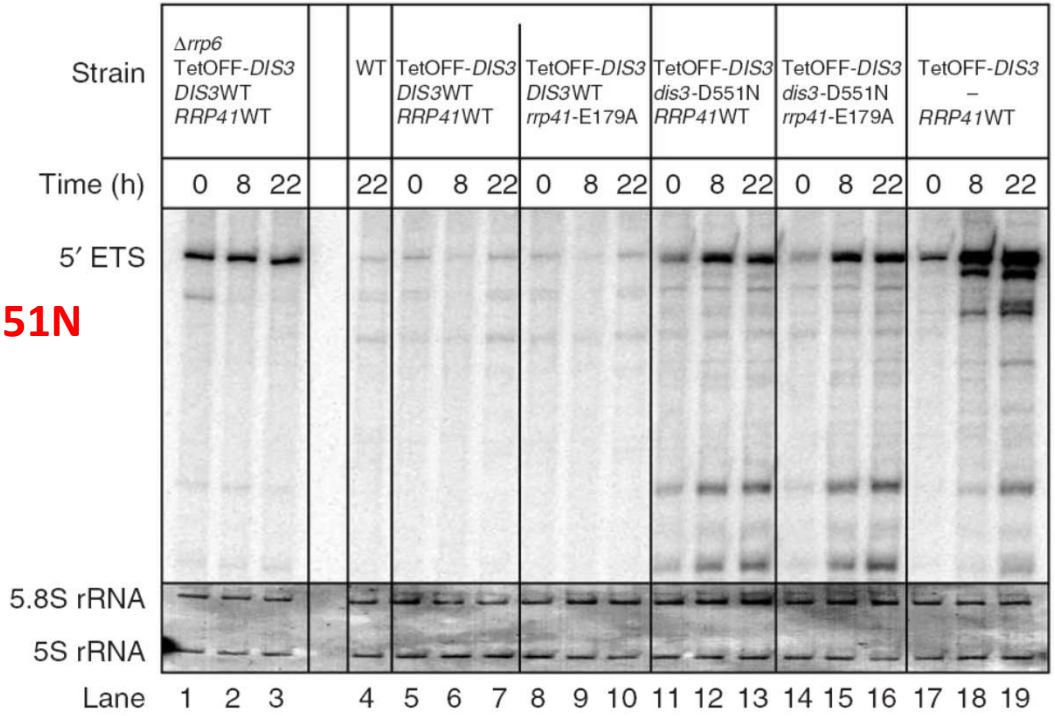
Dziembowski et al., *Nat Struct Mol Biol* 2007

Czy Dis3p jest rzeczywiście jedyną podjednostką katalityczną rdzenia drożdżowego egzosomu ?

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

- 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

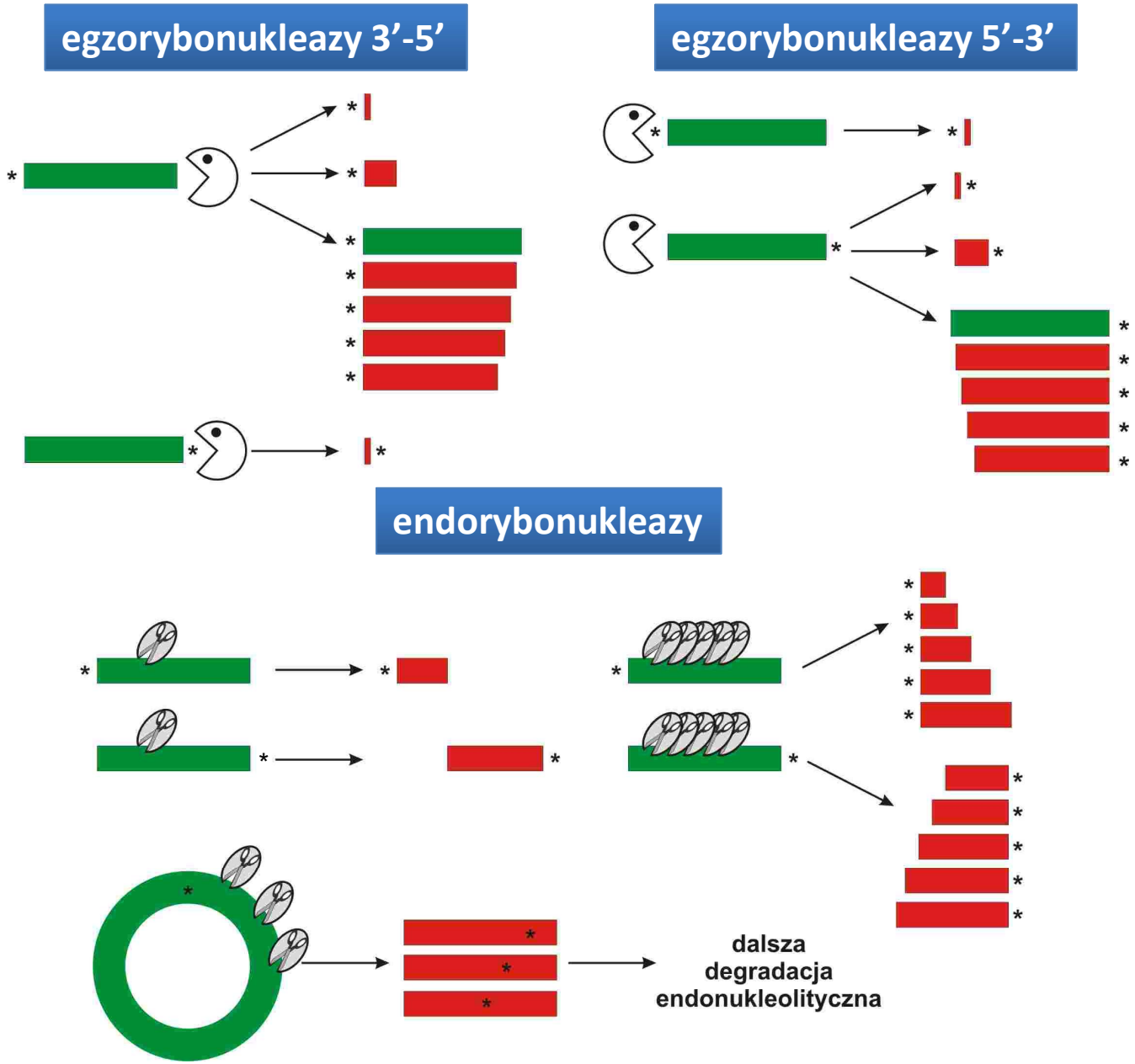


analiza hybrydyzacyjna typu northern

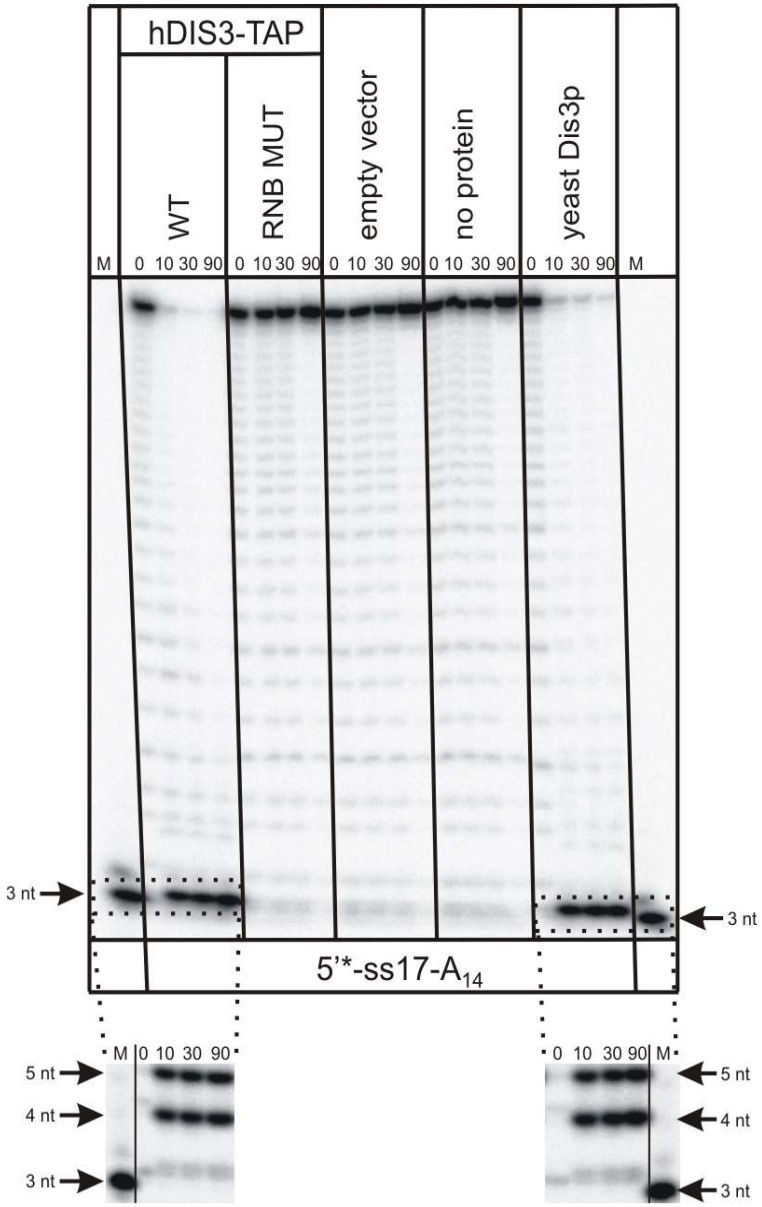
Obserwacje z doświadczeń *in vivo* dostarczają silnego poparcia dla wyników eksperymentów biochemicznych

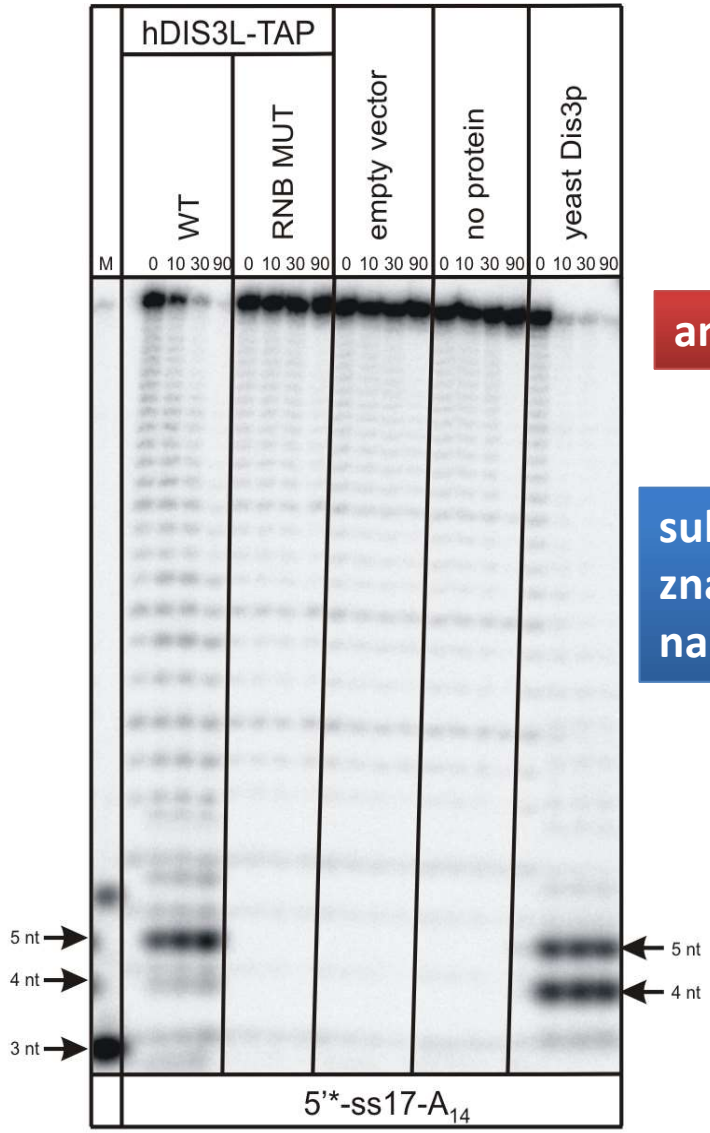
Dziembowski et al., *Nat Struct Mol Biol* 2007

W jaki sposób określa się kierunek działania rybonukleazy ?



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



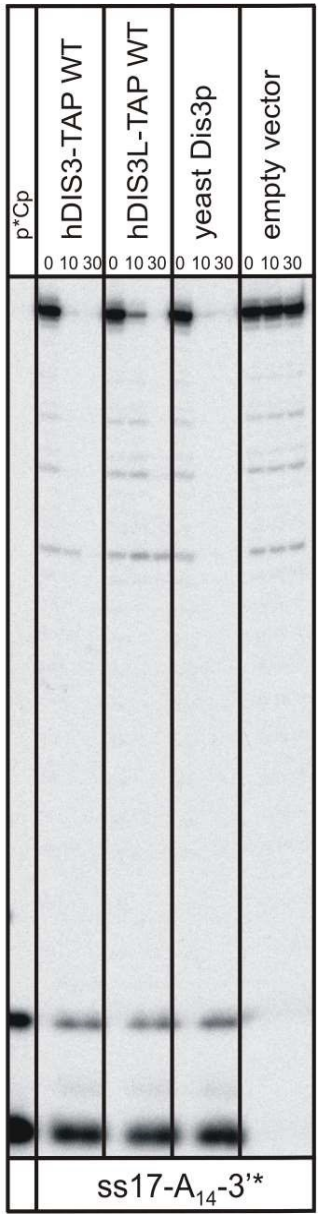


analiza PAGE

substrat znakowany na końcu 5’

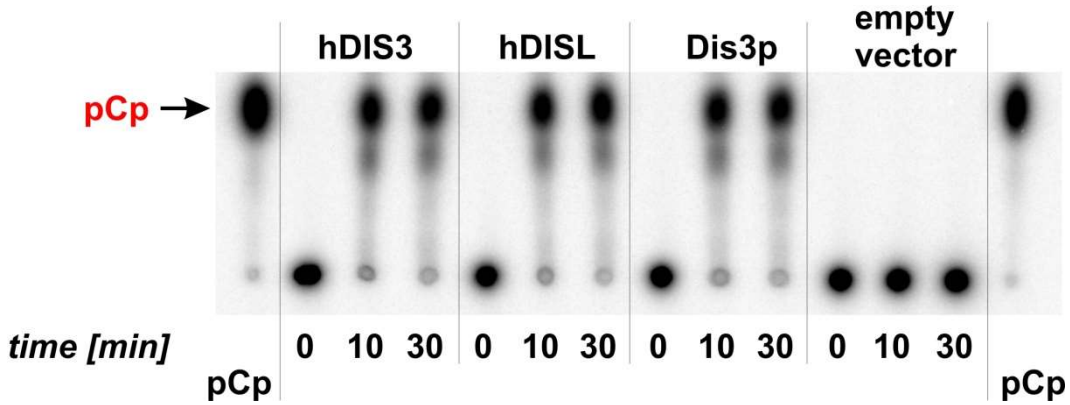
Tomecki et al., *EMBO J* 2010

Dla pewności trzeba zbadać substrat wyznakowany na przeciwnym końcu



substrat znakowany na końcu 3'

