



מסטר א' תשפ"ה - 0421-4129 - ביולוגיה מולקולרית למתקדמים עולם הרנ"א

בצד העברת המידע התורשתי מדנ"א לחלבונים יש ל-RNA תפקידי מפתח רבים. בשנות השישים טענו חוקרים שקיפול גלובולרי של סיבי הרנ"א עשוי ליצור כיסים ושקעים מותאמים לקישור מטבוליטים ואולי ליצור גם אתרים קטליטיים. תחזיות אלו אוששו עם גילוי השעתוק ההופכי של דנ"א על תבנית רנ"א, רמז לקדמוניותו הרנ"א, ובהמשך גילוי מולקולות רנ"א קטליטיות, תחילה ריבוזימים משחברי עצמם ובהמשך ריבוזימים טבעיים או מהונדסים מזרחי מגוון רחב של ריאקציות אנזימתיות. כך נולדה השערת "עולם הרנ"א" לפיה מולקולות רנ"א ומשכפלות עצמן קדמו בראשית החיים לחלבונים ולדנ"א והיוו את המחוללים הראשוניים של האבולוציה הדארווינית. הסתבר בהמשך שרנ"א קטליטי מהווה גם אתר יצירת הקשר הפפטידי בריבוזום ואחראי לשחבור מולקולות mRNA יוקריוטיות בספלייסוזום, תהליך בו מסולקים האינטרוני שבין הקטעים המתורגמים. לריבוזימים הטבעיים שהתגלו רפרטואר מצומצם, לא מתאים לקיום חיים. ייתכנות קיומם של ריבוזימים שזירזו את המגוון הנחוץ אבל נכחדו נבחנה בשיטת SELEX בה בודדו ממאגרי ענק אקראיים רצפים נדירים מזרחי ריאקציה מבוקשות כ חיבור בסיס רנ"א לשייר הסוכר או הוספת חומצה אמינית לקצה רנ"א או שכפול עצמוני. גודלם הצנוע של הריבוזימים הטבעיים או המהונדסים הפכו אותם לפרדיגמות מועילות בחקר יחסי מבנה-תפקוד של רנ"א. שתי שיטות לקביעת רצף סימולטנית של כלל הטרנסקריפטום או חלקים נבחרים ממנו היוו פריצת דרך נוספת: 1. שילוב שיעתוק הופכי וריצוף בתפוקה גבוהה (RNA-seq) ו-2. הזרמת מולקולת RNA דרך נקבים זעירים בהם נקרא בתורו כל אחד מבסיסי השרשרת (Nanopore sequencing). מכך הסתבר בין היתר שגנום האדם משועתק כמעט במלואו ומספר סוגי הרנ"א התאי גדול לאין שיעור ממה שהניחו בעבר. רבים מסוגים אלה מתפקדים בשלבי בקרת הביטוי הגנטי וכמה נקשרו לתסמונות אוטואימוניות וסרטניות. למרות זאת אולם נותר עדיין לזהות ולאפיין מבנית ותפקודית חלקים נרחבים של טרנסקריפטומי האדם, החי והצומח, במצבים נורמליים ופתולוגיים. סגירת פער ידע זה מחייבת ידיעת עקרונות מבנה ותפקוד ה-RNA ובקיאות בשיטות המחקר הרלבנטיות, ובכך נעסוק. תחילה נדון בעקרונות מבנה של מולקולות הרנ"א, אחר כך במוצאו המשוער בראשית החיים, בעולם נכחד שקדם להופעת החלבונים המתורגמים וגנומי הדנ"א. בהמשך נדון ברכיבים קריטיים של מולקולות רנ"א נוכחיות (extant) הכוללים את אתר



