

## Obelisks: A New Frontier in the RNA Viroisphere and Host-Microbe Interactions

### Obelisci: Nova granica u virosferi RNA i interakcijama domaćina i mikroba

**Autor:** Davor Moravek

#### Abstract

Culture-independent metatranscriptomics has revealed a vast, previously hidden biosphere of genetic entities. Among the most significant recent discoveries are the Obelisks—a novel class of viroid-like circular RNA replicators. First identified in human oral and gut microbiomes, these ~1-kilobase entities have several unique features. They possess predicted rod-like secondary structures and show deep phylogenetic divergence from all known biological agents. Furthermore, unlike classical viroids, they can encode a novel protein superfamily, the “Oblins.” The identification of these protein-coding, viroid-like RNAs challenges the established boundaries of subviral biology.

Obelisks are globally distributed and are particularly prevalent in human-associated microbial communities, detected in ~7% of gut and ~50% of oral microbiome samples. Their persistence in individuals and association with the commensal bacterium *Streptococcus sanguinis* suggest they are stable colonists. However, their biological roles, effects on their hosts, and implications for human health remain unknown. This review synthesizes current knowledge on Obelisk discovery, molecular biology, and ecology. It situates them within the context of host-microbe interactions and innate immunity and outlines a framework for future research.

**Keywords:** Obelisk; viroid-like; microbiome; circular RNA; Oblin; metatranscriptomics; innate immunity; *Streptococcus sanguinis*

#### Sažetak

Metatranskriptomika neovisna o staničnoj kulturi otkrila je golemu, prethodno skrivenu biosferu genetičkih entiteta. Među najznačajnijim nedavnim otkrićima su obelisci — nova klasa viroidima sličnih kružnih replikatora RNA. Prvi put identificirani u oralnim i crijevnim mikrobiomima čovjeka, ovi entiteti veličine otprilike jedne kilobaze imaju nekoliko jedinstvenih značajki. Posjeduju predviđene štapičaste sekundarne strukture i pokazuju duboku filogenetsku divergenciju od svih poznatih bioloških agensa. Nadalje, za razliku od klasičnih viroida, mogu kodirati novu proteinsku natporodicu, "obline". Identifikacija ovih viroidima sličnih RNA koje kodiraju proteine osporava utvrđene granice subvirusne biologije.

Obelisci su globalno rasprostranjeni i posebno su prevalentni u mikrobiološkim zajednicama povezanim s čovjekom, otkriveni u ~7 % uzoraka crijevnog i ~50 % uzoraka oralnog mikrobioma. Njihova postojanost u pojedincima i povezanost s komenzalnom bakterijom *Streptococcus sanguinis* upućuju na to da su stabilni kolonizatori. Međutim, njihove biološke uloge, učinci na domaćine i implikacije za ljudsko zdravlje ostaju nepoznati. Ovaj pregledni rad sintetizira trenutačna saznanja o otkriću, molekularnoj biologiji i ekologiji obeliska. Smješta ih u kontekst interakcija domaćina i mikroba te urođene imunosti te predlaže okvir za buduća istraživanja.

**Ključne riječi:** Obelisk; viroidima sličan; mikrobiom; kružna RNA; oblin; metatranskriptomika; urođena imunost; *Streptococcus sanguinis*

## Introduction: Unveiling Biological Dark Matter

Technological innovations have opened new frontiers in the biological sciences, enabling the exploration of previously inaccessible layers of complexity. A large part of this emerging landscape is “biological dark matter”—the uncharacterized diversity of genetic material and microbial entities inhabiting all ecosystems, including the human body.

Against this backdrop, a novel class of biological agents—the Obelisks—was identified in early 2024 within human oral and gut microbiomes (Zheludev et al., 2024). Discovered through reference-free computational pipelines, Obelisks occupy an evolutionary niche between viroids and RNA viruses. Unlike viruses, they lack protective capsids; unlike all known viroids, they encode their own proteins (Oblins), a feature that blurs subviral definitions. Their high prevalence raises important questions about their functions and evolutionary origins, including whether they are relics of a primordial “RNA World” or products of reductive evolution.

