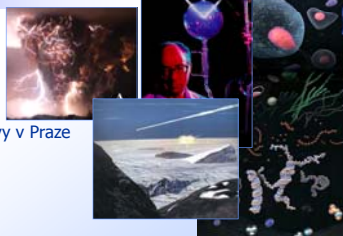


Formování stavebních bloků života ...

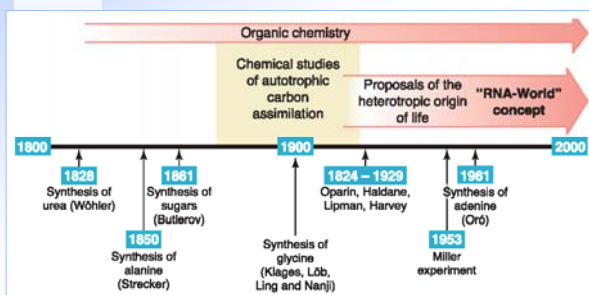
... aneb molekuly tvořící život

Vladimír Kopecký Jr.

Fyzikální ústav Univerzity Karlovy v Praze
Oddělení fyziky biomolekul
<http://biomolecules.mff.cuni.cz>
kopeccky@karlov.mff.cuni.cz



Počátky života Historický přehled



J. L. Bada and A. Lazcano, Science 300 (2003) 745-746.

Počátky života Prebiotická evoluce

- 1924 – **A. I. Oparin** ukazuje, že prvotní organismy musely být **heterotrofní** a užívat **anaerobní fermentaci**, navrhuje vznik života za přítomnosti NH_3 , uhlíkových a sloučenin C-kov (karbidů)
- 1927 – **J. B. S. Haldane** ukazuje na **nepřítomnost O_2 a O_3** v prvotní atmosféře
- 1938 – **Oparin** přichází s ideou **redukční atmosféry**, přítomnosti UV záření a výbojů v prvotní atmosféře
- 1953 – **S. L. Miller** a **H. Urey** (Univ. of Chicago) syntéza **aminokyselin**
- 1961 – **J. Oró** (Univ. of Houston) – syntéza **bází nukleových kyselin**

Aleksandr Ivanovič Oparin (1894–1980)



Stanley L. Miller (1930–2007)



J. B. S. Haldane (1892–1964)

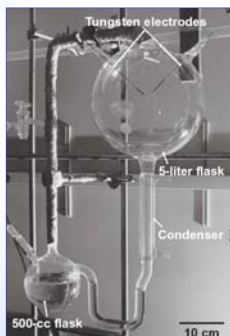
Počátky života

Prebiotická evoluce – složení atmosféry

Atmosféra Složení

Redukční	CH ₄ , NH ₃ , N ₂ , H ₂ O, H ₂ CO ₂ , N ₂ , H ₂ O, H ₂ CO ₂ , H ₂ , H ₂ O
Neutrální	CO ₂ , N ₂ , H ₂ O
Oxidační	CO ₂ , N ₂ , H ₂ O, O ₂

- Původní Oparinův návrh redukční atmosféry obsahoval CH₄, NH₃, H₂O, H₂
- Shodné složení plynů užil i Miller ve svém experimentu
- Neutrální a oxidační atmosféry nevedou k abiotické syntéze aminokyselin

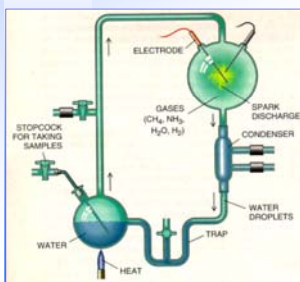


Původní experimentální aparatura S. L. Millera

Aminokyseliny

Prebiotická syntéza aminokyselin

- V roce 1952 provádí S. L. Miller experiment (v laboratoři H. C. Ureyho) se silně redukční atmosférou...



