

Czasorozdzielcza wielowymiarowa spektroskopia NMR z próbkowaniem niejednorodnym

Promotor: Dr hab. Krzysztof Kazimierzuk

Założenia Pośród technik chemii analitycznej używanych w laboratoriach na całym świecie szczególne miejsce zajmują techniki spektroskopowe. Umożliwiają one wyznaczenie struktur molekuł oraz dają wgląd w mechanizmy reakcji chemicznych. Wiedza o tym, jak przebiega reakcja w czasie pozwala na optymalizację procesu np. w celu zwiększenia jego wydajności. W celu efektywnych pomiarów czasorozdzielczych ważne jest stworzenie szybkich technik pomiarowych, które umożliwiłyby powtarzanie eksperymentów z dużą częstotliwością. Dwu- i wielo-wymiarowa spektroskopia NMR jest doskonałym źródłem szczegółowej informacji strukturalnej, ale jest zbyt powolna aby mogła służyć efektywnemu monitorowaniu reakcji. Celem niniejszej pracy było opracowanie metody umożliwiającej stosowanie wielowymiarowej spektroskopii NMR w wariancie czasorozdzielczym.

W tradycyjnym podejściu monitorowanie reakcji za pomocą NMR przeprowadza się przy użyciu serii widm jednowymiarowych (najczęściej ^1H NMR). Są to szybkie i czułe eksperymenty, ale zawodzą w przypadku skomplikowanych mieszanin których widma składają się z olbrzymiej liczby nakrywających się pików. Problem rozdzielczości można rozwiązać wprowadzając dodatkowe wymiary widma. Spektroskopia wielowymiarowa jest jednak czasochłonna. Główną przyczyną nie jest jednak jej niska czułość, ale ograniczenia klasycznej teorii

próbkowania (teoremat Nyquista i zasada nieoznaczoności Fouriera) w wyniku których szerokość pików jest związana z liczbą zmierzonych punktów sygnału, a więc pośrednio z czasem pomiaru, który musi sięgać często kilku dni. Wiele technik zostało zaproponowanych, aby ominąć te ograniczenia, takich jak ultraszybki NMR [1] czy nowe techniki próbkowania [2]

Próbkowanie niejednorodne (*Non uniform sampling (NUS)*) jest coraz częściej stosowane jako technika pozwalająca na pomiar wielowymiarowego widma w stosunkowo krótkim czasie. W podejściu NUS, jedynie niewielki podzbiór losowo wybranych punktów sygnału jest rzeczywiście mierzony w eksperymencie. Pozostałe punkty są rekonstruowane za pomocą zaawansowanych algorytmów, różniących się założeniami i zakresem stosowalności.

Czasorozdzielczy NUS (*Time Resolved NUS (TR-NUS)*) został zaproponowany przez Orekhova i współpracowników [3]. Idea podejścia opiera się na zarejestrowaniu sygnału NUS próbkowanego losowo równoległe do procesu zachodzącego w próbce. Zestaw danych jest następnie dzielony na podzbiory odpowiadające kolejnym momentom czasu rzeczywistego. Każdy z podzbiorów służy do rekonstrukcji widma, które stanowi “klatkę” w “filmie” obrazującym zmiany zachodzące w widmie w wyniku reakcji.

Sposób realizacji W ramach niniejszej pracy udoskonalałam oryginalną technikę TR-NUS przez zastosowanie algorytmów przetwarzania danych opartych na skompresowanym próbkowaniu (*compressed sensing, CS*). CS jest grupą metod rekonstrukcji widma z danych NUS opartych na założeniu, że powstające widmo jest *rzadkie* lub *kompresowalne*. Założenie takie jest dość dobrze spełnione w przypadku widm NMR, które zazwyczaj składają się ze stosunkowo niewielkiej liczby pików w dziedzinie częstości (w porównaniu z jej rozmiarem). Zastosowanie CS w przetwarzaniu TR-NUS zapewnia dużo lepsze efekty niż oryginalna

metoda dekompozycji wielowymiarowej [3], ale wymaga optymalizacji parametrów takich jak: rodzaj próbkowania, wielkość “klatki”, dopuszczalne zmiany amplitudy pików etc. Analiza widma przypominającego “film”, choć potencjalnie dostarczająca wielu nieoczywistych informacji, jest również nietrywialna.

Głównymi celami niniejszej pracy było:

- Wprowadzenie wariantu TR-NUS opartego na przetwarzaniu danych za pomocą CS i zastosowanie go w monitorowaniu reakcji zachodzących w skomplikowanych mieszaninach lub próbkach makromolekuł.
- Zaproponowanie technik przetwarzania sygnału o optymalnej rozdzielczości czasowej i czułości.
- Opracowanie technik analizy widma otrzymanego z TR-NUS.
- Teoretyczna analiza kształtu linii i artefaktów.

