



Dr hab. Marta Dudek, prof. CBMM
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk
ul. H. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź
tel. (42) 680 32 39
e-mail: mdudek@cbmm.lodz.pl

Łódź, dn. 10.05.2022

RECENZJA

pracy doktorskiej Pana mgr Dariusza Gołowicza

pt. 'Novel methods for acquiring and processing NMR signals with combined sampling of Fourier and non-Fourier dimensions'

Praca doktorska Pana mgr Dariusza Gołowicza została przygotowana pod kierunkiem dr hab. Krzysztofa Kazimierczuka na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Tematyka pracy znakomicie wpisuje się w prowadzone w zespole dr hab. Kazimierczuka badania związane z rozwojem metodologii rejestracji i przetwarzania widm NMR z zastosowaniem niejednorodnego próbkowania (NUS, z ang. *non-uniform sampling*). NUS pozwala na znaczną niejednokrotnie oszczędność czasu pracy spektrometru, a opiera się na idei rejestracji jedynie wybranych punktów pomiarowych, z których zazwyczaj w procesie rekonstrukcji odtwarzane jest pełnowartościowe widmo NMR. Choć pierwsze zastosowanie NUS w pomiarach NMR-owych sięga lat 90tych ubiegłego wieku, metoda ta ciągle jest rozwijana i coraz szerzej stosowana w kolejnych obszarach chemii i biologii strukturalnej. Z drugiej strony, jak Doktorant sam zauważa we wstępie ocenianej pracy doktorskiej, jednorodne próbkowanie sygnału NMR jest wciąż zdecydowanie najbardziej powszechnym sposobem rejestracji widm. Przedstawiona dysertacja ma na celu prezentację szerokiego wachlarza możliwych zastosowań NUS w jego szczególnej postaci czasorozdzielczego NUS (TR-NUS, z ang. *time-resolved NUS*), a także rozwój metodologii TR-NUS, pozwalający na wydajniejszą rejestrację widm w sytuacji zmieniających się warunków zewnętrznych (np. w wyniku zachodzącej w rurce pomiarowej reakcji) lub eksperymentalnych (takich jak zmienna wartość wybranych parametrów stosowanych w sekwencjach pulsowych). Realizacja tak postawionych celów przyczynia się w dużym stopniu do poszerzenia stosowalności tej metody rejestracji widm NMR, jak również do jej propagowania w naukach chemicznych. Warto podkreślić, że aktualność poruszanej przez Doktoranta tematyki została potwierdzona przez przyznanie mu przez Narodowe Centrum Nauki grantu PRELUDIUM.

Praca napisana jest w języku angielskim, co można uznać za jej zaletę, ponieważ jako taka może stanowić cenną pozycję literaturową dla społeczności międzynarodowej. Dodatkowo, zawiera streszczenie w językach polskim i angielskim, zgodnie z wymogami Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. 2018 poz. 1668). Całość obejmuje 208 stron i podzielona jest na 4 główne części: wstęp, część metodologiczną, opis uzyskanych wyników oraz perspektywy rozwoju metod akwizycji i



przetwarzania sygnału NMR. Dość nietypowa wydaje się wzajemna proporcja tych części, z których najdłuższa jest część pierwsza opisująca motywację Doktoranta do podjęcia rozważanych zagadnień, dość obszerną historię rozwoju technik NMR-owych, dobrze umieszczającą pracę Doktoranta w szerszym kontekście, oraz bardzo rozbudowany opis teorii spektroskopii NMR, w tym metod związanych z rejestracją i przetwarzaniem widm NMR. Wprawdzie teoria ta opisana jest jasno i logicznie (choć miejscami z przeskokami myślowymi), to jednak zabrakło mi w całym opisie pewnej konsekwencji. Z jednej strony niezwykle szeroko omówiony i przedstawiony jest formalizm operatorowy, a z drugiej brakuje niektórych podstawowych informacji, jak na przykład definicji czasu mieszania w widmie TOCSY. Z całą pewnością opis ten prezentuje szeroką wiedzę Doktoranta o spektroskopii NMR, jednak celowość umieszczenia tak rozbudowanego opisu przy jednoczesnym braku niektórych podstawowych informacji może być uznana za dyskusyjną.