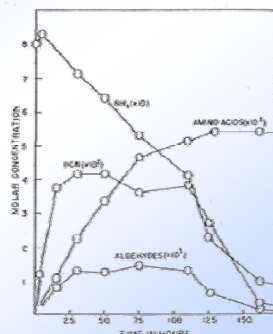
AMINO ACID	MURCHISON METEORITE	DISCHARGE EXPERIMENT
GLYCINE	***	***
ALANINE	***	***
β-AMINO-N-BUTYRIC ACID	***	***
γ-AMINOBUTYRIC ACID	***	***
VALINE	***	***
NORVALINE	***	***
ISOVALINE	***	***
PROLINE	***	***
PIPECOLIC ACID	***	***
ASPARTIC ACID	***	***
GLUTAMIC ACID	***	***
β-ALANINE	***	***
β-AMINO-N-BUTYRIC ACID	***	***
γ-AMINOBUTYRIC ACID	***	***
γ-AMINOBUTYRIC ACID	***	***
SARCOSINE	***	***
N-ETHYLGLYCINE	***	***
N-METHYLALANINE	***	***

■ S. L. Miller Science 117 (1953) 528–529.

Aminokyseliny

Prebiotická syntéza aminokyselin – výtěžek

Sloučenina	Relativní výtěžek
kys. mravenčí	1000
glycin	270
kys. glukonová	240
alanin	146
kys. mléčná	133
β-alanin	64
kys. octová	64
sarkosin	21
kys. jantarová	17
močovina	9
N-methylalanin	4
kys. glutamová	3
kys. asparagová	2

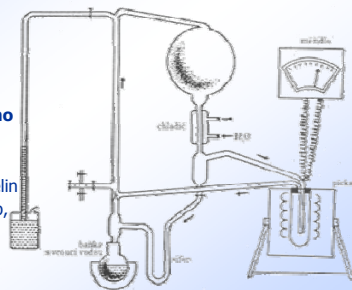


■ S. L. Miller Biochim. Biophys. Acta 23 (1957) 480–489.

Aminokyseliny

Prebiotická syntéza aminokyselin

- Harada a Fox modifikovali Millerův experiment
- Odstranili elektrody a nahradili je **píčkou s ohřevem 900–1000 °C** a s přidáním **křemenného písku jako katalyzátoru**
- Zvyšuje se podíl proteinogenních aminokyselin (Ala, Gly, Asp, Glu, Lys, Trp, His, Asn)
- Pokusy jsou kritizovány (teplota <120 °C je přijatelnější)

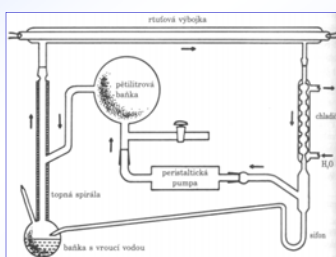


■ K. Harada and S. W. Fox, Nature 201(1964) 335. J. G. Lawless & C. D. Boynton, Nature 243 (1973) 450.

Aminokyseliny

Prebiotická syntéza aminokyselin

- Modifikace Millerova experimentu – odstranění elektrod a nahrazení **UV-výbojkou**
- Při ozáření směsi CH_4 , C_2H_6 , NH_3 a H_2O UV zářením (110–150 nm) vzniká převážně Gly, Ala a kys. α -aminobutanová
- Při ozáření směsi CH_4 , CO , NH_3 a H_2O UV-zářením (145–180 nm) vzniká Gly, Ala, Val, ..., hydrazin, močovina, formaldehyd, etc.
- Formaldehyd či sirovodík je možno užít jako fotosensibilizační činidla (při expozici 200–300 nm)

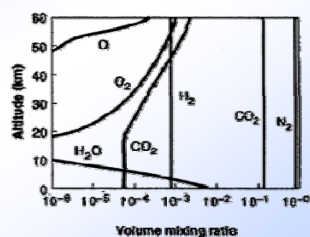


■ W. Groth & H. von Weyssenhoff, Naturwissenschaften 44 (1957) 520. N. Dodonova & A. L. Sidorova, Biophysica 6 (1961) 14.

