

významné zástupce rostlin, hub a živočichů. Jak vyplývá z vlastní geomorfologie Hřebečského hřbetu, jde o území dosti neschůdné (strmé svahy) a současně i poměrně nebezpečné (časté pády stromů nebo uvolněných balvanů, poddolované partie, nenápadné puklinové jeskyně). Pohyb mimo cesty nebo za špatného počasí při silném větru, za vytrvalého deště je opravdu jen na vlastní nebezpečí. V případě NPR Rohová je navíc možný pohyb pouze po hranicích rezervace, a to i co se týče většiny cest procházejících skrze chráněné území.

Nejlепším výchozím bodem je velké odstavné parkoviště v obci Hřebeč, odkud lze projít dva okruhy.

● Kratší severní okruh o délce 7–8 km vede po červené značce (stezka Via Czechia – Českomoravská) po západní hranici PR Hřebečovský les. Po červené dospějeme až k vyhlídce Nad doly, na kterou se paradoxně sestupuje po schodech dolů. Zde je velmi dobře patrná nestabilní hrana kuesty s oddělenými skalními opukovými bloky. Z vyhlídky se naskytne pohled na jižní část hřbetu s vrchem Roh jako jeho hlavní dominantou. Odtud pokračujeme po naučné stezce Hřebečské důlní stezky. Po 1 km se stezka rozděluje, přičemž se dáme vpravo a sestoupíme na úpatí kuesty. Kousek po svahu pod námi uvidíme úzkokolejnou železnici, po níž se vozil vytěžený materiál z dolů Hřebeč. Ze stezky odbočíme po neznámé cestě vpravo kousek před místem, než by naučná stezka křižovala

koleje. Po pravé straně mineme bývalý důl Gerhard (v provozu do r. 1961) a po chvíli se již ocitneme v areálu dolů Hřebeč. Budeme pokračovat rovně mezi chátrajícími budovami, až se otevře pohled vlevo, kde se nachází zmíněná měsíční krajina. Kromě exoticky působícího členitého reliéfu nabízí i výhled do Moravskotřebovské kotliny. Vzápětí dojdeme do serpentiny staré silnice do Moravské Třebové. Nyní se musíme vydat po silnici směrem z kopce (tím se vrátíme na naučnou stezku). Po 600 m odbočíme na lesní cestu vpravo, z níž po dalších 600 m odbočíme opět vpravo na cestu, která nás už dovede zpět na parkoviště.

● Delší jižní okruh čítající až 20 km obchází po jejích hranicích celou NPR Rohová, která se rozkládá na nejmohutnější části kuesty. Na tomto výletě se dočkáme poněkud jiného obrázku, než nabízí okruh severní. Jednak zde rychle utichne nepřetržitý hluk R35 a nenalezneme tak výrazné památky lidské činnosti (byť i zde v minulosti probíhaly průzkumné sondy, k těžbě ale nikdy nedošlo) s výjimkou stavu lesních porostů. Budeme kráčet liduprázdným hlubokým lesem, který místy ukáže pralesovitý ráz, a po cestě zpět po hraně kuesty se budeme obdivovat výhledům a opatrně našlapovat, když budeme chtít pohlédnout ze srázu dolů. Ze stejného parkoviště nyní vyrazíme na jih po naučné stezce Boršovský les. Po 500 m, kdy cesta vede v krátkém úseku skrz rezervaci, dojdeme na rozcestí, z něhož se vydáme vpravo stále po naučné stezce, která odsud kopíruje

východní hranici NPR. Po chvíli dojdeme na rozcestí U Vysokého Mostu, kde kuestu přetíná údolí Stříbrného potoka. Ze tří cest zvolíme tu prostřední, která dál lemujeme východní hranici NPR. Následuje zhruba 8,5 km pochod stále po hranici rezervace až k silnici spojující Pohledy a Křenov. Na ní odbočíme vpravo, abychom vzápětí odbočili vpravo ještě jednou. Lesní cesta nás po 500 m dovede k další odbočce vpravo na cestu, která se stáčí zpět k NPR a jde souběžně se západní hranicí rezervace. Po necelých 2 km se naše cesta setká s červenou značkou a lesní cyklostezkou. Pokračovat budeme po červené stále v těsné blízkosti hranice NPR. Na rozcestí, k němuž po chvíli dorazíme, si můžeme udělat odbočku k vrchu Roh (660 m n. m.), nejvyššímu bodu hřbetu, pak se vrátíme a půjdeme po červené značce něco přes 300 m. Následně odbočíme po lesní cestě, která se opět přibližuje hranicím rezervace a vede k vysílači nad obcí Kamenná Horka. Od vysílače pak míří neznámá stezka přímo zpět do obce Hřebeč, kde jsme na parkovišti okruh započali.

