

# Oponentský posudek

## dizertační práce Ing. Milady Krejčové

### Molekulární motory a Maxwellův démon

Disertační práce Ing. Milady Krejčové je zaměřena na vysoce aktuální oblast, mikromechaniku na molekulární úrovni, konkrétně na matematické modelování molekulárního motoru myosinu II. Za hlavní přidanou hodnotu modelu považují interdisciplinární aplikaci principů statistické fyziky na biologický jev svalové kontrakce a funkci molekulárního motoru. Statistické predikce polohy myozinové hlavičky jsou řešeny dle Fokker-Planckova popisu. Zajímavým interpretačním pohledem je aplikace konceptu Maxwellova démona na popis myozinové hlavy coby prostředníka a pozorovatele vykonávaného pohybu.

Vlastní disertační práce o 141 stranách je členěna obvyklým způsobem. Po souhrnu, přehledu klíčových slov, obsahu a seznamech obrázků a tabulek následuje úvodní část (Part I), která je poměrně rozsáhlá. Po stručném vysvětlení hlavního předmětu dizertační práce a její struktury (kapitola 1) následují 2 rozsáhlé kapitoly. První z nich (kapitola 2) je věnována biologické podstatě, rozdělení a charakterizaci základních molekulárních motorů a úloze myosinu II ve svalové kontrakci. Druhá (kapitola 3) je zaměřena na statistickou a informační teorii statistické fyziky a její vztahy s termodynamikou včetně matematického popisu. Jako možný interpretační pohled je zaveden a podrobně vysvětlen koncept Maxwellova démona, jeho historický vývoj a možné aplikace.

Po přehledném shrnutí hlavních cílů a hypotéz (Part II, kapitola 4) následuje metodologická část (Part III). V ní je čtenář seznámen s řešením Fokker-Planckovy rovnice, difúzní rovnice (kapitola 5), Wang-Peskin-Elstonovým algoritmem a mezními podmínkami (kapitola 6). Je představen 3-stavový model myosinu II (stav bez vazby, se slabou vazbou a po záběru) s matematickým popisem hlavních závislostí (kapitola 7), kondenzace funkčních stavů (kapitola 8) a určování pozice myozinové hlavičky (kapitola 9).

Výsledkovou část (Part IV) tvoří 5 navazujících kapitol, které se postupně zabývají numerickým a analytickým řešením Fokker-Planckovy a difúzní rovnice (kapitola 10), vlivem mezních podmínek (kapitola 11), stavovými přechody a vlivem ATP (kapitola 12), rychlostí molekulárního motoru myosinu II v závislosti na zatížení a ATP (kapitola 13) a konečně predikcí pozice myozinové hlavičky (kapitola 14). Práci uzavírá celkové shrnutí (Part V, kapitola 15) doplněné souhrny v českém, anglickém a německém jazyce. Literární rozhled a orientaci v oboru dokládá rozsáhlá bibliografie o 142 položkách.

Aplikace principů statistické fyziky a termodynamiky do modelování molekulárních biologických jevů (interakce myosinu s aktinem) je hlavním přínosem předložené práce a relevantní cestou k pochopení variability biologických odpovědí, kterou klasické mechanické modely nedokážou popsat a predikovat. Realističnost modelu byla ověřena simulací mechanických vlastností, závislosti rychlosti na vnějším zatížení, kdy bylo zjištěno dvojité hyperbolické rozložení, které odpovídá literárním údajům. Zajímavým konceptem je interpretace funkce myosinu pomocí Maxwellova démona coby jakéhosi prostředníka a pozorovatele biologického děje.

Zvolené téma dizertační práce je dle mého názoru vysoce aktuální. Přestože jsou funkce kosterního svalu již popsány do značné hloubky, stále zůstává řada nejasností a právě aplikace statistických přístupů na molekulární procesy (nejen svalové kontrakce) je slibnou cestou. Možná lepším předmětem takto zaměřeného výzkumu by byl iontové kanály, u kterých nechybí údaje o molekulárních pochodech (single-channel patch-clamp) ani údaje o synchronizovaném chování na úrovni celé buňky. Aplikace statistických principů může směřovat k vysvětlení drobné variability opakujících se dějů, která může být klíčem k pochopení důležitých biologických a medicínských aplikací, např. dějů vedoucích ke vzniku poruch srdečního rytmu. Za důležitý považují interdisciplinární charakter práce, kdy pokročilé

metody statistické fyziky jsou aplikovány na studium biologického fenoménu a přispívají k jeho lepšímu porozumění. Z hlediska rozvoje oboru tak práce rozšiřuje aplikační možnosti matematického modelování a statistické fyziky na jedné straně, na straně druhé přispívá k hlubšímu pochopení biologického jevu.

