

Prof. dr hab. Andrzej Ejchart  
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN  
Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa  
aejchart@ibb.waw.pl

Warszawa, dn. 08.06.2017

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Rupashree Dass zatytułowanej:  
*Time-resolved multidimensional NMR spectroscopy with non uniform sampling*

Recenzowana rozprawa doktorska mgr Rupashree Dass została wykonana i napisana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego a jej promotorem był dr Krzysztof Kazimierczuk, który jest jednym z wiodących specjalistów w dziedzinie nowoczesnych metod detekcji w magnetycznym rezonansie jądrowym (NMR).

Jednym z wielu licznych zastosowań NMR jest wyznaczanie przestrzennych struktur cząsteczek, dynamika cząsteczkowa oraz badanie oddziaływań międzycząsteczkowych. Te zastosowania stają się szczególnie ważne w badaniach układów biologicznych w warunkach bliskich do warunków fizjologicznych, zwłaszcza układów stosunkowo małych z biologicznego punktu widzenia, o masach do 40 kDa. Jednak całkowity czas niezbędny do wykonania wszystkich niezbędnych do tego celu wielowymiarowych widm NMR jest długi. Czasem jest to zbyt długi czas ze względu na ograniczoną trwałość materiału biologicznego lub stabilność spektrometru. Skrócenie czasu pomiarów można osiągnąć stosując niejednorodne próbkowanie (NUS). Metoda NUS pozwala na znaczną oszczędność czasu przy zachowaniu lub w pewnych przypadkach nawet poprawie rozdzielczości widmowej w wymiarach z detekcją pośrednią w porównaniu do metod standardowych stosujących próbkowanie jednorodne. Z drugiej strony mankamentem NUS jest pojawianie się zakłóceń wymagających stosowania skomplikowanych algorytmów czyszczących widma. Dr Krzysztof Kazimierczuk i jego współpracownicy od wielu lat prowadzą badania w tej dziedzinie wprowadzając między innymi do spektroskopii NMR metodę przetwarzania sygnałów zwaną *compressed sensing* (CS). Kolejnym ważnym krokiem w rozwoju metody NUS była adaptacja do NMR techniki rozdzielczej czasowo (TR). Widma TR NUS pozwalają na pomiar i ilościową ocenę zmian zachodzących w widmach na skutek procesów zależnych od czasu lub zmiennych warunków fizycznych jak n.p. temperatura.

Główne cele recenzowanej rozprawy zostały przez autorkę sformułowane w sposób następujący: wprowadzenie wariantu TR NUS opartego na CS i zastosowanie go do

monitorowania złożonych reakcji chemicznych, znalezienie takiej metody przetwarzania sygnału, która równocześnie poprawiałaby rozdzielczość czasową oraz jej czułość, stworzenie metod pozwalających na analizę widm pseudo 3D mierzonych techniką TR NUS i wreszcie wykonanie teoretycznej analizy zależności pomiędzy kształtem sygnału a wielkością zakłóceń.

Rozprawa składa się z czterech części, dodatków zawierających część doświadczalną i programy pomocnicze stosowane przez autorkę oraz kopie czterech publikacji zawierających większą część wyników otrzymanych w trakcie wykonywania pracy doktorskiej. Pierwsza część, **Introduction**, zawiera opisy podstaw wielowymiarowej spektroskopii NMR, niejednorodnego próbkowania, CS oraz wprowadzenie podejścia rozdzielczo czasowego do spektroskopii NMR. W części drugiej, **Methods**, wyjaśnione zostały bardziej szczegółowo założenia TR NUS oraz przedstawiona została szczegółowa analiza zależności pomiędzy amplitudą sygnału a wielkością zakłóceń wprowadzanych przez NUS. Trzecia część, **Application**, zawiera opisy zastosowania TR NUS do ilościowych badań rozwijania białek pod wpływem zmiany temperatury, przebiegu reakcji biochemicznych i metabolizmu bakteryjnego oraz wyznaczanie procesu narastania magnetyzacji w widmach NOESY mierzonych metodą TR NUS. Czwarta część, **Perspectives**, zawiera krótkie opisy trzech interesujących tematów: zaadoptowanie TR NUS do małych spektrometrów "biurkowych", naprzemienny pomiar różnych typów widm NMR w jednym bloku pomiarowym oraz zastosowanie transformacji Radona w spektroskopii NMR.

Opis metod przedstawionych w pierwszej części jest zwięzły i klarowny. Wyczerpująco zostały przedstawione informacje niezbędne do zrozumienia kolejnych części rozprawy. Niemniej można w tej części znaleźć kilka nieprecyzyjnych sformułowań i drobnych błędów. N.p. na str. 4 fragment "R<sub>k</sub> is the relaxation rate" należy dodać słowo "transverse". Brakuje definicji symbolu  $\eta_{IS}$  w równaniu (5) na str. 8. Na rys. 4 (str. 8) brakuje wyjaśnienia skali osi rzędnych a przedstawiony na tym rysunku przebieg wydaje się niemożliwy do realizacji w jakimkolwiek pomiarze NOE. Termin "virtual echo" (str. 18) ściśle związany z rzadkim próbkowaniem widm NMR powinien być wyjaśniony bardziej szczegółowo. Na rys 8 ze str. 19 oś rzędnych została omyłkowo oznaczona jako <sup>1</sup>H a nie <sup>13</sup>C. Co ciekawe, podobny błąd znajduje się w publikacji zawierającej ten materiał.

