


Od stavebních bloků k polymerům života ...

... aneb prebiotická evoluce

Vladimír Kopecký Jr.

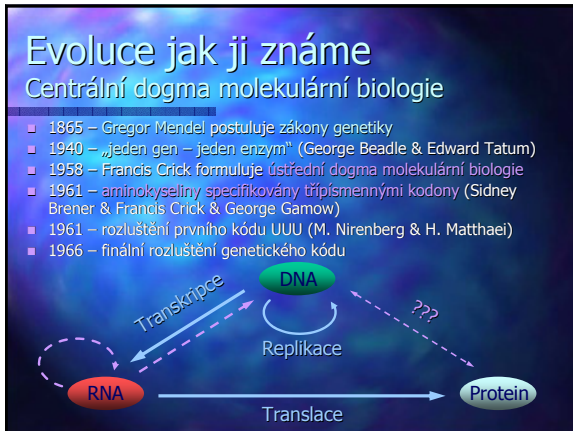
Fyzikální ústav Univerzity Karlovy v Praze
Oddělení fyziky biomolekul
<http://atrey.karlin.mff.cuni.cz/~ofb/kopeccky.html>
kopeccky@karlov.mff.cuni.cz



Evoluce jak ji známe

Centrální dogma molekulární biologie

- 1865 – Gregor Mendel postuluje zákony genetiky
- 1940 – „jeden gen – jeden enzym“ (George Beadle & Edward Tatum)
- 1958 – Francis Crick formuluje ústřední dogma molekulární biologie
- 1961 – aminokyseliny specifikovány třípísmennými kodony (Sidney Brenner & Francis Crick & George Gamow)
- 1961 – rozluštění prvního kódu UUU (M. Nirenberg & H. Matthaei)
- 1966 – finální rozluštění genetického kódu



Počátky života

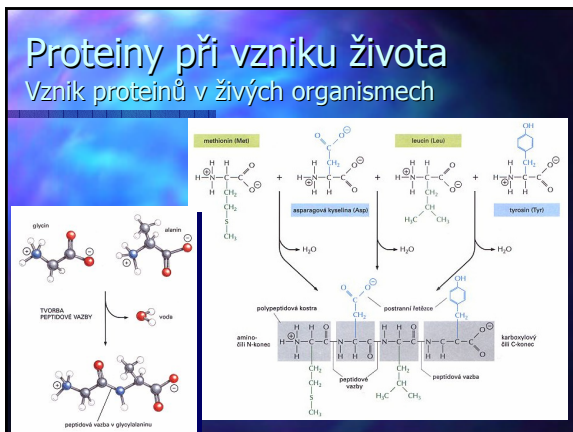
Scénáře vzniku života

- Proteiny, nikoli nukleové kyseliny
 - koacerváty – semipermeabilní membrány, Oparin (1924)
 - mikrosféry – protenoidy (sílky aminokyselin), Fox
- Nukleové kyseliny, nikoli proteiny
 - genová hypotéza – ribozymy, koenzymy, možná afinita k protenoidům (1986)
- Koexistence proteinů a nukleových kyselin
 - hypercykly – teoretický model autoreplikujících se systémů, Eigen (1960)
- Úplně jiný základ
 - anorganické jílky – silikátové slouky, možnost katalýzy, Cairns-Smith (1980)



Proteiny při vzniku života

Vznik proteinů v živých organismech



Proteiny při vzniku života

Vznik peptidů

- Aminokyseliny mohou začít vytvářet peptidy za aktivace CO v podmínkách horkých vodných roztoků za přítomnosti koloidního (Fe,Ni)S
- (Fe,Ni)S hydrolyzáza močoviny může být evolučním předchůdcem enzymu Ni-ureázy
- Podporuje chemoautotrofii vznik života s primitivním (Fe,Ni)S metabolismem



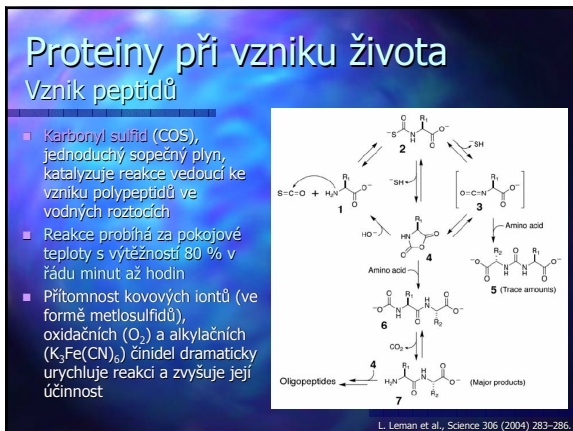
Schéma CO-železného peptidového cyklu. A) aminokyselina, B) anhydrid N-carboxy amonokyselin, C) série N-carboxomyl peptidů, D) série aminokyselin, tj. peptid, E) racemické deriváty hydantoinu, F) deriváty močoviny

