

INNOWACYJNE ZASTOSOWANIA  
N-WYMIAROWEJ SPEKTROSKOPII NMR  
CIAŁA STAŁEGO W ANALIZIE  
STRUKTURY I DYNAMIKI  
MOLEKULARNEJ PEPTYDÓW, BIAŁEK I  
KOMPLEKSÓW METALI  
PRZEJŚCIOWYCH Z WYKORZYSTANIEM  
NOWYCH METOD ZWIĘKSZAJĄCYCH  
EFEKTYWNOŚĆ POMIARÓW.

Imię i nazwisko: Piotr Paluch

**1. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:**

- 13.07.2017 – doktor nauk chemicznych, Centrum Badań Molekularnych Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi, tytuł rozprawy doktorskiej „**Rozwój i implementacja metod spektroskopii NMR w ciele stałym z wykorzystaniem bardzo szybkiego wirowania próbek pod kątem magicznym**”, promotor prof. dr hab. Marek J. Potrzebowski
- 05.07.2011 – magister inżynier, Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej, tytuł pracy „Analiza NMR oddziaływań ligand receptor” promotor prof. dr hab. Stefan Jankowski

**2. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:**

- 15.12.2023-obecnie **adiunkt**, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi
- 14.11.2023-14.11.2024 **senior researcher**, Wydział Chemii, Uniwersytet Aveiro
- 01.09.2019-31.12.2023 **adiunkt**, Wydział Chemii Uniwersytet Warszawski
- 02.01.2013-15.12.2023 **asystent**, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi
- 08.09.2011-02.01.2013 **chemik**, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi

### 3. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

#### 3.1. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Innowacyjne zastosowania N-wymiarowej spektroskopii NMR ciała stałego w analizie struktury i dynamiki molekularnej peptydów, białek i kompleksów metali przejściowych z wykorzystaniem nowych metod zwiększających efektywność pomiarów.

#### 3.2. Spis publikacji stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego:

Osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę wniosku habilitacyjnego zostało przedstawione w opisanych ośmiu pracach oryginalnych. W pięciu z nich jestem pierwszym autorem, a w czterech pełnię rolę autora korespondencyjnego. Oświadczenia dotyczące mojego wkładu w każdą z poniższych publikacji, a także oświadczenia współautorów, zostały dołączone do wniosku. Niniejszy autoreferat syntetycznie przedstawia kluczowe wyniki i znaczenie tych prac, podkreślając ich wkład metodologiczny i aplikacyjny.

##### 1) **Paluch, Piotr; Trébosc, Julien; Amoureux, Jean-Paul; Potrzebowski, Marek J.**

„ $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  CPVC NMR method under Very Fast Magic Angle Spinning for analysis of dipolar interactions and dynamics processes in the crystalline phosphonium tetrafluoroborate salts” (2017) *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, **87**, 96–103. DOI: 10.1016/j.ssnmr.2017.05.004

*Praca dotyczy rozwoju i zastosowania dwuwymiarowej metody CP-VC do badania dynamiki soli fosfoniowych. Jest to pierwszy przykład użycia tej techniki do analizy procesów dynamicznych dla par jąder innych niż  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ , co poszerza zakres jej zastosowań w NMR-krytalografii. Mój wkład obejmował koncepcję projektu, zaplanowanie i wykonanie całokształtu eksperymentów NMR, przygotowanie skryptów i przeprowadzenie symulacji numerycznych, pełną analizę danych wraz z opracowaniem graficznym oraz aktywny udział w pisaniu i redakcji manuskryptu.*

- 2) **Paluch, Piotr; Pawlak, Tomasz; Ławniczak, Karol; Trébosc, Julien; Lafon, Olivier; Amoureux, Jean-Paul; Potrzebowski, Marek J.** „Simple and Robust Study of Backbone Dynamics of Crystalline Proteins Employing  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  Dipolar Coupling Dispersion” (2018) *Journal of Physical Chemistry B*, **122**(34), 8146–8156  
DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b04557

*W artykule rozszerzyłem 2D CP-VC na badania dynamiki łańcucha głównego białek w ciele stałym poprzez analizę dyspersji sprzężeń dipolowych  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ . Zaproponowany protokół jest prosty, powtarzalny i odporny na artefakty, dzięki czemu stanowi użyteczne narzędzie dla społeczności BioNMR. Jestem autorem korespondencyjnym. Odpowiadałem za ideę projektu, planowanie i wykonanie wszystkich eksperymentów, analizę danych oraz ich wizualizację, a także za przygotowanie i redakcję manuskryptu. Praca ma charakter metodologiczny i aplikacyjny – demonstrowa możliwość ilościowego opisu ruchów w strukturach białkowych przy wysokich prędkościach MAS.*

- 3) **Paluch, Piotr; Augustyniak, Rafał; Org, Mai-Liis; Vanatalu, Kalju; Kaldma, Ats; Samoson, Ago; Stanek, Jan** „NMR Assignment of Methyl Groups in Immobilized Proteins Using Multiple-Bond  $^{13}\text{C}$  Homonuclear Transfers, Proton Detection, and Very Fast MAS” (2022) *Frontiers in Molecular Biosciences*, **9**, art. 828785.  
DOI: 10.3389/fmolb.2022.828785

*Praca przedstawia nowe sekwencje 3D i 4D umożliwiające przypisanie sygnałów  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  grup metylowych w krystalicznych białkach, z wykorzystaniem transferów homojądrowych  $^{13}\text{C}$ , detekcji  $^1\text{H}$  i bardzo szybkiego MAS. Mój wkład obejmował zaplanowanie i napisanie wszystkich programów do symulacji i ich wykonanie, przygotowanie większości sekwencji impulsowych, rejestrację widm oraz wiodący udział w analizie danych, opracowaniu rycin i redakcji tekstu. Metody te ułatwiają przypisanie sygnałów aminokwasów metylowych, co ma znaczenie dla badań dynamiki i oddziaływań w kompleksach białkowych.*

- 4) **Druzbicki, Kacper; Paluch, Piotr; Dolot, Rafał; Bąk-Sypień Irena; Kuc, Ewelina; Jeziorna, Agata; Potrzebowski, Marek J.** „From Amorphous Bundles to Nanoporous Peptide Frameworks: Solvent-Driven Self-Assembly of Pro-Val-Pro-Val” (2026) *Biomacromolecules*, **27**, 549–566.  
DOI: 10.1021/acs.biomac.5c01800

Praca przedstawia badania strukturalne nanoporowatego tetrapeptydu Pro–Val–Pro–Val z wykorzystaniem spektroskopii NMR oraz technik dyfrakcji rentgenowskiej. Mój wkład obejmował zaprojektowanie i przeprowadzenie wszystkich pomiarów NMR, analizę uzyskanych widm oraz przygotowanie części manuskryptu poświęconej wynikom spektroskopii NMR. Badania mają charakter strukturalny i łączą dane spektroskopowe oraz dyfrakcyjne w celu scharakteryzowania właściwości badanego układu.

