

Η Ερευνητική ομάδα DarkMatters μελετάει:

Την Σκοτεινή ύλη της Ζωής

- Το δίκλωνο RNA, τα εξωσώματα, τα ρυθμιστικά RNAs, τις στρεσογόνες καταστάσεις, εξωκυττάρια και τα ενδοκυττάρια παραπροϊόντα του μεταβολισμού.

Τη Μοριακή Βιολογία και Γενετική της

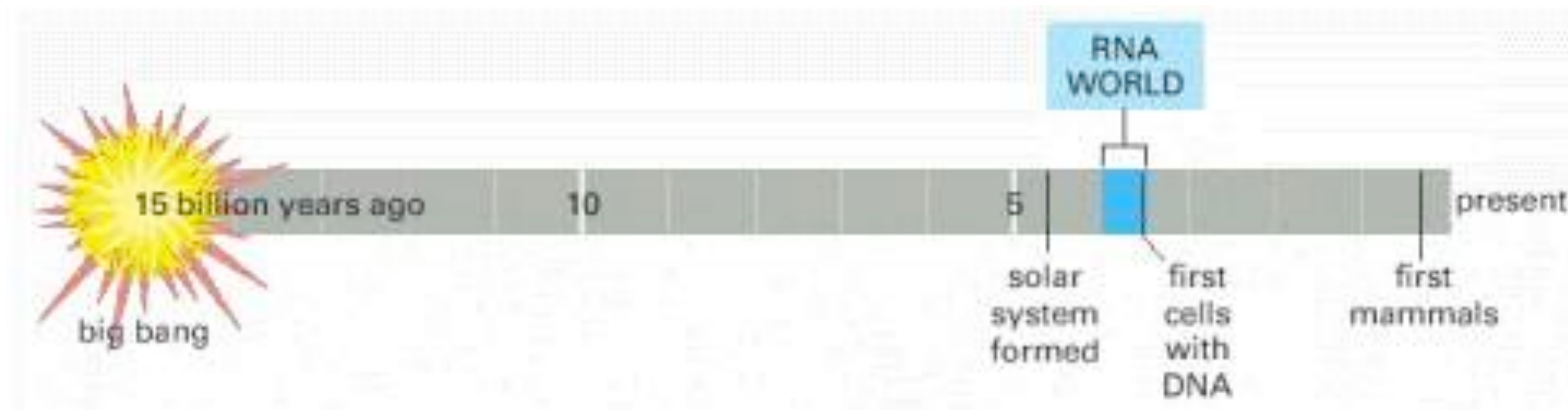
- **Exosomics** - Υψηλής-απόδοσης ανάλυσης των μοριακών και γενετικών προφίλ εξωσωμάτων σε βιολογικά υγρά (Μητρικό γάλα vs ζωικών γάλατων).
- **Stressomics** - Υψηλής-απόδοσης ανάλυσης της Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του Στρες.
- **RNA-omics** - Υψηλής-απόδοσης ανάλυση μονόκλωνων και δικλωνων δομών RNA.
- **Bioinformatics** - Υψηλής-απόδοσης υπολογιστική και πολυδιάστατη ανάλυση ρυθμιστικών RNAs (μακρών μη-κωδικοποιών RNAs; lncRNAs, μικρών RNAs (miRNAs), μη-κωδικοποιών περιοχών (υποκινητές, ενισχυτές, μετάθετα στοιχεία και επαναλήψεις).

Ύλη και τρόπος βαθμολόγησης

- Κεφάλαια από το **1. Genes VIII (Lewin)**, **2. Βιοπληροφορική και Λειτουργική Γονιδιωματική (Pevsner)** και **3. βιβλιογραφία**
- Εξετάσεις πολλαπλών ερωτήσεων (**70%-100%**) και μία εργασία (προαιρετική) (**30%**).
- Η Εργασία θα αφορά την παρουσίαση μιας δημοσίευσης με επίκεντρο τη σημασία των μη-κωδικοποιών RNAs (θα σας προταθούν πρόσφατοι τίτλοι δημοσιεύσεων).

Ο Κόσμος του RNA

- RNA has been the first biomacromolecule on Earth, appearing during pre-cellular evolution of life



The Ancient RNA World hypothesis

Antonios Giannakakis, PhD
Computational Molecular Biology

Τι είναι ζωή?



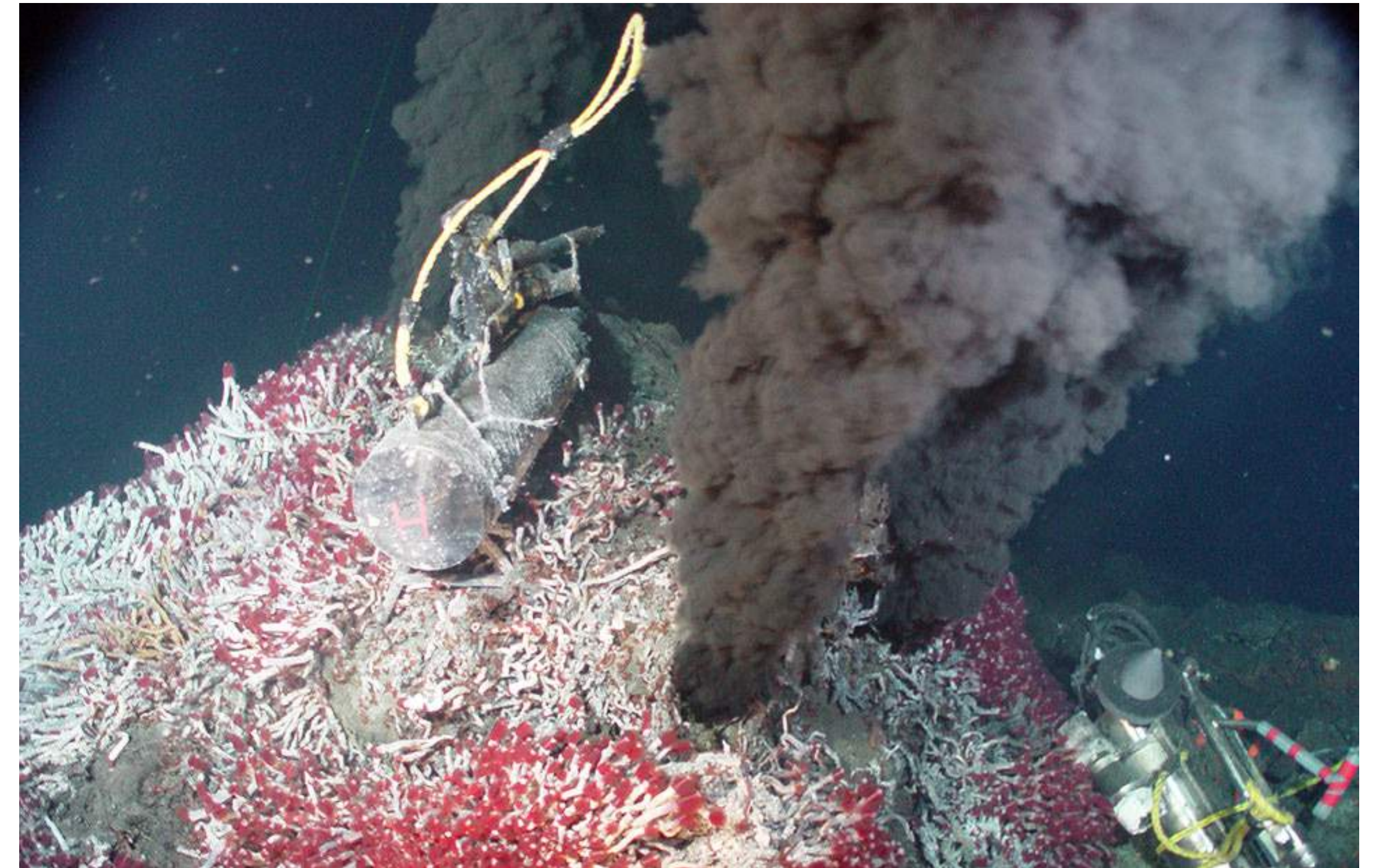
- Ο ορισμός από την NASA είναι: «**Η ζωή είναι ένα αυτοσυντηρούμενο χημικό σύστημα ικανό για τη Δαρβινική εξέλιξη**».
- Η δαρβινική εξέλιξη εξαρτάται από την επιλεκτική διάδοση κληρονομήσιμων πληροφοριών. Ο Κάρολος Δαρβίνος περιέγραψε την εξέλιξη ως «κληρονομικότητα με τροποποίηση».
- Η απόκλιση της πληροφορίας, το μέγεθος της και η αξιόπιστη αντιγραφή/μετάδοση της (οι μεταβλητές της συνάρτησης που τροφοδοτούν της εξέλιξη της ζωής)
- Έχει νοημοσύνη εφόσον βασίζεται στην πληροφορία;
- Χρειάζεται ενέργεια;
- Έχει διαφορά από τους ζωντανούς οργανισμούς;

Πως δημιουργήθηκε;

- ~5 % **συνήθης ύλη**, ~25 % **σκοτεινή ύλη** και ~70% **σκοτεινή ενέργεια**.
 - > 30 % είναι ύλη εκ της οποίας η πλειοψηφία είναι σκοτεινή ύλη.
- Η **συνήθης ύλη** διακρίνεται σε ανόργανη, οργανική και ζωντανή.
- Η Ζωή βασίζεται στην οργανική ύλη αλλά δεν περιλαμβάνει αποκλειστικά ζωντανούς οργανισμούς (που μέχρι στιγμής ξέρουμε ότι υπάρχουν μόνο στη Γη).
- Οι ζωντανοί οργανισμοί αποτελούνται από κυτταρικές μορφές ζωής (αυτόνομοι) αλλά και μη-κυτταρικές μορφές (μή-αυτόνομης) ζωής, με τους ιούς (**viruses**) και ιοειδή (**viroids**) να κατέχουν προεξάρχοντα θέση

Η ζωή χρειάζεται ενέργεια

- Η ερώτηση σχετικά με τις πηγές ενέργειας δεν έχει απαντηθεί, δεν αναφέρεται καν από τον ορισμό της ζωής της NASA παραπάνω, ωστόσο οποιαδήποτε διαδικασία αναπαραγωγής θα απαιτούσε παροχή ενέργειας. Η ενέργεια κατά την πρώιμη εξέλιξη ήταν απίθανο να παρασχεθεί από τον Ήλιο, καθώς το ηλιακό φως μπορεί να φτάσει μόνο σε περίπου 200 μέτρα κάτω από την επιφάνεια της θάλασσας.
- Η ζωή, ωστόσο, πιθανότατα ξεκίνησε από υδροθερμικές οπές βαθιά στον ωκεανό όπου το φως του ήλιου δεν μπορεί να φτάσει, όπου, για παράδειγμα, είναι διαθέσιμη η γεωθερμική ενέργεια. Προσφέρουν ισχυρές διαβαθμίσεις θερμοκρασίας, υψηλές πιέσεις, στοιχεία που λειτουργούν ως καταλύτες και ποικίλα δομικά στοιχεία της ζωής. Επιπλέον, το παγωμένο νερό επιτρέπει σε προσαρμοσμένα στο κρύο ριβοένζυμα να καταλύουν μάλλον μακρύ RNA in vitro
- Είναι πιθανό ότι τα δομικά στοιχεία σύνθετων βιοπολυμερών όπως το RNA προέρχονται από συγκεκριμένες περιοχές στον ωκεανό της πρώιμης Γης, όπως υδροθερμικές οπές που παρέχουν μια πηγή ενέργειας (δηλαδή θερμότητα) καθώς και τους απαραίτητους χημικούς πρόδρομους, στοιχεία και μεταλλικά ιόντα που απαιτούνται για την κατάλυση. **Αυτά τα τοπικά «κοιλώματα/κόγχες» (niches) μπορεί να λειτουργούσαν ως «μικρές ζεστές λίμνες» του Δαρβίνου αυξάνοντας τη συγκέντρωση των αντιδραστηρίων.**



Σε ένα μείγμα νερού-πάγου και ηφαιστιακών πετρωμάτων επιλέχθηκε ένα ριβοένζυμο (ένα μη κωδικοποιό RNA), το οποίο ήταν σε θέση να πολυμερίσει ένα προϊόν του ίδιου μήκους με εκείνο, λειτουργώντας ως αντίγραφο RNA, το επόμενο σημαντικό βήμα για την προέλευση της ζωής.

Εξέλιξη με βάση το RNA

- Κατά την πρώιμη ιστορία της ζωής στη Γη, πιστεύεται ότι το RNA χρησίμευσε τόσο ως γενετικό υλικό όσο και ως παράγοντας εκφραζόμενης λειτουργίας σε μια εποχή που συνήθως αναφέρεται ως «κόσμος του RNA».
- Η ευελιξία των λειτουργιών του RNA στηρίζει υποθέσεις σχετικά με την προέλευση και την πρώιμη εξέλιξη της ζωής.
- Τέτοιες υποθέσεις για έναν «κόσμο RNA» - μια αρχέγονη βιολογία που επικεντρώνεται στο RNA ως το κύριο βιομόριο - συμφωνούν : **1)** με τον ουσιαστικό ρόλο της κατάλυσης RNA στη σημερινή βιολογία (Cech, 2000; Goldman and Kacar, 2021; Nissen et al. , 2000; Wilkinson et al., 2020) **2)** την ανακάλυψη πολλαπλών συνθετικών/μεταβολικών «προ»βιοτικών οδών που οδηγούν σε αρκετά από τα νουκλεοτίδια RNA (και DNA) (Becker et al., 2019; Kim et al., 2020; Patel et al., 2015; Powner et al., 2009· Xu et al., 2020) και **3)** την πρόοδο τόσο στον μη ενζυματικό όσο και στον καταλυόμενο από RNA πολυμερισμό του RNA και ορισμένων από τα ανάλογα του. (Deck et al., 2011; Hassenkam et al., 2020; Prywes et al., 2016; Rajamani et al., 2008; Sosson et al., 2019; Sponer et al., 2021; Wachowius and Holliger, 2019; Zhang et al., 2020; Zhou et al., 2020, Papastavrou et al., 2024)

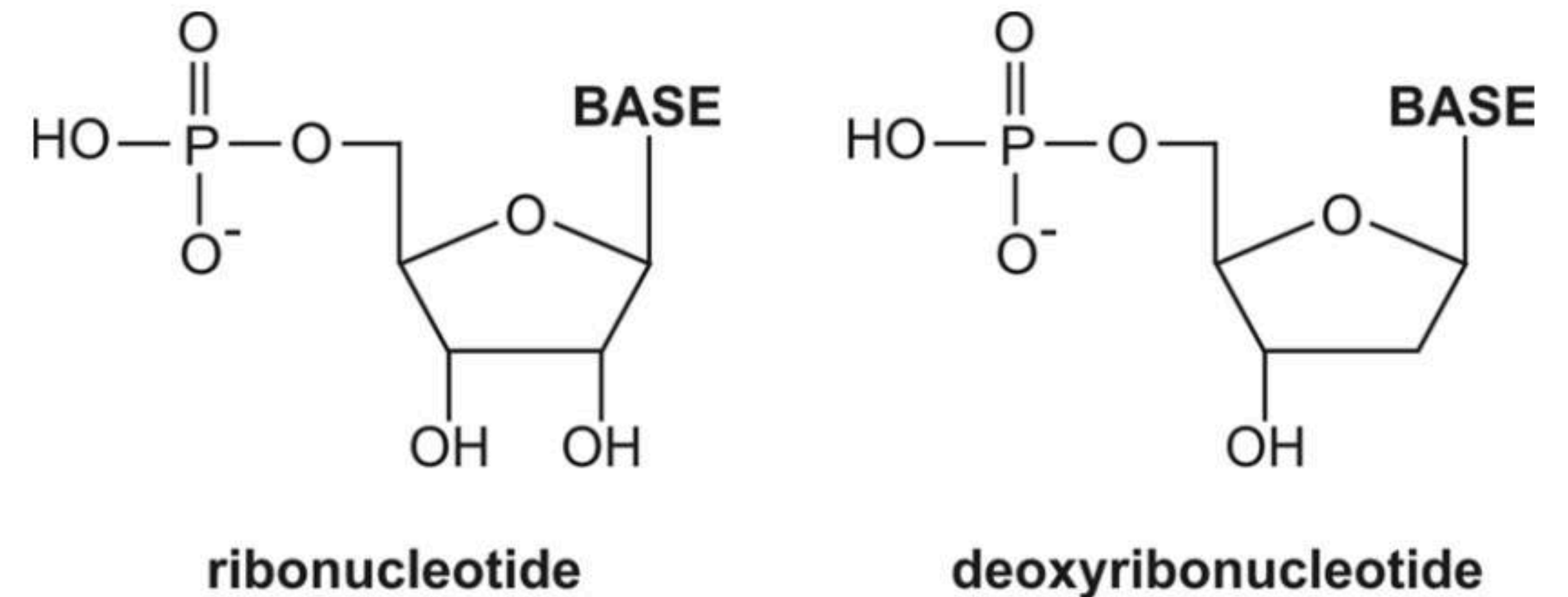


Figure 4.3. Ribonucleotide (left) and deoxyribonucleotide (right) are the building blocks of RNA and DNA, respectively.

Οι χημικές μονάδες που περιλαμβάνουν το RNA ονομάζονται ριβονουκλεοτίδια (Εικόνα 4.3), επομένως το RNA είναι μια σειρά από ριβονουκλεοτίδια. Κάθε ριβονουκλεοτίδιο αποτελείται από τρεις μικρότερες μονάδες, συμπεριλαμβανομένου ενός τύπου σακχάρου που ονομάζεται ριβόζη, ενός φωσφορικού άλατος και μιας αζωτούχου βάσης. Η αζωτούχα βάση που περιλαμβάνεται στο RNA, η οποία συχνά αναφέρεται απλώς ως βάση, μπορεί να είναι ένας από τους τέσσερις διαφορετικούς τύπους: γουανίνη, ουρακίλη, αδερίνη και κυτοσίνη. Αυτές οι τέσσερις διαφορετικές βάσεις δημιουργούν στη συνέχεια τέσσερα διαφορετικά ριβονουκλεοτίδια, τα οποία αναφέρονται ως μονοφωσφορικές γουανοσίνη, ουριδίνη, αδενοσίνη και κυτιδίνη, αντίστοιχα.

