

Warszawa, 25 lipca 2016

Dr hab. Joanna Trylska, prof. UW  
e-mail: [joanna@cent.uw.edu.pl](mailto:joanna@cent.uw.edu.pl)

Rada Naukowa  
Wydziału Chemii  
Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza  
w Poznaniu

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Stachiewicz pt. "Modelowanie i symulacje komputerowe rozplatania polinukleotydów w nanoporach"**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Anny Stachiewicz zatytułowana "Modelowanie i symulacje komputerowe rozplatania polinukleotydów w nanoporach" została złożona na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Rozprawa doktorska została napisana pod kierunkiem prof. dra hab. Andrzeja Molskiego. Jej angielski tytuł to "*Modeling and computer simulations of polynucleotide unzipping in nanopores*". Głównym celem pracy było opracowanie modelu gruboziarnistego DNA i jego zastosowanie do symulacji przechodzenia DNA przez nanopory oraz określenia mechanizmu i kinetyki translokacji DNA przez nanopory. Rozprawa opisuje zagadnienia na pograniczu chemii, modelowania molekularnego, symulacji komputerowych, biologii oraz biofizyki.

Rozprawa doktorska składa się z sześciu rozdziałów w języku polskim oraz jednego kilkustronicowego podsumowania w języku angielskim. Istotną część stanowią załączniki w formie publikacji, gdzie szczegółowo opisano prezentowane zagadnienia: modele i symulacje. W rozprawie znajduje się także wykaz publikacji i konferencji autorki. Rozprawa doktorska zawiera 50 stron (nie licząc istotnych załączników) i 66 odnośników literaturowych. Wstęp systematyzuje to co jest opisane dalej w rozdziałach. W rozdziale Wprowadzenie jest krótkie wprowadzenie do zagadnień dotyczące DNA, nanoporów, spektroskopii sił atomowych w zastosowaniu do nanoporów, pełnoatomowej dynamiki molekularnej i dostępnego oprogramowania oraz stochastycznej dynamiki Brownowskiej. W następnym rozdziale wypunktowane są cele pracy doktorskiej. W kolejnym rozdziale autorka opisuje metodologię badawczą. Potem przedstawia wyniki i wnioski. We wnioskach jest krótkie podsumowanie najważniejszych zagadnień badanych w pracy, ograniczenia modeli

oraz informacja do jakich innych układów mogą być przydatne. Jakość redakcji rozprawy jest bez zarzutu. Autorka opisuje cele pracy i etapy badań w sposób klarowny.

Nanopory są wszechobecne w układach biologicznych, gdyż zapewniają transport różnych cząsteczek, w tym jonów. Nanopory pełnią też istotną rolę w translokacji biopolimerów. Są to naturalne kanały białkowe w błonach biologicznych ale mogą też być syntetycznie stworzonymi otworami do celów doświadczalnych. Obecnie jest wiele metod wytwarzania syntetycznych nanoporów i są one z różnych materiałów, na przykład nanopory półprzewodnikowe, polimerowe (polimer organiczny - glikol polietylenowy), czy grafenowe. W latach dziewięćdziesiątych XX wieku przeprowadzono pierwsze doświadczenia translokacji pojedynczych cząsteczek przez nanopory. W tego typu doświadczeniach do membrany z nanoporem otoczonej elektrolitem przykładane jest napięcie, powstaje silne pole elektryczne, które powoduje translokację cząsteczki przez por. Translokację odzwierciedlają mierzone zmiany prądu jonowego.

Autorka opisuje i bada modelowe nanopory służące do translokacji DNA. Jej badania mogą się przyczynić do rozwoju metody doświadczalnej sekwencjonowania DNA w syntetycznych nanoporach. Taka metoda sekwencjonowania mogłaby pomóc w wykryciu modyfikacji epigenetycznych nici DNA, które są istotne dla nowotworów. Wartość mierzonego prądu jonowego podczas translokacji DNA przez nanopor jest zależna od rodzaju nukleotydu. Pod warunkiem, że prąd będzie można rejestrować z dobrą rozdzielczością, wydaje się, że ten rodzaj sekwencjonowania DNA będzie miał szansę powodzenia. Aby to było możliwe muszą zostać zbudowane syntetyczne nanopory, które zapewnią odpowiednio wolną translokację i odpowiednio wzmocnią sygnał generowany podczas przechodzenia DNA. Celem pracy doktorskiej mgr Stachiewicz było zbadanie translokacji spinki DNA przez nanopory przy użyciu modelowania molekularnego i symulacji komputerowych. Zadanie to wymagało stworzenia odpowiedniego modelu DNA a także nanoporu, gdyż aby biopolimer mógł przejść przez wąski kanał musi się rozpleść. Tak więc autorka tworząc model musiała uwzględnić dwa ważne aspekty: model DNA umożliwiający rozplatanie oraz odpowiedni model i charakterystykę nanoporu oraz jego otoczenia jonowego, przez który przeciągała DNA.