C. Huber et al., Science 301 (2003) 938–940.

Proteiny při vzniku života

Vznik peptidů

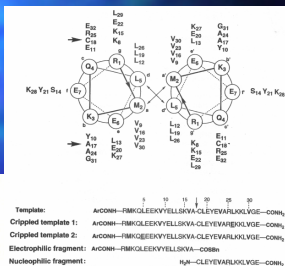
- Karbonyl sulfid (COS), jednoduchý sopečný plyn, katalyzuje reakce vedoucí ke vzniku polypeptidů ve vodných roztocích
- Reakce probíhá za pokojové teploty s výtěžností 80 % v řádu minut až hodin
- Přítomnost kovových iontů (ve formě metosulfidů), oxidačních (O_2) a alkylačních ($K_2Fe(CN)_6$) činidel dramaticky urychluje reakci a zvyšuje její účinnost



L. Leman et al., Science 306 (2004) 283–286.

Proteiny při vzniku života Samosereplikující peptid

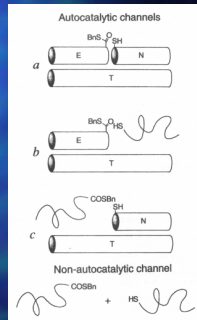
- 32-mer α -helix (coiled-coil) podobný leucinovému zipu autokatalyzuje ve vodném prostředí vznik svého obrazu složením 15- (nukleofilní fragment) a 17-meru (elektrofilní fragment)



D. H. Lee et al., Nature 382 (1996) 525-528.

Proteiny při vzniku života Samosereplikující peptid

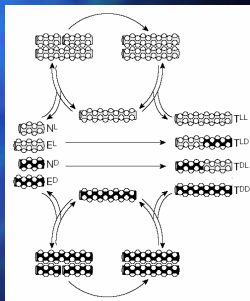
- Elektrofilní fragment atakuje prostřednictvím thioesteru esteru -COSBn terminální SH-amino skupinu nukleofilního fragmentu
- Vznikne cystein thioester intermediát, který se přemění na termodynamicky favorizovanou peptidovou vazbu a spojí oba fragmenty
- Katalytická cesta může probíhat:
 - A) prostřednictvím ternárního komplexu
 - B), C) za vzniku binárních komplexů (nízká výtěžnost, problémy s agregací)
 - D) přímou interakcí obou fragmentů, což je v porovnání s autokatalýzou proces s malou výtěžností



D. H. Lee et al., Nature 382 (1996) 525-528.

Proteiny při vzniku života Chirální selektivita

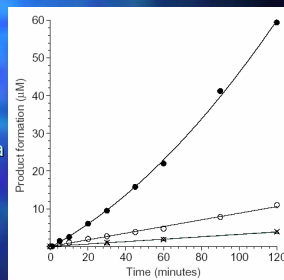
- Schématické znázornění chiroselektivních replikačních cyklů
- Homochirální peptidy T^{DD} a T^{LL} jsou produkovány autokatalýzou
- Heterochirální (T^{DL} a T^{LD}) peptidy vznikají nekatalyzovanou kondenzací nukleofilního (N) a elektrofilního (E) peptidu
- Teplátem řízená ligace homochirálních fragmentů vede k aplikaci homochirální produktů obecně



A. Sagatelian et al., Nature 409 (2001) 797-801.

Proteiny při vzniku života Chirální selektivita

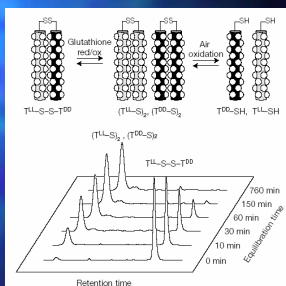
- Stupeň formování produktu v závislosti na čase
- Produkce homochirálních produktů (T^{LL} a T^{DD}) – plná kolečka, a heterochirálních produktů (T^{DL} a T^{LD}) – prázdná kolečka, je ukázána jako funkce času pro roztok obsahující 100 μ M koncentraci N^L , N^D , E^D a E^L
- Spodní křivka (trojúhelníky, křížky, resp.) je kontrola v přítomnosti 3M GndHCl



A. Sagatelian et al., Nature 409 (2001) 797-801.

Proteiny při vzniku života Chirální selektivita

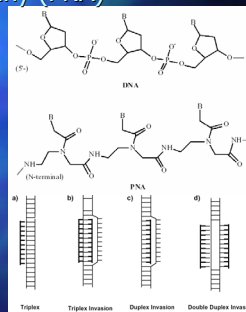
- Formování coiled-coil struktury a odpovídající HPLC retenční časy
- Příkrá disproporce ukazuje, že vznik coiled-coil helikální struktury je přísně chiroselektivní
- Stejně mechanismy vedly ke vzniku homochirálního života na Zemi



