

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

PORIJEKLO ŽIVOTA

ORIGIN OF LIFE

Andrea Mrnjavac

Preddiplomski studij molekularne biologije

Undergraduate study of molecular biology

Mentor: doc.dr.sc. Damjan Franjević

Zagreb 2015.

## SADRŽAJ:

1.UVOD.....	2
2.VREMENSKI OKVIR NASTANKA ŽIVOTA.....	3
3. RNA KAO PRIMARNI PRENOSITELJ GENSKJE INFORMACIJE.....	4
3.1. RNA.....	4
3.1.1. pre-RNA faza.....	5
3.1.2. RNA faza.....	7
3.1.3. Protein/DNA faza.....	8
3.2. Ostale teorije o prvotnom genskom materijalu.....	9
4. GDJE JE NASTAO ŽIVOT?.....	11
4.1. Panspermija.....	11
4.2. Vrući izvori na površini Zemlje.....	12
4.2.1. Fotosinteza kao pokretač života.....	12
4.2.2. Geotermalni sustavi na kopnu.....	16
4.3. Dubokomorski hidrotermalni izvori.....	19
5. ZAKLJUČAK.....	23
6.SAŽETAK.....	24
7.SUMMARY.....	25
8.LITERATURA.....	26

## 1. UVOD

Da bi smo uopće mogli prepoznati život, pa tako i njegovo porijeklo, moramo se zapitati :“Što je uopće Život?„, Definicija života vjerojatno ima koliko i autora koji su se usudili definirati ga. Neke od prihvaćenijih definicija su:

-„Život je samoodrživ kemijski sustav sposoban za Darwinističku evoluciju“ (Joyce, 1994., prema Cleland & Chyba, 2002.)

-„Život je sustav koji se opire povećanju entropije“ (Shrödinger, 1945., prema Cleland & Chyba, 2002.)

-„Život je visoko uređen sustav tvari i energije obilježen složenim ciklusima koji održavaju ili postupno povećavaju red u sustavu izmjenom energije s okolišem“ (Feinberg & Shapiro, 1980., prema Cleland & Chyba, 2002.)

-„Život je sustav odijeljen od okoliša koji se spontano umnaža energijom iz vlastitih, termodinamski povoljnih redoks reakcija“ (Martin & Russell, 2003.)

Predmet istraživanja porijekla života jest rasvjetljivanje puta koji je od jednostavnih kemijskih spojeva doveo do nastanka LUCA (last universal common ancestor) - zajedničkog pretka svih organizama. LUCA objedinjuje većinu, ako ne i sve zajedničke osobine svih živućih organizama: genska informacija, pohranjena u obliku sljedova baza DNA, koja se replicira, prepisuje, a potom translatira; ATP (adenozin-trifosfat) kao glavni prijenosnik energije; konzervirani biokemijski putovi i enzimi/koenzimi; membrana s receptorima i transporterima... Ovakve univerzalije u živom svijetu mogu se objasniti samo zajedničkim pretkom. LUCA ne trebamo gledati kao određenu vrstu, već kao populaciju organizama koji su slobodno razmjenjivali gene lateralnim prijenosom. (DeDuve, 2003.)

Još u 19. stoljeću Louis Pasteur je zaključio: „Živo nastaje iz živog“. Ali kako je nastao taj prvi oblik života? Postoji nekoliko više ili manje uvjerljivijih hipoteza, ali za sada nemamo konačan odgovor na to pitanje. Ono što sigurno znamo jest da se život pojavio, i to na Zemlji (ako isključimo teoriju panspermije o kojoj će također biti riječi).

## 2. VREMENSKI OKVIR NASTANKA ŽIVOTA

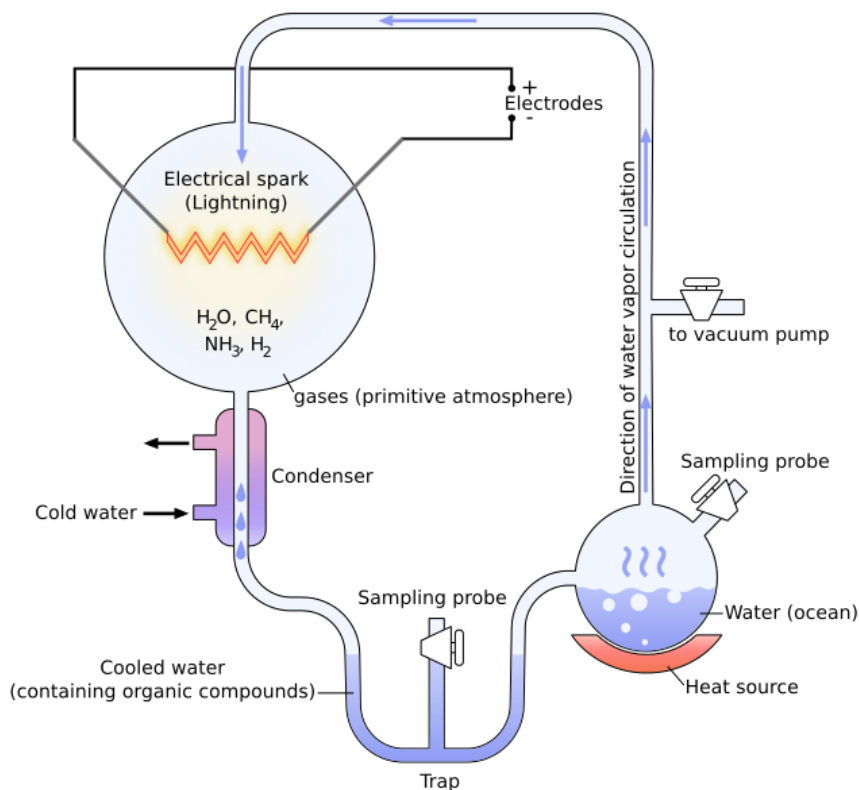
Zemlja se zajedno sa Sunčevim sustavom formirala prije oko 4.6 milijardi godina. Između 4.3 milijarde godina p.n.e. i 3.8 milijardi godina p.n.e. Zemlja je bila objekt udara raznih tijela iz svemira. Zbog energije oslobođene sudarima, Zemlja je u ovom periodu bila u polutekućem stanju koje je uzrokovalo nakupljanje težih elemenata u jezgri, te lakših pri površini. Naš planet je dobio svoju slojevitost. U ovom periodu Zemlja je bila potpuno nenastanjiva. No, relativno brzo se ohladila razvijajući čvrstu koru, a uslijedile su i dugogodišnje kiše koje su formirale oceane. Neki pretpostavljaju da su prvi oceani kondenzirani već 4.4 milijardi godina p.n.e. (Wild, 2001. prema Martin & Russell, 2003.) Rana Zemljina atmosfera bila je reducirajuće prirode, a prevladavali su amonijak, metan, dušik, ugljikov dioksid, vodik i vodena para. Smatra se da do prije 2.4 milijarde godina nije bilo kisika u atmosferi, pa tako ni ozonskog sloja, te je UV-zračenje stoga do površine dolazilo u svom potpunom intenzitetu. Najstariji dokazi postajanja života sežu u 3.86 milijardi godina p.n.e. (Mojzis, 1996. prema Lal, 2008.) Radi se o stijenama na otoku Akilia na zapadu Greenlanda čiji sastav ugljikovih izotopa ukazuje na biološko porijeklo. Naime, živi organizmi preferiraju lakši  $^{12}\text{C}$  u odnosu na  $^{13}\text{C}$ , tako da nakupine ugljika nastale djelovanjem živih organizama imaju nešto viši postotak  $^{12}\text{C}$  u odnosu na ostala mjesta u prirodi. Imajući na umu poznate informacije, postavljaju se pitanja: „Je li bilo dovoljno vremena za nastanak života?“ i „Koliko je pojava života vjerojatan događaj?“ (Orgel, 1998.) Ako zanemarimo teoriju panspermije, očito je da se život pojavio na Zemlji. A budući da ne znamo je li se tih ranih godina Zemljine „mladosti“ život pojavljivao često, ne možemo govoriti o tome koliko je pojava života vjerojatan događaj. Neki smatraju da se pod „pravim uvjetima“ život morao pojaviti vrlo brzo, predlažući čak 10 milijuna godina kao donju granicu trajnosti tog procesa (Lazcano & Miller, 1994. prema Orgel, 1998.).

### 3. RNA KAO PRIMARNI PRENOSITELJ GENSKJE INFORMACIJE

Metabolizam, genetika i staničnost života usko su povezani. No, kako je došlo do međuovisnosti navedenih značajki? Je li primordijalni metabolizam razvio vlastitu kontrolu genima ili je primordijalna genetička informacija zarobila svoje metaboličke resurse? (Wächtershäuser, 2014.) Postoji nekoliko hipoteza koje se međusobno isprepliću.

#### 3.1. RNA

Postoje jasni dokazi da velike količine organskih molekula neprestano nastaju na mnogim mjestima u svemiru (deDuve, 2003.) Primjerice, najjednostavnija aminokiselina, glicin, pronađena je u području Strijelca B2, gustom oblaku međuzvezdane prašine u središtu Mliječnog puta (Kuan, 2003. prema Lal 2008.) Pretpostavka je da su zajedno s kometima koji su padali na Zemlju ranih godina njene prošlosti donesene i građevne jedinice za nastanak života. Te su tvari bile nadopunjene organskim tvarima nastalih na Zemlji iz anorganskih. Još je 1953. Stanley Miller izveo svoj poznati pokus (**Slika 1.**) u kojem je simulirao uvjete Zemljine rane atmosfere.



