

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Geologie
Studijní obor: Praktická geobiologie



Rastislav Čvirik

Evolúcia života a svet RNA
Evolution of Life - The RNA world

Bakalářská práce

Školitel: Doc. RNDr. Anton Markoš, CSc.

Praha, 2014

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som predkladanú záverečnú prácu vypracoval samostatne a že som uviedol všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť, nebola predložená k nadobudnutiu iného, alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, 20.5. 2014



Rastislav Čvirik

Pod'akovanie

Týmto spôsobom sa chcem predovšetkým poďakovať školiteľovi, Doc. RNDr. Antonovi Markošovi, CSc za vedenie práce, trpezlivosť a podnetné pripomienky pri jej písaní. Ďalej by som sa chcel poďakovať rodine za psychickú a aj finančnú podporu.

Abstrakt

Vznik a evolúcia života v prírodných vedách predstavuje komplexnú a doposiaľ nevyriešenú otázku. Jedno z možných vysvetlení ponúka hypotéza „sveta RNA“. Jej hlavnou myšlienkou je, že molekula RNA môže fungovať ako nositeľ genetickej informácie a zároveň aj ako katalyzátor chemických reakcií. Rovnako predpokladá, že v skorej fáze vývoja života na Zemi bola genetická kontinuita zaistená replikáciou molekuly RNA, proteíny a DNA sa vynorili až neskôr. Z recentných výskumov sa vynárajú stále silnejšie dôkazy ktoré podporujú existenciu tohoto sveta. Zostáva však stále množstvo problémov a nevyriešených paradoxov spojených prebiotickou chémiou. Aj keď táto teória priamo nevysvetľuje vznik života, ponúka zaujímavú alternatívu ako k tejto udalosti mohlo dojsť na primitívnej Zemi.

Abstract

Origin and evolution of life represents complex and not yet resolved question in a field of natural sciences. One of the possible explanation is held by „The RNA world theory“. In its general notion, RNA molecule can function both as genetic carrier and catalyst. Further it assumes, that in early development of life, genetic continuity was assured by the replication of RNA whereas proteins and DNA only appeared later. In a light of recent reasearch there is now a strong evidence supporting existence of this world. However, there are still several problems associated with prebiotic chemistry reactions and number of unresolved paradoxes. Although this teory does not directly explain life's origins, it offers us an alternative how such event may occured on primitive Earth.

OBSAH

1 Úvod	7
2 Prebiotické podmienky	8
2.1 História Zeme a Slnčnej sústavy	8
2.1.2 Kométy	8
2.1.3 Meteority	9
2.1.4 Medzihviezdny prach	9
2.2 Počiatkový vývoj Zeme, zloženie atmosféry a vznik oceánov	10
2.3 Časove „okno“ vzniku života	11
3 Život a fyzika	11
4 Evolúcia života a svet RNA	12
4.1 Obecná myšlienka sveta RNA	12
4.2 Súčasná funkcia RNA v bunke	13
4.3 Prebiotická syntéza nukleotidov	13
4.3.1 Syntéza cukrov z formaldehydu	13
4.3.2 Syntéza purínu	14
4.3.3 Syntéza pyrimidínu	15
4.3.4 Prebiotická syntéza nukleotidov	16
4.3.5 Fosforylácia nukleotidov	16
4.3.6 Polymerizácia aktivovaných nukleotidov	18
4.4 Replikácia RNA	20
4.4.1 Neenzymatická replikácia RNA	20
4.4.2 Prvá RNA replikáza	21
4.4.3 Funkcia replikázy vo vyvinutom svete RNA	24
4.5 Ribozýmy	24
4.6 Sen molekulárneho biológa	26
4.7 Alternatívne genetické systémy	27
5 Záver	29
6 Použitá literatúra	30

1 Úvod

Myšlienka, že sa pri vzniku života uplatnili molekuly RNA skôr ako proteíny bola navrhnutá už viac ako pred štyridsiatimi rokmi (Woese, 1967; Crick, 1968; Orgel, 1968). Autori predniesli hypotézu, že katalyzátory založené na RNA mohli hrať kľúčovú úlohu v raných fázach evolúcie života. Avšak skutočnosť, že RNA katalyzátory môžu byť stále prítomné v súčasných organizmoch bola stále prehliadaná. Až nečakaný objav ribozým (Kruger et al., 1982; Guerrier-Takada et al., 1983) rozpútal rozsiahle diskusie o úlohe RNA v evolúcii života a viedol k sformovaniu hypotézy sveta RNA ("the RNA World" Gilbert, 1986). Definícia sveta RNA však v súčasnej dobe znamená rôzne pojmy pre rôzne vedecké skupiny. Bolo by preto márne hľadať striktné definície. Tieto teórie sa však zhodujú v troch základných predpokladoch. (1) V prvotných fázach evolúcie života bola genetická informácia prenášaná molekulou RNA. (2) Kľúčom k jej replikácii je párovanie báz na spôsob objavený Watsonom a Crickom. (3) Proteíny z počiatku neboli prítomné a ich úlohu plnili ribozýmy. Teória Sveta RNA poskytuje oveľa slabšie argumenty v oblasti, či život naozaj začal syntézou RNA a aká bola dostupnosť jednotlivých chemických prvočiniteľov v prebiotických podmienkach ranej Zeme, a teda, či mohol život začať týmto spôsobom bez predchádzajúcej evolúcie iných makromolekúl. V svetle najnovších výzkumov má problém teórie sveta RNA stále ďaleko od svojho vyriešenia. Je preto vhodné zvažovať alternatívy, že predchodcom systému postaveného na RNA mohli byť iné replikatívne molekuly, rovnako ako mohla byť RNA predchodcom DNA a proteínov.

2 Prebiotické podmienky

2.1 História Zeme a Slnecnej sústavy

Vek Zemského telesa sa dnes odhaduje na približne 4,5 miliardy rokov, len o 10 až 15 miliónov rokov menej ako vek Slnecnej sústavy (Dalrymple, 1994). V súčasnosti prijímaná hypotéza pre vznik Slnecnej sústavy je nebulárna hypotéza (Montmerle et al., 2006) podľa ktorej Slnecná sústava skondenzovala do protoplanetárneho disku z mračna častíc prachu a plynu ktoré boli pozostatkom predchádzajúcej supernovy. V dôsledku vonkajšieho faktoru, ktorým mohla byť napríklad zmena gravitačného alebo elektromagnetického poľa, prípadne výbuch inej supernovy, sa začal plynový oblak zmršťovať a roztáčať. Odstredivou silou nadobudlo protoplanetárne mračno najvyššiu koncentráciu látky v jeho centrálnej časti. Vplyvom gravitácie a tepla sa guľový útvar zo stlačeného plynu zohrieval a postupne začal žiariť ako protoslnko. Jeho ďalším zmršťovaním a zohrievaním sa v ňom naštartovala termonukleárna fúzia ktorej uvoľnená energia zabraňovala už ďalšiemu gravitačnému kolapsu. Elektromagnetickým žiarením boli následne vypudené volatilné prvky ako vodík, kyslík a dusík. Tieto prvky boli „odviate“ do vonkajších častí Slnecnej sústavy kde boli použité predovšetkým k sformovaniu planét plyných obrov zatiaľ čo ťažšie prvky ako oxidy kovov a silikáty skondenzovali bližšie centru a boli použité na tvorbu vnútorných kamenných planét Slnecnej sústavy. Menšie zvyškové telesá, kométy, meteority a medzihviezdny prach dopadajú na planéty do dnes. Predpokladá sa však, že intenzita týchto udalostí bola rádovo vyššia v čase, keď sa na Zemi formoval život. Prítomnosť extraterestrického organického materiálu v týchto telesách viedla k úvahám, že mohli byť dobrým zdrojom organických zlúčenín ktoré sú potrebné pre vznik života (Oró, 1961; Anders, 1989; Chyba et al., 1990; Chyba and Sagan, 1992).

2.1.1 Kométy

Kométy sú telesá zložené zo zmesi prachu a ľadu, sformované v ranných fázach vzniku Slnecnej sústavy (Festou et al., 2004). Okrem ľadu a rôznych anorganických zložiek boli na kométach spektroskopicky zaznamenané volatilné organické komponenty (Ehrenfreund and Charnley, 2000), a to vysokoreaktívne organické zlúčeniny ako kyanovodík a formaldehyd.

Merania pomeru izotopov vodíka dokonca naznačujú, že nejaká časť vody z oceánov môže pochádzať z komét (Chyba, 1990; Meier et al., 1998). Ak je toto tvrdenie pravdivé, kométy by zároveň mohli na Zem priniesť aj organické zlúčeniny. Kométa s priemerom jeden kilometer by priniesla množstvo kyanovodíku porovnateľné s odhadovanou ročnou produkciou redukčnej atmosféry. Toto množstvo by bolo ešte dôležitejšie v prípade, ak by ranná Zem nemala redukčnú atmosféru, samozrejme ale za predpokladu, že by bol všetok kyanovodík zachovaný po impakte.

2.1.2 Meteority

Meteority všeobecne predstavujú menej volatilné zbytky z formácie Slnčnej sústavy. Teda objekty, ktoré sa sformovali bližšie pri Slnku a prešli výraznejšou tepelnou premenou (Lauretta and McSween, 2006). Ich zloženie je premenlivé od kamenných až po železité. Takzvané uhlíkaté chondrity obsahujú podstatnejšie množstvo organických zložiek a to až v miere dvoch percent z celkovej hmoty (Alexander et al., 2007). Z uhlíkatých chondritov bolo už identifikovaných množstvo organických zlúčenín vrátane tých, ktoré nachádzame aj v súčasných organizmoch (Pizzarello et al., 2006). Nezvyčajné pomery izotopov uhlíka v týchto telesách naznačujú, že sa vskutku jedná o extraterestrický organický materiál (Pizzarello and Cronin, 2000; Glavin and Dworkin, 2009).

2.1.3 Medzihviezdny prach

Prísun chemických prvkov z medzihviezdneho prachu bol pravdepodobne oveľa dôležitejší ako z komét a meteoritov. Súčasná miera prínosu medzihviezdneho prachu na Zem je vysoká, odhaduje sa však, že táto miera mohla byť na primitívnej Zemi 100 až 1000 krát vyššia (Love and Brownlee, 1993). Avšak obsah organických zlúčenín v medzihviezdnom prachu je stále málo známy. Odhaduje sa, že ich hlavnou zložkou by mohli byť heterogénne organické polyméry voľne označované aj ako tholíny. Pri hydrolýze sa z tholínov uvoľňujú aminokyseliny. Môžu teda predstavovať dobrý zdroj organických zlúčenín (Khare et al., 1986). Pri vstupe častíc medzihviezdneho prachu do atmosféry sa tieto prvky zahrievajú a ich tholíny môžu pyrolyzovať vytvárajúc kyanovodík a ďalšie organické zlúčeniny (Mukhin et al., 1989; Chyba et al., 1990).