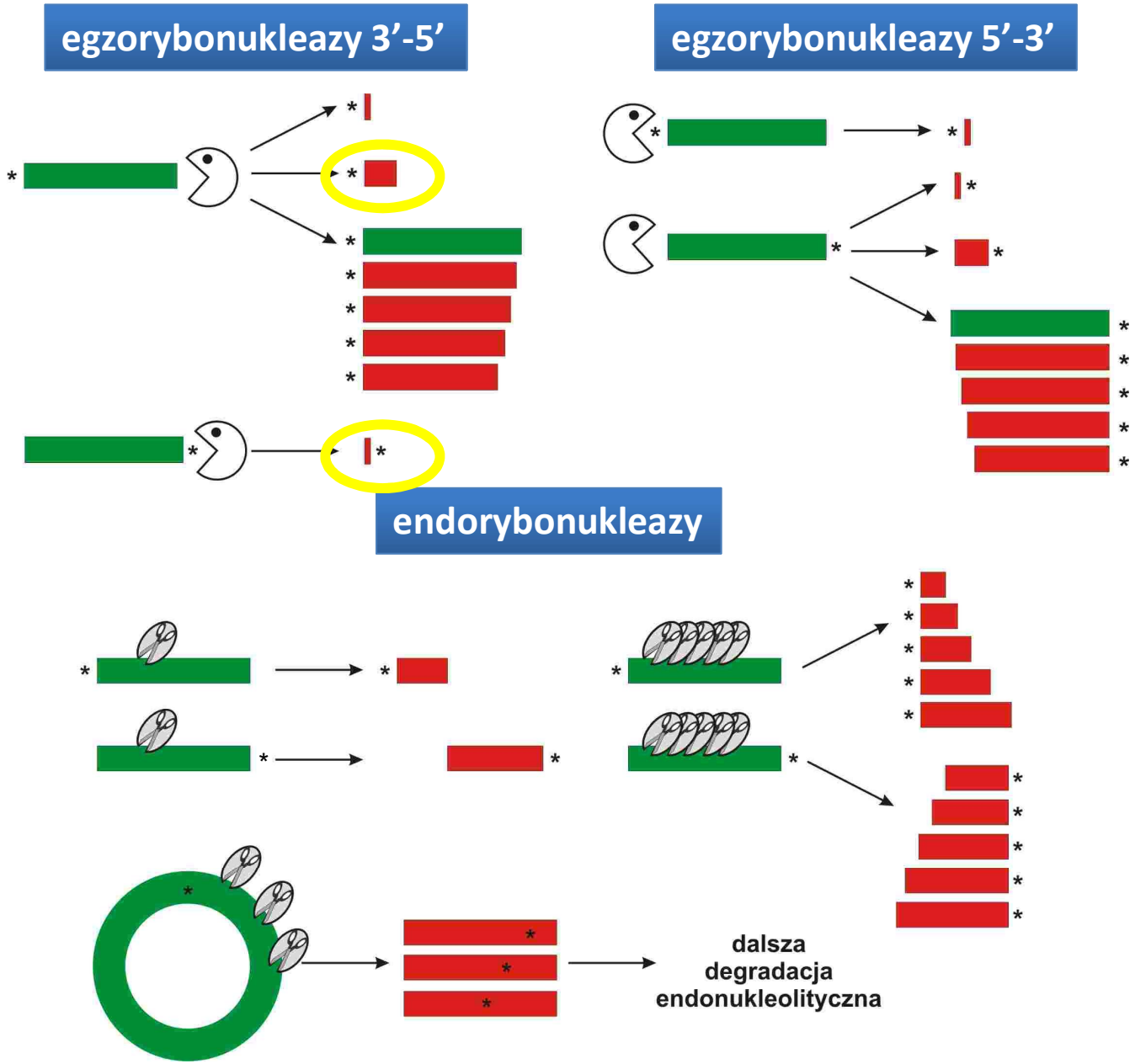
analiza PAGE



analiza TLC

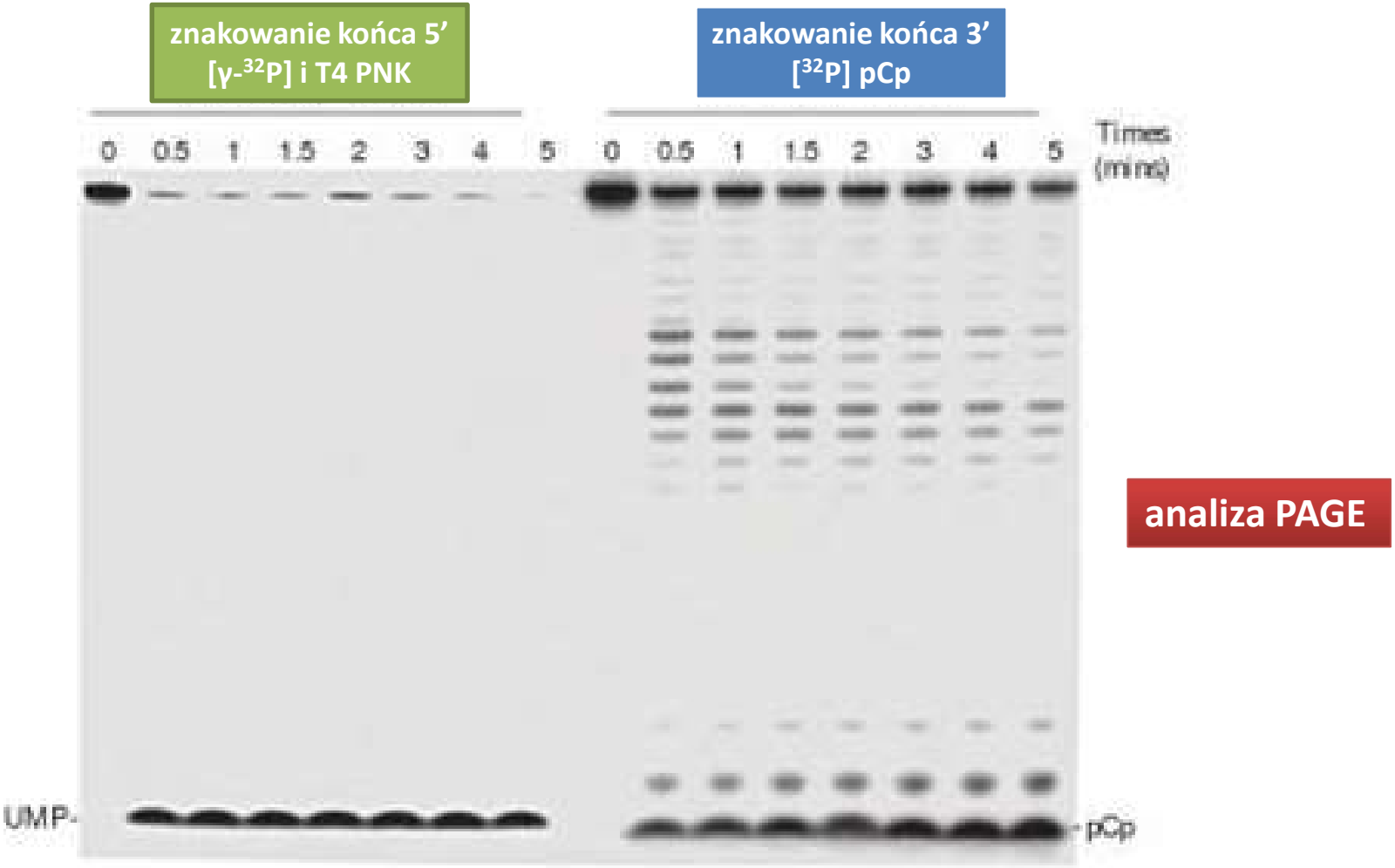
Tomecki et al., *EMBO J* 2010

Ludzkie homologi Dis3 są egzorybonukleazami 3’-5’



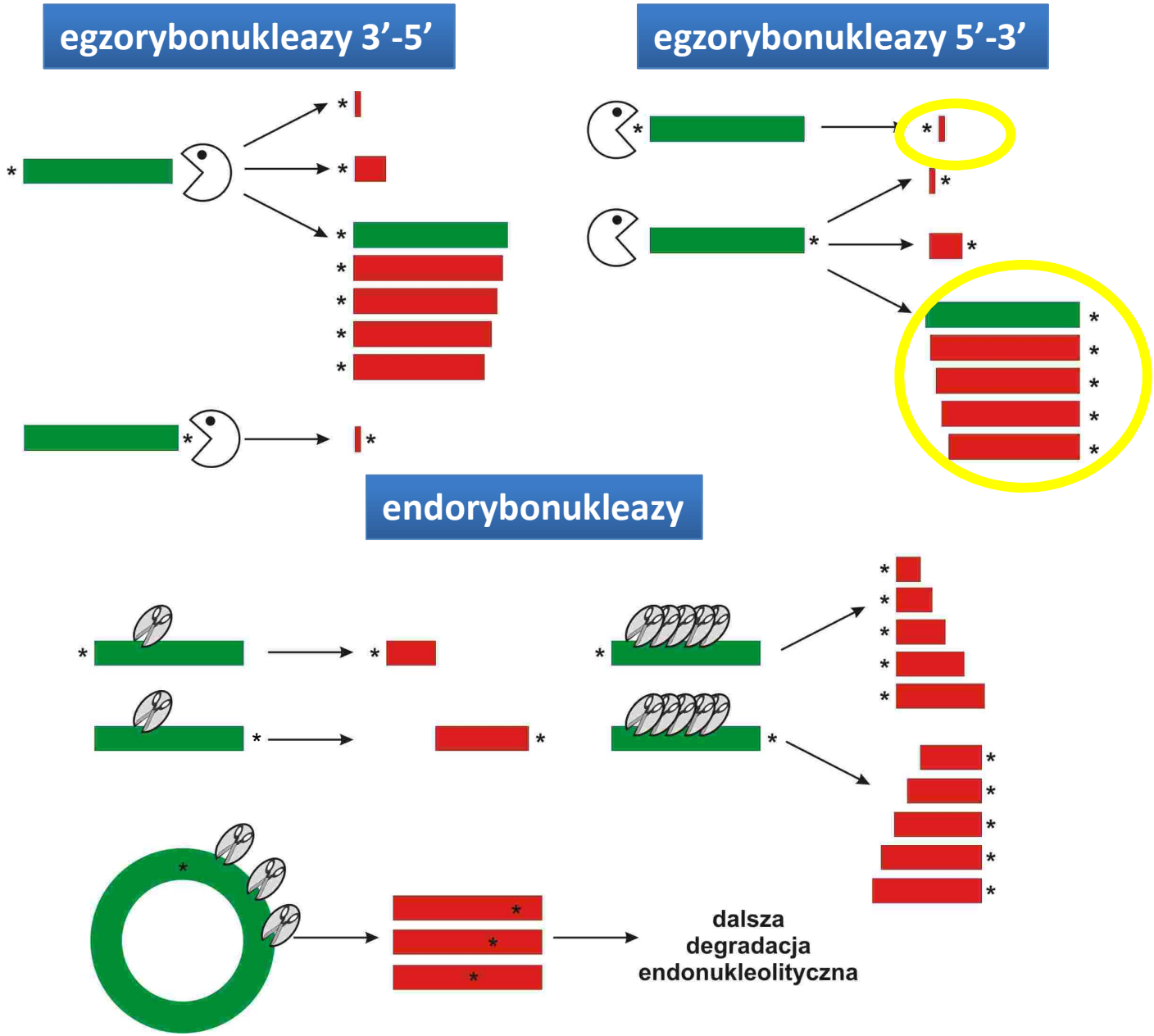
A jak to wygląda w przypadku egzonukleaz 5’-3’ ?

Przykład 1: Xrn1 z *S. cerevisiae*



Pellegrini et al., *Methods enzymol* 2008

Xrn1 jest egzorybonukleazą 5’-3’



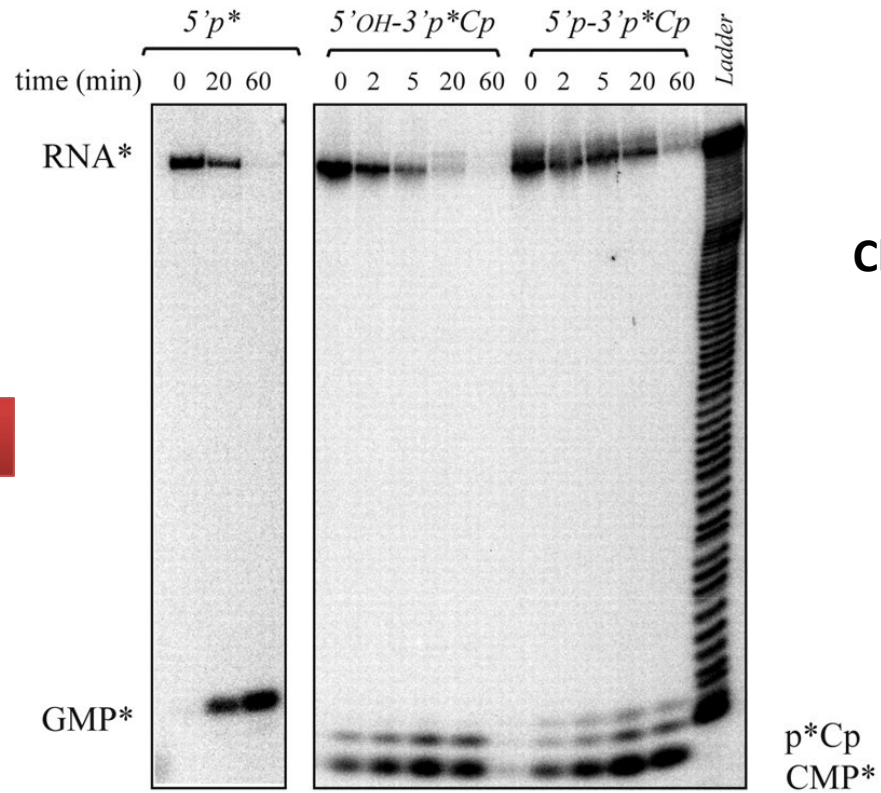
Czy RNaza J1 działa w kierunku 3'-5', czy 5'-3' ?

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

znakowanie końca 3' [^{32}P] pCp

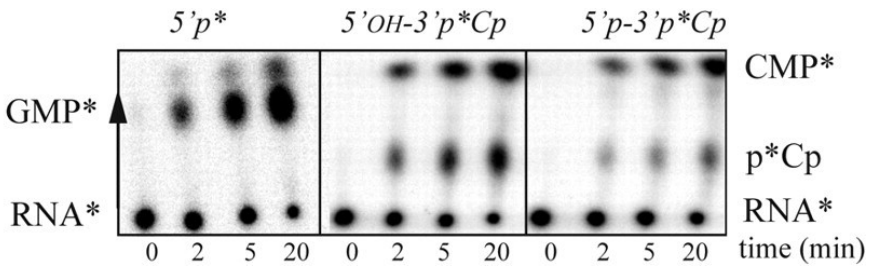
analiza PAGE

G – pierwszy nukleotyd substratu sR47



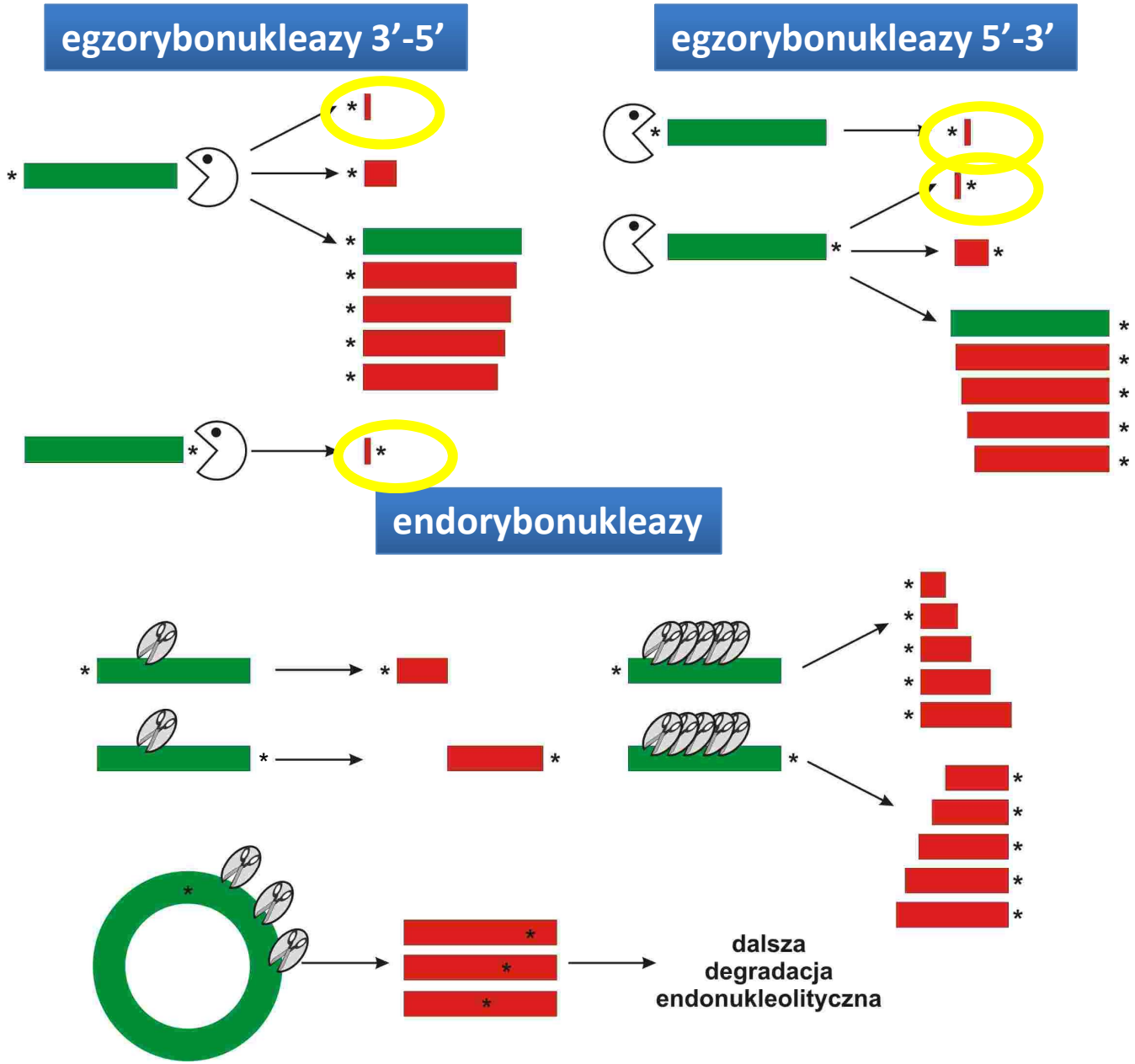
Clouet-d'Orval et al., *J Biol Chem* 2010

analiza TLC



Nie można stwierdzić na podstawie powyższych wyników

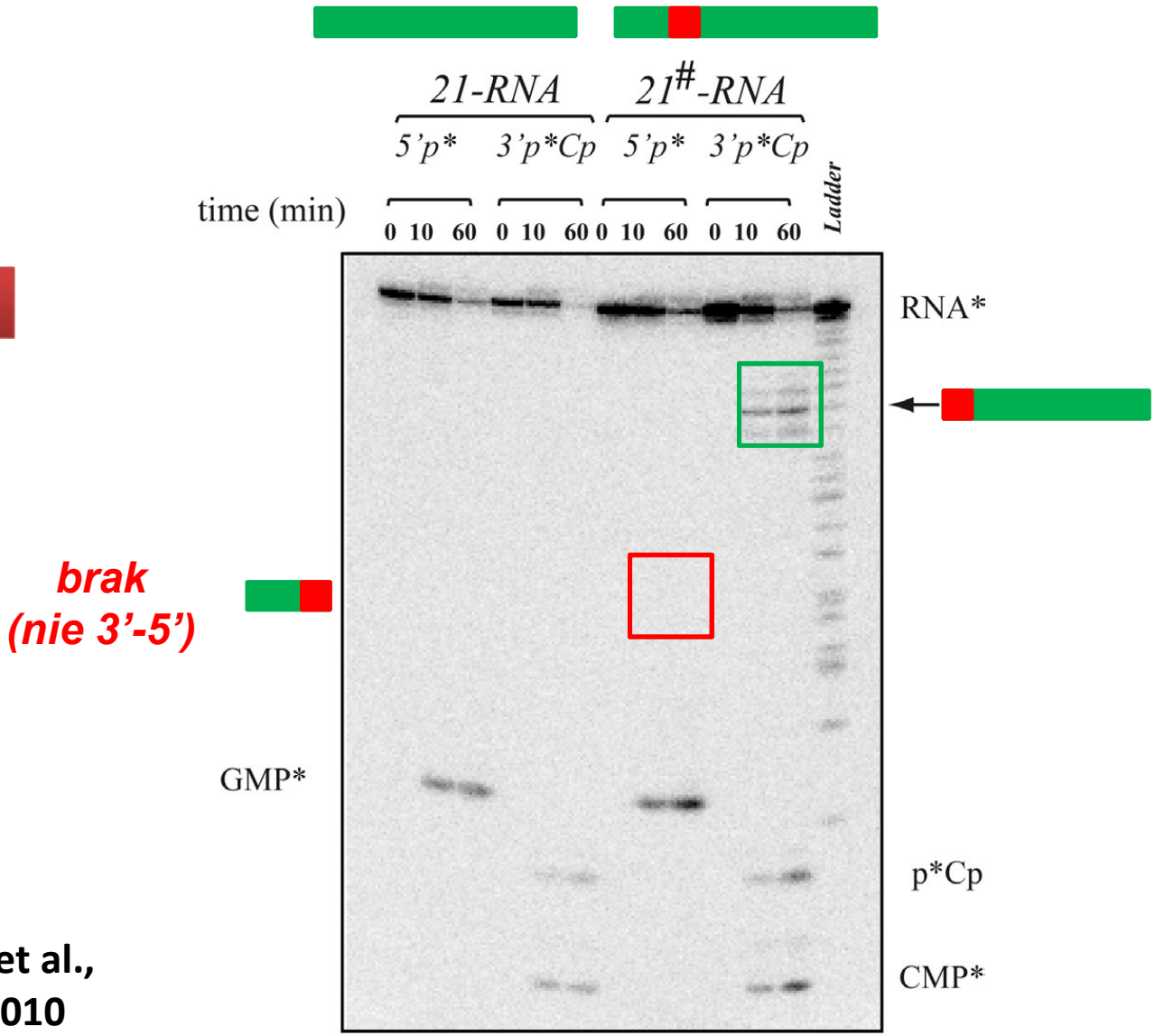
Nie zawsze jest to oczywiste



Jak to ostatecznie stwierdzić ?