Kolejne dwie części rozprawy dotyczą już bezpośrednio badań prowadzonych przez Pana Dariusza Gołowicza, z których pierwsza na 18 stronach opisuje zastosowaną metodologię badań, w tym szczegóły przeprowadzonych eksperymentów NMR-owych, zaś kolejna to 50 stron prezentujących uzyskane wyniki badań i główne osiągnięcia Doktoranta. Ostatnie 5 stron opisu to prezentacja perspektyw rozwoju obszaru badawczego, którego dotyczy praca doktorska, jednak jest to raczej prezentacja innych narzędzi które można zastosować do rejestracji widm NMR-owych w zmieniających się warunkach, niż perspektywy wykorzystania lub rozwinięcia osiągnięć Doktoranta stanowiących podstawę pracy doktorskiej. Bibliografia obejmuje 242 pozycje literaturowe, z których znaczna część to prace badawcze opublikowane w literaturze międzynarodowej w ciągu ostatnich lat. To pokazuje dużą dojrzałość naukową Doktoranta oraz dobrą znajomość najnowszych wyników badań dotyczących omawianych zagadnień.

Przechodząc do omówienia najważniejszych osiągnięć ocenianej pracy doktorskiej, należy wśród nich wymienić opracowanie modyfikacji metody TR-NUS, nazwanej przeplataniem TR-NUS, a pozwalającym na rejestrację kilku eksperymentów NMR-owych jednocześnie, włączając w to eksperymenty 2D, oraz metody przemiatanego transferu koherencji (SCoT - z ang. *Swept Coherence Transfer*), służącego do kontrolowanej zmiany wybranego parametru sekwencji pulsowej, którego wartość ma stanowić nowy pseudo-wymiar w rejestrowanych eksperymentach.

Pierwszą ze wspomnianych wyżej metod Doktorant zastosował do monitorowania reakcji addycji beznyloaminy i akrylamidu, a także do śledzenia procesu wzmocnienia sygnału indukowanego parawodem w reakcji uwodornienia dwóch nienasyconych estrów. Warto wspomnieć, że druga z wymienionych reakcji była monitorowana w systemie przepływowym za pomocą tzw. biurkowego spektrometru NMR. Spektrometry takie w ostatnich latach zyskują na popularności ze względu na znacznie niższą cenę zakupu w porównaniu do



standardowych spektrometrów, a także na zdecydowanie niższe koszty eksploatacji. Ich podstawowym minusem jest jednak mała czułość, wymagająca stężeń badanych związków nawet rzędu moli/dm³ (dla widm ¹³C). W swojej pracy Doktorant połączył możliwości jakie oferuje technika wzmocnienia sygnału NMR za pomocą parawodoru z rozwijaną przez siebie metodą rejestracji widm z wykorzystaniem przeplatanego TR-NUS, aby śledzić reakcję uwodornienia mieszaniny fenylopropiolanu etylu i butynianu etylu. Należy podkreślić, że w przypadku takiej reakcji uwodornienia z hiperpolaryzacją intensywności sygnałów NMR zmieniają się w czasie rzędu kilku sekund, co znacznie utrudnia zastosowanie bardziej typowych eksperymentów z niejednorodnym próbkowaniem, które są wrażliwe na tzw. niestacjonarność sygnałów. Metoda zaproponowana przez Doktoranta stanowi więc istotny krok naprzód w monitorowaniu tego typu reakcji za pomocą spektroskopii NMR. Dodatkowo, dzięki wprowadzeniu procedury selektywnego ważenia podczas przetwarzania uzyskanych widm, Doktorant uzyskał znaczną redukcję szumów t₁ oraz artefaktów typowych dla eksperymentów z zastosowaniem parawodoru.