2.2 Počiatkový vývoj Zeme, zloženie atmosféry a vznik oceánov

Po prvotnej akrecii sa Zem začala postupne zohrievať z energie dopadajúcich telies a predovšetkým z energie uvoľnenej z rozpadu rádioaktívnych prvkov. Keď sa vnútorne zachytené teplo stalo dostatočne silným na to aby roztavilo horniny a kovy, nastal proces gravitačnej diferenciácie (Reichwalder, 2003). Ťažšie kovové prvky migrovali do vnútra planéty, a keďže značná časť zemského materiálu pozostávala z redukovaného železa táto udalosť odobrala veľkú časť redukčných ekvivalentov planéty. Naopak o mnoho ľahšie prvky vrátane dusíku, vodíku a uhlíku migrovali k vonkajším častiam.

To, či bola prvotná atmosféra niekedy redukčnej povahy zostáva stále nevyriešenou otázkou (Tian et al., 2005), ale zdá sa nepravdepodobné, že by tak mohlo byť po dlhší časový úsek. Atmosféra s prevahou N_2/CO_2 sa zdá byť najstabilnejšou formou bez prítomnosti života. O_2 je v dnešných podmienkach skoro výhradne generovaný organizmami. Bez prítomnosti života by bola životnosť O_2 v atmosfére veľmi krátka v dôsledku oxidácie s prvkami ako sú železo v zemskej kôre. Ako dôsledok neprítomnosti O_2 by neexistoval UV absorbujúci O_3 a UV žiarenie by dopadalo priamo na zemský povrch (Cleaves and Miller, 1998). Pokiaľ sa zemské jadro diferencovalo dostatočne rýchlo, mohla sa zemská atmosféra podobáť súčasným vulkanickým plynom (Rubey, 1951). Atmosféra postavená prevažne z CH_4 však podľa odhadov nemohla existovať viac ako $10^5 - 10^8$ rokov, a to v dôsledku fotolýzy metánu. Ľahké atmosférické plyny ako H_2 sú veľmi náchylné k úniku do kozmického priestoru vďaka nízkym únikovým rýchlostiam, iné prvky ako napríklad NH_3 by rýchlo dekomponovali vplyvom UV žiarenia (Ferris and Nicodem, 1972; Kuhn and Atreya, 1979). Avšak menšie množstvá NH_3 by mohli byť stabilné a ich veľké množstvá rozpúšťané v oceánoch (Bada and Miller, 1968). Ako zemský plášť postupne chladol, vodné pary skondenzovali a voda začala padať na zemský povrch v podobe zrážok. Vytvorili sa tak prvé vodné nádrže so zmytými zvetralinami. Existujú dôkazy z minerálnych zŕn zirkónov, že tekutá voda existovala už pred 4,4 miliardami rokov (Valley et al., 2002). Naše vedomosti o teplote a pH prvotných oceánov však zostávajú obmedzené. Teplota mohla kolísať v rozmedzí 0 až $100^\circ C$ a pH až od 5 do 11 (Kempe and Degens, 1985; Morse and Mackenzie, 1998). Oxidovaný stav atmosféry je dôležitý pre produkciu organických molekúl ako HCN. V CH_4/N_2 type atmosféry je HCN produkovaný v hojnej miere (Chameides and Walker, 1981; Stribling and Miller, 1987) avšak v CO_2/N_2 atmosfére je väčšina molekúl N vyprodukovaných štiepením N_2 naviazaná na O a vytvára NO_x zlúčeniny (Chameides and Walker, 1981). Redukované

zmesi plynov všeobecne viac prispievajú k organickým reakciám ako oxidované a neutrálne zmesi plynov. Dokonca iba mierne redukujúca zmes plynov dokáže prispieť k značnému množstvu organických zlúčenín a zdá sa byť pravdepodobné, že dostatok energie nebol v tomto prípade limitujúcim faktorom (Stribling and Miller, 1987). Redukčné podmienky sú rovnako potrebné pre efektívnu syntézu aminokyselín, purínov, pyrimidínov a cukrov (Stribling and Miller, 1987). Z toho, čo je známe o prebiotckej chémii sa dá usúdiť, že pokiaľ nebola prvotná atmosféra Zeme redukčnej povahy, museli byť organické zložky na Zem prinesené prachovými časticami, meteoritmi a kométami (Anders, 1989; Chyba et al., 1990). Avšak množstvá materiálu, ktoré by mohli byť týmto spôsobom prinesené nemuseli postačovať pre vznik života.

2.3 Časové „okno“ vzniku života

Existuje všeobecný predpoklad, že život vznikol za pomerne dlhý časový úsek. Nie je však možné určiť presnú chronológiu týchto udalostí. Existujú pomerne presvedčivé paleontologické dôkazy, že mikrobiálny život prosperoval už pred približne 3,5 miliardami rokov (Schopf, 1993). Naopak horniny prinesené z Mesiaca ukazujú, že Zem prešla približne pred 3,9 miliardou rokov sériou rozsiahlych bombardovaní, ktoré by mali pre život, ak by už existoval, sterilizujúci efekt (Abramov and Mojzsis, 2009). Z uvedeného teda vyplýva, že vznik a diverzifikácia života musela prebehnúť počas časového úseku trvajúceho iba 300 miliónov rokov (Lazcano and Miller, 1996).

3 Život a fyzika

Aké fyzikálne vlastnosti musí mať systém aby sme ho mohli nazývať živým? Podľa Kauffmanu sa dá život zdefinovať ako autokatalytický systém schopný aspoň jedného termodynamického cyklu (Kauffman, 2000) a tento systém musí byť nevyhnutne vychýlený z termodynamickej rovnováhy. Druhý termodynamický zákon hovorí, že entropia izolovaného systému je buď stála alebo stúpa. Entropia predstavuje mieru neusporiadanosti systému. Zvyšovanie entropie podľa druhého termodynamického zákona teda nie je nič iné, než tendencia systému prechádzať z menej pravdepodobných stavov na pravdepodobnejšie stavy a teda že fyzikálne systémy prirodzene zvyšujú svoju mieru neusporiadanosti. Život

predstavuje vysoko usporiadaný systém konajúci prácu, a ako už bolo spomenuté, je pre to nutne vychýlený z termodynamickkej rovnováhy. Z klasickej fyzikálnej definície vyplýva, že práca je sila pôsobiaca po dráhe, vyjadrená ako skalárna veličina. Práca sa však dá definovať aj ako usmerňované uvoľňovanie energie. U rovnovážnych systémov žiadnu čistú prácu získať nejde. Situácia je ale iná, ak sa jedná o systém nerovnovážny. Meranie a detekcia odchýliek od rovnováhy sa u nerovnovážnych systémov vypláca a vedie k získaniu práce. Uvoľnená energia poslúži k práci, ktorá sa môže šíriť do ďalších pracovných cyklov, v ktorých sa budujú nové usmerňovače energie pre ešte ďalšie šírenie práce (Kauffman, 2000). Na živý organizmus sa dá preto dívať ako na nerovnovážny systém, v ktorom sa môžu merania a ich registrácie vyplácať pretože to dovoľuje získať zo systému viac energie než bolo investovanej do samotného merania a záznamu. Vysoká špecifika molekulárnych procesov v bunke je najlepším príkladom tohoto fyzikálneho procesu. Celá kaskáda signálnych dráh v bunke meria a koordinuje aktivitu ako vo vnútri tak aj na povrchu.

4 Evolúcia života a svet RNA

4.1 Obecná myšlienka sveta RNA

Termín svet RNA bol prvý krát použitý Gilbertom (1986) ktorý študoval katalytické molekuly RNA. Koncept „prvotnej“ molekuly RNA je však ešte starší. Uvažovali nad ním už Crick (1968), Orgel (1968) a Woese (1967). Noller následne preukázal, že ribozomálna RNA je pre funkciu samotného ribozómu oveľa dôležitejšia ako ribozomálne proteíny, čo dodalo experimentálny podklad pre uvedené špekulácie (Noller and Chaires, 1972; Noller, 1993). Objav RNA katalýzy (Kruger et al., 1982; Guerrier-Takada et al., 1983) poskytol ešte pevnejšiu oporu pre pravdepodobnosť sveta RNA. Objav širokého spektra RNA katalyzátorov výberom reťazcov RNA z veľkej knižnice náhodných sekvencií (SELEX) (Ellington and Szostak, 1990; Tuerk and Gold, 1990; Wright and Joyce, 1997) poháňal vedecký entuziazmus a umožnil nám pochopiť hypotetický prvotný organizmus založený na RNA s komplexným metabolizmom (Benner et al., 1989). Nevyriešenou otázkou však naďalej zostáva, existoval svet RNA? Jedným z najpresvedčivejších tvrdení je, že molekula RNA dokáže prenášať informáciu a môže svojou konformáciou zároveň slúžiť aj ako katalyzátor. Existuje predpoklad, že by RNA mala byť schopná samoreplikácie a skutočne

dokáže konať určitý druh týchto chemických reakcií. Ribozóm využíva RNA katalýzy v kľúčových krokoch syntézy proteínov u všetkých doteraz známych organizmov, a dá sa preto predpokladať že tak bolo aj u posledného univerzálneho spoločného predka (LUCA). RNA vysoko pravdepodobne vznikla skôr ako DNA, pretože viacero enzýmov je špecializovaných pre syntézu ribonukleotidových prekursorov RNA, zatiaľ čo deoxyribonukleotidová syntéza predstavuje iba derivát ribonukleotidovej syntézy. A nakoniec, predpokladaný svet RNA poskytuje atraktívnu možnosť kontinuity od sveta RNA až do dnešnej podoby života s DNA a proteínmi.

4.2 Súčasná funkcia RNA v bunke

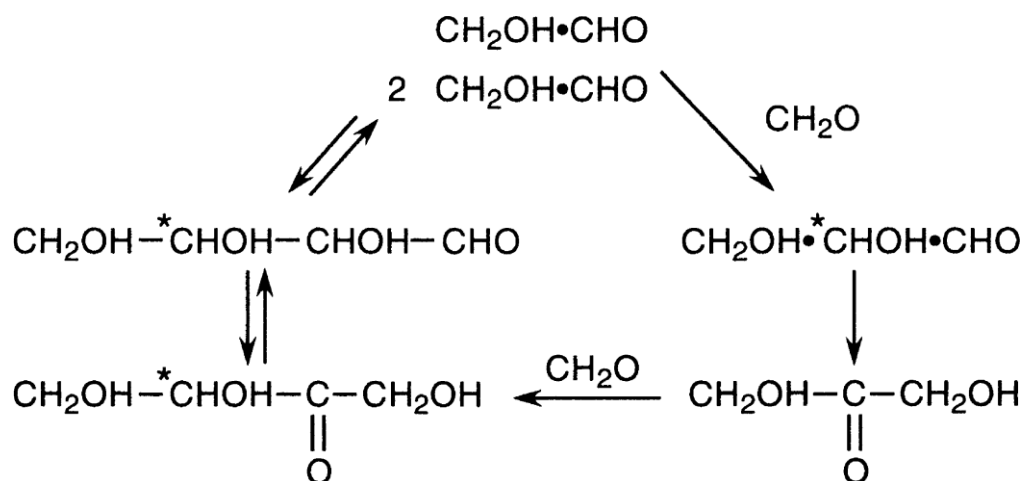
Dnes má RNA predovšetkým funkciu messengeru a je centrálnou molekulou pre génovú expresiu u všetkých živých organizmov (Atkins, Gesteland, Cech, 2011). Je taktiež kľúčová pre katalýzu, ako možno dramaticky pozorovať na ribozóme rovnako tak ako aj na ostatných ribozýmoch. RNA ďalej dokáže špecificky viazať malé metabolity a následne využiť energiu získanú z väzby na zmenu z jednej RNA štruktúry na druhú. Tieto takzvané riboswitche sú bežnými regulátormi génovej expície u gram pozitívnych baktérií a nachádzame ich aj v iných organizmoch vrátane rastlín. Okrem toho aj veľmi malé molekuly RNA môžu fungovať ako ribozýmy dosahujúce sekvenčne špecifické samoštiepenie. Väčšie ribozýmy môžu uskutočňovať zložité reakcie spájania RNA.