Krótką drugą część zawiera opis techniki TR NUS a także omówione zostały niektóre ważne czynniki mające wpływ na jakość otrzymywanych widm. Są to rozmiar podzbioru danych wykorzystywanych w rekonstrukcji widma z wykorzystaniem metody CS, zminimalizowanie problemów wynikających ze sprzeczności pomiędzy intensywnością

sygnału a rozdzielczością czasową i wielkością zakłóceń. Ponadto skrótowo omówiono ogólną ideę statystycznego TOCSY (STOCSY) oraz trudności we włączeniu techniki TR do tej metody. Ta część razem z poprzednią tworzą znakomite przygotowanie do następnej części rozprawy. Drobne zastrzeżenie do tej części dotyczy braku wyjaśnień dwóch skrótów. Skrót BT-HNCO został użyty w tekście dwukrotnie (str. 25, 26) bez komentarza. Nawet rozszyfrowanie BT jako Best TROSY wymaga kilku słów wyjaśnienia oraz odpowiedniego odnośnika literaturowego. Drugi skrót, MDD, posiada co prawda odnośnik literaturowy, ale wydaje się, że należało podać, że MDD jest wyspecjalizowanym pakietem oprogramowania.

Główna trzecia część rozprawy poświęcona jest zastosowaniom metody TR NUS.

Pomiary i wyniki temperaturowego rozwijania białka były wykonane na dwóch małych białkach, domenie SH3 kurzej alfa spektryny i ludzkiej ubikwityny. Ciągłe zmiany przesunięć chemicznych lub wielkości sygnałów były wyznaczane z widm zmierzonych metodą TR NUS i porównane z otrzymanymi z zestawu widm zmierzonych standardowo. Porównanie wykazało zgodność ilościową obu metod. Należy jednak brać pod uwagę poszerzenie sygnałów wynikające z rekonstrukcji widm z jednowymiarowych składowych zmierzonych w różnych temperaturach. Mimo stwierdzenia, że "the conventional approach took more experimental time" nie podany został liczbowy wynik określający ten zysk czasowy. Wyniki tych badań zostały opublikowane.

Śledzenie przebiegu reakcji biochemicznych były badane na przykładach fermentacji mąki pszennej oraz fermentacji mleka. Ponieważ jednowymiarowe widma  $^1\text{H}$  często wykazują niedostateczną rozdzielczość widmową powoduje to konieczność stosowania dwuwymiarowych widm  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  HSQC i w konsekwencji analizy widm pseudo 3D z czasem reakcji w trzecim wymiarze. Na końcu tego rozdziału znajduje się stwierdzenie: "TR-NUS implemented with CS processing in a 2D experiment, is a much better alternative than using  $^1\text{H}$  NMR for monitoring fast reactions involving complex mixtures". Czy naprawdę zastosowana metoda jest znacznie lepsza niż rozdzielenie nałożonych sygnałów o znanym kształcie i położeniu w widmach jednowymiarowych?

Ilościowe wyznaczenie objętości sygnałów korelacyjnych w serii widm NOESY w celu obliczenia prędkości relaksacji wzajemnej wykorzystywanej do wyznaczania odległości międzyjądrowych jest zawsze zadaniem trudnym. Dlatego zastosowano TR NUS w widmach NOESY, aby wyznaczyć objętości sygnałów korelacyjnych w sposób ciągły. Zminimalizowano największą napotkaną przeszkodę - zakłócenia zniekształcające wyznaczone objętości sygnałów korelacyjnych. To podejście było badane przy wykorzystaniu próbki strychniny a wyniki porównano z wynikami otrzymanymi z serii standardowo

zmierzonych widm NOESY. Uwagi recenzenta do tej części są następujące. Na str. 51 napisano: "mixing time is changed linearly with every  $t_1$  point". Taka modyfikacja sekwencji NOESY została po raz pierwszy wprowadzona w roku 1982 pod nazwą *accordion spectroscopy*. Byłoby dobrze wspomnieć o tym. Ponadto dlaczego rys. 28 i tabela 2 znajdują się w odległych miejscach tekstu. Tabela 2 jest umieszczona na str. 53 a rys. 28 na str. 61, podczas gdy oba są omawiane na str. 59.

Na końcu tego rozdziału znajduje się stwierdzenie: "NOESY provides results in shorter time than conventional experiments. The resulting internuclear distance values have greater accuracy than those obtained from conventional experiments." Podobnie jak poprzednio nie podano ile wynosi deklarowany zysk czasowy. Ponadto opierając się na liczbach podanych w tabeli 2 druga część przytoczonego stwierdzenia wydaje się nieprawdziwa.

Dwie uwagi ogólne dotyczące rozprawy jako całości to po pierwsze, brak spisu skrótów mimo, że nie stanowi usterki merytorycznej jest utrudnieniem przy lekturze tekstu. Ze względu na wysoce specjalistyczną tematykę, niektóre skróty mogą być nieznane nawet specjalistom z dziedziny spektroskopii NMR. Po drugie fragmenty tekstu przedstawiające jakąś tematykę są rozrzucone po całej rozprawie, co utrudnia jej czytanie.

Pomimo tych drobnych uwag krytycznych oceniam bardzo wysoko poziom naukowy przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej. Naukowe cele rozprawy zostały osiągnięte a jej wyniki należy uznać na znaczące, co pozwala na wykorzystanie ich w dalszym rozwoju spektroskopii NMR. Wyniki przeprowadzonych badań były regularnie publikowane w znaczących, recenzowanych czasopismach naukowych i znajdowały oddźwięk w środowisku osób pracującym w dziedzinie NMR.

W oparciu o wyrażoną powyżej opinię stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymogi określone w artykule 13 ustawy z dnia 14.03.2003 stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie mgr Rupashree Dass do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Andrzej Ejchart