

# Evoluce ve zkumavce

## Co by teroristé neměli číst

**EDUARD  
KEJNOVSKÝ**

Může člověk napodobit evoluci? Můžeme ji urychlit nebo určovat její směr? Experimenty s evolucí ve zkumavce ukazují, že je to možné. Evoluce *in vitro* může být užitečným nástrojem studia evolučních mechanismů, které nemůžeme sledovat přímo, a retrospektivní pohled je často obtížný.

### Replikace DNA

Pokusy v laboratoři napodobující evoluci jsou založeny na dvou základních procesech – replikaci DNA a selekci. Základní vlastností živého systému je jeho schopnost replikovat se. Zákon života je neúprosný – co se nedokáže účinně replikovat, nepřežije. Replikovat DNA můžeme poměrně snadno i ve zkumavce. Biologové často při své práci používají metodu polymerázové řetězové reakce (PCR), kdy do zkumavky dají DNA, kterou chtějí namnožit, přidají enzym DNA polymerázu, nukleotidy potřebné pro tvorbu rostoucího řetězce DNA a trochu solí, aby zajistili vhodné prostředí. Výsledkem může být namnožený gen nebo dokonce veškerá DNA ve zkumavce, to pokud si půjčíme polymerázu od bakteriofága phi29.

Vraťme se ale k evoluci ve zkumavce. Pokud ve výše uvedené reakci použijeme DNA polymerázu, která dělá při replikaci často chyby při včleňování konkrétních nukleotidů, získáme populaci molekul DNA, které se vzájemně liší. A právě toho lze využít. Vědci se rozhodli najít úsek DNA, který se nejsilněji váže na nějakou jinou molekulu, například nějaký peptid či aminokyselinu. Smíchali proto populaci

rozličných molekul DNA s touto aminokyselinou a vychytili molekuly DNA, které se na aminokyselinu vázaly nejsilněji. Získanou subpopulaci DNA podrobili znovu chybující amplifikaci a následně vazbě na aminokyselinu a tento cyklus mnohokrát zopakovali. Výsledkem byl úsek DNA, který se velmi silně vázal na danou aminokyselinu. Popsaný postup je znám pod zkratkou SELEX (viz slovníček) a byl velmi populární v devadesátých letech (obr. 1). Molekuly DNA nebo RNA získané selexem se označují jako aptamery a využívají se pro vědecké, průmyslové i terapeutické účely. Byly získány aptamery vážící například trombin, interferon, PSA (prostate specific antigen) nebo dopamin.

### Bakteriofág Q $\beta$

Krásným příkladem selekčních procesů ve zkumavce jsou dávné experimenty Sola Spiegelmana s bakteriofágem Q $\beta$ , které měly vědcům napovědět více o počátcích života a prvních replikátorech na bázi RNA (viz „Relikty světa RNA“, Vesmír 92, 78, 2014/2). Zejména ho zajímalo, zda se bude genom fága v průběhu experimentu nějak vyvíjet. V šedesátých letech, kdy Spiegelman experimenty prováděl, nebyla známa polymerázová řetězová reakce (PCR) umožňující amplifikaci v jedné zkumavce. Bylo nutné po každé replikaci odebrat část vzorku a přenést ho do další zkumavky, kde byla čerstvá RNA replikáza a nukleotidy. Co bylo výsledkem pokusu? Během přenosů se genom fága neustále zmenšoval, selekce preferovala rychleji se replikující, tedy kratší genomy. Po 74 generacích (přenosech) se původní RNA genom fága Q $\beta$  o velikosti 4500 nukleotidů zmenšil na pouhých několik desítek nukleotidů. Co bylo největším překvapením? Vyselektovaný úsek odpovídal vazebnému místu pro RNA replikázu. Ano, tím nejdůležitějším místem genomu byla tajemná vlásenka, která se normálně nachází na konci fágové RNA a určuje začátek replikace. Tato struktura byla vědci označena jako „Spiegelmanovo monstrum“. Následující experimenty „nutily“ fága Q $\beta$  k replikaci v přítomnosti různých selekčních činidel, například jedů. Spiegelmanovi pokračovatelé dokonce provedli amplifikaci v nepřítomnosti RNA genomu fága Q $\beta$  a zjistili, že i tehdy ve zkumavce vznikne spontánně se replikující úsek RNA odpovídající vazebnému místu pro replikázu – tedy „Spiegelmanovo monstrum“.