Těmito návrhy tras jsme samozřejmě neobsáhli celou kuestu a jistě stojí za to navštívit i další její části. Zejména PP Pod skálou, kde se může naskytnout v naší přírodě vzácný pohled na vzrostlé tisy, které místy vytvářejí téměř zapojený porost.

Použitou literaturu a mapu obou popsaných vycházkových okruhů najdete na webové stránce Živy.

Marian Novotný

K výuce

Tajemství tvarů – predikce 3D struktury proteinů

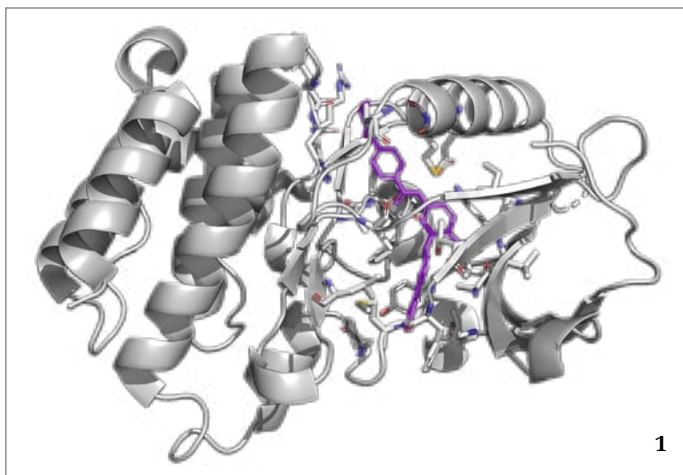
V 90. letech minulého století běžela v České televizi zábavná soutěž Kufr. Soutěžící měli jako jeden z úkolů uhodnout funkci předmětů, které zasílali diváci. Funkci hádali na základě vzhledu – předmět si mohli vzít do rukou, otočit nebo potěžkat. Tvar předmětů nezřídka stačil k tomu, aby jeho funkci poznali. Myšlenka pořadu však nebyla příliš originální, lidé se pokoušejí pochopit podstatu věcí skrze detailní pozorování jejich tvarů už celá staletí – např. jsou známy studie ptáčích křídel od Leonarda da Vinciho k pochopení létání. Studovat velké věci je často možné pouhým okem, ale už když se chceme podívat na detail složeného oka hmyzu, hodí se zvětšující lupa, a pokud budeme chtít vidět a porozumět, proč kontakt s kopřivou pálí a s hluchavkou ne, budeme k vizualizaci žahavého trichomu kopřivy potřebovat spíše mikroskop. Platí však, že znalost tvarů je užitečná pro pochopení jejich funkce i v případě úplně malých objektů, jako jsou makromolekuly vyskytující se uvnitř buněk?

Odpovědi na tuto otázku začaly přicházet velmi postupně v druhé polovině 20. století díky experimentálně nesmírně náročným metodám, jako jsou rentgenová krystalografie a nukleární magnetická rezonance,

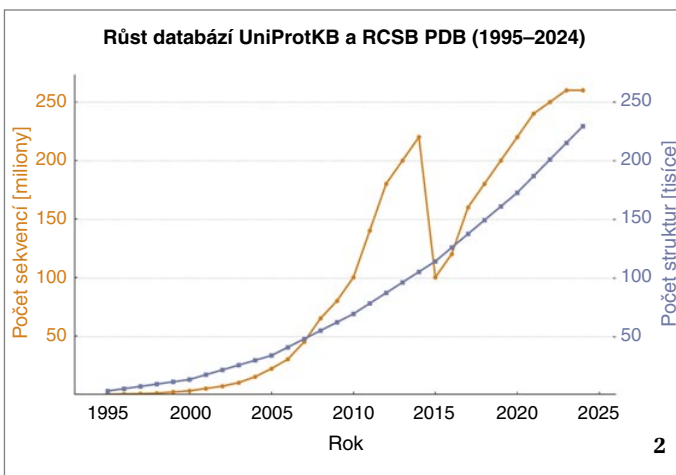
v poslední době i kryoelektronová mikroskopie. Tyto metody strukturní biologie nám umožnily nahlédnout dovnitř buněk a sledovat dokonce pozice jednotlivých atomů uvnitř proteinů – tedy terciární (3D)

