



UNIVERSITY OF GOTHENBURG  
THE SWEDISH NMR CENTRE

Göteborg 2017-06-12

Prof. Dr. Vladislav Orekhov  
Department of Chemistry and Molecular Biology  
University of Gothenburg, Sweden  
tel: +46 (0) 31 786 3886  
E-mail: [orov@nmr.gu.se](mailto:orov@nmr.gu.se)

Prof. Dr. Kryszynski  
Chairperson of the Committee  
for doctoral studies Faculty of  
Chemistry  
University of Warsaw, Poland

**Reviewer report on the doctoral thesis entitled „Time resolved multidimensional NMR spectroscopy with Non-Uniform Sampling" submitted by Rupashree Dass**

Since invention of the multi-dimensional Fourier NMR spectroscopy by Richard Ernst and Jean Jeener in the beginning of 70<sup>th</sup>, the NMR have been a very vibrant field of research, where ever more powerful techniques and new diverse applications were introduced. Present-day NMR is an indispensable analytical tool in chemistry, molecular and structural biology, medicine, pharmaceutical and food industries, and in many other fields of industry and research. Even without the NMR applications in medical imaging, the world market of NMR instruments and services reaches billions of euros every year. NMR experiments provide detailed atomic-level information about chemical composition, covalent and tertiary molecular structure, as well as about molecular interactions and atomic (structural) motions. It is possible to study motions both in the equilibrium state, e.g. Brownian translations, rotations, and transitions between energetically close states, as well as to monitor unidirectional changes such as those happening during chemical reactions. The latter analysis is the scope of the time-resolved spectroscopy (TR) and is the focus of thesis presented by Rupashree Dass.

In a TR experiment, one needs to achieve appropriate resolution in time coordinate of the studied processes. This is often in contradiction with the traditional NMR requirement of achieving sufficient sensitivity and spectral resolution, because both demand repetition of measurements and thus extended

measurement time. In her thesis, Rupashree Dass looked for the solution to this challenge in the rapidly developing field of optimal sampling and novel signal processing of NMR signal.

The thesis consists of five parts. The first part introduces multi-dimensional NMR, theory of non-uniform sampling (NUS), signal processing with compressed sensing (CS), and specific aspects of TR-NMR for following chemical reactions. Parts II and III describe methods used in the work and several show-case applications performed by Rupashree Dass. The last two parts outline perspectives and possible follow-ups of the work and contain supplementary details of the experiments and used/developed software.

Chapter I of the thesis is an introduction. Of course, in 20 pages it is not possible to describe consistently and in sufficient details theory behind the NMR spectroscopy and modern signal processing. Nevertheless, the chapter serves its purpose and the proportions and selection of the techniques and algorithms are balanced and reasonable. In some places of the chapter, I was surprised by formulations and sometimes had to read the sentences twice. This can be understood partly because of the conciseness of the introduction and necessity of the shortcuts in the presentation. I do not put much importance to this aspect of the thesis and below give a few examples, just to be more specific.

[Page 3] “the nuclear spins start to gradually orient themselves to precess around the axis of the applied field” – this looks as a clear oversimplification and shortcut in explaining behaviour of the quantum mechanical system of spins.

[Page 13] “the number of points in  $S$  and  $s$  are the same and the system of equations (7) is unique.” – I’d like to see that the solution is “unique”, not the “system of equations”.

[Page 15] “In an NMR measurement, only the number of peaks and locations matter.” – this is of course an oversimplification. NMR is a quantitative technique and a great deal of its applications relies on quantification of peak intensities and integrals.

[Page 21] “Titrations ... can clearly help to distinguish between reactants, products and short-lived intermediates.” – I am not sure if the titration, which is “a linear increase of concentration of one of the species” is very useful in distinguishing and quantifying “short-lived intermediates”.

For the discussion, I have the a question regarding Eq 1 on page 4. Is this the exact formula for an FID or a simplification? For example, how large is  $N$  for describing signal of  $H_2O$  in practical spectrum of a sample in water?

[Page 17] “sampling requirements are between  $2K$  of  $l_0$  norm and  $K \log(N/K)$  of  $l_1$  norm” From this sentence, I do not quite follow the advantage the  $l_0$  norm, because for a realistic sparse level of  $N/K=10$ ,  $\log(N/K)=1$  and the sampling requirements of the second expressions is  $K$ , i.e. lower than  $2K$  for the  $l_0$  norm.

Chapter II “Methods”, as it says, describes the methods used in the PhD study. It also presents the main theoretical results of the thesis, because most of the used methodology was developed during the work described in the thesis.