- 5) **Paluch, Piotr; Rankin, Andrew G.M.; Trébosc, Julien; Lafon, Olivier; Amoureux, Jean-Paul** „Analysis of HMQC experiments applied to a spin  $\frac{1}{2}$  nucleus subject to very large CSA” (2019) *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, **100**, 11–25. DOI: 10.1016/j.ssnmr.2019.03.001

Artykuł dostarcza pogłębionej analizy teoretyczno-eksperymentalnej eksperymentów D-HMQC dla jąder o bardzo dużej anizotropii przesunięcia chemicznego (np.  $^{195}\text{Pt}$ ) w warunkach szybkiego MAS. Pracę zrealizowałem podczas stażu podoktorskiego w laboratorium prof. J.-P. Amoureux i prof. O. Lafona (Lille, Francja) finansowanego z programu MOBILNOŚĆ-PLUS. Jako autor korespondencyjny przygotowałem oprogramowanie do symulacji i przeprowadziłem wszystkie symulacje, napisałem sekwencje impulsowe, zarejestrowałem widma, przeanalizowałem i zwizualizowałem dane oraz współtworzyłem manuskrypt. Praca stanowi praktyczny przewodnik doboru parametrów i interpretacji widm dla trudnych jąder spin-1/2 z dużym CSA.

- 6) **Rankin, Andrew G.M.; Trébosc, Julien; Paluch, Piotr; Lafon, Olivier; Amoureux, Jean-Paul** „Evaluation of excitation schemes for indirect detection of  $^{14}\text{N}$  via solid-state HMQC NMR experiments” (2019) *Journal of Magnetic Resonance*, **303**, 28–41. DOI: 10.1016/j.jmr.2019.04.004

Praca ocenia i porównuje schematy wzbudzenia w eksperymentach D-HMQC dla pośredniej detekcji jądra  $^{14}\text{N}$  za pomocą  $^1\text{H}$ , co jest zagadnieniem istotnym z uwagi na kwadrupolowy charakter  $^{14}\text{N}$ . Publikacja powstawała równolegle do pozycji 5) w trakcie mojego stażu w Lille. Przygotowałem i uruchomiłem wszystkie symulacje numeryczne oraz aktywnie uczestniczyłem w analizie danych i opracowaniu wizualnym wyników. Rezultaty

stanowią zestaw praktycznych wskazówek dotyczących doboru sekwencji, warunków RF i prędkości MAS pod kątem czułości i rozdzielczości.

- 7) **Atterberry, Benjamin A.; Paluch, Piotr; Lamkins, Andrew R.; Huang, Wenyu; Rossini, Aaron J.** „Rapid Acquisition of  $^{103}\text{Rh}$  Solid-State NMR Spectra by 31P Detection and Sideband Selective Methods” (2025) *Journal of the American Chemical Society*, **147**(17), 14411–14421.  
DOI: 10.1021/jacs.5c00784

*W artykule opisane są metody szybkiej rejestracji widm  $^{103}\text{Rh}$  w ciele stałym z wykorzystaniem J-HMQC i pośredniej detekcji  $^{31}\text{P}$ , uzupełnione o selektywne podejścia „sideband-selective”. Mój udział obejmował koncepcję projektu, planowanie i realizację wstępnych eksperymentów NMR (w sytuacji ograniczeń sprzętowych – brak sondy pozwalającej na MAS > 20 kHz), a także aktywny udział w analizie danych oraz współredakcję manuskryptu. Jestem autorem korespondencyjnym. Wypracowane strategie istotnie skracają czas pomiaru i poprawiają wykrywalność jąder o niskiej czułości, co ma znaczenie dla chemii kompleksów rodu i katalizy.*

- 8) **Paluch, Piotr; Kupče, Ēriks; Trébosc, Julien; Lafon, Olivier; Amoureux, Jean-Paul** „Hadamard acquisition of  $^{13}\text{C}$ – $^{13}\text{C}$  2-D correlation NMR spectra” (2021) *Magnetic Resonance in Chemistry*, **59**(3), 247–256.  
DOI: 10.1002/mrc.4969

*Praca prezentuje zastosowanie szybkiej akwizycji typu HADAMARD do rejestrowania homojądrowych widm korelacyjnych  $^{13}\text{C}$ – $^{13}\text{C}$ , co znacząco redukuje czas eksperymentu przy zachowaniu informacji korelacyjnej. Publikacja powstała podczas mojego stażu podoktorskiego w Lille. Przygotowałem wszystkie sekwencje impulsowe, zarejestrowałem wszystkie widma, przeanalizowałem i zilustrowałem wyniki oraz współtworzyłem tekst. Metoda stanowi efektywną alternatywę dla klasycznych akwizycji 2D w badaniach materiałów organicznych i małych cząsteczkowych.*

### 3.3. Omówienie celu naukowego ww. publikacji i osiągniętych wyników wraz omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

#### 3.3.1. Cel naukowy

Celem naukowym przedstawianych badań było przede wszystkim opracowanie metod rejestracji widm NMR w ciele stałym, które dają możliwie prostą w analizie odpowiedź w rozsądnym czasie – także wtedy, gdy badany układ jest trudny (szerokie widma, niska czułość, złożona dynamika), a standardowe eksperymenty stają się zbyt kosztowne czasowo lub mało jednoznaczne. Dlatego konsekwentnie opierałem rozwój metod o warunki szybkiego i bardzo szybkiego MAS (fast/UF-MAS) oraz o takie strategie transferu magnetyzacji i detekcji, które realnie poprawiają czułość i rozdzielczość, bez utraty wiarygodności otrzymywanych parametrów. W praktyce ten cel realizowałem trzema uzupełniającymi się kierunkami.

Po pierwsze, rozwijałem eksperymenty nastawione na pomiary sprzężeń dipolowych  $^1\text{H-X}$  (zwłaszcza w rodzinie CP-VC), bo to one dają bezpośredni dostęp do odległości międzyatomowych i – co równie ważne – do informacji o ruchach lokalnych, które redukują obserwowane sprzężenia. Zależało mi, żeby te pomiary nie były tylko demonstracją metody, ale żeby dało się je zastosować od prostych układów modelowych po bardziej złożone próbki, np. biomolekuły, gdzie interesuje nas profil dynamiki wzdłuż całego łańcucha.

Po drugie, równolegle pracowałem nad eksperymentami wielowymiarowymi, które w NMR ciała stałego często napotykają na dwa „wąskie gardła”: przypisania oraz czas akwizycji. Stąd duży nacisk na sekwencje, które są możliwie proste w użyciu, dobrze skalują się z prędkością MAS i dają zauważalne skrócenie czasu pomiaru (np. dzięki detekcji  $^1\text{H}$  i technikom przyspieszania akwizycji). Innymi słowy: chciałem, żeby z eksperymentów 3D/4D dało się korzystać praktycznie, a nie tylko „teoretycznie”.