Aminokyseliny

Prebiotická syntéza vs. atmosféra

- Experimenty předpokládaly silně redukční atmosféru
- **Prvotní atmosféra** byla pravděpodobně **mírně redukční**
- Do atmosféry unikaly vulkanické plyny (především CO a CO_2) a H_2 , který mizel do kosmu
- Přítomnost CH_4 a NH_3 závisí na oxidačních možnostech zemské kůry
- Atmosféra ale nebyla oxidační do ca. –2,5 Gy

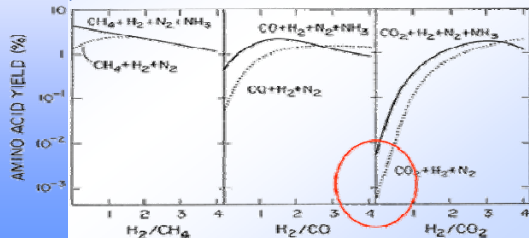


■ J. F. Kasting, Science 259 (1993) 920–926.

Aminokyseliny

Prebiotická syntéza aminokyselin

- Atmosférické podmínky jsou klíčové pro syntézu aminokyselin
- I když jsou výtěžky **v atmosféře $\text{CO}_2 + \text{N}_2$ malé, nejsou nulové, sic!**

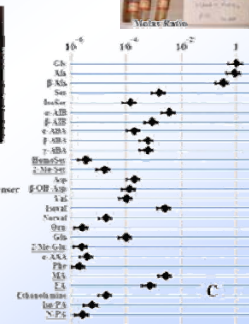


■ G. Schlesinger, S. L. Miller, J. Mol. Evol. 19 (1983) 376–382.

Aminokyseliny

Prebiotická syntéza aminokyselin – repete

- **Původní provedení** Millerova experimentu s **parogenerátorem**
- Pára generuje v jiskrové komoře **OH radikály** reagující s AA i s prekurzory
- Podtržené AA byly pozorovány poprvé

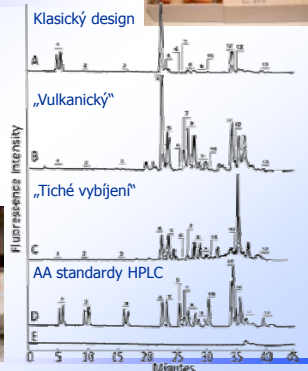
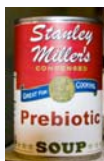


■ A. P. Johnson et al., Science 322 (2008) 404.

Aminokyseliny

Prebiotická syntéza aminokyselin – repete

- „Vulkanická“ aparatura generuje **vetší pestrost aminokyselin** při zachování výtěžku
- I když nebyla atmosféra redukční, **redukované plyny a výboje běžně provází výbuchy sopek!**
- Prekurzory a AA se vymyjí z atmosféry

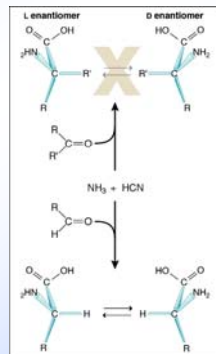


■ A. P. Johnson et al., Science 322 (2008) 404.

Aminokyseliny

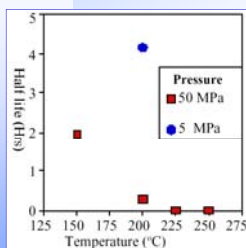
Prebiotická syntéza aminokyselin

- **Aminokyseliny vznikající Steckerovou** reakcí s aldehydy mohou racemizovat, reakce s ketony vede k neracemizujícím aminokyselinám
- Meziprodukt Stackeroovy syntézy **aminonitril** $RCH(NH_2)CN$ má **krátký poločas rozpadu** – 1000 let při 0 °C
- Reakce musí probíhat relativně rychle
- Je závislá na koncentraci NH_3 a HCN , na pH a teplotě
- NH_3 mohl být při pH 8,1 rozpuštěn v oceánech; v plynném stavu je rozkládán UV-zářením

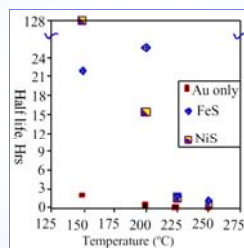


Aminokyseliny

Stabilita aminokyselin v přítomnosti minerálů



Efekt teploty a tlaku na poločas života leucinu (Leu). Pokus byl proveden ve vodném roztoku, v nepřítomnosti minerálů.