Doc. RNDr. Eduard  
Kejnovský, CSc., viz Vesmír  
93, 78, 2014/2.

### SLOVNÍČEK

**SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment)** – metoda označovaná také jako „evoluce *in vitro*“ nebo „selekce *in vitro*“, kdy se „chybující“ replikací ve zkumavce vytvoří heterogenní populace molekul DNA nebo RNA a následnou selekcí získávají molekuly DNA nebo RNA, které se silně vážou na určité ligandy, např. aminokyseliny.

**Polymerázová řetězová reakce (PCR)** – metoda, kterou se ve zkumavce pomocí termostabilní polymerázy namnoží vybraný úsek DNA. Při opakovaném zahřívání a ochlazení, během nichž se oddělují (denaturují) a reasociují vlákna DNA („nasedání“ primerů), se syntetizují nové řetězce, v důsledku čehož počet vláken exponenciálně roste.

**Aptamer** – nukleová kyselina nebo peptid schopný silně se vázat k jiným molekulám (aminokyselinám, peptidům ap.). Získává se selekcí ve zkumavce metodou SELEX.

**Bakteriofág (zkráceně „fág“)** – virus napadající bakterie (Vesmír 92, 204, 2013/4). Jeho genom tvoří DNA nebo RNA. Má minimální genetické vybavení potřebné pro vstup do bakterie, replikaci genomu a syntézu bílkovin vlivové kapsidy i nezbytných enzymů uvnitř bakterie a k opuštění bakteriální buňky.

Z trochu jiného soudku jsou experimenty snažící se „řízenou evolucí“ připravit bakterie se zvýšenou rezistencí k antibiotikům. Třebaže tyto experimenty patří spíše do genového inženýrství a biotechnologie, mohou objasnit řadu molekulárních mechanismů uplatňujících se v evoluci DNA. Vědci vzali několik genů (cefalosporinázové geny) zodpovědných za rezistenci k moxolactamu ze čtyř druhů bakterií. Nastříhali tyto geny na kousky, promíchali je a znovu spojili. Vznikla směs různých chimérických genů, představujících kombinace genových fragmentů, kterou vložili do bakterie a sledovali míru rezistence. Podařilo se jim vyselektovat mutantní bakterie, které měly více než 500krát vyšší rezistenci oproti původním kmenům. Právě touto cestou tvorby pomocí „modulů“ často kráčí evoluce, když podobně jako při hře s dětskou stavebnicí Lego dochází k přeskupování celých úseků DNA.

### Genová terapie

Selekce ve zkumavce se používá i při genové terapii. Častým nástrojem k vnášení genů do lidského genomu jsou adenoviry. Metodou SELEX lze upravit povrchové bílkoviny adenovirů tak, že jsou odolné vůči lidským protilátkám. Imunitní systém pak viry nezničí a je naděje, že požadovaný gen bude vložen do lidského genomu. Pouhým několikatýdenním experimentem, proveditelným v běžné laboratoři, lze připravit viry, proti nimž člověk nemá obranu, a navíc lze těmto virům podstrčit i další geny. Nesnažme se domyslet, co by se stalo, kdyby se tento nástroj dostal do rukou bioteroristů.

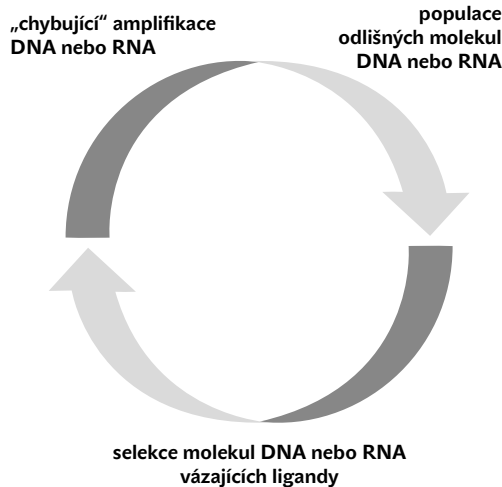


Schéma experimentu SELEX, kdy se opakují fáze amplifikace a selekce nukleových kyselin nejsilněji se vážících na určité ligandy.