W przypadku monitorowania reakcji benzyloaminy z akrylamidem, dzięki zastosowaniu przeplatanego TR-NUS Doktorant był w stanie zarejestrować imponującą liczbę 768 eksperymentów ¹H-¹³C HSQC i ¹H-¹³C HMBC (obok eksperymentów jednowymiarowych) w tym samym czasie pomiarowym, jaki pozwolił na standardową rejestrację jedynie 6 eksperymentów ¹H-¹³C HSQC i ¹H-¹³C HMBC. Tak znaczne skrócenie czasu pomiaru eksperymentów 2D NMR umożliwia ich zastosowanie do monitorowania reakcji, co ma szczególne znaczenie w przypadku gdy widma jednowymiarowe zawierają nakładające się sygnały. Dzięki temu możliwe staje się wykorzystanie dwuwymiarowych technik NMR-owych do śledzenia reakcji chemicznych *in situ*, w tym do bardziej wiarygodnej identyfikacji powstających produktów pośrednich. Uzyskane wyniki Doktorant porównał do tych otrzymanych z pomiarów konwencjonalnych i wykazał, że w tym ostatnim przypadku dochodzi do znacznego niedoszacowania lub przeszacowania wartości stałych szybkości reakcji (w zależności od tego czy śledzi się przyrost produktów czy zanik substratów). Z drugiej strony, z widm 2D zarejestrowanych z wykorzystaniem przeplatanego TR-NUS Doktorant uzyskał takie same wyniki jak z eksperymentów jednowymiarowych, tym samym potwierdzając wiarygodność stosowanej metody. Wyniki przedstawione przez Doktoranta dotyczące monitorowania obu reakcji chemicznych za pomocą nowo wprowadzonej techniki przeplatanego TR-NUS uważam za najbardziej znaczącą i wartościową część przedstawianej pracy doktorskiej. Jednocześnie, jest ona również najlepiej umotywowana na tle najnowszej literatury dotyczącej tego zagadnienia.

Druga opracowana przez Doktoranta metoda, SCoT, została skonstruowana z myślą o rejestracji takich widm NMR, w których wprowadzony jest nowy pseudo-wymiar, zbudowany ze zmieniających się wartości wybranego parametru sekwencji pulsowej. Wymiar ten,



nazywany przez Doktoranta wymiarem nie-Fourierowskim, a więc takim, dla którego nie przeprowadza się typowej transformaty Fouriera, stanowiły w przypadku przedstawianej dysertacji wartości:

- opóźnienia czasowego ('delay') odpowiadającego 1/4 wartości stałej sprzężenia ^1H - ^{13}C w transferze INEPT w sekwencji HSQC
- częstości pulsu nasycającego ^{15}N , co posłużyło do rejestracji profili ^{15}N CEST
- czasu mieszania w sekwencji ^1H - ^1H TOCSY

W przeprowadzonych badaniach Doktorant dokonał optymalizacji transferu INEPT, wyznaczając optymalne wartości stałych $J_{^1\text{H}-^{13}\text{C}}$ dla wszystkich par CH w mieszaninie dwóch związków, aldehydu 3-metoksybenzoowego i 17α -ethynylestradiolu, zaś uzyskane wyniki porównał ze standardowo mierzonymi eksperymentami. W innym zastosowaniu SCoT wyznaczone zostały profile ^{15}N CEST dla białka G48A SH3, co pozwoliło na określenie stałej szybkości wymiany chemicznej między przeważającą w próbce konformacją białka a tą znacznie mniej spopulowaną, standardowo „niewidoczną” dla eksperymentu NMR. Wreszcie, dzięki określeniu profili transferu TOCSY dla 32-aminokwasowego nieustrukturyzowanego peptydu, Doktorant wyjaśnił wątpliwości związane z przypisaniem sygnałów ^1H pochodzących od łańcuchów bocznych dwóch lizyn badanego peptydu. Zastosowana przez Doktoranta metoda SCoT pozwoliła na zmniejszenie liczby artefaktów w rekonstruowanych widmach, a także liczby błędów związanych z uśrednieniem sygnału. Dodatkowo, eksperymenty zarejestrowane zostały w krótszym czasie w porównaniu do swoich konwencjonalnych odpowiedników (skrócenie to wynosiło odpowiednio 50%, 38% i 75% dla widma HSQC, profili ^{15}N CEST oraz transferu TOCSY). Pozwala to na znacznie efektywniejsze wykorzystanie czasu pracy spektrometru. Należy docenić przedstawienie tak szerokiego wachlarza możliwości zastosowań połączenia metody SCoT i przeplatanej TR-NUS, a także ogrom pracy Doktoranta włożony w rejestrację widm oboma metodami (konwencjonalną i tą z SCoT-TR-NUS) oraz w ich analizę. Z drugiej strony jednak czasami odnosiłam wrażenie pewnej nieadekwatności stopnia skomplikowania zastosowanej metody do uzyskanego efektu końcowego. Przykładowo, w przypadku transferu TOCSY przedstawione narzędzie badawcze wydaje się być bardzo wyrafinowane, służy zaś rozróżnieniu pomiędzy dwoma blisko rezonującymi sygnałami ^1H , spośród całego mrowia pozostałych sygnałów, które jak rozumiem można było przypisać z zastosowaniem konwencjonalnych narzędzi. W takiej sytuacji przydałby się choć jeden przykład "z życia" gdzie zastosowanie takiego złożonego narzędzia do przypisania wszystkich sygnałów w łańcuchu bocznym było kluczowe do rozwiązania istotnego problemu naukowego. Moja ocena nie ma bynajmniej na celu deprecjonowania przedstawionych osiągnięć, a jedynie zwrócenie uwagi Doktoranta na korzyść umieszczenia wyników swoich badań w szerszym kontekście chemicznym i/lub biologicznym. Szkoda byłoby, aby opracowane przez Doktoranta cenne metody nie były