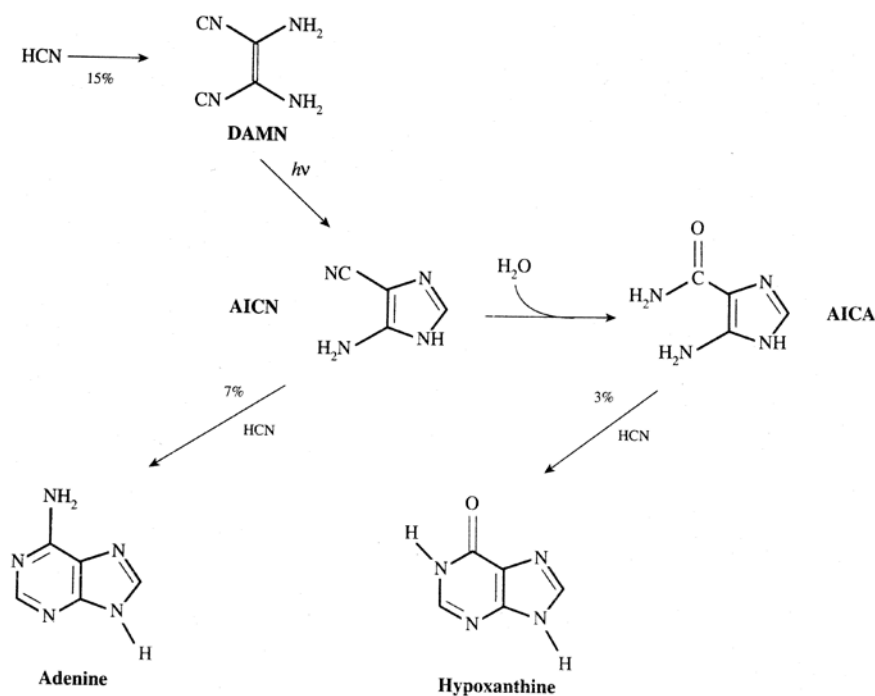
**Slika 1.** Millerov eksperiment

Smjesu plinova (metan, amonijak, vodena para i vodik) izložio je električnom izbijanju te već nakon dva dana u kondenzatu detektirao glicin, a nakon tjedan dana još nekolicinu aminokiselina, kraće karboksilne kiseline, kao i one s hidroksilnom skupinom, te ureu. (Miller, 1953. prema Lazcano & Bada, 2003.). Miller je u svojim rezultatima vidio dokaz za postojanje prebiotske juhe iz koje se razvio život, što je još 1920ih predložio Aleksandar Oparin. Ova teorija se danas uglavnom odbacuje. (Malo je vjerojatno da su u prebiotskoj juhi tvari bile dovoljno koncentrirane da bi međusobno reagirale, također, vladala je kemijska ravnoteža koja ne pogoduje kemijskim reakcijama.)

1968. Leslie Orgel i Francis Crick predlažu RNA kao prvu molekulu koja je imala ulogu prijenosa genske informacije. Ova teorija danas je široko prihvaćena jer osim što RNA ima mogućnost pohrane i prijenosa genske informacije, također ima i katalitičku ulogu (ribozimi).

### 3.1.1. pre-RNA faza

Ova faza uključuje korake koji su doveli od osnovnih proizvoda organske kemije do prvih replicirajućih RNA molekula. Protometabolizam je vjerojatno ovisio o mreži prilično složenih kemijskih procesa. Čini se vjerojatnim da su ATP i drugi NTP-ovi (nukleozid-trifosfati) koji služe kao prekursori za sintezu RNA u danas-prisutnim organizmima, imali svoju ulogu već u protometabolizmu. Vjerojatno su bili prijenosnici energije, prije sudjelovanja u formiranju prvih RNA molekula. Manje vjerojatna alternativa bi bila da se RNA pojavila drugim mehanizmima i bila izvor prvih NTP-ova. Postavlja se pitanje kako je onda došlo do sinteze prvih nukleotida. Zbog veće stabilnosti dušične baze, čiji je prekursor HCN (**Slika 2.**), su vjerojatno nastale prve.



**Slika 2.** Prebiotska sinteza adenina i hipoksantina, vjerojatno prve baze koje su bile gradivni elementi RNA (Joyce, 1989. prema Zubay & Mui, 2001.)

Riboza je vjerojatno nastala od formaldehida ( $CH_2O$ ), te nakon fosforilacije reagirala s jednom od dušičnih baza izgrađujući nukleotid. Budući HCN i  $CH_2O$  međusobno reagiraju, riboza i dušične baze nisu mogli nastati u isto vrijeme na istom mjestu. (Zubay & Mui, 2001.) Kemijske reakcije u protometabolizmu morale su biti održive tijekom dužeg vremena u kojem bi se razvio enzimski kataliziran metabolizam. Te reakcije postupno bi bile obogaćivane ribozimski kataliziranim reakcijama. (Gilbert, 1986. prema DeDuve, 2003.) Ključni ishod protometabolizma bilo bi nastajanje prvih RNA molekula. Nastajanje RNA je bila posljedica kemijskih procesa kojima su stvorene i mnoge drugi polinukleotidi. Malo je vjerojatno da su selektivno stvoreni polinukleotidi koji su imali samo komplementarne baze A (adenin) i U (uracil), odnosno G (gvanin) i C (citozin). Vjerojatno su RNA kakve danas poznajemo bile rijetke u toj smjesi polinukleotida, no molekularnom selekcijom su jedine opstale. Naime, mogle su služiti kao kalupi za vlastitu replikaciju, koju uz to i same kataliziraju.

### 3.1.2. RNA faza

Ova faza je započela interakcijama između RNA i aminokiselina što je dovelo do stvaranja kompleksa sličnih današnjim aminoacil-tRNA. Ove interakcije su pokazivale stupanj specifičnosti što je dovelo do odabira 20 aminokiselina koje danas izgrađuju proteine, kao i njihovu homokiralnost (sve aminokiseline nastale biološkim putem su L-orijentacije, svi šećeri nastali biološkim putem su D-orijentacije). Oko pojave homokiralnosti mišljenja su dosta podijeljena. Svakako je bilo bitno narušavanje stanja racemata (višak jednog od enantiomera), te amplifikacija efekta autokatalizom. (Frank, 1953. prema Wächtershäuser, 2014.) Neki smatraju da homokiralnost biomolekula ima vanzemaljski izvor. A jedan od dokaza mogao bi biti meteorit Murchison u kojem je pronađen višak L-aminokiselina. Višak enantiomera moglo je uzrokovati sinkrotrono zračenje neutronske zvijezde, koje ima polarizacijski efekt (Engel & Macko, 1997. prema Keszthelyi, 2001.), ili vrlo duga izloženost vrlo niskoj, kritičnoj temperaturi pri kojoj se D-aminokiseline pretvaraju u L-aminokiseline (Salam, 1993. prema Keszthelyi, 2001.). Yamagata (1966.) je pretpostavio da L- i D-enantiomeri imaju vrlo malu razliku u energijama, argumentirajući to kvantnom fizikom, ali ipak dovoljnu da akumulacijom dovedu do prevladavanja jednog od enantiomera (Yamagata et al., 1980. prema Bonner, 1999.) Još uvijek prevladava mišljenje da je izvor homokiralnosti čista slučajnost, pa tako Russel i Martin (2003.) iznose teoriju po kojoj je tako slučajnošću peptidil-transferaza evoluirala na način da može katalizirati polimerizaciju samo L-aminokiselina, dok je isto tako slučajnošću evoluirala enolaza koja katalizira adiciju vode na nekiralni fosfoenolpiruvat sintetizirajući kiralni 2-fosfo-D-glicerat. Pitanje je bi li danas svi živi organizmi bili izgrađeni od L-aminokiselina da RNA nije izgrađena od D-riboze. (DeDuve, 2003.) Očigledno je da su interakcije s aminokiselinama poboljšale stabilnost i replikabilnost tadašnjih RNA. Pretpostavlja se da su prvotne RNA bile sastavljene od 50-100 nukleotida, te su sličile na današnje tRNA (Eigen & Winkler-Oswatitsch, 1981. prema DeDuve, 2003.), a kasnije u priču ulaze i ancestralne rRNA i mRNA čije su interakcije s ancestralnim aminoacil-tRNA uzrokovale stvaranje peptidnih veza među aminokiselinama. Vjerojatno je da su interakcije između ancestralnih mRNA i tRNA uključivale sparivanje komplementarnih dušičnih baza, što je bila osnova za stvaranje genskog koda. U jednom trenutku staničnost je postala potrebna kako bi omogućila selekciju na temelju prednosti koje su pojedinim stanicama pružali produkti translacije njihovih gena. Moguće je da se staničnost pojavila i ranije, neki čak vjeruju da je bila početni korak ka postanku života, ali sigurno se morala razviti do faze selekcije gena. (DeDuve, 2003.) Pretpostavlja se da su protostanice



obilovale kopijama gena kako bi se povećala vjerojatnost da protostanice kćeri, nastale nasumičnim diobama dobiju genski materijal. (Reanney, 1987. prema Santos et al., 2003.)