4.3 Prebiotická syntéza nukleotidov

4.3.1 Syntéza cukrov z formaldehydu

Reakcia polymerizácie formaldehydu za prítomnosti minerálnych katalyzátorov ktorej produktom je zmes cukrov, takzvaná formózová reakcia bola objavená už v 19 storočí (Butlerow, 1861) a bola ďalej podrobne preskúmaná do väčších detailov (Mizuno & Weiss, 1974). Reakcia prebieha vo vodnom roztoku za premeny jednoduchého substrátu, formaldehydu na zmes komplexných molekúl z ktorých sú mnohé veľmi dôležité biochemické zlúčeniny. Prvým produktom reakcie je glycoaldehyd ktorý je neskôr premenený a glyceraldehyd a zmes tetrózových, pentózových a hexózových cukrov. V daných podmienkach reakcie sa cukry pretvárajú na hydroxy-kyseliny a podobné

zlúčeniny za približne ten istý časový úsek, ako za ktorý vznikli. Ak by mohla byť Butlerova reakcia usmernená k tvorbe ribózy, poskytla by ideálnu cestu, ako vysvetliť vznik cukrovej zložky RNA. Až do nedávna bolo považované za nemožné nasmerovať reakciu týmto smerom, pretože ribóza ako produkt je zastúpená len vo veľmi zanedbateľnom množstve. Avšak nedávno bola preštudovaná aj iná chemická cesta. Zubay podrobne študoval formózovú reakciu katalyzovanú Pb^{2+} (Zubay, 1998; Zubay& Mui, 2001). Ukázalo sa, že viac ako 30% vstupného formaldehydu môže byť premeneného na zmes aldopentóz a predkladá silný dôkaz, že ribóza je prvý z vytvorených pentózových cukrov a formujú sa z nej ďalšie pentózy za pomoci Pb^{2+} katalyzovanej izomerácie. Tieto štúdie teda naznačujú, že syntéza ribózy v prebiotických podmienkach bola možná.



Obr. I - Jednoduchý model hypotetického cyklu autokatalytickej formózovej reakcie. V každom cykle molekula glycoaldehydu napomáha syntéze druhej molekuly glycoaldehydu z dvoch molekúl formaldehydu. U asymetrických uhlíkov s hviezdičkou nie je zadefinovaná stereo chémia (Orgel, 2004).

4.3.2 Syntéza purínu

V pôvodnej práci z roku 1950 Juan Oreo a jeho spolupracovníci poukázali, že adenín môže byť produktom refluxovania kyanidu amónneho (chemická metóda zahrievania roztoku pri ktorej sa skondenzované pary vracajú späť do nádoby kde podliehajú ďalšiemu zahrievaniu). Tieto a ďalšie podobné reakcie boli znovu analyzované s použitím iných reakčných podmienok a produkty analyzované s použitím vylepšených analytických techník. Okrem adenínu boli medzi produktmi reakcie zachytené aj malé množstvá guanínu. (Miyakawa et

4.3.4 Prebiotická syntéza nukleotidov

Syntéza nukleotidov z ribózy a nukleotidových báz je zatiaľ najmenej vyriešenou otázkou vo svete RNA. Ak je D-ribóza zahriata s hypoxantínom za prítomnosti chloridu horečnatého alebo zmesi anorganických solí prítomných v morskej vode, vzniká až 8% autentického β -D-inosínu a menšie množstvo α izoméru (Fuller et al., 1972). Zmes produktov vytvorených pri reakcii adenínu za rovnakých chemických podmienok je oveľa viac rozmanitá keďže sa reakcia odohráva na amino skupine. Každopádne, hydrolýza produktov reakcie za relatívne miernych podmienok zanechá menšiu zmes izomérov adenosínu z ktorej až 3% tvorí β -D-adenozín. Doposiaľ však nebola popísaná žiadna priama syntéza pyrimidínu, uracilu alebo citozínu z ribózy.

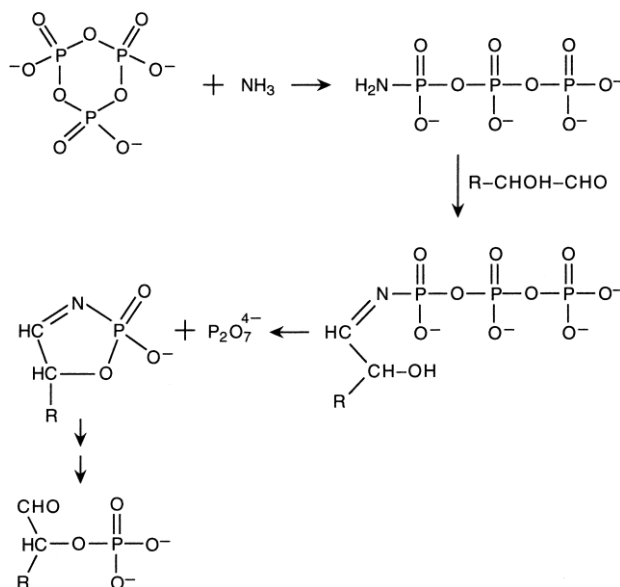
4.3.5 Fosforylácia nukleotidov

Za najpravdepodobnejší zdroj fosfátu v prebiotických podmienkach sú považované anorganické fosfáty alebo polyfosfáty. Avšak iba ortofosfáty a nerozpustné fosforečnany vápenaté sú hojne zastúpené v súčasných horninách. Existujú dôkazy, že kondenzované fosfáty môžu byť produktom vulkanickej činnosti (Yamagata et al., 1991). V kontexte prebotickej syntézy bolo preskúmaných mnoho postupov za prítomnosti anorganických ortofosfátov alebo polyfosfátov. Mnohé zo skorších pokusov fosforylovať nukleotidy využili organické kondenzačné činidlá ako sú kyanamid, kyanamid dimér alebo kyanát. Avšak tieto reakcie sú zvyčajne veľmi neefektívne vo vodných roztokoch pretože vodný roztok viaže aktivované fosfátové medziprodukty reakcie (Lohrmann & Orgel, 1968). Tak ako ostatné alkoholy, môžu byť nukleotidy fosforylované zahriatím v tuhom stave s kyslými fosfátmi ako je napríklad NaH_2PO_4 . Tieto reakcie však vyžadujú pomerne vysoké teploty a nie sú veľmi účinné (Beck et al., 1967). Močovina a v menšom rozsahu amidy môžu katalyzovať túto reakciu, konkrétne keď je fosfát amónny použitý ako anorganická zložka. Predpokladá sa, že fosfát amónny je neobyčajne efektívny v tejto reakcii pretože stráca amoniovú skupinu zahriatím a vytvára veľmi kyslé prostredie. Keď nie sú prítomné organické komponenty, zahrievanie fosfátu amónneho s močovinou umožňuje vznik zmesi lineárnych polyfosfátov s vysokou molekulárnou hmotnosťou (Lundstrom & Whittaker, 1937; Osterberg & Orgel, 1972). Zahrievaním pri miernejších teplotách s fosfátom amónnym a močovinou môžu byť nukleotidy premenené na komplexnú zmes produktov obsahujúcich jednu alebo viac

fosfátových skupín (Lohrmann & Orgel, 1971). Napríklad, keď je uridín zahrievaný za dostatku močoviny a fosfátu amónneho pri teplote 100°C až 70% vstupných prvkov je premenených na zmes fosforylátov. Pokusy usmerniť tieto reakcie k tvorbe špecifických fosfátov alebo polyfosfátov ako napríklad nucleotid 5'-fosfát alebo 5'-trifosfát už zaznamenali pozitívne výsledky (Handsuh et al., 1973; Osterberg et al., 1973; Reimann & Zubay, 1999). Tieto reakcie boli naďalej študované, avšak ich mechanizmy nie sú stále dobre známe. Katalýza na kyslej báze sa však zdá byť jednou z najpravdepodobnejších ciest (Osterberg & Orgel, 1972). Už zmienená močovinou katalyzovaná reakcia prebieha oveľa pomalšie, keď je fosforečnan amónny nahradený málo rozpustným fosforečnanom vápenatým. Predsa je však pri reakciách hydroxylapatitu, močoviny, chloridu amónneho a nukleozidov pri teplote 100°C produktom až 20% nukleotidov (Lohrmann & Orgel, 1971). Ukázali sme, že zahrievaním fosforečnanov amónnych s katalyzátormi ako je močovina vznikajú zmesi lineárnych polyfosfátov. Tieto zlúčeniny môžu však vznikajú aj silným zahrievaním iných kyslých fosfátov ako sú NaH_2PO_4 . Možno práve aj z tohto dôvodu vznikajú pri vulkanickej činnosti (Yamagata et al., 1991). Lineárne polyfosfáty sa neukázali byť dobrými fosforylačnými činidlami vo vodných roztokoch. Môžu sa ale ochotne pretvárať na cyklické trifosfáty alebo trimetafosfáty v zásaditých podmienkach za prítomnosti bivalentných kovových iónov. Cyklické trimetafosfáty sú dôležité ako potencionálne fosforylačné činidlá v prebiotických podmienkach. V silných zásaditých podmienkach reagujú cis glykoly s trimetafosfátmi za vzniku cyklických fosfátov ktoré následne hydrolyzujú na zmes monofosfátov. Reakcia amoniaku s trimetafosfátovým aniontom vyprodukuje amidotrifosfát. Následne 2-hydroxyl skupina „zaútočí“ na alfa fosfát, vypudí pyrofosfát a sformuje cyklický fosforamidát. Nakoniec cyklický fosforamidát podstúpi hydrolýzu aby mohol naviazať 2-fosfát aldehydu. Táto sekvencia reakcií je považovaná za veľmi zaujímavú z hľadiska prebotickej chémie. Nevyhneme sa však skonštatovaniu, že v súčasnej dobe zatiaľ neexistuje žiadny presvedčivý dôkaz o syntéze nukleotidov za prebiotických podmienok. Bolo už demonštrovaných veľa individuálnych krokov ktoré mohli prispieť k reakciám na ranej Zemi. Súčasná publikácia, obzvlášť od Zubaya a jeho spolupracovníkov naznačujú, že toto pátranie by nemuselo byť úplne beznádejné (Reimann & Zubay, 1999).