Po trzecie, istotnym filarem cyklu była pośrednia detekcja jąder „trudnych” – o niskiej czułości, bardzo szerokich liniach (duże CSA) albo niekorzystnych właściwościach relaksacyjnych. W tym obszarze kluczowe było dla mnie pokazanie, że odpowiednio zaprojektowana sekwencja (np. warianty D-HMQC i podejścia sideband-selective) potrafi „przenieść” informację o jądrze X na jądro czułe i dzięki temu drastycznie skrócić czas potrzebny do uzyskania użytecznego widma. Ten sposób myślenia jest wspólny dla prac

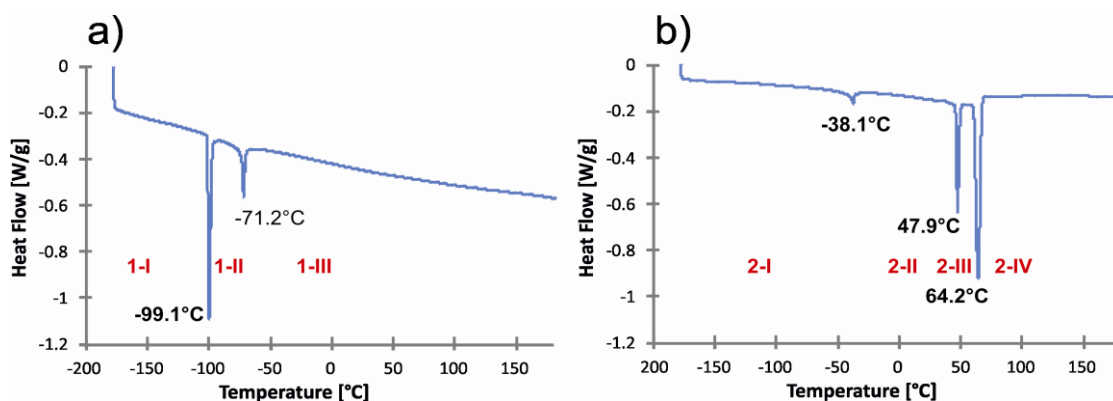
dotyczących m.in.  $^{195}\text{Pt}/^{14}\text{N}$  oraz  $^{103}\text{Rh}$ , gdzie punktem wyjścia zawsze było pytanie: co zrobić, żeby eksperyment był wykonalny w rutynowej praktyce laboratoryjnej.

Podsumowując, moje badania mają charakter metodologiczny, ale z wyraźnym nastawieniem na zastosowania: wypracowałem zestaw rozwiązań (sekwencje, warianty selektywne, „best-practice” doboru parametrów), które zwiększają czułość i/lub skracają czas eksperymentów NMR w ciele stałym, a jednocześnie dostarczają parametrów możliwych do interpretacji ilościowej (sprzężenia dipolowe, parametry CSA, wskaźniki dynamiki). Zależało mi też na tym, żeby ta metodologia była możliwie uniwersalna – tak, aby podobną logikę eksperymentu dało się stosować zarówno w BioNMR, jak i w chemii materiałów czy chemii metaloorganicznej.

### 3.3.2. Publikacja 1

Od wielu lat w centrum moich zainteresowań naukowych znajduje się opracowywanie i wykorzystywanie metod opartych o spektroskopię NMR ciała stałego do pomiaru sprzężeń dipolowych  $^1\text{H-X}$ . Wykorzystywane przeze mnie metody oparte są głównie na technikach typu 2D CP-VC w warunkach szybkiego wirowania pod kątem magicznym, które zostały zaproponowane przeze mnie w 2013 roku w pracy w JMR<sup>1</sup>, i zostały później połączone z detekcją  $^1\text{H}^2$  oraz zweryfikowane teoretycznie przez symulacje numeryczne<sup>3</sup>. W cytowanych pracach metody te stosowane były wyłącznie do pomiarów sprzężeń dipolowych  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H-}^{15}\text{N}$ .

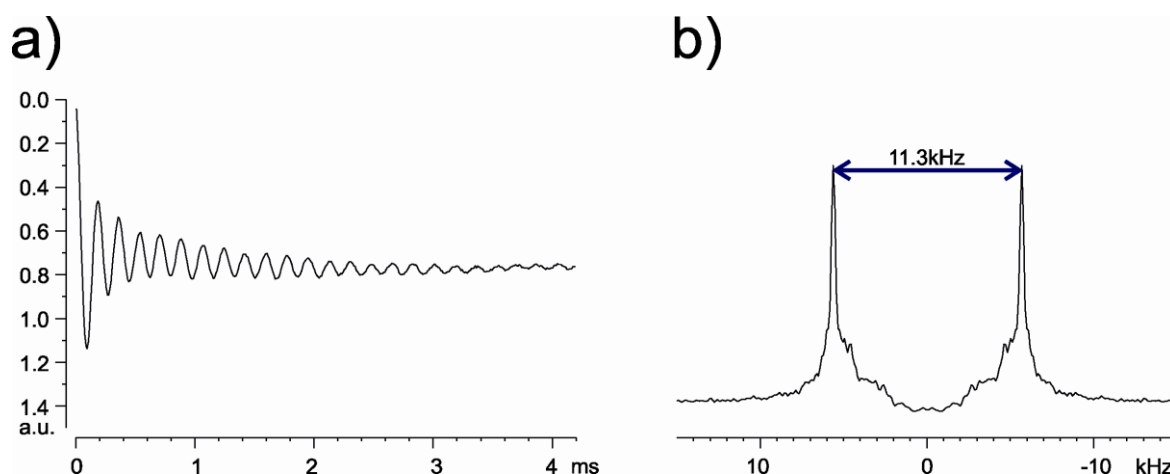
W omawianej pracy pokazałem aplikację pomiarów sprzężeń dipolowych  $^1\text{H-}^{31}\text{P}$  z wykorzystaniem sekwencji 2D CP-VC do analizy procesów dynamicznych w stałych solach fosfoniowych. Szczegółowo przeanalizowałem poprzez symulacje numeryczne wpływ procesów dynamicznych na otrzymany kształt dubletów dipolowych a także efekty oddziaływań wielospinowych oraz niehomogeniczności impulsów RF. Eksperymentalnie jako związki modelowe użyłem dwa dobrze krystaliczne tetrafluoroborany a) tri-tert-butylofosfoniowy i b) tri-metylofosfoniowy. Jak pokazują termogramy DSC (**Rysunek 1**) obydwie związki występują w kilku fazach krystalicznych w szerokim zakresie temperatur.



**Rysunek 1** Termogramy DSC tetrafluoroboranu a) tri-t-butylofosfoniowego i b) tri-metylofosfoniowego.

W przypadku tetrafluoroboranu tri-tert-butylofosfoniowego, ze względu na wymaganą dla eksperymentu 2D CP-VC szybką rotację próbki i związany z tym ograniczony zakres

dostępnych temperatur, możliwa była analiza wyłącznie fazy występującej powyżej  $-71.2^{\circ}\text{C}$ , w temperaturze zbliżonej do temperatury pokojowej (faza I-III). Dla tej formy krystalicznej obserwowane rozszczepienie dipolowe wynosi  $(\Delta)$  11.3 kHz, co odpowiada wartości sprzężenia dipolowego (D) równego 15.8 kHz, zgodnego z teoretyczną długością wiązania P-H równą 1.4 Å. Świadczy to o braku występowania procesów dynamicznych o skali czasowej  $\mu\text{s}$  i szybszych w obrębie pary spinowej  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$ .