My question concerns p 4.2 on page 28. The first “n” points in Eqs 18 and 19 are needed mostly to meet the CS sampling conditions and should (hopefully) have little effect at the peak intensity measured using the much smaller “k” points. Would you agree that “n” points are used as support and thus the approach seems related to the co-processing (co-mdd) of several time frames used in the original publication on the TR-NUS-NMR.

Chapter III “Applications”, describes experimental results of the study, which are showcase demonstration of the developed TR-NUS methodology. The chapter is easy to read and it largely repeats the materials presented in the peer reviewed research papers published by the author of thesis. Without having any real criticism here, I have a few questions for clarifying several points in the presentation.

[Page 40] “The D2 peak volume drops quickly with increase in temperature due to increased relaxation.” It would be good to hear what author understand by “relaxation” and why does she assumes that the relaxation increases with temperature. For me, it seems that the author uses terms “relaxation” and line-broadening as synonyms.

[Page 40] “ ... unwanted line broadening due to higher temperature averaging effects. This can be prevented by using slower temperature sweep ... “. What does limit the rate of the temperature sweep? It seems that slow sweep rate improves the results. So, why doing it fast?

The last part in the chapter III apparently has not been published yet. Was it? This is an interesting work to which I have several questions.

[Page 63] “No spectral changes were observed over time, showing that D2O does not affect bacterial cellular processes.” It is difficult to believe that bacteria are completely indifferent to D2O. Would it be possible to perform (at least some) experiments in H2O?

[Page 63] When monitoring processes in vivo, it is always interesting to know if the observed molecules are located inside living cells, are in the growing media or in dead cells. Is this relevant for your study? Could you suggest how to distinguish these scenarios?

[Page 64] “at low concentrations the face tonic aids bacterial growth (!)” This statement indeed deserves the exclamation sign. Could you suggest a plausible explanation or additional experiments in order to double check you finding? Was the conclusion based on statistically significant data?

Chapter IV of the thesis is called “Perspectives”. It apparently includes unpublished yet interesting results obtained by the author during her PhD studies.

The most extended and detailed is paragraph 12 of the chapter III. It describes very promising application of Radon transform for TR (NUS) studies. I mostly agree with the arguments and have only a minor technical question concerning the text.

[Page 77] “Each fid is multiplied by a phase factor of  $\Delta\omega$  in any or both of the dimensions. ... In Fig. 44 the fids have been multiplied by  $\Delta\omega$  only in the direct dimension.” Was it a problem to multiply the FIDs by  $\Delta\omega_1$  and  $\Delta\omega_2$  in both dimensions of the HSQC spectrum? I assume that the peaks were moving with temperature in both dimensions.

In conclusion, the thesis of Rupashree Dass is devoted to the development of a new approach for time-resolved NMR. The work introduces new methodology that significantly extend the NMR toolbox in chemical and biochemical applications. It has also clear prospects in food industry and biotechnology. The new methodology stems from the most recent advances in non-uniform sampling and fast NMR and is a true step forward in the NMR field. I am sure that in the future we will see important follow ups, extensions, and applications of the approach and ideas presented in the thesis. The thesis is clearly written and well-illustrated by figures. Most of the results are really novel, have been published in respected peer-reviewed journals and are absolutely credible.

Based on this thesis, I would like to recommend awarding to Rupashree Dass PhD degree with distinction.



Vladislav Orekhov  
Professor, Dr.

Recenzja pracy doktorskiej mgr Rupashree Dass pt.: „Czasorozdzielcza wielowymiarowa spektroskopia NMR z próbkowaniem niejednorodnym”

Od czasu wynalezienia wielowymiarowej spektroskopii NMR z transformacją Fouriera przez Richarda Ernsta i Jeana Jennera na początku lat 70tych, NMR stał się tętniącą życiem dziedziną nauki, do której wprowadzano nawet bardziej zaawansowane techniki i zróżnicowane zastosowania. Współczesny NMR jest unikalnym narzędziem chemii analitycznej, biologii molekularnej i strukturalnej, medycyny, przemysłu farmaceutycznego, żywnościowego i wielu innych. Nawet pomijając zastosowania NMR w obrazowaniu medycznym, światowy rynek sprzętu i usług NMR osiąga każdego roku miliardy euro. Eksperymenty NMR dostarczają szczegółowej (z rozdzielczością atomową) informacji o składzie chemicznym, strukturze kowalencyjnej i trzeciorzędowej, jak również o oddziaływaniach międzycząsteczkowych i ruchach atomów. Umożliwiają one badanie ruchów zarówno w stanie równowagowym, takich jak np. ruchy Browna, rotacje, przejścia między bliskimi stanami energetycznymi, jak i monitorowanie przemian zachodzących w wyniku reakcji chemicznych. To właśnie te ostatnie są główną dziedziną zastosowań spektroskopii czasorozdzielczej i przedmiotem badań przedstawionych w pracy doktorskiej mgr Rupashree Dass.