4.3.6 Polymerizácia aktivovaných nukleotidov

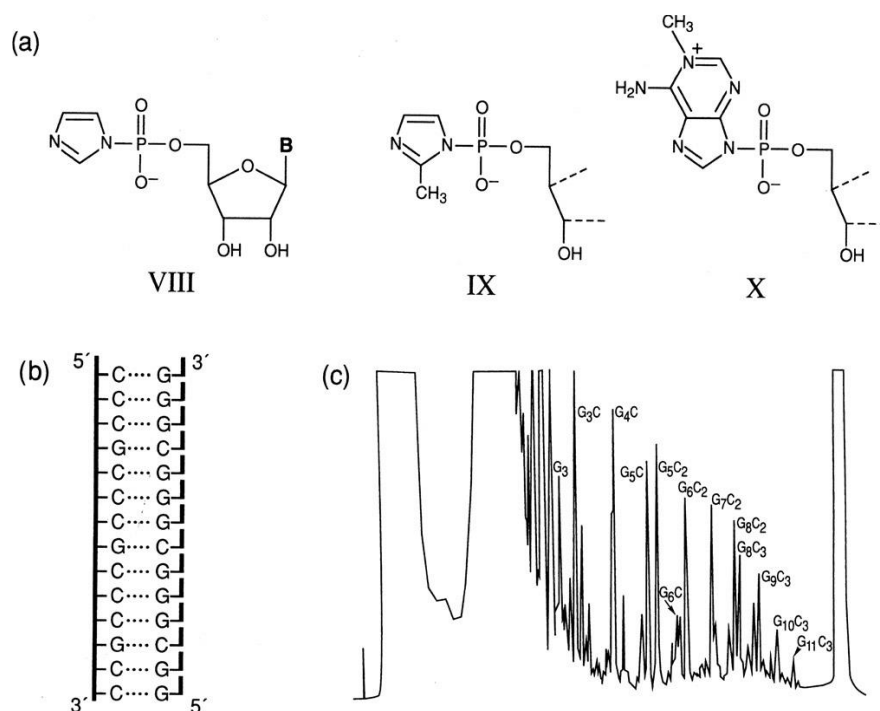
Polymerizácia nukleotidov vo vodnom roztoku je energeticky náročná reakcia a neprebíha spontánne. Evaporácia kyslých roztokov nukleotidov a ich následné zahrievanie vedú k utvoreniu zložitých zmesí veľmi krátkych nukleotidov v ktorých sa 2'-5' alebo 3'-5' fosfodiesterové väzby vyskytujú viacmenej náhodne (Moravek, 1967). V dôsledku toho musia pokusy polymerizovať nukleotidy vo vodných roztokoch nevyhnutne využívať externých aktivačných činidiel. Pokusy za použitia vápna a jemu podobných aktivačných činidiel alebo vo vode rozpustných karbodimidov nevedli k uspokojivým výsledkom alebo prinajlepšom viedli len k veľmi zanedbateľným množstvám dinukleotidov a krátkych oligonukleotidov. Polymerizácia predaktivovaných nukleotidov sa stretla s omnoho väčším úspechom. Avšak nukleotid-5'-polyfosfáty reagujú vo vodných roztokoch veľmi pomaly takže je ich štúdium v laboratórnych podmienkach problematické. Miesto toho boli pri väčšine reakcií použité nukleotidy aktivované ako fosforamidáty (obr. IV). Môžu byť prítomné v značnom množstve z reakcie nukleozid-5'-polyfosfátov a preto boli označené aj za prebiotické (Lohrmann, 1977). Je však nejasné, či a ako tieto látky mohli existovať na



Obr. III - Fosforylácia alfa hydroxyaldehydov amidotrifosfátovým aniontom (Orgel, 2004)

primitívnej Zemi, takže predstavujú iba indikátory toho, ako to mohlo vyzerat' v ranej molekulárnej evolúcií života. Zdroj energie potrebný pre polymerizáciu nukleotidov je tiež v súčasnej dobe nejasný. Jedným z možných vysvetlení je vytvorenie nukleotid polyfosfátov

z nukleotidov a anorganického fosfátu. Týmto spôsobom mohli nukleotid polyfosfáty pomaly polymerizovať alebo mohli byť premenené na fosforamidy ktoré polymerizovali rýchlejšie. James Ferris a jeho spolupracovníci podrobne skúmali pozoruhodné reakcie v ktorých minerál ílu, montmorilonit katalyzuje syntézu dlhých oligonukleotidov z relatívne zriedených roztokov nukleotid fosforamidátov (Ferris et al., 2003). V jednom z pokusov, za použitia fosforamidátu založenom na 1-metyladeníne boli schopný identifikovať nukleotidy dlhé až 40 báz (Huang & Ferris, 2003) a až 80% z nich obsahovalo 3'-5' fosfodiester reťazce. Je to bezpochyby jeden z najzaujímavejších objavov v kontexte katalýzy za prebiotických podmienok. Montmorilonit je ílový minerál s vrstvenou štruktúrou aluminosilikátov ktorá ochotne expanduje a dovoľuje väčším molekulám dostať sa medzi jednotlivé vrstvy. Je pravdepodobné, že sa nové fosfodiesterové vrstvy vytvárajú vtedy, keď sú substráty absorbované medzi vrstvami (Ertem & Ferris, 1998). Regiošpecifita (regiospecifity) polymerizácie do značnej miery závisí na povahe nukleotidovej bázy a aktivačnej skupiny. V niektorých prípadoch dokonca dokáže preferovať 3'-5' formáciu fosfodiesteru pred 2'-5'



Obr. IV

- Štruktúra niektorých aktivovaných nukleotidov použitých k syntéze oligonukleotidov
- Zjednodušený diagram s aktivovanými mononukleotidami usporiadanými na d(CCCGCCCGCCG) templaté
- Elektroforéza produktov vytvorených z aktivovaných monomérov usporiadaných na d(CCCGCCCGCCG) templaté. Je označené zloženie oligomérov odpovedajúce hlavným produktom. Degradácia so špecifickými RNA-zami ukázala, že každý hlavný produkt je komplementárny k subsekvencií templátu (Orgel, 2004).

formáciou ale vo väčšine prípadov je regiošpecifita veľmi mierna alebo preferuje 2'-5' formáciu fosfodiesterových väzieb. Tento spôsob katalýzy za pomoci minerálov je efektívny no nie je nijako výrazne špecifický, čo sa týka izomerických produktov. Tieto modely sú preto stále nepriame, keďže fosforamidáty nie sú považované za molekuly, ktoré mohli vzniknúť v prebiotických podmienkach.

4.4 Replikácia RNA

4.4.1 Neenzymatická replikácia RNA

Ak by existoval mechanizmus polymerizácie aktivovaných nukleotidov, vyprodukoval by zložitú zmes oligonukleotidov ktoré by sa líšili dĺžkou aj sekvenciou báz. Ďalšou fázou zrodenu sveta RNA by bola replikácia niektorých týchto molekúl tak, aby mohol začať proces porovnateľný s prirodzeným výberom. Predpokladá sa takzvaná templátom riadená syntéza, to znamená syntéza komplementárneho oligonukleotidu za pomoci už existujúceho oligonukleotidu. V súčasnosti bol už odvodený kus práce týkajúci sa tejto problematiky (Joyce, 1987; Orgel, 2004a). Väčšina aktivovaných nukleotidov nepodstupuje efektívne a regiošpecifické reakcie v prítomnosti RNA alebo DNA templátu. Obecne iba veľmi malé množstvo templátových molekúl dokáže riadiť syntézu komplementárneho vlákna a komplement zvyčajne obsahuje zmes 2'-5' alebo 3'-5' reťazcov. Pri práci s guanozín 5-fosfo-2-methylimidazolom sa ukázalo, že polycytozínový reťazec môže riadiť syntézu oligoguanínového reťazca. Táto reakcia je veľmi efektívna a regiošpecifická (Inoue and Orgel, 1981). Náhodné kopolyméry obsahujúce funkčné skupiny cytozínu môžu byť použité na riadenie syntézy s produktmi obsahujúcimi guanín a komplementmi obsahujúcimi ostatné bázy prítomné v templáte (Inoue and Orgel, 1983). Reakcia s polycytozínovým alebo guanínovým templátom je obzvlášť zaujímavá, pretože produkty, tak ako aj samotný templát sú tvorené výhradne cytozínovými alebo guanínovými reziduami. Keby tieto produkty mohli byť znovu použité ako templáty, reakcia by sa mohla dostať do samoreprodukujúcej sekvencie. Samoreplikácia je v tomto prípade však veľmi nepravdepodobná, pretože polycytozínové a guanínové molekuly neobsahujú prebytky cytozínových reziduí a majú tendenciu vytvárať stabilné „samoštruktúry“ (selfstructures) ktoré im bránia, aby mohli fungovať ako templáty (Joyce and Orgel, 1986). Tieto samoštruktúry môžu mať 2 typy. Štandardné stiedanie Watson-Crick G-C bází alebo kvadrahélixovú štruktúru ktorá je

výsledkom asociácie štyroch G-bohatých sekvencií. Preto každý C-bohatý oligonukleotid, ktorý je zároveň schopný slúžiť aj ako templát môže dať vzniknúť G-bohatému komplementárnemu produktu, ktorý má sklon byť uzamknutý v už spomínanej samoštruktúre a teda nemôže ďalej slúžiť ako templát. Ak obídeme problém samoštruktúry použitím štandardných G-C nukleotidov narazíme na problém, pretože by bolo najskôr potrebné objaviť podmienky, ktoré umožňujú viazanie mononukleotidov schopných templátom riadenej syntézy a aby zároveň potlačili tvorbu dlhých dvojitych regiónov, ktoré by mohli vylúčiť aktivované monoméry z templátu. V tejto oblasti bol urobený pokrok objavom templátov s definovanými sekvenciami, ktoré sú vierohodne skopírované do komplementárneho produktu (Inoue et al., 1984; Acevedo and Orgel, 1987; Wu and Orgel, 1992a). Príbuzná schéma neenzymatickej replikácie zahŕňa ligáciu krátkych 3'-5' oligomérov (James and Ellington, 1999). Je to veľmi atraktívna cesta, ktorú podporuje aj objav analogických reakcií katalyzovaných ribozýmami (Bartel and Szostak, 1993). Tento spôsob má však hneď dve prekážky. Prvá je obťažnosť získania substrátu a druhá je spojená s presnosťou replikácie. Páry oligonukleotidov obsahujúce nezhodu v jednej z bází, obzvlášť keď nezhoda vytvorí G-U vybočený pár, stále hybridizujú rovnako efektívne ako plne komplementárne oligonukleotidy. Výnimka platí jedine pri vysokých teplotách ktoré sa blížia rozpadovému bodu dobre spárovanej štruktúry. Dosiahnuť teda presnosť by bolo zložité za každého pravdepodobného tepelného režimu.