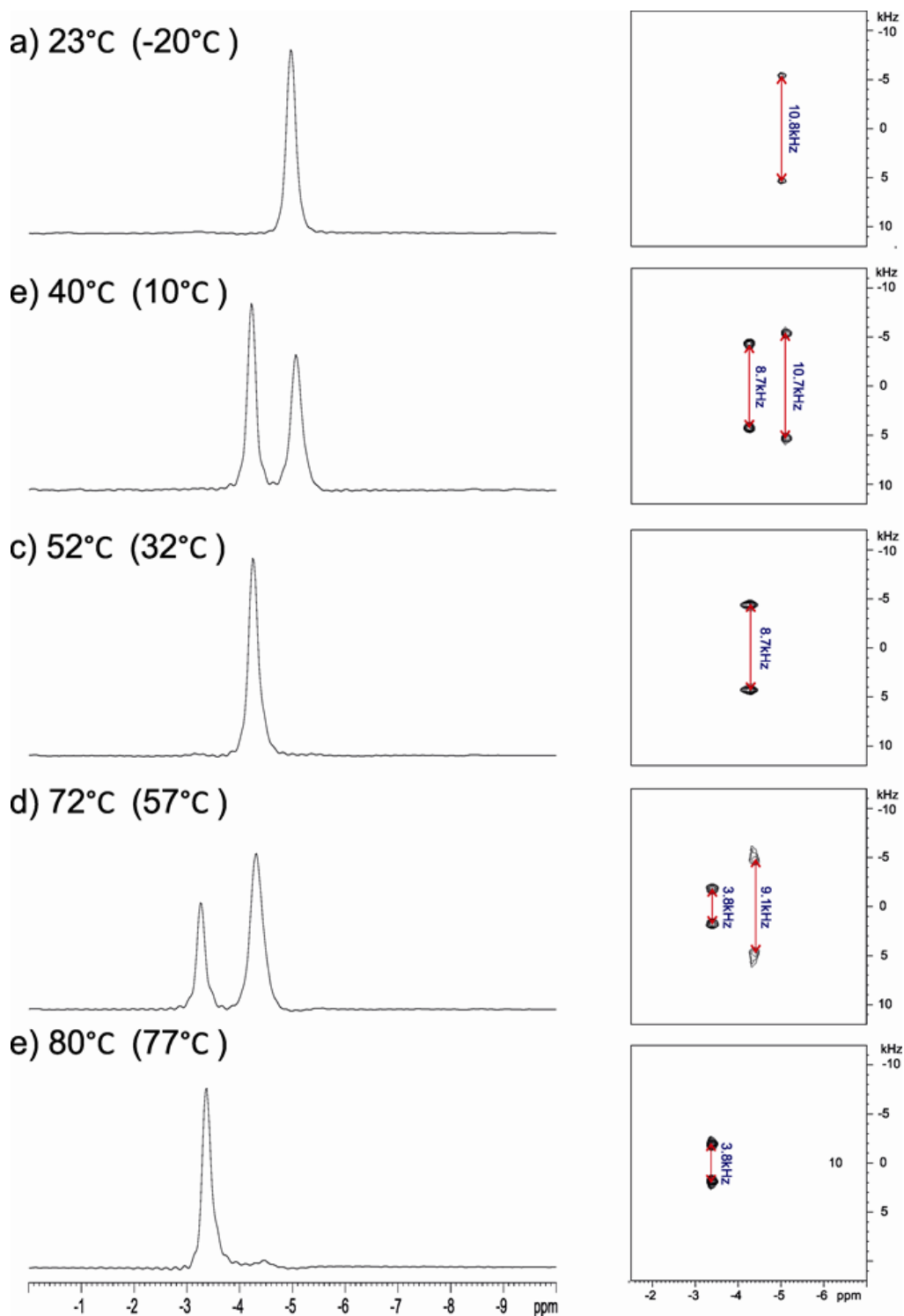


**Rysunek 2 a) Oscylacje dipolowe oraz ich b) transformata Fouriera pokazująca dublet dipolowy, zarejestrowane dla tetrafluoroboranu tri-t-butylfosfoniowego.**

Tetrafluoroboran tri-metylofosfoniowy występuje aż w 4 różnych fazach, z których 3 (2-II, 2-III i 2-IV) mogły być zbadane z wykorzystaniem techniki 2D CP-VC w warunkach szybkiej rotacji pod kątem magicznym. Wymagało to wykonania pomiarów zmiennotemperaturowych, które w warunkach szybkiego wirowania pod kątem magicznym zwykle związane są z występowaniem gradientu temperatury wzdłuż rotora tym większego, im temperatura bardziej różni się od temperatury pokojowej<sup>i</sup>. Dodatkowo wymagało to precyzyjnej kalibracji rzeczywistej temperatury w tych samych warunkach pomiaru (zadana temperatura, przepływy gazu stabilizującego temperaturę, prędkość rotacji), z wykorzystaniem rezonansu  $^{207}\text{Pb}$  dla azotanu (V) ołowiu (II). Po eksperymentalnym uzyskaniu rzetelnych informacji o temperaturze możliwe było zaobserwowanie faz II-IV dla tetrafluoroboranu

<sup>i</sup> Ściślej, im temperatura gazów napędowych różni się od temperatury gazu stabilizującego temperaturę. W przypadku sond dostępnych w CBMM gazy napędowe dostarczane są w temperaturze pokojowej i nie ma możliwości zmiany ich temperatury.