W eksperymencie czasorozdzielczym (time-resolved, TR), należy osiągnąć rozdzielczość czasową odpowiednią dla tempa zachodzących procesów. Stoi to często w sprzeczności z tradycyjnymi wymaganiami stawianymi spektroskopii NMR, tj. odpowiednią czułością i rozdzielczością widmową, ponieważ obie wymagają seryjnego powtarzania pomiaru, a zatem długiego czasu eksperymentu. W swojej pracy doktorskiej, Rupashree Dass szukała rozwiązania tego problemu w gwałtownie rozwijających się technikach optymalnego próbkowania i nowoczesnych technikach przetwarzania sygnału.

Praca składa się z pięciu części. Pierwsza z nich wprowadza czytelnika w zagadnienia wielowymiarowej spektroskopii NMR, teorii niejednorodnego próbkowania (NUS), przetwarzania sygnału za pomocą skompresowanego próbkowania (CS) i aspektów TR-NMR związanych z monitorowaniem reakcji chemicznych. Części II i III opisują metody zastosowane w pracy i szereg przypadków zastosowań zaimplementowanych przez mgr Rupashree Dass. Ostatnie dwie części zarysowują perspektywy i możliwe następstwa pracy oraz zawierają suplement opisujący szczegóły eksperymentów i użyte lub rozwijane oprogramowanie.

Rozdział I stanowi wstęp. Oczywiście, spójne i wyczerpujące opisanie teorii spektroskopii i nowoczesnych technik przetwarzania sygnału NMR na 20 stronach jest niemożliwością. Tym niemniej, wstęp spełnia swoje zadanie, a proporcje i wybór omawianych technik i algorytmów są wyważone i rozsądne. W niektórych miejscach wstępu byłem zaskoczony sformułowaniami i czasem musiałem przeczytać zdanie po raz drugi. Może to być częściowo zrozumiałe, ze względu na zwięzłość wstępu i potrzebę dokonywania skrótów. Nie przykładam wielkiej wagi do tego aspektu pracy i jedynie dla ścisłości podaję poniżej kilka przykładów:

[strona 3] “the nuclear spins start to gradually orient themselves to precess around the axis of the applied field” - wygląda to na przesadne uproszczenie i skrót myślowy w opisywaniu zachowania kwantowo-mechanicznego układu spinów.

[strona 13] “the number of points in S and s are the same and the system of equations (7) is unique.” - jednoznaczne („unique”) jest raczej rozwiązanie układu równań, a nie sam układ.

[strona 15] “In an NMR measurement, only the number of peaks and locations matter.” – jest to oczywiście przesadne uproszczenie. NMR jest techniką ilościową i wiele z jego zastosowań opiera się na ocenie intensywności pików i całek.

[strona 21] “Titrations ... can clearly help to distinguish between reactants, products and short-lived intermediates.” – Nie jestem pewien, czy miareczkowanie które jest liniowym zwiększaniem stężenia jednego ze związków (“a linear increase of concentration of one of the species”) jest rzeczywiście bardzo użyteczne w rozróżnianiu i ocenie ilościowej krótko-żyjących produktów pośrednich (“short-lived intermediates”).

Jeśli chodzi o dyskusję wyników, to mam pytanie dotyczące równania 1 na stronie 4. Czy jest to dokładny wzór na sygnał FID czy też uproszczenie? Na przykład, jak duże jest  $N$  w przypadku sygnału H<sub>2</sub>O w praktycznym przypadku widma próbki w wodzie?

[strona 17] “sampling requirements are between  $2K$  of 10 norm and  $K\log(N/K)$  of 11 norm”  
Zaletą użycia normy 10 nie wynika z powyższego zdania, gdyż w realistycznych przypadkach poziomu rzadkości  $N/K=10$ , wymagania próbkowania wg drugiego wyrażenia to  $K$ , tzn. niższe niż  $2K$  dla normy 10.

Część II „Methods”, zgodnie z nazwą opisuje metody użyte w przedstawianej pracy. Przedstawia również główne wyniki teoretyczne pracy, ponieważ większość używanej metodologii została opracowana w ramach badań opisywanej w rozprawie.

Pojawia się pytanie dotyczące par. 4.2 na stronie 28. Pierwsze  $n$  punktów w równaniach 18 i 19 jest wymagane głównie aby spełnić wymagania teorii CS i powinny mieć (w idealnym przypadku) niewielki wpływ na intensywność piku mierzoną przy użyciu o wiele mniejszych  $k$  punktów. Czy autorka pracy zgodziłaby się z twierdzeniem, że  $n$  punktów stanowi *support* i w związku z tym podejście wygląda na spokrewnione z metodą co-processingu (co-mdd) wielu klatek, tak jak jest to opisane w oryginalnej pracy o TR-NUS-NMR?