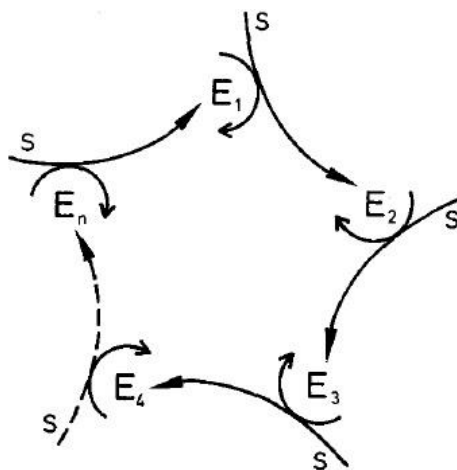
4.4.2 Prvá RNA replikáza

Hlavná myšlienka teórie sveta RNA dáva najväčší dôraz na molekulu RNA ktorá je schopná katalyzovať svoju vlastnú replikáciu. Takáto molekula musí fungovať ako RNA dependentná RNA polymeráza, pôsobiaca na seba (alebo svoje vlastné kópie) aby vyprodukovala komplementárne RNA a pôsobiaca na komplementárne RNA aby vytvorila ďalšie svoje kópie. Efektivita a presnosť tohto procesu musí byť dostatočne rýchla, aby vytvorila životaschopné „potomstvo“ RNA molekúl rýchlosťou, ktorá je vyššia, ako je rýchlosť dekompozície rodičovských molekúl. Nie je však jasné, či replikácia zahŕňa len jednu alebo skupinu molekúl RNA ktoré sa vo vzájomnom cykle replikujú. Koncept hypercyklu ako prvý navrhli Eigen a Schuster (Eigen and Schuster, 1978). Hypercyklus predstavuje sériu reakcií u ktorých produkty v každom kroku s pomocou alebo bez pomoci ďalších reaktantov prejdú ďalšou transformáciou. Ak je produkt vytvorený v tejto sekvencii

rovnaký ako reaktant v predošlom kroku, systém sa podobá na reakčný cyklus a cyklus ako celok na katalyzátor. Ak v ďalšom kroku vytvoríme reakčný cyklus v ktorom aspoň jeden, ale ak je možné všetky medziprodukty budú mať funkciu katalyzátora. Každý z nich je vytvorený z uvoľnenej energie za katalytickej pomoci predchádzajúceho medziproduktu. Takýto systém musí byť pomerne zložitý a preto je ťažko stretnúť sa s ním v prírode. Najlepším príkladom je štvorčlenný cyklus spojený s templátom riadenou replikáciou molekuly RNA. Ďalej sa vynára otázka, či by pomerne krátka molekula RNA mohla byť schopná katalyzovať vlastnú replikáciu s dostatočnou presnosťou. Koncept hraničných chýb, ktorý definuje vrchný limit frekvencie kopírovaných chýb ktoré môžu byť tolerované replikujúcou makromolekulou bol po prvý krát zavedený Eigenom (1971). Táto dôležitá myšlienka bola ďalej rozvedená v sérii matematických prác (McCaskill, 1984a; Eigen et al., 1988; Schuster and Swetina, 1988). Eigenov model uvažuje o populácii replikujúcich sa oligonukleotidov ktoré využívajú zdroje z limitovanej zásoby aktivovaných nukleotidov k ich ďalšej replikácii. U tohoto modelu je množstvo syntézy nových kópií konkrétnej replikujúcej sa RNA úmerné jej koncentrácii. Výsledkom je autokatalytický rast celého systému. Hrubý nárast produkcie je rozdielom medzi tvorením bezchybných kópií a rýchlosťou degradácie už existujúcich kópií RNA. Aby zvýhodnená molekula RNA mohla prerásť svojich konkurentov musí hrubá produkcia presiahnuť priemernú produkciu ostatných RNA v populácii. Iba bezchybné kópie zvýhodnenej molekuly prispievajú k jej vlastnej čistej produkcii, avšak všetky ostatné molekuly RNA prispievajú k ich kolektívnej produkcii. Teda relatívna výhoda zvýhodnenej molekuly spočíva v tom, že v porovnaní s ostatnou populáciou zníži produkciu chybných kópií. Mali by sme však rešpektovať, že označená superiorita jednej sekvencie nad ostatnými nemôže byť dosiahnutá v evolučnom čase, pretože čoskoro povstanú nové varianty ktoré prekonajú súčasné dominantné druhy. Avšak počiatočná superiorita môže byť dôležitá, aby umožnila efektívne sa samoreplikujúcej molekule RNA povstať z „bazénu“ menej efektívnych replikátorov. To znamená, že primitívna samoreplikujúca RNA sa môže uchytiť za pomoci menších chýb v reťazci pri absencii ostatných efektívne sa replikujúcich molekúl. To, či táto možnosť môže nastať bude závisieť na jej superiorite. Napríklad RNA, ktorá sa kopíruje desať krát efektívnejšie než ostatné a dokáže tento úkon zvládnuť s 90% presnosťou nemôže byť dlhšia ako 12 nukleotidov a podobne zvýhodnená RNA ktorá sa kopíruje s presnosťou 70% nemôže byť dlhšia ako 4 nukleotidy. Zdá sa ale nepravdepodobné, že by ktorýkoľvek zo 17-tich miliónov možných RNA dodekamérov bol schopný katalyzovať svoju replikáciu s 90% presnosťou a ešte menej pravdepodobné že tetranukleotid môže katalyzovať svoju vlastnú

replikáciu so 70% presnosťou. Avšak RNA ktorá je schopná replikovať sa 10^6 krát efektívnejšie ako jej konkurenti a dokáže to s 90% presnosťou môže byť dlhá až 67 nukleotidov a tá, ktorá je schopná replikovať sa so 70% presnosťou môže byť dlhá až 20 nukleotidov. Keď je samoreplikácia spočiatku ustálená, jej presnosť bude pravdepodobne nízka. Bude však prebiehať silná selekcia ktorá bude preferovať jednotky so zvýšenou presnosťou. Ako sa bude presnosť stále zvyšovať, môže byť vytvorený stále väčší genóm. Toto umožňuje objavenie stále väčšieho množstva možných sekvencií, z ktorých niektoré môžu viesť k ďalšiemu zvýšeniu presnosti ktoré zároveň vedie k stále väčšiemu genómu. Akonáhle dosiahne vyvíjajúca sa populácia presnosť okolo 99%, dosiahnutá dĺžka genómu môže činiť až okolo 100 nukleotidov, dokonca už aj pri skromných hodnotách superiority. To dovoľí pevnému ustanoveniu života na báze RNA. Do tej doby je to však súťaž medzi evolučnými vylepšeniami chabo sa replikujúceho systému. Ak je čas potrebný k ustanoveniu vysokej presnosti príliš dlhý, vzniká riziko, že populácia podľahne environmentálnej katastrofe skôr ako bude schopná vytvoriť dané protiopatrenia. Je však ťažké s istotou stanoviť minimálnu možnú veľkosť RNA replikázového ribozýmu.

Ak dokážeme akceptovať pohľad na vznik života z perspektívy sveta RNA, a teda, že existoval prvotný „rezervoár“ ktorý obsahoval replikázové ribozýmy zložené povedzme zo 40 báz s presnosťou replikácie okolo 90%, potom si nie je ťažké predstaviť, ako začala evolúcia založená na RNA. Z počiatku by jeden úspešný klon expandoval bez prítomnosti konkurencie. Ako by však kompetícia o substráty zosilnela, narástlo by zastúpenie zvýhodnených individuí. Po nejakom čase intenzívnej kompetície by bol jeden najzvýhodnenejší druh nahradený „kvazidruhom“ (quasispecies), to znamená zmesou najzvýhodnenejších jedincov a podstatným množstvom blízko príbuzných jedincov ktorý sa replikujú skoro tak rýchlo a so skoro takou presnosťou ako tí najzvýhodnenejší (Eigen and Schuster 1977; Eigen et al., 1988). Prakticky vzaté, akonáhle by sa objavila distribúcia zložitých replikátorov, kvazidruhov, svet RNA už mohol existovať na pevnom základe, a pominúc environmentálne katastrofy, nepravdepodobné, aby stratil schopnosť uchovať genetickú informáciu.



Obr. V - Katalytický hypercyklus

Zložky cyklu $E_1 > E_n$ sú sami katalyzátormi vytvorenými z energeticky bohatého substrátu (S) kde každý medziprodukt E_i katalyzuje vytvorenie E_{i+1} (Eigen and Schuster, 1979).

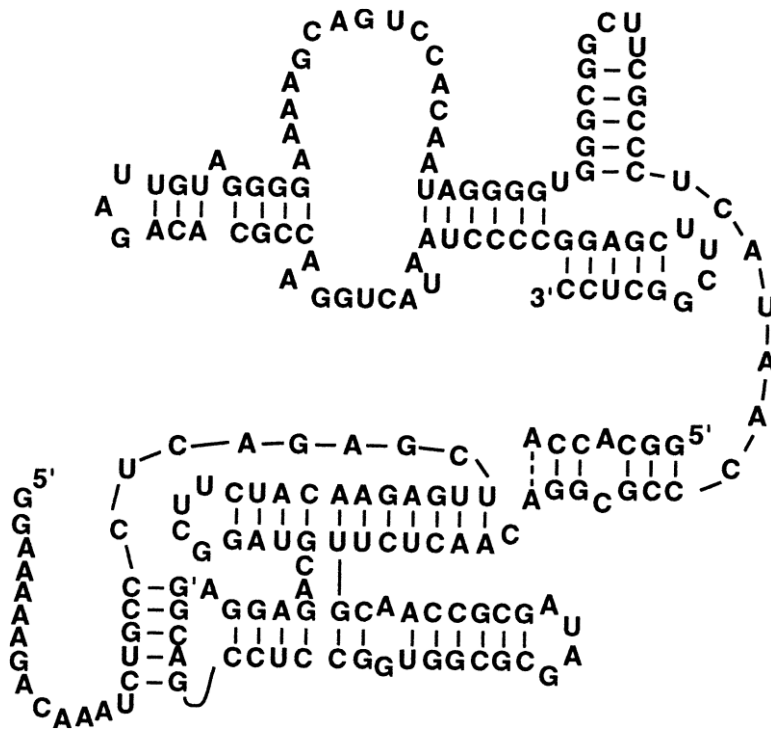
4.4.3 Funkcia replikázy vo vyvinutom svete RNA

Aj keď je zložité povedať ako vznikla prvá RNA replikáza, nie je ťažké si predstaviť ako mohla táto molekula fungovať. Chemizmus replikácie RNA by zahŕňal templátom riadenú polymerizáciu mono alebo krátkych oligonukleotidov s chemizmom podobným v mnohých smeroch s dočasnou I skupinou ribozýmov (Cech, 1986; Been and Cech, 1988; Doubna and Szostak, 1989).