Zwykle modele gruboziarniste czy inaczej zredukowane nie pozwalają na zmianę struktury drugorzędowej biopolimeru. Najprostsze tego typu modele są bowiem oparte na modelach sieci elastycznej, która jest dynamiczna i może się rozciągać ale topologia jest ustalona i pseudo-wiązania nie mogą się zrywać ani tworzyć nowe. Autorka musiała więc wybrać odpowiedni model gruboziarnisty taki, który zapewniłby możliwość rozplatania struktury drugorzędowej DNA. Dodatkowym problemem okazał się fakt, że modele gruboziarniste są zwykle parametryzowane w próżni albo w niejawnym modelach rozpuszczalnika. Autorka chciała jednak uwzględnić wodę i jony w nanoporach w sposób jawny, gdyż pracowała z ujemnie naładowanym DNA, więc musiała wybrany model gruboziarnisty dostosować jeszcze do jawnej reprezentacji rozpuszczalnika.



W nanoporze istotny jest przepływ wody i jonów pod wpływem przyłożonego napięcia, więc autorka modelowała jawnie i nanopor i środowisko. Woda była reprezentowana w sposób oparty na modelu MARTINI. Autorka musiała jednak ten model dostosować do swoich potrzeb, na przykład aby symulować prąd jonowy. Istotnym okazało się użycie tzw. sumowania Ewalda przy opisie oddziaływań elektrostatycznych. W modelach pełnoatomowych takie traktowanie elektrostatyki jest już standardem ale w modelach gruboziarnistych zwykle albo wcale nie stosuje się elektrostatyki (jest ona niejawnie zaimplementowana w potencjale oddziaływania) albo stosuje się promień odcięcia (tzw. *cut-off*). Autorka pracowała z DNA i jonami, gdzie bardziej szczegółowe traktowanie elektrostatyki okazało się istotne.

Stworzenie modelu biopolimeru i nanoporu wymagało przetestowania wielu parametrów, zarówno dotyczących modeli jak i samych symulacji. Mgr Anna Stachiewicz przetestowała różne modele nanoporów, cylindryczne i stożkowe, a także określiła wpływ przyłożonego napięcia na rozplatanie DNA. Napięcie ma istotne znaczenie, gdyż jeśli jest za duże DNA zamiast się rozplatać zniekształca się.

Jestem mile zaskoczona, że udało się tak dobrać parametry, że model autorki odzwierciedla temperatury topnienia spinki DNA w rozsądnych zakresach temperatur. W modelach pełnoatomowych nie byłoby to możliwe, gdyż zostały sparametryzowane w oparciu o dane doświadczalne w temperaturach pokojowych. Ciekawym byłoby też sprawdzenie innych sekwencji DNA i porównanie topnienia na przykład w oparciu o standardowy model najbliższych sąsiadów (ang. *nearest-neighbor*).

Poza stworzeniem odpowiedniego modelu do symulacji translokacji spinki DNA przez nanopory autorka po przeprowadzeniu symulacji przeanalizowała mechanizm takiej translokacji. Określenie mechanizmu translokacji także stanowi istotny wkład w dziedzinę. Mgr Stachiewicz określiła minimalne napięcie dla rozplatania DNA oraz stwierdziła, że układ pokonuje dwie bariery energetyczne, jedną związaną z rozplataniem DNA a drugą związaną z translokacją po rozpleceniu DNA. Wyzaczyła, że ok. 25-30% czasu translokacji układ spędza na rozplataniu. Stwierdziła, że w przypadku poru stożkowego rozplatanie rozpoczyna się powyżej przewężenia nanoporu. Co istotne autorka przeprowadzała symulacje dla ustalonych parametrów po kilka razy, gdyż w praktycznych krótkich symulacjach w dynamice molekularnej trajektoria ruchu może zależeć od warunków początkowych (losowania prędkości). Ciekawym byłoby też określenie jak rozplatanie i translokacja zależą od sekwencji DNA w kontekście przyszłej predykcyjności modelu.

Poniżej mam kilka pytań i uwag dotyczących rozprawy. Stanowią one jednak punkty do dyskusji i nie umniejszają wagi przeprowadzonych symulacji.

Na stronie 17 autorka pisze, że przeprowadziła symulacje pełnoatomowe translokacji DNA przez nanopor ale trwały one dwa tygodnie przy użyciu dwóch procesorów Intel Xeon i

autorka uznała, że to za długo. Zwykle jednak symulacje pełnoatomowej dynamiki molekularnej w jawnym rozpuszczalniku trwają miesiące, więc to raczej nie jest długo... Można też aplikować o czas obliczeniowy na klastrach komputerów dużej mocy. Co jest istotne to to, że uproszczony model ma wiele innych ważnych zalet, na przykład możliwość większej kontroli nad użytymi parametrami i łatwiejszego dopasowania parametrów (jest ich mniej). Pełnoatomowe pola siłowe są raczej niezmiennalne przez jedną osobę, a pełnoatomowe modele wody nie oddają dobrze symulacji w wysokich temperaturach. Dodatkowo w modelach pełnoatomowych doświadczalnie zmierzone temperatury topnienia DNA nie są odtwarzalne. W modelu gruboziarnistym temperatura jest parametrem. Kolejny powód to taki, że łatwiej przeprowadzić symulacje prowadzące do wyznaczenia kinetyki przechodzenia przez por (metoda WHAM) oraz można stosować dużo niższe napięcia zbliżone do doświadczalnych. Nie umniejszałabym więc roli modeli gruboziarnistych bo często są lepiej kontrolowalne niż pełnoatomowe.