Πως δημιουργήθηκαν τα βιοπολυμερή;

A Production of Amino Acids Under Possible Primitive Earth Conditions

Stanley L. Miller^{1, 2}

G. H. Jones Chemical Laboratory,
University of Chicago, Chicago, Illinois

- **Αβιοτικές και εξωφρενοφικές συνθήκες** υπάρχουν στις αρχές δημιουργίας της Γης. Με τη μοντελοποίηση αυτών των πρωτόγονων περιβαλλόντων στο εργαστήριο, οι επιστήμονες μπορούν να δοκιμάσουν απευθείας υποθέσεις σχετικά με το πώς μπορεί να ξεκίνησε η ζωή στη Γη, ή ακόμα και σε άλλους πλανήτες.
- Ο σχηματισμός οργανικών μορίων, συμπεριλαμβανομένων των προδρόμων RNAs, έχει αποδειχθεί υπό προσομοιωμένες συνθήκες από έναν αριθμό πειραμάτων
- Έκθεση CH_4 , NH_3 , H_2O , και H_2 σε UV φως και συχνές αστραπές (ηλεκτρόδιο) παρήγαγε ένα μεγάλο αριθμό από οργανικά μόρια κάποια εκ των οποίων είναι πρόδρομα μόρια των βιομορίων που υπάρχουν σήμερα στη βιοσφαιρά μας (**Miller-Urey experiment**). Αυτά τα απλά μόρια όπως φορμαλδεύδη (formaldehyde, HCHO) και υδροκυάνιο (hydrogen cyanide, HCN), να αποτέλεσαν τα δομικά στοιχεία για πιο πολύπλοκα αλλά κοινά αμινοξέα.
- Οι νουκλεοτιδικές βάσεις δημιουργήθηκαν αργότερα στο εργαστήριο, για παράδειγμα, από τον **Sutherland**, ο οποίος πραγματοποίησε μια σύνθεση «ένα δοχείο» (one-pot reaction) που οδηγεί σε αμινοξέα, νουκλεοτίδια και λιπίδια.
- Εναλλακτικά, ή επιπρόσθετα, η χημική ανάλυση των μετεωριτών υποδηλώνει ότι μερικά από τα δομικά στοιχεία μικρών μορίων για το RNA και άλλα βιοπολυμερή μπορεί να προέρχονται από το διάστημα [9], ενώ πολύπλοκες δομές RNA και άλλα βιοπολυμερή είναι απίθανο να επιβιώσουν ταξιδεύοντας στο διάστημα. Η έκθεση σε κοσμικές ακτίνες θα κατέστρεφε το RNA. Έτσι, ενώ μερικά από τα μικρά μοριακά δομικά στοιχεία για τη ζωή, συμπεριλαμβανομένων των αμινοξέων, μπορεί να έχουν έρθει στην πρώιμη Γη μέσω μετεωριτών, πολύπλοκα βιοπολυμερή πρέπει να έχουν εξελιχθεί

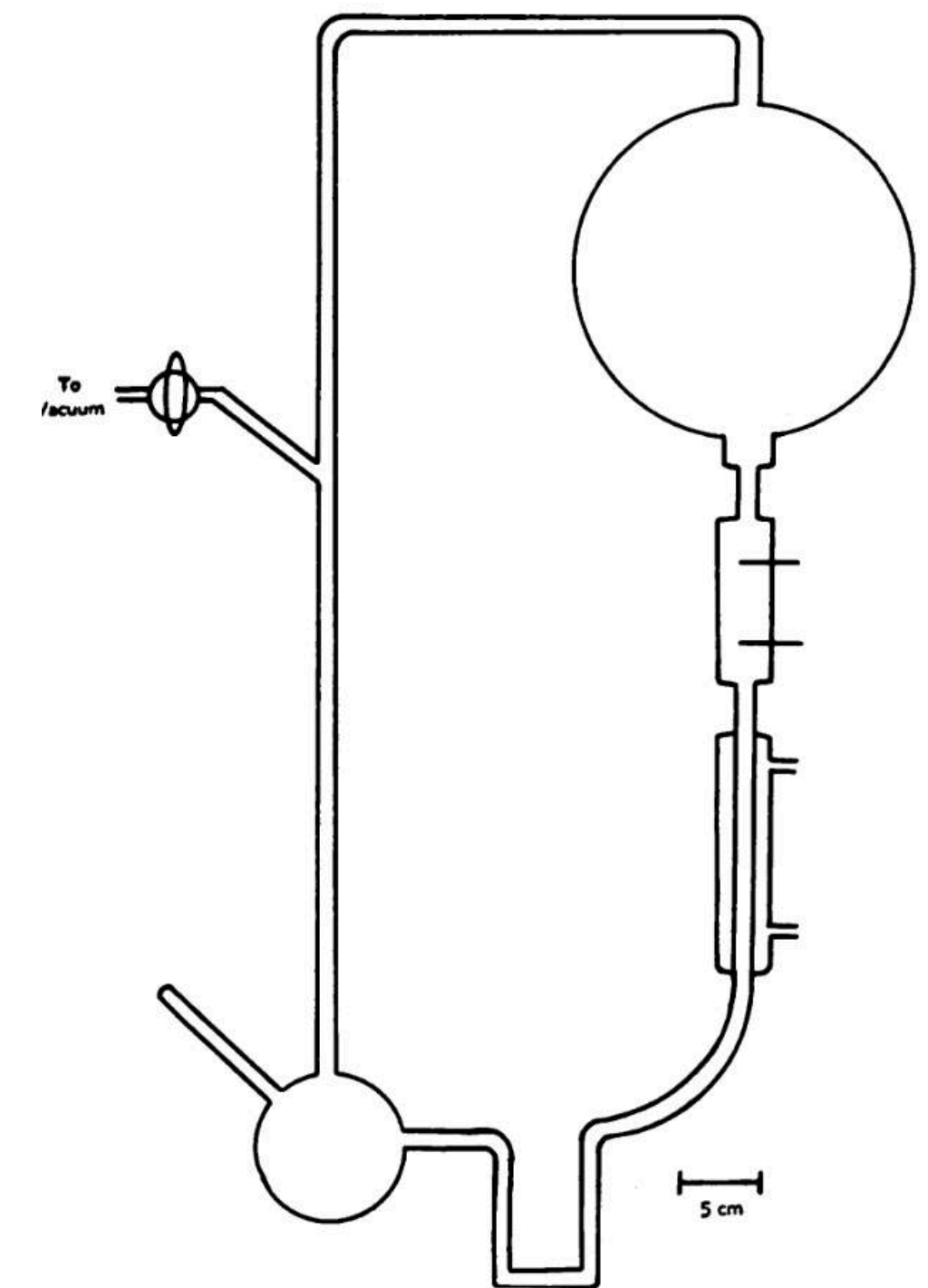


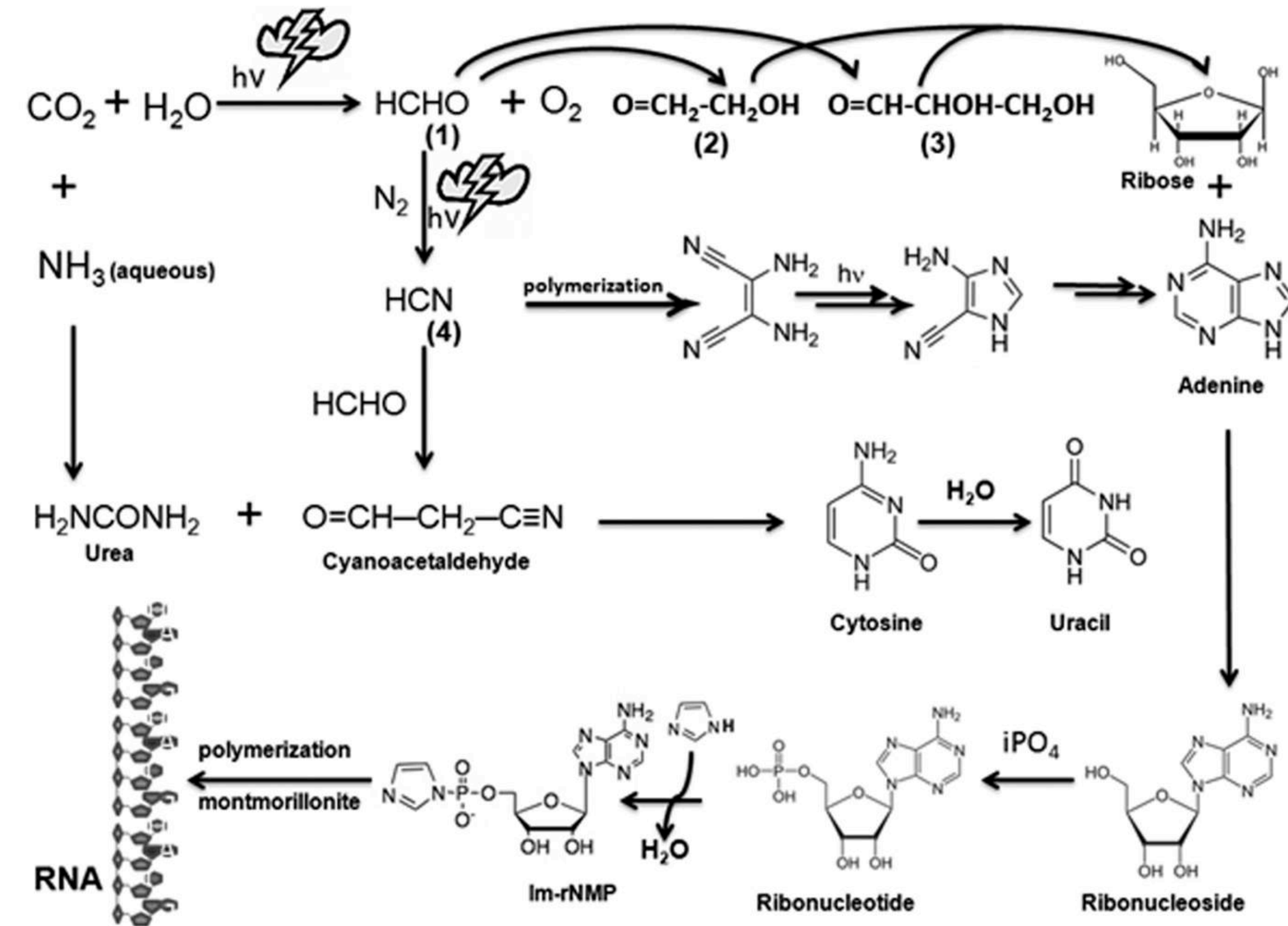
FIG. 1.

¹ Miller, S.L.; Urey, H.C. Organic Compound Synthesis on the Primitive Earth: Several questions about the origin of life have been answered, but much remains to be studied. Science 1959, 130, 245-251.

² Patel, B.H.; Percivalle, C.; Ritson, D.J.; Duffy, C.D.; Sutherland, J.D. Common origins of RNA, protein and lipid precursors in a cyanosulfidic protometabolism. Nat. Chem. 2015, 7, 301-307.

Πρεβιοτική σύνθεση ριβόζης, πουρινών, πυριμιδινών και RNA πολυμερών

- Απλά ανόργανα μόρια όπως CO₂, H₂O, HCHO, NH₃ και HCN μπορούν να συνδυαστούν για να σχηματίσουν οργανική ζάχαρη ριβόζης και αζωτούχες βάσεις (πουρίνες και πυριμιδίνες) επιλεκτικά υποβάλλοντάς τα σε ηλεκτρικές εκκενώσεις που αντιπροσωπεύουν τις προτεινόμενες ακραίες καιρικές συνθήκες στον πρεβιοτικό κόσμο.
- Το εξαιρετικά δραστικό μόριο φορμαλδεΐδης (1) μπορεί να δημιουργηθεί με την αντίδραση άφθονο CO₂ που υπήρχε στον αναγωγικό κόσμο με μόρια νερού. Η επακόλουθη αντίδραση του HCHO με τον εαυτό του μπορεί να προκαλέσει σάκχαρο ριβόζης μέσω ενδιάμεσων όπως η γλυκοαλδεΐδη (2) και οι γλυκεραλδεΐδες (3) ή άλλο αντιδραστικό μόριο HCN αντιδρώντας με N₂ υπό υψηλή ατμοσφαιρική πίεση. Το HCN αντιδρά με τον εαυτό του για να παράγει τη βάση πουρίνης αδενίνη και, με το HCHO, παράγει κυανοακεταλδεΐδη, η οποία μπορεί να αντιδράσει με την ουρία (H₂NCONH₂) για να δημιουργήσει δύο βάσεις πυριμιδίνης, δηλαδή την κυτοσίνη και την ουρακίλη.
- Το σάκχαρο της ριβόζης συνδέεται με αζωτούχες βάσεις για την παραγωγή ριβονουκλεοτιδίων που μπορεί να έχουν φωσφορυλιωθεί από ανόργανο φωσφορικό άλας (iPO₄) από διαλυμένα ορυκτά για την παραγωγή ριβονουκλεοτιδίων (Costanzo et al., 2007).
- **Αυτά τα ριβονουκλεοτίδια ενεργοποιούνται από την ιμιδαζόλη (Im) και στη συνέχεια πολυμερίζονται σε μια μακριά αλυσίδα χωρίς κανένα πρότυπο σε έναν πηλό καταλύτη όπως ο μοντμοριλλονίτης, ο οποίος υπήρχε σε αφθονία στην πρεβιοτική Γη. Όλα αυτά τα βήματα εξαρτώνται από την πιθανότητα εμφάνισης όλων αυτών των συστατικών και ευνοϊκές συνθήκες τουλάχιστον σε κοντινή απόσταση από την επιφάνεια της Γης και την εγγύς ατμόσφαιρά της.**
- Στη χημεία, ένα πολυμερές είναι ένα σχετικά μεγάλο μόριο που αποτελείται από πολλές μικρότερες υπομονάδες, επομένως είναι καλός υποψήφιος για μια αυτοαναπαράγόμενη χημική ουσία. Πράγματι, όλες οι μορφές ζωής στη Γη



Rana AK, Ankri S. Reviving the RNA World: An Insight into the Appearance of RNA Methyltransferases. *Front Genet.* 2016 Jun 6;7:99. doi: 10.3389/fgene.2016.00099. PMID: 27375676; PMCID: PMC4893491.

Η Αντιγραφή με βάση μια μήτρα είναι απαραίτητη για τη Δαρβινική εξέλιξη

- Οποιοσδήποτε κι αν ήταν ο μηχανισμός δημιουργίας πολυμερών από ενεργοποιημένα νουκλεοτίδια, το αποτέλεσμα του θα ήταν ένα ετερόκλητο μείγμα από ολιγονουκλεοτίδια που διαφέρουν τόσο σε μήκος και σε αλληλουχία. Το καθοριστικό βήμα συνεπώς μετά τη ύπαρξη ολιγονουκλεοτιδίων είναι η αντιγραφή ορισμένων στο ώστε να ξεκινήσει μια διαδικασία ισοδύναμης της φυσικής επιλογής.
- Αυτό θα μπορούσε να γίνει μέσω πολυμερισμού ή μέσω ένωσης μικρότερων τμημάτων RNA αλλά πάντα με βάση μια μήτρα μέσω της οποίας δημιουργείται ικανή ελεύθερη ενέργεια να υποστηρίξει την επιμήκυνση μεγάλου μήκους RNA.
- Η αντίδραση που είναι κεντρικής σημασίας στην αντιγραφή είναι σύνθεση με βάση μήτρας και απουσία ενζύμων (δηλ. χημική σύνθεση). Δηλαδή η σύνθεση μια συμπληρωματικής αλυσίδας ολιγονουκλεοτιδίων κάτω από τις οδηγίες μια προϋπάρχουσας αλυσίδας ολιγονουκλεοτιδίων.
- Η μη-ενζυματική αντιγραφή του RNA είναι ένα εν δυνάμει μεταβατικό στάδιο ανάμεσα στην αβιογενετική χημική σύνθεση νουκλεοτιδίων και του κανονικού κόσμου του RNA όπου τα ριβόζυμα (καταλυτικά RNA) καταλύουν την αντιγραφή των γονιδιωμάτων RNA των πρώτων κυττάρων.

Αυτο-αναπαραγόμενες μηχανές αυτό-αντιγραφής

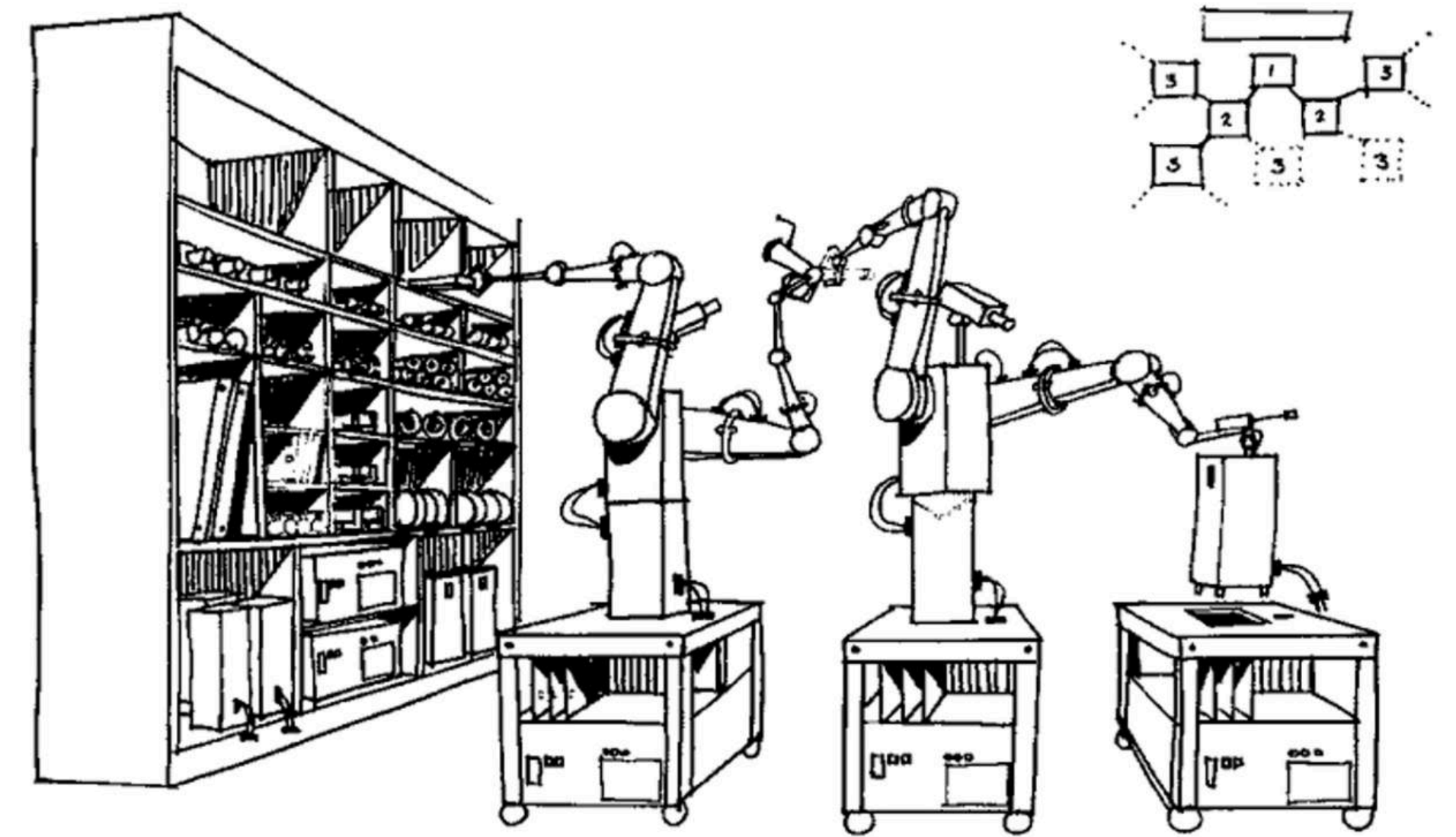


Figure 4.2. A simple imaginary self-replicating machine.
Source: From a National Aeronautics and Space Administration conference publication (1982). Public domain.