Część III „Applications”, opisuje eksperymentalne wyniki badań, które są przypadkami demonstrującymi rozwój metodologii TR-NUS. Rozdział łatwo się czyta i w większości powieliła on zawartość niezależnie recenzowanych publikacji autorki pracy. Mimo, że nie mam prawdziwie krytycznych uwag do tej części, mam jednak kilka spostrzeżeń wymagających wyjaśnienia.

[strona 40] “The D2 peak volume drops quickly with increase in temperature due to increased relaxation.” Chciałbym zrozumieć, co autorka rozumie pod pojęciem „relaksacji” i dlaczego zakłada ona, że jej szybkość miałaby spadać wraz z temperaturą. Wydaje mi się, że autorka używa zamiennie określeń „relaksacja” i „poszerzenie linii”.

[strona 40] “... unwanted line broadening due to higher temperature averaging effects. This can be prevented by using slower temperature sweep ...”. Co ogranicza szybkość przemiatania temperaturowego? Wygląda na to, że wolne przemiatanie poprawia wyniki. Dlaczego zatem robić to szybko?

Ostatnia część części III nie została jeszcze chyba opublikowana (?). Jest to interesująca praca do której miałbym kilka pytań.

[strona 63] “No spectral changes were observed over time, showing that D<sub>2</sub>O does not affect bacterial cellular processes.” Trudno uwierzyć, że bakterie są zupełnie obojętne na działanie D<sub>2</sub>O. Czy byłoby możliwe przeprowadzenie (przynajmniej części) eksperymentów w H<sub>2</sub>O?

[strona 63] Przy monitorowaniu procesów *in vivo*, zawsze interesujące jest czy badane cząsteczki znajdują się wewnątrz komórek, czy też w ośrodku lub w komórkach martwych. Czy jest możliwe sprawdzenie tego w przedstawionych badaniach? Czy autorka mogłaby zasugerować jak rozróżnić te przypadki?

[strona 64] “at low concentrations the face tonic aids bacterial growth (!)” To twierdzenie rzeczywiście zasługuje na wykrzyknik. Czy autorka mogłaby zasugerować przekonujące wyjaśnienie lub dodatkowe eksperymenty w celu weryfikacji twierdzenia? Czy wniosek ten był wyprowadzony z danych istotnych statystycznie?

Część IV rozprawy zatytułowany jest „Perspectives”. Zawiera on nie opublikowane jeszcze, ale interesujące rezultaty otrzymane przez autorkę w wyniku badań. Najbardziej rozległy i szczegółowy jest paragraf 12 rozdziału III. Opisuje on bardzo obiecujące zastosowanie transformacji Radona do badań typu TR (NUS). Zgadzam się z większością argumentów i mam jedynie drobne techniczne pytanie dotyczące tekstu.

[strona 77] “Each fid is multiplied by a phase factor of  $\Delta\omega$  in any or both of the

dimensions. ... In Fig. 44 the fids have been multiplied by  $\Delta\omega$  only in the direct dimension.” Czy rzeczywiście dużym problemem jest pomnożenie sygnałów FID przez  $\Delta\omega_1$  i  $\Delta\omega_2$  w obu wymiarach widma HSQC? Zakładam, że piki przesuwają się w obu wymiarach wraz ze zmianą temperatury.

Podsumowując, rozprawa mgr Rupashree Dass jest poświęcona rozwojowi nowego podejścia do czasorozdzielczej spektroskopii NMR. Praca wprowadza nową metodologię która znacząco rozszerza zestaw narzędzi NMR do zastosowań chemicznych i biochemicznych. Ma również dobre perspektywy zastosowań w przemyśle żywnościowym i biotechnologii. Nowa metodologia wywodzi się z ostatnich postępów w dziedzinie próbkowania niejednorodnego i szybkiego NMR i jest prawdziwym krokiem naprzód w dziedzinie NMR. Jestem przekonany, że w przyszłości spotkamy się z wieloma ważnymi rozszerzeniami oraz zastosowaniami podejścia i pomysłów zaprezentowanych w pracy. Rozprawa jest dobrze napisana i zilustrowana. Większość wyników jest rzeczywiście nowatorska, została opublikowana w recenzowanych artykułach w uznanych pismach i jest całkowicie wiarygodna.

Na podstawie rozprawy wnioskuję o nadaniu mgr Rupashree Dass tytułu doktora z wyróżnieniem.

Vladislav Orekhov  
Professor, Dr