Wyniki W początkowym etapie moich badań zastosowałam TR-NUS do monitorowania wywołanego temperaturą procesu rozwijania dwóch niewielkich białek globularnych (ubikwityny ludzkiej i domeny SH3 białka alfa-spektryny kurzej). Próbki mierzonego czasu t_1 w eksperymencie ^{15}N HSQC było prowadzone równoległe do liniowej zmiany temperatury. Po przetworzeniu danych TR-NUS za pomocą algorytmów CS, położenia i intensywności pików zostały porównane z klasycznym eksperymentem. Został też oceniony empirycznie wpływ rozmiaru “podzbioru” na jakość widma. Efektem prac była publikacja w piśmie *ChemPhysChem*. [4].

Powodzenie metody w projekcie skłoniło mnie do zastosowania jej w analizie chemicznej produktów reakcji enzymatycznych zachodzących w mieszaninach pochodzenia naturalnego. Jako przykładu użyłam reakcji fermentacji alkoholowej i mlekowej zachodzącej w roztworach mąki pszennej oraz mleka. Opracowałam protokół eksperymentalny, skrypty służące analizie widm TR-NUS (“śledzeniu” pików od klatki do klatki) oraz sposób zwiększenia rozdzielczości czasowej *post factum*. Ponadto, zaproponowałam użycie metody analizy korelacyjnej STOCSY [5][6], standardowo stosowanej w seryjnych pomiarach jednowymiaro-

wych, w analizie otrzymanych wykresów intensywności pików widmowych. Zastosowanie STOCSY umożliwiło rozdział widma mieszaniny na “pod-widma” związków zaangażowanych w niezależne reakcje chemiczne. Wyniki badań zostały opublikowane w piśmie *Analytical Chemistry*. [7]

Obserwowane w obu powyższych projektach stosunkowo duże wahania amplitudy pików nie mogły być wytłumaczone wyłącznie zjawiskiem niedoskonałej rekonstrukcji sygnału NUS. Widma TR-NUS zawierają dodatkowe artefakty związane z amplitudą sygnału zmieniającą się w ramach jednego podzbioru. Eksperymentalne i teoretyczne zbadanie tego zjawiska było następnym zadaniem realizowanym w ramach niniejszej pracy. Modelowym układem do badania tego zagadnienia było widmo 2D NOESY zdominowane przez silne piki diagonalne. Aby wywołać kontrolowaną, liniową zmianę amplitudy pików, pośrednio mierzony czas t_1 był zmieniany losowo. Czas mieszania był zmieniany liniowo równoległe do inkrementowania TR-NUS. Uzyskane wyniki stosunku sygnału do artefaktów dla różnych szybkości inkrementacji były porównane z zależnościami uzyskanymi w wyniku rozważań teoretycznych. Praca została opublikowana w *Journal of Magnetic Resonance*. [8]

Rozszerzeniem badań teoretycznych była praca nad właściwościami algorytmów CS dotycząca dopuszczalnego poziomu próbkowania sygnału i jego zależności od liczby pików w widmie. Badania te, prowadzone w oparciu o powszechnie stosowane widma ^{13}C HSQC oraz NOESY prowadziły do wyników zgodnych z teorią CS, ale sprzecznych z ugruntowanym (fałszywym) przeświadczeniem o zależności trudności rekonstrukcji od poziomu próbkowania NUS mierzonego względem pełnej siatki (a nie, jak mówi teoria, liczby pików). Wyniki analiz stały się częścią większego przeglądu opublikowanego w *Journal of Biomolecular NMR*. [9]

Powodzenie metody w badaniach chemicznych i zrozumienie jej ograniczeń spowodowały, że można było myśleć o rozszerzeniu jej zastosowań na trudniejsze przypadki, np. problemy mikrobiologii. Jako przykład wybrałam rzeczywisty problem występujący w kosmetologii, mianowicie działanie środków antybakte-

ryjnych na szczep *Propionibacterium acnes* wywołujący trądzik. Badanie metabolizmu kolonii bakterii *in situ* zmieniającego się pod wpływem dodatku toniku antybakteryjnego stało się możliwe dzięki użyciu TR-NUS. We współpracy z Dr Irena Eris S.A. przebadano szereg czynników antybakteryjnych i zaproponowano protokół oparty na eksperymentach TR-NUS: 2D TOCSY i 2D HSQC. Ten ostatni miał zastosowanie w przypadku kolonii żywionych znakowaną wzbogacaną w ^{13}C glukozą. Praca została wysłana niedawno do *Frontiers in microbiology*.