Asymetryczne wprowadzenie do substratu elementu spowalniającego aktywność nukleolityczną

analiza PAGE



brak (nie 3'-5')

jest !!! (5'-3')

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

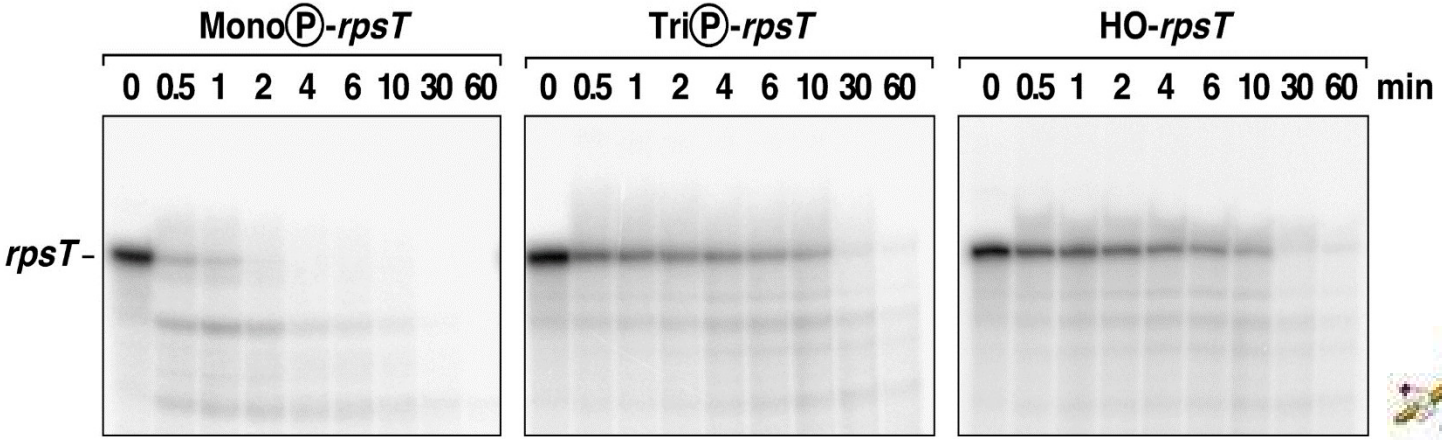
Aktywność wielu rybonukleaz zależy od statusu fosforylacji końca 5’ – jak badać to zjawisko ?

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 analoga czapeczki (transkrypty eukariotyczne) – czapeczka**

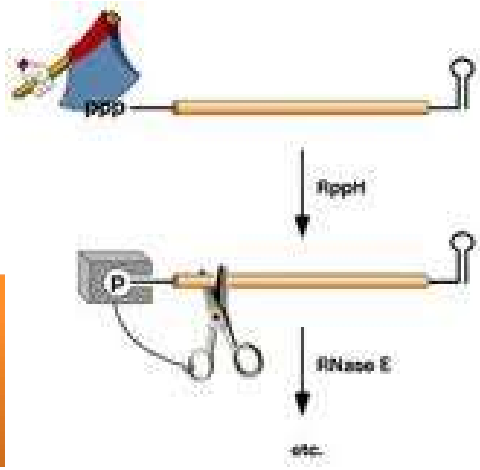
B RNase E cleavage in vitro:

Escherichia coli



analiza PAGE

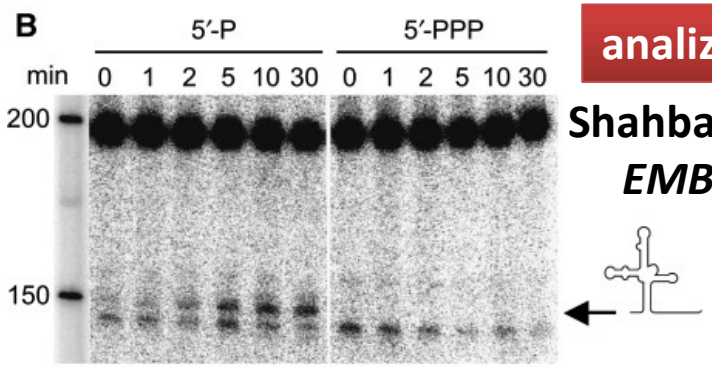
Celesnik et al., *Mol Cell* 2007



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”

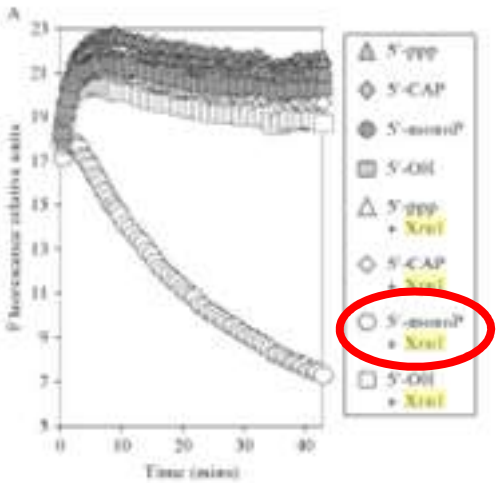
- RNaza J1 *Bacillus subtilis* i *Archaea* (patrz powyżej)
- RNaza Y *Bacillus subtilis*



analiza PAGE

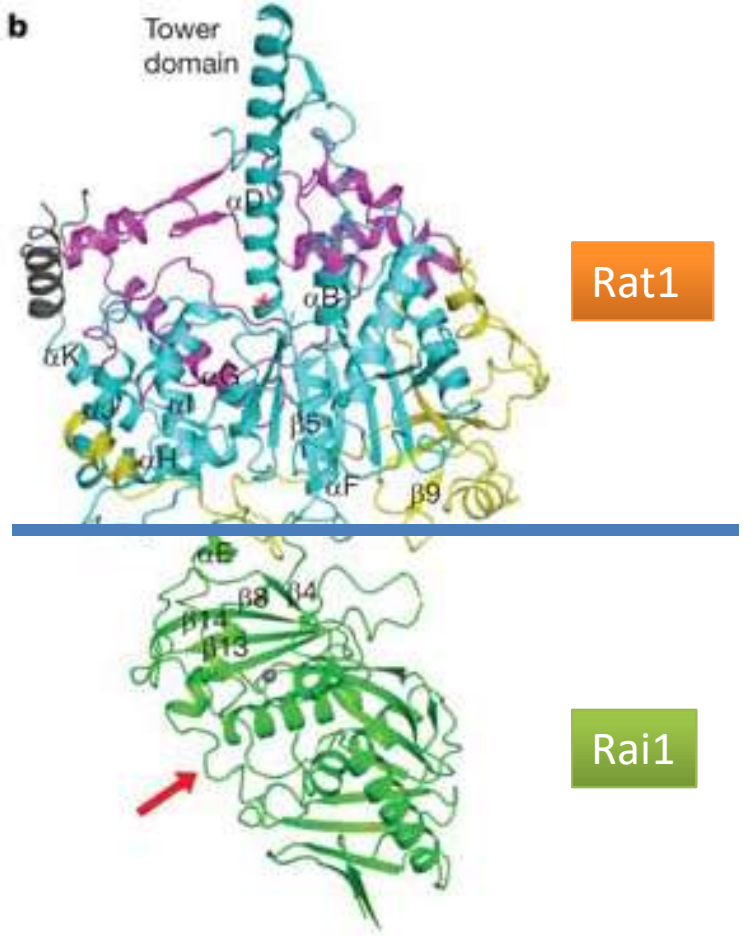
Shahbabian et al., *EMBO J* 2009

- Xrn1 (stąd konieczne usunięcie czapeczki)



Pellegrini et al., *Methods enzymol* 2008

- Rat1 (współdziała z pirofosfohydrolazą Rai1)

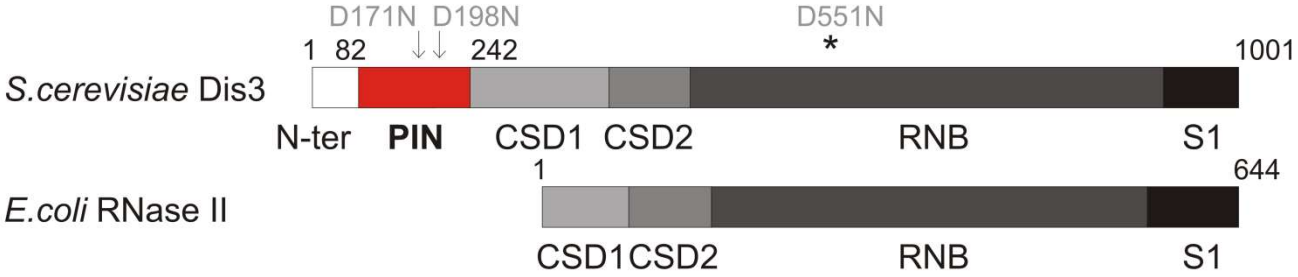


Xiang et al., *Nature* 2009

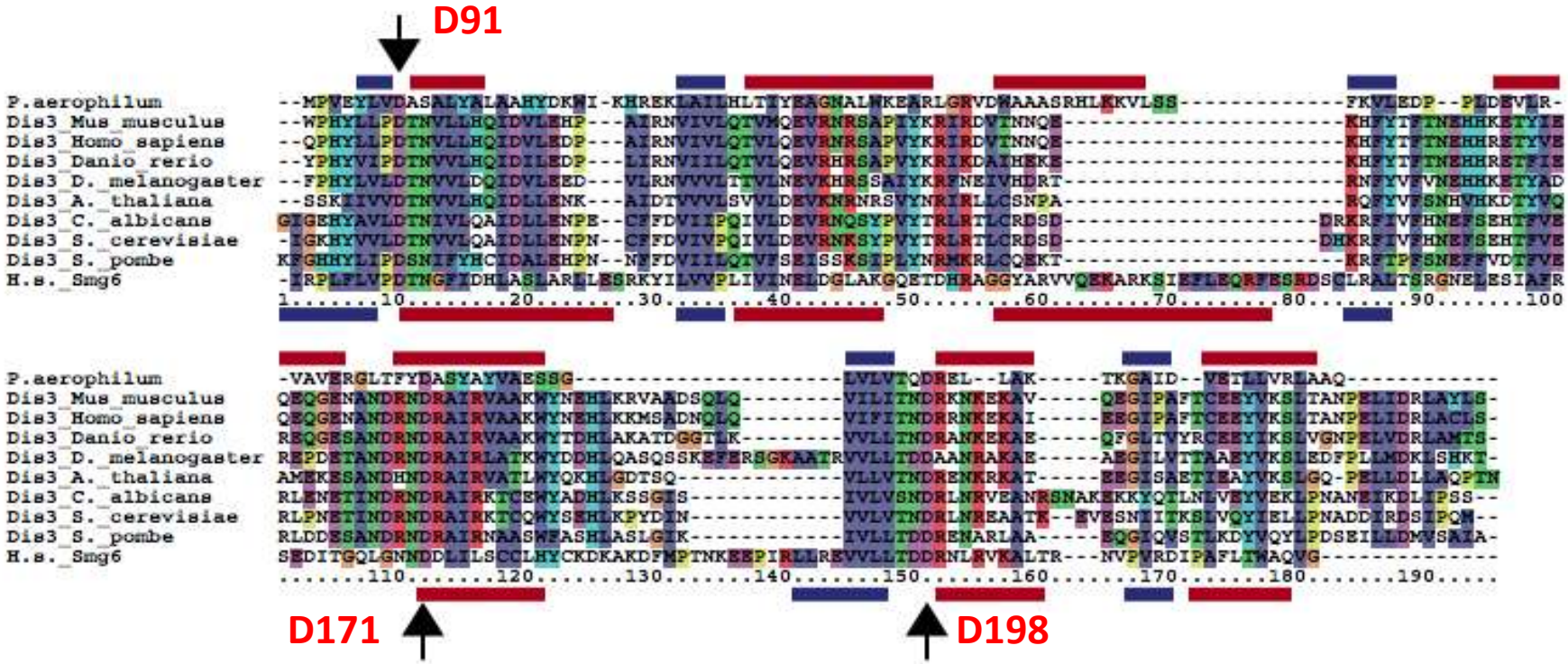
Czy Dis3p jest wyłącznie egzorybonukleazą 3’-5’?

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

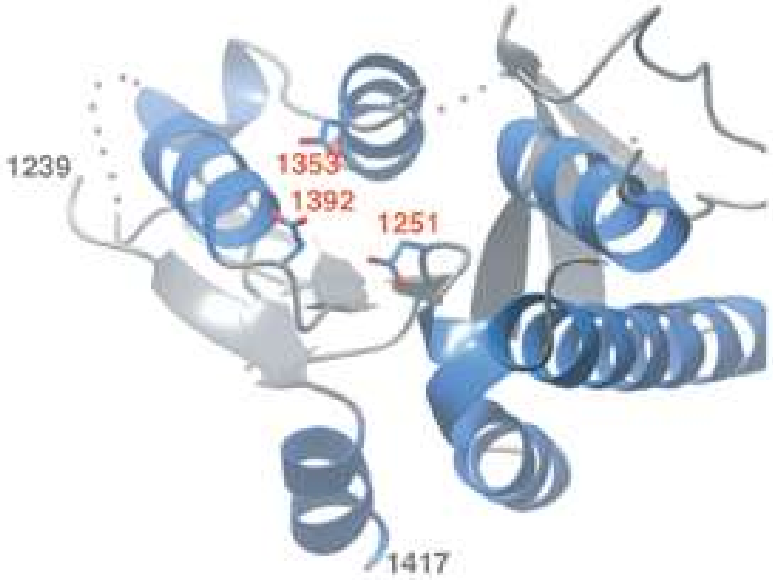
- **Organizacja domen funkcjonalnych białka Dis3p**



- **N-końcowa domena PIN jest silnie zachowana w ewolucji**



Białka zawierające domenę PIN są nukleazami

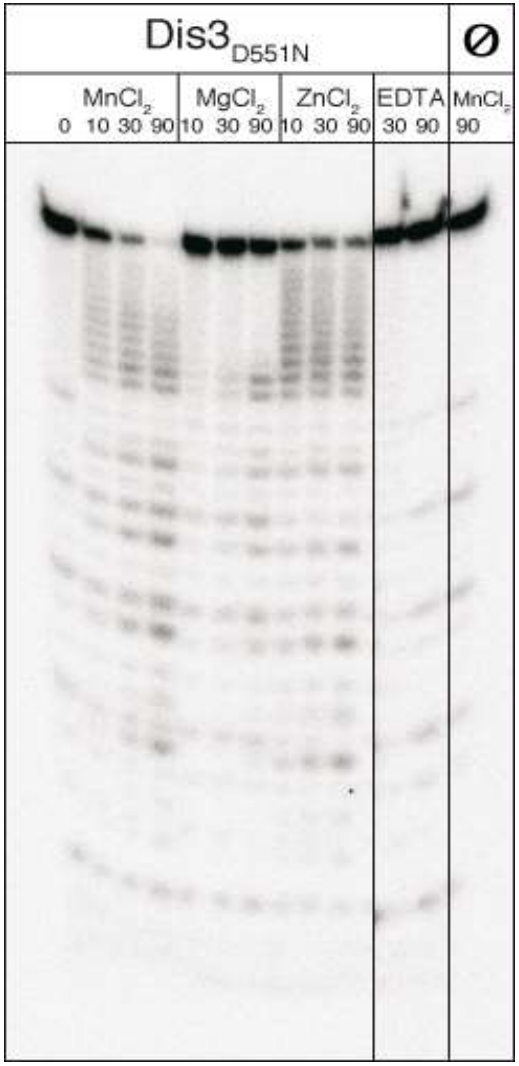


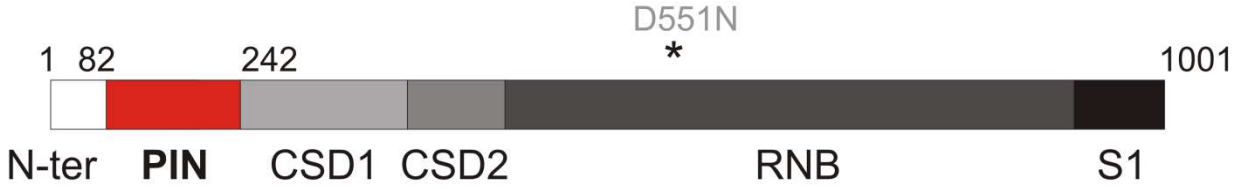
Struktura białka hSMG6 (Glavan *et al*., EMBO J, 2006)

- **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:

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

substrat znakowany na końcu 5'

analiza PAGE

Lebreton, Tomecki et al., *Nature* 2008

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

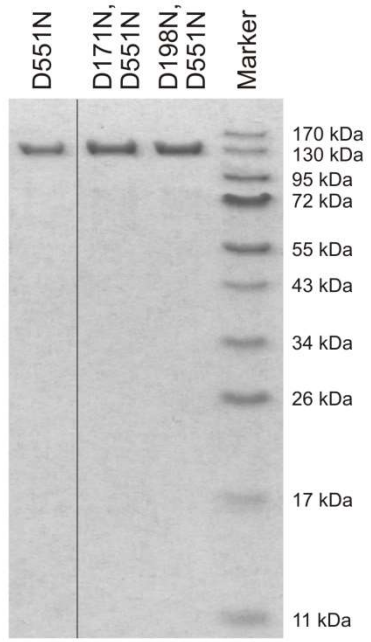
Przykład optymalizacji stężenia kationu dwuwartościowego stosowanego w reakcji

substrat znakowany na końcu 5'

analiza PAGE

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

Dodatkowe mutacje konserwowanych reszt asparaginianu w obrębie triady katalitycznej domeny PIN