Άλυτα προβλήματα σχετικά με τη μη-ενζυματική αντιγραφή του RNA.

- Ετερογένεια σε Περιεκτικότητα (Regiospecificity) – η χημική αντιγραφή μήτρας RNA δημιουργεί συμπληρωματικές αλυσίδες με ετερογένεια στο σκελετό τους περιέχοντας τόσο 2'-5' όσο και 3'-5 δεσμούς.
- Υψηλό T_m μεγάλου μήκους δίκλωνου RNA >30 bps dsRNA είναι σχεδόν αδύνατον να αποδιαταχθούν στις αβιοτικές συνθήκες που εικάζουμε ότι υπήρχαν. Υψηλή θερμοκρασία οδηγεί σε αποδιάταξη.
- Αξιοπιστία χημικής αντιγραφής μήτρας. Πολύ χαμηλή ώστε να επιτρέψει αξιόπιστη αντιγραφή λειτουργικής γενετικής πληροφορίας.
- Ο ρυθμός αντιγραφής είναι ίσος με το ρυθμό αποικοδόμησης (υδρόλυση).
- Η υδρόλυση επιταχύνεται από την παρουσία δισθενών ιόντων τα οποία όμως χρειάζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις για την αξιόπιστη αντιγραφή RNA.
- Η αστραπιαία επαναδημιουργία δίκλωνου RNA το οποίο δημιουργεί σταθερές δομές που αποτρέπουν την συνέχιση της αντιγραφής.

Το πρώτο ένζυμο της Βιολογίας

- Το 1549, οι Robertson και Scott αναφέρουν την κρυσταλλική δομή ενός ενζύμου RNA που λήφθηκε με την εξέλιξη του δοκιμαστικού σωλήνα που καταλύει τη σύνδεση σε δύο μόρια RNA που συνδέονται σε γειτονικές θέσεις κατά μήκος μιας μήτρας RNA
- Τα πρωτεϊνικά ένζυμα που καταλύουν την αντιγραφή του RNA χρησιμοποιούν ως δομικά στοιχεία τα τέσσερα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (NTPs). Αυτά συνδέονται με μια μήτρα RNA και ενώνονται μέσω της αντίδρασης μεταξύ της 3' υδροξυλική ομάδα του ενός NTP και την 5' τριφωσφορική ουρά του επόμενου, σχηματίζοντας έναν δεσμό 3',5'- φωσφοδιεστέρα.
- Το εκμαγείο παρέχει έναν ευνοϊκό προσανατολισμό για την αντίδραση, το 5'-τριφωσφορικό προσφέρει έναν επιθυμητό συνδυασμό να είναι πολύ σταθερό στο νερό αλλά θερμοδυναμικά υψηλά ενεργοποιημένο για την αντίδραση. Το μόνο που χρειάζεται είναι ο κατάλληλος καταλύτης για να διευκολύνει την αντίδραση

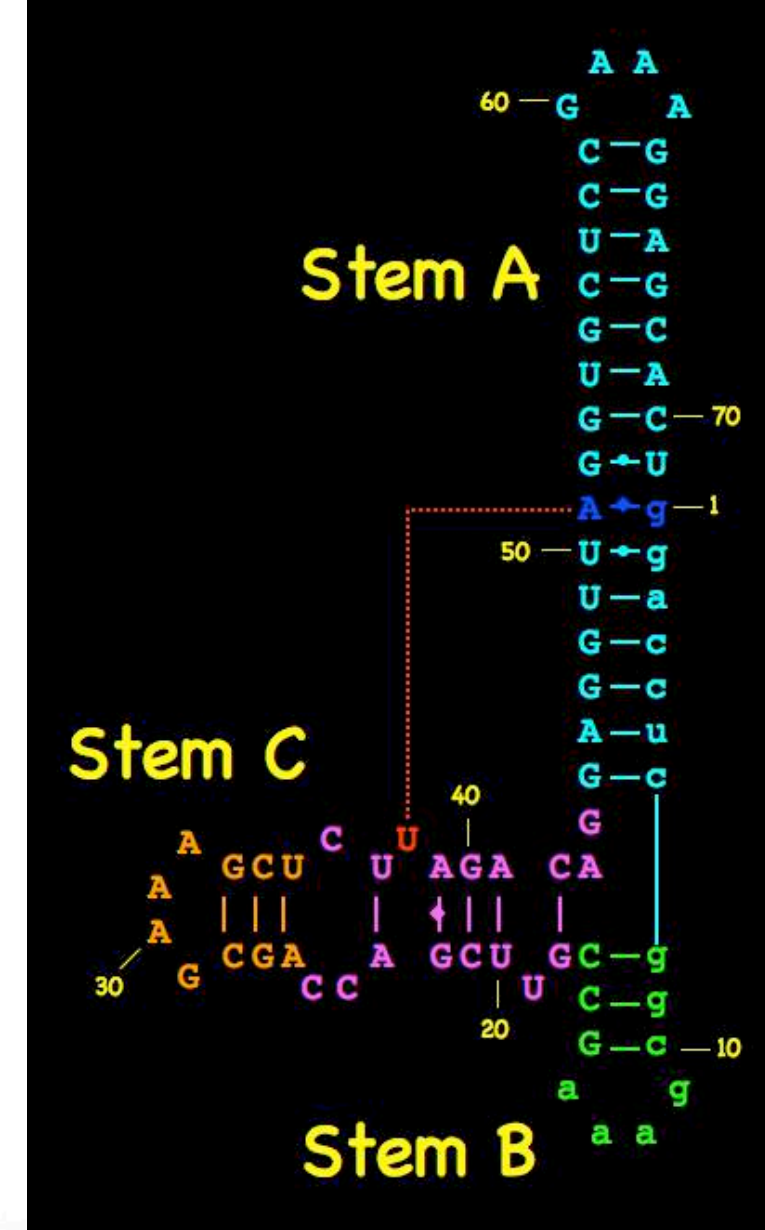
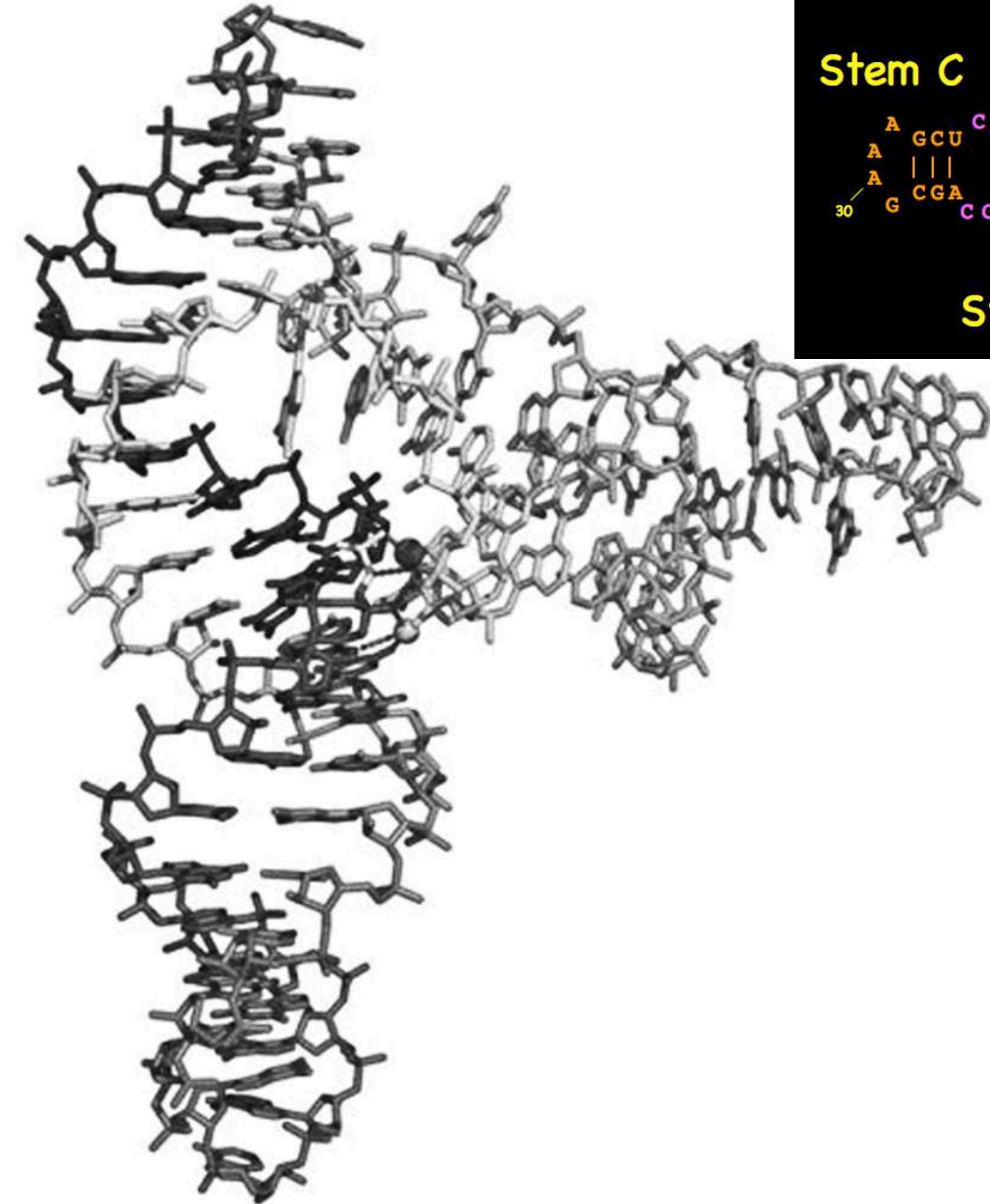
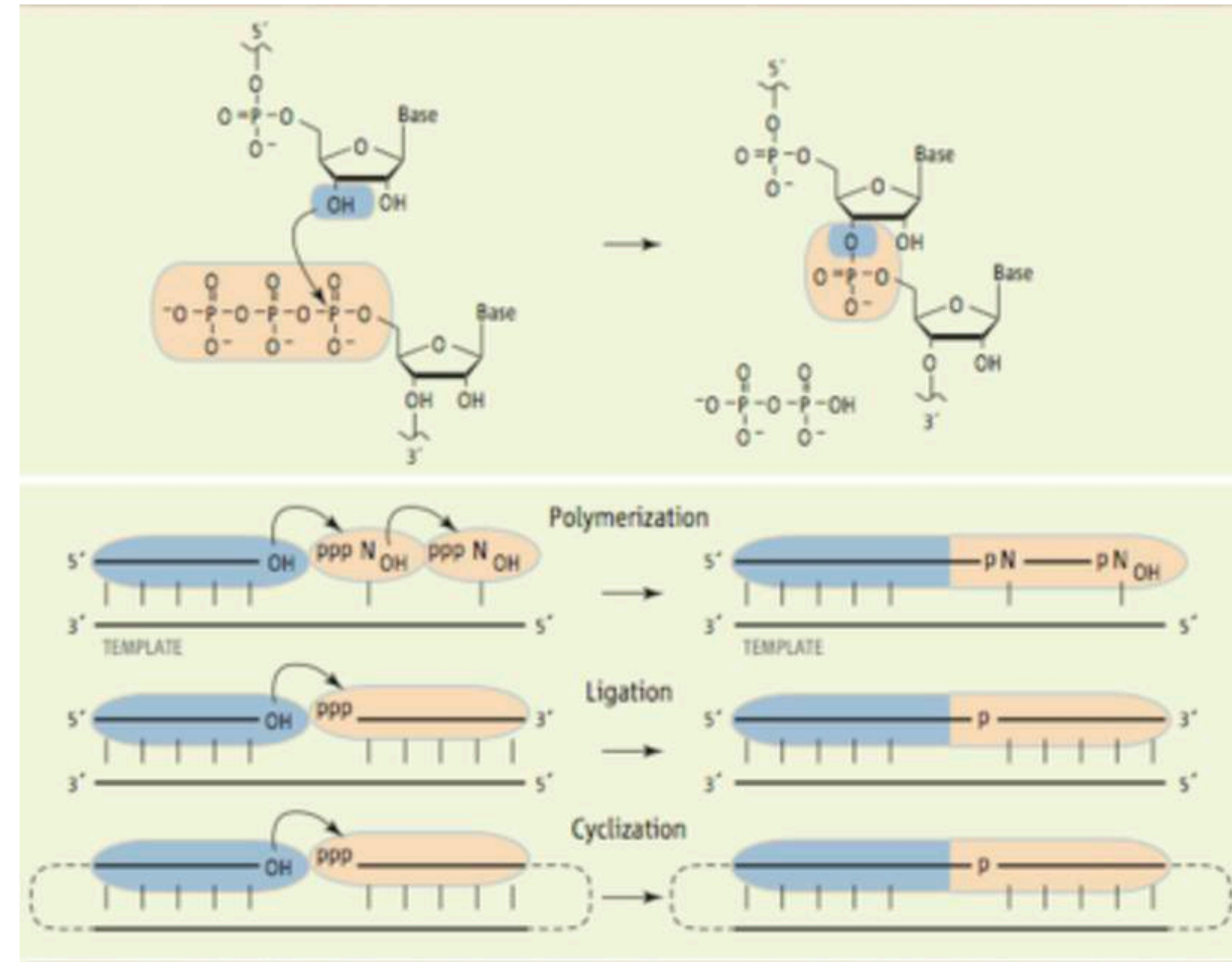


Figure 4.4. Structure of an L1 ligase ribozyme.
Source: Robertson MP, Scott WG (2007) The structural basis of ribozyme-catalyzed RNA assembly. *Science* 315: 1549–1553. Reprinted with permission from AAAS.

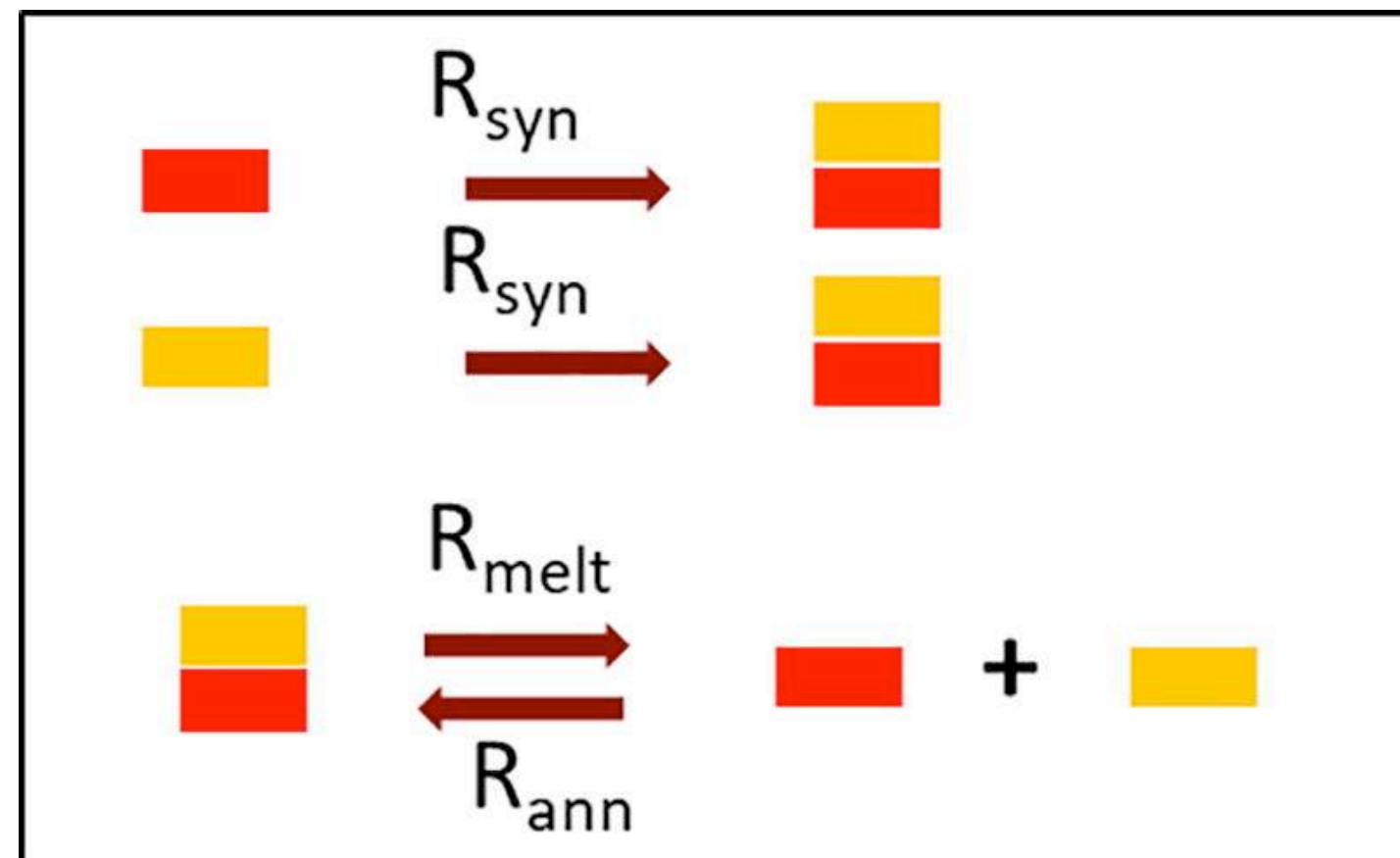
Το πρώτο ένζυμο της Βιολογίας

- Το 1549, οι Robertson και Scott αναφέρουν την κρυσταλλική δομή ενός ενζύμου RNA (L1 RNA ligase) που λήφθηκε με την εξέλιξη του δοκιμαστικού σωλήνα που καταλύει τη σύνδεση σε δύο μόρια RNA που συνδέονται σε γειτονικές θέσεις κατά μήκος μιας μήτρας RNA
- Τα πρωτεϊνικά ένζυμα που καταλύουν την αντιγραφή του RNA χρησιμοποιούν ως δομικά στοιχεία τα τέσσερα τριφωσφορικά νουκλεοτίδια (NTPs). Αυτά συνδέονται με μια μήτρα RNA και ενώνονται μέσω της αντίδρασης μεταξύ της 3' υδροξυλική ομάδα του ενός NTP και την 5' τριφωσφορική ουρά του επόμενου, σχηματίζοντας έναν δεσμό 3',5'- φωσφοδιεστέρα.
- Το εκμαγείο παρέχει έναν ευνοϊκό προσανατολισμό για την αντίδραση, το 5'-τριφωσφορικό προσφέρει έναν επιθυμητό συνδυασμό να είναι πολύ σταθερό στο νερό αλλά θερμοδυναμικά υψηλά ενεργοποιημένο για την αντίδραση. Το μόνο που χρειάζεται είναι ο κατάλληλος καταλύτης για να διευκολύνει την αντίδραση