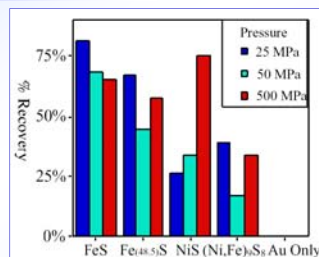
Efekt přidání minerálního pufru na stabilitu Leu. Experimentální tlak byl 50 MPa.

■ J. A. Brandes et al., 30th Lunar and Planetary Conference, Houston (2003), pp. 1284–1285.

Aminokyseliny

Stabilita aminokyselin v přítomnosti minerálů

- Vysoké tlaky a teploty degradují aminokyseliny, ale urychlují polymerizační reakce
- Přítomnost minerálů, především sulfidů kovů (FeS a NiS) má stabilizační účinek
- **Minerály mohly hrát roli stabilizujícího prostředí** u hydrotermálních pramenů (tlaky ca. 25–50 MPa)



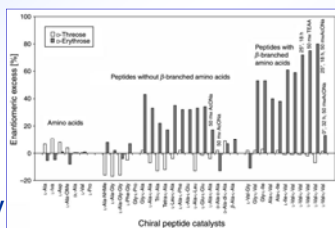
Efekt tlaku na stabilitu Leu v přítomnosti minerálů. Experiment prováděn při teplotě 200 °C a inkubaci vzorku 24 hodin.

■ J. A. Brandes et al., 30th Lunar and Planetary Conference, Houston (2003), pp. 1284–1285.

Aminokyseliny

Aminokyseliny jako katalyzátory

- Meziplanetární hmota obsahu aminokyselin s převahou L-formy o 2–9 %
- Syntéza cukrů ze směsi glykolaldehydu a formaldehydu (pH 5,4; 50 °C) za přítomnosti aminokyselin s převahou jedné formy ukazuje vychýlení izomerie cukrů ve prospěch opačné formy
- Vzniká asymetrie až 60 %
- Aminokyseliny a cukry ve vodném prostředí snadno racemizují, sic!
- Threosa může nahradit ribózu v molekule RNA, sic!



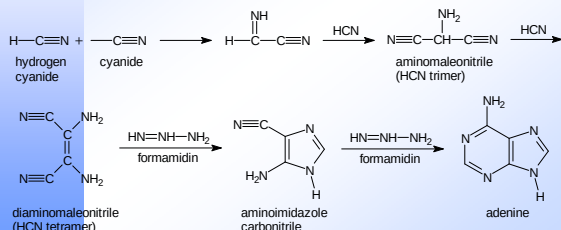
Efekt aminokyselinového katalyzátoru na asymetrickou syntézu threosy a erythrosy z glykolaldehydu. S-ivaline značí L-2-amino 2-methyl butiric acid.

- S. Pizzarello and A. L. Weber, Nature 303 (2004) 1151. A. Weber, Orig. Life Evol. Biosphere 28 (1997) 259

Báze nukleových kyselin

Abiotická syntéza adeninu

- V roce 1960 při reminiscencích na Millerův pokus získal John Oró adenin z roztoku HCN a NH₃ cirkulujícím ve shodné aparatuře po několik dní. Výtěžnost reakce je 0,5 %, vedlejšími produkty jsou 4-aminoimidazol-5-karboxamid a kyanidový polymer.

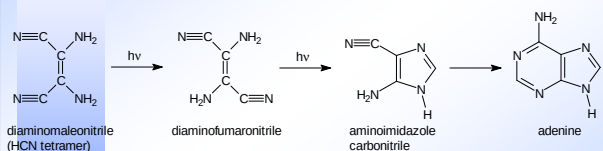


- J. Oró, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2 (1960) 407–412.