### 3.1.3. Protein/DNA faza

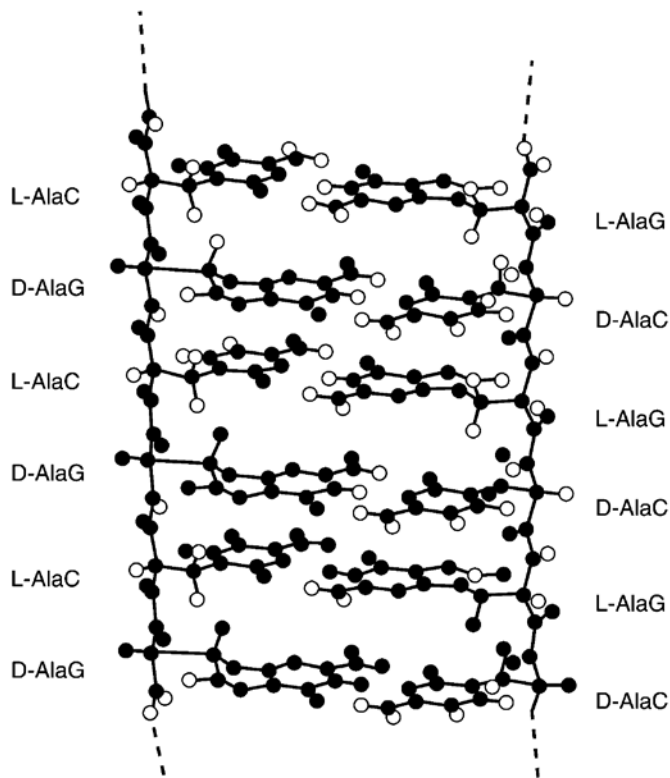
Prvotni produkti translacije gena bili su sličniji oligopeptidima nego pravim proteinima, ali su ipak bili dovoljno složeni da bi bili korisni protostanicama i omogućili njihovu selekciju (DeDuve, 2003.). Bitan događaj bio je i razvoj genskog koda. Genski kod je univerzalan, a za sve ne-standardne kodove je utvrđeno da su se sekundarno pojavili. (Osawa, 1995. prema Weberndorfer et al., 2003.). Također, genski kod je strukturiran na način koji umanjuje štetne posljedice mutacija. (Vogels, 1998. prema DeDuve, 2003.) To ukazuje na vjerojatnost da je današnji genski kod ishod dugotrajnog selektivnog procesa u kojem su mnogi kodovi „testirani“ mutacijama tRNA ili aminoacil-tRNA sintetaze. (DeDuve, 2003.) Taj selektivni proces morao se dogoditi dok je postajalo tek nekoliko manjih proteina, jer bi inače proces bio koban zbog moguće inaktivacije esencijalnih proteina. Osim genskih kodova, „testirani“ su i različiti translacijski produkti što je rezultiralo pojavom kompleksnijih proteinskih enzima i zamjenom protometabolizma metabolizmom kakvog i danas poznajemo. Mutacija gena eksprimirala bi se pojavom proteina koji bi imao korisnu katalitičku aktivnost, te bi omogućio protostanici u kojoj se pojavio brži rast i razmnožavanje u odnosu na ostatak protostanica u istim uvjetima uzrokujući amplifikaciju protostanice i njenog „potomstva“ s novonastalim korisnim enzimom. Također, protostanice su lateralnim transferom izmjenjivale veće količine gena (Woese, 1998. prema Santos et al., 2003.), a također nije isključena ni mogućnost fuzioniranja protostanica pod određenim uvjetima (Santos et al., 2003.), što je također moglo doprinijeti širenju korisnih gena među populacijom. Ponavljanje ovog procesa u novonastaloj populaciji dovelo bi do stjecanja mnogih korisnih enzima sve dok se ne skupi set enzima koji bi ispunjavao sve potrebe samoodržavajućeg metabolizma. (DeDuve, 2003.) Nakon nastajanja prvih enzima uslijedilo je produljivanje gena i njihovih translacijskih produkata, uzrokovano pojavom RNA replikaze povećane točnosti. Prije pojave LUCA morali su se razviti još mnogi enzimi, koenzimi, membrana je morala biti opremljena prenositeljima i receptorima, a DNA je morala preuzeti ulogu pohrane nasljedne informacije. DNA je bolja za ovu ulogu od RNA zbog svoje veće stabilnosti. Manje je reaktivna od RNA jer ne posjeduje hidroksilnu skupinu na C-2 položaju šećera koji gradi osnovicu polimera, te

gradi dvostruku zavojnicu što također doprinosi stabilnosti, a i pruža kalup za popravak u slučaju oštećenja jednog od lanaca. Također, metilirani uracil, timin (T) koji zamjenjuje uracil kod DNA, otporniji je na mutacije. Nije poznato ni kada ni kako je DNA preuzela ovu važnu ulogu od RNA, ali pretpostavlja se da su ključnu ulogu imala 3 enzima proizašla iz primarne RNA-replikaze: 1. reverzna transkriptaza koja prenosi informaciju iz RNA u DNA, 2. DNA-polimeraza koja služi replikaciji DNA, 3. transkriptaza, koja vraća informaciju RNA, kako bi RNA nastavila obavljati svoje ostale funkcije. (DeDuve, 2003.) Prvotna DNA replikacija vjerojatno se odvijala mehanizmom „rolling circle“, kakav vidamo kod današnjih bakterijskih i arhejskih plazmida, dok su se moderne DNA-polimeraze razvile odvojeno kod arheja i bakterija, na što ukazuje nedostatak sličnosti kod ovih dviju polimeraza. (Koonin et al., 1999. prema Wächtershäuser, 2014.)

Moguće je da navedene promjene nisu dovele do LUCA, već do drugačijeg jednostaničnog organizma koji je bio početna točka razgranatog filogenetskog stabla. Nekoliko bottleneck-ova je moglo uslijediti, a LUCA je mogao biti ishod jednog od njih. (DeDuve, 2008.)

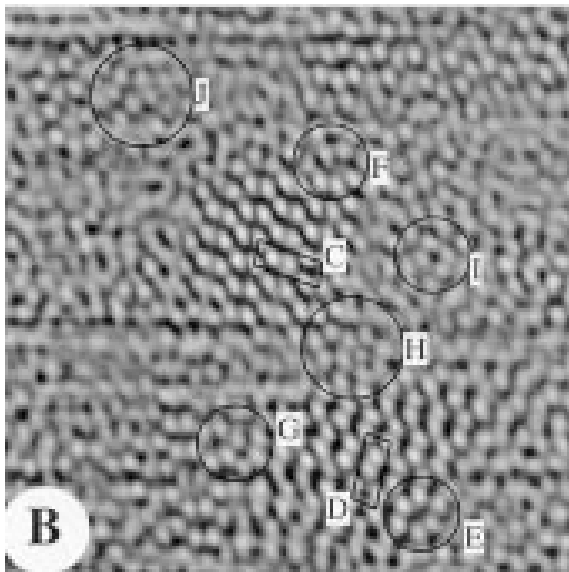
### 3.2. Ostale teorije o prvotnom genskom materijalu

U znanosti je uvijek vrijedno proučiti alternative vlastite teorije, što je učinio i Orgel, glavni zastupnik hipoteze RNA-svijeta. Kao jedinu prihvatljivu alternativu predlaže PNA, polinukleotid, ali s okosnicom od alternirajućih L- i D-aminokiselina (**Slika 3.**).



**Slika 3.** Hipotetska dvolančana alanil-PNA (nacrtao Orgel, 2003., prema Diederichsen, 1997.)

Sowerby i suradnici predlažu da su ulogu prvotnog genskog materijala imale slobodne purinske i pirimidinske baze koje se spontano slažu u jednoslojnu strukturu na dodirnoj površini vode i minerala, te pritom tvore kompleksne neperiodične strukture (**Slika 4.**) koje su mogle dovesti do stvaranja biološke informacije (Sowerby et al., 2000.)



**Slika 4.** Neperiodične strukture koje na površini  $\text{MoS}_2$  stvaraju adenin i uracil. Slika dobivena pretražnim tunelirajućim mikroskopom (Sowerby et al., 2000.)

## 4. GDJE JE NASTAO ŽIVOT?

### 4.1. Panspermija

Još su se i stari Grci pitali postoji li život poput našega na drugim svjetovima, dok se „moderna“ razmišljanja o mogućem nastanku života negdje u dubinama svemira te njegovom prijenosu na naš planet javljaju krajem 19. stoljeća. Mnogi poznati znanstvenici tog doba, među njima i poznati fizičar Lord Kelvin smatrali su da je klica života donesena na Zemlju padom meteorita iz svemira (litopanspermija). Poznati kemičar Svante Arrhenius vjerovao je da je život došao iz udaljenih planeta izvan sunčeva sustava nošen energijom zračenja zvijezda (radiopanspermija). Naravno, uskoro su se pojavile i prve sumnje i pitanja bi li taj hipotetski život mogao preživjeti uvjete u svemiru. Francis Crick predlaže teoriju usmjerene panspermije: inteligentna bića s planeta izvan sunčevog sustava su namjerno „zasijala“ život na Zemlji. Svoju teoriju argumentirao je tezom da je bilo dovoljno vremena da se život razvije i više puta tijekom evolucije svemira. (Crick, 1981. prema Raulin-Cerceanu et al., 1998.) Još i danas, ljudi su fascinirani idejom o postojanju života, a pogotovo inteligentnog negdje u svemiru. Budući je malo vjerojatno da ćemo otkriti „inteligentni“ vanzemaljski život direktnim kontaktom, ljudi su počeli razmišljati o načinima potencijalne komunikacije. 1959. Cocconi i Morrison predlažu slušanje radiovalova elektromagnetnog spektra na valnoj duljini vodika, najzastupljenije tvari u svemiru, a astronom Frank Drake 1961. izlaže svoju popularnu Drakeovu jednadžbu za procjenu broja (N) tehnološki naprednih civilizacija u našoj galaksiji. (Pearman 1963. prema Raulin-Cerceanu et al., 1998.)