4.5 Ribozýmy

Ak prijmeme myšlienku, že svet RNA bol prvým biologicky zorganizovaným svetom, musíme zahrnúť predpoklad, že spontánne vznikla knižnica RNA vlákien s odlišnými sekvenciami. Táto knižnica zároveň musela obsahovať sekvencie obsahujúce katalyzátory ktoré umožňovali samoreplikáciu RNA. Myšlienka, že molekula RNA vykonávala niektoré funkcie RNA polymerázy je teda stavebným pilierom „*de novo*“ (an „RNA-first“ view) chápanej teórie sveta RNA. Je však oveľa ťažšie určiť, ktoré ďalšie funkcie boli potrebné, aby mohol svet RNA pokračovať vo svojej evolúcií akonáhle začala replikácia. Pravdepodobne boli potrebné katalyzátory pre niektoré z metabolických funkcií, aby mohol svet RNA prejsť do samoudržateľného stavu. Je však veľmi ťažko odhadovať konkrétne

reakcie. Ribozýmy ktoré nachádzame v súčasných živých organizmoch majú napriek svojej dôležitosti limitovaný rozsah reakcií ktoré katalyzujú. Prvotný objav ribozým urobili Cech a Altman, keď popísali ribozýmy ktoré rozdeľujú a spájajú prirodzene sa vyskytujúce RNA (Kruger et al., 1982; Guerrier-Takada et al., 1983). Až na jednu dôležitú výnimku, ribozýmy, ktoré boli objavené v prírode vykonávajú obmedzené druhy funkcií. Neexistuje však dôkaz, že transkripcia alebo replikácia RNA zahŕňa katalýzu ribozýmom. Jedným z najdôležitejších ribozým v prírode je ribozóm, aj ten však funguje v súčinnosti s niekoľkými desiatkami proteínov pretože v kontexte súčasnej biosféry by sama RNA nestačila. Na druhú stranu je známe, že krok v chemickej reakcii formujúci peptidové väzby proteínov je katalyzovaný RNA samotného ribozómu bez ďalšej priamej asistencie proteínov (Steitz & Moore, 2003). Štruktúra ribozómu preto poskytuje jeden z najpresvedčivejších dôkazov pre svet RNA. Je však nepravdepodobné, že ďalšie štúdium proteínovej syntézy prinesie nové svetlo na túto problematiku. Ďalej boli objavené molekuly RNA, ktoré sa „*in vitro*“ viažu s vysokou afinitou na malé organické molekuly alebo na peptidy a proteíny (Puglisi & Williamson, 1999). Princiálne by malo byť možné rozšíriť tento typ chemickej procedúry a tak získať molekuly RNA schopné viazať sa na v podstate akýkoľvek typ vo vode rozpustného polyméru alebo na ktorýkoľvek typ pevného povrchu akým sú napríklad minerály alebo horniny. Dnes je už zrejmé, že veľké množstvo chemických reakcií môže byť katalyzovaných molekulou RNA. Napríklad reakcia 4-tiouridínu-5'fosfátu zo 4-tiouracilu a 5-fosforibozyl-1-pyrofosfátu je typickou riboenzymatickou reakciou. Avšak v začiatkoch predpokladaného sveta RNA bola nenahraditeľná len jedna funkcia, menovite katalýza replikácie RNA. V tejto oblasti boli už zaznamenané pozoruhodné objavy. Bartelovi a jeho spolupracovníkom sa podarilo vyvinúť katalytickú RNA ktorá už obsahuje jedny zo základných znakov RNA polymerázy (Johnston et al., 2001). Keď je táto vcelku komplikovaná molekula prítomná s ľubovoľným jednoreťazovým RNA templátom, RNA primérom a zmesou štyroch nukleotidových trifosfátov, je schopná komplementárnej syntézy templátov. Zatiaľ však nemôžu byť skopírované templáty dlhšie ako 14 rezíduí, je však veľmi pravdepodobné, že ďalšie „*in vitro*“ skúmanie by mohlo umožniť izoláciu ribozýmu schopného kopírovať oveľa dlhšie reťazce RNA. Izolácia takejto molekuly by určite veľkým dielom prispela k pochopeniu evolúcie života.



Obr. VI - Ribozým s funkciou RNA dependentnej RNA polymerázy (Orgel, 2004).

4.6 Sen molekulárneho biológa

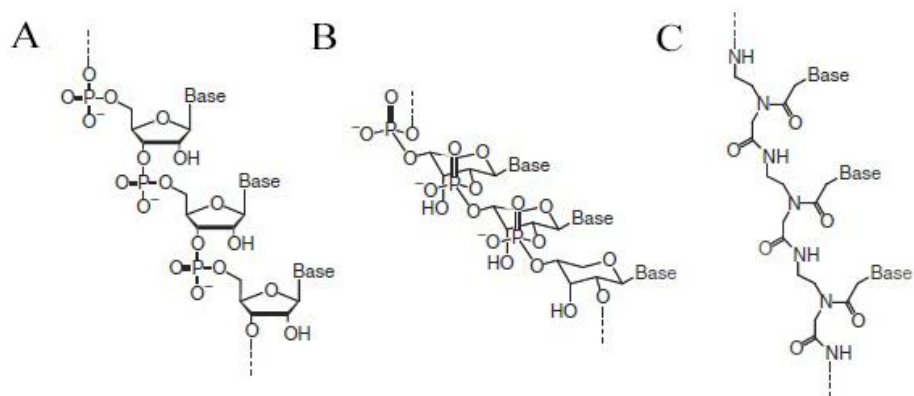
Scenár vzniku života podľa teórie sveta RNA sa dá inými slovami popísať aj ako „sen molekulárneho biológa“ (Joyce & Orgel, 1999) a to na základe optimistických pozorovaní a viacerých úspechov v oblasti modelovania prebiotckej chémie. Vo svete RNA najskôr predpokladáme, že nukleotidové bázy a cukry boli sformované nejakými druhmi prebiotckej chémie na Zemi alebo boli prinesené z medziplanetárneho priestoru meteoritmi alebo kométami. Potom sa nukleotidy sformovali z prebiotckých bázi, cukrov, anorganických fosfátov alebo polyfosfátov a naakumulovali sa v pomerne čistej forme v malom špecifickom „rezervoári“. Minerálna katalýza na dne tohto rezervoára, napríklad montmorilonitom, by potom katalyzovala syntézu dlhých jednoreťazcových polynukleotidov. Niektoré z nich potom skonvertovali na dvojité komplementárne reťazce spôsobom tempátom riadenej syntézy. Takto mohla vzniknúť a naakumulovať sa knižnica molekúl RNA na primitívnej Zemi. Predpokladá sa, že medzi týmito dvojitými RNA sa vyskytovala aspoň jedna, ktorá oplývala funkciou ribozýmu a schopnosťou vytvoriť vlastnú kópiu. Toto kopírovanie by vyprodukovalo druhú molekulu ribozýmu a celý proces by

napokon viedol až k exponenciálnemu rastu celej populácie. V tomto bode by potom prevzal kontrolu prirodzený výber. Už samotný Darwin naznačil, že život musí pochádzať z jedného alebo z pár jednoduchých organizmov ktoré sa kedysi dávno vyvinuli na Zemi. Z radikálneho pohľadu tejto teórie sa celá biosféra vyvinula z jedného, prípadne z viacerých replikujúcich sa polynukleotidov ktoré vznikli na primitívnej Zemi. V súčasnosti však existuje stále veľa nevyriešených problémov v prebiotickej chémii ktoré bránia tomu, aby sa tento „sen“ premenil na presvedčujúcu teóriu.

4.7 Alternatívne genetické systémy

Rozsiahle problémy spojené s pochopením, ako mohol RNA svet vzniknúť „de novo“ na primitívnej Zemi nás nútia preskúmať iné možnosti. Mohli iné alternatívne genetické systémy predchádzať Svet RNA? Mohli tieto systémy „vynájsť“ svet RNA? Tieto otázky vyvolali veľké špekulácie a napokon aj relevantné experimentálne dáta. Eschenmoser a kolegovia (Eschenmoser, 1999) podnikli systematickú štúdiu vlastností analogických nukleových kyselín v ktorých je ribóza nahradená iným cukrom alebo v ktorých je furanózová forma ribózy nahradená pyranózovou formou. Polynukleotidy tvorené pyranosilovým analógom tvoria spárované dvojité špirály a sú oveľa stabilnejšie. Špirály sú zatočené oveľa plynulejšie než tie zo štandardných nukleových kyselín. Pyranosilová RNA sa teda dá považovať za výhodný genetický systém, v niektorých smeroch sa dokonca zdá byť zlepšením. Avšak p-RNA nie je schopná reagovať s normálnou RNA a vytvárať spárované dvojité špirály. Ďalšiu rozsiahle študovanú peptidovú anaógiu predstavujú peptidové nukleové kyseliny (PNA) ktoré boli objavené Nielsenom a kolegami (Egholm et al., 1992; 1993; Wittung et al., 1994). PNA je nenabitá, achirálna analógia RNA alebo DNA kde je oporná štruktúra ribózy fosfátu nahradená opornou štruktúrou z amidových väzieb. PNA vytvára veľmi stabilné dvojzvitnice s komplementárnymi DNA alebo RNA. Informácia môže byť prenášaná z PNA na RNA alebo naopak z RNA na PNA (Schmidt et al., 1997a,b; Koppitz et al., 1998). V súčasnosti však nie je jasné, či je jednoduchšie syntetizovať monoméry týchto zlúčenín alebo štandardné nukleotidy. Teoretický prechod zo sveta podobného RNA na svet RNA by mohol prebehnúť dvoma spôsobmi. Prechod by mohol byť plynulý pokiaľ by pre-RNA templát dokázal riadiť syntézu RNA produktu s komplementárnou sekvenciou. Druhý spôsob prechodu môžeme označiť ako genetický prevrat (takeover). Samoreplikujúci systém sa vyvíja v čase a v rámci svojho evolučného

zvýhodnenia vyvinie mechanizmy pre syntézu a polymerizáciu značne odlišného systému napokon až do takej miery, že je ním nahradený.



Obr. VII - (A) RNA, (B) p-RNA, (C) PNA (Atkins, Gesteland, Cech, 2011).

5 Záver

Aj keď už bolo preukázaných mnoho hypotetických riešení pre problémy spojené s prebiotickou syntézou RNA, každé z nich ostáva naďalej v určitých aspektoch problematickým. Je však možné, že tieto prekážky budú postupne prekonané a táto teória sa stane jedného dňa oveľa presvedčivejšou. Avšak veľa vedcov v tomto odbore sa domnieva, že je to prakticky nemožné. Je preto vhodné obhliadnuť sa aj po iných možných riešeniach ako vznikol svet RNA a samotný život. Myšlienka, že jednoduchšie genetické systémy predchádzali RNA otvára celú sféru nových možností. Možno je RNA „vynálezom“ iných, jednoduchších systémov ktoré fungovali v extrémnych podmienkach ranej Zeme. A možno bol pôvodný genetický systém anorganický. Možno sa počiatočná replikácia zrodila na povrchoch nabitých minerálov alebo na poruchách štruktúr minerálnych zŕn. Avšak v tomto prípade ešte nezačali experimenty ktoré by preskúmali všetky tieto možnosti. Predpokladaný svet RNA by sme preto mali vnímať skôr ako určitý míľnik v ranej etape vývoja života tak isto ako táto teória predstavuje míľnik vo vedeckých štúdiách týkajúcich sa vzniku a pôvodu života na Zemi. A aj keď tento koncept priamo nevysvetľuje vznik života, pomohol viesť vedecké myslenie a s ním spojené experimentálne snahy. Ďalší pokrok v tejto oblasti bude primárne závisieť na nových experimentálnych výsledkoch chemikov, biochemikov a molekulárnych biológov ako sa budú snažiť objasniť problémy spojené s molekulárnou replikáciou, enzymológiou ribozýmov a bunecných procesov spojených s molekulou RNA.