szerzej używane tylko dlatego, że naukowcy niezwiązani bezpośrednio z rozwojem metod spektroskopii NMR nie będą w stanie dostrzec ich potencjału.

Obok powyżej omówionych prac badawczych, Pan Dariusz Gołowicz brał również udział w powstaniu programu TRENDS opracowanego w grupie dr hab. Krzysztofa Kazimierczuka, a umożliwiającego rejestrację i przetwarzanie widm z TR-NUS. Co ważne, program ten pozwala na rekonstrukcję rejestrowanych widm w czasie rzeczywistym, co jest przydatne zwłaszcza w przypadku śledzenia przebiegu reakcji chemicznych. W przedstawionej pracy Doktorant nie określa jasno jaki konkretnie był jego wkład w tworzenie tego programu, jednak deklarowany udział czwórki autorów publikacji opisującej jego funkcjonalność jest równy, a więc wynosi po 25%. Należy podkreślić i docenić, że program ten jest ogólnie dostępny na stronie internetowej wraz z instrukcją obsługi. Jedyna moja uwaga, niejako na marginesie, dotyczy tego, że został on napisany w Pythonie 2.7, który nie jest już wspierany, zaś kiedy publikowana była praca opisująca jego działanie ta wersja Pythona była już wycofywana, a Python 3.6 był już stosunkowo mocno rozpowszechniony. Szkoda by było, gdyby stosowalność tego programu ucierpiała z tak błahego powodu.

Jak w każdej pracy, również i w tej przedstawionej przez Pana Dariusza Gołowicza, znalazły się pewne niedociągnięcia, jednak żadne z nich nie umniejsza w znaczący sposób wartości naukowej prezentowanych badań. Od strony edytorskiej i językowej, niedociągnięcia te obejmują m.in.:

- powtarzający się kilkukrotnie błąd w nazwie związku: ethylphenyl propiolate, zamiast ethyl phenylpropiolate (nawet pod rysunkiem ze strukturą (!)) - wprawdzie jest to „jedynie” różnica jednej spacji, jednak w przypadku estrów ma to ogromne znaczenie, bo oznacza miejsce podstawienia; w efekcie nazwa z błędem jest nazwą innego związku niż ten, który badał Doktorant
- błędy w podziale wyrazów np. pode-jścia (str. 5); zw-eryfikowano (str. 7)
- literówki np. ‘przelatanego’ zamiast ‘przeplatanego’(str. 5), ‘be an artificial’ (str. 60) -> ‘by an artificial’
- przecinki na początku wiersza (choć rozumiem ich pochodzenie, to muszę przyznać, że niezwykle mnie to raziło przy czytaniu pracy)
- błędy językowe: ‘Except for...’ (str. 45) -> powinno być ‘Apart from’; częste niewłaściwe użycie rodzajników ‘the’ i ‘a’; niewłaściwie postawione znaki przestankowe np. ‘Taking as an example, two one-half spins’ (str. 53); ‘allows correlating’ (str. 81) -> ‘allows for correlating’ albo ‘allows to correlate’; częste użycie słowa ‘bigger’ zamiast ‘larger’
- nieprecyzyjne określenia np. ^{13}C HSQC lub ^{13}C HMBC (str. 117 i dalej) - oczywiście chodzi o widma ^1H - ^{13}C , ale przecież mogłyby to być również np. ^{19}F - ^{13}C
- niezręczne sformułowania: ‘Peaks that appear at high chemical shift values exhibit stronger effective magnetic field’ (str 69) - sygnały jako takie nie wykazują silniejszego pola magnetycznego, mogą co najwyżej mu odpowiadać



- zbyt ogólne stwierdzenia: 'the acquisition time of 2D data is very lengthy' (str. 77) - nie zawsze jest to prawda, bo można dostać bardzo dobrej jakości widmo COSY, czy nawet Impact-HMBC w 10-15 minut