strukturu proteinu. Proteiny jsou dynamické a mohou zaujmout více terciárních struktur, kterým říkáme konformace. Znalost terciární struktury nám pomáhá pochopit, jak dané proteiny nebo jiné molekuly a jejich komplexy fungují (o trojrozměrném uspořádání bílkovin a jeho významu viz i články K výuce v Živě 2020, 6: 282–285 a CXXXVIII–CXXXIX). Obrázek z rentgenové krystalografie molekuly DNA, který zachytila Rosalind Franklinová, vedl Jamese Watsona s Francisem Crickem k popisu struktury DNA, ale i k porozumění, jak může molekula DNA sloužit jako úložiště informace a jak je tato informace přesně kopírována z generace na generaci. Struktura proteinu ATPázy zase ukázala, jak buňka vyrábí ATP, a atomární struktury ribozomu naznačily, jak významnou roli hrají při vzniku peptidové vazby molekuly RNA. Za tyto objevy byly postupně udělovány Nobelovy ceny, stejně jako za rozvoj metod strukturní biologie a další zásadní objevy učiněné s přispěním těchto metod. Strukturní biologie dnes představuje rutinní metodu i v procesu vývoje nových léčiv či pochopení významu bodových mutací pro vznik lidských onemocnění. Příkladem mohou být krystalografické studie vazby gleevecu, přelomového léku na chronickou myeloidní leukémii, sloužící k pochopení, proč je gleevec vázán jen malou skupinou tyrozिनových kináz, a k identifikaci míst mutací, které povedou ke zvýšené rezistenci vůči tomuto léku a následně úpravám jeho struktury, aby se i s těmito mutacemi vypořádal (obr. 1).

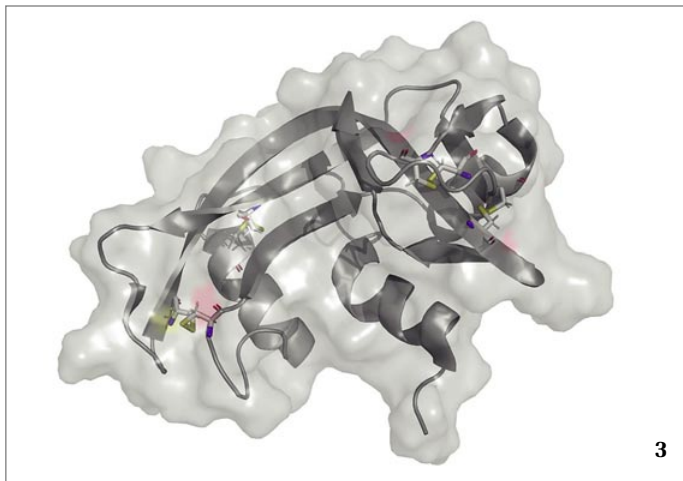
Přínos detailní znalosti trojrozměrného uspořádání molekul je dnes nepochybně



1



2



3



4

1 Struktura proteinu Abl kinázy (Protein Data Bank – PDB kód 2hyy) v komplexu s lékem gleevec. Gleevec vyznačen fialově a aminokyseliny, které jsou s ním v kontaktu, zvýrazněny.

2 Porovnání dostupnosti sekvenčních a strukturních dat – v grafu je znázorněn počet známých sekvencí proteinů v databázi UniProtKB a počet experimentálně určených struktur v databázi Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB). Počet známých sekvencí je o tři řády vyšší než počet známých struktur.

3 Struktura enzymu ribonukleázy (v databázi PDB registrován pod zkratkou 5rsa), který použil Christian B. Anfinsen při studiu denaturace a renaturace proteinu. Žluté disulfidické můstky, které pomáhají udržovat nativní 3D konformaci.

4 Srovnání experimentálně určené a předpověděné struktury termolysinu (PDB kód 6tmn). Experimentální struktura proteinu zeleně, struktura predikovaná programem AlphaFold modrozeleně. Vizualizováno programem PyMol (obr. 1, 3 a 4)

telný, ale experimentální určení struktur zůstává stále časově i finančně nákladné a vyžaduje složité a na údržbu náročné vybavení, které je tak omezeně dostupné. Počet známých experimentálních struktur sice roste dříve netušeným tempem díky výraznému pokroku ve všech oblastech od získání primárních dat až po počítačové metody určení výsledných struktur, ale ve srovnání s počtem známých sekvencí pro-

teinů je počet experimentálně stanovených struktur zcela zanedbatelný (pohybuje se na úrovni promile známých sekvencí). Díky nízké ceně sekvenování DNA se propast v množství známých sekvencí a známých 3D struktur proteinů ve skutečnosti stále rychleji rozšiřuje (obr. 2).