Výše uvedené příklady dokládají, že vědci jsou schopni napodobovat evoluci. Ve zkumavce imitují věčný koloběh, jehož součástí je tvorba variability, následná selekce a namnožení nejúspěšnějších prvků. Díky popsaným experimentům nejen lépe pochopíme zákonitosti evoluce, ale můžeme ji také ovlivňovat. Jak dlouhá je cesta od zkumavky k přírodnímu prostředí? Má člověk právo urychlovat či směřovat evoluci? Domnívám se, že ano. Vždyť odpradáвна přetváříme okolní přírodu ke svému užitku v podobě šlechtitelských zářahů. Člověk je přece součástí složité sítě života, která je evolucí utkána. Člověk je *uvnitř* tajemné hry života. Zvědavost a tvořivost je inherentní lidskou vlastností. Proto budou vědci stále provádět podobné pokusy, třebaže ti obezřetnější z nich budou upozorňovat i na možná nebezpečí...

## Křehké vztahy atomů helia

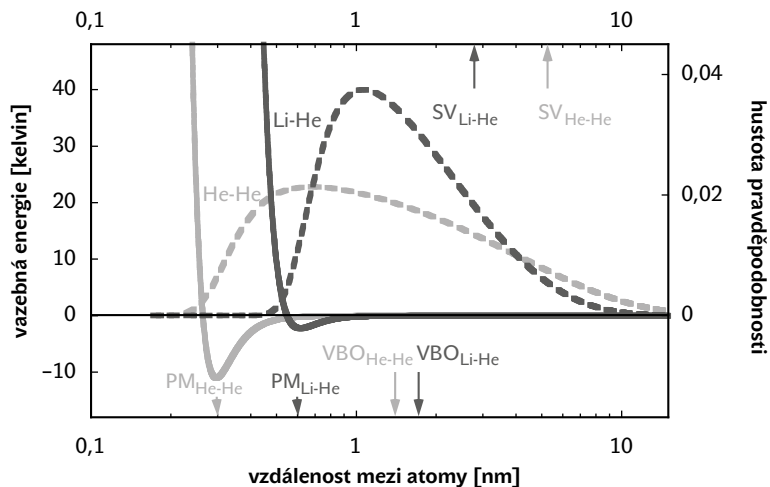
Elektroneutrální atomy či molekuly mohou vstoupit do tří druhů svazků, lišících se silou vazby, která je spojuje (mírou síly vazby je vazebná energie, tj. energie, kterou by bylo třeba vynaložit na roztržení vazby). Zatímco vazebná energie chemicky spojených atomů odpovídá řádově stovce kilokalorií na mol, tzv. vodíková vazba (např. mezi molekulami vody) je o řád nebo dva slabší. Ještě slabší jsou van der Waalovy síly, které jsou důsledkem vzájemné přitažlivosti mezi elektrickými dipóly atomů či molekul. Energie van der Waalovy vazby se obvykle vyjadřuje v kelvinech (energie vydělená Boltzmannovou konstantou; jedna kilokalorie na mol odpovídá zhruba čtyřem stům kelvinům). Nejslabší odrůda van der Waalových sil – tzv. disperzní síly – jsou důsledkem atrakce vzájemně indukovaných elektrických

dipólů atomů a molekul a nesou spoluodpovědnost např. za vznik klastrů a kondenzaci vůbec, jakož i za fyzisorpci. Jejich energie dosahuje řádově jednotek kelvinů.

Disperzní síly byly poprvé analyzovány v roce 1930 Fritzem Londonem, který ukázal, že jsou důsledkem kvantově mechanických korelací mezi pohybem elektronů ve dvou či více různých atomech (nebo molekulách) při velkých vzdálenostech. Úměrné polarizabilitě (tj.

