

Prof. dr hab. Zofia Gdaniec

Zakład Biomolekularnego NMR

Email: zgdan@ibch.poznan.pl

Poznań, 9 maja 2022 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej pana magistra Dariusza Gołowicza zatytułowanej
***„Novel methods of acquiring and processing NMR signals with combined sampling of
Fourier and non-Fourier dimensions”.***

Spektroskopia NMR wykorzystywana jest w różnych dziedzinach nauki, przemyśle oraz w diagnostyce medycznej. Gdy w 2014 roku firma Agilent ogłosiła, że zaprzestaje produkcji spektrometrów NMR wydawało się, że brak konkurencji na rynku doprowadzi do zahamowania postępu w tej dziedzinie. Na szczęście obawy te okazały się niepotrzebne, gdyż nadal obserwuje się dynamiczny rozwój spektroskopii NMR na wielu kierunkach. Dzięki postępowi technicznemu współczesne spektrometry NMR wyposażone są nie tylko w coraz to silniejsze magnesy ale również ich możliwości są znacznie większe, a stosowane metody coraz bardziej wyszukane i skomplikowane. Pomimo tego użytkownik po krótkim przeszkoleniu jest w stanie obsłużyć przyrząd i uzyskać potrzebne dane eksperymentalne. Jednak aby to było możliwe, większość informacji, których znajomość nie jest konieczna dla wykonania danego eksperymentu jest przed użytkownikiem ukryta. Jestem przekonana, że większość osób nie zdaje sobie sprawy ze złożoności sekwencji impulsowych czy z faktu, że jedną prostą komendą dokonuje transformacji Fouriera. Niestety wraz z konstrukcją coraz to bardziej zaawansowanych spektrometrów NMR znacząco wzrosła również ich cena. Nie każde laboratorium wykorzystujące do swoich badań pomiary NMR potrzebuje skomplikowanych, drogich urządzeń, których utrzymanie jest również kosztowne. W związku z tym, w ostatnich latach nastąpiło zapotrzebowanie na proste, tzw. biurkowe spektrometry NMR, które zyskują coraz większą popularność a ich możliwości są również nieporównywalnie większe, niż spektrometrów konstruowanych jeszcze na przykład 30 lat temu. Ich główną wadą jest mała czułość i rozdzielczość.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa mgr Dariusza Gołowicza została wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego pod opieką dr hab. Krzysztofa Kazimierczuka, prof. UW. Badania grupy kierowanej przez prof. Kazimierczuka koncentrują się wokół zagadnień związanych z rozwojem metodologii spektroskopii NMR, między innymi na opracowywaniu nowych metod rejestracji i przetwarzania danych eksperymentalnych. Recenzowana praca plasuje się w tym nurcie i dotyczy pomiarów, w których jeden z wymiarów ma charakter nie-Fourierowski.

Rozprawa napisana w języku angielskim poprzedzona jest streszczeniem w języku polskim, w którym zawarta została również obszerna informacja o strukturze dysertacji. W zasadzie Doktorant wykonał za mnie tę część recenzji, w której zazwyczaj staram się ustosunkować do układu pracy. Wspomnę tylko, że jest ona podzielona na cztery rozdziały: *Introduction*, *Methods*, *Results and Discussion* oraz *Perspectives*. Na końcu rozprawy znajduje się Bibliografia zawierająca 242 odnośniki. We wprowadzeniu liczącym 67 stron czytelnik znajdzie obok rysu historycznego, wprowadzenie do spektroskopii NMR oraz krótki rozdział poświęcony technice oszczędnego próbkowania. Na końcu rozdziału znajduje się fragment zaznajamiający czytelnika z zagadnieniami ściśle powiązаныmi z tematyką rozprawy i dotyczy nie-Fourierowskich wymiarów w spektroskopii NMR wraz ze wskazaniem pomiarów, w których opracowane przez Doktoranta metody mogą mieć zastosowanie. Chociaż całość wstępu jest napisana bardzo poprawnie a w części poświęconej historii spektroskopii NMR dowiedziałam się nowych faktów, nieco zmieniałabym proporcje – rozdział 1. 2 *Basic NMR* skróciłabym na korzyść rozdziału 1.4 *Compressed Sensing*, szczególnie że mgr Gołowicz jest pierwszym autorem dwóch prac przeglądowych dotyczących tej tematyki. W rozdziale 2 *Methods* obok detali eksperymentalnych dotyczących poszczególnych pomiarów omówiona jest również koncepcja czasorozdzielczego niejednorodnego próbkowania (TR-NUS - *time resolved non-uniform sampling*) oraz opracowanych przez Doktoranta metod przeplatanego czasorozdzielczego niejednorodnego próbkowania (*interleaved TR-NUS*) oraz przemiatanego transferu koherencji (SCoT- *Swept Coherence Transfer*). Uważam, że dla przejrzystości rozprawy rozdział ten powinien zawierać jedynie szczegóły eksperymentalne, natomiast opis metod, które są kluczowe dla zrozumienia prezentowanej tematyki, powinien znaleźć się we wstępie lub nawet, po niewielkim jego wydłużeniu, stanowić osobny rozdział.