Drakeova jednadžba:

$$N = R^* \cdot f_p \cdot n_e \cdot f_l \cdot f_i \cdot f_c \cdot L$$

$R^*$  = stopa nastajanja zvijezda pogodnih za nastanak inteligentnog života

$f_p$  = postotak takvih zvijezda s planetnim sustavima

$n_e$  = broj planeta pogodnih za život u planetarnom sustavu

$f_l$  = postotak planeta pogodnih za život na kojima se život uistinu i pojavio

$f_i$  = postotak planeta na kojima se pojavio inteligentni život

$f_c$  = postotak civilizacija s tehnologijom koja im dopušta slanje zamjetljivih signala u svemir

$L$  = vrijeme tijekom kojeg takva civilizacija šalje zamjetljive signale u svemir

No, ova formula smišljena je na modelu nama poznatog zemaljskog života, moguće je da postoje drugi oblici života, drugi tipovi biokemije, (Raulin-Cerceanu et al., 1998.) koji su nama trenutno nezamislivi, a vrlo vjerojatno i intelektualno neshvatljivi. 1984. je osnovan institut SETI (Search for ExtraTerrestrial Intelligence) čiji je cilj istraživati, razumjeti i objasniti podrijetlo i prirodu života u svemiru. U međuvremenu, na nekoliko istaživačkih objekata koje je čovjek poslao u svemir postavljene su poruke za možebitan „inteligentni“ život koji bi ih mogao protumačiti, slane su poruke radioteleskopima sa zemlje. Osim pokušaja komunikacije s „inteligentnim“ životom iz svemira, znanstvenici su pokušali detektirati kemijske tragove (npr. ozon) koji bi mogli ukazivat na postojanje života na određenom planetu (Schneider, 1996. prema Raulin-Cerceanu et al., 1998.). Nešto više rezultata dale su analize sastava kometa i međuzvezdane i okozvezdane tvari. Pronađen je spektar od oko 140 tvari uključujući : cijanovodik (HCN), metan (CH<sub>4</sub>), metanol (CH<sub>3</sub>OH), etanol (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH), mravlja kiselina (HCOOH), kao i složeniji aromatski ugljikohidrati. (Lal, 2008.) U meteoritima koji su pali na Zemlju pronađeno je 70-ak aminokiselina, od čega 8 proteinogenih (Raulin-Cerceanu et al., 1998.) Najzanimljiviji od pronađenih meteorita je možda ALH84001 s Marsa, u kojem su pronađene strukture koje podsjećaju na zemaljske mikrofosile, kao i mnoštvo organskih spojeva. Neki biolozi smatraju da postoji mogućnost da bi zaštićen unutar meteorita živi organizam mogao preživjeti put od Marsa do Zemlje. Zanimljiv je slučaj i mikroorganizama pronađenih iznad sloja tropopauze, na visini 20-40 km (Narlikar et al., 2003. prema Lal 2008.)

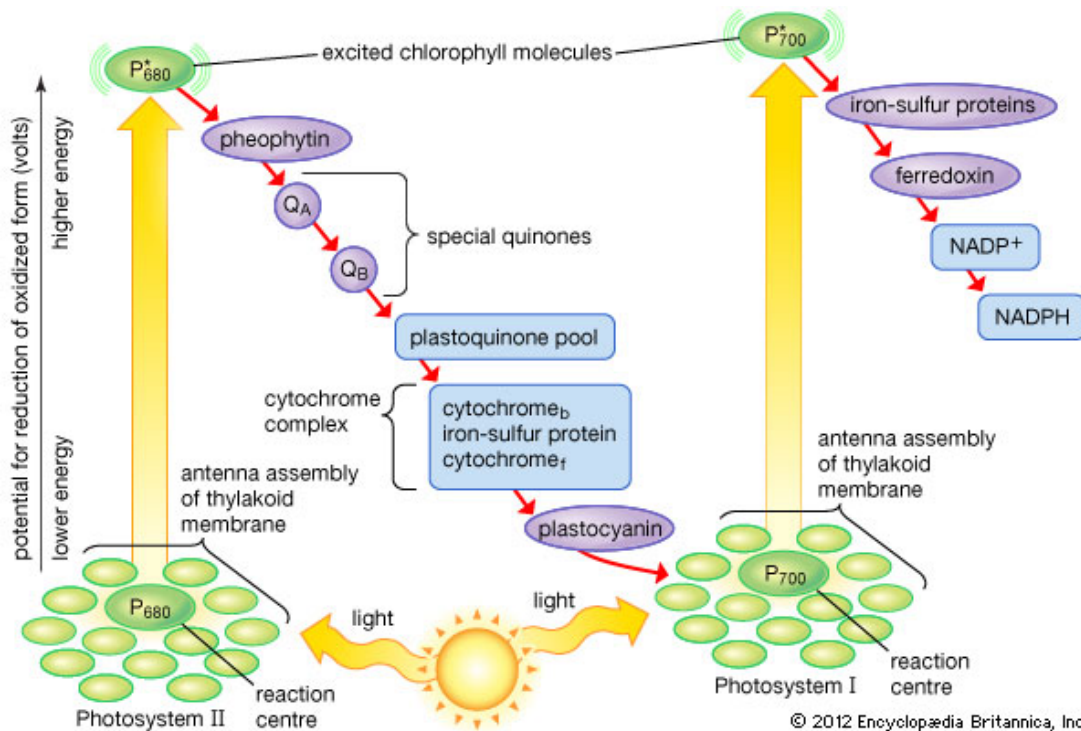
Iako je panspermija jedno od mogućih rješenja misterija postanka života na Zemlji, ne nudi odgovor točno gdje i na koji način je nastao život općenito. S informacijama koje danas imamo, ipak je veća vjerojatnost da su u svemiru, umjesto života, nastali njegovi gradivni elementi (pojedini organski spojevi) koji su u ranim zemljinim godinama meteoritima i kometima doneseni na Zemlju.

## 4.2. Vrući izvori na površini Zemlje

### 4.2.1. Fotosinteza kao pokretač života

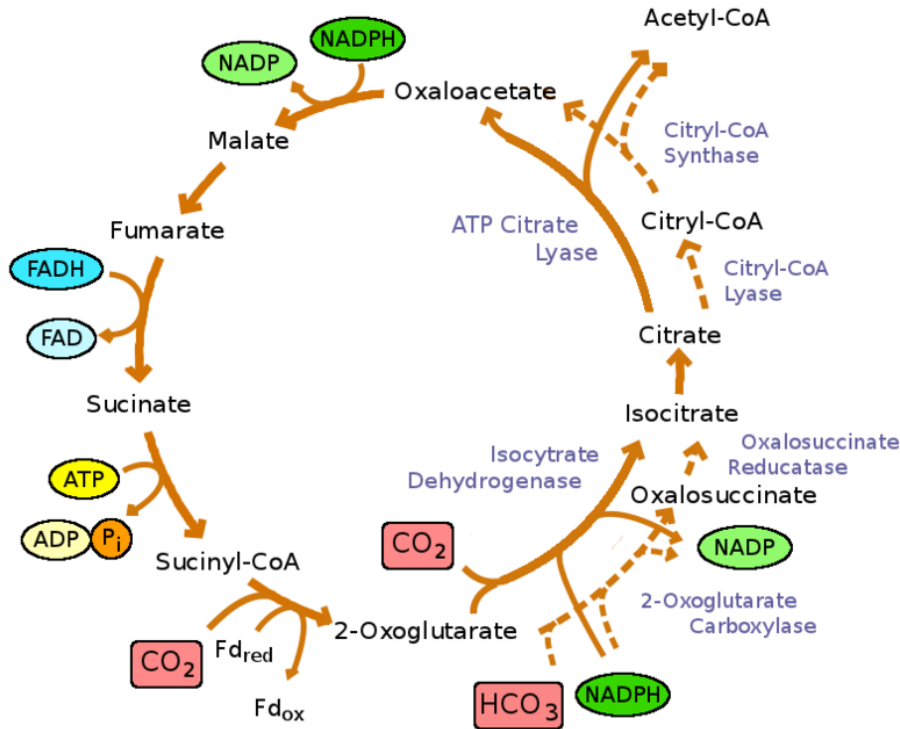
Moguće je da je život započeo kao fotoautotrof u atmosferi ugljikovog dioksida i dušika. (Hartman, 1998.) Voda u vrućim izvorima na površini mlade Zemlje vjerojatno je obilovala ionima željeza (Fe<sup>2+</sup>) i ostalih prijelaznih metala (Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) kao i magnezijevim ionima (Mg<sup>2+</sup>), aluminijevim ionima (Al<sup>3+</sup>), silikatnim ionima (SiO<sub>4</sub><sup>4-</sup>) te

plinovima, kao što su ugljikov dioksid ( $\text{CO}_2$ ), dušik ( $\text{N}_2$ ) i sumporovodik ( $\text{H}_2\text{S}$ ). Nakon precipitacije sulfida, višak željeza formirao bi samoreplicirajuće gline bogate željezom (SRIRC-„self-replicating iron-rich clays“) s dodatkom magnezijevih i silikatnih iona. Ugljikov dioksid se fotoreducirao (UV-zračenje je bilo izvor energije) u oksalat ( $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ ) uz pomoć iona željeza iz SRIRC-a. Ovaj korak možemo smatrati početkom evolucije fotosinteze. (Hartman, 1998.) Oksalat se zatim uz pomoć mangana dalje reducirao do glioksalata ( $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2$ ). Dva glioksilata se kondenziraju, te potom dekarboksiliraju tvoreći glicerat ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_4$ ). Sintetizirane organske kiseline katalizirale su daljnje stvaranje gline. Sljedeći korak u evoluciji SRIRC-a bio je ulazak sumpora u sustav što je dovelo do sinteze željezovih sulfida ( $\text{Fe}_2\text{S}_2$ ,  $\text{Fe}_4\text{S}_4$ ) koji su i danas reaktivni centri ferredoksina, metaloproteina koji sudjeluju u prijenosu elektrona u nizu metaboličkih reakcija, kao i fotosintezi (Slika 5).