A. Sagatelian et al., Nature 409 (2001) 797-801.

Proteiny při vzniku života Peptidové nukleové kyseliny (PNA)

- Kostra PNA je tvořena polymerem N-(2-aminoethyl)glycinem (AEG)
- AEG může snadno nahradit nestabilní cukry
- PNA se váží na DNA formující dvoj- či trojšroubovice příbuzné Watson-Crickové helixu
- PNA mohou být prekurzorem světa RNA
- PNA mají terapeutické využití v antisense strategii a genetické diagnostice

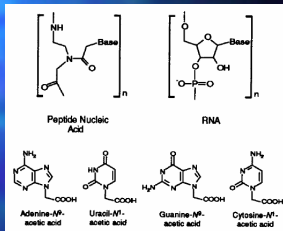


K. N. Ganesh and P. E. Nielsen, Current Org. Chem. 4 (2000) 931-943.

Proteiny při vzniku života

Peptidové nukleové kyseliny (PNA)

- V PNA je oproti RNA nahrazena kostra z ribózy a fosfátu N-(2-aminoethyl) glycinem (AEG)
- Báze nukleových kyselin jsou připojeny k AEG pomocí karboxylové skupiny
- Syntéza PNA musí probíhat odlišně od proteinů a nukleových kyselin (ale s podobnými stupni reakcí)

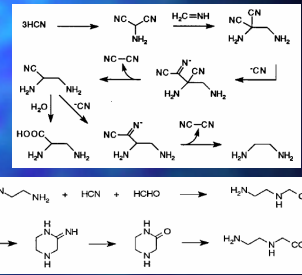


K. E. Nelson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000) 3868-3871.

Proteiny při vzniku života

Peptidové nukleové kyseliny (PNA)

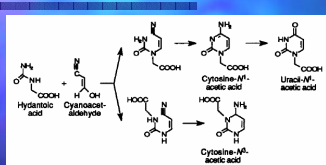
- Reakce vedoucí ke vzniku kostry PNA, tj. k AEG
- V prvním kroku vzniká z HCN a NH_3 kyselina 2,3-diaminopropionová a ethylendiamin (probíhá za teplot 80–100 °C, v řádech desítek hod.). Jako boční produkt vzniká kyanogen.
- Ethylendiamin může dále reagovat standardní Steckerovou reakcí za vzniku AEG



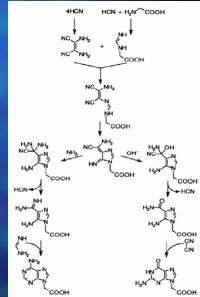
K. E. Nelson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 97 (2000) 3868-3871.

Proteiny při vzniku života

Peptidové nukleové kyseliny (PNA)



- Vznik pyrimidin-N¹-karboxylové kyseliny z kyseliny hydantoinové a kyanoacetaldehydu
- Vznik purin-N⁹-karboxylové kyseliny z HCN a glycinu

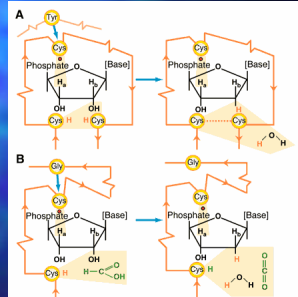


K. E. Nelson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 97 (2000) 3868-3871.

Proteiny při vzniku života

Předcházely proteiny vznik DNA?

- RNA obsahuje ribonukleotidy, DNA deoxyribonukleotidy → potřeba tvorby deoxyribonukleotidů
- Tvorby se neúčastní RNA, ale pouze enzym ribonukleotid reduktáza (RNR)
- Ukazuje se, že RNR je ve všech organizmech vysoce konzervována (podařilo se prokázat pro vzdálené třídy A) RNR I a B) RNR III)
- Proteiny musely být minimálně součástí světa RNA a předcházet vzniku DNA

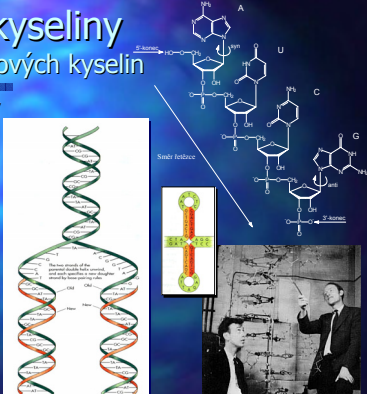


S. J. Freeland et al., Science 285 (1999) 690-692.

Nukleové kyseliny

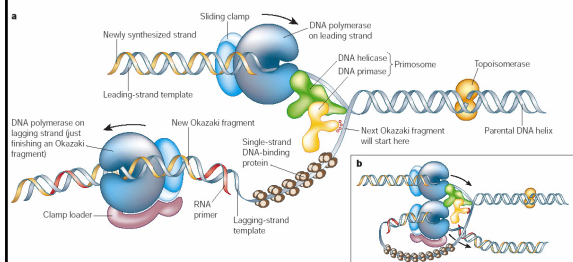
Struktura nukleových kyselin

- 1953 – objev struktury DNA (J. Watson, F. Crick – Nobelova cena spolu s M. Wilkinsem 1962, podíl patří i R. Franklinové)
- 1958 – semikonzervativní replikace DNA (Messelson, Stahl)
- DNA a RNA jsou polymerní molekuly
 - Pravotočivá A, B
 - Levotočivá Z
 - Vláseňková
 - Triplex
 - G-kvadruplex