Můžeme struktury predikovat?

V 50. letech 20. století byly vyvinuty metody umožňující zjistit aminokyselinovou sekvenci bílkovin a zároveň byly provedeny experimenty, které ukázaly, že 3D struktury proteinů by mohlo být možné předpovídat – právě z pořadí aminokyselin v polypeptidovém řetězci. Klíčovými se staly pokusy amerického biochemika Christiana B. Anfinsena a jeho týmu, jenž studoval způsob, jakým se protein „balí“ do své finální 3D struktury. Ke studiu si vybral malý protein ribonukleázu – enzym, který štěpí molekulu RNA a lze u něj snadno sledovat jeho enzymovou aktivitu (obr. 3). Anfinsen tento protein izoloval z buněk a přidal k němu denaturační látky močoviny a merkaptetanol. Přidáním močoviny se rozpadnou nekovalentní interakce mezi postranními řetězci aminokyselin uvnitř proteinu a po přidání merkaptetanolu dojde k redukci disulfidických vazeb mezi postranními řetězci cysteinů uvnitř proteinu. Kombinovaný efekt těchto dvou činidel způsobí rozpad 3D struktury proteinu ribonukleázy, což lze doložit tím, že protein přestane být enzymaticky aktivní. Pokud takto denaturovaný protein v bezbuněčném prostředí získal po odstranění močoviny a merkaptetanolu čas k zpětnému sbalení do správné struktury a k oxidaci,

byl schopen obnovit svou enzymatickou aktivitu až na 90 % původních hodnot. Anfinsen z těchto pokusů vyvodil, že veškerá informace, kterou protein potřebuje ke sbalení do nativní 3D konformace, je uložena v pořadí jeho aminokyselin. Za tento elegantní a jednoduchý pokus pak získal Nobelovu cenu a otevřel novou cestu k poznání 3D struktur proteinů.

Počátky předpovídání 3D struktury proteinů

Naneštěstí je však často velký rozdíl mezi poznáním, že je problém řešitelný, a nalezením řešení daného problému – a to byl i případ 3D struktury proteinů. Vědci věděli více než 50 let, že 3D strukturu proteinu by mělo jít předpovědět i ze sekvence, a na této hypotéze pracovalo mnoho výzkumných týmů po celém světě. Pokrok ale byl po dlouhou dobu velmi skromný.

Jak to víme? Predikce 3D struktury proteinů byla tak zajímavou vědeckou otázkou, že byla v r. 1994 zřízena soutěž či experiment CASP (Critical Assessment of protein Structure Prediction), jejímž cílem bylo sledovat pokrok a vyvíjet transparentní systémy hodnocení predikce 3D struktury proteinů. Autoři soutěže využili toho, že experimentální určení 3D struktury proteinů je zdoluhavý proces, který někdy trvá roky, a i finální kroky zabere měsíce, a tak mohou experimentátoři poskytnout sekvence proteinů, jejichž struktury právě dokončují, k teoretickým experimentům. Autoři CASP proto vždy jednou za dva roky na jaře vyzvali vědce k zaslání sekvencí proteinů, jejichž struktury mají před dokončením, a tyto sekvence pak nabídli týmům