## An Expanding Virosphere: From Viroids to Obelisks

### Viroid Biology

Viroids are the smallest known infectious agents. They are single-stranded, circular RNAs (246–430 nt) that lack protein-coding capacity and capsids. They rely entirely on host machinery for replication, often via a rolling-circle mechanism. Members of the family *Avsunviroidae* possess self-cleaving hammerhead ribozymes (HHRs), enabling autonomous processing of their replication intermediates (Hammann et al., 2012). This ribozyme feature is also found in a subset of Obelisks.

### Discovery and Core Features of Obelisks

In 2024, Zheludev et al. reported the discovery of Obelisks via metatranscriptomic analysis. Their hallmark characteristics include:

**Genome:** A circular RNA of approximately 1,000 nucleotides.

**Structure:** A predicted stable, rod-like conformation that likely enhances nuclease resistance.

**Coding Potential:** Obelisks encode “Oblins,” a novel protein superfamily, marking a departure from non-coding viroids.

**Replication:** Type-III HHRs in some lineages suggest a ribozyme-assisted rolling-circle mechanism.

**Phylogeny:** Obelisks form a distinct clade with no detectable sequence homology to any known biological agent.

### Ecology and Host Association

Obelisks appear in ~7% of human gut and ~50% of oral microbiome samples (Zheludev et al., 2024) and are widespread in marine environments (López-Simón et al., 2025). The first confirmed host is *Streptococcus sanguinis*, a common oral commensal where Obelisks can reach extremely high intracellular abundance (Maddamsetti & You, 2025). The hosts for most environmental Obelisks remain unidentified.

## Methodological Challenges

Key barriers to Obelisk research include the difficulty of assembling circular RNAs from short reads, low signal-to-noise ratios in many samples, and sequencing biases against circular molecules. Solutions include specialized bioinformatic pipelines (e.g., Tormentor; Kremer & de Barros, 2024) and the adoption of long-read sequencing technologies (Zhang et al., 2021).

## Host-Microbe Ecosystem Context

### The Microbiome in Health and Disease

Dysbiosis—an altered microbial community—is linked to diverse conditions. In colorectal cancer (CRC), tumor tissues often harbor microbes of oral origin (Nakatsu et al., 2015). The discovery of viroid-like RNAs in CRC tissues (Wu et al., 2025) suggests a “viromal dysbiosis” could parallel bacterial shifts.

### Nature-Nurture Interplay

Environmental factors often outweigh host genetics in shaping microbiomes (Rothschild et al., 2018), yet heritable microbial taxa exist, and host genetics modulate environmental effects (Gao et al., 2023). Obelisk prevalence may be shaped by such gene-environment interactions.

## Immunological Dimensions

### Pattern Recognition

Toll-like receptor 3 (TLR3) detects double-stranded RNA (dsRNA) motifs typical of viral replication (Alexopoulou et al., 2001). The highly structured genomic RNAs of Obelisks could engage such receptors, representing a persistent but underexplored mucosal immune stimulus.

## Research Hypotheses (Speculative)

**Microbiome Modulation:** Could Obelisks alter host bacterial physiology, potentially influencing community dynamics?

**Immune Engagement:** Do Obelisks interact with TLRs or other PRRs to modulate mucosal immunity?

**Clinical Markers:** Could Obelisks serve as biomarkers for dysbiosis-associated conditions if validated in future studies?

## Discussion, Limits, and Future Directions

### Limitations

Current knowledge of Obelisks is constrained by several factors:

**Reliance on Metatranscriptomic Inference:** Most observations are derived from sequencing data without direct experimental cultivation for the majority of Obelisk types.

**Limited Host Range Confirmation:** *Streptococcus sanguinis* remains the only confirmed host.

**Potential Sequencing and Assembly Artifacts:** Circular RNA reconstruction is susceptible to errors that may yield false positives.

**Sampling and Detection Biases:** RNA library preparation protocols may underrepresent circular

RNAs, potentially skewing prevalence estimates.

**Absence of Clinical Correlation Data:** No longitudinal studies have yet linked Obelisk presence to human health outcomes.

**Incomplete Functional Characterization:** Oblin protein functions remain predicted; experimental verification of their roles is lacking.

Addressing these limitations will require integrating optimized sequencing methods, targeted molecular assays, and carefully designed clinical studies.