Publikační aktivita kandidátky je přiměřená. Při podrobnějším rozboru publikační aktivity je nicméně zřejmé, že publikační potenciál poznatků prezentovaných v dizertační práci není dosud zcela vytěžen a měly by být uplatněny v impaktovaných časopisech, jejichž úroveň dle mého názoru dosahují.

Z formálního hlediska je práce kvalitní, její přehlednost dokládá systematický přístup k řešenému problému. Práce je zpracována velmi pečlivě, téměř bez překlepů a v anglickém jazyce, jehož úroveň dokládá velmi dobrou jazykovou připravenost kandidátky.

Na závěr bych si dovilil položit následující dotaz. Rád bych zdůraznil, že se nejedná o výtku předložené disertační práci, ale spíše o spekulativní komentář a doporučení pro budoucí práci.

Nejsem si zcela jist, že myosin II optimálně odpovídá konceptu Maxwellova démona coby prostředníka a pozorovatele. Z pohledu fyziologa by lepším kandidátem mohly být regulační proteiny aktinového filamenta (troponin, tropomyosin), jejichž postavení umožňuje nebo blokuje interakci aktinu s myosinem. Případně by vhodným kandidátem mohly být ryanodinové receptory sarkoplazmatického retikula, jejichž otevření umožňuje prudké zvýšení koncentrace intracelulárního vápníku, nebo vápníkové kanály sarkolemy (ICaL), které v závislosti na akčním napětí aktivují ryanodinové receptory. Nedala by se jejich funkce jakýchsi jednosměrných dveří v procesu kontrakce a vazby mezi excitací a kontrakcí dobře popsat pomocí Maxwellova démona?

**Závěr:**

**Předložená dizertační práce splňuje všechny požadavky kladené na dizertační práci, a proto ji jednoznačně doporučuji k obhajobě.**

V Plzni, 20. dubna 2021

Prof. MUDr. Milan Štengl, Ph.O.

## Oponentský posudek na doktorskou disertační práci

**Ing. Milady Krejčové: Molecular motors and Maxwell's demon.**

**k udělení akademického titulu "PhD" v oboru Aplikovaná mechanika na Západočeské universitě v Plzni.**

Studium tzv. molekulárních motorů je v posledních 15-ti letech velmi aktuální téma diskutované jak v biomechanice tak především v medicíně. Jde o kooperaci velkých molekul, jejichž výsledný pohyb je určován jednak mezimolekulárními silami a jednak jejich chaotickým (Brownovým) pohybem. Vzájemné působení mezimolekulárních a mechanických sil vyvolaných tepelným pohybem vede ke vzniku korelací, jejichž následkem může být i uspořádaný pohyb. Tento uspořádaný pohyb lze nazvat molekulárním motorem. Jedním z důsledků je např. i uspořádaný pohyb slabého aktinového vlákna vůči silnému vláknu myozinovému.