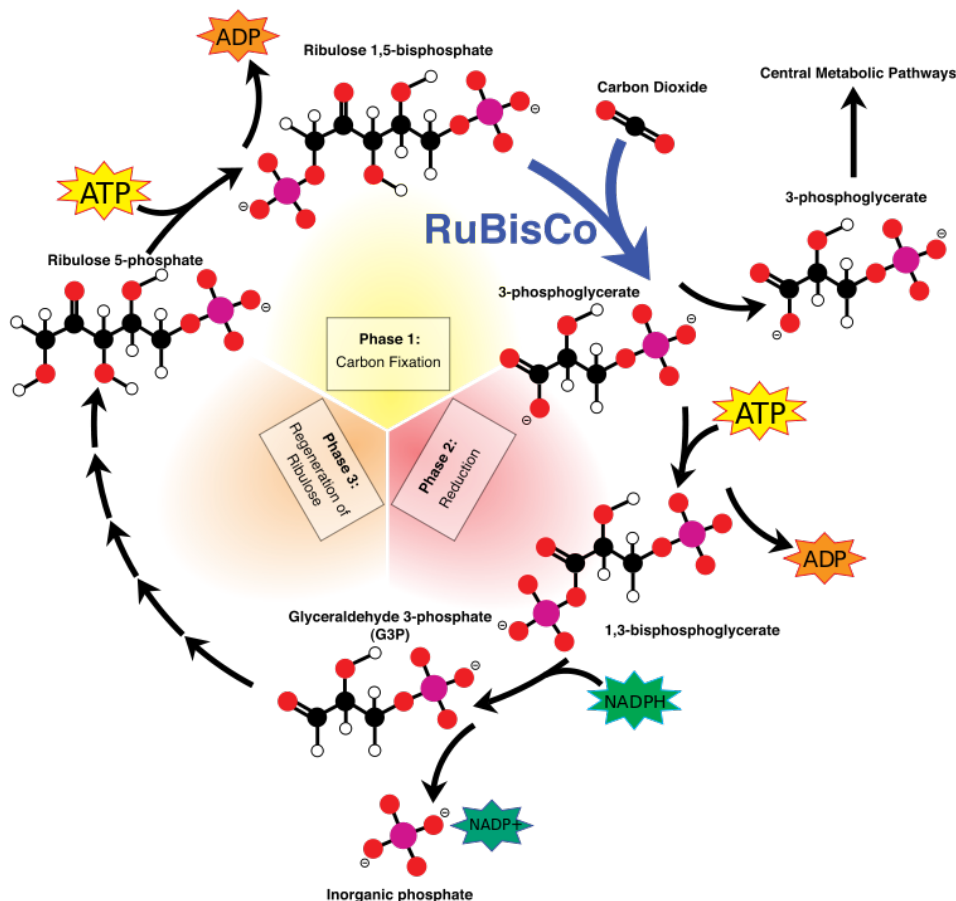
**Slika 5.** Lanac prijenosa elektrona u fotosintezi

Osim željezovih sulfida formirali su se i acetil-tioesteri. Acetil-tioesteri su reagirali s ugljikovim dioksidom sintetizirajući piruvat, koji bi reagirao s ugljikovim dioksidom tvoreći oksaloacetat, koji bi se potom reducirao u malat, koji bi se potom analizirao na acetil-tioester i glioksalat. (Ivanovsky et al., 1993. prema Hartman, 1998.). Ovakav ciklus je kasnije proširen u obrnuti ciklus limunske kiseline (Slika 6.).



**Slika 6.** Obrnuti ciklus limunske kiseline

Kompleksniji sustav SRIRC-a bio je u mogućnosti fiksirati dušik. Redukcijom dušika u amonijak sinteza prvih aminokiselina je postala moguća. Prve membrane su mogle nastati od polipeptida s alternirajućim hidrofилnim i hidrofobnim aminokiselinama. (Hartman, 1998.) Osim sinteze prvih aminokiselina fiksacija dušika omogućila je i nastanak pirola (heterocikličkog aromatskog spoja s jednim dušikom i četiri ugljika u prstenu), flavina (bitan u redoks reakcijama), nikotinamida (prekursor bitnih koenzima), porfirina (proteinski dio hema), fikobilina i klorofila (pigmenti, bitni u fotosintezi). Napokon fosfat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) ulazi u evoluirajući sustav SRIRC-a, omogućujući fiksaciju ugljikovog dioksida Calvinovim ciklusom (**Slika 7.**).



**Slika 7.** Fiksacija ugljikovog dioksida Calvinovim ciklusom

Pomoću acetil-koenzima A (acetil-CoA,) iz jednostavnih ugljikohidrata sintetiziraju se masne kiseline, te zajedno s glicerolom i fosfatima stvaraju fosfolipide. Fosfolipidi izgrađuju membranu kakvu i danas poznajemo. Naposljetku dolazi do sinteze i polimerizacije nukleotida u polinukleotide, što se može smatrati začetkom razvoja genskog koda. (Hartman, 1998.)

Iz ovog kuta gledanja evolucija fotosinteze bila je ključna za pojavu života na Zemlji. Ova hipoteza uklanja potrebu za „prebiotskom juhom“ jer su za sintezu organskih tvari zaslužni fiksacija ugljikovog dioksida i dušika. Također, fosili fotosintetizirajućih cijanobakterija stari su preko 3.5 milijardi godina što ukazuje na vrlo ranu pojavu fotosinteze u kontekstu nastanka života. No, da bi došlo do fotoreakcija vrući izvori nisu smijeli biti duboki, te bi stoga postojala konstantna opasnost od presušivanja, koje bi zaustavilo razvoj života. Također, pitanje je kako bi se život proširio iz zatvorenih vrućih izvora po cijeloj Zemlji.



#### 4.2.2. Geotermalni sustavi na kopnu

Podatke o staništima prvih stanica možemo tražiti u sadržaju iona evolucijski najstarijih proteina. (Mulkiđjanian et al., 2012.) Današnje membrane sadrže kompleksne transportne sustave, te sustave za pretvorbu energije kakve membrane protostanica nisu mogle imati. Neke rekonstrukcije predlažu da su prve membrane bile sastavljene od jednostavnih lipida s jednim „repom“. (Deamer, 2008. prema Mulkiđjanian et al., 2012.) Pokusi su pokazali da su vezikuli od masnih kiselina (Mansy et al., 2008. prema Mulkiđjanian et al., 2012.) ili fosforiliranih izoprenoida (Nomura et al., 2001. prema Mulkiđjanian et al., 2012.) mogu „zarobiti“ polinukleotide i proteine, ali su propusne za male molekule. Slijedi da prve membrane nisu sprječavale slobodnu razmjenu malih molekula i iona s okolišem, što je za život bilo ključno prije pojave kompleksnih membranskih kanala i prenositelja, te nadalje sugerira da je unutarnji sastav prvih stanica bio u kemijskoj ravnoteži s njihovim okolišem.

Evolucijski najstariji enzimi, zajednički za sve tri domene života, pokazuju preferenciju prema cinku (Zn) i manganu (Mn) (Mulkiđjanian & Galperin, 2009. prema Mulkiđjanian et al., 2012.) Također, većina evolucijski najstarijih proteina uključenih u mehanizam translacije zahtijevaju ion kalija ( $K^+$ ) za svoje funkcioniranje (npr.  $K^+$ -ovisne GTPaze, peptidil-transferaza...), dok niti jedan od proučavanih ancestralnih proteina ne zahtjeva natrijev ion ( $Na^+$ ). (Mulkiđjanian et al., 2012.) Uz pretpostavku da kemijski sastav stanice odgovara okolišu u kojem su se razvile protostanice, visoki omjer  $[K^+]/[Na^+]$  u stanicama nikako ne odgovara teoriji o nastanku života u morskom okolišu, gdje je omjer navedenih iona obrnut. Za razvoj života zasigurno je bio ključan i fosfat ( $PO_4^{3-}$ ), koji je sastavni dio polinukleotidne okosnice, a globalne filogenomske analize pokazuju da je metabolizam na bazi fosfata stariji od LUCA (David & Alm, 2011. prema Mulkiđjanian et al., 2012.). Koncentracija fosfata u niti jednom prirodnom vodenom sustavu nije visoka kao u stanici, ali pretpostavlja se da su u reducirajućim primordijalnim uvjetima hipofosfit ( $PO_2^{3-}$ ) i fosfit ( $PO_3^{3-}$ ) mogli biti otopljeni u dostatnoj koncentraciji. (Schwartz, 2006. prema Mulkiđjanian et al., 2012.)

S obzirom na prijašnje opservacije, čini se vjerojatnim da su protostanice evoluirale u staništima visokim omjerom  $[K^+]/[Na^+]$ , te relativno visokim koncentracijama  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  i fosfora. (Mulkiđjanian et al., 2012.) Takvim karakteristikama odgovaraju kopneni geotermalni sustavi (**Slika 8.**).