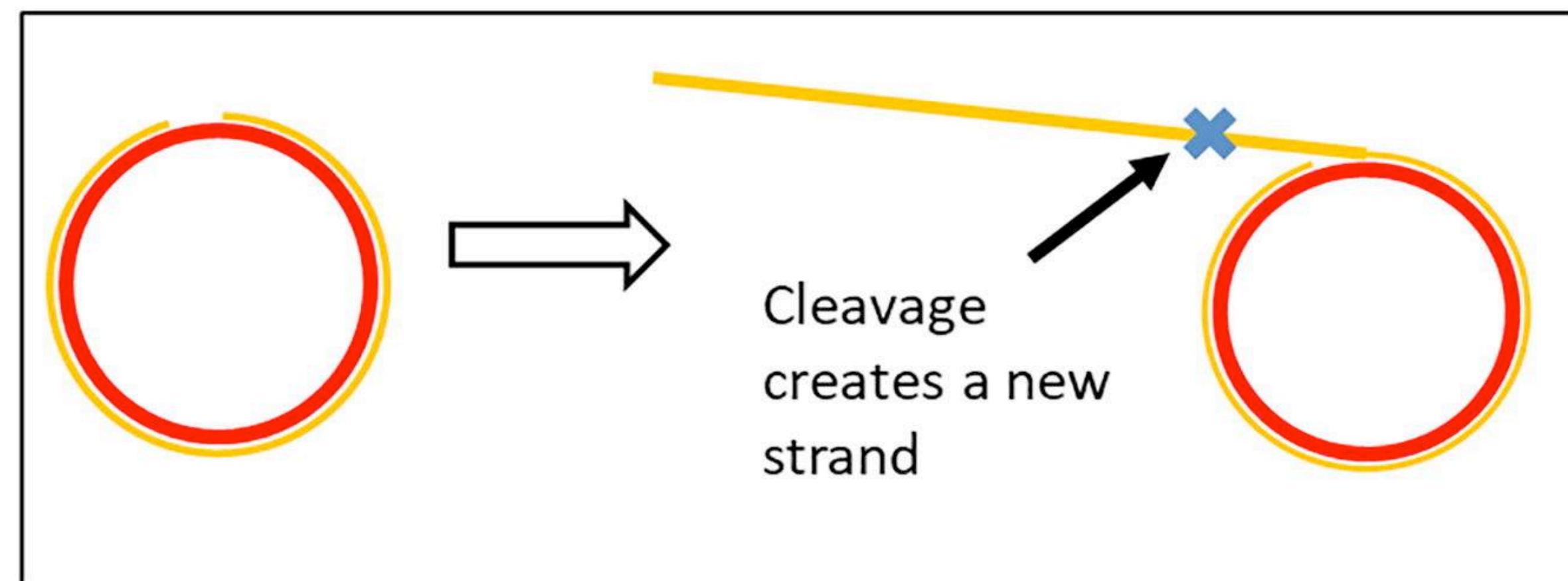


Μη ενζυματική vs ενζυματική αντιγραφή του RNA

- Στην αρχή, ο αναδιπλασιασμός του RNA είναι πιθανό να συνέβη ως μια μη ενζυματική διαδικασία με την οποία αντιγράφηκαν εκμαγεία RNA για να δώσουν συμπληρωματικούς κλώνους, οι οποίοι με τη σειρά τους αντιγράφηκαν για να δώσουν επιπλέον αντίγραφα των αρχικών προτύπων. Η διακύμανση της αλληλουχίας θα είχε προκύψει λόγω ατελούς πιστότητας αντιγραφής και εκείνες οι παραλλαγές που αναπαράγονταν πιο αποτελεσματικά θα είχαν αυξηθεί για να κυριαρχήσουν στον πληθυσμό, μέχρι να εμφανιστούν νέες παραλλαγές με ακόμη μεγαλύτερη καταλληλότητα.
- Σε κάποιο σημείο κατά τη διάρκεια της πρώιμης ιστορίας της εξέλιξης με βάση το RNA, πιστεύεται ότι το RNA εξέλιξε την ικανότητα να καταλύει τη δική του αντιγραφή, ενεργώντας ως μια εξαρτώμενη από RNA πολυμεράση RNA. Καθώς η αποτελεσματικότητα και η ακρίβεια της αντιγραφής RNA βελτιωνόταν, μεγαλύτερα και πιο πολύπλοκα RNA μπορούσαν να αντιγραφούν, περιλαμβάνοντας πιο εξελιγμένα καταλυτικά μοτίβα και επεκτείνοντας το λειτουργικό ρεπερτόριο του κόσμου του RNA. **Σε όλες τις γενιές της εξέλιξης που βασίζεται σε RNA, η ακρίβεια αντιγραφής πρέπει να έχει υπερβεί ένα κρίσιμο όριο για τη διατήρηση κληρονομικών πληροφοριών, και αυτό το όριο θα είχε αυξηθεί καθώς τα εξελισσόμενα RNA αυξάνονταν σε μέγεθος και πολυπλοκότητα.**



Replication driven by temperature cycling is inhibited by reannealing.



Rolling circle replication occurs via strand-displacement and may be the most likely form of replication in the RNA World.

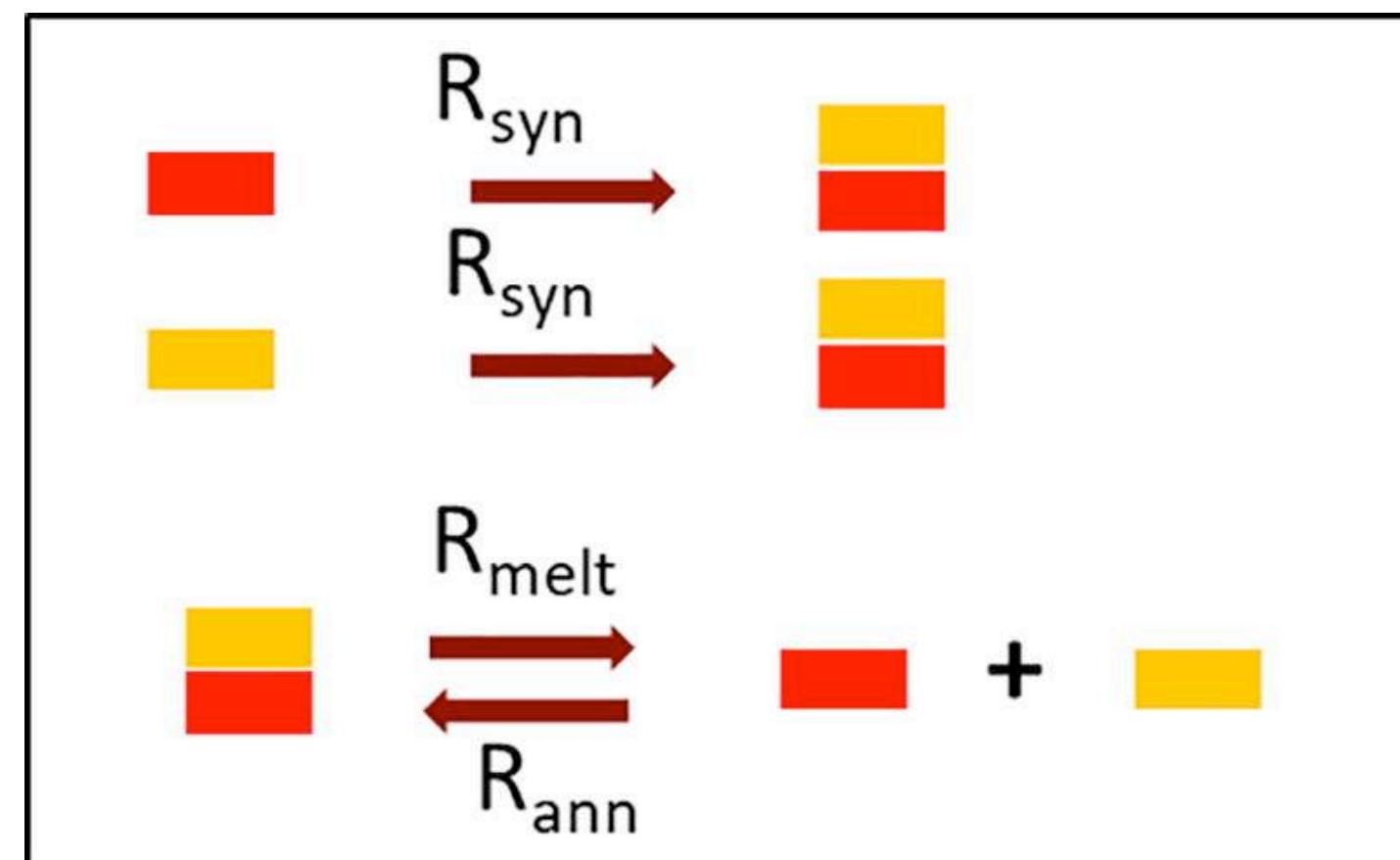
Η RNA-διαμεσολαβούμενη RNA πολυμεράση – RNA ρεπλικάση

- Λόγω των παραπάνω δυσκολιών που υπάρχουν στη χημική αντιγραφή μητρας RNA, πολλοί επιστήμονες υποστηρίζουν ότι η ζωή και η θεωρία εξέλιξης του Δαρβίνου ξεκίνησε πριν το RNA. Σε αυτόν το προγενέστερο κόσμο πριν του RNA, η ζωή βασιζόταν σε ένα πολυμερές που έμοιαζε με το RNA (δεν έχει ανακαλυφθεί ακόμη), είχε τις καταλυτικές και μητρικές ιδιότητες του RNA αλλά επέτρεπε μια πιο πιθανή αβιοτική αντιγραφή. Στη συνέχεια αυτό το pre-RNA μόριο ανέπτυξε τις ιδιότητες να συνθέτει RNA η οποία είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία του πρώτου ριβοζυμου ρεπλικάσης RNA και τη μετάβαση στον κόσμο των RNA-πολυπεπτιδίων (του γενετικού κώδικα)

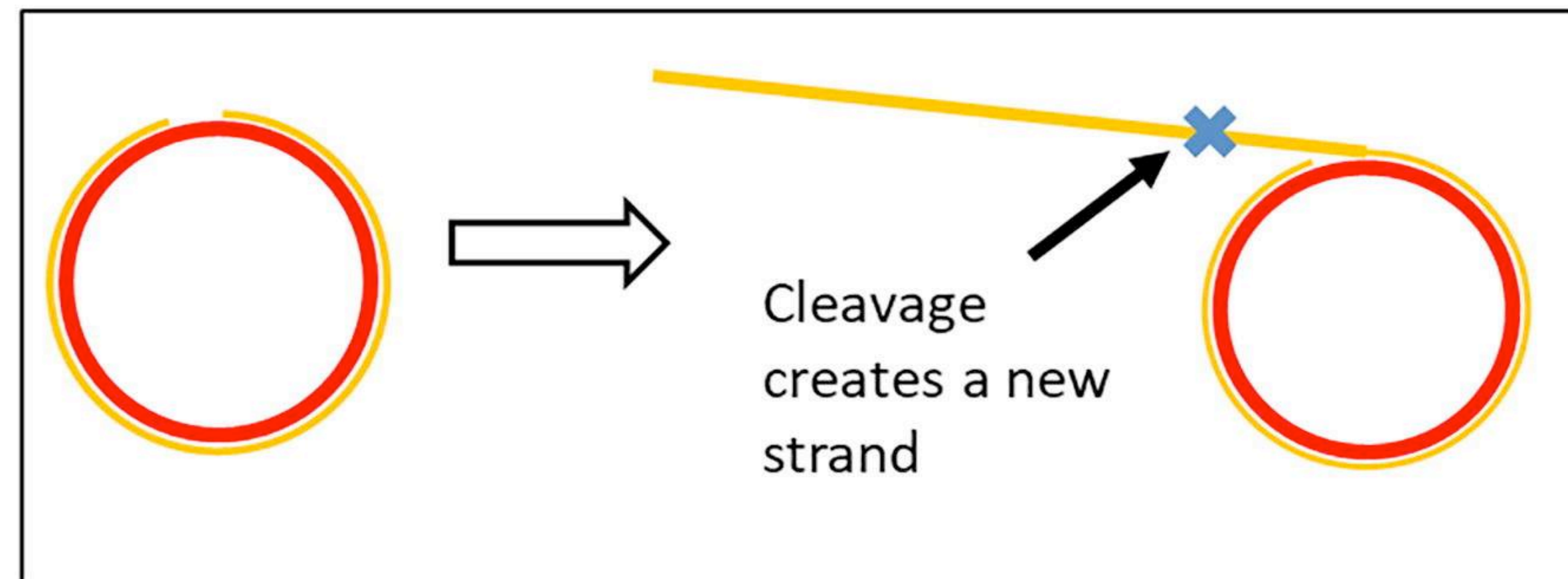
Μη ενζυματική vs ενζυματική αντιγραφή του RNA

Στην αρχή, ο αναδιπλασιασμός του RNA είναι πιθανό να συνέβη ως μια μη ενζυματική διαδικασία με την οποία αντιγράφηκαν εκμαγεία RNA για να δώσουν συμπληρωματικούς κλώνους, οι οποίοι με τη σειρά τους αντιγράφηκαν για να δώσουν επιπλέον αντίγραφα των αρχικών προτύπων. Η διακύμανση της αλληλουχίας θα είχε προκύψει λόγω ατελούς πιστότητας αντιγραφής και εκείνες οι παραλλαγές που αναπαράγονταν πιο αποτελεσματικά θα είχαν αυξηθεί για να κυριαρχήσουν στον πληθυσμό, μέχρι να εμφανιστούν νέες παραλλαγές με ακόμη μεγαλύτερη καταλληλότητα.

Σε κάποιο σημείο κατά τη διάρκεια της πρώιμης ιστορίας της εξέλιξης με βάση το RNA, πιστεύεται ότι το RNA εξέλιξε την ικανότητα να καταλύει τη δική του αντιγραφή, ενεργώντας ως μια εξαρτώμενη από RNA πολυμεράση RNA. Καθώς η αποτελεσματικότητα και η ακρίβεια της αντιγραφής RNA βελτιωνόταν, μεγαλύτερα και πιο πολύπλοκα RNA μπορούσαν να αντιγραφούν, περιλαμβάνοντας πιο εξελιγμένα καταλυτικά μοτίβα και επεκτείνοντας το λειτουργικό ρεπερτόριο του κόσμου του RNA. **Σε όλες τις γενιές της εξέλιξης που βασίζεται σε RNA, η ακρίβεια αντιγραφής πρέπει να έχει υπερβεί ένα κρίσιμο όριο για τη διατήρηση κληρονομικών πληροφοριών, και αυτό το όριο θα είχε αυξηθεί καθώς τα εξελισσόμενα RNA αυξάνονταν σε μέγεθος και πολυπλοκότητα.**



Replication driven by temperature cycling is inhibited by reannealing.



Rolling circle replication occurs via strand-displacement and may be the most likely form of replication in the RNA World.

Το πρόβλημα διαχωρισμού κλώνων

Η *in vitro* μελέτη της εξέλιξη και της μηχανικής του RNA οδήγησαν στην ανακάλυψη ριβοενζύμων πολυμεράσης RNA (RPRs) ικανών να εκτελούν σύνθεση από μήτρα RNA έως και 200 νουκλεοτιδίων (nt) RNA (Attwater et al., 2013), συνθέτοντας ενεργά ριβοένζυμα συμπεριλαμβανομένης της καταλυτικής τάξης I πυρηνικής λιγάσης (Horning and Joyce, 2016; Tjhung et al., 2020) στην καρδιά των πιο αποτελεσματικών RPRs, καθώς και έναρξη της διαδικασίας σύνθεσης RNA χρησιμοποιώντας έναν μηχανισμό με αναλογίες με την έναρξη μεταγραφής που εξαρτάται από το σίγμα

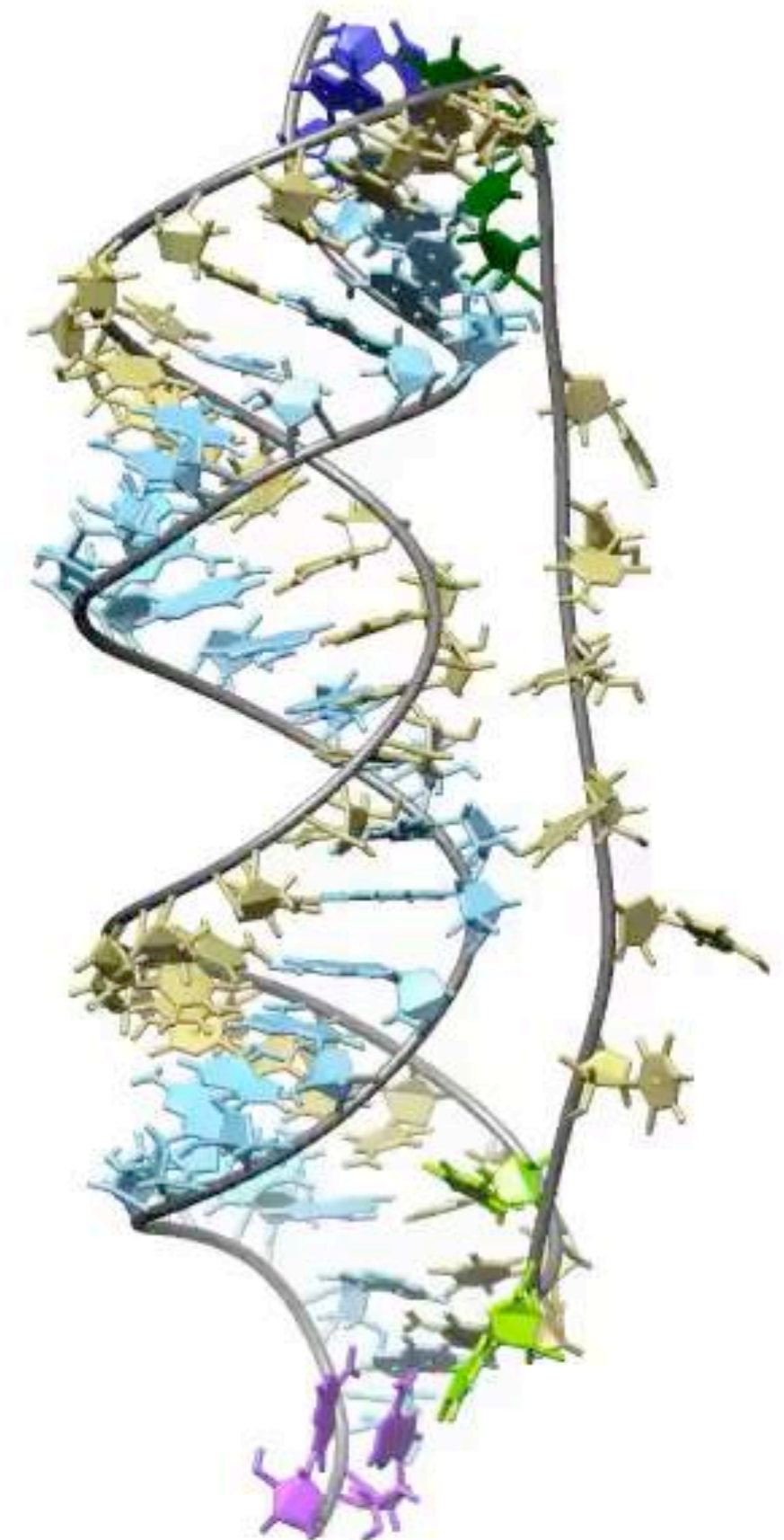
Ωστόσο, εξακολουθούν να υπάρχουν ορισμένα θεμελιώδη εμπόδια που πρέπει να ξεπεραστούν προτού μπορέσει να δημιουργηθεί ένα αυτόνομο σύστημα αυτοαναπαραγωγής. **Ένα κεντρικό πρόβλημα μεταξύ αυτών είναι το λεγόμενο «πρόβλημα διαχωρισμού κλώνων», μια μορφή αναστολής του προϊόντος λόγω της συσσώρευσης αδιέξοδων διπλών RNA υψηλής σταθερότητας, τα οποία δεν μπορούν να διαχωριστούν (αποτελεσματικά) υπό συνθήκες αντιγραφής** (Le Vay και Mutschler, 2019). Το πρόβλημα διαχωρισμού κλώνων έχει ξεπεραστεί με θερμοκυκλοποίηση (ή θερμοφόρηση) παρόμοια με PCR (Horning and Joyce, 2016· Salditt et al., 2020), αλλά αυτή η προσέγγιση μπορεί να περιορίζεται σε βραχεία ολιγομερή RNA (ακόμη και παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων παράγοντες μετουσίωσης) καθώς οι θερμοκρασίες τήξης των μακρύτερων διπλών RNA πλησιάζουν ή ακόμη και υπερβαίνουν το σημείο βρασμού του νερού (Freier et al., 1986; Szostak, 2012

Rolling circle RNA synthesis catalyzed by RNA

Emil Laust Kristoffersen^{1†}, Matthew Burman², Agnes Noy², Philipp Holliger^{1*}

¹MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge Biomedical Campus, Cambridge, United Kingdom; ²Department of Physics, University of York, York, United Kingdom

Here we have explored rolling circle synthesis (RCS) as a potential solution to this strand separation problem. **We observe sustained RCS by a triplet polymerase ribozyme beyond full-length circle synthesis with strand displacement yielding concatemeric RNA products.** Furthermore, we show RCS of a circular Hammerhead ribozyme capable of self-cleavage and re-circularisation. Thus, all steps of a viroid-like RNA replication pathway can be catalyzed by RNA alone. Finally, we explore potential RCS mechanisms by molecular dynamics simulations, which indicate a progressive build-up of conformational strain upon RCS' with destabilisation of nascent strand 5'- and 3'-ends. Our results have implications for the emergence of RNA replication and for understanding the potential of RNA to support complex genetic processes.