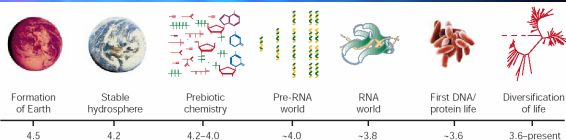
Nukleové kyseliny

Replikace DNA



Svět RNA

Biochemické epochy světa

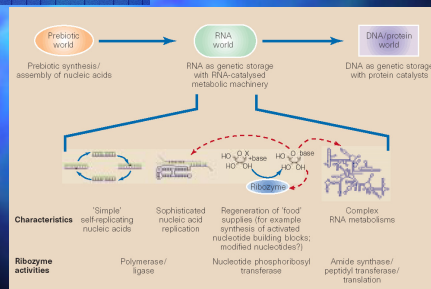


Časová škála událostí na ranné Zemi. Udáno v Gy před současností. Vyznačení událostí je přibližné a RNA svět je třeba posunout hlouběji do minulosti.

G. F. Joyce, Nature 418 (2002) 214-221.

Svět RNA

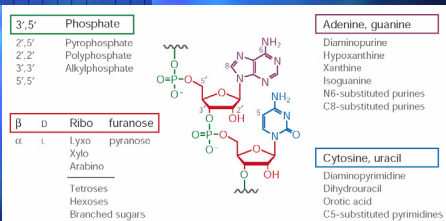
Biochemické epochy RNA světa



M. P. Robertson and A. D. Ellington, Nature 395 (1998) 223-225.

Svět RNA

Alternativní systémy k RNA

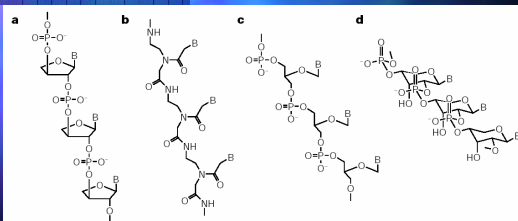


Změť molekul jež byly k dispozici pro tvorbu RNA světa. Rozdílné barvy udávají čtyři základní komponenty potřebné pro tvorbu RNA. Seznam možných analogů je udán pod základní složkou. Analogy lze prakticky libovolně kombinovat do funkčních celků, sic!

G. F. Joyce, Nature 418 (2002) 214-221.

Svět RNA

Alternativní systémy k RNA



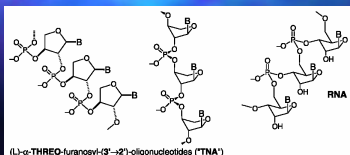
Možní kandidáti na předchůdce RNA v rané historii Země. a) threosová nukleová kyselina, b) peptidová nukleová kyselina, c) analog nukleové kyseliny odvozený od glycerolu, d) pyranosyl RNA. B – značí nukleotidovou bázi.

G. F. Joyce, Nature 418 (2002) 214-221.

Svět RNA

Alternativní systémy k RNA

- Vzhledem k nestabilitě ribosy je vhodné nahradit cukr za jiný, např. pyranosu (6) či furanosu (5)
- TNA a jiné cukerní modifikace vykazují podobné hybridizační vlastnosti jako RNA či DNA a vytváří s nimi i heteroduplexy (viz. teploty tání dané v tabulce), většinou mají větší strukturní flexibilitu

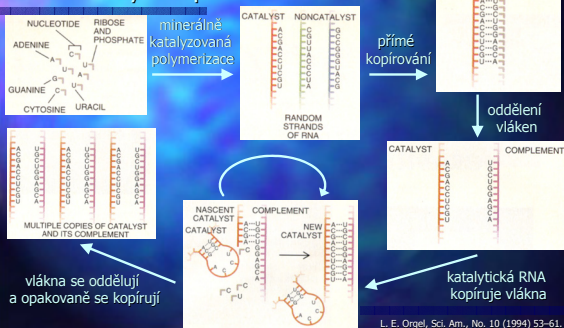


	TNA	RNA	DNA	
TNA	42 56 53 31	28 57 47 39	32 47 43 25	A B C D
RNA	78 58 50 41	62 59 57 52	59 44 40 36	A B C D
DNA	68 41 36 26	47 43 41 35	65 48 43 36	A B C D

K.-U. Schöning et al., Science 290 (2000) 1347-1351.