**BŘETISLAV  
FRIEDRICH**

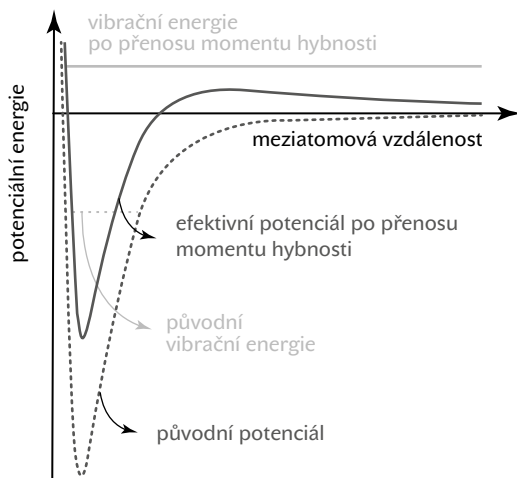
Prof. RNDr. Břetislav Friedrich, CSc., (\* 1953) studoval na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze, aspiranturu absolvoval v Heyrovského ústavu Akademie věd. V letech 1986–1987 působil v Ústavu Maxe Plancka v Göttingenu, v letech 1987–2003 na Harvardově univerzitě a od roku 2003 v Ústavu Fritze Habera Společnosti Maxe Plancka v Berlíně, kde se zabývá zejména interakcemi molekul s elektrickými, magnetickými a optickými poli. V roce 2011 byl zvolen čestným členem Učené společnosti České republiky. Od roku 2013 je editorem časopisu *Frontiers in Physical Chemistry and Chemical Physics* a knižní edice *Alexander von Humboldt Lectures* (Springer).



1. Závislost energie vzájemného působení (potenciálu) dvojice atomů helia (světlá křivka) a atomů helia a lithia (tmavá křivka) na vzdálenosti mezi atomy příslušné dvojice (škála nalevo) spolu s hustotou pravděpodobnosti (škála napravo) nalezení dané dvojice atomů při určité meziatomové vzdálenosti (přerušované křivky – světlá pro He<sub>2</sub> a tmavá pro LiHe). Šípky označují hodnoty polohy minima (PM) potenciálu, střední hodnoty meziatomové vzdálenosti (SV) i vnější body obratu (VBO) na příslušných potenciálech. Poznamenejme, že vazebná energie He<sub>2</sub> (1 mK) a LiHe (6 mK) je v měřítku obrázku menší než tloušťka čáry použité k zobrazení disociační meze (odpovídající nulové vazebné energii). Výpočty provedl Brett Esry (Kansaská státní univerzita).

deformovatelnosti elektronového obalu atomu či molekuly vnějším elektrickým polem) jsou Londonovy disperzní síly obzvláště slabé v případě atomů helia (He; polarisabilita atomu helia je nejmenší ze všech atomů v základním stavu), které se proto vyhýbají svazkům s jinými atomy, ať už helia nebo jiných prvků, např. lithia (Li). Na druhou stranu činí zcela zaplněná elektronová slupka atomu helia natolik kompaktním, že minimální vzdálenost, na kterou si atom helia připustí k tělu jiný atom (buď helia, nebo jiného prvku), je tak malá, jak to druhý atom dovolí. Ze všech možných atomových kombinací je tedy nejmenší právě pro pár He-He. Důsledkem je, že přitažlivé Londonovy disperzní síly, které rostou nepřímo úměrně s šestou mocninou meziatomové vzdálenosti, mají v případě dimeru helia (He<sub>2</sub>) příležitost dosáhnout poměrně velké hodnoty ještě předtím, než jsou přemoheny odpudivými silami při malých meziatomových vzdálenostech.