יצירת הקשר הפפטידי (Peptidyl transfer center, PTC) ואת המרכז הקטליטי בספלייסוזום (Spliceosome). עתיקותם אתרים נרמזת ע"י נוכחות הראשון בשכבה ריבוזום קדומה ודמיון בין האתר הקטליטי של השני לסוג ריבוזים משחבר עצמו (self-splicing group II intron) שנפוץ בחיידקים ובאברוני תאי פרוטוזואה, פטריות וצמחים. עפ הופעת החלבונים המתורגמים וגנומי הדנ"א נוספו לרנ"א משימות חדשות בבקרת הביטוי הגנטי, בשכפול דנ"א, שעתוק מולקולות הרנ"א ושיחבורן בתרגום החלבונים ובהכוונתם ליעדיהם בתא ומחוצה לו. כמו כן נדון בטכנולוגיות שמאפשרות לקבוע בו זמנית את המבנים ואת האינטראקציות הדינמיות של כלל מולקולות ה-RNA בתא, לעקוב אחר שינוען ליעדיהן, מהלך תרגומן, וסילוקן או השתקתן. הן כוללות שיטות ריצוף RNA בתפוקה גבוהה כמו RNA-seq בה מבוצעים כלל סוגי ה-RNA התאי או תת-סדרות שלו ורצפיהם מפוענחים ע"י הפיכתן לעותקי DNA (cDNA) שמרוצפים בו-זמנית. בשיטת קביעה ישירה שאינה מצריכה הפיכה ל cDNA מוזרמים סיבי ה-RNA דרך חיישנים זעירים בהם מזוהים בסיסי סיבי ה-RNA בזה אחר זה (Nanopore sequencing). ב ניתן למדל בו-זמנית גם את המבנים המרחביים של הרצפים בשילוב התמרות כימיות של אזורי רנ"א גלויים ואיתורם כמוטציות ברצפים הנבדקים כמתואר לעיל..

פרקי הקורס

עקרונות מבנה הרנ"א

קביעת מבנה רנ"א

ניבוי מבנה רנ"א

רנ"א קטליטי

יחסי מבנה תפקוד של ריבוזימים טבעיים ומלאכותיים

השערת עולם הרנ"א

נזקי רנ"א ותיקונם

התמרות בסיסים

קשרי רנ"א חלבון

זיהוי ואפיון הטרנסקריפטום וחלבונים נלווים



1st Semester 2024/25-0421-4129

Advanced Molecular Biology “The RNA World”

The study of RNA structure and functions lagged behind those of DNA and proteins due to its relative instability and the misconception that it merely mediates the information transfer between DNA and proteins. Nonetheless, individuals like Francis Crick, Leslie Orgel and Carl Woese thought otherwise. Besides serving as a viral genomes they argued, RNA folds globularly and hence may harbor pockets able to bind metabolites and perhaps catalyze enzymatic reactions. As such, RNA could have self-replicated and, hence, act as an early driver of the Darwinian evolution, before translated proteins and DNA genomes existed. Support to this “RNA first” notion lent two the discoveries: of reverse transcription of DNA on an RNA template and of catalytic RNAs (ribozymes) including those responsible for peptide bond formation and mRNA splicing. Such ribozymes served as experimental paradigms, of RNA structure-function relationships. Although most natural ribozymes acted on RNA phosphate centers, artificial selection (SELEX) expanded the range of known ribozyme-catalyzed reactions needed to sustain an imaginary RNA World. Parallel development of new generation sequencing (NGS) enabled sequencing cDNA libraries even of the entire cellular RNA inventory. This revealed near complete transcription of complex genomes and that the number of functional human RNA species far exceeds that previously assumed. Many of the novel RNA species thus discovered regulate various gene expression stages and deficiency, excess or mutational changes of some account for disorders including autoimmune and cancerous diseases. Yet, these data are only a tip of an iceberg yet to explore. Addressing this gap calls for familiarity with the principles of RNA structure and function relation and the tools to explore it this course strives to avail.

Our course has three divisions termed past, present and future. The first entails hypotheses concerning the origin of RNA and its role early in life’s evolution, before the ascent of translated proteins and DNA genomes. The second concerns extant life, where ancient RNA functions in splicing, decoding the genetic message and forming the peptide harbors molecular fossils, i.e., early life relics. Translated proteins probably took over some other ancient RNA functions



while, on the other hand, RNA evolved in extant life a variety of added tasks in regulating various stages in genome replication, transcription, mRNA splicing, the synthesis of proteins and their transport to their cellular or extracellular destinations. The future chapter deals with state-of-the-art technologies allowing to simultaneously determine the structure, dynamics and fate of the entire cellular inventory of RNA.

Why devote an entire course to RNA?