## Research Roadmap

**Computational:** Enhance circular RNA assembly algorithms and expand curated reference databases.

**Experimental:** Validate Oblin protein functions using techniques such as CRISPRi knockdown in *S. sanguinis* and RNA immunoprecipitation sequencing.

**Clinical:** Develop *in situ* localization approaches (e.g., custom FISH probes; Poirier et al., 2024) and quantitate any association with host inflammation in cohorts.

## Conclusion

Obelisks—protein-coding, viroid-like circular RNAs—challenge existing paradigms of subviral life. Whether they are relics of an RNA World or simplified descendants of more complex viruses, their role in microbial communities and host systems is a compelling new research frontier. Resolving their ecological and medical significance will require integrated computational, molecular, and clinical approaches.

## Glossary of Key Terms

**Avsunviroidae:** A family of plant viroids that replicate in chloroplasts and contain self-cleaving hammerhead ribozymes.

**Biological dark matter:** A term for the vast array of unknown or uncharacterized genetic material and microbial life detected in sequencing projects.

**Circular single-stranded RNA (circular ssRNA):** A nucleic acid molecule forming a covalently closed loop, often more stable than linear RNA.

**CRISPR interference (CRISPRi):** A genetic silencing technique that uses a catalytically inactive Cas protein to repress target gene transcription.

**Dysbiosis:** An imbalance in the composition or function of the microbiome that is associated with disease states.

**Hammerhead ribozyme (HHR):** A small RNA motif capable of self-cleavage, involved in the replication of some viroids and other subviral RNAs.

**Innate immunity:** The non-specific arm of the immune system that provides the first line of defense against pathogens.

**Long-read sequencing:** Technologies (e.g., nanopore) that generate reads thousands of bases long, useful for assembling full-length circular RNAs.

**Metatranscriptomics:** The study of the complete set of RNA transcripts from all organisms in a given sample.

**Obelisk:** A class of ~1 kb viroid-like circular RNAs capable of encoding proteins (Oblins).

**Oblin:** A protein encoded by Obelisk genomes, belonging to a novel protein superfamily with

unknown function.

**Pattern Recognition Receptor (PRR):** A host cell receptor that recognizes conserved microbial structures, initiating innate immune responses.

**Rolling-circle replication:** A method of nucleic acid replication that produces long, tandem copies of a circular template.

***Streptococcus sanguinis*:** A commensal bacterium of the human oral cavity, identified as the first confirmed host of an Obelisk.

**Toll-like receptor 3 (TLR3):** An innate immune receptor that detects double-stranded RNA.

---

## Hrvatska verzija

### Uvod: Otkrivanje biološke tamne tvari

Tehnološke inovacije otvorile su nove granice u biološkim znanostima, omogućujući istraživanje prethodno nedostupnih razina složenosti. Velik dio ovog krajolika u nastajanju čini "biološka tamna tvar" — neokarakterizirana raznolikost genetičkog materijala i mikrobioloških entiteta koji nastanjuju sve ekosustave, uključujući ljudsko tijelo.

U tom je kontekstu početkom 2024. godine unutar ljudskih oralnih i crijevnih mikrobioma identificirana nova klasa bioloških agensa — obelisci (Zheludev i sur., 2024.). Otkriveni pomoću računalnih cjevovoda bez oslanjanja na referentne sekvence, obelisci zauzimaju evolucijsku nišu između viroida i RNA virusa. Za razliku od virusa, nedostaju im zaštitni kapsidi; za razliku od svih poznatih viroida, kodiraju vlastite proteine (obline), što je značajka koja briše granice subvirusnih definicija. Njihova visoka prevalencija postavlja važna pitanja o njihovim funkcijama i evolucijskom podrijetlu, uključujući jesu li ostaci primordijalnog "RNA svijeta" ili proizvodi reduktivne evolucije.

### Širenje virosfere: Od viroida do obeliska

#### Biologija viroida

Viroidi su najmanji poznati infektivni agensi. To su jednolančane, kružne RNA (246–430 nt) kojima nedostaje sposobnost kodiranja proteina i kapsida. U potpunosti se oslanjaju na stanične mehanizme domaćina za replikaciju, često putem mehanizma kotrljajućeg kruga. Članovi porodice *Avsunviroidae* posjeduju samorežuće čekićaste ribozime (HHR), što omogućuje autonomnu obradu njihovih replikacijskih intermedijera (Hammann i sur., 2012.). Ova značajka ribozima također se nalazi u podskupini obeliska.