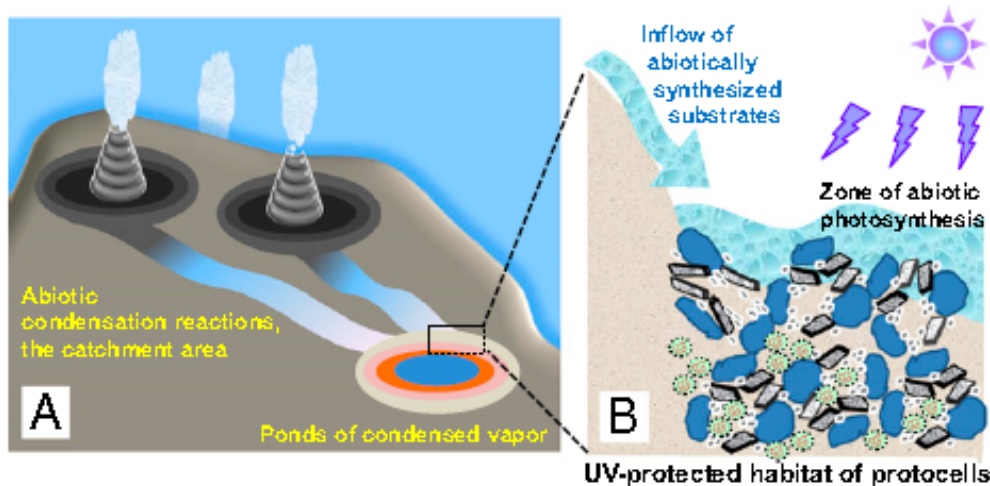
**Slika 8.** Kopneni geotermalni sustav, poprečni presjek (preuzeto i prilagođeno iz Mulkidjanian et al., 2012.)

Kopneni geotermalni sustav opskrbljuje se uglavnom padalinskom vodom koja se duboko pod zemljom miješa s magmatskim tekućinama i zagrije na 300-500 °C; takve vruće tekućine mogu ispirati razne ione iz stijena. Nakon grijanja, voda postaje lakša te se, obogaćena metalnim kationima i anionima poput Cl<sup>-</sup>, HS<sup>-</sup> i CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, uzdiže prema površini. Na manjim dubinama, vruća voda počne prelaziti u vodenu paru zbog nižeg tlaka. Plinovita faza obično se odjeljuje od tekuće faze, i to ne samo fizički, nego i kemijski: Cl<sup>-</sup> uglavnom ostaje u tekućoj fazi, a CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> i H<sub>2</sub>S suspendiraju se među česticama vodne pare, tvoreći zonu para. Put protoka tekuće faze i točno mjesto ispuštanja određeni su pukotinama u stijeni; izbačena tekućina blago je lužnata, uz visok sadržaj Na<sup>+</sup> i Cl<sup>-</sup>. Dio para kondenzira se blizu površine i izbacuje termalnim izvorima, a ostatak stiže do površine kroz pukotine u stijenama tvoreći fumarole (ispušne ventile). Metalni kation nalaze se i u zoni tekućine i u zoni para, ali omjer [K<sup>+</sup>]/[Na<sup>+</sup>] daleko viši u zoni para.

Nedostatak enzima vezanih za autotrofni način prehrane među setom evolucijski očuvanih proteina ukazuje na to da su protostanice bile heterotrofi; ovisile su o abiotski sintetiziranim organskim tvarima (Mansy et al., 2008. prema Mulkidjanian et al., 2012.). U opisanim geotermalnim sustavima postojala su najmanje dva kontinuirana izvora organskih tvari. Hidrotermalna izmjena („Hydrothermal Alteration“) događa se kada stijene koje sadrže željezo reagiraju s vodom pri temperaturi od oko 300°C, što je uobičajena temperatura geotermalnih sustava. U navedenim uvjetima dio Fe<sup>2+</sup> u stijeni se oksidira u Fe<sup>3+</sup>; elektrone

oslobođeni ovom reakcijom prihvaćaju ioni vodika iz vode stvarajući  $H_2$ . U prisutnosti otopljenog  $CO_2$ , u konačnici se sintetiziraju razni ugljikohidrati. (Bird et al., 2004. prema Mulkidjanian et al., 2012.). Slične reakcije mogle bi dovesti do sinteze amonijaka. (Brandes et al., 1998. prema Mulkidjanian et al., 2012.) Drugi izvor organskih tvari bila bi abiotska fotosinteza katalizirana česticama ZnS i MnS. (Guzman & Martin, 2009. prema Mulkidjanian et al., 2012.)

Dva tipa okoliša bitna za ranu evoluciju opisana su u geotermalnim sustavima : mineralne površine koje bi katalizirale razne abiotske sinteze i geotermalni bazeni koji bi imali ulogu „uzgajališta“ prvih replicirajućih oblika života (**Slika 9.**)



**Slika 9.** A) geotermalni sustav s vanjske strane, B) geotermalni bazen (preuzeto iz Mulkidjanian et al., 2012.)

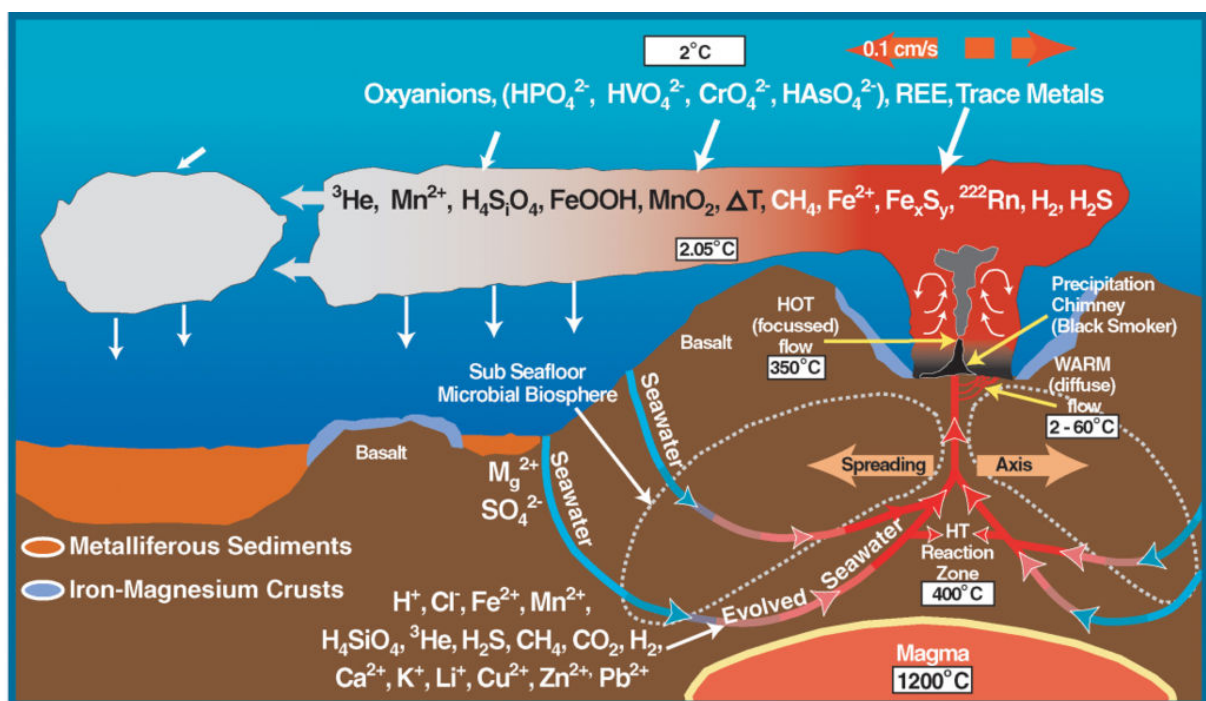
U bazenu su se akumuliraju razne (organske) tvari nošene geotermalnim tekućinama, kao i one sintetizirane na mineralima. (Osim katalizatora fotosinteze, sloj minerala bio je mjesto reakcije između amonijaka, sulfida, fosfitnih i fosfatnih iona s ugljikovim spojevima.) Akumulirane tvari bile bi gradivni elementi protostanica koje su obitavale u dubljim dijelovima bazena, zaštićene od UV-zračenja silikatnim sedimentima s kristalčićima ZnS i MnS, za koje se pokazalo da izrazito dobro absorbiraju UV-zračenje. Poroznost silikatnih minerala omogućavala je transport metabolita od gornjih, osvijetljenih slojeva minerala, do donjih zaštićenih slojeva s protostanicama.

U prilog teoriji o kopnenim geotermalnim sustavima kao kolijevkama života, ide i njihova autonomija. Naime, kemijski uvjeti u geotermalnim bazenima ovise gotovo samo o geotermalnoj aktivnosti, te su efektivno neovisni o klimatskim uvjetima i promjenama. Geotermalni bazeni, bi stoga mogli opstati milijunima godina u nepromijenjenim uvjetima,

omogućujući evoluciju protostanica i njihov opstanak kroz rane periode glacijacije. (Kasting & Catling, 2003. prema Mulkidjanian et al., 2012.)

#### 4.3. Dubokomorski hidrotermalni izvori

Još od njihova otkrića, biolozi smatraju hidrotermalne izvore, pukotine u zemljinoj kori iz kojih izvire geotermalno ugrijana voda (**Slika 10.**), vjerojatnim mjestima nastanka života zbog visoko reaktivnog kemijskog okoliša koji je daleko od ravnotežnog stanja (Baross & Hoffman, 1985. prema Baross & Martin, 2015.).