W Rozdziale 3 *Results and Discussion* wyraźnie zaznaczone są trzy sekcje poświęcone trzem odrębnym zagadnieniom. Pierwsza dotyczy opisu głównych funkcji programu TReNDS, druga analizuje zalety metody *przeplatanego* TR-NUS w monitorowaniu reakcji chemicznych a trzecia skupia się na wykorzystaniu metody SCoT w różnych eksperymentach z nie-Fourierowskim wymiarem, w których zmiana amplitudy sygnału następuje w sposób kontrolowany. W rozdziale tym zmieniałabym kolejność poszczególnych sekcji, dając opis programu TReNDS na koniec, gdyż dopiero po omówieniu przykładów wykorzystujących *przeplataną* TR-NUS oraz SCoT, jego funkcjonalność może zostać w pełni doceniona,

zachęcając czytelnika do zainstalowania go i przetestowania jego funkcjonalności. Rozdział 4 *Perspectives* poświęcony jest rozważaniom Doktoranta na temat potencjalnych kierunków rozwoju pomiarów różnych wymiarów nie-Fourierowskich oraz zaprezentowane jest urządzenie, które pozwala na usprawnienie takich badań na biurkowych spektrometrach NMR.

Zalety opracowanych przez siebie metod Doktorant prezentuje na konkretnych przykładach, zestawiając je z wynikami pomiarów wykonanych w sposób tradycyjny. Tak na przykład, porównując dwa eksperymenty monitorowania przebiegu reakcji addycji aza-Michaela benzyloaminy i akrylamidu, z których jeden wykonano przy użyciu zaproponowanej przez Doktoranta metody *przeplatanego* TR-NUS a drugi przeprowadzono w sposób tradycyjny okazało się, że gdy do monitorowania przebiegu reakcji konieczna jest rejestracja widm 2D, metoda *przeplatanego* TR-NUS daje dokładniejsze wyniki. Innym przykładem zaprezentowanym w rozprawie jest połączenie metody *przeplatanego* TR-NUS i hiperpolaryzacji jądrowej parawodorem do śledzenia z wysoką rozdzielczością czasową i spektralną wzmocnionych sygnałów produktu reakcji uwodornienia fenylopropiolanu etylu i 2-butynianu etylu. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że eksperymenty te zostały wykonane na biurkowym spektrometrze, co znacznie poszerza ich funkcjonalność.