Aktinová vlákna jsou spojena se Z linií a myozinová vlákna, na kterém jsou navázány aktivní hlavičky (cross-bridges, v češtině často nazývané příčné můstky), jsou přes elastický polymer titin spojeny s M linií. Uspořádaný pohyb příčných můstků vede ke zkracování vzdálenosti mezi Z a M liniemi. Dochází tak ke zkracování sarkomery (svalové vlákno kontrahuje). Z průřezu sarkomery je patrné, že každé vlákno myozinu je obklopeno šesti vlákny aktinovými a každé aktinové vlákno je obklopeno minimálně třemi myozinovými vlákny. Střední vzdálenost mezi tenkými a tlustými vlákny je 23 nm. Tedy vzdálenost dostatečně malá k tomu aby se uplatnily mezimolekulární elektromagnetické síly. Dodáním iontu  $\text{Ca}^{2+}$  na straně slabého aktinového vlákna dochází ke změně elektrického potenciálu a na místo s iontem  $\text{Ca}^{2+}$  (troponin) se naváže hlavička myozinu spojená se silným myozinovým vláknem. Tato hlavička obsahuje vysoce energetickou molekulu ATP (adenosintrifosfát), která při hydrolyze  $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}$  vede ke změně tvaru (vztyčení) navázané hlavičky tak, že dochází ke vzájemnému posuvu obou vláken. Dalším přívodem ATP dojde opět k rozpojení můstku a myozinová hlavička se narovná podél myozinového vlákna. Obvyklá velikost výchylky myozinové hlavičky z rovnovážné polohy je v rozmezí 47nm (rozpojená poloha před kontrakcí) až do -47 nm po kontrakci. Tento proces se cyklicky opakuje a dochází ke kontrakci sarkomery z původní délky 3.65  $\mu\text{m}$  na 1.05  $\mu\text{m}$  (překrytí vláken až o 2.6  $\mu\text{m}$ ) až do vyčerpání  $\text{Ca}^{2+}$  a ATP.

Takto zjednodušený model sarkomery, lze považovat za lineární molekulární motor, který při kontrakci generuje sílu, a tudíž koná mechanickou (expanzní práci). Jinými slovy; přeměňuje chemickou energii (neexpanzní práci  $\Delta G = -30.5 \text{ kJ/mol}$ ) na energii mechanickou (expanzní). Dochází tak k transformaci jedné formy energie na formu jinou, aniž by byla třeba asistence nějakého hypotetického démona.

Matematická formulace vzájemné relace mezi stochastickým pohybem molekul, kterým je především difúze (Brownův pohyb) a dodatečným mezimolekulárním silovým působením, včetně chemických reakcí, je principiálně obsažena ve většině parabolických rovnic. K formulaci vzájemné souvislosti mezi náhodnými silami a dodatečnou tažnou silou je nejvhodnější Fokler-Planckova parciální diferenciální rovnice. Tato rovnice, popisuje časový vývoj funkce hustoty pravděpodobnosti rychlosti částice pod vlivem tažných sil (konvekce, mechanické či elektromagnetické síly) a náhodných sil vyvolaných tepelným (Brownovým) pohybem. Když je tato rovnice použita k výpočtu pravděpodobnosti polohy částic, je více známa jako Smoluchowskéhc

s konvekcí. V případě s nulovou difúzí je ve statistické mechanice známa jako Liouvilleova rovnice.

Hlavním cílem práce bylo navrhnout model svalové kontrakce (sarkomery) tak, aby bylo možno řešením Fokker-Planckovy rovnice simulovat generaci mechanické síly popsané pomocí Hillovy rovnice.

## Hodnocení

- a) Použité metody odpovídají současným trendům v oblasti aplikace matematických metod k popisu biomechanických problémů. Práce je orientována více na objasnění vzniku uspořádaného procesu v jinak velmi složitém chaotickém prostředí. Úlohou je objasnění svalové kontrakce s cílem dosáhnout konkrétních výsledků, které lze porovnat s experimentálně zjištěnými průběhy. Přínosem práce je realizace numerického kódu pro řešení Fokker-Planckovy rovnice pro pravděpodobnost polohy částic účastnících se svalové kontrakce. Vychází z práce autorů Yin Y. a Guo Z (Collective mechanism of molecular motors and a dynamic mechanical model for sarcomere) uvedené jako citace [136] s použitím algoritmu WPE autorů Wang, Peskin a Elston (A Robust Numerical Algorithm for Studying Biomolecular Transport Processes) citovaná jako [132]. Vlastním výpočtem autorka práce prokázala, že rychlost kontrakce a maximální izometrická aktivní síla rostou s rostoucí koncentrací ATP a stanou se konstantní, když koncentrace ATP dosáhne jakési rovnovážné saturace. Kontrakční rychlost s postupným zvyšováním zátěžové síly se snižuje. V normalizovaném tvaru jsou tyto výsledky v dobré shodě s Hillovým modelem svalu, citace [26], viz. Fig. 13.9 a 13.10.
- b) Práce má přiměřený rozsah (včetně literatury má 128 stran) a obsahuje velké množství údajů a obrázků, některé však nejsou pro formulaci samotného modelu využity. Rešeršní část je přiměřená a věnuje se především popisu různých typů molekulárních motorů a diskusi o Maxwellově démonu, jehož zásadní vliv na existenci uspořádaného pohybu (molekulárního motoru) se mi nepodařilo nalézt. Práce se tak stává poněkud nepřehlednou zaváděním nepoužívaných pojmů jako relativní entropie či přenos informace. Nicméně, je napsána srozumitelnou angličtinou a má velmi dobrou grafickou úroveň. Výsledky simulací jsou dobře popsány a interpretovány.
- c) Mezi publikacemi autora nejsou žádné práce ve SCOPUSu, které by byly věnovány výsledkům disertace. Nicméně problémům disertace jsou věnovány konferenční příspěvky na mezinárodních konferencích věnovaných čistě biomechanickým problémům. Z uvedených publikací je dále patrné, že se M. Krejčová uvedenému problematice pečlivě a dlouhodobě věnovala. Uvedené publikace a i tato disertační práce ukazují na její schopnost porozumět a numericky řešit složité biomechanické, popř. technické, problémy.