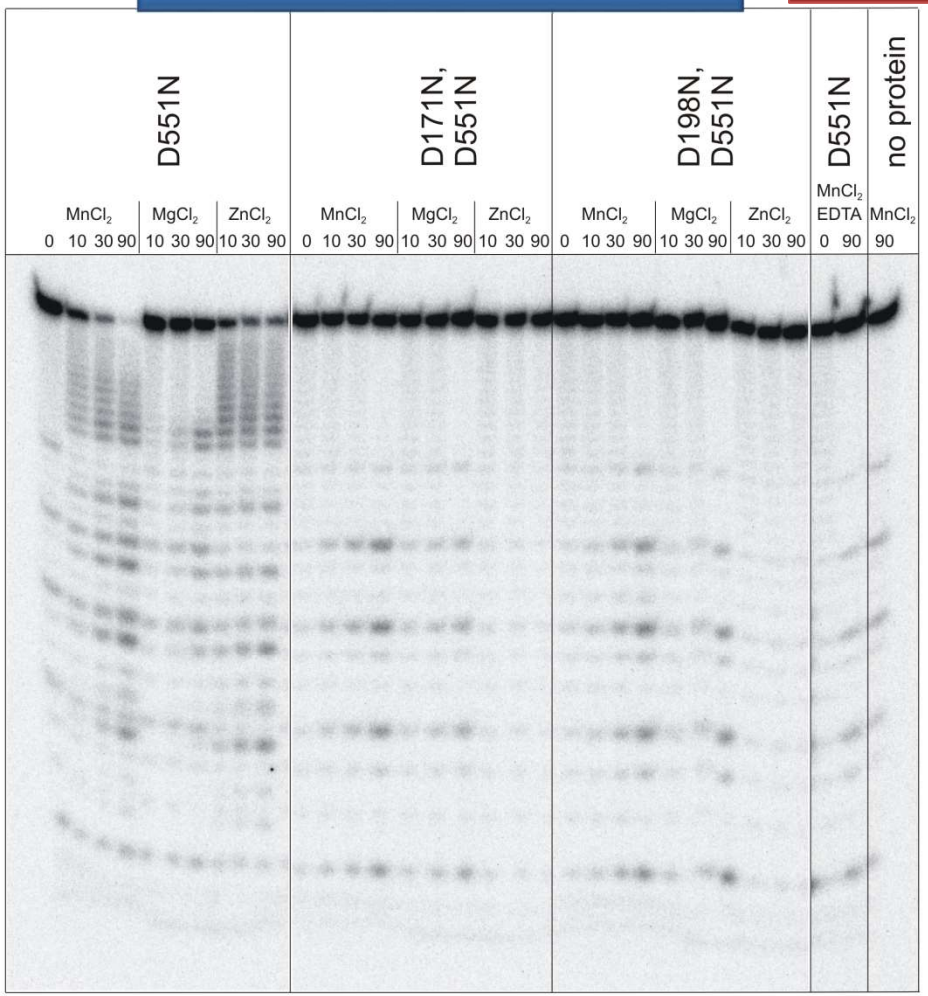
analiza SDS-PAGE

Lebreton, Tomecki et al., *Nature* 2008

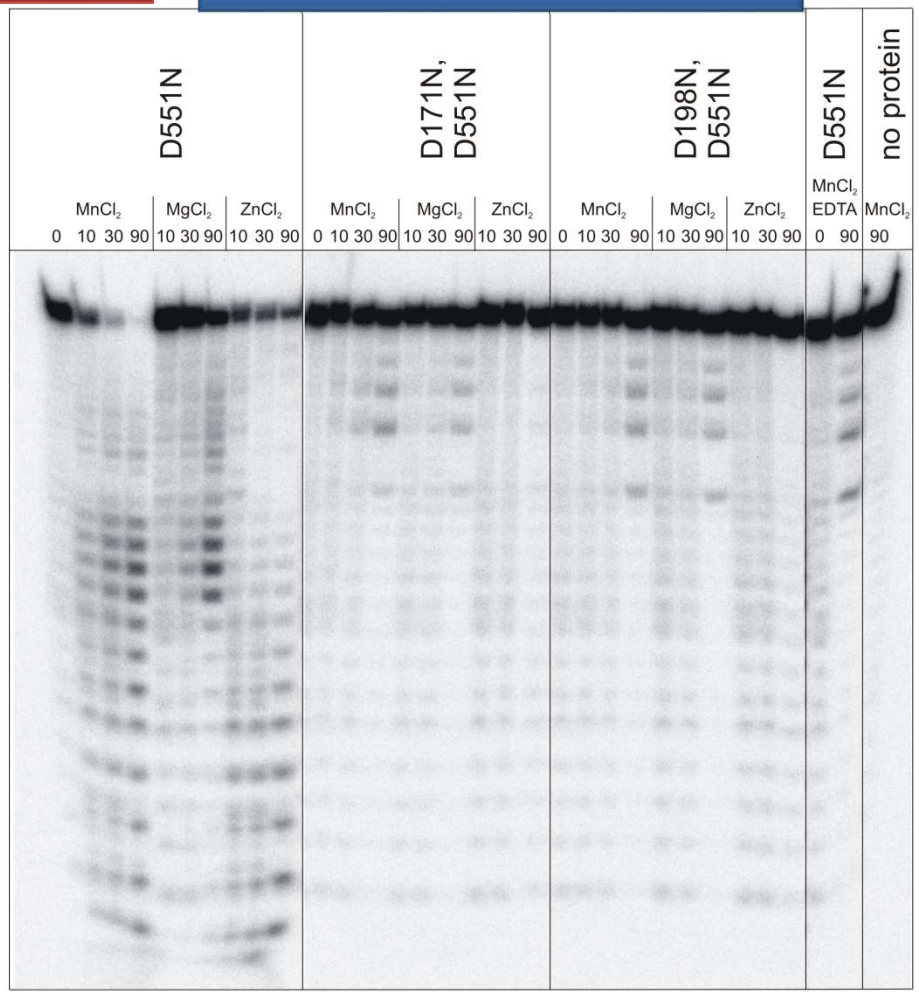
Obecność katalitycznych reszt asparaginianu w $Dis3_{PIN}$ jest konieczna dla degradacji RNA *in vitro*

analiza PAGE

substrat znakowany na końcu 5'

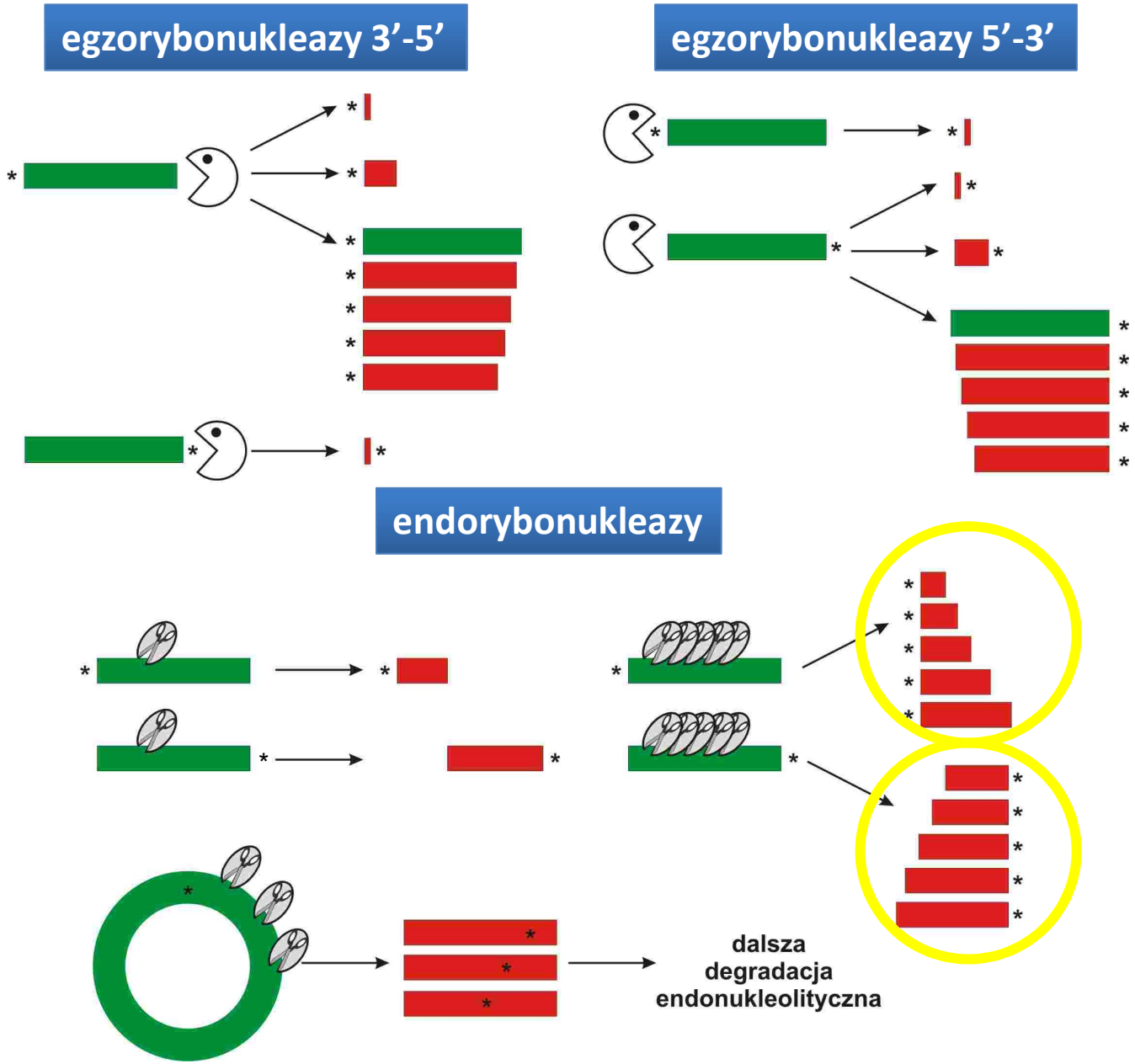


substrat znakowany na końcu 3'



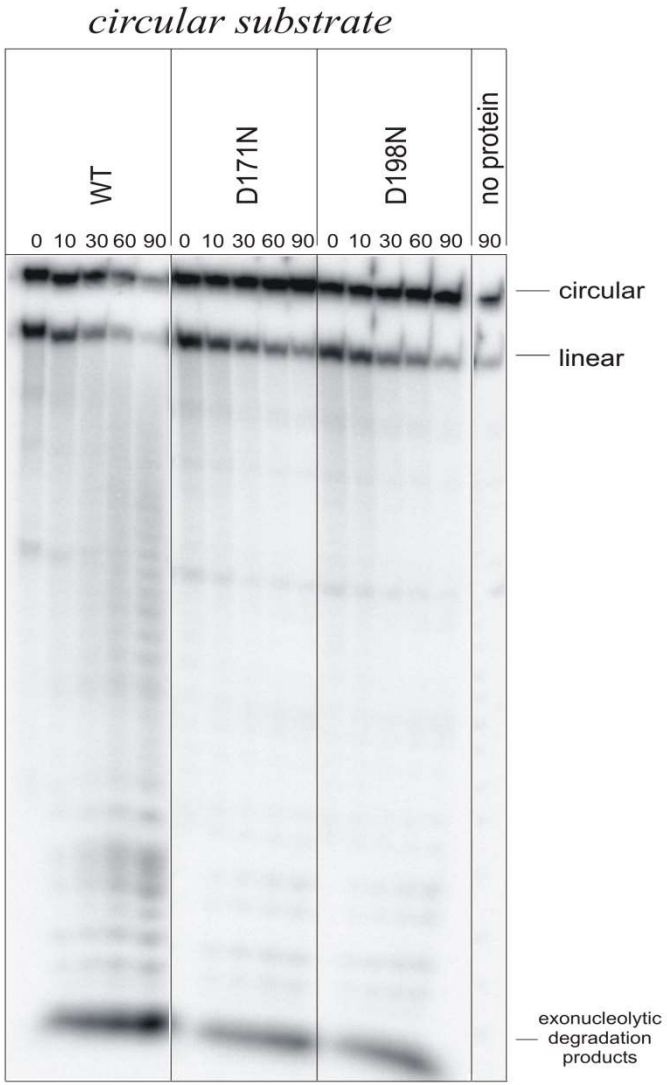
„drabinka" produktów degradacji w przypadku substratów znakowanych na różnych końcach sugeruje, że obserwujemy aktywność endorybonukleolityczną

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:

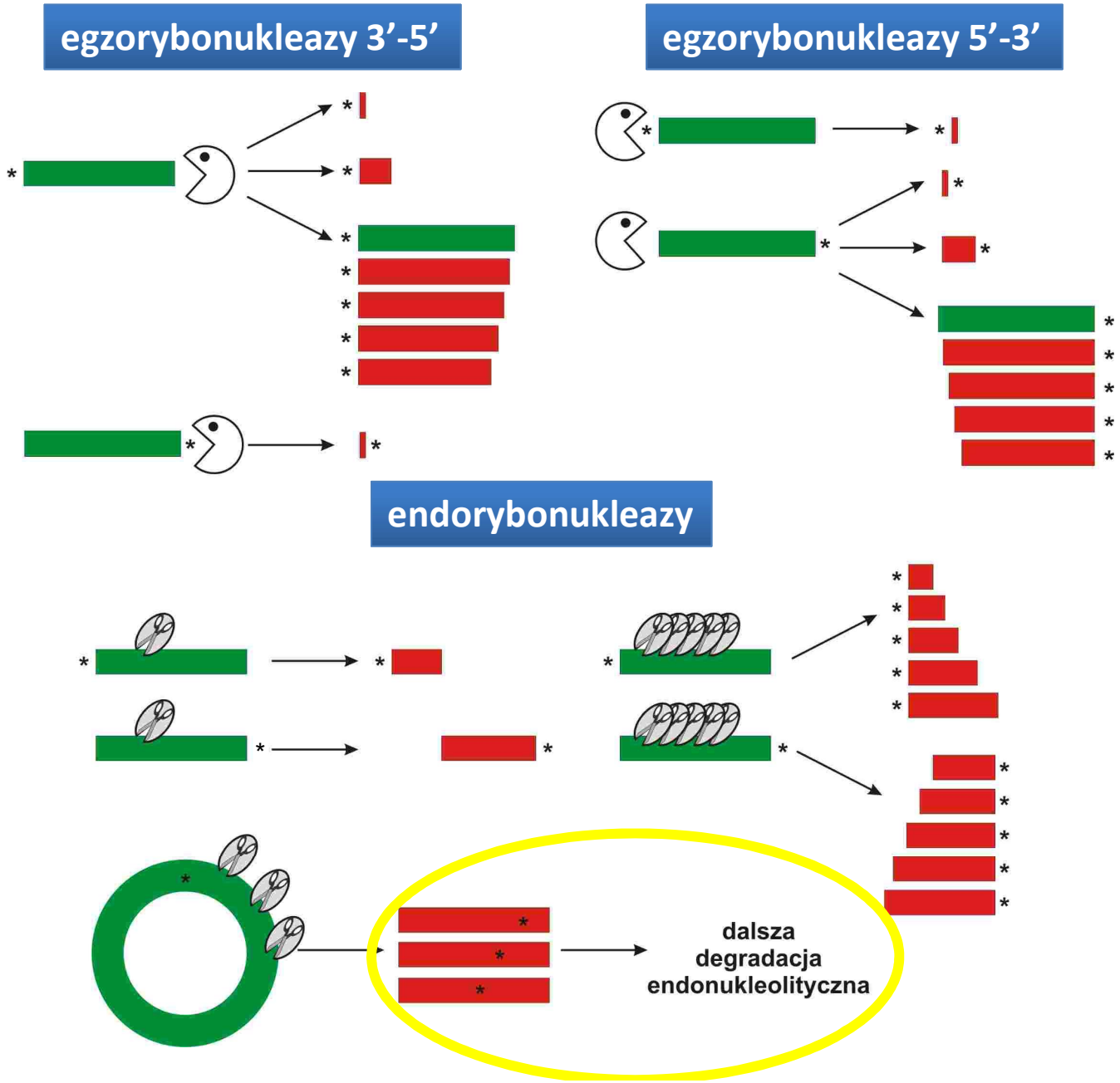
- znakowanych na końcu 5’
- znakowanych na końcu 3’
- kolistych

analiza PAGE

… co świadczy o tym, że jest endonukleazą !

Lebreton, Tomecki et al., *Nature* 2008

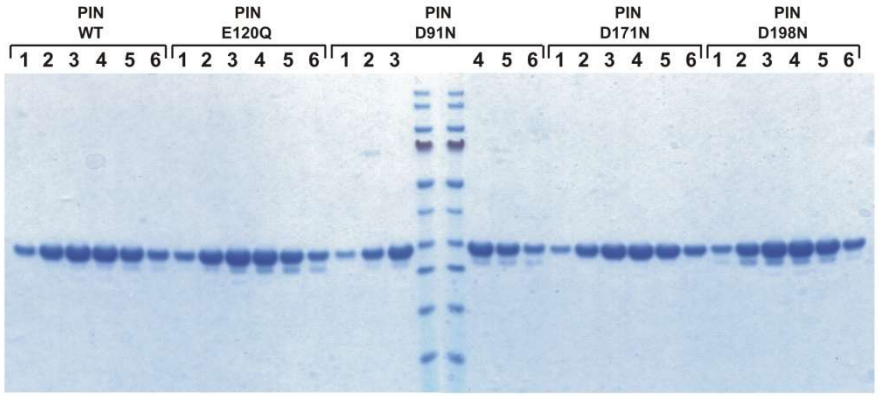
Degradacja substratu kolistego – tylko endonukleazy



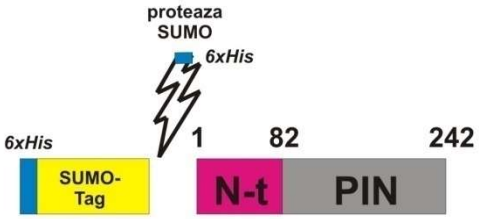
Czy aktywność endorybonukleolityczna domeny PIN jest zależna od reszty białka Dis3p?