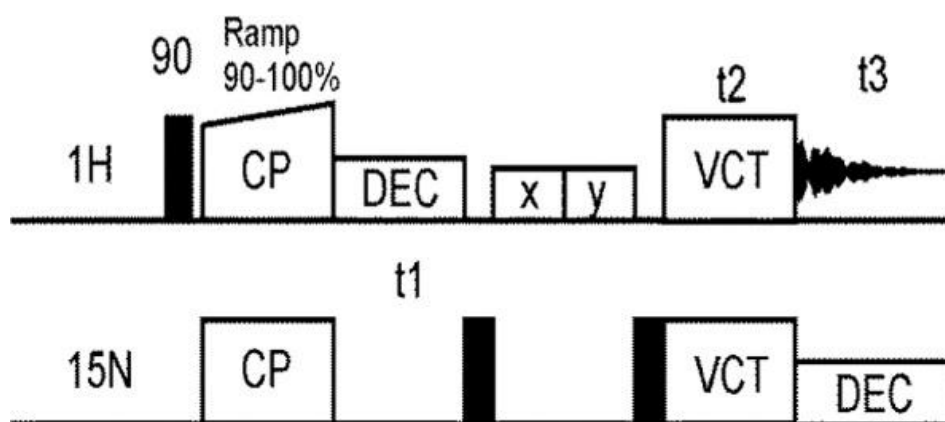
trimetylofosfoniowego, a dodatkowo, dzięki występowaniu gradientu temperatury, możliwe było obserwowanie fazy II i III oraz III i IV równocześnie. **Rysunek 3** przedstawia widma  $^{31}\text{P}$  CP-MAS oraz 2D CP-VC zarejestrowane w 5 różnych temperaturach. W temperaturze  $23^\circ\text{C}$  obserwowana jest wyłącznie faza II, a zmierzona wartość rozszczepienia dipolowego ( $\Delta$ ) wynosi 10.6 kHz, co odpowiada statycznej parze spinowej  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$ . Sugeruje to, że w przypadku fazy II nie ma procesów dynamicznych o skali czasowej  $\mu\text{s}$  i szybszych w obrębie pary spinowej  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$ . Zwiększenie temperatury do  $52^\circ\text{C}$  umożliwiło obserwację czystej fazy III, dla której wartość rozszczepienia dipolowego ( $\Delta$ ) jest wyraźnie zredukowana w stosunku do przypadku statycznego i wynosi 8.7 kHz. To świadczy o występowaniu procesów dynamicznych obejmujących parę spinową  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$ . Dalsze zwiększanie temperatury prowadzi do obserwacji czystej fazy IV w temperaturze  $80^\circ\text{C}$ . Tutaj obserwowana wartość rozszczepienia dipolowego ( $\Delta$ ) jest bardzo silnie zredukowana i wynosi jedynie 3.8 kHz, co świadczy o włączeniu kolejnych procesów dynamicznych coraz bardziej redukujących obserwowane sprzężenie dipolowe. Ze względu na ograniczoną ilość danych nie określono geometrii oraz skali czasowej tych procesów dynamicznych. Przedstawione wyniki wskazują na dużą przydatność eksperymentu  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  CP-VC w badaniach plastycznych jonowych kryształów organicznych. Jest to jedna z niewielu metod spektroskopowych (jeśli nie jedyna), która pozwala na tak dokładne śledzenie procesów dynamicznych. Ich opisanie z kolei, przekłada się na głębsze zrozumienie mechanizmu działania elektrolitów stałych, co jest jedną z możliwych aplikacji plastycznych organicznych kryształów jonowych.



Rysunek 3 Widma  $^{31}\text{P}$  CP-MAS (strona lewa) oraz 2D CP-VC (prawa strona) zarejestrowane dla tetrafluoroboranu tri-metylofosfoniowego przy prędkości rotacji równej 50 kHz i zarejestrowane przy różnych temperaturach próbki (skalibrowanej przy pomocy pomiarów widm  $^{207}\text{Pb}$  dla  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  w tych samych warunkach). W nawiasie dla porównania podano zadaną temperaturę odczytaną bezpośrednio z kontrolera temperatury.

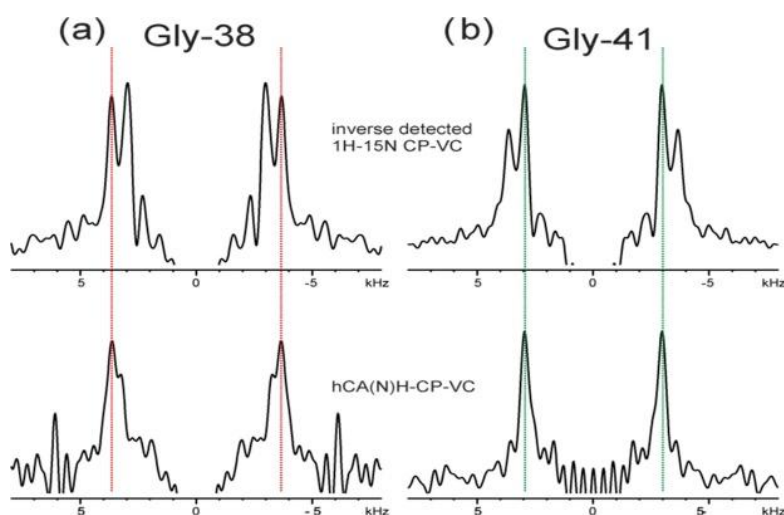
### 3.3.3. Publikacja 2

Kontynuacją prac skupionych wokół techniki CP-VC jest przedstawiana publikacja, implementująca technikę 3D CP-VC z detekcją  $^1\text{H}$  i edycją  $^{15}\text{N}$  lub  $^{13}\text{C}$  ( $\text{C}\alpha$ ). Pomimo że trójwymiarowa technika CP-VC (3D CP-VC RFDR i 3D CP-VC-SHANGHAI) została przeze mnie zaproponowana już kilka lat wcześniej i po raz pierwszy pozwoliła śledzić procesy dynamiczne łańcuchów bocznych, w tym pierścieni aromatycznych, w białkach (GB-1 i DLC-8)<sup>4</sup>, była ona obarczona ograniczeniami wynikającymi z niskiej czułości metody (detekcja  $^{13}\text{C}$ ) oraz skomplikowanego obrazu widma 3D z bardzo dużą liczbą pików korelacyjnych. Dodatkowo, mimo swojego potencjału, technika nie była w pełni komplementarna z typowymi metodami śledzenia dynamiki w białkach opartymi na pomiarach czasów relaksacji  $^{15}\text{N}$  lub sprzężeń dipolowych  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  przy użyciu sekwencji innych niż CP-VC. W związku z tym, nadrzędnym celem opisywanej pracy było opracowanie metody pozwalającej na łatwą analizę procesów dynamicznych makromolekuł, która będzie zarówno czuła, jak i w pełni komplementarna z istniejącymi już metodami. W tym celu rozwinąłem opracowaną wcześniej<sup>2</sup> metodę 2D CP-VC z detekcją  $^1\text{H}$  do sekwencji 3D. Opracowana sekwencja (**Rysunek 4**), 3D hNH-CP-VC z detekcją  $^1\text{H}$  i edycją  $^{15}\text{N}$ , doskonale nadaje się do połączenia z technikami przyspieszania akwizycji poprzez skrócenie czasów  $T_1$  z zastosowaniem związków paramagnetycznych (PACC, ang. *paramagnetic-assisted condensed data collection*)<sup>5</sup>. Jest to godne uwagi, ponieważ zwykle stosowane metody pomiaru czasów relaksacji  $^{15}\text{N}$  nie mogą być wykorzystane w obecności domieszek paramagnetycznych, przez co stają się bardzo kosztowne czasowo.



Rysunek 4 Sekwencja 3D hNH-CP-VC z jednym wymiarem dipolowym  $t_2$  ( $D_{\text{NH}}$ ) oraz wymiarami przesunięć chemicznych  $t_1$   $^{15}\text{N}$  i  $t_3$   $^1\text{H}$ .