Z bardziej merytorycznych kwestii, moje uwagi dotyczą w zasadzie braku precyzji w formułowaniu niektórych wniosków. Na stronie 174 Doktorant stwierdza: 'Notably, the results obtained for the frame size of 64 points are the most consistent with the results obtained for conventionally measured CEST data.' Zdanie to jest prawdziwe tylko w odniesieniu do wartości k_{ex} (stała szybkości wymiany), ale nie w odniesieniu do δ_B (zawartość mniej populowanego stanu). Dodatkowo, czy Doktorant mógłby odnieść wyniki uzyskanych przez siebie wartości k_{ex} i δ_B do danych literaturowych? Również na stronie 174 Doktorant zauważa, że zmiana wielkości podzbioru punktów używanego do rekonstrukcji ('frame') powoduje 'wyplaszczenie' ('flattening') zagłębień w profilach CEST i odsyła czytelnika do rysunku 3.25 - to, co ja widzę na rysunku 3.25 to zmiany intensywności mniejszego sygnału - czy to Doktorant miał na myśli mówiąc o 'wyplaszczeniu'? Ponadto, Doktorant wskazuje na konieczność właściwego doboru wielkości podzbioru punktów ('frame'), jednak nie precyzuje jak się takiego doboru dokonuje.

W części dotyczącej monitorowania reakcji addycji bezyloaminy z akrylamidem wartości stałych szybkości reakcji uzyskane metodą konwencjonalnej rejestracji **jednowymiarowych** widm ^1H NMR i tych zarejestrowanych z TR-NUS różnią się od siebie dość znacznie (Tabela 3.1, str. 152) - czy Doktorant może skomentować te różnice? Jakie byłyby różnice w uzyskanych wynikach jeśli wzięłoby się inne sygnały do wyliczenia stałych szybkości? I wreszcie, czy nie lepiej wziąć średnią z wszystkich dostępnych sygnałów?

Ostatnia uwaga dotyczy normalizacji wartości integracji dla sygnałów ^1H aldehydu 3-metoksybenzoesowego w pomiarach krzywych transferu INEPT. W pracy kilkakrotnie Doktorant umieścił informację że były one normalizowane do 6 protonów, przy czym proton aldehydowy był pomijany w tej analizie. Jednak cząsteczka aldehydu 3-metoksybenzoesowego ma w sumie 8 protonów, a zatem jeśli nawet pominiemy sygnał aldehydowy to ciągle zostajemy z 7 protonami. W opublikowanej pracy dotyczącej tego zagadnienia podana jest informacja dotycząca normalizacji do sumy protonów znajdujących się w danej cząsteczce, a zatem nie rozwiewa to przytoczonych wątpliwości. Z drugiej strony, podane w Tabeli 3.2 wartości integracji sumują się do 7, a więc sugerują raczej zwykłą pomyłkę w pracy doktorskiej niż błędnie przeprowadzoną normalizację. Niemniej ta kwestia powinna zostać wyjaśniona.

Jak można zauważyć, przytoczone pytania i wątpliwości dotyczą pewnych szczegółów przeprowadzonych przez Doktoranta badań, nie wpływają jednak na moją pozytywną ocenę całej pracy doktorskiej. Jest dla mnie jasne, że Pan Dariusz Gołowicz wykazał się znaczną dojrzałością naukową i umiejętnością samodzielnego prowadzenia badań. Wnioski



wyciągnięte z przeprowadzonych prac są logiczne i mają uzasadnienie w uzyskanych wynikach, zaś nowo opracowane metody badawcze stanowią bez wątpienia oryginalne rozwiązanie wielu problemów badawczych związanych z rejestracją widm NMR dla wymagających układów. Warto podkreślić, że niektóre wyniki swoich badań przedstawionych w tej rozprawie Doktorant opublikował już w 4 pracach oryginalnych w bardzo dobrych czasopismach o uznanej renomie międzynarodowej, jest także współautorem obszernej pracy przeglądowej dotyczącej tematyki pracy doktorskiej oraz 4 innych publikacji naukowych, z których trzy opublikowane zostały w czasopismach należących do przedziału Q1. Podsumowując, w mojej opinii przedstawiona praca doktorska spełnia z nawiązką wymagania stawiane takim rozprawom w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. 2018 poz. 1668). W związku z tym z przekonaniem wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne UW o dopuszczenie Doktoranta do publicznej obrony przedstawionej pracy doktorskiej.

M. Dudek