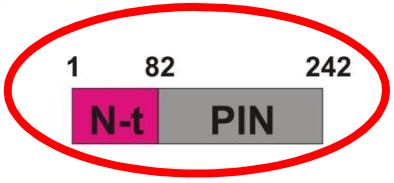
Konieczność oczyszczenia pojedynczej domeny białka i zbadania jej aktywności

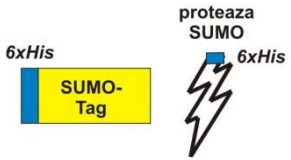
analizy SDS-PAGE

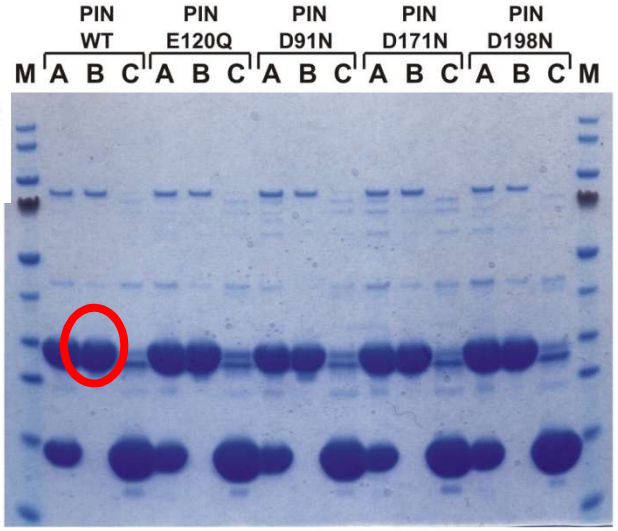


sączenie molekularne







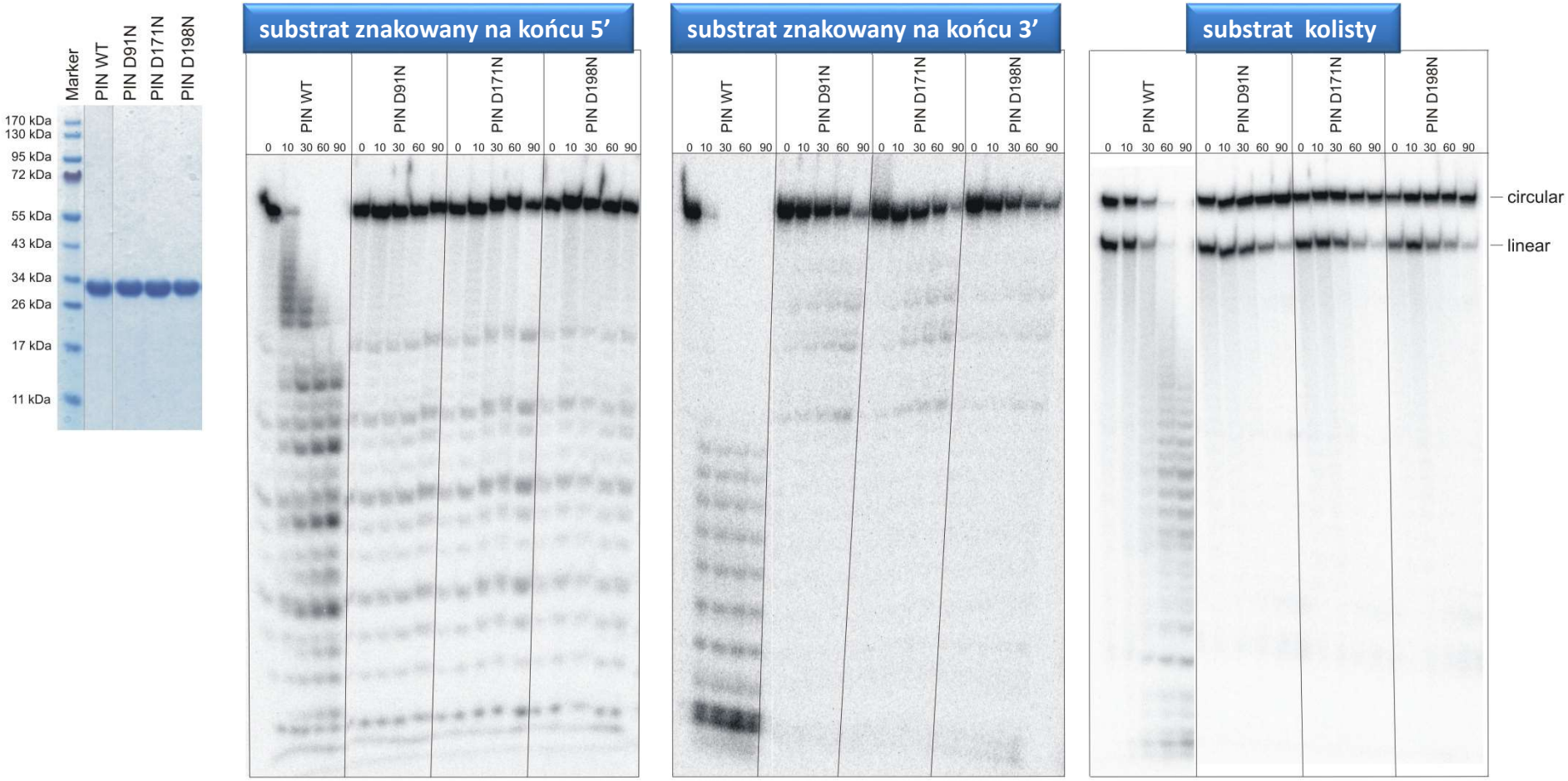


(A) eluat po 1. czyszczeniu na złożu niklowym i trawieniu proteazą SUMO

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

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

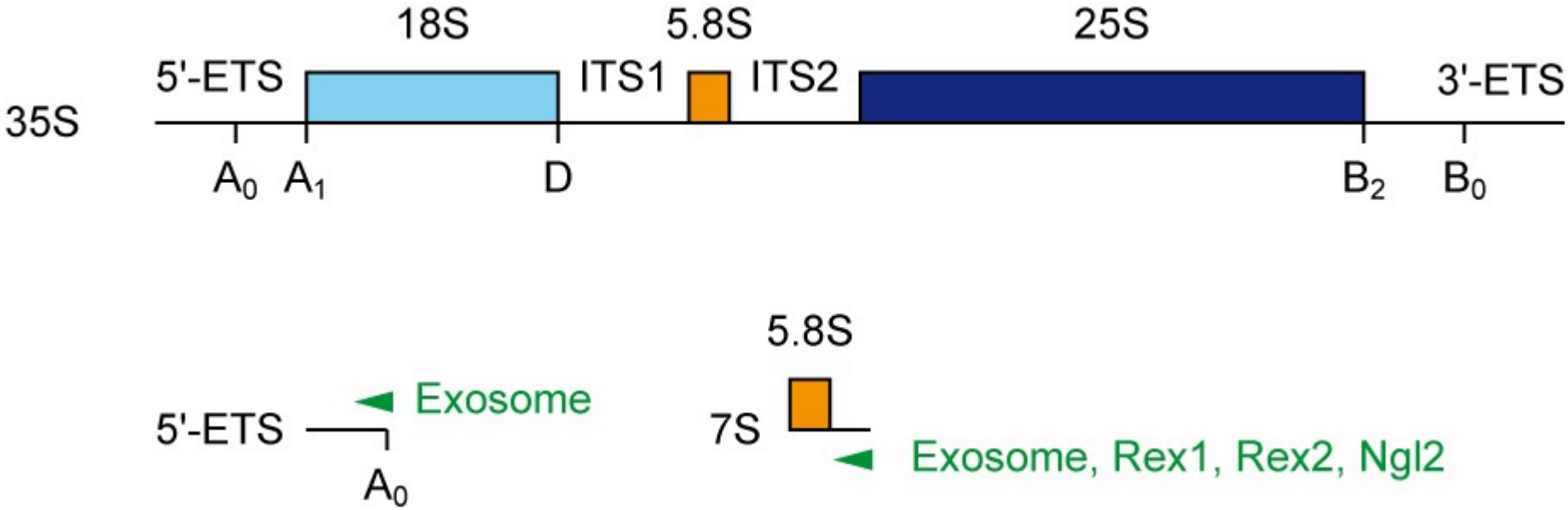
Sama domena PIN wykazuje aktywność endonukleolityczną, która jest znoszona przez mutacje konserwowanych reszt asparaginianu w centrum aktywnym



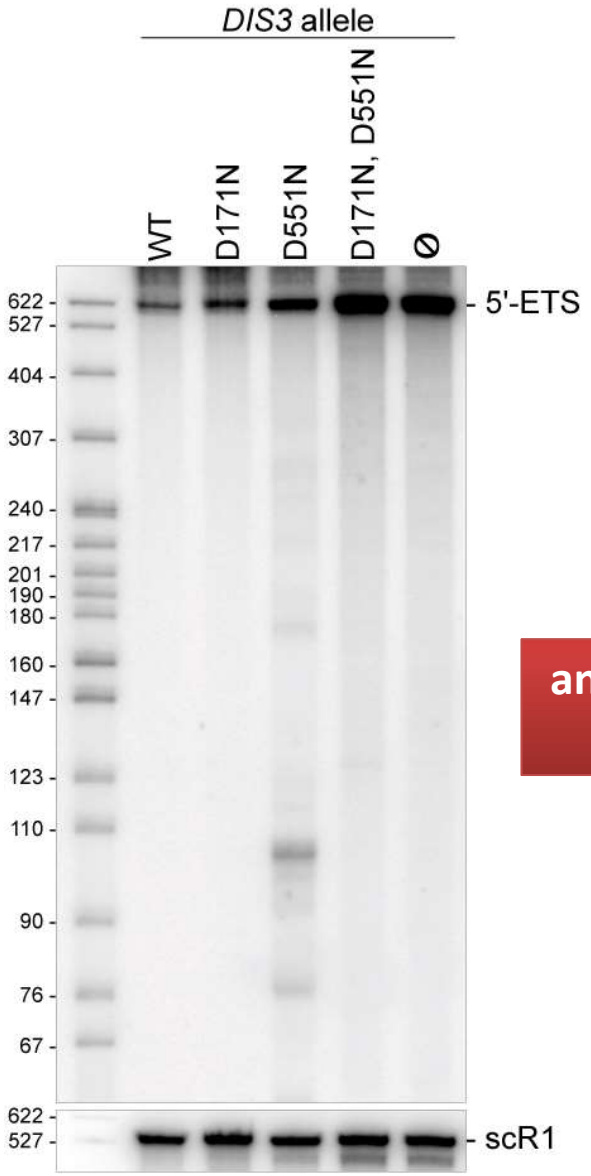
analiza PAGE

Lebreton, Tomecki et al., *Nature* 2008

Substraty egzosomu w ścieżce obróbki rRNA



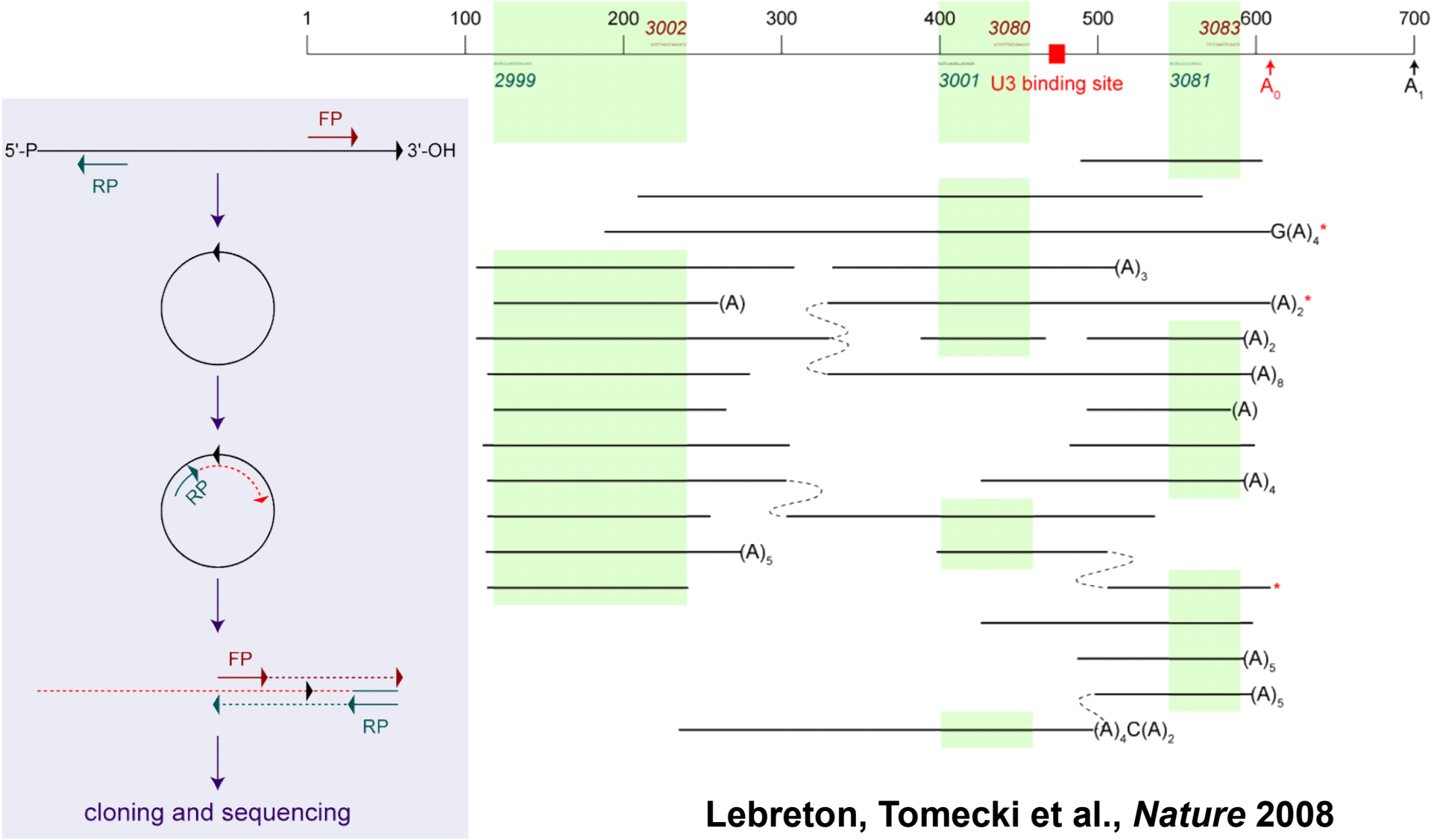
Wpływ mutacji w Dis3 na substrat egzosomu: 5’-ETS