Opracowaną metodę przetestowałem na komercyjnie dostępnymi<sup>ii</sup> białku GB-1 w pełni znakowanym izotopami  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  i  $^2\text{H}$ , z wymienionymi protonami NH, wykrystalizowanym w obecności dodatku przyspieszającego relaksację  $\text{Na}_2\text{CuEDTA}$ . Pomimo że w przypadku jonów  $\text{Cu}^{2+}$  nie należy oczekiwać zmian przesunięć chemicznych wywołanych przez przesunięcie pseudokontaktowe (PCS), zdecydowałem się na wykonanie pełnych przypisań łańcucha głównego w oparciu o serię eksperymentów 3D z detekcją  $^1\text{H}$ , implementując<sup>iii</sup> sekwencje hCONH, hCANH, hcaCOcaNH, hcoCAcoNH, hcaCBcaNH, hcaCBcacoNH. Przypisania *de-novo* były niezbędne ze względu na znany fakt występowania białka GB-1 w co najmniej pięciu formach polimorficznych o nieznacznie różnych przesunięciach chemicznych<sup>6</sup>, które w szczególnie niekorzystnych przypadkach mogą współwystępować w jednej próbce, znacząco utrudniając, a nawet uniemożliwiając analizę widm. Korzystając z serii sześciu widm przypisałem wszystkie widoczne sygnały NH, CA, CB i CO, a następnie, korzystając z pakietu CS-Rosetta, określiłem strukturę posiadanej próbki białka GB-1 (zdeponowaną w BioMagResBank pod numerem 27562), zgodną z wcześniej opisanymi strukturami tego białka. Dysponując wiarygodnymi przypisaniami NH dla posiadanej próbki, zarejestrowałem i poddałem analizie widmo 3D CP-VC otrzymane przy użyciu sekwencji 3D hNH-CP-VC (**Rysunek 4**).



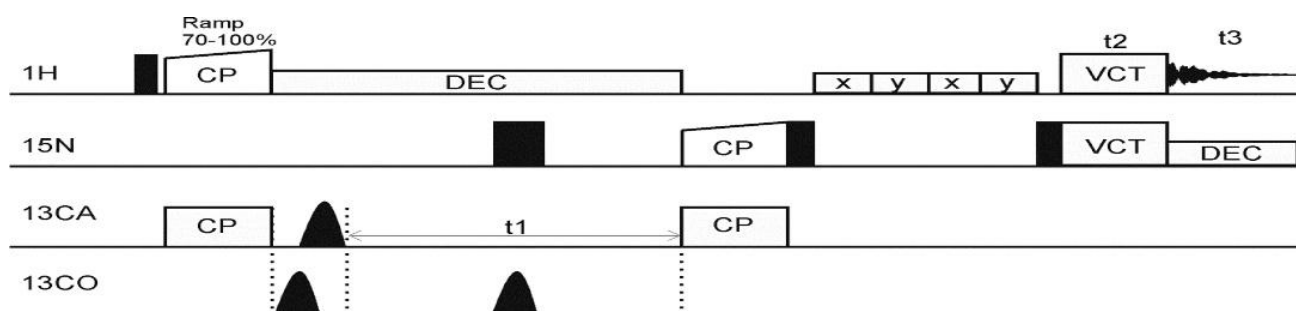
**Rysunek 5** Jednowymiarowe przekroje (wymiar dipolowy  $D_{\text{NH}}$ ) otrzymane z widm 3D zarejestrowanych przy użyciu sekwencji przedstawionych na Rysunek 4 oraz Rysunek 6.

<sup>ii</sup> W czasie realizacji projektu nie posiadałem dostępu ani nie współpracowałem z żadnym laboratorium specjalizującym się w ekspresji znakowanych izotopowo białek.

<sup>iii</sup> Zgodnie z moją wiedzą eksperymenty tego typu zostały zaimplementowane i wykonane po raz pierwszy w Polsce.

Umożliwiło to określenie sprzężeń dipolowych dla większości obserwowanych reszt aminokwasowych. Mimo że widmo 2D hNH tak małego białka jak GB-1 (szczególnie dla próbki perdeuterowanej) charakteryzuje się dobrą dyspersją sygnałów, niektóre z nich nakładają się na siebie do tego stopnia, że niemożliwa była analiza części reszt, jak np. pary Gly-38 i Gly-41 (**Rysunek 5**).

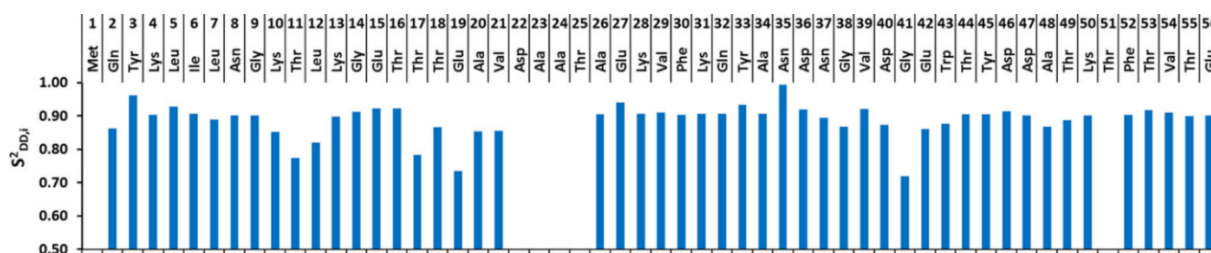
W związku z powyższym opracowałem inną metodę edycji, bazującą na połączeniu techniki CP-VC z sekwencją hCANH (**Rysunek 6**). Połączenie to umożliwia otrzymanie zarówno sekwencji 4D hCANH-CP-VC, jak i 3D hCANH-CP-VC. W przedstawianym projekcie, ze względu na dobrą rozdzielczość wymiaru  $C\alpha$  (zwłaszcza dla problematycznych glicyn), zdecydowałem się na wariant 3D. Korzystając z obu proponowanych sekwencji, jednoznacznie wyznaczyłem sprzężenia dipolowe dla wszystkich obserwowanych reszt aminokwasowych w badanej próbce białka GB-1. Należy podkreślić, że w analogiczny sposób można zrealizować sekwencję 3D hCONH-CP-VC, jednak typowo dyspersja sygnałów CA jest większa niż CO.



**Rysunek 6** Sekwencja 3D hCANH-CP-VC z jednym wymiarem dipolowym  $t_2$  ( $D_{NH}$ ) oraz wymiarami przesunięć chemicznych  $t_1$   $^{13}C$  i  $t_3$   $^1H$ .

W celu potwierdzenia użyteczności zmierzonych wartości sprzężenia dipolowego  $D_{NH}$  do analizy procesów dynamicznych zdecydowałem się wyznaczyć parametr uporządkowania dipolowego wzdłuż łańcucha głównego zdefiniowany jako  $S_{DD,i}^2 = (D_i/D_{ref})^2$ , gdzie  $D_i$  to zmierzona eksperymentalnie wartość sprzężenia dipolowego, a  $D_{ref}$  to teoretyczna wartość referencyjna. Należy tutaj podkreślić, że wartość tego parametru nie zależy wprost od szybkości procesu dynamicznego, a jedynie od tego czy występuje proces dynamiczny szybszy od  $10\mu s$ . Jeśli procesy o skali czasowej mniejszej niż  $10\mu s$  nie występują dla pary jąder  $^{15}N$ - $^1H$  to należy

oczekiwać parametru  $S_{DD,i}^2$  bliskiego 1.0. Natomiast jeśli udział takich szybkich procesów w dynamice pary jąder  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  jest istotny, to parametr  $S_{DD,i}^2$  będzie wyraźnie mniejszy od 1.0. Graficzna reprezentacja wartości  $S_{DD,i}^2$  wzdłuż łańcucha głównego dla posiadanej próbki białka GB-1 została zilustrowana w postaci łatwego w analizie wykresu słupkowego (**Rysunek 7**).