Tato soutěž mezi atrakcí a repulzí propůjčuje He<sub>2</sub> jediný křehký vázaný stav, jehož



2. „Zatřesení“ molekulou vázanou původním potenciálem (tmavá přerušovaná křivka) v původním vibračním stavu (horizontální světlá přerušovaná čára) vede k přenosu momentu hybnosti, který modifikuje původní potenciál a vytvoří potenciál efektivní. Při přenosu dostatečně velkého momentu hybnosti je původní vibrační hladina vytlačena z potenciálu (světlá horizontální čára) a molekula se rozpadne (disociace).

energie leží jen 1 milikelvin pod disociační mezí (obr. 1). Není proto divu, že demonstrovat existenci He<sub>2</sub> v laboratoři si vyžádalo úsilí trvající několik desetiletí. Pátrání po dimeru helia bylo završeno r. 1994, kdy Peter Toennies a Wieland Schöllkopf z Ústavu Maxe Plancka v Göttingenu využili ternárních srážek v supersonickém heliovém molekulovém paprsku  $\text{He} + \text{He} + \text{He} \rightarrow \text{He}_2 + \text{He}$  k „přípravě“ dimeru helia a následně použili jeho vlnové vlastnosti při difrakci tohoto paprsku na transmisní nanomřížce k jeho identifikaci. Poznamenejme, že úkolem třetího atomu He v ternární srážce je odnést přebytečnou energii a moment hybnosti.

Prokázat existenci další dvouatomové molekuly obsahující helium LiHe trvalo bezmála dvě desetiletí. Důkaz o existenci LiHe se podařilo podat v roce 2013 skupině Jonathana Weinsteina na Nevadské univerzitě v Reno, která použila odlišné metody než předtím Toennies a Schöllkopf, a to jak na přípravu, tak i na detekci polárního paramagnetického radikálu LiHe. Místo aby se Weinstein a spol. spoléhali na molekulové paprsky, použili metodu chlazení studeným heliovým nárazníkovým plynem, vyvinutou Johnem Doylem a spolupracovníky na Harvardově univerzitě. Ti vyvinuli metodu mimo jiné ke studiu kinetiky vzniku van der Waalsových molekul – úsilí, které vedlo k nepřímému důkazu existence radikálu AgHe (atom stříbra agregovaný s atomem helia v základním stavu) a přímo inspirovalo práci Weinsteina a spolupracovníků zaměřenou na LiHe.

Ti připravili LiHe prostřednictvím studených ternárních srážek mezi atomy lithia a helia  $\text{Li} + \text{He} + \text{He} \rightarrow \text{LiHe} + \text{He}$ . Atomy lithia byly vpraveny do plynného helia pomocí laserového odpaření (ablace) kovového lithia. Plynné helium bylo udržováno při kryogenní teplotě (několika kelvínů) termálním kontaktem s heliovým kryostatem. Klíčovou ingrediencí experimentu Jonathana Weinsteina a spol. byla spektroskopická detekce křehkého radikálu LiHe, jehož vyšší elektronické stavy (podobné elektronickým stavům atomu lithia) lze vzbudit laserovým zářením ve snadno dostupné viditelné oblasti elektromagnetického spektra (671 nm). Získané spektrum LiHe ukázalo, že při teplotě kryogenního helia je obsazen pouze jediný rotačně-vibrační stav LiHe. V následujícím kroku Weinstein a jeho spolupracovníci určili na základě teplotní závislosti opticky měřené hustoty LiHe vazebnou energii tohoto rotačně-vibračního stavu: 6 milikelvínů. To znamená, že síla svazku lithia s heliem stačí jen na to, aby byl vázán pouze základní vibrační stav – bez možnosti molekulové rotace (první rotačně vzbuzený stav by měl energii 80 milikelvínů, tedy 74 milikelvínů nad disociační mezí). Podobná situace nastává v případě dimeru He<sub>2</sub>, který může také existovat pouze bez rotace (první rotačně vzbuzený stav by byl 180 milikelvínů nad disociační mezí).

Jednou z nejpozoruhodnějších vlastností dimeru He<sub>2</sub> je jeho velikost, daná střední vzdáleností atomů helia (přesněji jejich ja-