#### Otkriće i temeljne značajke obeliska

Godine 2024. Zheludev i suradnici izvijestili su o otkriću obeliska putem metatranskriptomске analize. Njihove ključne karakteristike uključuju:

**Genom:** Kružna RNA od približno 1000 nukleotida.

**Struktura:** Predviđena stabilna, štapićasta konformacija koja vjerojatno povećava otpornost na nukleaze.

**Sposobnost kodiranja:** Obelisci kodiraju "obline", novu proteinsku natporodicu, što predstavlja odmak od nekodirajućih viroida.

**Replikacija:** HHR tipa III u nekim linijama upućuju na mehanizam kotrljajućeg kruga potpomognut ribozimom.

**Filogenija:** Obelisci tvore zaseban kladus bez uočljive homologije sekvence s bilo kojim poznatim biološkim agansom.

#### Ekologija i povezanost s domaćinom

Obelisci se pojavljuju u ~7 % uzoraka ljudskog crijevnog i ~50 % uzoraka oralnog mikrobioma (Zheludev i sur., 2024.) te su široko rasprostranjeni u morskim okolišima (López-Simón i sur., 2025.). Prvi potvrđeni domaćin je *Streptococcus sanguinis*, čest oralni komenzal kod kojeg obelisci mogu doseći izuzetno visoku unutarstaničnu brojnost (Maddamsetti & You, 2025.). Domaćini za većinu okolišnih obeliska ostaju neidentificirani.

#### Metodološki izazovi

Ključne prepreke u istraživanju obeliska uključuju poteškoće u sastavljanju kružnih RNA iz kratkih očitavanja, niske omjere signala i šuma u mnogim uzorcima te pristranosti sekvenciranja protiv kružnih molekula. Rješenja uključuju specijalizirane bioinformatičke cjevovode (npr. Tormentor; Kremer & de Barros, 2024.) i usvajanje tehnologija sekvenciranja dugih očitavanja (Zhang i sur., 2021.).

## Kontekst ekosustava domaćina i mikroba

### Mikrobiom u zdravlju i bolesti

Disbioza — promijenjena mikrobiološka zajednica — povezana je s različitim stanjima. Kod kolorektalnog karcinoma (CRC) tumorska tkiva često sadrže mikrobe oralnog podrijetla (Nakatsu i sur., 2015.). Otkriće viroidima sličnih RNA u tkivima CRC-a (Wu i sur., 2025.) sugerira da bi "viromalna disbioza" mogla pratiti bakterijske promjene.

#### Interakcija genetskih i okolišnih čimbenika

Okolišni čimbenici često nadmašuju genetiku domaćina u oblikovanju mikrobioma (Rothschild i sur., 2018.), no postoje nasljedni mikrobiološki taksoni, a genetika domaćina modulira okolišne učinke (Gao i sur., 2023.). Prevalencija obeliska može biti oblikovana takvim interakcijama gena i okoliša.

#### Imunološke dimenzije

##### Prepoznavanje uzoraka

Toll-u sličan receptor 3 (TLR3) otkriva motive dvolančane RNA (dsRNA) tipične za replikaciju virusa (Alexopoulou i sur., 2001.). Visoko strukturirane genomske RNA obeliska mogle bi se vezati za takve receptore, predstavljajući trajan, ali nedovoljno istražen imunološki poticaj na sluznicama.

##### Istraživačke hipoteze (spekulativne)

**Modulacija mikrobioma:** Mogu li obelisci mijenjati fiziologiju bakterijskog domaćina, potencijalno utječući na dinamiku zajednice?

**Imunološki angažman:** Interagiraju li obelisci s TLR-ima ili drugim PRR-ima kako bi modulirali imunitet sluznica?

**Klinički biljezi:** Mogu li obelisci služiti kao biljezi za stanja povezana s disbiozom ako se to potvrdi u budućim studijama?