Jako perspektywę przyszłych udoskonaleń przeanalizowałam możliwość użycia transformacji Radona w przetwarzaniu widm w których zachodzi liniowa zmiana położenia pików. Wstępne badania, oparte na serii pomiarów 1D i 2D ^{15}N HSQC wskazują, że możliwe jest znaczne wzmocnienie czułości pomiaru lub jego przyspieszenie. Co ciekawe, podejście jest oparte na klasycznym próbkowaniu, a zatem nie posiada ograniczeń związanych z rekonstrukcją CS. Praca jest w przygotowaniu, wyniki są zebrane w rozdziale "Perspectives" niniejszej rozprawy.

Wnioski Zaproponowana metoda okazała się efektywnym rozwiązaniem w wielu problemach: od chemii analitycznej do mikrobiologii. Jej dalsze udoskonalenia stały się tematem kolejnego projektu, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach programu OPUS 9, "Czasorozdzielcza N-wymiarowa spektroskopia do monitorowania procesów fizycznych i chemicznych" realizowanego w zespole dr hab. Krzysztofa Kazimierczuk. Wnikliwa analiza jej ograniczeń pozwoliła sformułować również alternatywny plan zastosowań transformacji Radona w badaniach czasorozdzielczych.

Warto podkreślić, że zaproponowane rozwiązanie jest znacznie prostsze w użyciu niż konkurencyjne metody spektroskopii "dwuwymiarowej jednoskanowej" [10] lub opartej na szybkim próbkowaniu [11]. Nie wymaga modyfikacji sekwencji impulsowych ani zastosowania specjalnej aparatury.

Literatura

- [1] Patrick Giraudeau and Lucio Frydman. Ultrafast 2D NMR: An Emerging Tool in Analytical Spectroscopy. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 7(1):129–161, 2014.
- [2] M. Billeter and V. Orekhov. *Novel Sampling Approaches in Higher Dimensional NMR*, volume 316. Springer Berlin Heidelberg, 2012.
- [3] Maxim Mayzel, Joakim Rosenl ow, Linn ea Isaksson, and Vladislav Y Orekhov. Time-resolved multidimensional NMR with non-uniform sampling. *Journal of Biomolecular NMR*, 58(2):129–139, 2014.
- [4] Wolfgang Bermel, Rupashree Dass, Klaus-Peter Neidig, and Krzysztof Kazimierczuk. Two-Dimensional NMR Spectroscopy with Temperature-Sweep. *ChemPhysChem*, 15(11):2217–2220, may 2014.
- [5] Timothy M.D. Ebbels and Rachel Cavill. Bioinformatic methods in NMR-based metabolic profiling. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 55(4):361–374, nov 2009.
- [6] Caroline J Sands, Muireann Coen, Anthony D Maher, Timothy M D Ebbels, Elaine Holmes, John C Lindon, and Jeremy K Nicholson. Statistical Total Correlation Spectroscopy Editing of ^1H NMR Spectra of Biofluids: Application to Drug Metabolite Profile Identification and Enhanced Information Recovery. *Analytical Chemistry*, 81(15):6458–6466, 2009.
- [7] Rupashree Dass, Wiktor Kozminski, and Krzysztof Kazimierczuk. Analysis of complex reacting mixtures by time-resolved 2d NMR. *Analytical Chemistry*, 87(2):1337–1343, 2015.
- [8] Rupashree Dass, Paweł Kasprzak, Wiktor Kozminski, and Krzysztof Kazimierczuk. Artifacts in time-resolved NUS: A case study of NOE build-up curves from 2D NOESY. *Journal of Magnetic Resonance*, 265:108–116, 2016.

- [9] Alexandra Shchukina, Paweł Kasprzak, Rupashree Dass, Michał Nowakowski, and Krzysztof Kazimierczuk. Pitfalls in compressed sensing reconstruction and how to avoid them. *Journal of Biomolecular NMR*, 2016.
- [10] Assaf Tal and Lucio Frydman. Single-scan multidimensional magnetic resonance. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 57(3):241–292, 2010.
- [11] Paul Schanda. Fast-pulsing longitudinal relaxation optimized techniques: Enriching the toolbox of fast biomolecular NMR spectroscopy. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 55(3):238–265, 2009.