Svět RNA

První kroky k replikaci

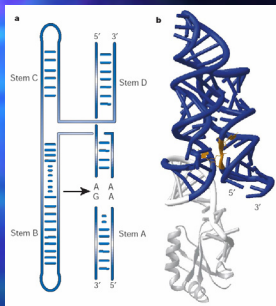


L. E. Orgel, Sci. Am., No. 10 (1994) 53-61.

Svět RNA

Kdo je rybozym?

- RNA molekula má klíčové postavení v centrálním dogmatu molekulární biologie
- RNA s katalytickou funkcí se nazývá rybozym
- Rybozymy vytvářely primitivní svět života
- Existovaly RNA organismy, ale evoluční stopy byly již zaházeny – vzpomínka na RNA svět ale zůstala...



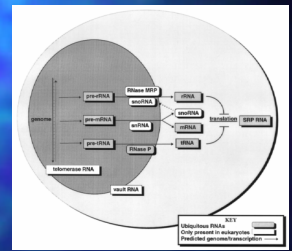
Struktura vlásečkového rybozymu. Důležité nukleotidy účastnící se sestřihu jsou zvýrazněny. (Protein je kokrytalizován.)

J. A. Doudna & T. R. Czech, Nature 418 (2002) 222–228.

Svět RNA

Co všechno umí RNA?

- RNA má stále informační, autokatalytickou a katalytickou funkci (na rozdíl od DNA)
- Syntézy telomer – telomerová RNA
- Přenosu genetické informace – mRNA
- Přenosu aminokyselin – tRNA
- Syntézy bílkovin – rRNA
- Hydrolyzy prekurzorů RNA – RNase P
- Samosestřihu intronů

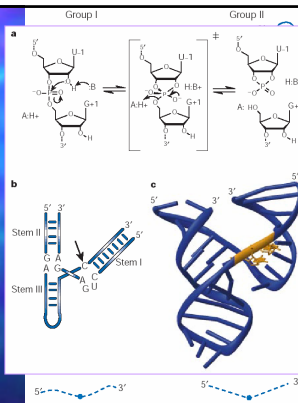


J. A. Doudna & T. R. Czech, Nature 418 (2002) 222–228.

Svět RNA

Viděl někdo rybozym?

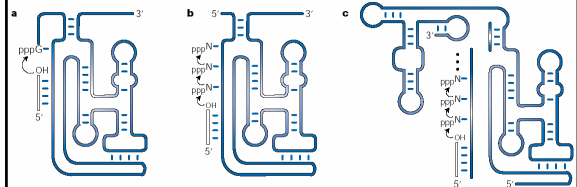
- Thomas Cech (Nobelova cena 1989) objevil samosestřiznost intronů u prvoka *Tetrahymena thermophila* v roce 1982
- U skupiny I je sestřih katalyzován GTP
- U skupiny II je sestřih veden přes A 2'-hydroxylovou skupinu
- RNA katalyzovaný samosestřih skupiny II provádí např. tzv. hammerhead ribozym



J. A. Doudna & T. R. Czech, Nature 418 (2002) 222–228.

Svět RNA

Evoluce rybozymů – polymeráz



In vitro evoluce rybozymu RNA polymerázy. a) rybozym katalyzuje templátem řízené připojení 3'-konce RNA primeru k 5'-konci rybozymu, b) katalyzuje připojení pppN na 3'-konec RNA primeru (urychlení $\sim 10^3 \times$), c) katalyzuje připojení 14 NTP k externímu RNA templátu.

G. F. Joyce, Nature 418 (2002) 214–221.

Svět RNA

Evoluce rybozymů – polymeráz

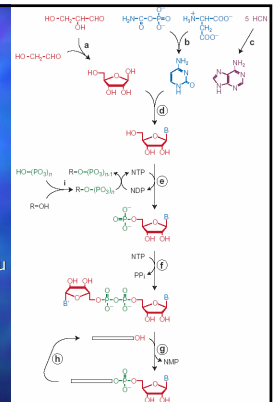
- Rybozymy lze vyvíjet uměle in vitro
- Předchozí fáze jsou známy pro rybozym ligázu třídy I
 - Fáze a) je ~ 120 -mer, pracující rychlostí 100 reakcí/min
 - Fáze c) je ~ 200 -mer, který připojí 14 nukleotidů za 24 hod., s přesností 97 %
- Přesnost kopírování musí být lepší než 1/délka sekvence, tj. pro 100-mer 99%, pro 40-mer 97,5% - takové rybozymy nejsou dosud známy...
- Pouze malá část variant RNA má katalytickou funkci!
 - Pro RNA o délce 100 nukleotidů vychází 4^{100} možných sekvencí – seskupení všech takových RNA má hmotnost ca. $10^{13} \times$ větší než Země...
 - Pro RNA o délce 40 nukleotidů vychází hmotnost ca. 40 kg