K práci mám následující dotazy.

1. Na počátku kap. 9 je Věta "Imagine, that a control mechanism, which is in the muscle cell (the demon), needs to locate "precise" position (and state of the myosin head) in time  $t = t_m$ ." Této větě rozumím tak, že „Představte si, že potřebujeme řídicí mechanismus, který je ve svalové buňce (tedy démona), který lokalizuje "přesnou" polohu (a stav hlavičky myozinu) v čase  $t = t_m$ ." Moje otázka je, zda tento démon pracuje s nějakou další, dosud neznámou interakcí? Není možné

- vysvětlit stav a polohu hlavy myozinu pomocí kvantové mechaniky, jako důsledek maximální pravděpodobnosti jejího aktuálního energetického stavu?
2. Proč byl zaveden pojem produkce vzájemné informace (mutual information production), když k vysvětlení funkce kontrakce (molekulárně motoru) to není třeba?  
Parabolické rovnice jsou obecně jediné, které věrohodně popisují evoluci reálných systémů, včetně respektování i jejich dlouhodobé paměti. Markovovské procesy sice respektují příčinnost, ale nová počáteční podmínka je důsledkem stavu definovaného jen v předchozím časovém kroku. Jak bylo ukázáno i v této práci, i toto zjednodušení dává věrohodné výsledky.
  3. Jak rozumět vztahu (10.3), jde zřejmě o překlep. V této podobě nedává žádný smysl. Veličina  $kBTm$  má fyzikální rozměr  $[pNm]$  a ne  $[pN/nm]$ ; vyskytuje se na více místech.
  4. Kap. 13. Výpočet rychlosti myozinové hlavy vede za jistých předpokladů k homogenní soustavě lineárních rovnic (13.15). Ta má nenulové řešení jen když je matice soustavy singulární, tj. její determinant je nulový. Tato vlastnost ukazuje na nějakou vnitřní souvislost mezi dopřednými toky  $F_{n+1/2}$  a zpětnými toky  $B_{n+1/2}$  vyjadřující rychlost přechodu mezi polohami myozinové hlavice. Existuje tudíž nějaká korelace mezi těmito toky, která by mohla i objasnit hypotézu hledaného nemateriálního démona.

Uvedené otázky nejsou zásadní pro výsledky předložené práce. Mají za cíl nasměrovat diskusi, popřípadě i zájem autora na problémy, které jsou podle autora posudku, pro modelování molekulárních motorů důležité.  
Práce neobsahuje žádné další věcné chyby a je v ní jen minimum překlepů.

## Závěr

Předložená práce má výbornou grafickou úroveň. Obsahuje rozsáhlou rešerši různých typů molekulárních motorů a jejich případný výskyt v biologických systémech. Vypracovaný software simuluje kontrakci sarkomery talc, že odpovídá experimentálně ověřenému Hillovu modelu svalu. Předložená doktorská práce k udělení titulu PhD., splňuje ustanovení § 47, odst. 3 Zákona č. 111/1998 o vysokých školách a doporučuji proto, aby byla Ing. **Milada Krejčová** připuštěna k její obhajobě na Fakultě aplikovaných věd, Západočeské University v Plzni.

V Praze dne 14. dubna 2021

Prof. Ing. František Maršilc, DrSc.  
Ústav termomechaniky AVČR