Mgr Rupashree Dass ur. 10.11.1990 jest absolwentką Wydziału Chemii, Kirori Mal College, Uniwersytetu w Delhi (rok ukończenia: 2013). Studia II stopnia ukończyła z wynikiem „first division” **Studia doktoranckie rozpoczęła w 2013 roku w Wydziale Chemii UW**. Pracę doktorską realizuje w laboratorium spektroskopii NMR w Centrum Nowych Technologii UW pod opieką naukową dr. hab. Krzysztofa Kazimierczuka. **Jest autorką 4 publikacji naukowych w tym 4 publikacji z listy filadelfijskiej. Sumaryczny IF prac wynosi 14.686.** Najważniejsze z nich to:

1. Two-dimensional NMR spectroscopy with temperature Sweep.W. Bermel, R. Dass, K.P. Neidig, K. Kazimierczuk, ChemPhysChem,2014, 15: 2217-2220 doi: 10.1002/cphc.201402191

2. Analysis of Complex Reacting Mixtures by Time-Resolved 2D NMR, R. Dass , W. Koźmiński , K. Kazimierczuk, Anal Chem, 2015, 87(2) , 1337-1343, DOI: 10.1021/ac504114h

3. Artifacts in time-resolved NUS: A case study of NOE build-up curves from 2D NOESY, R Dass, P. Kasprzak,W. Koźmiński, K. Kazimierczuk, J. Magn. Res. 2016, 265, 108-116, doi:10.1016/j.jmr.2016.01.025

4. Pitfalls in compressed sensing reconstruction and how to avoid them, A. Shchukina, P. Kasprzak, R. Dass, M. Nowakowski, K. Kazimierczuk, J Biomol NMR ,2016, doi:10.1007/s10858-016-0068-3

Jest (współ)autorką 2 wykładów, 3 komunikatów ustnych oraz 4 komunikatów posterowych na konferencjach zagranicznych jak również 3 komunikatów ustnych oraz 1 komunikatu posterowego na konferencji krajowej. Była kierownikiem grantu naukowego DSM oraz wykonawcą grantu naukowego SONATA BIS 2, „Rzadkie i prawie-rzadkie reprezentacje w problemach spektroskopii NMR”. Otrzymała następujące stypendia i nagrody: stypendium KNOW 2015/16 i Nagrodę wydawnictwa Wiley za najlepszy plakat (SMASH NMR conference,20-23 September 2015, Baveno, Italy).

Publikacji

1. Two-Dimensional NMR spectroscopy with Temperature Sweep, W Bermel, **R Dass**, K P Neidig, K Kazimierczuk, *ChemPhysChem*, 2014-15, 2217-2220
2. Analysis of Complex Reacting Mixtures by Time-Resolved 2D NMR, **R Dass**, W Koźmiński, K Kazimierczuk, *Analytical Chemistry* 2015 87 (2), 1337-1343
3. Artifacts in time-resolved NUS: A case study of NOE build-up curves from 2D NOESY, **Rupashree Dass**, Paweł Kasprzak, Wiktor Koźmiński, Krzysztof Kazimierczuk, *J. Magn. Res.* doi:10.1016/j.jmr.2016.01.025
4. Pitfalls in compressed sensing reconstruction and how to avoid them , Alexandra Shchukina, Paweł Kasprzak, **Rupashree Dass**, Michał Nowakowski, Krzysztof Kazimierczuk, *J Biomol NMR*, DOI 10.1007/s10858-016-0068-3

Konferencji:

1. Two-Dimensional Movie NMR with temperature sweep, Bio-NMR Conference, 5-8 May 2014, Warsaw, Poland
2. Two-Dimensional Movie NMR with temperature sweep, Ampere NMR School, 22-28 June 2014, Zakopane, Poland
3. Two-Dimensional Movie NMR with temperature sweep, Euromar, 29 June-3 July 2014, Zurich, Switzerland
4. Time resolved 2D NMR for studying chemical reactions, Instytut Chemii Organicznej PAN, 25 September 2014, Warsaw
5. Two-Dimensional Movie NMR with temperature sweep, 11-13 Nov 2014, Swedish NMR meeting, Gothenborg, Sweden
6. Analysis of Complex reacting mixtures with Time resolved NMR , Magnetic Moments in Central Europe, 27 Feb- 2 March 2015, Krynica, Poland
7. Analysis of Complex reacting mixtures with Time resolved NMR, Ampere NMR school, 14-20 June 2015, Zakopane, Poland
8. Implementation of Non Uniform Sampling to monitor magnetisation transfer , Euromar, july -july 10, 2015, Prague, Czech Republic
9. Implementation of Non Uniform Sampling to monitor magnetisation transfer, SMASH, 20-23 September 2015, Baveno, Italy
10. Application of Non Uniform Sampling to monitor in-vivo processes, SMASH, 14 September 2016, San Diego, USA
11. Application of Non Uniform Sampling to monitor in-vivo processes, Instytut Chemii Organicznej PAN, 28 September 2016, Warsaw,

12. Sensitivity enhancement by a Radon like transform, Magnetic Moments in Central Europe, 12
March 2017, Budapest, Hungary