Báze nukleových kyselin

Abiotická syntéza adeninu

- V roce 1966 ukázali Ferris a Orgel, že limitující část Oróva cyklu lze obejít dvoufotonovým procesem



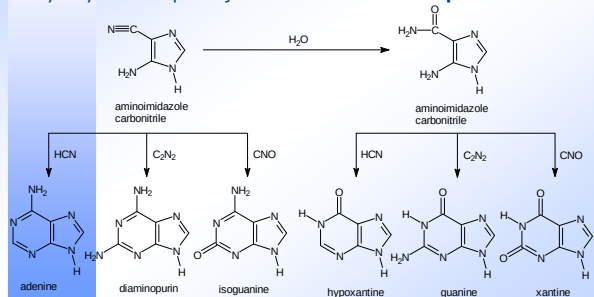
- Reakce mohla být v podmínkách primitivní Země urychlena v eutektickém roztoku HCN a H₂O, kde během měsíců při teplotách –10 až –30 °C samovolně vzniká HCN tetramer

- J. P. Ferris and L. E. Orgel, J. Am. Chem. Soc. 88 (1966) 1074.

Báze nukleových kyselin

Abiotická syntéza purinů

- Syntéza purinů je **obdobná k syntéze adeninu**
- Výtěžky ostatních purinů jsou **10× až 40× nižší než pro adenin**

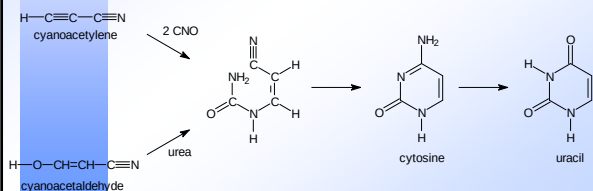


■ J. W. Schopf (Ed.): Life's origin. Univ. of California Press (2002) p. 94.

Báze nukleových kyselin

Abiotická syntéza cytosinu a uracilu

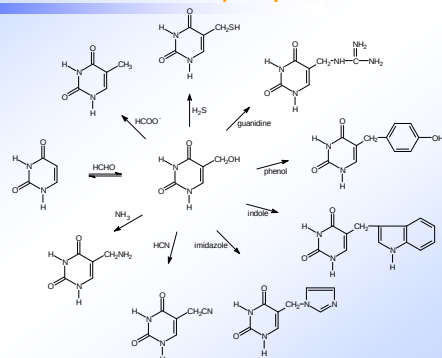
- Reakcí **kyanoacetylenu s CNO** vzniká cytosin, reakce vyžaduje nerelativně koncentrace CNO (>0,1 M)
- Reakce **kyanoacetylenu s močovinou** nevede k detekovatelnému množství cytosinu, ale při simulaci podmínek vypařování v lagunách (cyklické koncentrování látek) lze získat > 50% výtěžek cytosinu
- **Uracil vzniká deaminací z cytosinu**



■ M. P. Robertson and S. L. Miller, Nature 375 (1995) 772-774.

Báze nukleových kyselin

Krok ke světu RNA a nukleovým kyselinám

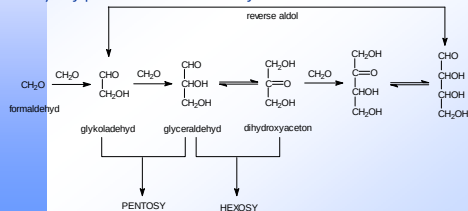


■ J. W. Schopf (Ed.): Life's origin. Univ. of California Press (2002) p. 97.

Cukry

Abiotická syntéza cukrů

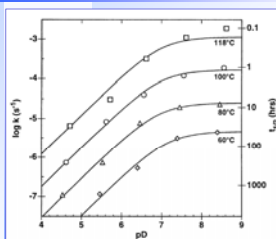
- Cukry vznikají **Butlerovovou syntézou** (1861) za alkalických podmínek
- Reakce je katalyzována $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a CaCO_3 , jílové minerály mohou při 100 °C také sloužit jako katalyzátory s malým výtěžkem
- Nevýhody Butlerovovy syntézy
 - Generuje velké množství rozmanitých cukrů >40
 - Cukry vznikají jako racemická směs L a D formy (pouze D-ribosa je přítomna v organismech)
 - Cukry mají podobné vlastnosti a nelze je snadno koncentrovat



■ C. Reid and L. E. Orgel, Nature 216 (1961) 455.