6 Použitá literatura

- Abramov, O., Mojzsis, S., J. 2009. Microbial habitability of the Hadean Earth during the late heavy bombardment. *Nature* **459 (7245)**: 419-22.
- Acevedo, O., L., Orgel, L., E. 1987. Non-enzymatic transcription of an oligodeoxynucleotide 14 residues long. *J Mol Biol* **197**: 187-193. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Alexander, C., M., O., D., Fogel, M., et al. 2007. The origin and evolution of chondrites recorded in the elemental and isotopic compositions of their macromolecular organic matter. *Geochim Cosmochim Acta* **71(17)**: 4380-403. In: Cleaves, J., H., II. 2012. Prebiotic Chemistry: What we know, what we don't. *Evo Edu Outreach* **5**: 342-360.
- Anders, E. 1989. Pre-biotic organic-matter from comets and asteroids. *Nature* **42(6247)**: 255-7.
- Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Bada, J., L., Miller, S., L. 1968. Ammonium ion concentration in the primitive ocean. *Science* **159(813)**: 423-5. In: Cleaves, J., H., II. 2012. Prebiotic Chemistry: What we know, what we don't. *Evo Edu Outreach* **5**: 342-360.
- Bartel, D., P., Szostak, J., W. 1993. Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences. *Science* **261**: 1411-1418.
- Beck, A., Lohrmann, R., Orgel, L., E. 1967. Phosphorylation with inorganic phosphates at moderate temperatures. *Science* **157**: 952. In: Orgel, L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.
- Been, M., D., Cech, T., R. 1988. RNA as an RNA polymerase: Net elongation of an RNA primer catalyzed by the Tetrahymena ribozyme. *Science* **239**: 1412-1416. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Benner, S., A., Ellington, A., D., Tauer, A. 1989. Modern metabolism as a palimpsest of the RNA world. *Proc Natl Acad Sci* **86**: 7054-7058.
- Butlerow, A. 1861. Formation synthetique d'une substance sueree. *Compt Rend Acad Sci* **53**:145-147. In: Orgel, L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.
- Cech, T., R. 1986. A model for the RNA-catalyzed replication of RNA. *Proc Natl Acad Sci* **83**: 4360-4363.
- Cleaves, H., J., Miller, S., L. Oceanic protection of prebiotic organic compounds from UV radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **95(13)**: 7260-3. In: Cleaves, J., H., II. 2012. Prebiotic Chemistry: What we know, what we don't. *Evo Edu Outreach* **5**: 342-360.
- Cleaves, J., H., II. 2012. Prebiotic Chemistry: What we know, what we don't. *Evo Edu Outreach* **5**: 342-360.
- Crick, F., H. 1968. The origin of the genetic code. *J Mol Biol* **38**: 367-379. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.

- Dalrymple, G., B. 1994. The age of the Earth. *Stanford, Stanford University Press*. In: Cleaves, J., H., II. 2012. Prebiotic Chemistry: What we know, what we don't. *Evo Edu Outreach* **5**: 342-360.
- Darnell, J. 2011. RNA: Life's indispensable molecule. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 351-359.
- Doudna, J., A., Szostak, J., W. 1989. RNA-catalysed synthesis of complementary-strand RNA. *Nature* **339**: 519-522. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Egholm, M., Buchardt, O., Christensen, L., Behrens, C., Freier, S., M., Driver, D., A., Berg, R., H., Kim, S., K., Norden, B., Nielson, P., E. 1993. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* **365**: 566-568. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Egholm, M., Buchardt, O., Nielson, P., E., Berg, R., H. 1992. Peptide nucleic acids (PNA). Oligonucleotide analogues with an achiral peptide backbone. *J Am Chem Soc* **114**: 1895-1897. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Ehrenfreund, P., Charnley, S., B. 2000. Organic molecules in the interstellar medium, comets, and meteorites: a voyage from dark clouds to the early Earth. *Annu Rev Astron Astrophys* **38**: 427-83. In: Cleaves, J., H., II. 2012. Prebiotic Chemistry: What we know, what we don't. *Evo Edu Outreach* **5**: 342-360.
- Eigen, M. 1971. Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwiss* **58**: 465-523.
- Eigen, M., Schuster, P. 1979. The Hypercycle : A principle of natural self-organisation. Part A: Emergence of the hypercycle. *Naturwiss* **64**: 541-565.
- Eigen, M., McCaskill, J., Schuster, P. 1988. Molecular quasi-species. *J Phys Chem* **92**: 6881-6891. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Ellington, A., D., Szostak, J., W. 1990. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**: 818-822.
- Ertem, G., Ferris, J., P. 1998. Formation of RNA oligomers on montmorillonite: site of catalysis. *Orig Life Evol Biosph* **28**: 485-499. In: Orgel, L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.
- Eschenmoser A. 1999. Chemical etiology of nucleic acid structure. *Science* **284**: 2118-2124. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Ferris, J., P., Sanchez, R., A., Orgel, L., E. 1968. Studies in prebiotic synthesis. 3. Synthesis of pyrimidines from cyanoacetylene and cyanate. *J Mol Biol* **33**: 693-704. In: Orgel, L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.
- Ferris, J., P., Nicodem, D., E. 1972. Ammonia photolysis and the role of ammonia in chemical revolution. *Nature* **238(5362)**: 268-9. In: Cleaves, J., H., II. 2012. Prebiotic Chemistry: What we know, what we don't. *Evo Edu Outreach* **5**: 342-360.
- Ferris, J., P., Zamek, O., S., Altbuch, A., M., Freiman, H. 1974. Chemical evolution. 18. Synthesis of pyrimidines from guanidine and cyanoacetaldehyde. *J Mol Evol* **3**: 301-309.
- L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.

- Festou, M., Keller, H., U., et al. 2004. Comets II. *Tucson: University of Arizona Press, Lunar and Planetary Institute*. In: Cleaves, J., H., II. 2012. Prebiotic Chemistry: What we know, what we don't. *Evo Edu Outreach* **5**: 342-360.
- Fuller, W., D., Sanchez, R., A., Orgel, L., E. 1972. Studies in prebiotic synthesis: VII. Solid-state synthesis of purine nucleosides. *J Mol Evol* **1**: 249-257. In: Orgel, L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.
- Gesteland, R., F., Cech, T., R., Atkins, J., F. 1999. The RNA World, 2nd ed. *Cold Springs Harbor, NY: Cold Springs Harbor Press*. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Giulio, M. 1997. On the RNA World: Evidence in Favor of an Early Ribonucleopeptide World. *J Mol Evol* **45**: 571-578.
- Glansdorff, N., Xu, Y., Labedan, B. 2008 The Last Universal Common Ancestor: emergence, constitution and genetic legacy of an elusive forerunner. *Biology Direct* **3**: 29
- Glavin, D., P., Dworkin, J., P. 2009. Enrichment of the amino acid L-isovaline by aqueous alteration on CI and CM meteorite parent bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* **106(14)**: 5487-92. In: Cleaves, J., H., II. 2012. Prebiotic Chemistry: What we know, what we don't. *Evo Edu Outreach* **5**: 342-360.
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., Altman, S. 1983. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* **35**: 849-857. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Handschuh, G., J., Lohrmann, R., Orgel, L., E. 1973. The effect of Mg²⁺ and Ca²⁺ on urea-catalyzed phosphorylation reactions. *J Mol Evol* **2**: 251-262. In: Orgel, L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.
- Huang, W., Ferris, J., P. 2003. Synthesis of 35-40 mers of RNA oligomers from unblocked monomers. A simple approach to the RNA world. *Chem Commun (Camb)* **12**: 1458-1459. In: Orgel, L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.
- Chameides, W., L., Walker, J., C., G. 1981. Rates of fixation by lightning of carbon and nitrogen in possible primitive atmospheres. *Orig Life Evol Biosph* **11(4)**: 291-302. In: Cleaves, J., H., II. 2012. Prebiotic Chemistry: What we know, what we don't. *Evo Edu Outreach* **5**: 342-360.
- Chyba, C., F. 1990. Impact delivery and erosion of planetary oceans in the early inner solar system. *Nature* **343(6254)**: 129-33.
- Chyba, C., Thomas, P., et al. 1990. Cometary delivery of organic molecules to the early Earth. *Science* **249(4967)**: 366-73.
- Chyba, C., Sagan, C. 1992. Endogenous production, exogenous delivery and impact-shock synthesis of organic molecules: an inventory for the origins of life. *Nature* **355**: 125-32.
- Inoue, T., Orgel, L., E. 1981. Substituent control of the poly(C) - directed oligomerization of guanosine 5-phosphoroimidazolide. *J Amer Chem Soc* **103**: 7666-7667, Cold Spring Harbor. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Inoue, T., Orgel, L., E. 1983. A nonenzymatic RNA polymerase model. *Science* **219**: 859-862. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Inoue, T., Joyce, G., F., Grzeskowiak, K., Orgel, L., E., Brown, J., M., Reese, C., B. 1984. Template-directed synthesis on the pentanucleotide CpCpGpCpC. *J Mol Biol* **178**: 669-676. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R.,

- Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- James, K., D., Ellington, A., D. 1999. The fidelity of template-directed oligonucleotide ligation and the inevitability of polymerase function. *Orig Life Evol Biosph* **29**: 375-390. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Johnston, W., K., Unrau, P., J., Lawrence, M., S., Glasner, M., E., Bartel, D., P. 2001. RNA-Catalyzed RNA polymerization: accurate and general RNA-templated primer extension. *Science* **292**: 1319-1325. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Joyce, G., F., Orgel L., E. 1986. Non-enzymic template-directed synthesis on RNA random copolymers: Poly(C,G) templates. *J Mol Biol* **188**: 433-441. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Joyce, G., F. 1987. Nonenzymatic template-directed synthesis of informational macromolecules. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **52**: 41-51. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Joyce, G., F., Orgel, L., E. 1999. Prospects for understanding the origin of the RNA world. In: *The RNA World*, 2nd ed. *Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor*, pp. 49-77.
- Kauffman, S. 2000. Čtvrtý zákon : Cesty k obecné biologii. *Paseka, Praha, 2004*, pp. 11-103.
- Kempe, S., Degens, E., T. 1985. An early soda ocean? *Chem Geol* **53(1-2)**: 95-108. In: Cleaves, J., H., II. 2012. Prebiotic Chemistry: What we know, what we don't. *Evo Edu Outreach* **5**: 342-360.
- Khare, B., N., Sagan, C., et al. 1986. Amino acids derived from Titan tholins. *Icarus* **68(1)**: 176-84.
- Koppitz, M., Nielsen, P., E., Orgel, L., E. 1998. Formation of oligonucleotide-PNA-chimeras by template-directed ligation. *J Am Chem Soc* **120**: 4563-4569. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Kruger, K., Grabowski, P., J., Zaug, A., J., Sands, J., Gottschling, D., E., Cech, T., R. 1982. Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* **31**: 147-157. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Kuhn, W., R., Atreya, S., K. 1979. Ammonia photolysis and the greenhouse effect in the primordial atmosphere of the earth. *Icarus* **37(1)**: 207-13. In: Cleaves, J., H., II. 2012. Prebiotic Chemistry: What we know, what we don't. *Evo Edu Outreach* **5**: 342-360.
- Lauretta, D., S., McSween, H., Y. 2006. Meteorites and the early solar system II. *Tucson: University of Arizona Press, In collaboration with Lunar and Planetary Institute* In: Cleaves, J., H., II. 2012. Prebiotic Chemistry: What we know, what we don't. *Evo Edu Outreach* **5**: 342-360.
- Lazcano, A., Miller, S., L. 1996. The Origin and Early Evolution of Life: Prebiotic Chemistry, the Pre-RNA World, and Time. *Cell, Vol.* **85**: 793-798.
- Lohrmann, R., Orgel, L., E. 1968. Prebiotic synthesis: phosphorylation in aqueous solution. *Science* **161**: 64-66. In: Orgel, L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.
- Lohrmann, R., Orgel, L., E. 1971. Urea-inorganic phosphate mixtures as prebiotic phosphorylating agents. *Science* **171**: 490-494. In: Orgel, L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.