analiza hybrydyzacyjna typu northern

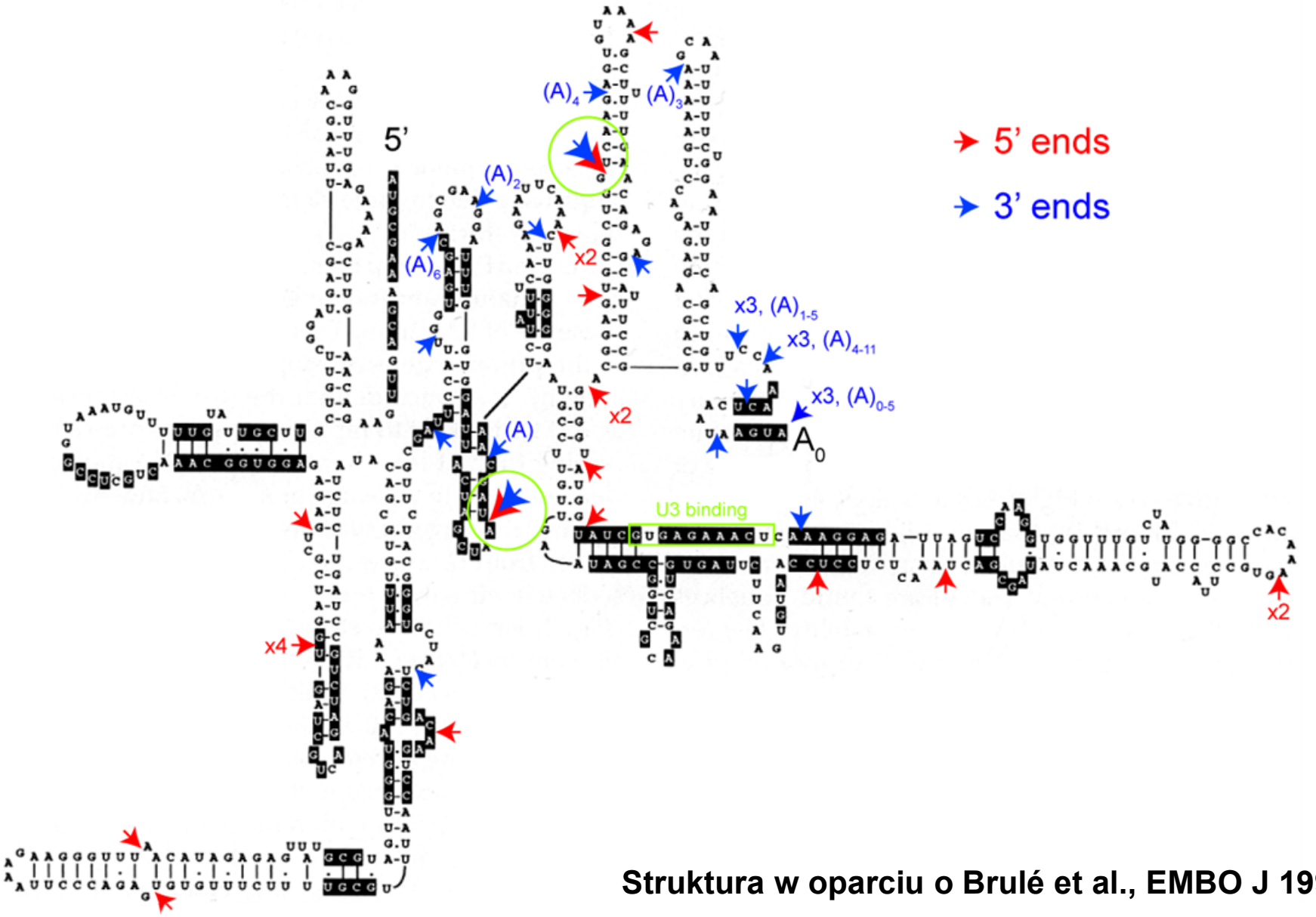
Lebreton, Tomecki et al., *Nature* 2008

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



Lebreton, Tomecki et al., *Nature* 2008

$Dis3_{PIN}$ wprowadza cięcia preferencyjnie w obrębie pętli



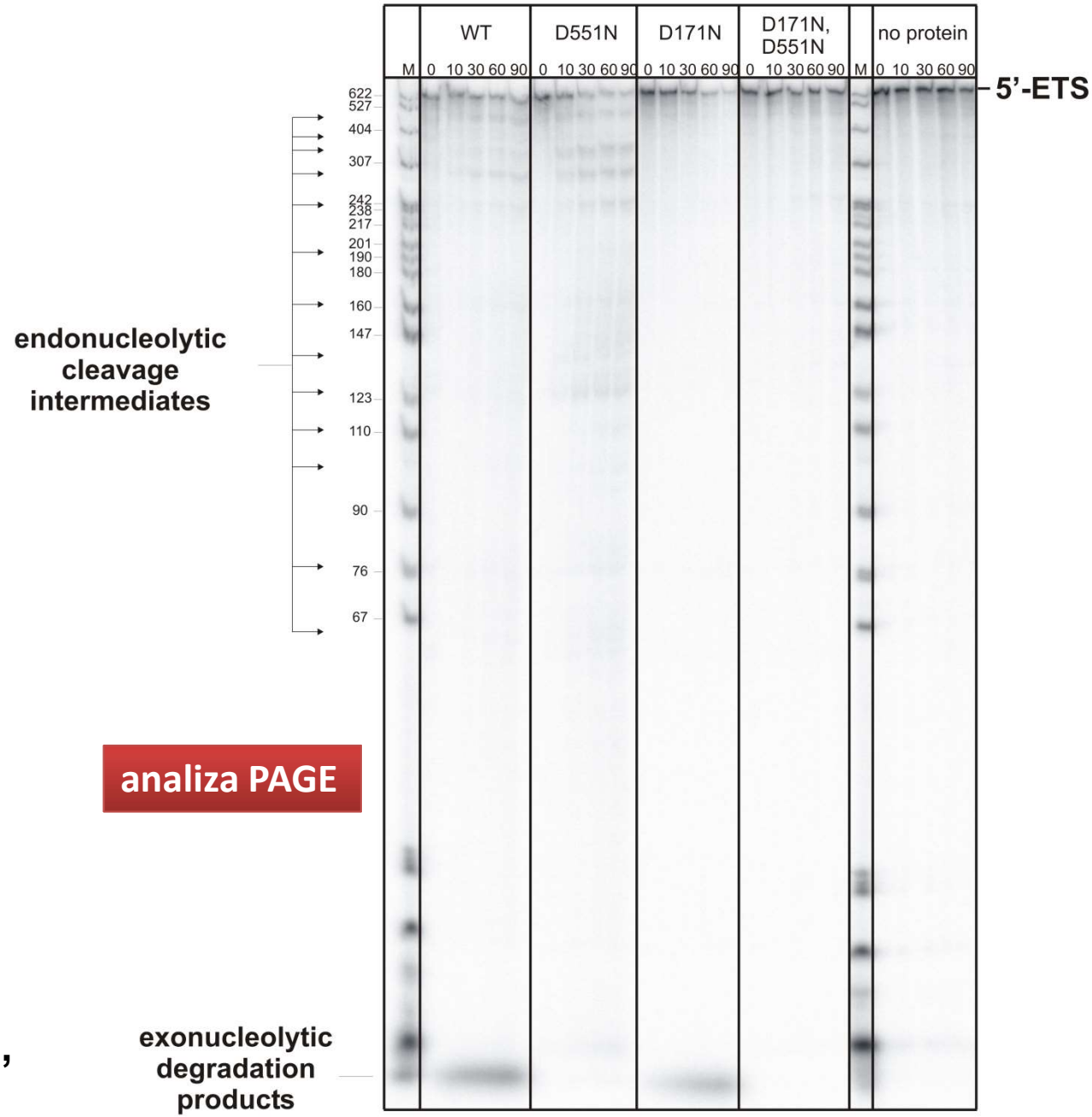
Struktura w oparciu o Brulé et al., EMBO J 1996

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

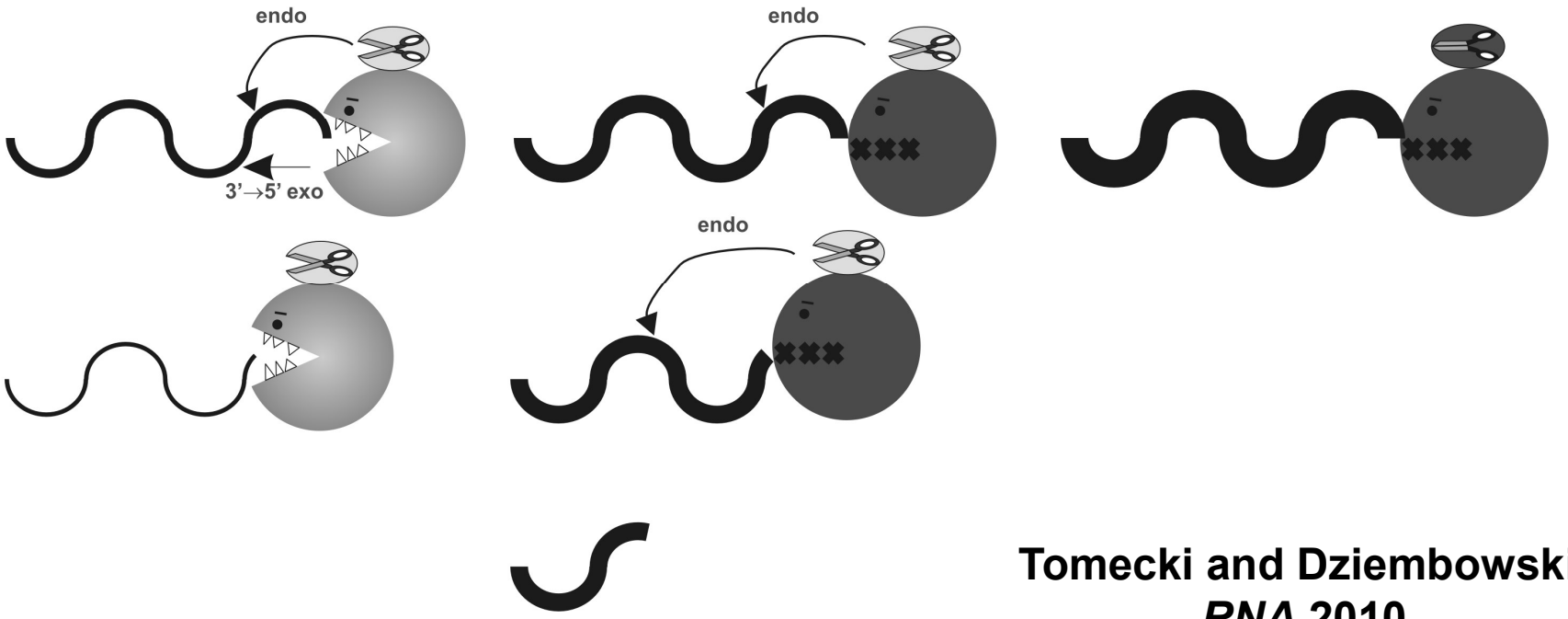
analiza PAGE



Lebreton, Tomecki et al., *Nature* 2008

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

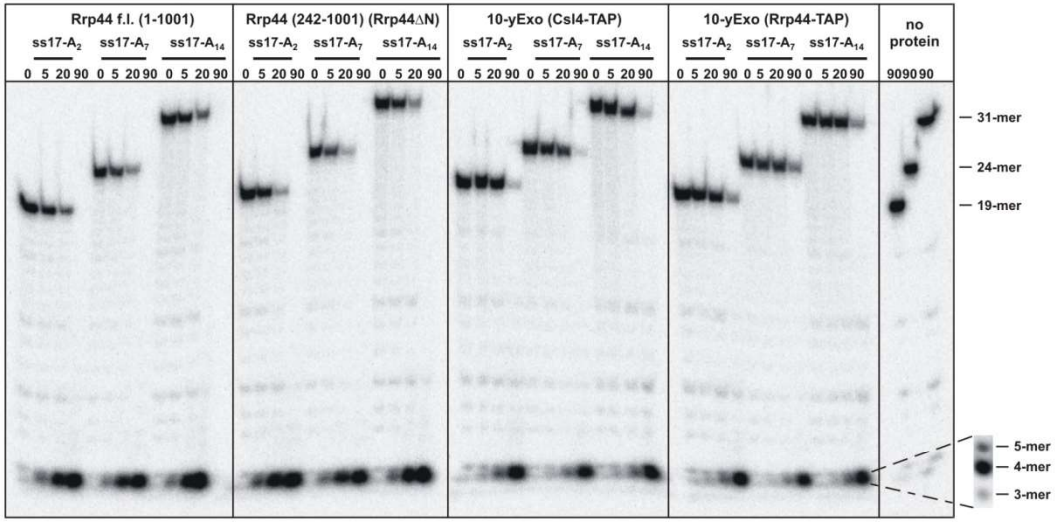
Aktywność endonukleolityczna PIN może pomagać egzonukleazom

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

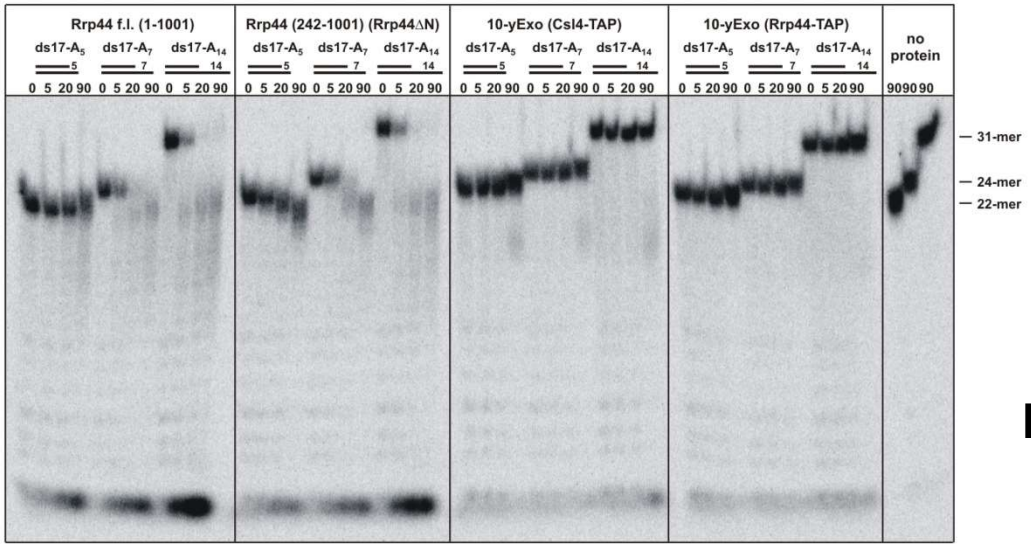
Aktywność Dis3p a aktywność egzosomu – o czym nam mówią takie porównania ?

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

substraty jednoniciowe



substraty dwuniciowe



analiza PAGE

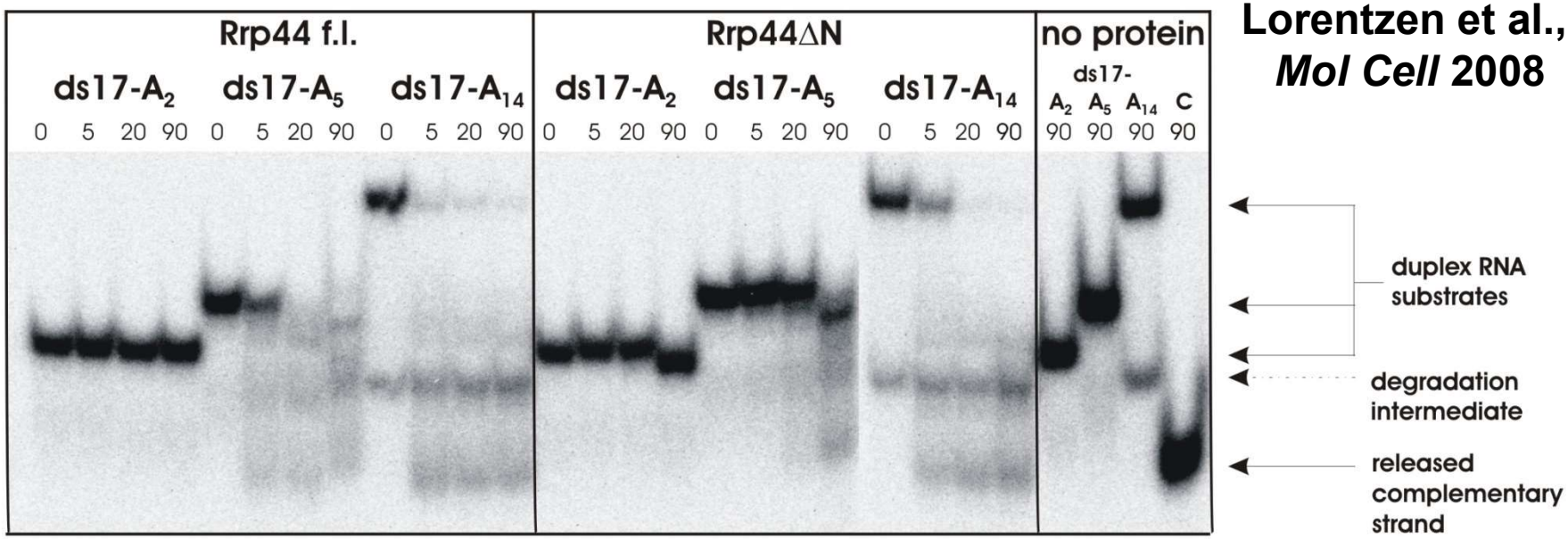
* ——————

Lorentzen et al., *Mol Cell* 2008

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

Czy Dis3p wykazuje własności helikazy RNA ?

substraty dwuniciowe



Lorentzen et al., *Mol Cell* 2008

elektroforeza produktów degradacji w natywnym żelu poliakrylamidowym

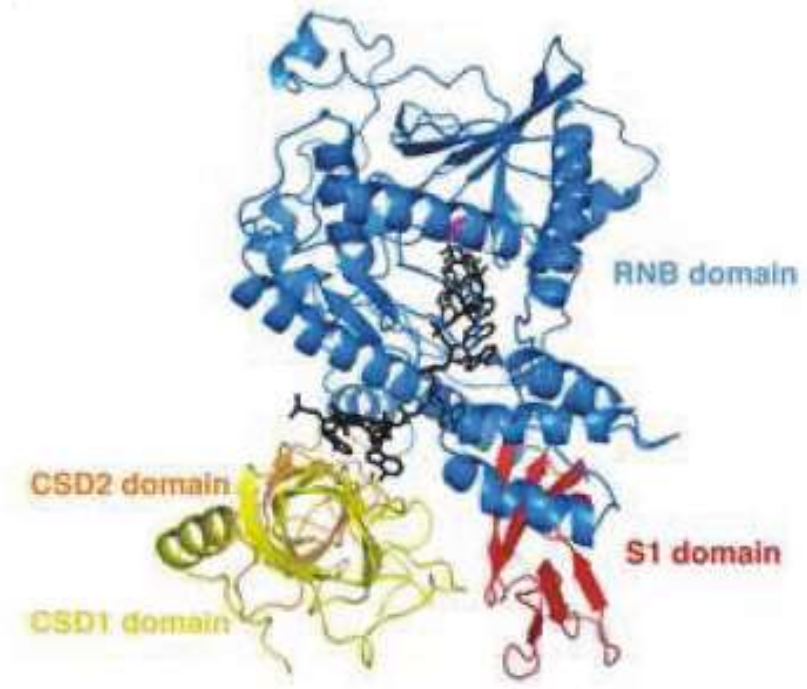
Dis3p ma zdolność rozplatania dwuniciowych substratów RNA

- ***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

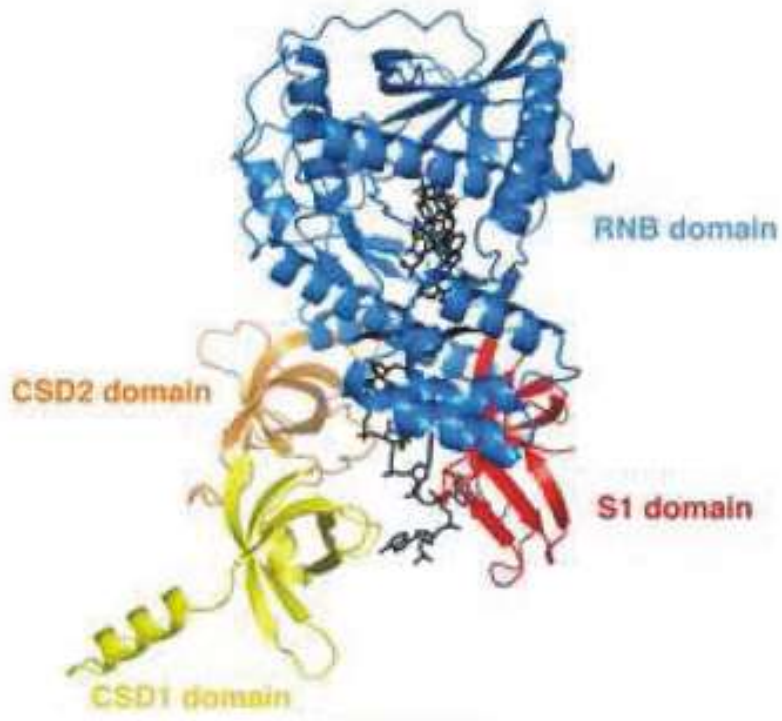
O tym, jak ważne jest zestawianie danych biochemicznych z informacjami strukturalnymi