**Rysunek 7** Parametr uporządkowania dipolowego  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  zdefiniowany jako  $S_{DD,i}^2 = (D_i/D_{\text{ref}})^2$  wzdłuż łańcucha peptydowego białka GB-1.

Analiza profilu  $S_{DD,i}^2$  wzdłuż łańcucha głównego wskazuje na uzyskanie wyników zgodnych z doniesieniami literaturowymi<sup>7</sup> dla białka GB-1 i zgodnych z oczekiwaniami. Wartości parametru uporządkowania dipolowego wyraźnie poniżej 1.0 obserwowane są dla nieustrukturyzowanych fragmentów (pętli) obejmujących reszty Lys-10, Thr-11, Leu-12, Thr-17, Glu-19, Asp-40, i Gly-41. Średnia wartość parametru jest bliska 0.89, co pokrywa się z wcześniejszymi raportami dla tego białka. Dla najbardziej ruchliwych pozycji (np. Gly-41) uzyskane  $S_{DD,i}^2 \approx 0.72$  dobrze koresponduje z danymi relaksacyjnymi i symulacjami MD<sup>8</sup> (wartości rzędu 0.6), a także z wynikami dla próbek bez domieszek paramagnetycznych, gdzie obserwuje się prostą korelację między elementami struktury drugorzędowej a lokalną ruchliwością. Co istotne, zastosowanie PACC nie wpływa na wartości sprzężeń dipolowych  $D_i$ , dzięki czemu względne  $S_{DD,i}^2$  pozostają porównywalne z literaturą, podczas gdy bezpośrednie analizy relaksacyjne w obecności centrów paramagnetycznych bywają utrudnione przez niejednorodne skracanie czasów relaksacji. Zaimplementowana przeze mnie sekwencja jest prosta, powtarzalna i precyzyjna. Dodatkowo, prowadzenie detekcji  $^1\text{H}$  umożliwiło znaczne skrócenie czasu pomiaru dynamiki makrocząsteczek. Dzięki temu 3D CP-VC może w szybki sposób dostarczyć cennych informacji na temat dynamiki poszczególnych reszt aminokwasowych, co przekłada się na lepsze wyjaśnienie roli danego białka, czy mechanizmu jego działania.

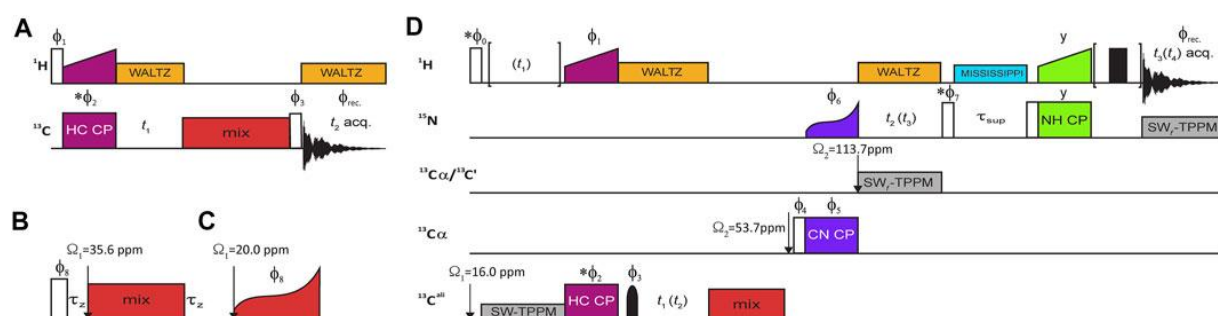
### 3.3.4. Publikacja 3

Kolejna z przedstawianych w autoreferacie publikacji skupiona jest wokół problemu przypisań sygnałów grup metyloowych aminokwasów (Val, Leu, Ile) w białkach. Pozornie praca ta nie ma bezpośredniego połączenia z poprzednią pracą, jednak jeśli weźmiemy pod uwagę, że znaczną część procesów dynamicznych w białkach (szczególnie o dużej wielkości) bada się za pomocą analizy relaksacji  $^{13}\text{C}$  grup metyloowych, powiązanie to staje się jasne. Ze względu na dużą odległość od grupy NH przypisanie sygnałów metyloowych jest zwykle znacznie utrudnione, szczególnie w przypadku dużych białek lub białek w ciele stałym. W literaturze można znaleźć kilka podejść do rozwiązania tego problemu, jak np.:

- Sekwencje 3D HMCM[CG]CBCA stosowane w cieczy.<sup>9</sup>
- Strategie oparte o selektywną mutagenezę,<sup>10</sup> która mimo że może być stosowana zarówno w fazie ciekłej jak i stałej, jest niezmiernie czasochłonna i kosztochłonna ze względu na konieczność przygotowania dokładnie tylu próbek ile jest aminokwasów metyloowych.
- Czasochłonną analizę korelacji NOE między grupami metyloowymi a protonami NH, możliwą w obydwu fazach.
- Wysoce efektywne zastosowanie sekwencji 3D (H)CCH, 3D H(C)CH i 4D HCCH<sup>11,12</sup> lub 3D (H)CX(CA)NH<sup>13</sup> w ciele stałym z różnymi typami sekwencji mieszających.

Mimo istnienia wspomnianych efektywnych metod stosowanych do analizy próbek w ciele stałym, nigdy nie porównano systematycznie możliwych schematów mieszania przy różnych prędkościach rotacji oraz różnych schematach znakowania. Tymczasem, różne schematy mieszania mogą znacząco wpływać na efektywność transferu magnetyzacji, a co za tym idzie, na wartość stosunku sygnał/szum. W omawianej pracy postanowiłem wyjść temu naprzeciw i obiektywnie ocenić jakie metody mieszania będą najlepsze. Z możliwych różnych sekwencji mieszania zdecydowałem się na wybór aż 10 różnych możliwych schematów mieszania (FLOPSY, DIPSI, WALTZ, różne warianty TOBSY, fp-RFDR, DREAM) i przeanalizowałem ich efektywność zarówno numerycznie, korzystając z programu SIMPSON, jak i eksperymentalnie. Schemat zastosowanych sekwencji od 2D do 4D przedstawia schematycznie **Rysunek 8**. W celu rzetelnej oceny efektywności wymienionych sekwencji wybrałem aż 4 układy modelowe: 2,3- $^{13}\text{C}_2$ -alaninę, w pełni