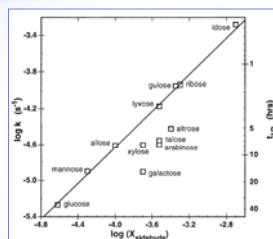
Cukry

Stabilita v závislosti na teplotě a pH



Stupeň rozkladu ribosy jako funkce pH udaný pro různé teploty. Poločas rozpadu při pH 7,4 a 100 °C je 74 min., při 25 °C 300 dnů, při 0 °C 44 let

■ R. Larralde et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 8158–8160.

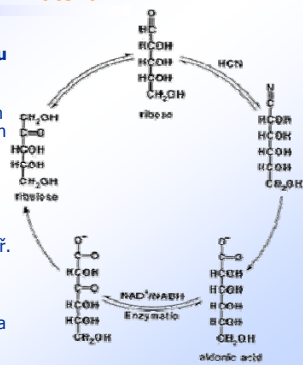


Stupeň rozkladu aldosa při pH 7,4 a teplotě 100 °C v 50 mM fosfátovém pufru vs. molární frakce (X) volného aldehydu

Cukry

Jsou cukry vhodný stavební materiál?

- **Nestabilita cukrů je diskvalifikuje jako významnou součást prebiotické evoluce**
- Cukry bylo možno v prebiotické evoluci uchovávat prostřednictvím cyklu ribosa + HCN → kyanohydrin → (hydrolyza) kys. aldonová (stabilní dlouhodobě) → (enzymaticky) → ribulosa → (izomerizace) ribosa
- Cukry musely být nahrazeny v prvním genetickém materiálu např. peptidy nebo jinou necukernou kóstrou
- Glykolýza je zřejmě jedním z prvních zdrojů energie, ale musela se vyvinout až po prebiotické evoluci



■ R. Larralde et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 8158–8160.

Nukleotidy

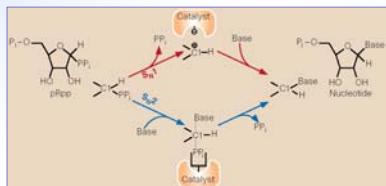
RNA katalyzovaný vznik nukleotidu

■ Syntéza nukleotidů je závislá na vzniku glykosidické vazby

- Vazba se tvoří mezi C1 ribosy a N9 purinu nebo N1 pyrimidinu

■ S_N1 reakce

- Pyrofosfát PP_i se odštěpí
- Vzniká + nabitý C1
- Nukleofilním atakem se naváže báze glykosidickou vazbou
- Užíváno nukleosid fosfobosyl transferázami



■ S_N2 reakce

- PP_i se váže na RNA
- Vzniká pozitivně nabitý C1
- Nukleofilním atakem se naváže báze glykosidickou vazbou za současného odštěpení PP_i

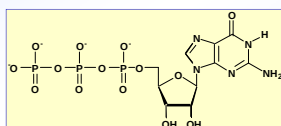
■ P. J. Urrau and D. P. Bartel, Nature 395 (1998) 260–263.

Nukleotidy

Pradávná alternativa ATP?

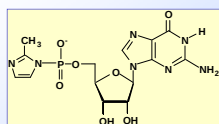
■ Nukleosid trifosfáty

- Substrát „moderního“ života
- Velice silně polární molekula
- Nízká chemická reaktivita



■ Nukleosid fosfoimidazolidy

- Modelový prebiotický substrát
- Méně polární, více permeabilní
- Vysoká chemická reaktivita



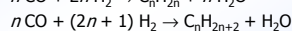
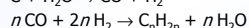
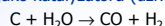
■ J. P. Ferris et al., Nature 381 (1996) 59–61.