G. F. Joyce, Nature 418 (2002) 214–221.

Svět RNA

Metabolické funkce

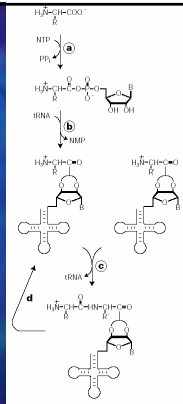
- Hypotetická cesta RNA katalyzované syntézy RNA
- a) aldolová kondenzace glycerinaldehydu a glykolaldehydu vedoucí k ríose
- b) přenos karbamoylu z karbamoyl fosfátu na aspartát a cyklizace formující pyrimidin
- c) pentamerizace HCN za vzniku purinu
- d) vytvoření nukleosidu
- e) fosforylace (minerální zdroj) nukleosidu na nukleotid
- f) aktivace nukleotidu NTP
- g) připojení nukleotidu na 3'-konec RNA primeru
- h) prodlužování RNA (NDP je recyklováno v kroku e)



G. F. Joyce, Nature 418 (2002) 214–221.

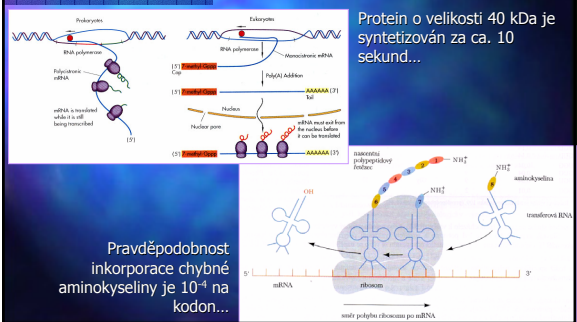
Svět RNA Metabolické funkce

- **Hypotetická cesta RNA-katalyzované syntézy proteinů**
- a) aktivace aminokyseliny formováním aminoacyl-nukleotid anhydridu
- b) přenos aktivované aminokyseliny na 2' (3')-konec tRNA (aminokyselina může snadno migrovat mezi oběma pozicemi)
- c) přenospeptidu vedoucí k formování dipeptidu. Dvě aminoacyl-tRNA jsou blízko u sebe vázány na komplementárním tmplátu
- d) postupné opakování cyklu vede k formování polypeptidu

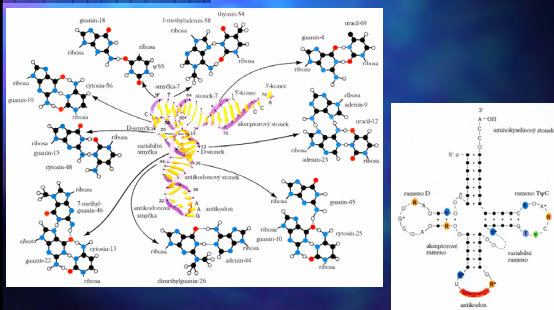


G. F. Joyce, Nature 418 (2002) 214-221.

Genetický kód je když... Jak se staví protein

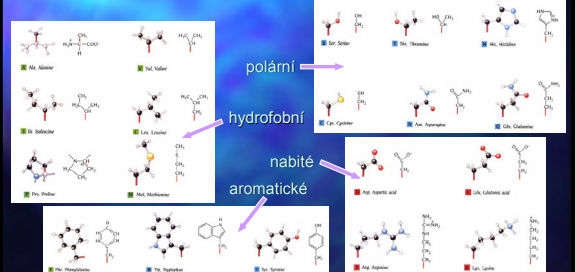


Genetický kód je když... K čemu je dobrá tRNA



Genetický kód je když... Standardní sada 20 aminokyselin?

- 21 aminokyselinou je selenocystein (přítomná od Archae po savce)
- 22 aminokyselinou je pyrrolysine (z r. 2002 výskyt v Archae a Eubacteria)



Genetický kód je když...

	U	C	A	G	
První pozice	U	Fenylalanin	Serin	Tyrosin	Cystein
				STOP	STOP
	C	Leucin	Prolin	Histidin	Tryptofan
				Glutamin	Arginin
A		Izoleucin	Treonin	Asparagin	Serin
		Metionin		Lysin	Arginin
G		Valin	Alanin	Kys. asparag.	Glycin
				Kys. glutam.	

Genetický kód je když... Je genetický kód univerzální?