Τα «ζωντανά απολιθώματα» των αρχέγονων ιοειδών

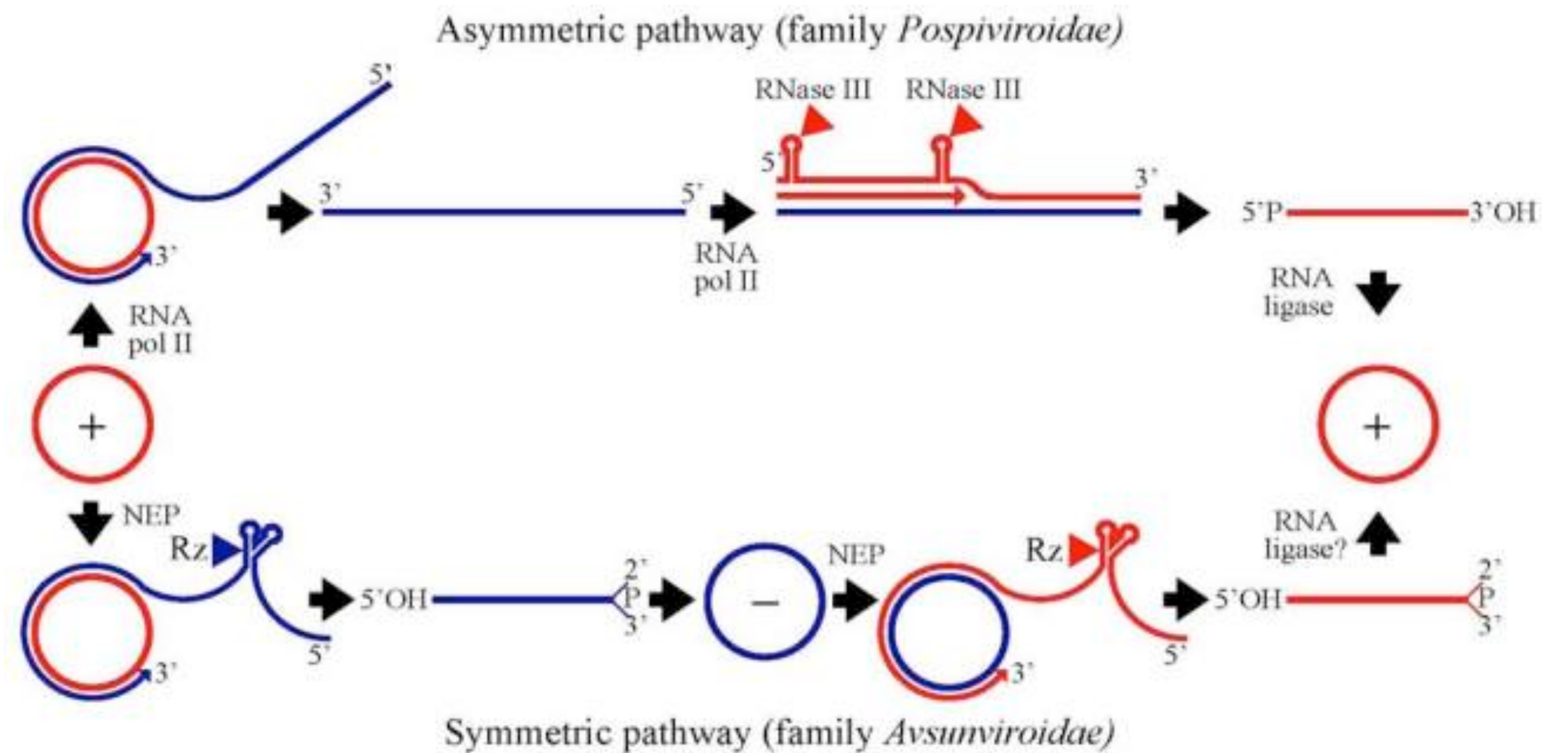
Δεν υπάρχει κανένα ίχνος αυτού του «κόσμου RNA» σήμερα, αλλά μοριακά «απολιθώματα» μπορεί να υπάρχουν στην τρέχουσα βιολογία. Τα ιοειδή, για παράδειγμα, είναι μικρά μονόκλινα, κυκλικά RNA που είναι μολυσματικά παθογόνα. Σε αντίθεση με τους ιούς, δεν έχουν πρωτεϊνική επικάλυψη. Όλα τα γνωστά ιοειδή μολύνουν τα αγγειόσπερμα (ανθοφόρα φυτά) και τα περισσότερα προκαλούν ασθένειες, των οποίων η αντίστοιχη οικονομική σημασία για τον άνθρωπο ποικίλλει ευρέως.

Το πρώτο ιοειδές ανακαλύφθηκε από τον Diener το 1971 (PSTVd).

Σε αντίθεση με τους ιούς, τα ιοειδή δεν περιβάλλονται από πρωτεϊνική μεμβράνη και δεν κωδικοποιούν καμία πρωτεΐνη. Χρειάζονται πρωτεΐνες από το φυτό ξενιστή για να αναπαραχθούν. Με την είσοδο τους στα φυτικά κύτταρα χρησιμοποιούν την πολυμεράση II, το κύριο τρόπο δηλαδή μεταγραφής του κυτταρικού DNA ή την nuclear-encoded chloroplastic RNA polymerase (NEP).

Η εκάστοτε πολυμεράση προσδένει στο ιοειδές και καταλύει τη σύνθεση νέου RNA χρησιμοποιώντας το κυλιόμενο κύκλο (rolling circle) και το RNA του ιοειδούς ως μήτρα.

Οι επιστήμονες κατάφεραν να κατασκευάσουν ριβοένζυμα που μπορούν να αντιγράψουν σύνθετους κλώνους RNA. Αυτό υποδηλώνει ότι η αντιγραφή που μοιάζει με ιοειδή θα μπορούσε να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας μόνο RNA.



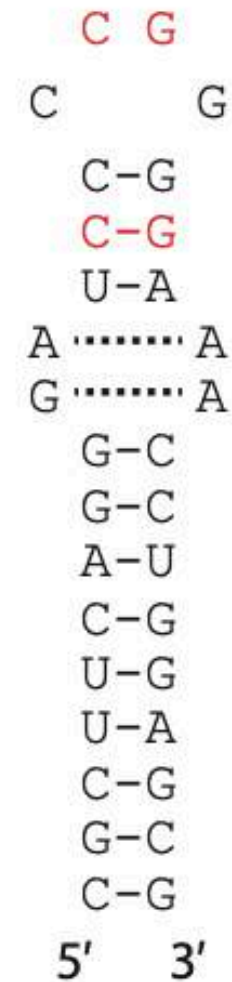
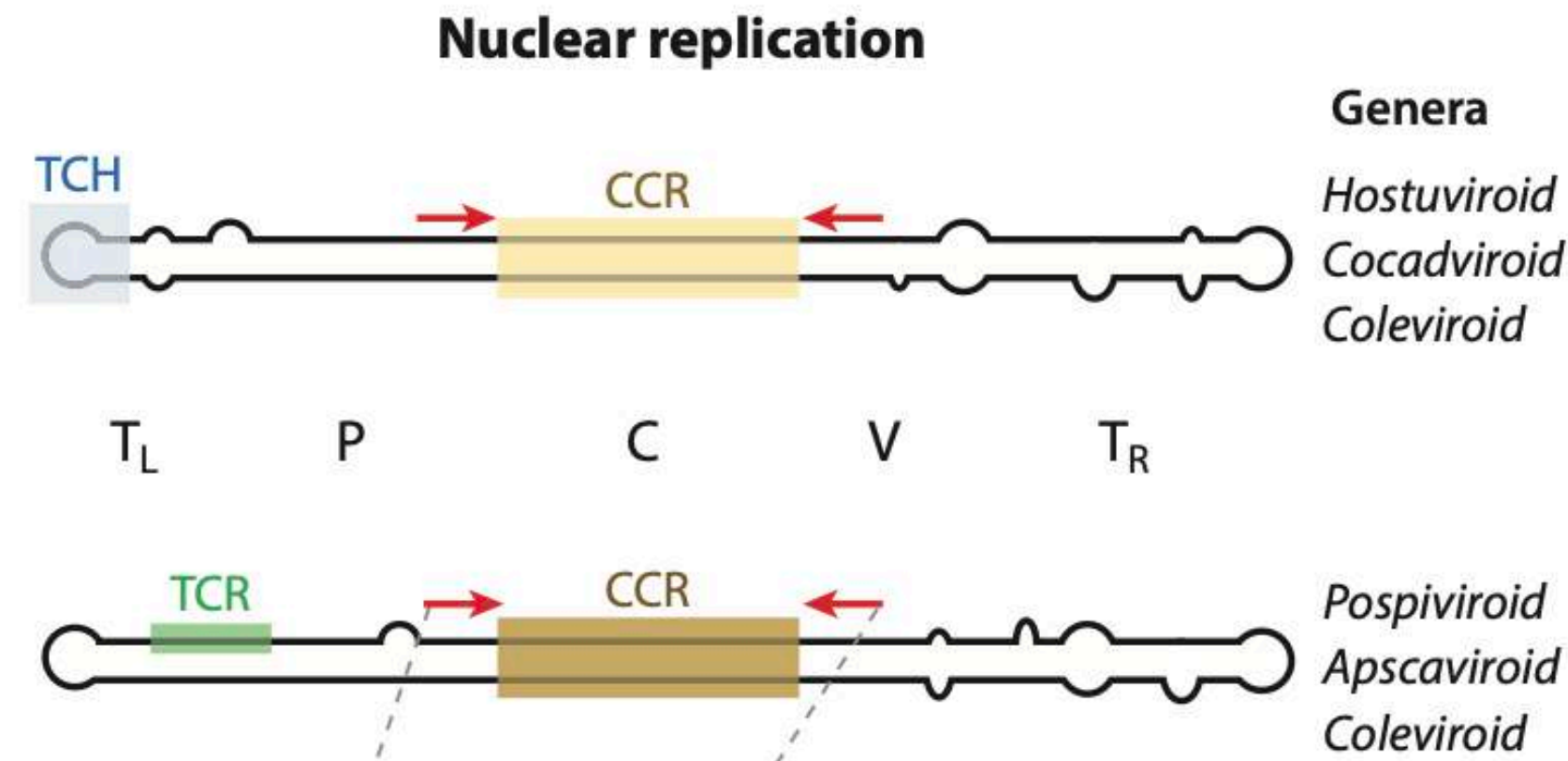
Rolling-circle replication mechanism with the two alternative pathways followed by members of the family *Pospiviroidae* (asymmetric) and *Avsunviroidae* (symmetric) [15,16,46]. Red and blue lines refer to (+) and (-) strands, respectively. Arrowheads mark the cleavage sites of a host RNase III or a hammerhead ribozymes (Rz), and the resulting terminal groups are indicated. Elongation of RNA strands is catalyzed by the nuclear RNA polymerase II (RNA pol II) or the nuclear-encoded chloroplastic RNA polymerase (NEP).

Τα ωοειδή

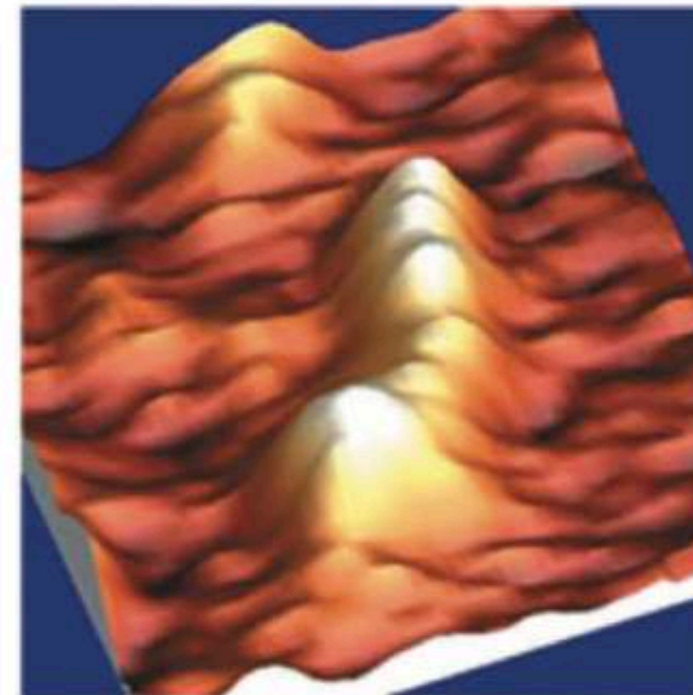
- Τα ιοειδή αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά ως παράγοντες που προκαλούν ασθένειες στις πατάτες ως ιοειδές κονδύλου της ατράκτου πατάτας (PSTVd) [17]. Τα ριβοένζυμα και τα ιοειδή μοιράζονται πολλές δομικές ιδιότητες. Και τα δύο είναι κυκλικά, μη κωδικοποιητικά μόρια RNA όπου τα ιοειδή είναι μεγαλύτερα, κυμαινόμενα από 246 έως 434 νουκλεοτίδια, όλα περιέχουν μια συντηρημένη κεντρική περιοχή CCR. Είναι μεγαλύτερα από τα ριβοένζυμα, τα οποία αποτελούνται από έναν πυρήνα και τρεις έλικες, συνολικά 50 έως 150 νουκλεοτίδια.

- Τα ιοειδή αποτελούνται από ένα αυτοσυμπληρωματικό ραβδοειδές ή διακλαδισμένο δομημένο ομοιοπολικά κλειστό κυκλικό RNA. Αποτελούν δύο οικογένειες, αλλά μόνο η μία από αυτές φέρει ένα ενζυμικά ενεργό μοτίβο σφυροκεφαλής, η άλλη βασίζεται σε παράγοντες ξενιστή. Τα ονόματά τους αναφέρονται στους ξενιστές τους, αβοκάντο ή πατάτες (*Avsun- ή Pospiviroidae*, αντίστοιχα). RNA; vd-sRNA, viroid-derived small RNA.