Membránové lipidy

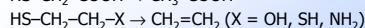
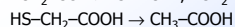
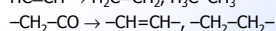
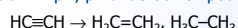
Syntéza mastných kyselin

- Mastné kyseliny jsou syntetizovány v cyklických krocích, zřejmě bez paralely s biosyntézou

- **Fischer–Tropschova syntéza** v modifikaci Nooner (1979) syntetizuje řetězce až 21 uhlíků dlouhé za vysokého tlaku H₂, teploty a v přítomnosti Ni nebo Fe jako katalyzátoru (užíváno v organické chemii):



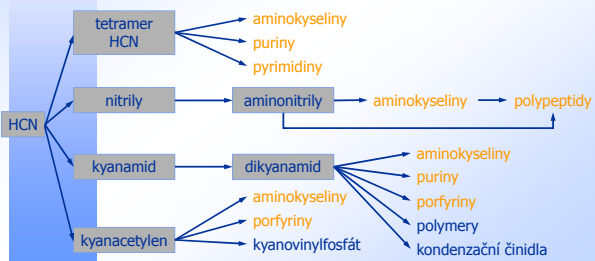
- **Stetterova tvorba nasycených uhlovodíků v přítomnosti FeS a SH** v neutrálním pH, při anaerobních podmínkách a teplotě 100 °C



Počátky života

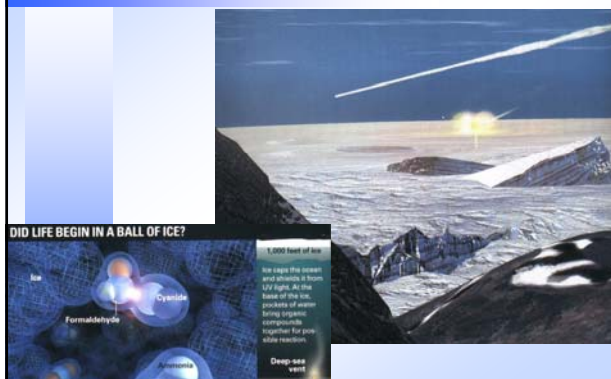
Chemická evoluce biomolekul z HCN

- HCN hrál **zřejmě nejdůležitější** roli při vzniku biomolekul
- V atmosféře snadno **vzniká působením výbojů** a je **nesnadno destruatelný UV zářením**
- Bohužel **snadno reaguje s H_2O** za vzniku formamidu a posléze $HCOOH$...



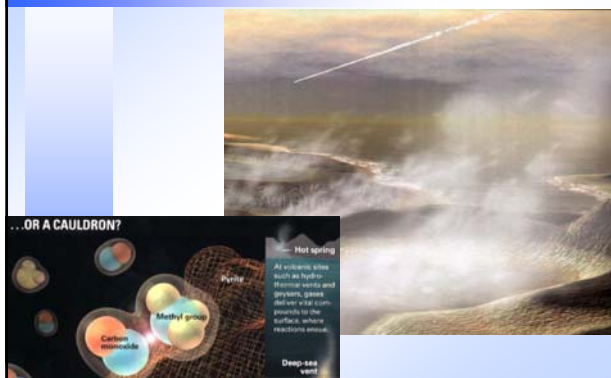
Počátky života

Vznikl život na ledové Zemi...



Počátky života

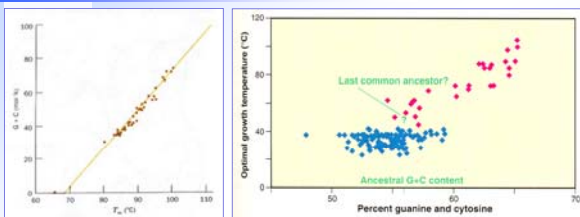
nebo v horkém zřídle?



Počátky života v Darwinově teplém rybníčku...



Počátky života Nikdo to nerad horké...



Teplota tání DNA dle zastoupení G + C párů

Analýza společného předka na základě zastoupení G + C párů v rRNA

- **Poločasy rozpadů jednotlivých bází**
 - Při 100 °C – C 19 dní, A G U 12 let, při 0 °C – C 17 000 let, A G U 600 000 let
- **Poločasy rozpadů cukrů**
 - Při 100 °C – 73 minut, při 0 °C – 44 let
- R. Larralde et al. PNAS 92 (1995) 8158. S. Levy & S. Miller Science 302 (1998) 618.