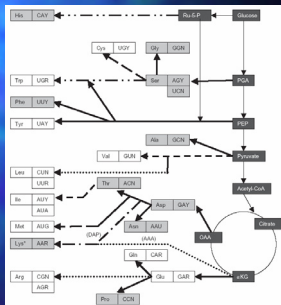
- Standardní kód je velmi rozšířený, ale ne zcela univerzální!
- Genetický kód mitochondrií a některých nálevníků se liší (objev na základě sekvenačních studií DNA v roce 1981)
- V nálevnicích specifikují kodony **UAA** a **UAG** kyselinu glutamovou a nikoliv **Stop**

Mitochondrie	UGA	AUA	CUN	AGA	CGG
Standardní kód	Stop	Ile	Leu	Arg	Arg
Savčí	Trp	Met		Stop	
Pekařské kvasinky	Trp	Met	Thr		?
Neurospora crassa	Trp				?
Drosophila	Trp	Met		Ser	
Prvoci	Trp				
Rostliny	Trp				

Genetický kód je když...

Vznik a vývoj genetického kódu

- Známosti biochemických drah syntézy aminokyselin
- Aminoacyl-tRNA synthetasy (aaRSs) se podílí na připojení aminokyselin na tRNA (dělí se na I – bílé a II třídu - šedě)
- Vývoj kódu je závislý na
 - Biosyntetické dráze aminokyselin
 - Relativním obsahu GC v kodonu
 - Příslušnosti k třídě aaRSs
- První kód obsahoval Ala, Gly, Ser, Asp, Glu, (Val) důležité při tvorbě β -sheetu



L. Kilpican and M. Saffro, J. Theor. Biol. 228 (2004) 389–396.

Genetický kód je když...

Vznik a vývoj genetického kódu

Aminokys.	Třída	G,C kódon	G,C,A kódon	G,C,A,U kódon	No. reakcí
Gly	I	GGC, GGG			1
Ala	II	GGC, GGG			1
Pro	II	CCG, CCG			1
Arg	I	CGC, CGG			8
Asp	II		GAC		1
Asn	II		AAC		1
Thr	II		ACC, ACR		5
Ser	II		AGG		3
His	II		CAC		10
Lys	II+I		AAR		9
Glu	I		GAR		2
Gln	I		CAR		2
Phe	II			UUY	10
Tyr	I			UAY	10
Trp	I			UGG	1
Ile	I			AUA, AUU	5
Leu	I			UUR, CUN	8
Val	I			CUN	4
Met	I			AUG	7
Cys	I			UGY	2

L. Kilpican and M. Saffro, J. Theor. Biol. 228 (2004) 389–396.

Genetický kód je když...

Vývoj genetického kódu

- Prvotní kód obsahoval pouze NAIN sekvenci a aminokyseliny důležité při fixaci amoniaku
- Šipky označují biosyntetické dráhy
- ΔF_T značí průměrnou přenosovou energii, tj. míru hydrofobicity

STAGE 2	5' ↓	A	C	G	U	3' ↓
G		Asp ²				Y
		Glu ²				R
A		Asn ²				N
C		Gln ²				N
U		Ter				N
ΔF_T	6.6					

B. K. Davis, Prog. Biophys. Mol. Biol. 72 (1999) 157–243.

Genetický kód je když...

Vývoj genetického kódu

STAGE 4	5' ↓	A	C	G	U	3' ↓
G		Asp ²	Ala ⁴		Val ⁴	Y
		Glu ²				R
A		Asn ²		Ser ⁴		N
C		Gln ²	Pro ⁴			N
U		Ter	Ser ⁴			N
ΔF_T	6.6	-0.7	-0.6	-2.6		

B. K. Davis, Prog. Biophys. Mol. Biol. 72 (1999) 157–243.

Genetický kód je když...

Vývoj genetického kódu

STAGE 6	5' ↓	A	C	G	U	3' ↓
G		Asp ²	Ala ⁴	Gly ⁵	Val ⁴	Y
		Glu ²				R
A		Asn ²	Thr ⁶	Ser ⁴		N
C		Gln ²	Pro ⁴			N
U		Ter	Ser ⁴	Cys ⁶		N
ΔF_T	6.6	-0.8	-1.7	-2.6		

B. K. Davis, Prog. Biophys. Mol. Biol. 72 (1999) 157–243.

Genetický kód je když...

Vývoj genetického kódu

- Prvotní kód byl postupně doplňován v závislosti na složitosti syntézy a potřebných vlastnostech
- Přibýly základní aminokyseliny
- Jako poslední byly doplněny aminokyseliny s aromatickým postranním řetězcem
- Šipky označují biosyntetické dráhy
- ΔF_T značí průměrnou přenosovou energii, tj. míru hydrofobicity

STAGES 9 – 14	5' ↓	A	C	G	U	3' ↓
G		Asp ²	Ala ⁴	Gly ⁵	Val ⁴	Y
		Glu ²				R
A		Asn ²	Thr ⁶	Ser ⁴	Ile ⁷	Y
		Lys ¹⁰		Arg ⁹	Met ⁷	R
C		His ¹⁰	Pro ⁴	Arg ⁹	Leu ¹¹	Y
		Gln ²				R
U		Tyr ¹¹	Ser ⁴	Cys ⁶	Phe ¹¹	Y
		Ter		Trp ¹⁴	Leu ¹¹	R
ΔF_T	5.5	-1.2	3.2	-3.1		

B. K. Davis, Prog. Biophys. Mol. Biol. 72 (1999) 157–243.

Genetický kód je když...