The study of RNA structures & functions lagged years behind those of DNA and protein, a lag owing to technical problems and a misconception. Instability of RNA molecules compared to DNA and proteins impeded their isolation and characterization. In the early days of molecular biology, RNA was considered mainly as an intermediary transmitting the genetic information contained in DNA in form of nucleotide sequences, allowing to translate them into the proteins' amino acid language. Yet, some investigators including Francis Crick, Leslie Orgel and Carl Woese thought that RNA is capable of more. They were aware of the existence of viral RNA genomes and, importantly, of the globular structure RNAs molecules assume, reminiscent of the way proteins fold. As such, RNA could have harbored pockets able to bind specific metabolites and, perhaps, catalyzing enzymatic reactions. Accordingly, these dual roles could allow RNA to act as a self-replicating genome and evolve before proteins and DNA appeared on the scene. Strong support to this idea lent the discoveries of (a) reverse transcription of DNA copies of an RNA template, (b) short RNA stretches serving as DNA replication primers, and, importantly, (c) the existence of catalytic RNA molecules termed ribozymes, which partake, among others, in the formation of the peptide bonds during protein synthesis at the ribosome. Before delving into the topics of the course, I will briefly describe my role in it as well as yours. That is, in the first part of the course I will be teaching the class frontally. In the second part, the class will teach itself, where each participant presents a short talk about a selected relevant research paper, a presentation that earns hers/his half the final grade, the written exam providing the other half.



The discoveries mentioned above also spurred the development of novel technologies that made it possible to identify, isolate and determine the sequence of the various cellular entire cellular collection of RNA species (the transcriptome), model their structures and discover their functions. The data obtained revealed near complete transcription of complex genomes like the human. In other words, the number of RNA species it encodes far exceeds that assumed before. Many of the numerous novel RNA species discovered play key regulatory roles in various stages of gene expression. Importantly, the absence or inadvertent over-production of or mutations in some of the previously unknown RNAs account for various pathological disorders, including autoimmune and cancerous diseases. Moreover, the insights gained so far likely represent a tip of an iceberg of relevant facts remaining to discover. Filling this gap in requires familiarity with RNA's structure and function principles and with the relevant research tools. Participation in this course may help reduce this gap.

I divided the course symbolically into past, present and future chapters. In the first, we will discuss hypotheses about the origin of RNA at the brink of life, in an extinct world in which translated proteins and DNA genomes did not exist. The second part discusses the state of RNA in present life forms (extant life) in the key processes of decoding the genetic code and forming the peptide bond during protein synthesis as well as the plain and alternative splicing reactions of mRNA maturation. The RNA portions exercising these ancient roles, are rightfully considered as a molecular fossil from the dawn of life, i.e., from the conjectured RNA World. Apart from these ancient functions, RNA acquired may new tasks in a variety of control stages, from regulating replication and transcription to RNA splicing, the simple and the interchangeable, as well as directing mature proteins to their various destinations within or outside the cell. The third, future chapter is devoted to state-of-the-art technologies allowing simultaneously assessment of structure and dynamic interactions of all RNA molecules present in a cell.

I will teach the class in one part of this graduate course. In the second part, the class will teach itself. That is, each participant will prepare a short lecture about a relevant research article, usually picked from lists included in my first presentation.



Why devote an entire course to RNA? The study of RNA structure and functions lagged behind those of DNA and proteins for both technical and theoretical considerations. RNA's high fragility rendered its isolation and structural structural-functional characterization of the vast majority of its myriad molecules much more difficult compared to proteins and DNA. What is more, in the heydays of the "Central Dogma of Molecular Biology (DNA→RNA→ Proteins) RNA was considered primarily as an intermediary in the transfer of genetic information from DNA to proteins. However, even then were researchers who argued that RNA not only can serve as a template for its own replication but give its globular structure, may be encoded with protein-like specific binding and even catalytic activities. As such, unlike DNA and proteins, RNA could catalyze its own reproduction and, hence precede the two other informational macromolecules in the evolution of life. Important discoveries made in the 1970s and 1980s reinforced these notions. They included the reverse transcription of DNA from RNA templates and the existence of catalytic RNA molecules. The latter, termed ribozymes were shown two decades later to constitute the catalytic hearts of the ribosome and the spliceosome.

These discoveries spurred the arrival of technologies enabling the identification, isolation and determination of the structure and functioning of the entire cellular RNA molecules. The emerging data revealed, among others, that complex genomes such as the human undergo transcription almost in their entirety. In other words, the number of RNA species acting in the cell is far greater than the previously assumed. Many of the newly discovered RNA molecules turned out to play key roles at the various stages of gene regulation and organism development. Importantly, certain pathologies, including autoimmune and cancerous, result from a deficiency/excess/mutation of such a regulatory RNA molecule. These insights form just the tip of an iceberg yet to unravel. Filling the gap requires familiarity with the principles of RNA structure-function relationships as well as with existing and upcoming technologies intended to decipher RNA structure, mechanism and biological function, knowledge needed for developing novel drugs and other biomedical tools. Sharing our joint effort could contribute to these goals.