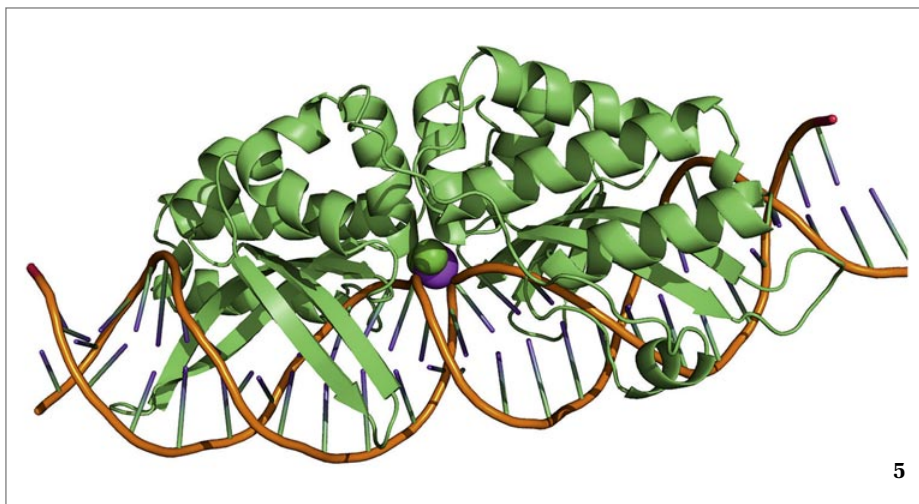
vyvíjejícím metody předpovídání 3D a poskytl jim několik měsíců času k predikci. Mezitím bylo dokončeno experimentální určení těchto struktur, a proto se daly na konci roku srovnat výsledky teoretické predikce s experimentálně určenými 3D strukturami a posoudit, jak moc se (ne)daří je předpovědět ze sekvence. Další významnou součástí CASP experimentu je maximální otevřenost soutěživých – autoři metod se scházejí a diskutují, jak postupy dále vylepšovat, metody publikují a poskytují zdarma. Výsledky CASP i přes tuto výjimečnou otevřenost po dlouhou dobu ukazovaly, že predikce 3D struktury ze sekvence je stále v plenkách – užitečné výsledky se dařilo získávat jen pro velmi malé proteiny. Vědci se v té době snažili problém řešit tak, že naleznou konformaci daného řetězce aminokyselin proteinu s nejnižší možnou energií. Tento přístup, jakkoli logický, zatím přinášel limitované výsledky pro velmi malé proteiny.

Průlom v určení 3D struktur proteinů

Pomoc přišla z nečekaného směru – již zmiňované sekvenování se stalo natolik dostupnou metodou, že se sekvenční databáze začaly plnit a pro mnoho proteinů byly k dispozici vyšší stovky, nebo dokonce tisíce sekvencí homologních proteinů z blízké příbuzných i vzdálenějších organismů. Srovnávání homologních proteinů ukázalo, že v sekvenci proteinů se vyskytují pozice, jejichž fyzikálně-chemické vlastnosti spolu korelují. Pokud se např. na pozici 10 vyskytuje kladně nabitá aminokyselina, tak na pozici 20 se nachází záporně nabitá. Pokud je však aminokyselina na pozici 10 u jiného homologu téhož proteinu hydrofobní, i aminokyselina na pozici 20 přestává být u stejného homologu záporně nabitá a stane se také hydrofobní. Pravděpodobně proto, aby fyzická blízkost, či dokonce kontakt, který mezi sebou mohou mít aminokyseliny na pozicích 10 a 20, mohly zůstat zachovány, byť chemická povaha interakce se může změnit, např. z elektrostatické na hydrofobní. Predikce 3D struktury se tedy proměnila z úlohy, která hledá 3D konformaci s nejnižší energií, na úlohu, kdy se ve velkých datechch příbuzných sekvencí proteinu hledají pozice, které se koordinovaně proměňují. Zásadní milník v predikci 3D struktur proteinů tak představoval rozvoj sekvenčních metod.

V r. 2018 se soutěže CASP poprvé účastnila komerční firma Deep Mind. Tato britsko-americká firma, kterou založil britský počítačový vědec Demis Hassabis a následně koupila firma Google, se věnuje rozvoji metod umělé inteligence a do širšího povědomí vstoupila v r. 2015 se svým programem AlphaGo, jenž dokázal porazit evropského šampiona ve hře Go. Program dále vylepšovala, až porazil i nejlepšího hráče světa, a dnes je podle odborníků člověkem neporazitelný.

V oblasti predikce 3D struktur proteinů firma představila program AlphaFold. AlphaFold se rovnou stal vítězem soutěže CASP a zaznamenal dříve netušený pokrok i v predikci založené čistě na sekvenci proteinů. Skutečný průlom pak přišel v r. 2020, kdy druhá verze programu AlphaFold nejenže přesvědčivě zvítězila v soutěži CASP, ale hlavně predikovala prakticky úplně



5

5 Predikce komplexu proteinu s nukleovou kyselinou a ionty kovů. Nové verze experimentálních nástrojů dovedou predikovat i komplexy proteinů – na obr. komplex meganukleázy s DNA, vápenatým iontem (zeleně) a sodíkovým iontem (fialově). Predikce z AlphaFold serveru vizualizována programem PyMol. Všechny orig. M. Novotný

přesně skoro všechny z přibližně 100 sekvencí, které byly součástí soutěže. Predikované struktury byly často k nerozeznání od experimentálně určených i na úrovni postranních řetězců aminokyselin (obr. 4 a na 2. str. obálky). Velký pokrok v úspěšnosti však zaznamenali i další soutěžící. Na čem je tedy založen úspěch nových metod pro předpověď 3D struktury proteinů?