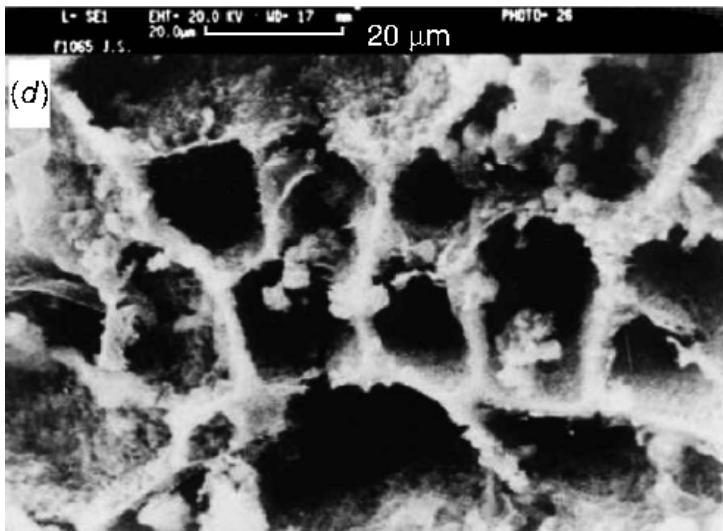


**Slika 10.** Biogeokemijski ciklus dubokomorskih hidrotermalnih izvora

Alkalni hidrotermalni izvori smatraju se osobito vjerojatnim mjestima nastanka života (Russell & Hall, 1997. prema Baross & Martin, 2015.), jer njihovi kemijski uvjeti imaju mnogo toga zajedničkog sa samim životom: umjerena temperatura od oko 70 °C i obilje H<sub>2</sub> iz geološkog procesa serpentinizacije. Serpentinizacija je proces u kome mineral olivin (Mg-Fe silikat) reagira s morskom vodom i formira serpentinit (hidroksilirani Mg-silikat) i magnetit (željezov oksid), što je pogodno za sintezu reduciranih spojeva ugljika iz CO<sub>2</sub> (Schrenk et al., 2013. prema Baross & Martin, 2015.). Također, kod alkalnih hidrotermalnih izvora odnos pH između unutrašnjosti njihove strukture i okoliša odgovara razlici između unutrašnjosti i okoliša modernih stanica (Sojo et al., 2014. prema Baross & Martin, 2015.). U laboratorijskoj

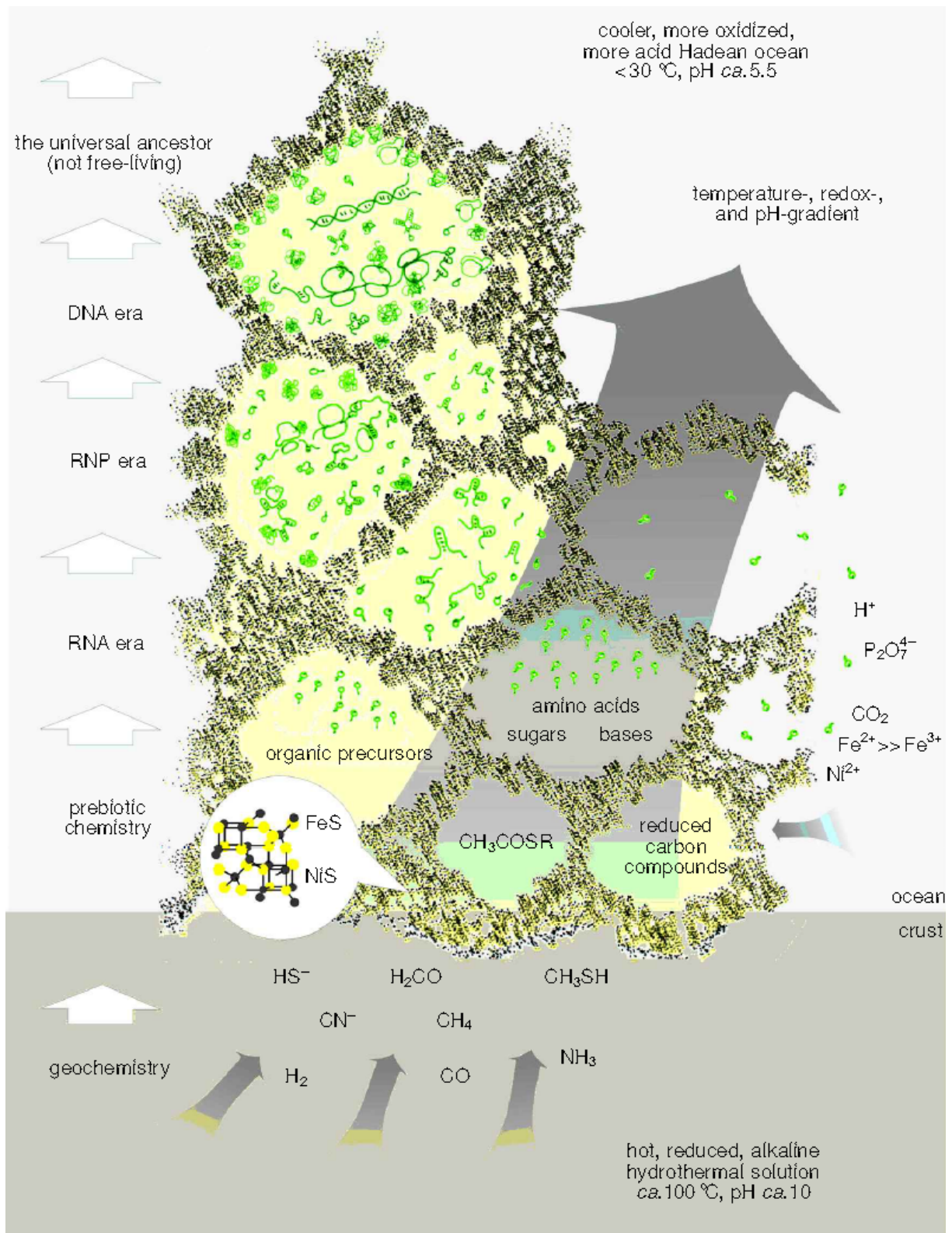
simulaciji uvijeta u alkalnim hidrotermalnim izvorima Roldan et al. (2015. prema Baross & Martin, 2015.) sintetizira metanoat ( $\text{HCOO}^-$ ), metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), etanoat ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) i piruvat ( $\text{CH}_3\text{COCOO}^-$ ) iz  $\text{CO}_2$ . To dokazuje da uvijeti u hidrotermalnim izvorima mogu pogodovati sintezi biološki relevantnih organskih spojeva.

Ključno za nastanak života svakako je stvaranje polupropusnog odjeljenja od okoliša. Hidrotermalni izvori odgovaraju i ovom uvijetu. Naime, vruća voda koja izlazi iz hidrotermalnih izvora obiluje hidrogensulfidom ( $\text{HS}^-$ ) koji bi reagirao s obiljem metalnih iona sadržanih u morskoj vodi prije cca. 4 milijarde godina ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) uzrokujući njihovu konstantnu precipitaciju u obliku metalnih sulfida (s prevladavajućim  $\text{FeS}$ ). Precipitati su stvarali šuplje trodimenzionalne strukture (**Slika 11.**).



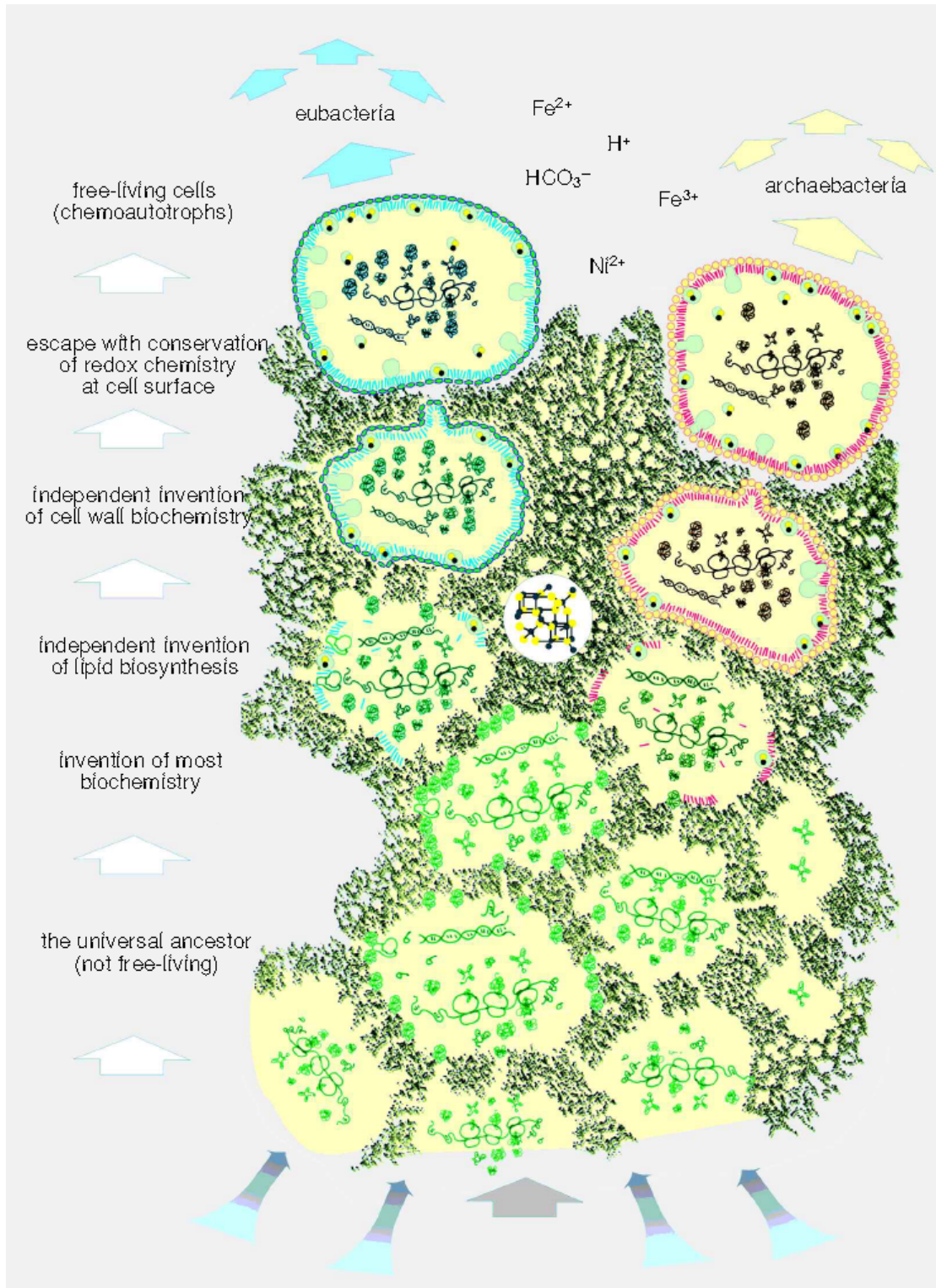
**Slika 11.** Strukture dobivene laboratorijskim miješanjem  $\text{Na}_2\text{S}$  i  $\text{FeCl}_2$ . (Russell & Hall, 1997., preuzeto iz Martin & Russell, 2003.) Slika dobivena elektronskim mikroskopom.