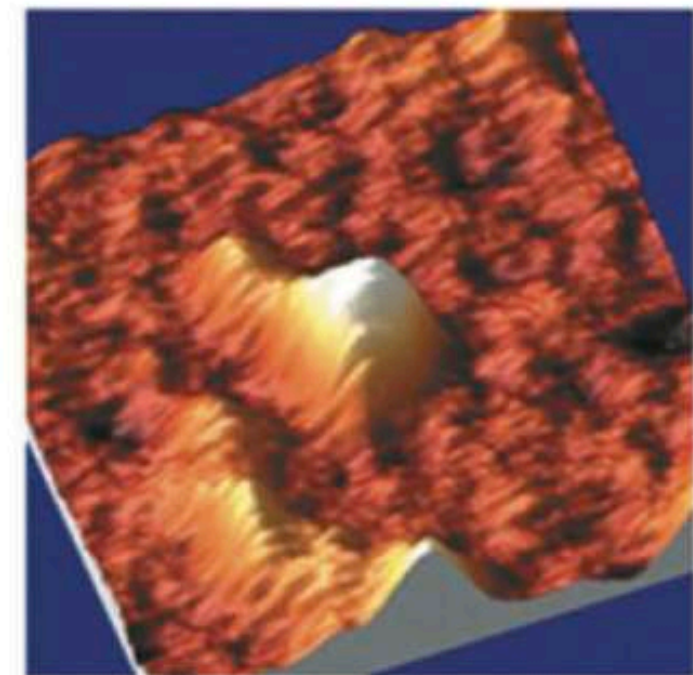
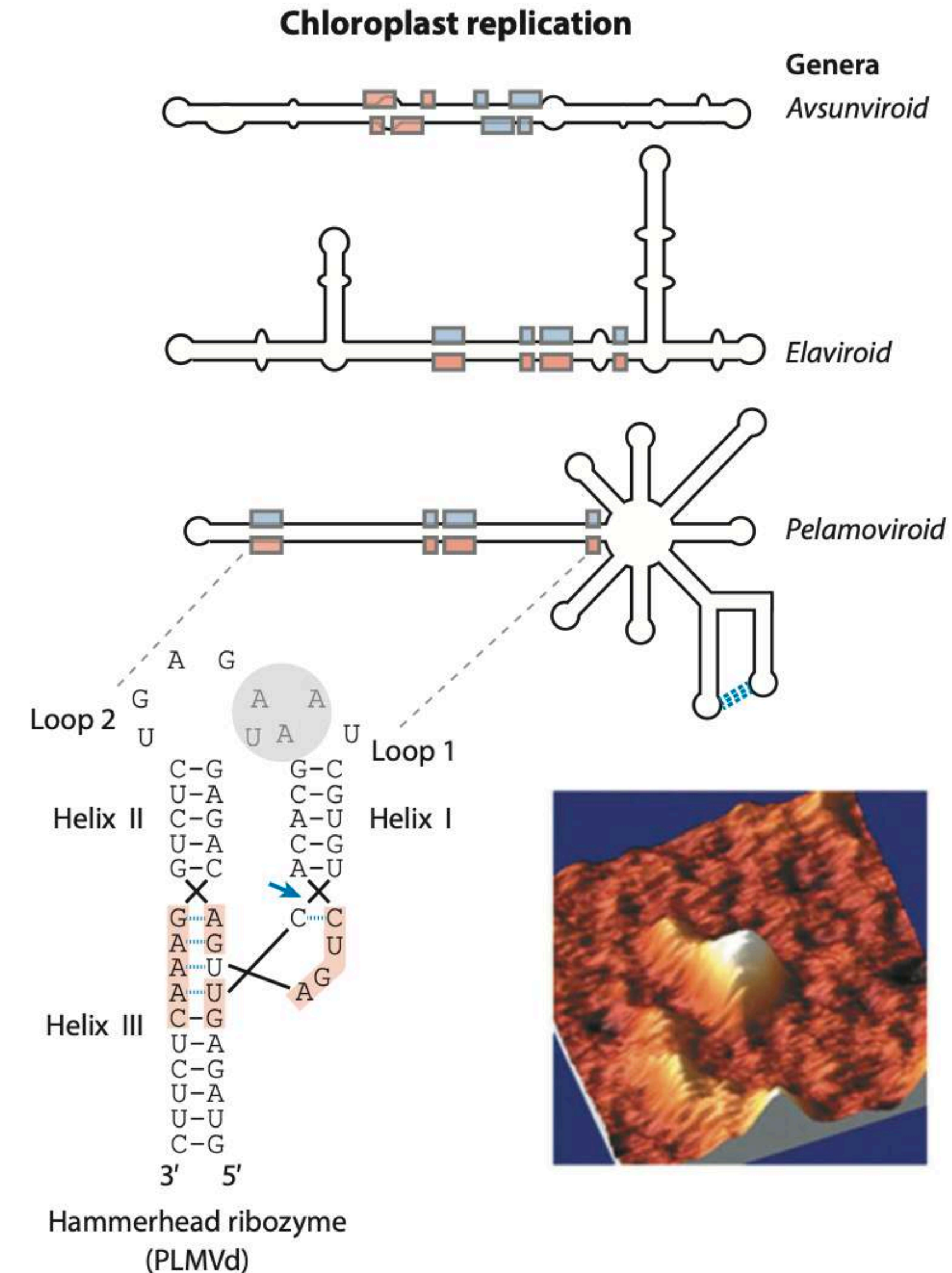
a Family *Pospiviroidae*



Hairpin I
(PSTVd)

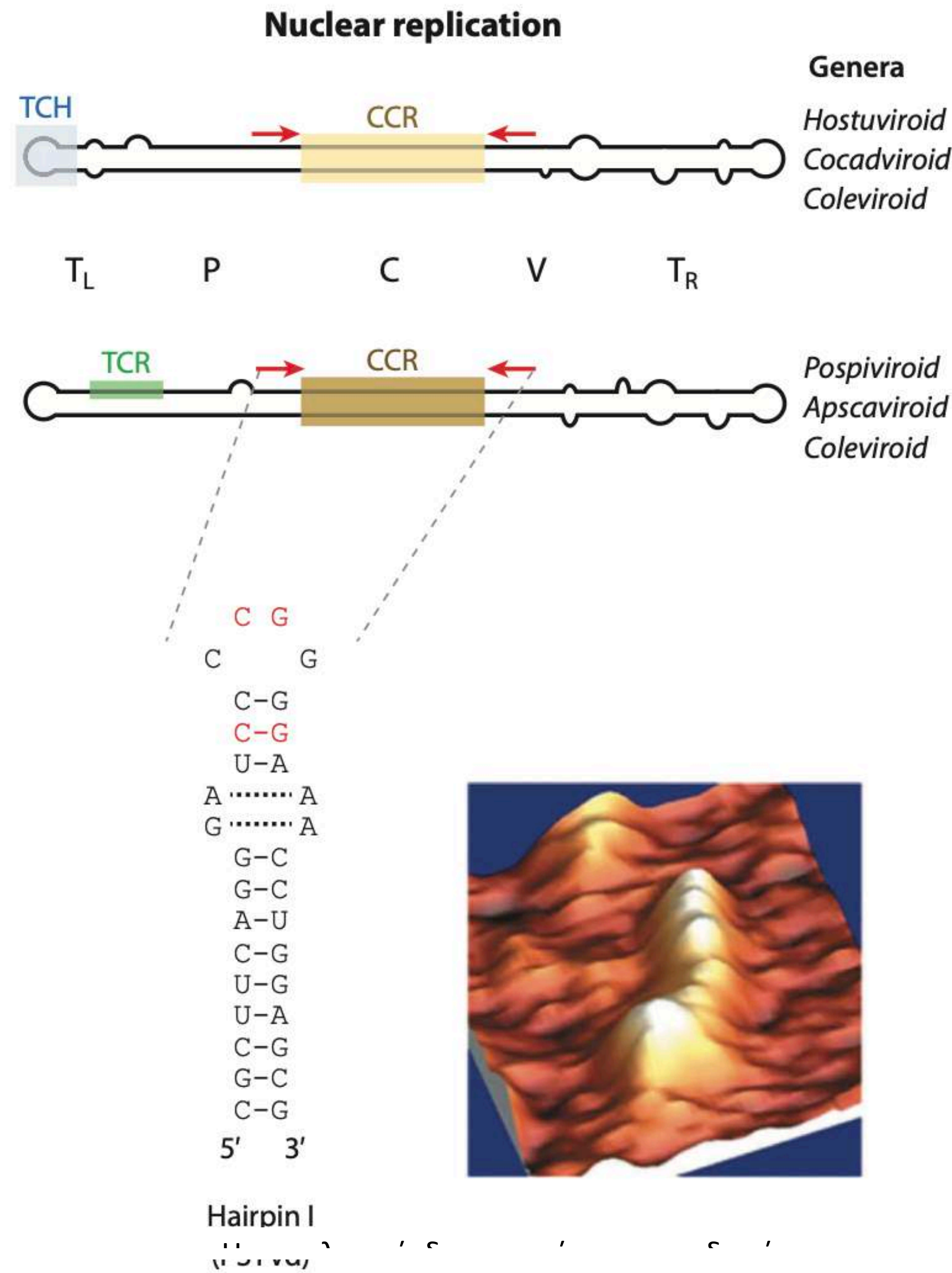


b Family *Avsunviroidae*

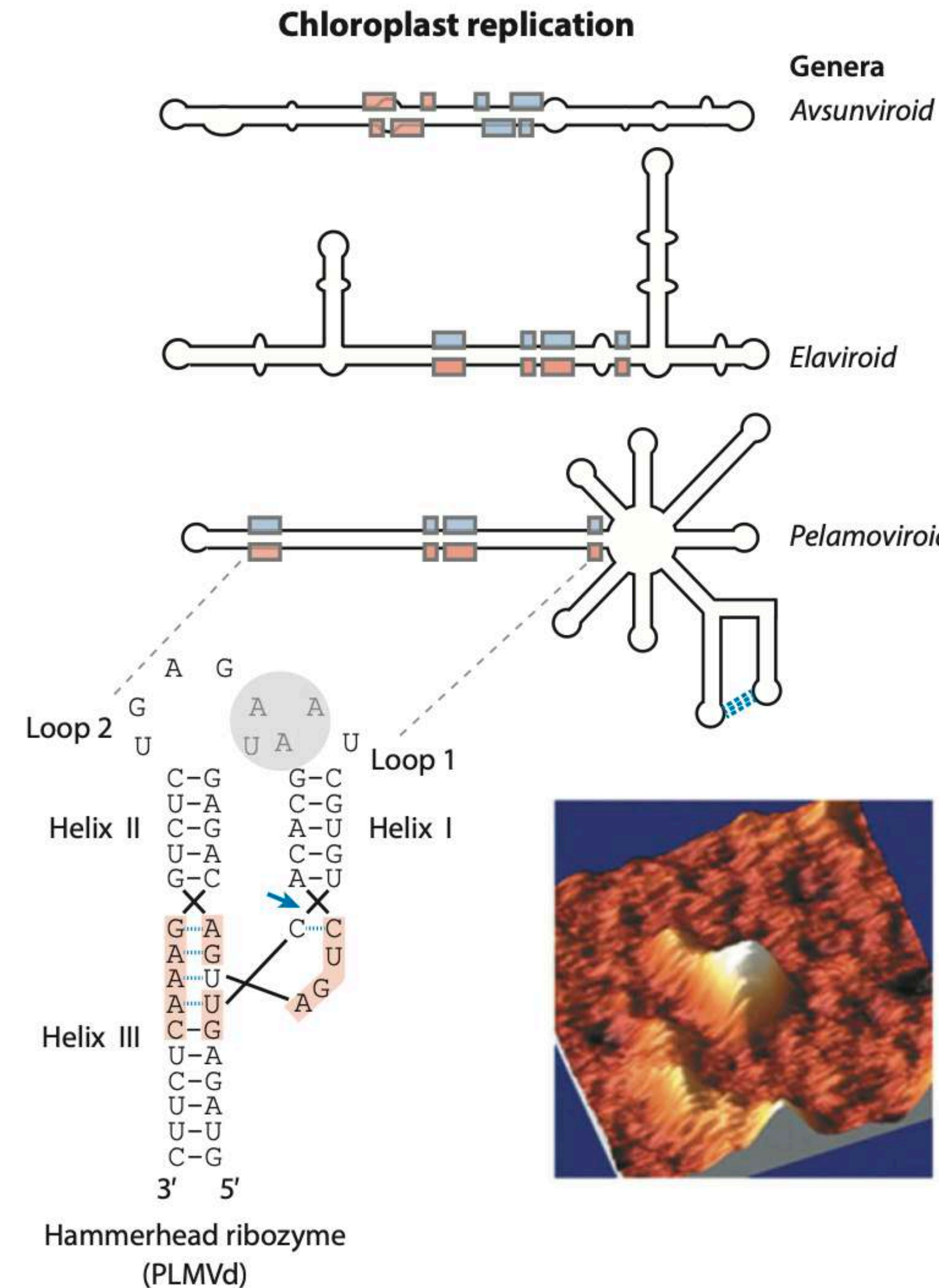


- Main structural and biological features of viroids classified in the families Pospiviroidae and Avsunviroidae. (a) Viroids classified in the family Pospiviroidae replicate in the nucleus and adopt a rod-like secondary structure containing conserved motifs with biological and taxonomic relevance: the CCR, the TCR, and the TCH (shaded). Members of each genus contain a specific CCR and the TCH (genera *Hostuviroid* and *Cocadviroid* and members of the genus *Coleviroid* with the smallest genome) or the TCR (genera *Apscaviroid* and *Pospiviroid* and members of the genus *Coleviroid* with the largest genome). The approximate locations of the C, P, V, TL, and TR domains with putative functional roles in several members of the family are indicated. Red arrows represent flanking inverted repeats that together with the upper part of the CCR can fold in the metastable hairpin I (bottom left), in which conserved nucleotides in all members of the family Pospiviroidae are marked in red. The 3D view of an atomic force micrograph of the plus circular PSTVd RNA (bottom right) shows bumps likely corresponding to internal loops or bulges in the proposed conformation. (b) Viroids classified in the family Avsunviroidae replicate in the chloroplast; may adopt rod-like (genus *Avsunviroid*), semibranching (genus *Elaviroid*), or branched (genus *Pelamoviroid*) secondary structures; and contain the sequences conserved in most natural hammerhead structures in plus and minus polarity strands (pink and blue boxes, respectively). The tertiary interaction between two loops identified in members of the genus *Pelamoviroid* is indicated with dashed lines. The hammerhead ribozyme structure (bottom left), characterized by tertiary interactions between nucleotides of loops 1 and 2 (gray background), is adopted only during replication and determines the self-cleavage of the viroid RNA

a Family Pospiviroidae



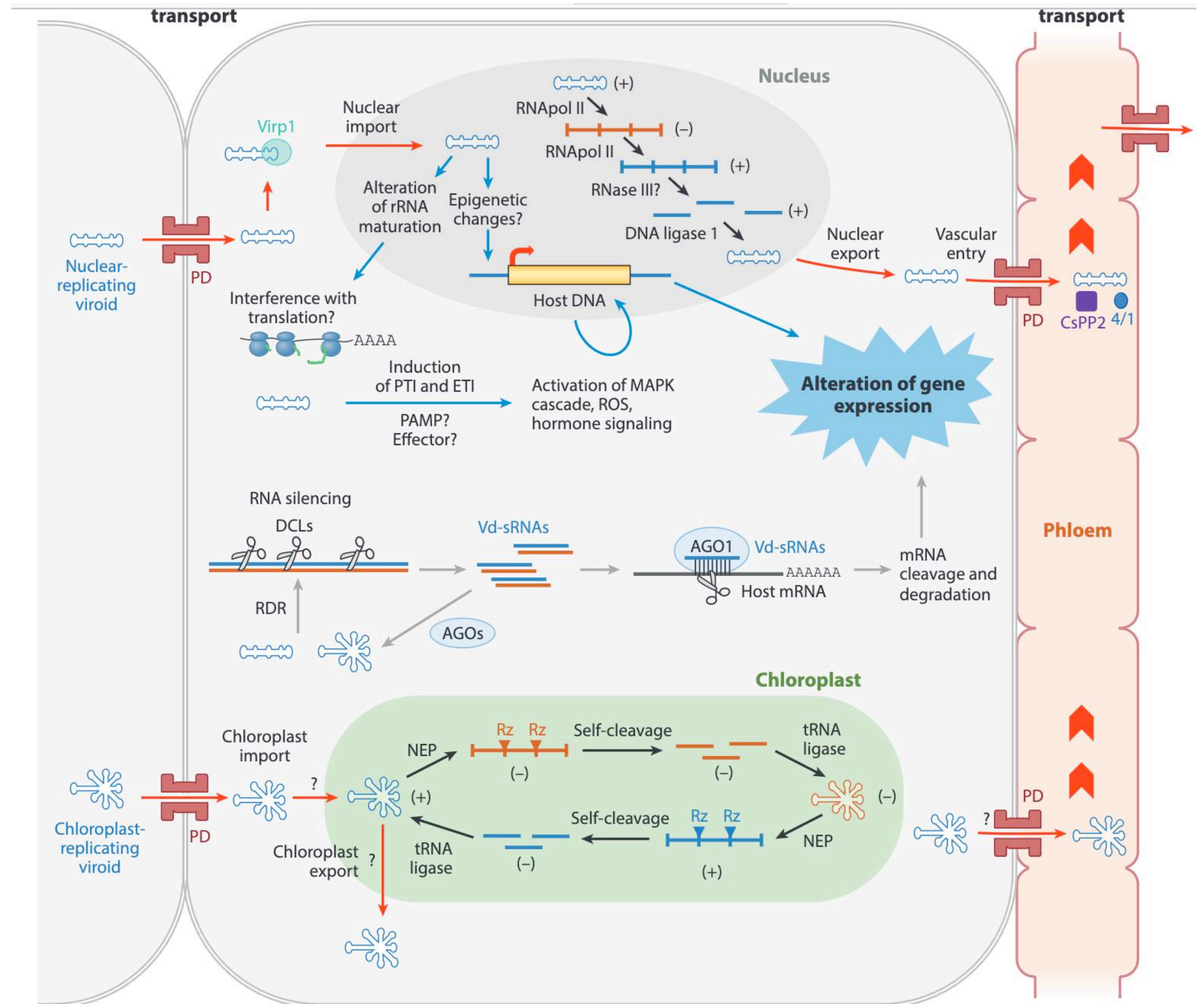
b Family Avsunviroidae



Αντιγραφή, κίνηση και προτεινόμενοι παθογενετικοί μηχανισμοί ιοειδών.

• Τα ιοειδή μετακινούνται από κύτταρο σε κύτταρο μέσω των πλαασμοδεσμάτων (PD) και συστηματικά μέσω του φλοιώματος, πιθανότατα αλληλεπιδρώντας με συγκεκριμένους παράγοντες ξενιστή. Μετά την είσοδο στο κύτταρο, τα ιοειδή μετακινούνται στον πυρήνα (οικογένεια *Rospiriviridae*) ή στον χλωροπλάστη (οικογένεια *Ansunviridae*), όπου αναπαράγονται μέσω ενός ασύμμετρου και συμμετρικού μηχανισμού κυλιόμενου κύκλου, αντίστοιχα. Τα κόκκινα βέλη υποδεικνύουν μονοπάτια διακίνησης ιών. Υποδεικνύονται οι πρωτεΐνες ξενιστή και οι Rzs που εμπλέκονται στους κύκλους αντιγραφής του ιού (μαύρα βέλη). Τα ιοειδή είναι ενεργοποιητές και στόχοι του μηχανισμού σίγησης του RNA (γκρι βέλη). Τα vd-sRNAs, που δημιουργούνται από τη δραστηριότητα τεμαχισμού των πρωτεϊνών DCL, φορτώνονται σε πρωτεΐνες AGO που μπορεί να στοχεύουν στην αποικοδόμηση των RNAs του ιού. Τα RDRs μπορεί να μεταμορφώσουν ορισμένα θραύσματα RNA του ιού σε επιπλέον υποστρώματα DCL. Τα vd-sRNAs μπορεί να καθοδηγούν το AGO1 στα συγγενή mRNA του ξενιστή για τη διάσπαση και την αποικοδόμησή τους, μειώνοντας έτσι την έκφραση ορισμένων γονιδίων ξενιστή και προκαλώντας συμπτώματα. Εναλλακτικές προτεινόμενες οδοί παθογένεσης (μπλε βέλη) είναι η ενεργοποίηση PTI και ETI, η παρεμβολή στη μετάφραση και η επαγωγή επιγενετικών αλλαγών στο DNA του ξενιστή. Συντομογραφίες: AGO, Argonaute; CsPP2, πρωτεΐνη φλοιώματος αγγουριού 2; DCL, Dicer-like; ETI, ανοσία που προκαλείται από τελεστές. MAPK, ενεργοποιημένη από μιτογόνο πρωτεϊνική κινάση; mRNA, αγγελιαφόρο RNA; NEP, πυρηνικά κωδικοποιημένη RNA πολυμεράση; PAMP, μοριακό σχέδιο που σχετίζεται με παθογόνο; PD, πλασμοδεσμάτα; PTI, ανοσία που προκαλείται από μοριακό πρότυπο που σχετίζεται με παθογόνο. RDR, RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση; RNAPol II, RNA πολυμεράση II; ROS, δραστικά είδη οξυγόνου. rRNA, ριβοσωμικό RNA; Rz, ριβοένζυμο; tRNA, μεταφορά

• RNA; vd-sRNA, μικρό RNA που προέρχεται από ιοειδή.RNA; vd-sRNA, viroid-derived small RNA.