Bardzo interesujący jest fragment rozprawy, w którym mgr Gołowicz zaadaptował metodę TR-NUS do badania nie-Fourierowskich wymiarów, gdzie zmiana amplitudy sygnału może być kontrolowana i jest zazwyczaj wynikiem transferu koherencji. Potencjał tej metody nazwanej SCoT został pokazany na trzech przykładach. Jako pierwszy przykład posłużył eksperyment ^1H - ^{13}C HSQC, w którym optymalizacja transferu INEPT może być wykorzystana do poprawy ilościowej analizy heterojądrowych widm 2D. Analizę porównawczą eksperymentów z użyciem SCoT i wykonanych metodą konwencjonalną Doktorant przeprowadził dla wymagającej z punktu widzenia rejestracji widm ^1H - ^{13}C HSQC próbki, w której stałe sprzężenia $^1J_{\text{HC}}$ wynoszą od 120 do 260 Hz (mieszanina 17 α -etynyloestradiolu i 3-metoksybenzaldehydu). Jak pokazał, eksperyment ten można znacznie skrócić dzięki wykorzystaniu metody SCoT lub w tym samym czasie można uzyskać większą liczbę punktów w wymiarze nie-Fourierowskim, co pozwala na wierniejsze odtworzenie krzywych INEPT.

Drugie z zaprezentowanych w rozprawie podejść wykorzystujących metodę SCoT dotyczy badania równowagi konformacyjnej białka SH3 G48A. Za pomocą widm CEST ^1H - ^{15}N HSQC mgr Gołowicz otrzymał profile ^{15}N CEST, na podstawie których wyznaczył stałą szybkości wymiany chemicznej. Porównanie wyników eksperymentów otrzymanych z wykorzystaniem opracowanej przez Doktoranta metody z eksperymentami wykonanymi metodą tradycyjną wskazuje na potencjalne korzyści. Również w tym przypadku można znacznie skrócić czas wykonania eksperymentu albo znacznie zwiększyć gęstość próbkowania wymiaru CEST bez konieczności wydłużania czasu eksperymentu.

W ostatnim przykładzie Doktorant skupia się na analizie krzywych transferu TOCSY jako wymiaru nie-Fourierowskiego i poddaje analizie możliwe korzyści płynące z zastosowania opracowanej przez siebie metody. Na przykład, poprzez porównanie eksperymentalnych krzywych transferu TOCSY z krzywymi uzyskanymi z symulacji kwantowo-mechanicznych, mgr Gołowicz ilustruje możliwość wykorzystania tego eksperymentu do przypisania sygnałów w łańcuchu bocznym peptydu TAU domena-R4 o naturalnej zawartości izotopów.

W literaturze dotyczącej spektroskopii NMR często można znaleźć nowe sekwencje impulsów lub ciekawe metody, które niestety trudno jest wdrożyć zwykłemu użytkownikowi. Aby omawiane w rozprawie techniki, TR-NUS, *przeplatany* TR-NUS i SCoT, stały się bardziej dostępne dla potencjalnych adresatów, mgr Gołowicz wraz z współpracownikami stworzył darmowy program o nazwie TReNDS. Na przykładzie monitorowania enzymatycznej hydrolizy sacharozy Doktorant zaprezentował główne funkcje tego programu. Nie tylko z obowiązku recenzenta ale i z czystej ciekawości chciałam więc sprawdzić osobiście jego działanie. Niestety już na początku okazało się, że spektrometry NMR, które znajdują się w Instytucie są kontrolowane za pomocą komputerów z systemem Windows 7 a nie Windows 10, co jest wymagane do instalacji TReNDS 1.1. Pomyślałam więc, że sprawdzę to oprogramowanie na moim służbowym PC, spełniającym większość wymogów. Po aktualizacji terminala *wsl 1* do wersji *wsl 2* przestał jednak działać używany przeze mnie program Sparky, zaprzestałam więc dalszych prób. Opis napotkanych przeze mnie kłopotów podczas próby instalacji TReNDS nie ma w żadnym wypadku na celu podważenia jego wartości. Uzmysławia jedynie ilość problemów, które należy pokonać, aby takie narzędzie stało się uniwersalne, niezależne od systemu oraz jak ważna jest nieustanna współpraca twórców oprogramowania z użytkownikami. Niemniej po przeczytaniu opisu funkcji programu TReNDS trzymam kciuki, aby jak najszybciej udało się go wdrożyć jako jedną z opcji w Topspinie, czyli programie służącym do obsługi spektrometrów firmy Bruker.

Z obowiązku recenzenta muszę wymienić również usterki przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej.