#### Rasprava, ograničenja i budući smjerovi

##### Ograničenja

Trenutačno znanje o obeliscima ograničeno je s nekoliko čimbenika:

**Oslanjanje na metatranskriptomsku inferenciju:** Većina opažanja proizlazi iz podataka sekvenciranja bez izravnog eksperimentalnog uzgoja za većinu tipova obeliska.

**Ograničena potvrda raspona domaćina:** *Streptococcus sanguinis* ostaje jedini potvrđeni domaćin.

**Potencijalni artefakti sekvenciranja i sastavljanja:** Rekonstrukcija kružne RNA podložna je pogreškama koje mogu dati lažno pozitivne rezultate.

**Priistranosti uzorkovanja i detekcije:** Protokoli za pripremu RNA biblioteka mogu podcijeniti kružne RNA, potencijalno iskrivljujući procjene prevalencije.

**Nepostojanje podataka o kliničkoj korelaciji:** Nijedna longitudinalna studija još nije povezala prisutnost obeliska s ishodima ljudskog zdravlja.

**Nepotpuna funkcionalna karakterizacija:** Funkcije proteina oblina ostaju predviđene; nedostaje eksperimentalna provjera njihovih uloga.

Rješavanje ovih ograničenja zahtijevat će integraciju optimiziranih metoda sekvenciranja, ciljanih molekularnih testova i pažljivo osmišljenih kliničkih studija.

##### Plan istraživanja

**Računalno:** Poboľjšati algoritme za sastavljanje kružnih RNA i proširiti kurirane referentne baze podataka.

**Eksperimentalno:** Potvrditi funkcije proteina oblina tehnikama kao što su CRISPRi utišavanje u vrsti *S. sanguinis* i sekvenciranje RNA imunoprecipitacijom.

**Klinički:** Razviti pristupe za lokalizaciju *in situ* (npr. prilagođene FISH sonde; Poirier i sur., 2024.) i kvantificirati moguću povezanost s upalom domaćina u kohortama.

## Zaključak

Obelisci — viroidima slične kružne RNA koje kodiraju proteine — osporavaju postojeće paradigme subvirusnog života. Bilo da su ostaci RNA svijeta ili pojednostavljeni potomci složenijih virusa, njihova uloga u mikrobiološkim zajednicama i sustavima domaćina predstavlja intrigantnu novu granicu istraživanja. Rješavanje njihovog ekološkog i medicinskog značaja zahtijevat će integrirane računalne, molekularne i kliničke pristupe.

## Rječnik ključnih pojmova

**Avsunviroidae:** Porodica biljnih viroida koji se repliciraju u kloroplastima i sadrže samorežuće čekičaste ribozime.

**Biolška tamna tvar:** Pojam za golemi niz nepoznatog ili neokarakteriziranog genetičkog materijala i mikrobni oblika života otkrivenih u projektima sekvenciranja.

**CRISPR interferencija (CRISPRi):** Tehnika genetskog utišavanja koja koristi katalitički neaktivan protein Cas za suzbijanje transkripcije ciljnog gena.

**Čekičasti ribozim (HHR):** Mali RNA motiv sposoban za samorezanje, uključen u replikaciju nekih viroida i drugih subvirusnih RNA.

**Disbioza:** Neravnoteža u sastavu ili funkciji mikrobioma povezana sa stanjima bolesti.

**Kružna jednolančana RNA (kružna ssRNA):** Molekula nukleinske kiseline koja tvori kovalentno zatvorenu petlju, često stabilnija od linearne RNA.

**Metatranskriptomika:** Proučavanje cjelokupnog skupa RNA transkripata svih organizama u danom uzorku.

**Mehanizam kotrljajućeg kruga:** Metoda replikacije nukleinske kiseline koja proizvodi duge, tandemske kopije kružnog predloška.

**Obelisk:** Klasa ~1 kb viroidima sličnih kružnih RNA sposobnih za kodiranje proteina (oblina).

**Oblin:** Protein kodiran genomima obeliska, pripada novoj proteinskoj natporodici s nepoznatom funkcijom.

**Receptor za prepoznavanje uzoraka (PRR):** Receptor stanice domaćina koji prepoznaje konzervirane mikrobne strukture, pokrećući urođene imunološke odgovore.