Czy modyfikacja modelu jest udostępniona w programie NAMD lub czy autorka planuje udostępnić odpowiednie skrypty tak, żeby inni mogli skorzystać z modelu, na przykład dla spinek DNA o innych sekwencjach?

Przydałoby się wyjaśnienie dlaczego taki właśnie model gruboziarnisty DNA tj. z pracy Dans i in. a nie na przykład Drukker i in. *Model simulations of DNA denaturation dynamics*, J. Chem. Phys., 114:579, 2001) autorka zdecydowała się zaimplementować. Są też inne modele gruboziarniste, które pozwalają na rozplatanie i topnienie spinek kwasów nukleinowych. Przydałoby się także bardziej szczegółowy opis tego pola siłowego, gdyż nie ma go w publikacji w *J. Comput. Chem.* 2015 a stanowi on istotną część pracy autorki.

Strona 18, rysunek 4.1: Czy łatwo byłoby dopasować model też dla siły jonowej KCl? A co w przypadku jonów dwivalentnych, czy je w ogóle trzeba i można uwzględnić?

Strona 20: Przygotowano wiele modeli porów ale czy kształty odpowiadały też jakoś biologicznym kanałom, czy były to tylko modelowe układy? Pytam w kontekście innych struktur DNA lub nawet motywów RNA, dla których wiadomo, że formowanie struktury trzeciorzędowej zależy od dwuwartościowych jonów.

Oddziaływanie ze ściankami poru zostało zablokowane potencjałem odpychającym, żeby DNA nie kleiło się do ścianek w sposób nieodwracalny. Na stronie 34 we Wnioskach autorka pisze, że na szybkość translokacji wpływa oddziaływanie ze ściankami poru. Czy ten aspekt oddziaływania DNA-nanopor nie powinien być modelowany w sposób bardziej szczegółowy?

Strona 29, rysunek 5.3: Rysunek ten nie przedstawia korelacji tylko wyznaczone względem "z" różne miary, więc można mówić o zależności a nie korelacji.



Autorka nie uniknęła drobnych literówek i błędów. Nie obniżają one w żadnym stopniu wartości pracy ale wyszczególnienie ich wynika z mojej roli recenzenta. Na przykład:

- strona 10: "transportujący RNA (mRNA)" mRNA to informacyjny lub matrycowy RNA a transportujący to tRNA
- strona 14: "Na podstawie danej konfiguracja" powinno być konfiguracji
- w podpisach pod rysunkami są odniesienia do kolorów, a rysunki są czarno-białe, więc podpisy nie zostały przerobione z tych, które znajdują się w publikacjach.
- strona 19: " $\beta$ -helisy DNA" powinno być helisy B-DNA.
- strona 20, podpis pod rysunkiem 4.3: "(a) długości" powinno być długościach
- strona 21: "równowagowanie" powinno chyba być równoważenie

Mgr Anna Stachiewicz ma już istotny dorobek publikacyjny. Wyniki jej badań zostały opublikowane w języku angielskim w dwóch artykułach w czasopiśmie *Journal of Computational Chemistry* z listy filadelfijskiej o współczynniku oddziaływania  $IF=3.6$ . Modele i symulacje zostały więc już ocenione na arenie międzynarodowej. Wyniki badań zostały zaprezentowane na kilku konferencjach, między innymi na dwóch warsztatach w Linz w Austrii. Mgr Anna Stachiewicz ma też jedną pracę przeglądową, która została opublikowana w języku polskim w *Wiadomościach Chemicznych* i pozwoliła autorce wdrożyć się w temat na początku pracy badawczej w kierunku doktoratu. Artykuł ten otrzymał nagrodę Polskiego Towarzystwa Chemicznego za najlepszy artykuł wydrukowany w 2013 roku. Wkład mgr Anny Stachiewicz w powstanie każdej publikacji jest 70%, więc jej udział jest dominujący. Dodatkowo publikacje są tylko dwuautorowe, a mgr Anna Stachiewicz jest w każdej publikacji pierwszym autorem.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska magister Anny Stachiewicz stanowi oryginalne rozwiązanie zagadnienia/problemu naukowego, potwierdza ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie naukowej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez autorkę. Tym samym recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska spełnia wszystkie warunki ustawy o tytule naukowym i stopniach naukowych. W związku z tym wnoszę o dopuszczenie mgr Anny Stachiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

J. Trzejska