Počátky života Nikdo to nerad horké

- Zastoupení izotopů O, Si a H umožňuje stanovit teplotu pradávných oceánů (55–85, <40 °C, resp.)
- Fosfor je nezbytný biogenní prvek (dnes v koncentracích 19–26 ‰)
- V jihoafrických sedimentech z 3,2–3,5 Gyr již zastoupen 9,3–19,9 ‰ (6–8 ‰ v magmatickém apatitu či meteoritech)
- **Teplota oceánů vychází na 26–35 °C**

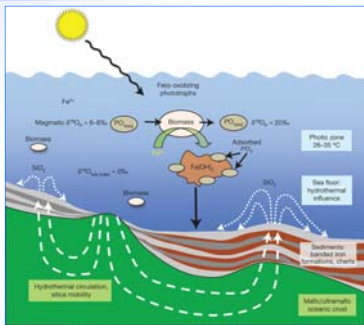
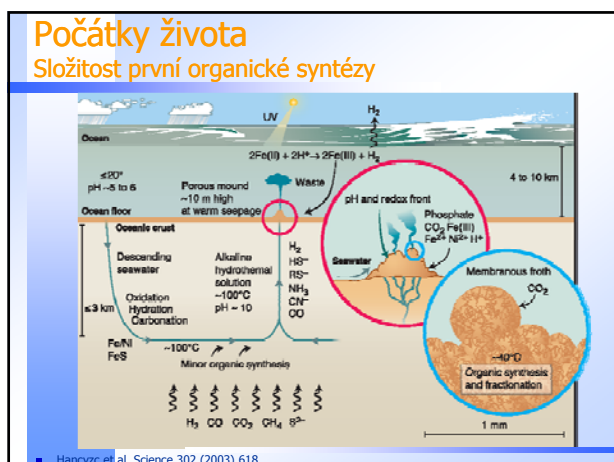


Schéma možného cyklu fosfátu a železa v oceánu Archeánu

- R. E. Blake et al. Nature 464 (2010) 1029–1032; M. T. Hren et al., Nature 462 (2009) 205–208.

Počátky života

Složitosť první organické syntézy



■ Hanczyc et al. Science 302 (2003) 618.

Počátky života

Nevýhody extrémních prostředí

Prostředí	Složení
Vysoké pH (10–14)	hydrolyzuje cukry, RNA, lipidy, denaturuje proteiny, inhibuje řadu prebiotických reakcí
Nízké pH (<0,5)	inhibuje Steckerovu reakci a HCN polymeraci na purinové báze, depurinuje DNA, hydrolyzuje a denaturuje proteiny
Vysoká salinita (5 M NaCl)	ničí membrány, denaturuje proteiny
Vysoká teplota (>100 °C)	ničí membrány, degraduje cukry, denaturuje proteiny a DNA, racemizuje aminokyseliny
Nízká teplota (< 20 °C)	zpevňuje membrány, zvyšuje koncentrace solí, snižuje metabolickou přeměnu
Ionizační záření	vytváří volné radikály, ničí všechny biomolekuly
UV záření	degraduje aminokyseliny, cukry a náze, působí mutageně

■ H. J. Cleaves, J. H. Chalmers, Astrobiology 4 (2004) 1–9.

Počátky života

Spleťté cesty života...



Doporučená literatura

- D. Deamer, J. W. Szostak (eds.): **The origins of life**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2010.
{Nejlepší současný soubor vědeckých prací na téma vzniku života}
- M. Gargaud, B. Barbier, H. Martin, J. Reisse (eds.): **Lectures in astrobiology** (Vol 1: From prebiotic chemistry to the origin of life on Earth). Springer, Berlin – Heidelberg 2002. {Učebnice astrobiologie vyžadující hlubší znalosti}
- J. I. Lunine: **Astrobiology** (A multidisciplinary approach). Pearson Education & Addison Wesley, New York 2005.
{První a skutečně základní učebnice astrobiologie}
- J. W. Schopf (ed.): **Life's origin (The beginnings of biological evolution)**. University of California Press, Berkeley – Los Angeles – London 2002.
{Skvělá kniha shrnující veškeré poznatky z prebiotické evoluce}
- G. Zubay: **Origins of life on earth and in the cosmos**. Wm. C. Brown Publishers, Boston, 1996. {Velmi hezká učebnice o vzniku života}