Dis3p



degraduje dsRNA

RNase II

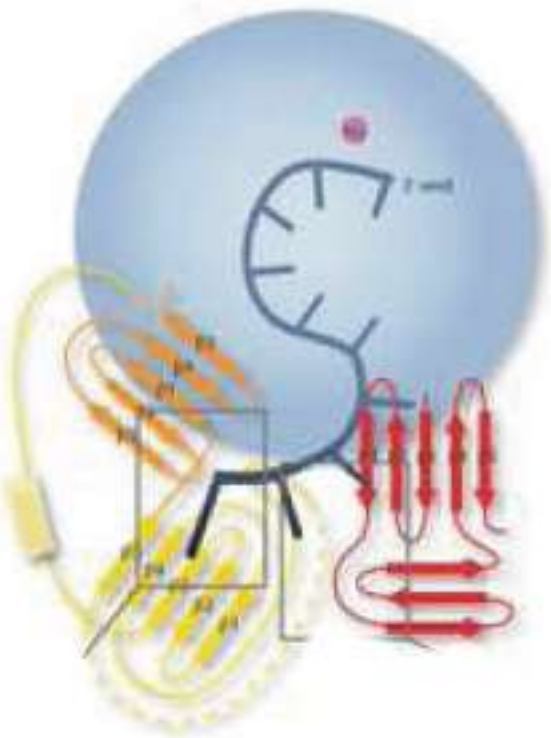


zatrzymuje się po napotkaniu struktury dwuniciowej

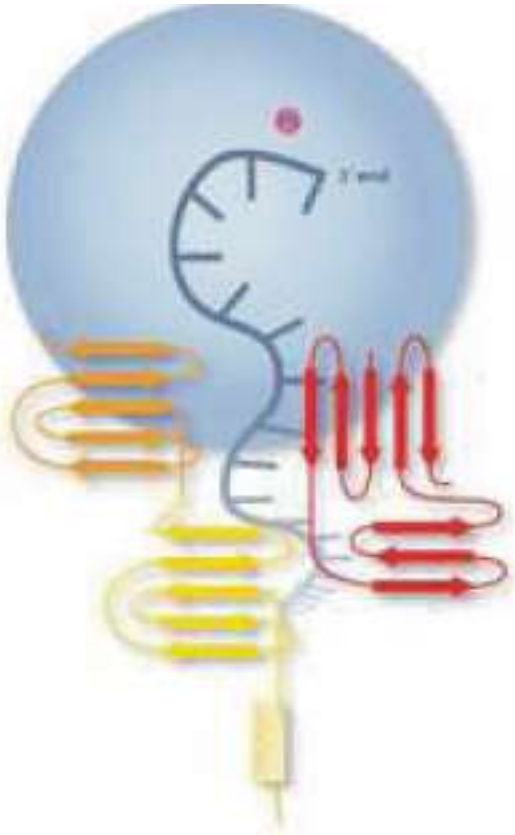
Lorentzen et al., *Mol Cell* 2008

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

Dis3p



RNase II

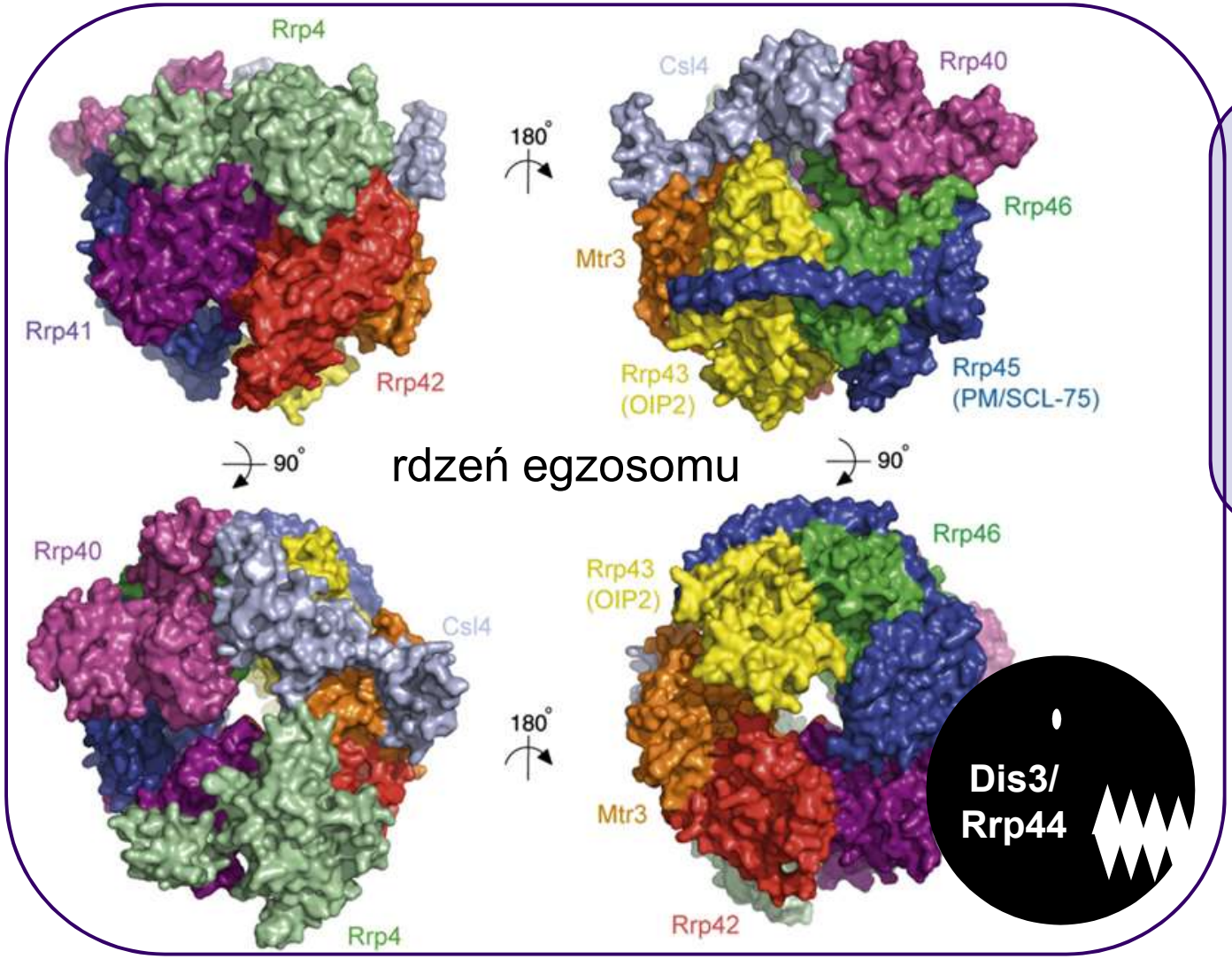


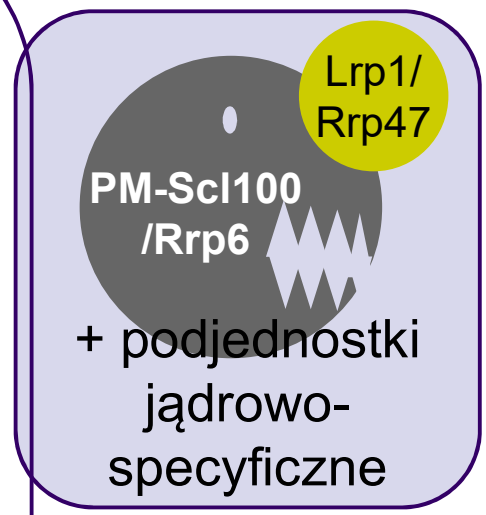
Lorentzen et al.,
***Mol Cell* 2008**

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 egzosomu tkwi w strukturze kompleksu ?

Gdzie lokalizuje się Dis3p względem pierścienia ?



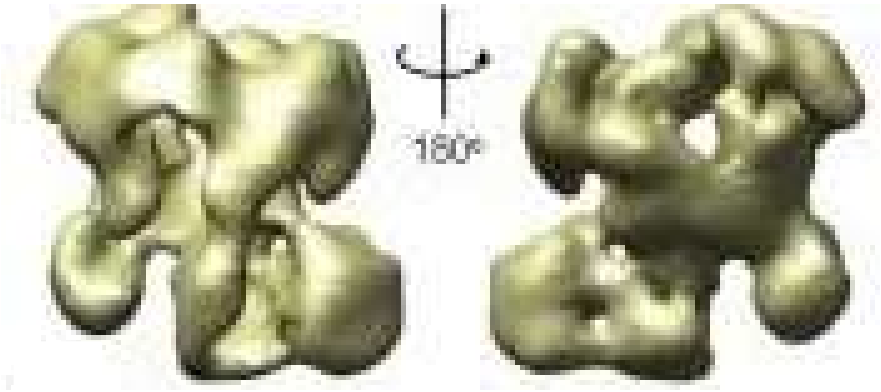


krystalizacja zrekonstytuowanego 9-składnikowego pierścienia egzosomu *H. sapiens*

wg Liu et al., *Cell* 2006; Hernandez et al., *EMBO Rep* 2006; Dziembowski et al., *NSMB* 2007

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

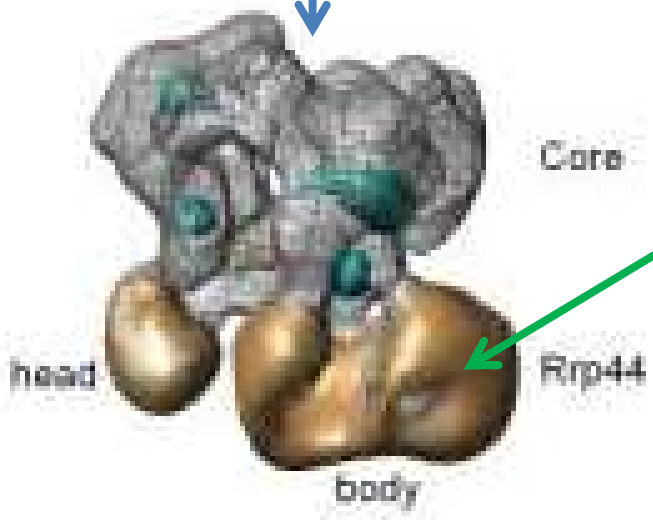
rdzeń z Dis3p



rdzeń bez Dis3p

wejście RNA do kanału ?

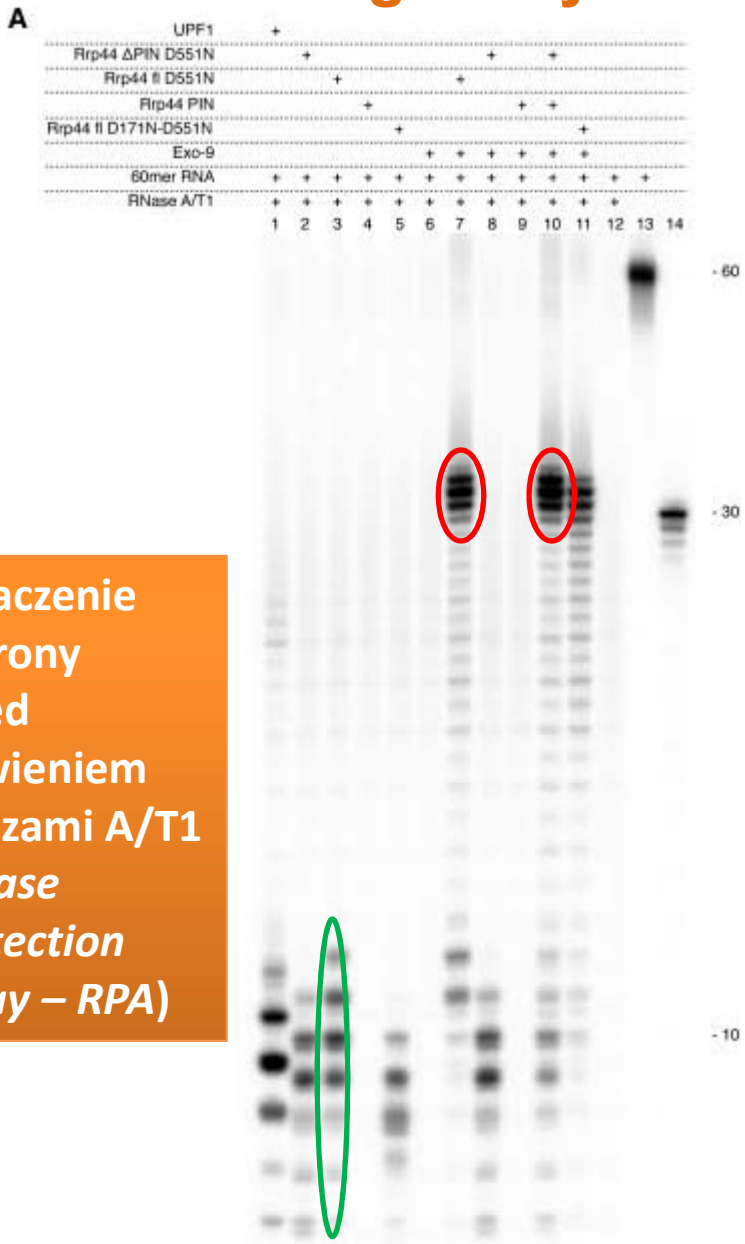
centrum aktywne Dis3p



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

Wang et al., *PNAS* 2007

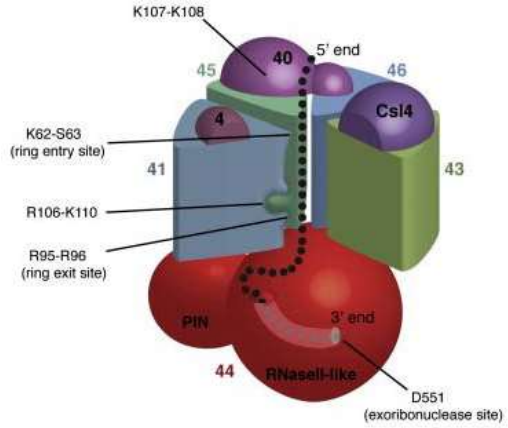
Wolne białko Dis3p i egzosom wiążą jednoniciowe fragmenty RNA bardzo różnej długości

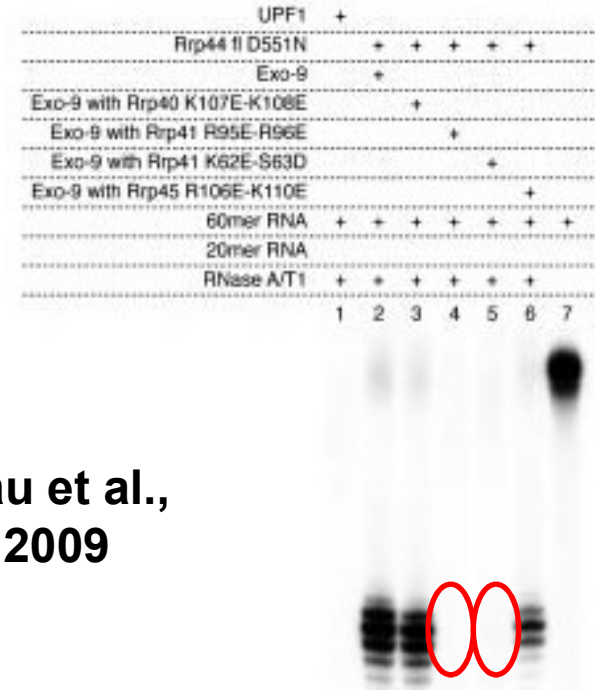


oznaczenie ochrony przed trawieniem RNazami A/T1 (*RNase protection assay – RPA*)

wejście do kanału

wyjście z kanału



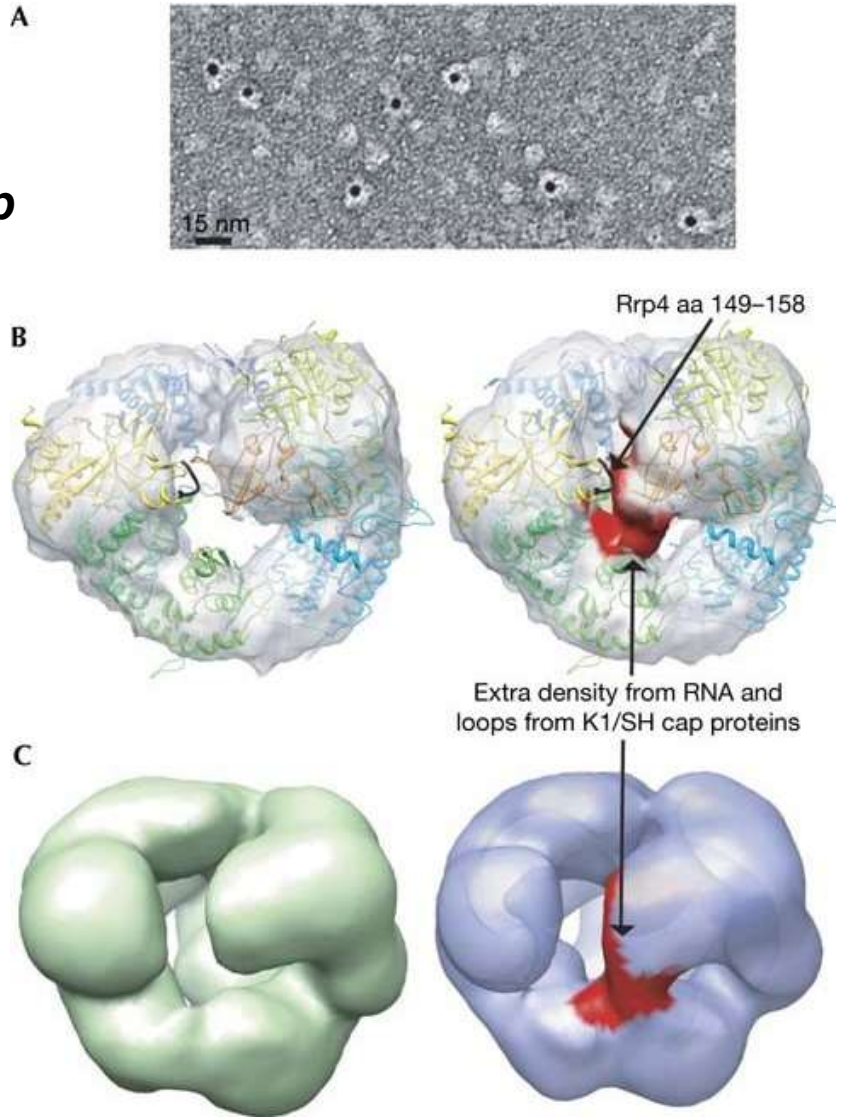


Bonneau et al., *Cell* 2009

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



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

widoki „z góry"

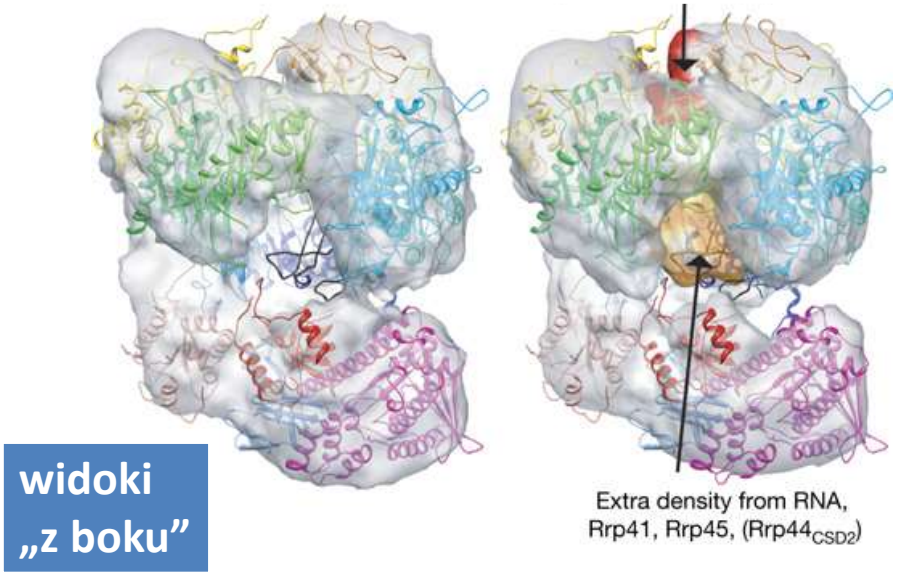
struktura rdzenia egzosomu rozwiązana przy użyciu kriomikroskopii elektronowej