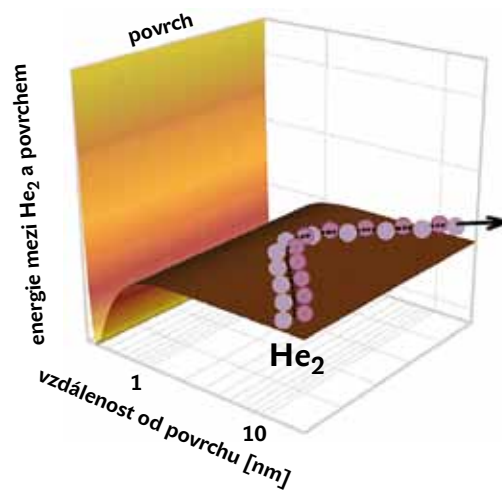
der, obr. 1). Ta obnáší zhruba 5 nanometrů, což činí  $\text{He}_2$  největší dvouatomovou molekulou (v základním elektronickém stavu), např. sedmdesátkrát větší, než je molekula vodíku  $\text{H}_2$ . Obří velikost  $\text{He}_2$  je způsobena jednak křehkostí vazby (vazba He-He je vůbec nejslabší známou vazbou – molekula vibruje téměř na prahu disociace, viz výše), jednak její malou hmotností. Přestože vnější bod obratu molekulové vibrace je pouhých 1,4 nm, dimer může díky své malé hmotnosti snadno tunelovat skrze bariéru danou vazebnou energií molekuly (která obnáší 1 milikelvin, viz výše). Důsledkem je, že se molekula většinou (z 80 %) nachází v klasicky zakázané oblasti za vnějším bodem obratu, jak je patrné z rozdělení hustoty pravděpodobnosti nalezení dvojice atomů helia molekuly  $\text{He}_2$  při dané meziatomové vzdálenosti (obr. 1).

Jak se chová LiHe? Díky své větší vazebné energii (šestinásobek hodnoty  $\text{He}_2$ ) a hmotnosti (jedenapůlnásobek hodnoty  $\text{He}_2$ ) je střední hodnota meziatomové vzdálenosti „jen“ 2,9 nm (obr. 1). Velikost LiHe by byla ještě menší, kdyby poloha minima potenciálu LiHe byla stejná, jako je u  $\text{He}_2$ . Minimum potenciálu LiHe je však posunuto k větším meziatomovým vzdálenostem (0,6 nm – zhruba dvojnásobek hodnoty pro  $\text{He}_2$ ) v důsledku méně kompaktní vazby elektronů Li ve srovnání s elektrony He a s tím související odpudivé interakce mezi atomy Li a He, která přemůže jejich přitažlivou interakci již při relativně velkých meziatomových vzdálenostech.

Současně je ale tato přitažlivá interakce – díky větší polarisabilitě lithia, a tím i větším Londonovým disperzním silám – dostatečně silná na to, aby vytvořila (i při těchto větších meziatomových vzdálenostech) potenciální minimum schopné vázat radikál LiHe. Podobně jako  $\text{He}_2$  tráví LiHe většinu svého života (zhruba 60 %) vně klasického bodu obratu (ten nastává při vzdálenosti 1,7 nm).

Za povšimnutí stojí – jak v případě  $\text{He}_2$ , tak i LiHe – rozdíl mezi polohou minima potenciálu a střední meziatomovou vzdáleností. Zatímco u typických molekul je tento rozdíl minimální, u tzv. halo molekul, jako je  $\text{He}_2$  a LiHe, je značný a svědčí o podstatné roli tunelování a o „životě“ halo molekuly v klasicky zakázané oblasti meziatomového potenciálu, kde je svazek jejich konstituentů ještě křehčí než jinde.

V naší laboratoři jsme vypracovali metodu, pomocí které lze přesně určit meziatomový potenciál halo molekul. Metoda je založena na „třesení“ molekulou prostřednictvím krátkého laserového pulsu (kratšího než vibrační perioda), který působí na (mírně anizotropickou) polarisabilitu halo molekuly a přeneše na ni moment hybnosti, úměrný intenzitě pulsu. Dostatečně intenzivní laserový puls molekulou „zatřese“ natolik, že se molekula rozpadne na atomy (obr. 2). Ze závislosti měřené pravděpodobnosti rozpadu (disociace) na intenzitě laserového pulsu lze pak obdržet hustotu pravděpodobnosti (prerušované křivky na obr. 1) a z ní přesnou hodnotu potenciálu.