- Lohrmann, R. 1977. Formation of nucleoside 5'-phosphoramidates under potentially prebiological conditions. *J Mol Evol* **10**: 137-154. In: Orgel, L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.
- Love, S., G., Brownlee, D., E. 1993. A direct measurement of the terrestrial mass accretion rate of cosmic dust. *Science* **262(5133)**: 550-3.
- Lundstrom, F., O., Whittaker, C., W. 1937. Chemical reactions in fertilizer mixtures. Effect of ammoniation on urea component of superphosphate mixtures. *Ind Eng Chem* **29**: 61-68. In: Orgel, L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.
- McCaskill, J., S. 1984a. A stochastic theory of molecular evolution. *Biol Cybernetics* **50**: 63-73. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Meier, R., Owen, T., C., et al. 1998. A determination of the HDO/H₂O ratio in comet C/1995 O1 (Hale-Bopp). *Science* **279(5352)**: 842-4. In: Cleaves, J., H., II. 2012. Prebiotic Chemistry: What we know, what we don't. *Evo Edu Outreach* **5**: 342-360.
- Miyakawa, S., Murasawa, K., Kobayashi, K., Sawaoka, A., B. 2000. Abiotic synthesis of guanine with high-temperature plasma. *Orig Life Evol Biosph* **30**: 557-566. In: Orgel, L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.
- Miyakawa, S., Cleaves, H., J., and Miller, S., L. 2002a. The cold origin of life: A. Implications based on the hydrolytic stabilities of hydrogen cyanide and formamide. *Orig Life Evol Biosph* **32**: 195-208. In: Orgel, L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.
- Miyakawa, S., Cleaves, H., J., Miller, S., L. 2002b. The cold origin of life: B. Implications based on pyrimidines and purines produced from frozen ammonium cyanide solutions. *Orig Life Evol Biosph* **32**: 209-218. In: Orgel, L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.
- Mizuno, T., Weiss, A., H. 1974. Synthesis and utilization of formose sugars. *Biochem* **29**: 173-227.
- Montmerlem, T., Augereau, J., C., et al. 2006. 3. Solar system formation and early evolution: the first 100 million years. *Earth Moon Planet* **98(1)**: 39-95. In: Cleaves, J., H., II. 2012. Prebiotic Chemistry: What we know, what we don't. *Evo Edu Outreach* **5**: 342-360.
- Moravek, J. 1967. Formation of oligonucleotides during heating of a mixture of uridine 2'(3')-phosphate and uridine. *Tetrahedron Lett* **18**: 1707-1710.
- Mukhin, L., M., Gerasimov, M., V., et al. 1989. Origin of precursors of organic molecules during evaporation of meteorites and mafic terrestrial rocks. *Nature* **340(6228)**: 46-8. In: Cleaves, J., H., II. 2012. Prebiotic Chemistry: What we know, what we don't. *Evo Edu Outreach* **5**: 342-360.
- Nelson, K., E., Robertson, M., P., Levy, M., Miller, S., L. 2001. Concentration by evaporation and the prebiotic synthesis of cytosine. *Orig Life Evol Biosph* **31**: 221-229. In: Orgel, L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.
- Noller, H., F., Chaires, J., B. 1972. Functional modification of 16S ribosomal RNA by kethoxal. *Proc Natl Acad Sci* **69**: 3115-3118. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Noller, H., F. 1993. Peptidyl transferase: Protein, ribonucleoprotein, or RNA? *J Bacteriol* **175**: 5297-5300. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Orgel, L., E. 1968. Evolution of the genetic apparatus. *J Mol Biol* **38**: 381-393.

- Orgel, L., E. 2002. Is cyanoacetylene prebiotic? *Orig Life Evol Biosph* **32**: 279-281.
- Orgel, L., E. 2004. Prebiotic adenine revisited: eutectics and photochemistry. *Orig Life Evol Biosph* in press. In: Orgel, L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.
- Orgel, L., E. 2004. Prebiotic adenine revisited: eutectics and photochemistry. *Orig Life Evol Biosph* in press. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Orgel, L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.
- Oró, J. 1961. Comets and the formation of biochemical compounds on the primitive Earth. *Nature* **190(4774)**: 389-90.
- Oro, J. 1961b. Comets and the formation of biochemical compounds on the primitive Earth. *Nature* **190**: 389-390. In: Orgel, L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.
- Osterberg, R., Orgel, L., E. 1972. Polyphosphate and trimetaphosphate formation under potentially prebiotic conditions. *J Mol Evol* **1**: 241-248. In: Orgel, L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.
- Osterberg, R., Orgel, L., E., Lohrmann, R. 1973. Further studies of urea-catalyzed phosphorylation reactions. *J Mol Evol* **2**: 231-234. In: Orgel, L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.
- Pizzarello, S., Cronin, J., R. 2000. Non-racemic amino acids in the Murray and Murchison meteorites. *Geochim Cosmochim Acta* **64(2)**: 329-38. In: Cleaves, J., H., II. 2012. Prebiotic Chemistry: What we know, what we don't. *Evo Edu Outreach* **5**: 342-360.
- Pizzarello, S., Cooper, G., W., Flynn, J., G.. 2006. The nature and distribution of the organic material in carbonaceous chondrites and interplanetary dust particles. In: Lauretta, D., S., McSween, H. Y. Meteorites and the Early Solar System II, *University of Arizona Press, Tucson*, pp. 625-651.
- Puglisi, J., D., Williamson, J., R. 1999. RNA interaction with small ligands and peptides. In: Gesteland, R., F., Cech, T., R., Atkins, J., F. The RNA World, 2nd ed. *Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor*, pp 403-425.
- Reichwalder, P., Jablonský, J. 2003. Všeobecná Geológia 1. *Vydavateľstvo Univerzity Komenského, Bratislava*, pp. 14-16.
- Reimann, R. and Zubay, G. 1999. Nucleoside phosphorylation: a feasible step in the prebiotic pathway to RNA. *Orig Life Evol Biosph* **29**:229-247. In: Orgel, L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.
- Robertson, M., P., Miller, S., L. 1995a. An efficient prebiotic synthesis of cytosine and uracil. *Nature* **375**: 772-774. In: Orgel, L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.
- Robertson, M., P., Miller, S., L. 1995b. Correction. an Efficient Prebiotic Synthesis of Cytosine and Uracil. *Nature* **377**: 257. In: Orgel, L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.
- Rubey, W., W. 1951. Geologic history of sea water. *Geol Soc Am Bull* **62(9)**: 1111-48. In: Cleaves, J., H., II. 2012. Prebiotic Chemistry: What we know, what we don't. *Evo Edu Outreach* **5**: 342-360.

- Sanchez, R., A., Ferris, J., P., Orgel, L., E. 1966b. Cyanoacetylene in prebiotic synthesis. *Science* **154**: 784-785. In: Orgel, L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.
- Shapiro, R. 1999. Prebiotic cytosine synthesis: a critical analysis and implications for the origin of life. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 4396-4401. In: Orgel, L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.
- Shapiro, R. 2002. Comments on „Concentration by evaporation and the prebiotic synthesis of cytosine.“ *Orig Life Evol Biosph* **32**: 275-278. In: Orgel, L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.
- Schmidt, J.,G., Christensen, L., Nielsen, P.,E., Orgel, L., E. 1997a. Information transfer from DNA to peptide nucleic acids by template-directed syntheses. *Nucleic Acids Res* **25**: 4792-4796. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Schmidt, J., G., Nielsen, P., E., Orgel, L., E. 1997b. Information transfer from peptide nucleic acids to RNA by template-directed syntheses. *Nucleic Acids Res* **25**: 4797-4802. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Schopf, J.,W. 1993. Microfossils of the Early Archean Apex Chert: new evidence of the antiquity of life. *Science* **260**: 640-646. In: Cleaves, J., H., II. 2012. Prebiotic Chemistry: What we know, what we don't. *Evo Edu Outreach* **5**: 342-360.
- Schuster, P., Swetina, J., 1988. Stationary mutant distributions and evolutionary optimization. *Bull Math Biol* **50**: 635-660. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Steitz, T., A., Moore, P., B. 2003. RNA, the first macromolecular catalyst: The ribosome is a ribozyme. *Trends Biochem Sci* **28**: 411-418. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Stribling, R., Miller, S.,L. 1987. Energy yields for hydrogen cyanide and formaldehyde syntheses: the HCN and amino acid concentrations in the primitive ocean. *Orig Life Evol Biosph* **17(3-4)**: 261-73.
- Tian, F., Toon, O., B., et al. 2005. A Hydrogen-rich early earth atmosphere. *Science* **308(5724)**: 1014-7. In: Cleaves, J., H., II. 2012. Prebiotic Chemistry: What we know, what we don't. *Evo Edu Outreach* **5**: 342-360.
- Tuerk, C., Gold, L. 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**: 505-510. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Valley, J., W., Peck, W., H., et al. 2002. A cool early Earth. *Geology* **30(4)**: 351-4.
- Wittung, P., Nielsen, P., E., Buchardt, O., Egholm, M., Norden, B. 1994. DNA like double helix formed by peptide nucleic acid. *Nature* **368**: 561-563. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Woese, C., R. 1967. The genetic code: The molecular basis for genetic expression. *p. 186. Harper & Row*. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.
- Wright, M., C., Joyce, G., F. 1997. Continuous in vitro evolution of catalytic function. *Science* **276**: 614-617. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.

Wu, T., Orgel, L., E. 1992b. Nonenzymatic template-directed synthesis on hairpin oligonucleotides. II. Templates containing cytidine and guanosine residues. *J Am Chem Soc* **114**: 5496-5501. In: Atkins, F., J., Gesteland, F., R., Cech, R., T. 2011. RNA worlds: From life's origins to diversity in gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*, pp. 2-42.

Yamagata, Y., Watanabe, H., Saitoh, M., Namba, T. 1991. Volcanic production of polyphosphates and its relevance to prebiotic evolution. *Nature* **352**: 516-519.

Zubay, G. 1998. Studies on the lead-catalyzed synthesis of aldopentoses. *Orig Life Evol Biosph* **28**: 13-26. In: Orgel, L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.

Zubay, G., Mui, T. 2001. Prebiotic synthesis of nucleotides. *Orig Life Evol Biosph* **31**: 87-102. In: Orgel, L., E. 2004. Prebiotic chemistry and the origin of the RNA world. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 99-123.