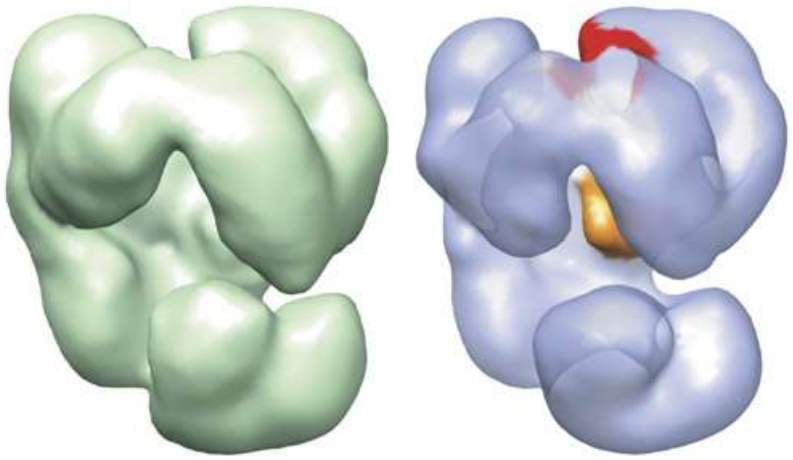
struktura rdzenia egzosomu rozwiązana przy użyciu mikroskopii elektronowej (*negative staining*)

struktura „apo" **struktura z RNA**

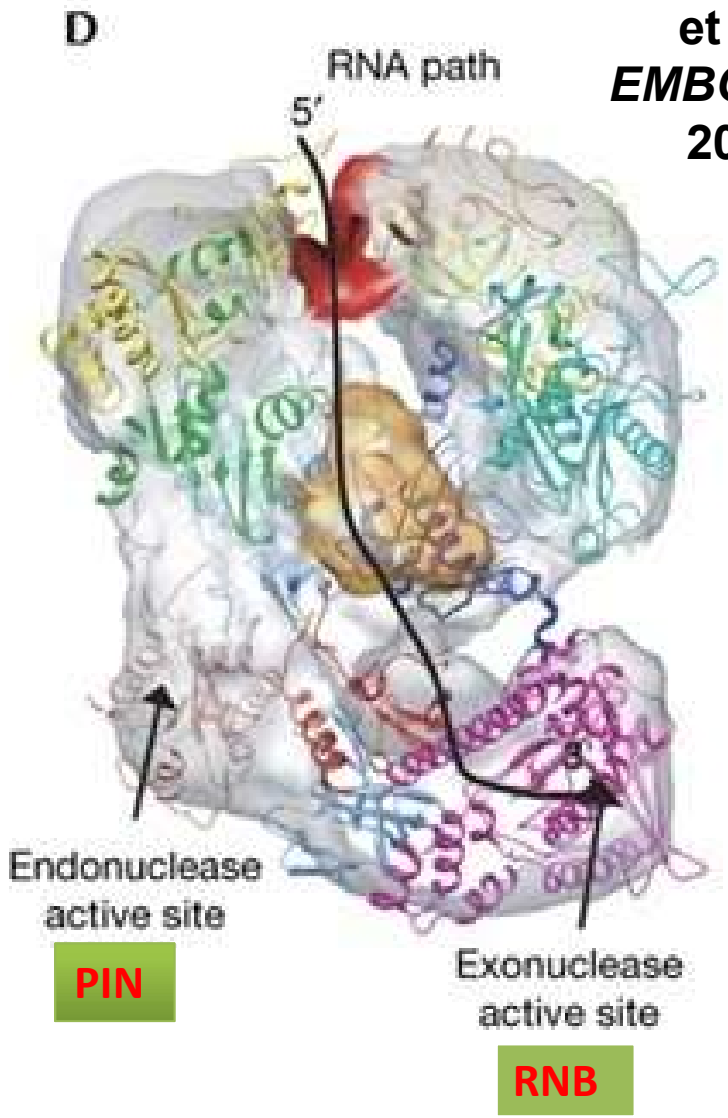
Czy ta droga jest wykorzystywana zarówno w przypadku kierowania substratu do domeny RNB, jak i do domeny PIN ?

Malet et al., *EMBO Rep* 2010

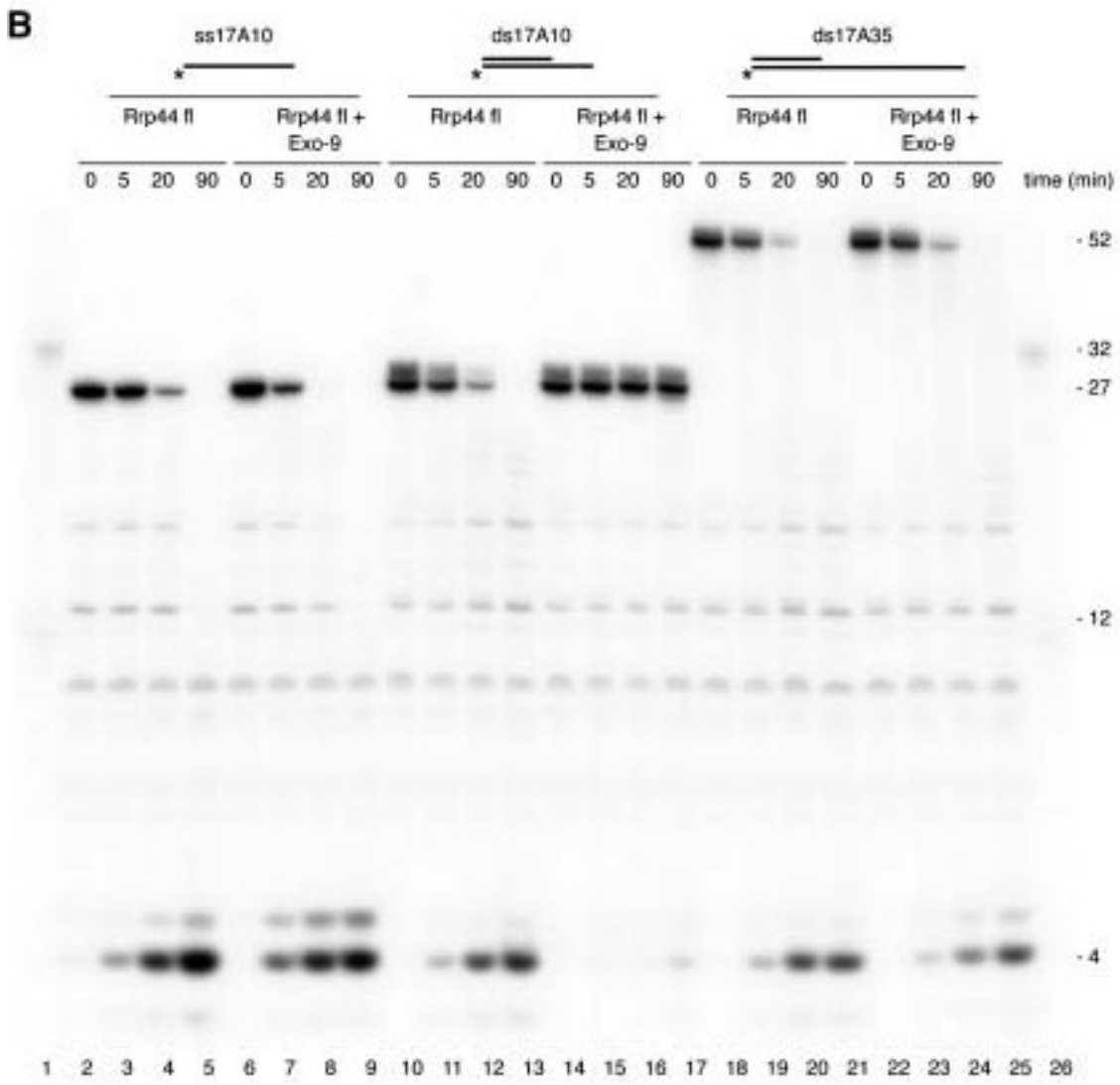




struktura „apo” struktura z RNA



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

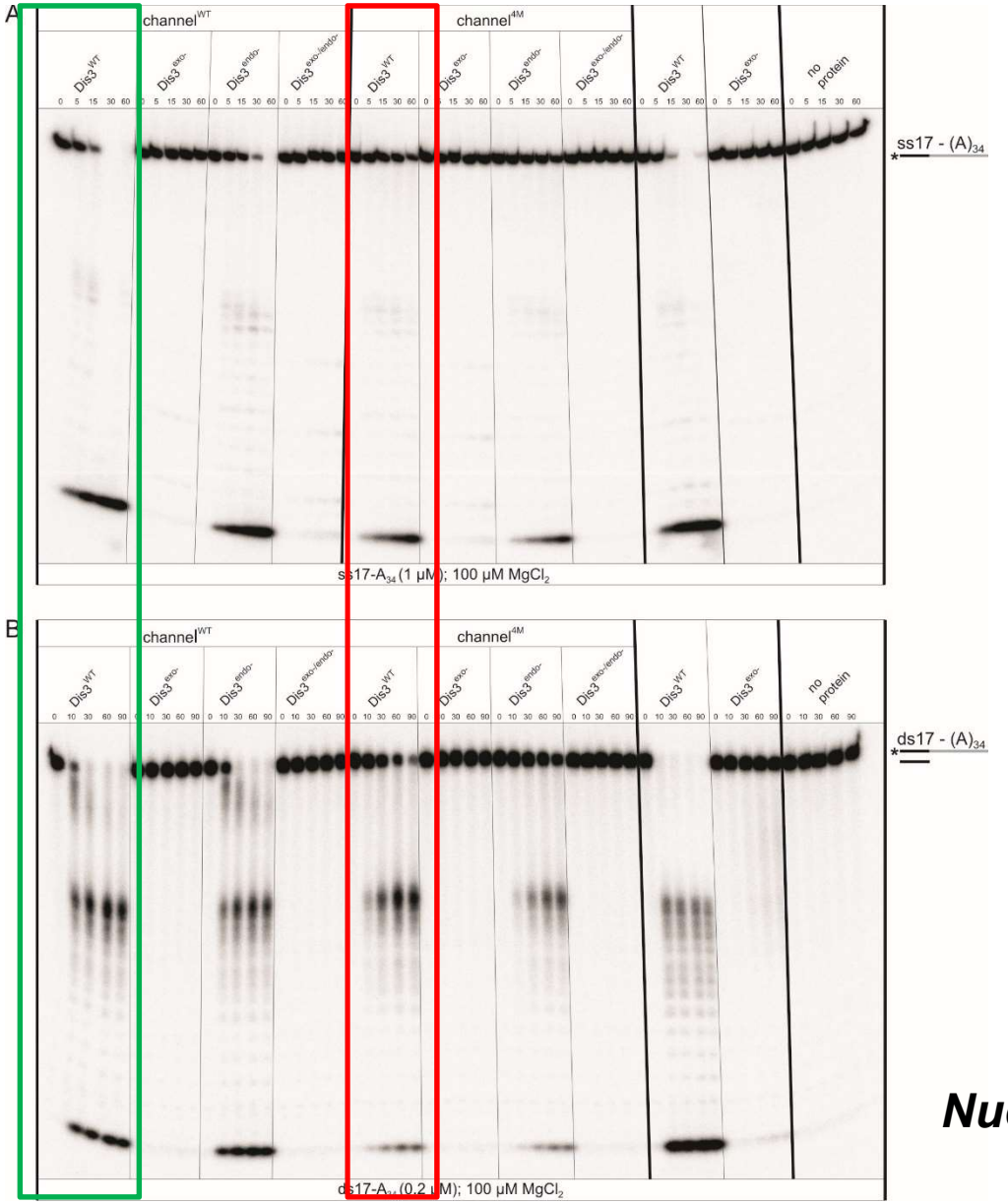


analiza PAGE

Bonneau et al., *Cell* 2009

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

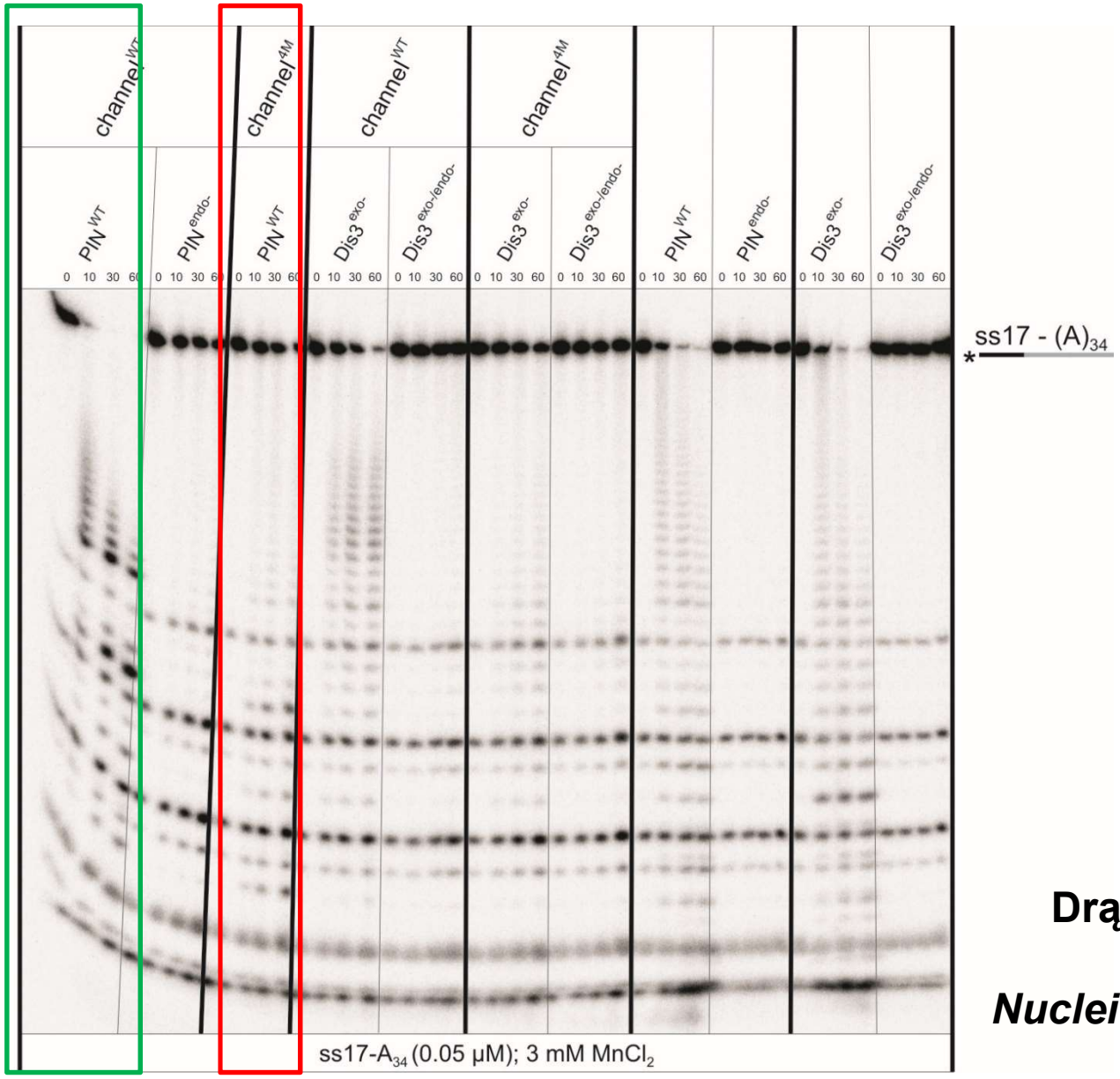
analizy PAGE



Drążkowska et al., *Nucleic Acids Res 2013*

Zablokowanie kanału hamuje również aktywność endonukleolityczną domeny PIN !

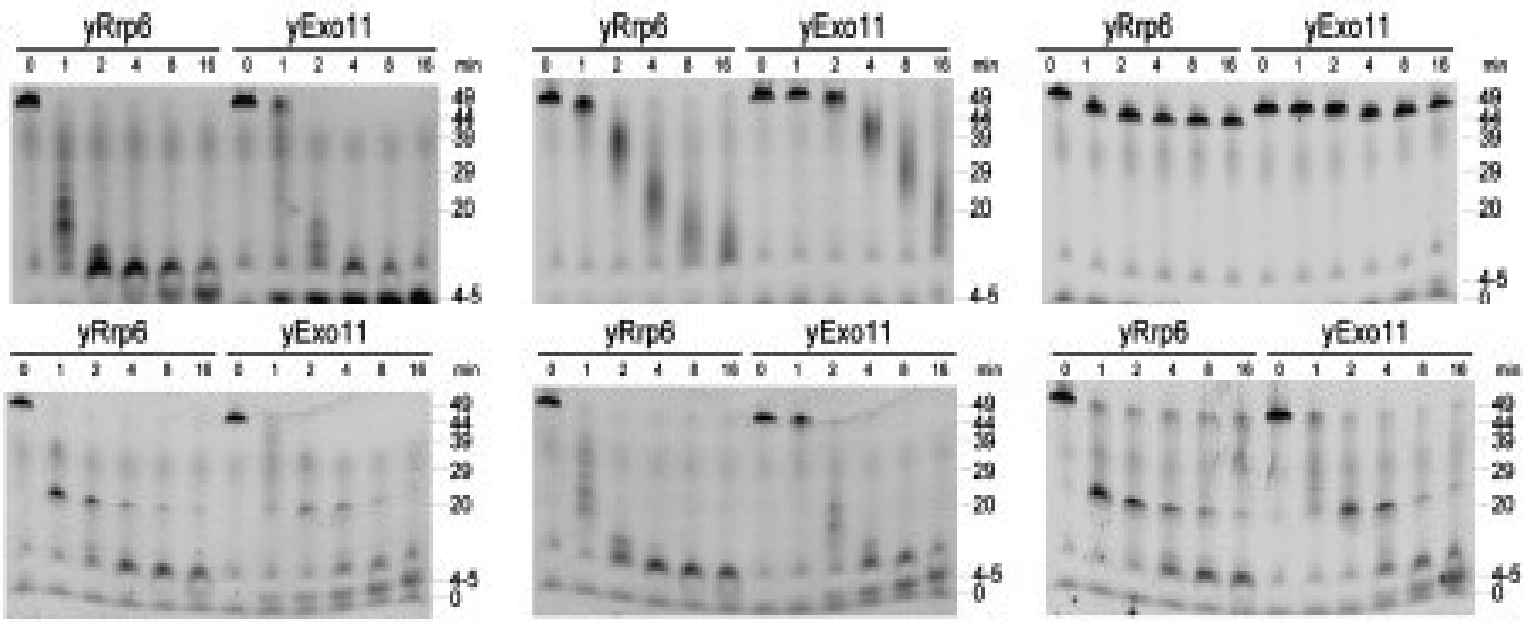
analiza PAGE



Drążkowska 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 sub-kompleksów – 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 ?