**Sekvenciranje dugih očitavanja:** Tehnologije (npr. nanopore) koje generiraju očitavanja duga tisuće baza, korisne za sastavljanje cjelovitih kružnih RNA.

***Streptococcus sanguinis*:** Komenzalna bakterija ljudske usne šupljine, identificirana kao prvi potvrđeni domaćin obeliska.

**Toll-u sličan receptor 3 (TLR3):** Urođeni imunološki receptor koji otkriva dvolančanu RNA.

**Urođena imunost:** Nespecifični krak imunološkog sustava koji pruža prvu liniju obrane od patogena.

---

## References- Reference

- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., & Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413(6857), 732–738. <https://doi.org/10.1038/35099560>
- Gao, R., Zhang, X., Chu, H., Zhang, H., Jesus, F., Beydoun, S., Zhang, G., Zhou, Z., Wang, S., Wu, C., & Cheema, A. K. (2023). Gut microbiota and host genetics modulate the effect of diverse diet patterns on metabolic health. *Frontiers in Genetics*, 13, 976814. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.976814>
- Hammann, C., Lupták, A., Perreault, J., & de la Peña, M. (2012). The ubiquitous hammerhead ribozyme. *RNA*, 18(5), 871–885. <https://doi.org/10.1261/rna.031401.111>
- Kremer, F. S., & de Barros, D. R. (2024). *Tormentor: An obelisk prediction and annotation pipeline* [Preprint]. bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2024.05.30.596730>
- López-Simón, J., de la Peña, M., & Martínez-García, M. (2025). Viroid-like “obelisk” agents are widespread in the ocean and exceed the abundance of RNA viruses in the prokaryotic fraction. *The ISME Journal*, 19(1), wraf033. <https://doi.org/10.1093/ismejo/wraf033>
- Maddamsetti, R., & You, L. (2025). The abundance of viroid-like RNA Obelisk-S.s in *Streptococcus sanguinis* SK36 may suffice for evolutionary persistence. *Journal of Molecular Evolution*, 93(3), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00239-025-10168-2>
- Nakatsu, G., Li, X., Zhou, H., Sheng, J., Wong, S. H., Wu, W. K. K., Ng, S. C., Tsoi, H., Dong, Y., Zhang, N., He, Y., Kang, Q., Cao, L., Wang, K., Zhang, J., Liang, Q., Yu, J., & Sung, J. J. Y. (2015). Gut mucosal microbiome across stages of colorectal carcinogenesis. *Nature Communications*, 6, 8727. <https://doi.org/10.1038/ncomms9727>
- Poirier, K. M., Luallen, R. J., & Rivera, D. E. (2024). RNA fluorescence in situ hybridization (FISH) as a method to visualize bacterial colonization in the *C. elegans* gut. *microPublication Biology*. <https://doi.org/10.17912/micropub.biology.001044>
- Rothschild, D., Weissbrod, O., Barkan, E., Kurilshikov, A., Korem, T., Zeevi, D., Costea, P. I., Godneva, A., Kalka, I. N., Bar, N., Zmora, N., Pevsner-Fischer, M., Israeli, D., Kosower, N., Malka, G., Wolf, B. C., Avnit-Sagi, T., Lotan-Pompan, M., Weinberger, A., ... Segal, E. (2018). Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature*, 555(7695), 210–215. <https://doi.org/10.1038/nature25973>
- Wu, M., Li, W., Hu, N., Liu, C., Li, J., Li, Y., Xu, N., Shi, J., Sun, J., & Li, J. (2025). Discovery of a novel viroid-like circular RNA in colorectal cancer. *Cancer Communications*, 45(1), 46–50. <https://doi.org/10.1002/cac2.12580>
- Zhang, X., Cuesta, R., Bolisetty, M. T., Chen, W., Liu, C., & Li, J. (2021). circFL-seq reveals full-length circular RNAs with rolling circular reverse transcription and nanopore sequencing. *eLife*, 10, e70715. <https://doi.org/10.7554/eLife.70715>
- Zheludev, I. N., Edgar, R. C., Lopez-Galiano, M. J., de la Peña, M., Babaian, A., Bhatt, A. S., & Fire, A. Z. (2024). Viroid-like colonists of human microbiomes. *Cell*, 187(23), 6521–6536.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.11.004>