Halo efekt je příkladem univerzality, tj. chování, které transcenduje konkrétní druh sil, a můžeme ho nalézt nejen v atomové, ale také např. v jaderné fyzice. Studium dalších dvou- a víceatomových van der Waalových molekul obsahujících atom či atomy helia se stává středem pozornosti fyziky vícečásticových soustav, včetně fyziky tzv. Jefimových stavů (připomínajících boromejské kruhy), které jsou dalším projevem univerzality. Dimer helia byl rovněž použit v elegantním experimentu na demonstraci tzv. kvantového odrazu, který provedli Bum Suk Zhao a Wieland Schöllkopf v Ústavu Fritze Habera v Berlíně (obr. 3). Paprsek  $\text{He}_2$  dopadající na pevný povrch při velmi nízké relativní rychlosti (paprsek byl poslán téměř rovnoběžně s povrchem) se odrazí ještě před dosažením povrchu, tj. při vzdálenostech, kdy interakce  $\text{He}_2$  s povrchem je ještě přitažlivá. Jako kdyby se tenisový míček odrazil ještě předtím, než dopadne na kurt. Na rozdíl od tenisového míčku křehké  $\text{He}_2$  by klasický odraz od povrchu (kde by na něj působily mnohem větší síly) nepřežilo. Studium halo molekul může též posloužit při objasňování retardačních jevů, které nastávají vlivem konečné hodnoty rychlosti šíření světla a jsou obzvláště zřetelné v případě páru vázaných, nicméně vzdálených atomů. V neposlední řadě poskytují slabě vázané halo molekuly možnost testovat přesnost kvantově chemických výpočetních metod.

**3. Kvantový odraz dimeru  $\text{He}_2$  od pevného povrchu (reflexní mřížky). Odraz nastane při vzdálenostech několika nanometrů nad povrchem, kde síly působící mezi dimerem  $\text{He}_2$  a povrchem jsou přitažlivé. Jev kvantového odrazu má optickou obdobu: paprsek světla dopadající na rozhraní dvou transparentních materiálů s odlišným indexem lomu se částečně odrazí – a to tím více, čím větší je změna indexu lomu na rozhraní. Přitom nezáleží na tom, zda index lomu na rozhraní roste či klesá (obdoba odpudivé či přitažlivé interakce). Obrázek adaptován z článku v Science 331, 892, 2011.**

*Tento článek věnuji s vděkem a radostí svému učiteli prof. Zdeňku Hermanovi při příležitosti jeho velkého životního jubilea. Zdeněk otevřel svým studentům dveře do světa. A nescíslným kolegům z celého světa dveře do Prahy! Zdeňku, všechno nejlepší!*

### K DALŠÍMU ČTENÍ

1. B. Friedrich: Proč jsou studené molekuly tak žhavé, *Chemické listy* 100, 256, 2006.
2. B. Friedrich: Chladnička místo laseru: alternativní cesta k Boseho-Einsteinovu kondensátu, *Československý časopis pro fyziku* 59, 354, 2009/6.
3. K. T. Tang, J. P. Toennies: Johannes Diderik van der Waals: A pioneer in the molecular sciences and Nobel Prize winner in 1910, *Angew. Chemie. Int. Ed.* 49, 9574, 2010.
4. W. Schöllkopf, J. P. Toennies: Nondestructive mass-selection of small van der Waals clusters, *Science* 266, 1345, 1994.
5. N. Tariq, N. Al Taisan, V. Singh, J. D. Weinstein: Spectroscopic detection of the LiHe molecule, *Phys. Rev. Lett.* 110, 153201, 2013.
6. H. Suno, B. D. Esry: Three-body recombination in cold heliumhelium-alkali-metal-atom collisions: *Phys. Rev. A* 80, 062702, 2009.
7. B. Friedrich: Kolotoč pro studené molekuly, *Vesmír* 91, 404, 2012/7–8.
8. M. Lemesko, B. Friedrich: Probing weakly-bound molecules with nonresonant light, *Phys. Rev. Lett.* 103, 053003, 2009.
9. Bum Suk Zhao, G. Meijer, W. Schöllkopf: Quantum reflection of  $\text{He}_2$  several nanometers above a grating surface, *Science* 331, 892, 2011.
10. C. H. Greene: Universal insights from few-body land, *Physics Today* 63, 40, 2010.