

Dott.ssa Giulia Talini

STUDIES ON CATALYTIC RNA MOLECULES RELEVANT TO THE RNA WORLD HYPOTHESIS

Tutor: Prof. Enzo Gallori

Riassunto

L'attività di ricerca svolta nell'ambito del progetto di Dottorato ha avuto come oggetto lo studio di diverse molecole di RNA ad attività catalitica (ribozimi e viroidi) allo scopo di valutare come esse possano essersi evolute in un primitivo "RNA world". In particolare sono state indagate le caratteristiche strutturali, l'attività biologica, e la protezione di queste molecole di RNA, considerate relitti di un "RNA world".

Infatti, tra le condizioni che possono aver permesso alle molecole di RNA di intraprendere un processo di evoluzione molecolare, due sono le fondamentali: molecole di RNA primordiali dovevano 1) avere la capacità di strutturarsi correttamente per svolgere la loro attività catalitica, 2) essere protette da agenti degradanti (come raggi UV, raggi X e alte temperature, probabilmente presenti sulla terra primordiale).

La prima parte del lavoro è stata effettuata presso il laboratorio della Professoressa Marie-Christine Maurel, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI. Essa ha riguardato lo studio dell'attività di "self-cleavage" e della organizzazione strutturale della forma lineare e monomeric del viroide "Avocado Sunblotch" (in polarità positiva e negativa) in diverse condizioni sperimentali, ottenute variando la temperatura e la concentrazione di Mg²⁺.

L'attività di "self-cleavage" è stata analizzata effettuando cinetiche di reazione in vitro. I risultati ottenuti hanno mostrato un incremento dell'attività del viroide sia in polarità positiva (+) che negativa (-) all'aumentare della concentrazione di Mg²⁺ e della temperatura, nonostante il filamento (-) sia risultato più attivo e meno suscettibile a degradazione ad alte temperature rispetto a quello (+). Studi più approfonditi sul viroide nella sua polarità (-) hanno evidenziato, tra le altre cose, la fondamentale importanza del Mg²⁺ per la sua attività in vitro: il viroide è infatti inattivo in assenza di Mg²⁺ nonostante la presenza di alte concentrazioni di un catione monovalente. Il viroide risulta inattivo anche in "condizioni fisiologiche" (25°C, 2 mM di Mg²⁺, 150 mM di K⁺, pH 7.5), che riproducono in vitro alcune delle condizioni del cloroplasto, compartimento all'interno del quale avviene la replicazione del viroide. Questo risultato suggerisce che in vivo il viroide possa essere aiutato ad assumere la struttura attiva per il "cleavage" da altri ioni e/o fattori presenti nel cloroplasto.

Partendo dalle condizioni fisiologiche e variando la concentrazione di Mg²⁺ e la temperatura, sono state trovate le condizioni ottimali affinché potesse verificarsi il "cleavage". Alcune di queste condizioni sono state scelte per la caratterizzazione della struttura del viroide, effettuata tramite due tecniche spettroscopiche: Dicroismo Circolare (CD) e spettroscopia Raman.

Questo lavoro ci ha permesso di valutare quali fossero i cambiamenti strutturali del viroide correlati ad una forma inattiva o attiva. In particolare ci siamo focalizzati sui cambiamenti strutturali indotti dal Mg²⁺, il quale favorisce la formazione di una struttura ordinata ad elica-A, suggerendo che quest'ultima possa essere la corretta struttura che il viroide deve assumere per tagliarsi. Dati ottenuti monitorando gli spettri del viroide durante una reazione di "cleavage" hanno mostrato che il taglio non può essere evidenziato dal CD. Al contrario vengono osservati cambiamenti durante il tempo negli spettri Raman, che sembrano essere correlati con l'efficienza del "cleavage".

Infine è stato valutato l'effetto della temperatura sulla struttura del viroide tramite CD. I risultati suggeriscono che tra 50 e 75°C si verifica un probabile "melting" della struttura del viroide, evidenziato da un decremento dell'intensità e uno spostamento verso il rosso del picco principale degli spettri. Esperimenti effettuati per verificare la reversibilità del processo (cioè se il viroide fosse in grado di riassumere una struttura chiusa, partendo da una completamente aperta) suggeriscono che le proprietà strutturali del viroide presentano isteresi.

Nella seconda parte del lavoro è stata indagata la capacità di un ribozima "hammerhead trans-acting", disegnato a partire dalle sequenze del ribozima "hammerhead" presente nel "Peach Latent Mosaic Viroid", di poter effettuare la reazione di "cleavage" dopo essere stato sottoposto allo stress di alte temperature

(80°C). Il ribozima è stato sottoposto a stress in presenza o assenza di un dipeptide (Lys-Lys), nell'ipotesi che l'interazione tra RNA e peptidi primordiali possa aver rappresentato uno step cruciale nel corso dei processi prebiotici di evoluzione molecolare. I risultati ottenuti hanno mostrato che le molecole di RNA mantengono la loro abilità di interagire le une con le altre e di effettuare la reazione di "trans-deavage" anche in presenza di Lys-Lys. In più, la presenza di questo dipeptide sembra fornire protezione alle molecole di RNA catalitico nei confronti di alte temperature.