Vývoj genetického kódu

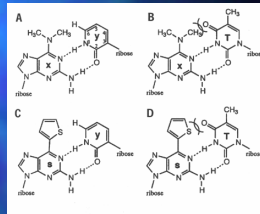
STANDARD CODE					
5' ↓	A	C	G	U	3' ↓
G	Asp ³ Glu ²	Ala ⁴	Gly ⁵	Val ⁴	Y
A	Asn ² Lys ¹⁰	Thr ⁶	Ser ⁴	Ile ⁷ Met ¹	Y
C	His ¹³ Gln ²	Pro ⁴	Arg ⁹	Leu ⁹	Y
U	Tyr ¹¹ Ter	Ser ⁴	Cys ² Trp ¹	Phe ¹¹ Leu ²⁰	Y

B. K.Davis, Prog. Biophys. Mol. Biol. 72 (1999) 157-243.

DNA jak ji neznáme

Modifikace genetického kódu a aminokyselin

- Expandovaný genetický kód
 - tRNA kódující jistou sekvenci je přiřazena nová aminokyselina
 - Inkorporují se modifikace pro biotechnologie v bakteriích i eukaryotech (např. o-methyl-Tyr, p-benzoyl-Phe, p-iodo-Tyr)
- Modifikovaný genetický kód
 - Ke kódu jsou přiřazeny nové vzájemně komplementární báze
 - Počet písmen se tak rozšíří a dále je možno pokračovat via expandovaný genetický kód



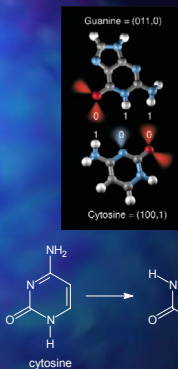
Nepřirozené párování x-y a x-s, a v důsledku sterického bránění nerozpoznávána spojení x-T a s-T

I. Hirao et al. Nature Biotech. 20 (2002) 177-182. J. W. Chin et al. Science 301 (2003) 964-967.

DNA jak ji neznáme

Je kód zvolen optimálně?

- Na základě teorie informace (donor = 1, akceptor = 0, purin = 0, pyrimidin = 1) lze ukázat, že volba A-T a G-C je optimální s ohledem na informační šum
- Náhrada U za T je v DNA nezbytná
 - C přechází v U deaminací, tato změna je nerozlišitelná
 - Tedy RNA musela předcházet DNA

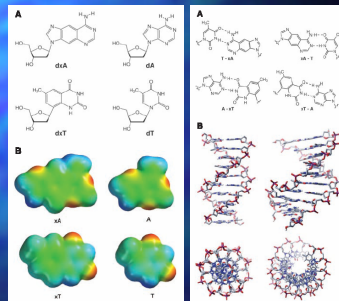


D. Bradley, Science 297 (2002) 1789-1791.

DNA jak ji neznáme

Expandovaná DNA

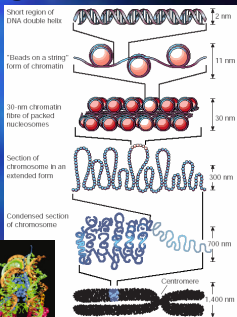
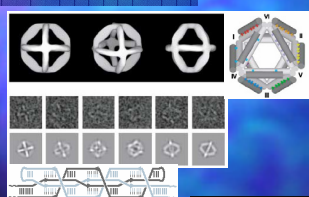
- Modifikované báze vznikají přidáním jednoho aromatického kruhu navíc
- Báze si zachovávají své vlastnosti
- Expandovaná DNA je mnohem stabilnější než DNA „klasická“
- Hybrid i čistá forma expandované DNA je plně funkční
- Neexistuje žádné známé omezení na užití expandované DNA



H. Liu et al. Science 302 (2003) 868-871.

DNA jak ji neznáme

Jak skladovat DNA?



DNA (1700 bp) o určité sekvenci je schopna spontánního složení do oktameru s průměrem 22 nm

W. Shih et al. Nature 427 (2004) 618-621.

Život jak ho neznáme

Je život opravdu tak jednoduchý fenomén?

- „Průměrný protein“ má 200 aminokyselin
- Počet všech kombinací aminokyselin je 20^{200} , tj. zhruba 10^{600}
- Vesmír má 10^{81} částic
- Rychlá chemická reakce trvá 1 femtosekundu (10^{-15} s)
- Počet všech myslitelných párových srážek od velké třesky je $10^{80} \times 10^{80} \times 10^{13} = 10^{193}$
- Vesmír by potřeboval 10^{67} životů aby vytvořil všechny kombinace tohoto proteinu
- Vesmír se neopakuje – je nergodický...