Osim strukturalne uloge,  $\text{FeS}$  (i  $\text{NiS}$ ) su imali katalitičku ulogu u sintezi acetylmetilsulfida iz ugljikovog monoksida i metil-sulfida unutar šupljih struktura omeđenih polupropusnim odjeljenjima koja su omogućavala koncentriranje produkata sinteze unutar struktura. Sličnim reakcijama, od reaktanata iz hidrotermalnih izvora i okolne morske vode mogle su se sintetizirati i prve RNA koje su po najnovijim pretpostavkama imale i ulogu stvaranja hidrofobnog sloja koji je štitio polipeptide i ugljikohidrate (Baross & Martin, 2015.). Sve navedeno je moglo dovesti do pojave LUCA bakterija i arhea (**Slika 12.**). (Martin & Russell, 2003.)



**Slika 12.** Model nastanka života reakcijama pokretanih redoks, pH i temperaturnim gradijentom u hidrotermalnim izvorima (preuzeto iz Martin & Russell, 2003.)

Neslobodnoživući LUCA odvojeno je evoluirao u slobodnoživuće, kemoautotrofne, membranom obavijene bakterije i arheje, što objašnjava razlike u građi među njihovim membranama (Slika 13.).



**Slika 13.** Model evolucije slobodnoživućih organizama iz neslobodnoživućeg LUCA. (preuzeto iz Martin & Russell, 2003.)

## 5. ZAKLJUČAK

Ništa u ranoj evoluciji nema smisla osim u svijetlu kemijske predodređenosti (Wächtershäuser, 2014.). Uistinu, jedino što je sigurno jest da su za nastanak života odgovorne reakcije kemijskih spojeva i elemenata koje su se odvijale u skladu s uvjetima koji su vladali u njihovoj okolini. A na isti način u istim uvjetima reagirali bi i danas. Stoga smatram da je za istraživanje nastanka života nužna suradnja biologa, kemičara, geologa i matematičara kako bi uz što više varijabli napravili matematičke modele i izračunali vjerojatnosti potencijalnih putova koji su doveli do nastanka života. Naravno, ni to nam neće sa sigurnošću otkriti odgovor na pitanje „Kako je nastao život?“, jer ako je nešto manje vjerojatno ne znači da se nije dogodilo. Još uvijek smo daleko od konačnog odgovora, ali promatrajući sličnosti i razlike među organizmima koji nas danas okružuju, kao i istražujući geološku povijest zemlje, možemo se ipak približiti korak naprijed odgovoru na to ključno pitanje.



## 6. SAŽETAK

Predmet istraživanja porijekla života jest rasvjetljivanje puta koji je od jednostavnih kemijskih spojeva doveo do nastanka LUCA (last universal common ancestor) - zajedničkog pretka svih organizama. Zemlja je nastala prije oko 4.6 milijardi godina, a prvi dokazi života sežu 3.86 godina u prošlost, kada su na Zemlji još uvijek vladali reducirajući uvjeti uz obilje amonijaka, metana, dušika, ugljikova dioksida, vodika i vodene pare. Budući nije bilo kisika, nedostajao je i ozonski sloj, te je UV-zračenje u cijelom svom intenzitetu dolazilo do površine zemlje. Postoje mnoge teorije gdje je u uvjetima koje je pružala mlada Zemlja život mogao nastati: od ideja da je život došao iz svemira, preko vrućih izvora na površini zemlje do dubokomorskih hidrotermalnih izvora. Svaka od teorija ima svoj odgovor na pitanje je li prvo evoluirao metabolizam, u kojem se kasnije razvila molekula koja je mogla prenositi gensku informaciju, ili je prvo nastala molekula prenositelj genske informacije uz koju je kasnije evoluirao metabolizam. No, većina se slaže da je primarnu uloga prijenosa genske informacije vjerojatno imala RNA koja, za razliku od stabilnije DNA koja danas posjeduje tu ulogu, osim mogućnosti pohrane informacije u obliku slijeda nukleotida posjeduje i katalitičku aktivnost. Također, većina se i slaže da su za nastanak života bili izrazito bitni metalosumporni spojevi koji su imali katalitičku aktivnost, a očuvani su i danas kao dio, biokemijski vrlo bitnih, metaloproteina. Još uvijek ne znamo konačan odgovor na pitanje: „Kako je nastao život?“, ali svako novo otkriće je komadić slagalice koja daje odgovor na to pitanje.

## 7.SUMMARY

The object of origin of life research is to elucidate the pathway leading from simple chemical compounds rise to the LUCA (last universal common ancestor) - the common ancestor of all organisms. Earth was formed about 4.6 billion years ago, and the first evidence of life dates 3.86 years in the past, when the Earth was still characterized by reducing conditions with an abundance of ammonia, methane, nitrogen, carbon dioxide, hydrogen and water vapor. Since there was no oxygen, the ozone layer was also missing, and UV-radiation reached the surface of Earth in whole of its intensity. There are many theories where, in the conditions that early Earth offered, life might have originated: from the idea that life came from outer space, via the hot springs on the Earth's surface to the deep-sea hydrothermal vents. Each theory has its own answer to the question whether the metabolism is the one that evolved first and later developed a molecule that was able to carry and store genetic information, or the the molecule that carried genetic information first evolved around which later evolved metabolism. However, most agree that RNA had the primary role of storing replicable genetic information which, in contrast to the more stable DNA which now plays this role, in addition to capacity to store genetic information in the form of a sequence of nucleotides also possesses catalytic activity. As well, most agree that metallosulfuric compounds, that showed a catalytic activity and are preserved today as part of biochemically important metalloproteins were extremely important for the emergence of life. We are still not able to doubtlessly answer the question "How did life originate?", but each new discovery is part of the puzzle that gives us the answer.

## 8. LITERATURA

Baross J.A., Martin W.F., 2015., The Ribofilm as a Concept for Life's Origins, *Cell* 162 : 13-15

Bonner W.A., 1999., Chirality amplification, *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 29: 615–623

Cleland C.E., Chyba C.F., 2002., Defining 'Life', *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 32: 387–393

DeDuve C., 2003., A research proposal on origin of life, *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 33: 559–574

Hartman H., 1998., Photosynthesis and the origin of life, *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 28: 515–521

Keszehelyi L., 2001., Homochirality of biomolecules, *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 31: 249–256.

Lal A.K., 2008., Origin of Life, *Astrophys Space Sci* 317: 267–278

Lazcano A., Bada J.L., 2003., The 1953 Stanley L. Miller experiment, *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 33: 235–242

Martin W., Russell M.J., 2003., On the origins of cells, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 358(1429): 59–85

Mulkidjanian A.Y., Bychkov A.Y., Dibrova D.V., Galperin M.Y., Koonin E.V., 2012., Origin of first cells at terrestrial, anoxic geothermal fields, *PNAS* 2012 : E821–E830

Orgel L.E., 1998., The origin of life- how long did it take?, *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 28: 91–96

Orgel L.E., 2003., Some consequences of the RNA world hypothesis, *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 33: 211–218

Raulin-Cerceau F., Maurel M.C., Schneider J., 1998., From panspermia to bioastronomy, the evolution of the hypothesis of universal life, *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 28: 597–612

Santos M., Zintzaras E., Szathmáry E., 2003., Origin of seks revisited, *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 33: 405–432

Sowerby S.J., Stockwell P.A., Heckl W.M., Petersen G.B., 2000., Self-programmable, self-assembling two-dimensional genetic matter, *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 30: 81–99

Wächtershäuser G., 2014., The Place of RNA in the Origin and Early Evolution of the Genetic Machinery, *Life* 2014, 4, 1050-1091

Weberndorfer G., Hofacker I.L., Stadler P.F., 2003., On the evolution of primitive genetic codes, *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 33: 491–514

Zubay G., Mui T., 2001., Prebiotic synthesis of nucleotides, *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 31: 87–102