- Jak już wcześniej wspominałam, zmieniałabym nieco układ pracy, niektóre fragmenty bym skróciła, inne natomiast, jak na przykład ten o *Compressed Sensing* bym wydłużyła.
- Czytając rozprawę zastanawiałam się, czy tytułowy „wymiar nie-Fourierowski” jest terminem powszechnie stosowanym w spektroskopii NMR, czy też stworzony został na potrzeby opracowywanych metod. Chociaż uważam, że termin ten jest bardzo intuicyjny, to jako tytułowe pojęcie powinien zostać zdefiniowany wcześniej a nie dopiero na stronie 59.
- Nie podoba mi się stwierdzenie: „poprawa ilościowości w widmach ^{13}C HSQC”. W słowniku języku polskiego nie znalazłam takiego wyrazu. Uważam, że poprawniej byłoby napisać np.:

„poprawa analizy ilościowej widm ^1H - ^{13}C HSQC” lub „poprawa charakteru ilościowego widm ^1H - ^{13}C HSQC.”

- Nigdzie w pracy nie znalazłam wyjaśnienia terminu „*long NUS schedule*”. Jaka jest różnica pomiędzy „*NUS schedule*” a „*long NUS schedule*”?
- Na stronie 132 można znaleźć zdanie: „*The chemical exchange rate constant calculated for conventional measurement was $181.74 \pm 1.85 \text{ s}^{-1}$...*”, z kolei wartość tej samej stałej podana w tabeli 3.3 wynosi $182 \pm 2 \text{ s}^{-1}$. Skąd taka różnica dokładności?

Wymienione powyżej usterki nie mają wpływu na moją ocenę recenzowanej rozprawy. Zdecydowana większość wyników zamieszczonych w rozprawie została już opublikowana w 7 publikacjach, które ukazały się w recenzowanych czasopismach międzynarodowych, a tym samym była już poddana krytycznej ocenie przez społeczność naukową. W przypadku rozpraw doktorskich opartych na wynikach badań zespołowych trudno jest dokładnie stwierdzić, co zostało zrobione przez poszczególnych jego członków. Przygotowanie rozprawy w formie bezosobowej, jak to miało miejsce w niniejszym przypadku, również nie ułatwia recenzentowi jej oceny. Jednak fakt, że w 5 z tych prac mgr Gołowicz jest pierwszym autorem oznacza, że wkład Doktoranta w ich powstanie był niewątpliwie znaczący. Warto również dodać, że część rozprawy dotycząca analizy krzywych transferu TOCSY, która jeszcze nie jest opublikowana, stanowiła tematykę projektu NCN PRELUDIUM, którego Doktorant był kierownikiem. Fakt ten najlepiej ilustruje szeroki zakres problematyki zawartej w ocenianej rozprawie. Chociaż tematyka pracy jest według mnie dość niszowa i raczej odległa od głównego nurtu moich zainteresowań, to jest ona zarazem niezwykle ważna i co istotne, została przedstawiona w bardzo przystępny sposób, co pozwoliło mi na zrozumienie idei każdego z prezentowanych przez Doktoranta zagadnień.

Chciałabym również podkreślić, że zrealizowanie celów rozprawy wymagało od mgr Gołowicza szeregu umiejętności, począwszy od zrozumienia podstaw zjawiska NMR, co zostało zaprezentowane we wstępie do rozprawy, poprzez dogłębną znajomość metod rejestracji i przetwarzania sygnałów aż do wykorzystania spektroskopii NMR do badania różnych zjawisk i procesów. Na podkreślenie zasługuje również wnikliwa i krytyczna analiza wyników pomiarów. W pracy bardzo podobało mi się to, że za każdym razem, gdy Doktorant prezentował nową, opracowaną przez siebie metodę, otrzymane wyniki konfrontował z rezultatami eksperymentów wykonanych w sposób konwencjonalny, co pozwalało na jasne zobrazowanie ich zalet i wad.