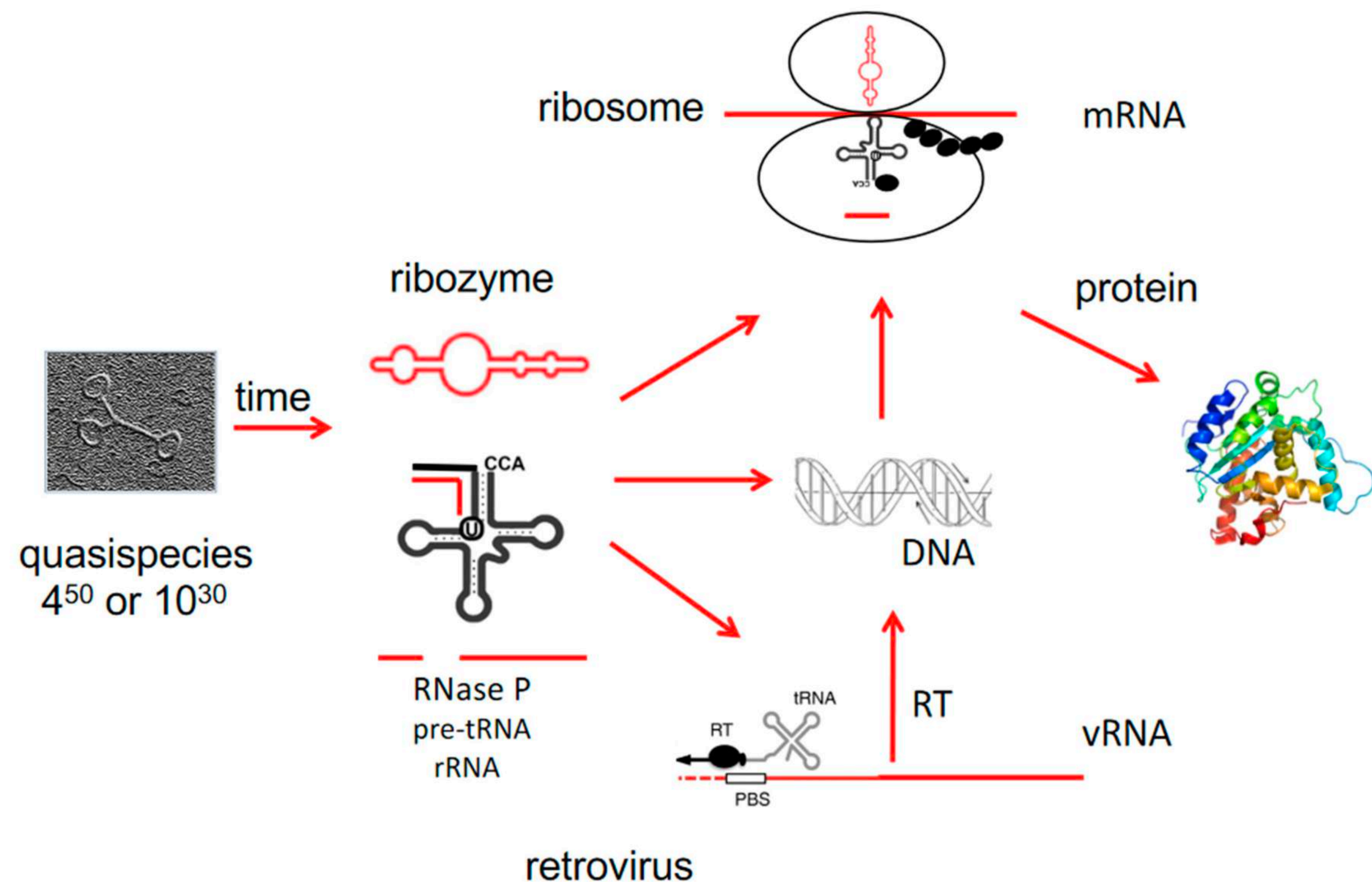


Ιοειδείς/ιοειδή RNA/ριβοένζυμα νωρίς κατά την εξέλιξη

Τα ριβοένζυμα (ένζυμα που βασίζονται στο RNA) πιθανότατα αποτελούν έναν από τους πρώτους τύπους βιομορίων που έχουν εξελιχθεί, όπως αποδεικνύεται από το γεγονός ότι δεν έχουν ικανότητα κωδικοποίησης και ότι η πρωτεϊνοσύνθεση σε όλη τη γνωστή κυτταρική ζωή στη Γη εξακολουθεί να βασίζεται στα ριβοένζυμα, το καταλυτικά ενεργό μέρος του ριβοσώματος. Ένα άλλο ριβοένζυμο επεξεργάζεται το πρόδρομο tRNA σε όλους τους κυτταρικούς οργανισμούς.

Υπάρχουν στοιχεία από αναλύσεις αλληλουχίας ότι τα ριβοένζυμα (καταλυτικά ενεργές δομές RNA) που μοιάζουν με ιοειδή, δηλαδή οι πρόγονοι των σημερινών ιοειδών (**viroids**) έχουν εξελιχθεί σε ιούς [10] και ότι κατά τη διάρκεια της εξέλιξης οι ιοί ή οι πρόγονοί τους προηγούνται της εμφάνισης του τελευταίου καθολικού κυτταρικού προγόνου (LUCA) [11].

Αυτές οι πρώιμες οντότητες που μοιάζουν με ιούς πιθανώς εξέλιξαν την πρωτεϊνική και DNA σύνθεση πριν από το πρωτο-κύτταρο.

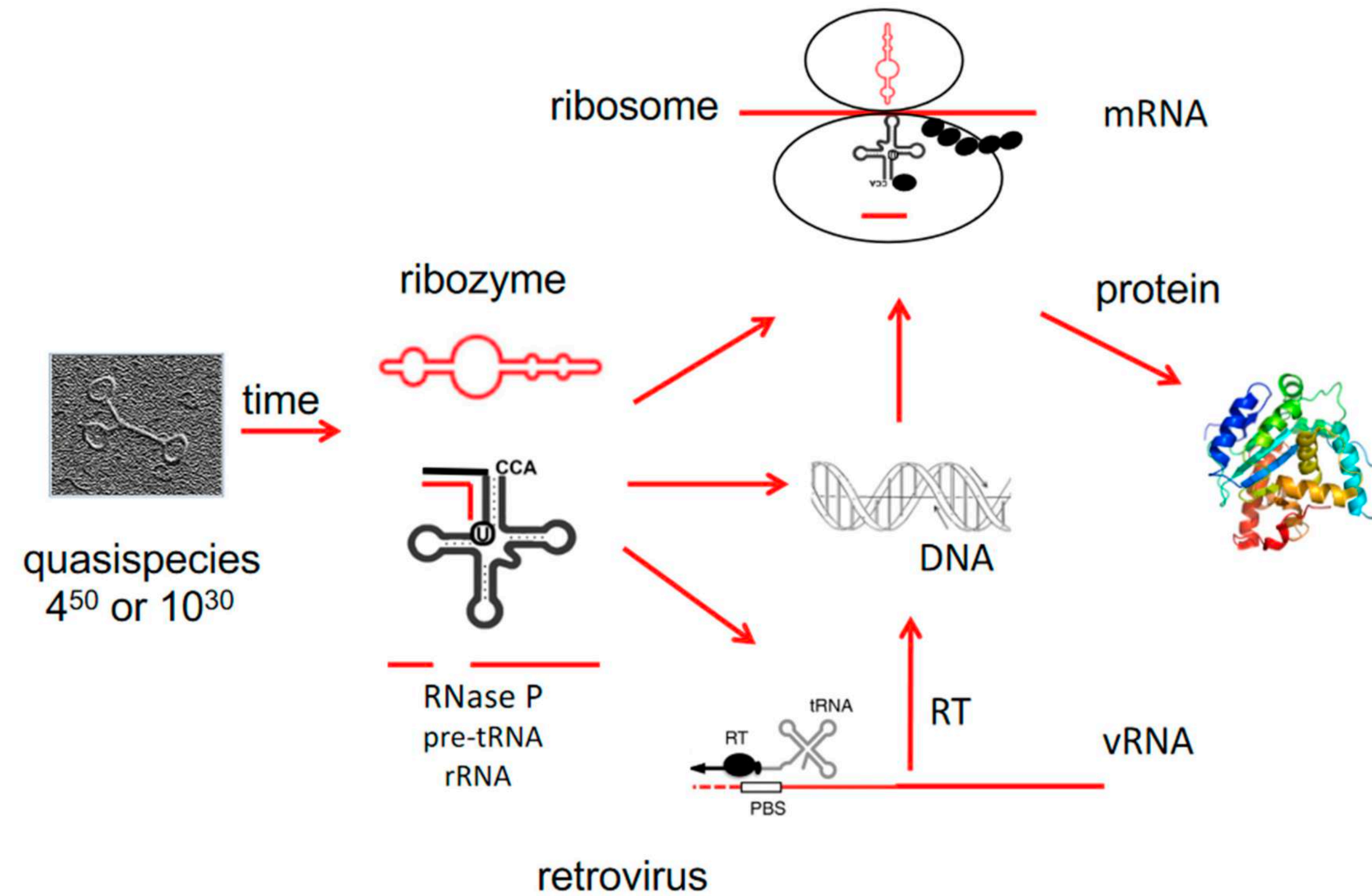


Wilson, D.S.; Szostak, J.W. In vitro selection of functional nucleic acids. *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 611–647.

Ιοειδείς/ιοειδή RNA/ριβοένζυμο νωρίς κατά την εξέλιξη

Η εικόνα δείχνει ένα Ιοιδές/ριβοένζυμο και τα tRNA μπορούν να σχηματιστούν αυθόρμητα από ένα **οιονό είδος** (quasispecies) πολλών μορίων RNA, και τα δύο παρουσιάζουν ενζυματικές δραστηριότητες.

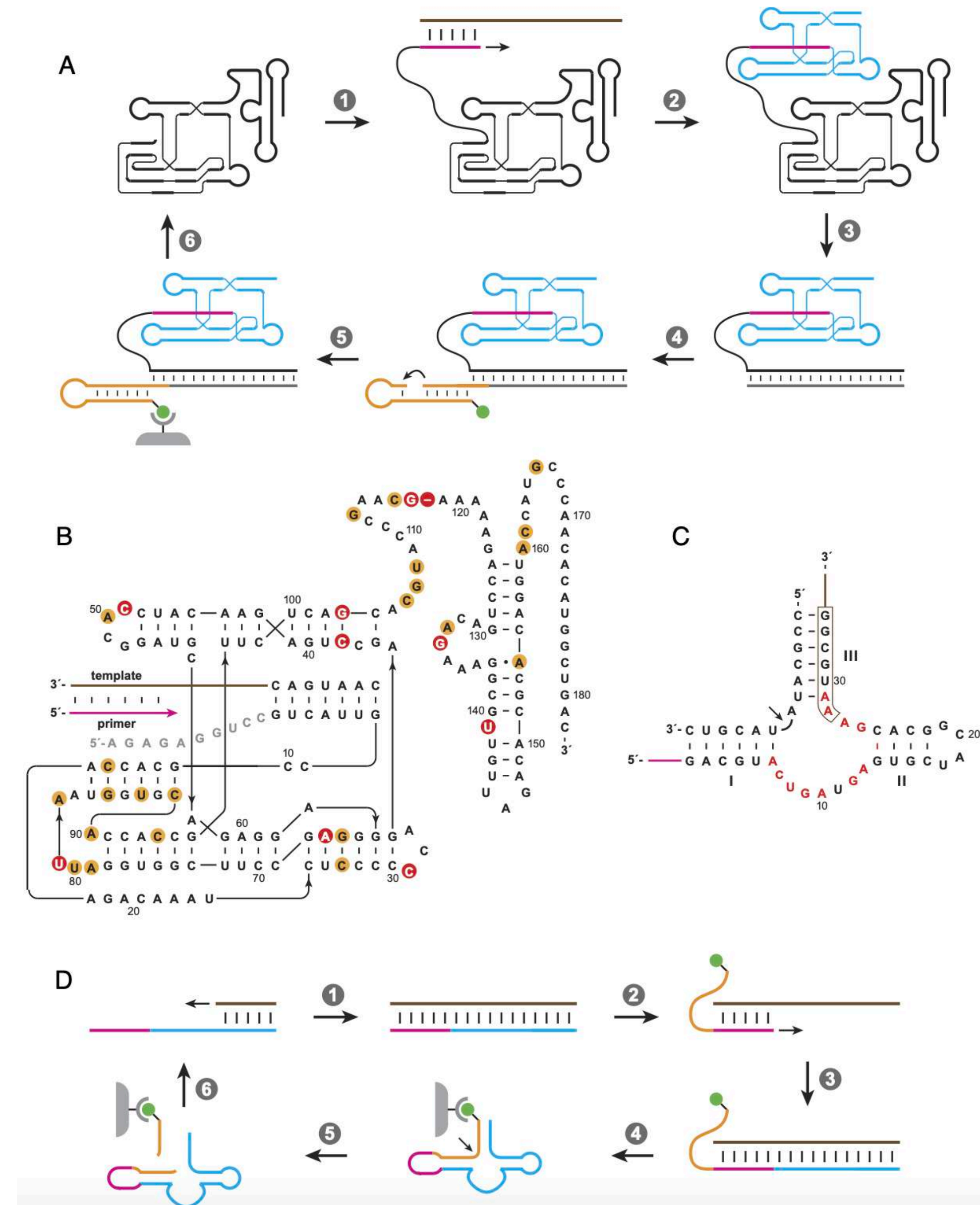
Το ριβοένζυμο RNase P επεξεργάζεται το pre-tRNA στο μικρότερο tRNA, το DNA μπορεί να προκύψει από το RNA χωρίς αντίστροφη μεταγραφή (RT), η πρωτεϊνική σύνθεση στα ριβοσώματα απαιτεί ριβοένζυμο ως βασικά συστατικά (το mRNA είναι αγγελιοφόρο RNA, το vRNA είναι ιικό RNA). Το PBS είναι η θέση δέσμευσης εκκινητών για σύνδεση tRNA)



RNA-διαμεσολαβούμενη εξέλιξη του καταλυτικού RNA

RNA

Εικ. 1. Κατευθυνόμενη εξέλιξη ριβοζύμων πολυμεράσης και σφυροκεφαλής. (A) Σχήμα για επιλεκτική ενίσχυση ριβοζύμων πολυμεράσης που συνθέτουν ένα λειτουργικό ριβοένζυμο λιγάσης κατηγορίας I. 1) Προσκόλληση στην πολυμεράση ενός εκκινήτη RNA (ματζέντα), που συνδέεται με ένα πρότυπο RNA (καφέ) που κωδικοποιεί τη λιγάση κατηγορίας I. 2) επέκταση του εκκινήτη με πολυμερισμό NTPs (κυανό). 3) αντίστροφη μεταγραφή της πολυμεράσης. 4) προσάρτηση ενός υποστρώματος RNA για απολίπωση (πορτοκαλί) στο 3' άκρο του cDNA πολυμεράσης και υβριδισμός αυτού του υποστρώματος σε μήτρα 5'-βιοτινυλιωμένου (πράσινου) RNA που είναι συνδεδεμένο με το άλλο υπόστρωμα για σύνδεση (πορτοκαλί). 5) σύλληψη των απολίπωμένων προϊόντων σε μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης (γκρι). και 6) Ενίσχυση και μεταγραφή PCR για τη δημιουργία απογόνων πολυμερασών. (B) Αλληλουχία και δευτεροταγής δομή της 71-89 RNA πολυμεράσης. **Οι πορτοκαλί κύκλοι υποδεικνύουν μεταλλάξεις που προέκυψαν κατά την εξέλιξη που οδήγησαν στην πολυμεράση 52-2 (17).** Οι κόκκινοι κύκλοι υποδεικνύουν μεταλλάξεις που προέκυψαν από την πολυμεράση 52-2 έως την 71-89. νουκλεοτίδια σε γκρι προστέθηκαν κατά την εξέλιξη της πολυμεράσης. (Γ) Αλληλουχία και δευτερογενής δομή του ριβοενζύμου hammerhead που συνδέεται με ένα υπόστρωμα RNA. Τα στελέχη I-III επισημαίνονται, τα αυστηρά διατηρημένα νουκλεοτίδια φαίνονται με κόκκινο χρώμα και οι περιοχές δέσμωσης εκκινήτων 5' και 3' εμφανίζονται με ματζέντα και καφέ, αντίστοιχα. Το βέλος υποδεικνύει τη θέση διάσπασης του υποστρώματος. (D) Σχέδιο για επιλεκτική ενίσχυση καταλυόμενη από RNA ριβοενζύμων hammerhead που διασπούν ένα προσκολλημένο υπόστρωμα RNA. 1) Επέκταση ενός εκκινήτη RNA (καφέ) με πολυμερισμό των NTPs σε ένα πρότυπο RNA που κωδικοποιεί το HHR- RNA. 2) διαχωρισμός κλώνων και υβριδισμός ενός δεύτερου εκκινήτη RNA (ματζέντα), με προσαρτημένο υπόστρωμα 3'-βιοτινυλιωμένου RNA. 3) επέκταση του δεύτερου εκκινήτη για τη δημιουργία HHR+ RNA. 4) σύλληψη βιοτίνης σε μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης. 5) διάσπαση του προσαρτημένου υποστρώματος RNA, απελευθερώνοντας την κεφαλή του σφυριού από τα σφαιρίδια. 6) αντίστροφη μεταγραφή, ενίσχυση PCR και μπροστινή μεταγραφή για να ξεκινήσει ο επόμενος γύρος επιλεκτικής ενίσχυσης.