Kouzlo AlphaFoldu

AlphaFold je program, který využívá tzv. hlubokého učení, aby pro jakoukoli sekvenci proteinu, která má příbuzné sekvence (což jsou prakticky všechny, které nebyly uměle vytvářeny), sestavil 3D strukturu proteinu s atomárním rozlišením (můžeme v ní určit polohy všech atomů jednotlivých aminokyselin). AlphaFold se učil, jak vypadá proteinová struktura a jak vypadají kontakty aminokyselin, z databáze experimentálně určených struktur proteinů (Protein Data Bank, PDB). V sekvenci hledá korelované pozice, a tudíž aminokyseliny, které by mohly být v kontaktu, a to za pomoci srovnání homologních sekvencí, jež identifikuje ve velkých databázích obsahujících miliardy proteinových sekvencí. K trénování i predikci samotné využíval speciální typ procesoru zvaný TPU (Tensor Processing Unit), vyvinutý firmou Google speciálně pro strojové učení, který byl pro akademické týmy pracující na predikci struktur nedostupný.

Post AlphaFold éra

AlphaFold byl autory, přestože pocházejí z komerčního prostředí, poskytnut v duchu soutěže CASP k volnému použití, což vedlo k revoluci ve strukturální biologii. Díky spolupráci s Evropským bioinformatickým institutem (EBI) vznikla i databáze predikovaných struktur AlphaFold Database, protože tvorba struktury ze sekvence byla na běžném počítači stále náročná. Počet dostupných strukturálních dat se tak zvedl o tři až čtyři řády z desítek tisíc proteinů

před r. 2022 na současné stovky milionů proteinů s predikovanou 3D strukturou.

Vývoj metod pro 3D strukturu makromolekul se nezastavil a k dispozici jsou dnes desítky nástrojů, v nichž se uplatňují postupy aplikované v AlphaFoldu. Tyto programy využívají dostupnost strukturálních dat k tomu, aby předpovídaly, jaké komplexy mohou monomerní proteiny tvořit, kde mohou být místa posttranslačních úprav a jak budou vypadat nebo zda a kde mohou konkrétní proteiny vázat nukleové kyseliny, malé molekuly jako kofaktory či léky (obr. 5). Strukturální informace slouží i k odhadu významu mutací, které pozorujeme např. v lidské populaci. Dva lidé se velmi hrubým odhadem v průměru liší ve třech milionech nukleotidů, a tak není úplně snadné určit, které rozdíly mohou např. způsobit závažné onemocnění. Dostupná strukturální data však pomáhají řešit i tento problém. V r. 2024 byl představen AlphaFold 3, který umí nejen predikovat strukturu monomeru proteinů, ale i řadu dalších úloh zmíněných výše. Tato verze je dokonce dostupná jako webový server (<https://alphafoldserver.com/>), kde si nejnovější program může vyzkoušet úplně každý – zkuste si to také.

V r. 2024 získali již zmíněný Demis Hassabis a americký chemik a počítačový vědec John Jumper Nobelovu cenu za chemii – za predikci proteinové struktury a za vyřešení problému, který popsal Ch. B. Anfinsen před více než 50 lety. D. Hassabis popisoval, že se pokusili vyřešit predikci 3D struktury proteinů ze tří důvodů. Šlo o problém, na který bylo aplikovatelné strojové učení. Dále byla k dispozici kvalitní a validovaná trénovací data v podobě strukturálních databází PDB a existoval systém, jak zhodnotit kvalitu predikce (v podobě soutěže CASP). V neposlední řadě je problém zaujal, protože má celospolečenský dopad – predikce 3D struktur proteinů může pomoci pochopit dopad některých mutací na vznik různých onemocnění a dostupnost detailních strukturálních dat povede i k usnadnění vývoje nových léčiv.

Předpověď 3D struktury je unikátní metodou, která má potenciál měnit životy lidí a zároveň, na rozdíl od řady dalších pokročilých biologických metod, ji lze provozovat prakticky zdarma odkudkoli na běžném počítači.