Jestem przekonana, że tematyka realizowana w rozprawie przez mgr Gołowicza ma istotne znaczenie dla rozwoju współczesnej spektroskopii NMR. Opracowanie metod pozwalających na efektywny pomiar różnych wymiarów nie-Fourierowskich znajdzie z pewnością szerokie zastosowanie

wśród wielu użytkowników spektrometrów NMR. Jest to bardzo istotne, gdyż długi czas pomiaru może uniemożliwić badania, zarówno z uwagi na koszt wykonania pomiaru, jak i na niestabilność niektórych próbek. Opracowanie narzędzia umożliwiającego wdrożenie omawianych metod, czyli stworzenie programu TReNDS, z pewnością to ułatwi, gdyż dzięki temu wszystkie techniki przedstawione w pracy: TR-NUS, przeplatany TR-NUS i SCoT stają się dostępne dla użytkowników NMR. Chociaż nie miałam szansy się o tym przekonać to, jak zapewnia w swojej rozprawie mgr Gołowicz, „wszystkie pomiary, w których częstotliwość lub intensywność sygnału zmienia się w czasie (w sposób niekontrolowany lub kontrolowany), nadają się do uruchomienia z TReNDS po wybraniu jednej z zaimplementowanych metod.”

Kolejnym ważnym elementem badań Doktoranta jest to, że nie kieruje on opracowywanych przez siebie metod jedynie do użytkowników spektrometrów wysokorozdzielczych, ale również wskazuje potencjalne zastosowanie tych metod na spektrometrach biurkowych, co z pewnością znacznie zwiększy ich użyteczność.

W oparciu o wyrażoną powyżej opinię stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska z nawiązką spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie mgr Dariusza Gołowicza do następnych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na nowatorski charakter pracy polegający na opracowaniu metod pozwalających na efektywny pomiar różnych wymiarów nie-Fourierowskich, który ma istotne znaczenie dla rozwoju współczesnej spektroskopii NMR, wnioskuję również o wyróżnienie tej rozprawy zgodnie ze zwyczajami Wydziału Chemii UW.

Zofia /daniel

Prof. dr hab. Zofia Gdaniec

Zakład Biomolekularnego NMR

Email: zgdan@ibch.poznan.pl

Poznań, 9 maja 2022 r.

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pana magistra Dariusza Gołowicza zatytułowanej
„Novel methods of acquiring and processing NMR signals with combined sampling of Fourier and non-Fourier dimensions”.

Rozprawa doktorska pana mgr Dariusza Gołowicza jest wyróżniającą się pracą naukową. Tematyka rozprawy dotyczy opracowania nowych metod pozwalających na efektywny pomiar różnych wymiarów nie-Fourierowskich i ma istotne znaczenie dla rozwoju współczesnej spektroskopii NMR. Uważam, że wyniki zaprezentowane w rozprawie znajdują praktyczne zastosowanie wśród wielu użytkowników spektrometrów NMR, gdyż pozwalają między innymi na znaczne skrócenie czasu pomiaru. Długi czas pomiaru może uniemożliwić badania, zarówno z uwagi na koszt jego wykonania, jak i na niestabilność niektórych próbek. Stworzenie programu TReNDS, czyli narzędzia pozwalającego na wdrożenie opracowanych metod, z pewnością to ułatwi, gdyż dzięki temu wszystkie omawiane w rozprawie techniki stają się dostępne dla użytkowników NMR.

Chciałabym również podkreślić, że zrealizowanie celów rozprawy wymagało od mgr Gołowicza szeregu umiejętności, począwszy od zrozumienia podstaw zjawiska NMR poprzez dogłębną znajomość metod rejestracji i przetwarzania sygnałów aż do wykorzystania spektroskopii NMR do badania różnych zjawisk i procesów. Na podkreślenie zasługuje również wnikliwa i krytyczna analiza wyników pomiarów.

Dorobek Doktoranta jest wyróżniający i obejmuje 9 prac, z których wszystkie ukazały się w recenzowanych czasopismach międzynarodowych. W 5 pracach jest pierwszym autorem, wliczając tę, która ukazała się w prestiżowym *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* Na podkreślenie zasługuje fakt, że mgr Gołowicz kierował projektem NCN PRELUDIUM.

Zofia Gdaniec