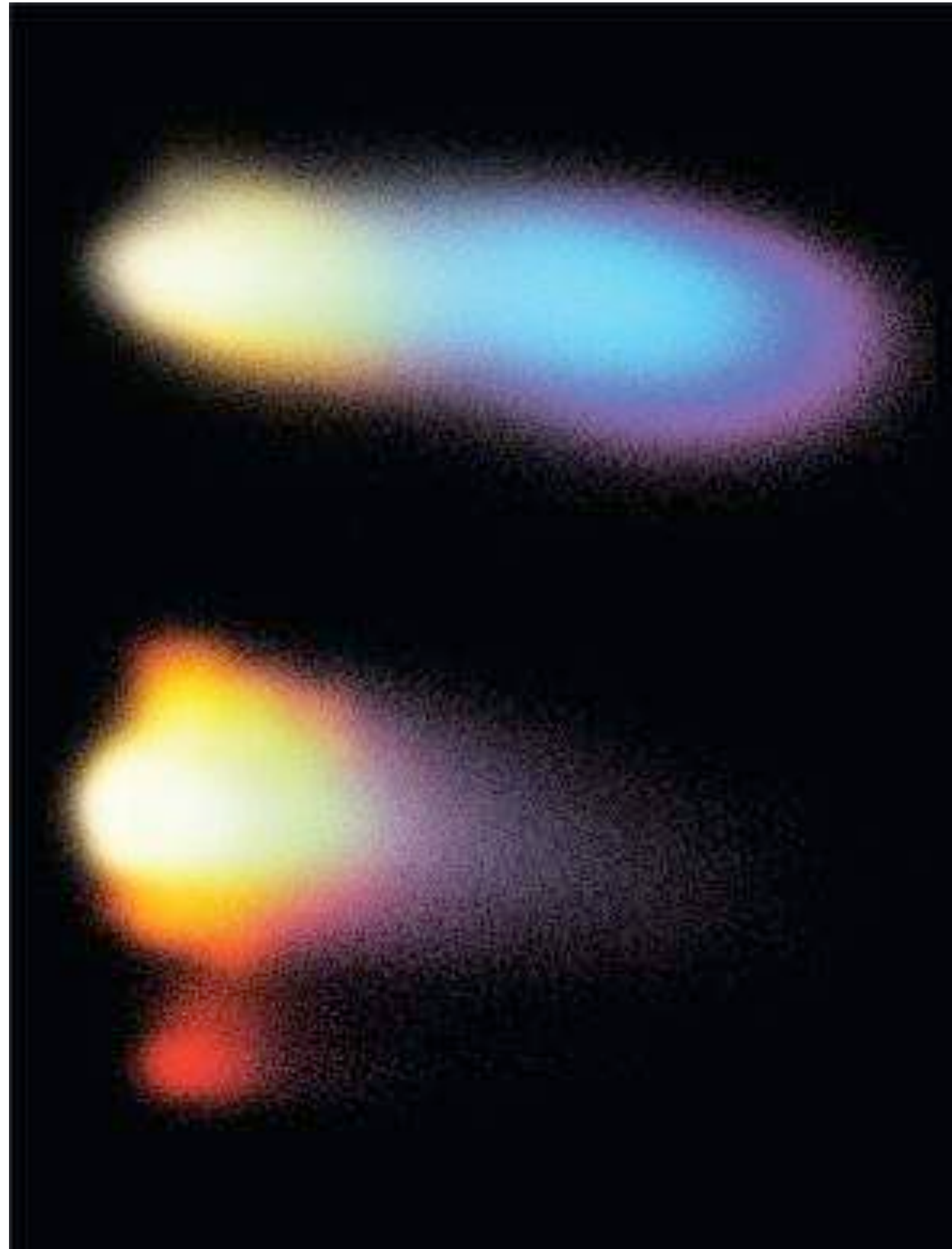


Το ριβοένζυμο hammerhead

- Η σφυροκεφαλή είναι ένα μικρό, αυτοδιασπώμενο RNA που περιέχει ~34 νουκλεοτίδια, 12 από τα οποία είναι αυστηρά διατηρημένα από bakt;hria (19, 20). Αυτό το μέγεθος βρέθηκε ότι τοποθετεί την κεφαλή του σφυριού πάνω από το όριο σφάλματος για την πολυμεράση χαμηλής πιστότητας, αλλά εντός του ορίου σφάλματος για την πολυμεράση υψηλής πιστότητας. Στην παρούσα μελέτη, οκτώ γύροι καταλυόμενης από RNA εξέλιξης πραγματοποιήθηκαν παράλληλα χρησιμοποιώντας τις δύο πολυμεράσες. Κατά τη διάρκεια κάθε γύρου, το RNA της σφυροκεφαλής αντιγραφόταν από την πολυμεράση για να δώσει το συμπλήρωμά της, το οποίο με τη σειρά του αντιγραφόταν από την πολυμεράση για να δημιουργήσει νέα ριβόζυμα hammerhead, τα οποία απαιτούνταν για να καταλύσουν μια αντίδραση διάσπασης RNA. Έτσι, η καταλληλότητα των εξελισσόμενων σφυροκεφαλών καθορίστηκε τόσο από την αναπαραγωγικότητα όσο και από την καταλυτική τους δραστηριότητα. Μετά από κάθε γύρο εξέλιξης, τα RNA μεταγράφηκαν αντίστροφα και ενισχύθηκαν PCR, τα οποία παρείχαν ένα αρχείο υλικών που αναλύθηκαν με βαθιά αλληλουχία για να προσδιοριστεί η πορεία της εξέλιξης της σφυροκεφαλής.

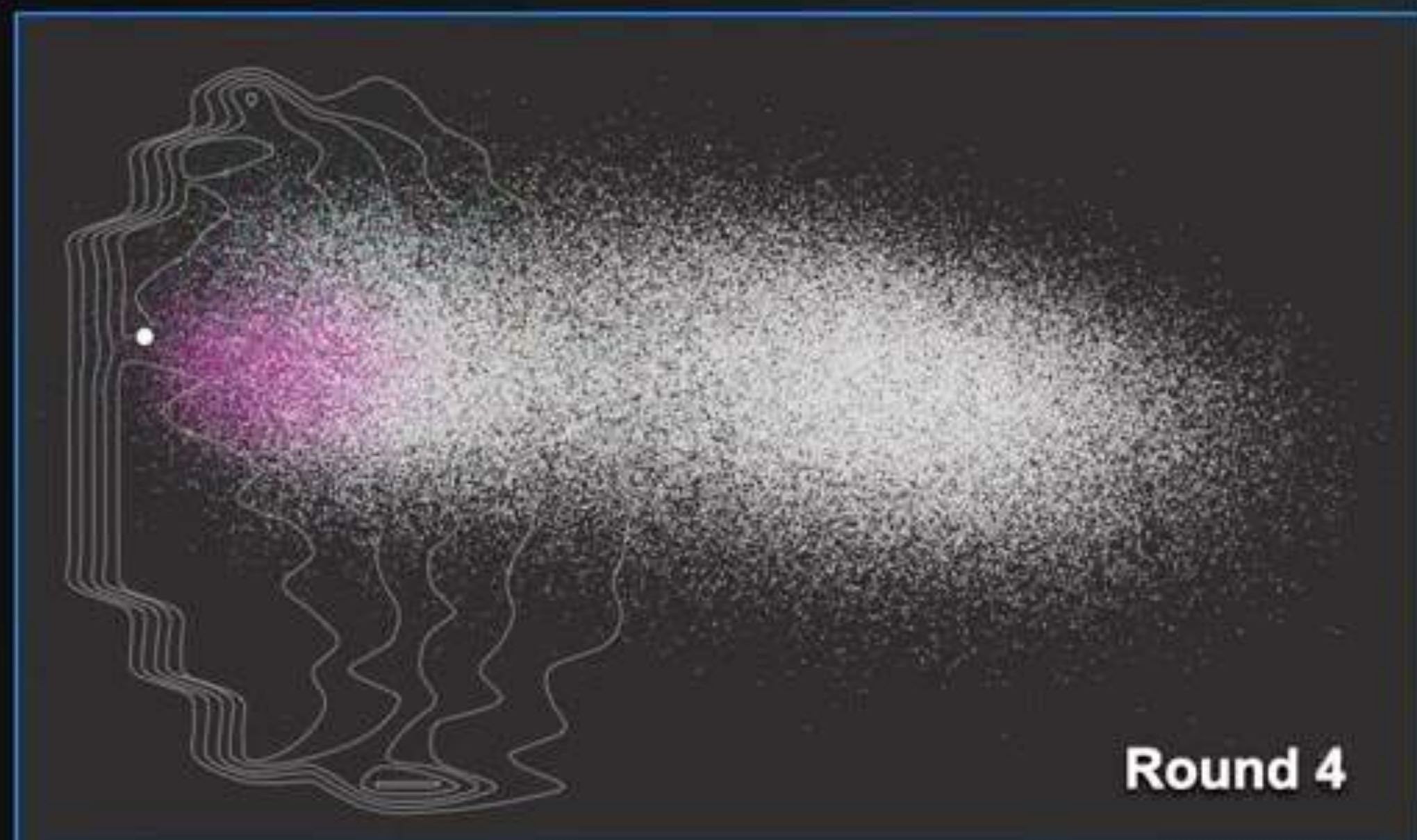
RNA-διαμεσολαβούμενη εξέλιξη του καταλυτικού RNA

Οι αλληλουχίες hammerhead που αντιγράφονται από την πολυμεράση χαμηλότερης πιστότητας απομακρύνονται από την αρχική τους αλληλουχία RNA (επάνω) και χάνουν τη λειτουργία τους με την πάροδο του χρόνου. Οι σφυροκέφαλοι που καταλύονται από την υψηλότερης πιστότητας πολυμεράση διατηρούν τη λειτουργία και εξελίσσουν καλύτερες ακολουθίες (κάτω).

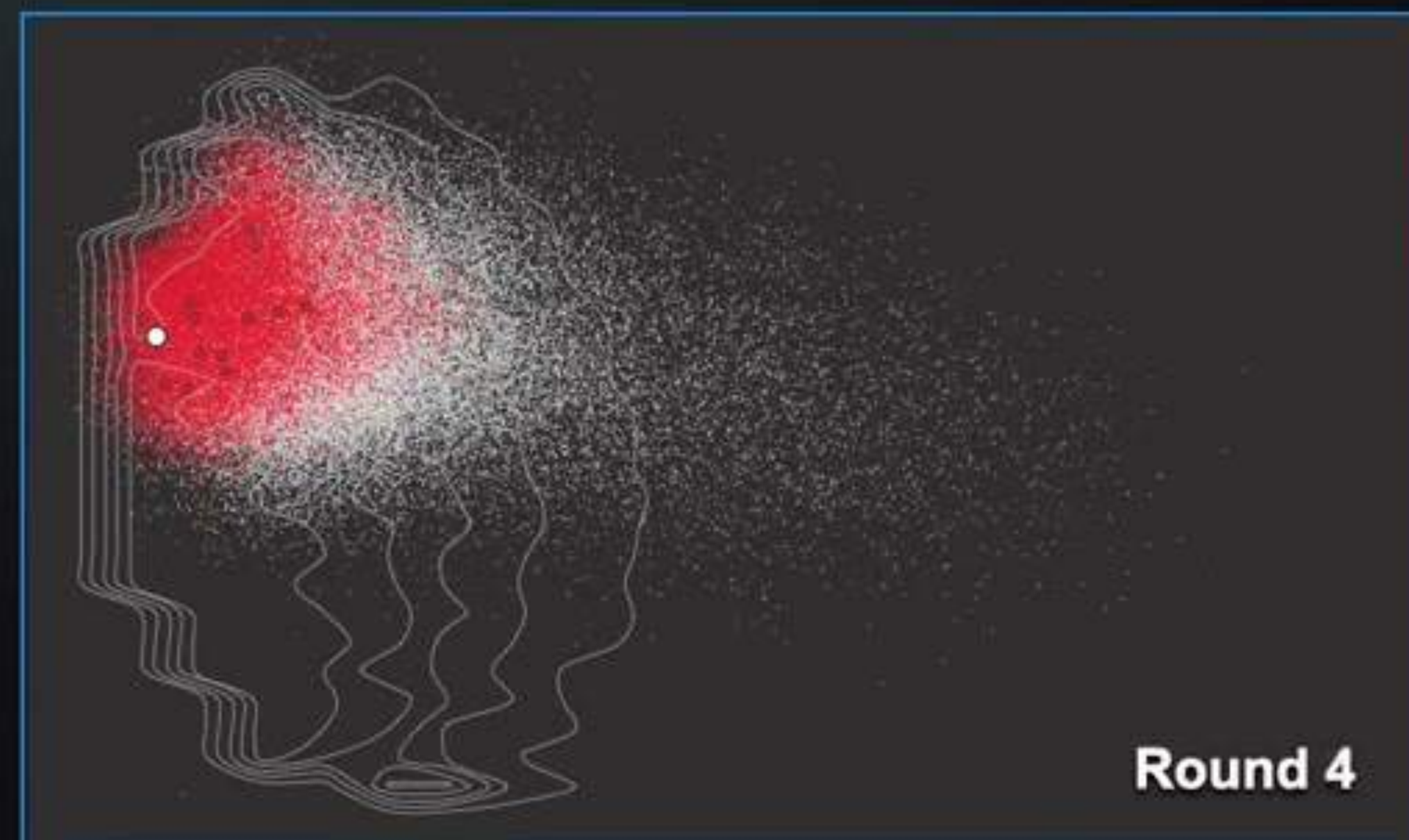


Κατά τους πιο πρόσφατους γύρους κατευθυνόμενης εξέλιξης, που αναφέρονται εδώ, οι πολυμεράσες χρειάστηκε να συνθέσουν τη λιγότερη κατηγορία I. Αυτή η απαίτηση άσκησε άνευ προηγουμένου πίεση επιλογής στην ακρίβεια της σύνθεσης επειδή ακόμη και λίγα λάθη θα οδηγούσαν σε ένα ανενεργό προϊόν. Ως συνέπεια αυτών των προσπαθειών, η πιστότητα της σύνθεσης βελτιώθηκε σημαντικά, καθιστώντας δυνατή, για πρώτη φορά, τη χρήση ενζύμων RNA για την αντιγραφή και την εξέλιξη άλλων λειτουργικών RNA. Ως επίδειξη αυτής της ικανότητας, τόσο τα προηγούμενα χαμηλής πιστότητας όσο και τα νεότερα υψηλής πιστότητας ριβοένζυμα πολυμεράσης προκλήθηκαν να εξελίξουν το ριβοένζυμο hammerhead.

52-2 polymerase



71-89 polymerase



Συμπερασματικά I

Η υπόθεση του Diener το 1989[31] είχε προτείνει ότι οι μοναδικές ιδιότητες των ιοειδών τα καθιστούν πιο εύλογα μακρομόρια από τα ιντρόνια ή άλλα RNA που θεωρούνταν στο παρελθόν ως πιθανά «ζωντανά λείψανα» ενός υποθετικού, προκυτταρικού κόσμου RNA. Αν ναι, τα ιοειδή έχουν λάβει σημασία πέρα από την ιολογία των φυτών για την εξελικτική θεωρία, επειδή οι ιδιότητές τους τα καθιστούν πιο εύλογους υποψηφίους από άλλα RNA για να εκτελέσουν κρίσιμα βήματα στην εξέλιξη της ζωής από αβιοτική ύλη (αβιογένεση). Η υπόθεση του Diener ξεχάστηκε ως επί το πλείστον μέχρι το 2014, όταν αναβιώθηκε σε ένα άρθρο ανασκόπησης από τους Flores et al.,[29] στο οποίο οι συγγραφείς συνόψισαν τα στοιχεία του Diener που υποστηρίζουν την υπόθεσή του ως:

- Μικρό μέγεθος των ιοειδών, που επιβάλλεται από την επιρρεπή σε σφάλματα αντιγραφή.
- Η υψηλή περιεκτικότητά τους σε γουανίνη και κυτοσίνη, η οποία αυξάνει τη σταθερότητα και την πιστότητα αντιγραφής.
- Η κυκλική τους δομή, η οποία εξασφαλίζει πλήρη αντιγραφή χωρίς γονιδιωματικές ετικέτες.
- Ύπαρξη δομικής περιοδικότητας, η οποία επιτρέπει τη σπονδυλωτή συναρμολόγηση σε διευρυμένα γονιδιώματα.
- Η έλλειψη ικανότητας κωδικοποίησης πρωτεΐνης, που συνάδει με έναν βióτοπο χωρίς ριβόσωμα.
- Η αντιγραφή μεσολαβείται σε μερικούς από ριβοένζυμα - το δακτυλικό αποτύπωμα του κόσμου του RNA.

Η παρουσία, σε υπάρχοντα κύτταρα, RNA με μοριακές ιδιότητες που προβλέπονται για RNA του κόσμου του RNA αποτελεί ένα άλλο ισχυρό επιχείρημα που υποστηρίζει την υπόθεση του κόσμου του RNA. Ωστόσο, η προέλευση των ίδιων των ιοειδών από αυτόν τον κόσμο του RNA έχει τεθεί υπό αμφισβήτηση από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της ανακάλυψης ρετροζύμων (μια οικογένεια ρετροτρανσποζονίων που πιθανόν αντιπροσωπεύει τους προγόνους τους) και την πλήρη απουσία τους από οργανισμούς εκτός των φυτών (ειδικά την πλήρη απουσία τους από προκαρυώτες, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων και των αρχαίων).

Annual Review of Virology

Advances in Viroid-Host Interactions

Beatriz Navarro,¹ Ricardo Flores,^{2,*} and Francesco Di Serio¹

¹ Institute for Sustainable Plant Protection, National Research Council of Italy, I-70126 Bari, Italy; email: beatriz.navarro@ipsp.cnr.it

² Institute of Molecular and Cellular Biology of Plants (UPV-CSIC), Polytechnic University of Valencia, 46022 Valencia, Spain

Συμπερασματικά II

Το μήνυμα που δίνουμε εδώ είναι ότι η αρχή της ζωής πρέπει να ήταν απλή και ότι τα RNA που μοιάζουν με ιοειδή είναι καλοί υποψήφιοι για τα πρώτα βιομόρια που μοιάζουν με τη ζωή. Τα ιοειδή είναι οι μικρότερες γνωστές οντότητες που μπορούν να αναπαραχθούν και να υποστούν τη δαρβινική εξέλιξη, έναν από τους ορισμούς της ζωής. Τα σημερινά ιοειδή απαιτούν κύτταρα ξενιστές για την αντιγραφή τους, αλλά οι πρόγονοί τους μπορεί να ήταν ικανοί για ανεξάρτητη αναπαραγωγή και εξέλιξη πριν από την εμφάνιση της κυτταρικής ζωής. Το μικρό τους μέγεθος, η ευελιξία, η μεταλλαξιγένεση και η αυτονομία τους, βασισμένα αποκλειστικά σε δομικές πληροφορίες απουσία γενετικού κώδικα και πρωτεϊνοσύνθεσης, είναι χαρακτηριστικά που χρειάζονται για άλλες μορφές ζωής, όπως παραδειγματίζονται από τα ριβοσώματα των οποίων η καταλυτική δραστηριότητα εξαρτάται από δύο ριβόζυμα. Το ένα εκτελεί σύνθεση πεπτιδίων, το άλλο, η RNase P, επεξεργάζεται το ριβοσωμικό RNA και κόβει το tRNA στην τελική του δομή. Είναι ο βασικός μεταφορέας των αμινοξέων όπως απαιτείται από τον γενετικό κώδικα του mRNA. Κατά συνέπεια, προτείνουμε ότι τα ιοειδή μπορεί να χρησιμεύσουν ως μοντέλα για πρώιμες μορφές ζωής στη Γη. Ανάλογα δομικά στοιχεία με καταλυτικές λειτουργίες που απαιτούνται για την αντιγραφή μπορεί να υπάρχουν σε άλλους πλανήτες και ουράνια σώματα καθώς και σε εξωπλανήτες. Οι επίγειες οντότητες που μοιάζουν με ζωή με βασικές ιδιότητες των απλών ριβοζύμων ή ιοειδών θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι έχουν εξελιχθεί αλλού. Έτσι, τα ιοειδή μπορούν να θεωρηθούν ως κύριοι υποψήφιοι ή μοντέλα στην αναζήτηση ανάλογων οντοτήτων εκτός της Γης στο σύμπαν.