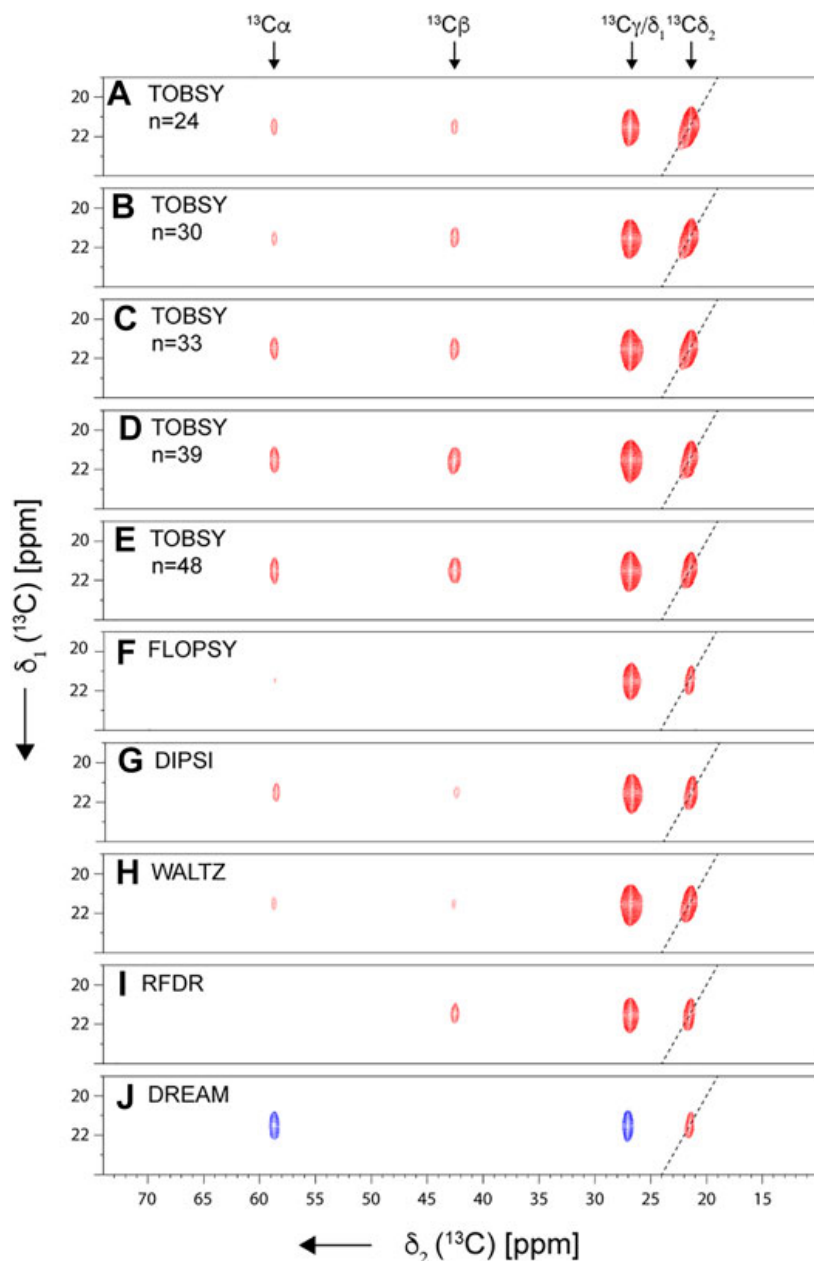
znakowany  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  tripeptyd fMLF, oraz białko SH3 w dwóch wariantach znakowania, które będą omówione później. Ze względu na techniczny charakter opisu oraz szczegółowość porównania schematów mieszania, nie będą one tutaj dokładnie omawiane; przedstawione zostaną jedynie wnioski końcowe, oparte na ocenie ich efektywności na przykładzie tripeptydu  $\text{U-}^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -fMLF oraz białka  $\text{U-}^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{CH}_3$ -SH3.



**Rysunek 8** Schematy używanych sekwencji a) korelacje 2D  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  z różnymi blokami mieszania, b) blok mieszania typu FLOPSY/DIPSI/WALTZ/TOBSY/fp-RFDR, c) blok mieszania typu DREAM, d) sekwencja 3D(H) $\text{C}^{\text{MET}}(\text{CC})(\text{CA})\text{NH}$  i 4D  $\text{HC}^{\text{MET}}(\text{CC})(\text{CA})\text{NH}$ .

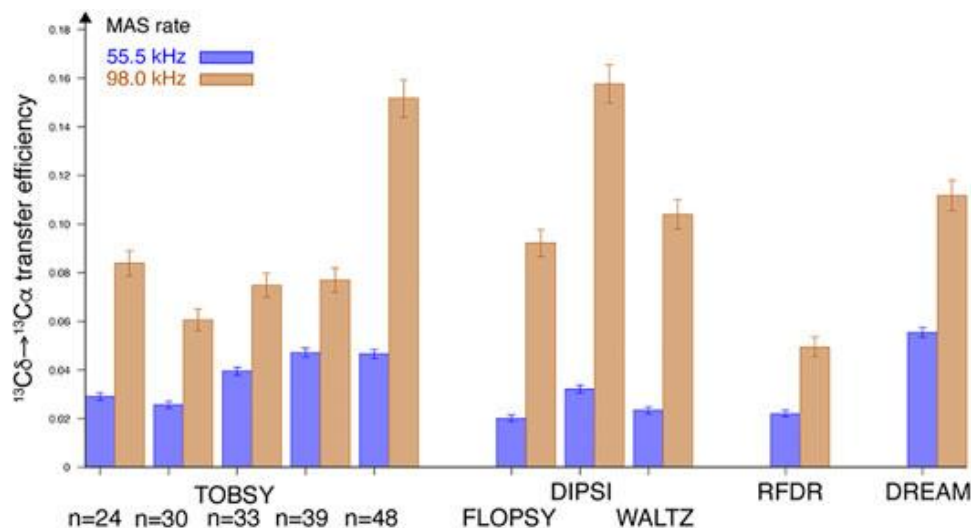
Eksperymentalna analiza transferu magnetyzacji  $\text{C}_{\delta 1} \rightarrow \text{C}_{\alpha}$  na próbce  $\text{U-}^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -fMLF (**Rysunek 9**) pokazała wyraźnie, że jego efektywność zależy nie tylko od typu sekwencji, ale, co ważniejsze, bardzo silnie od prędkości rotacji. Zwiększenie prędkości rotacji z 55.5 kHz (możliwej do uzyskania dla rotorów o średnicy 1.3 mm i mniejszej) do 98.0 kHz (osiągalnej przy użyciu rotorów o średnicy poniżej 0.81 mm) w każdym przypadku podnosi znacząco efektywność transferu (**Rysunek 10**). Wzrost efektywności transferu magnetyzacji jest szczególnie widoczny w przypadku dwóch najlepszych sekwencji mieszających DIPSI oraz TOBSY  $\text{C}_{948}^1$  (wzrost efektywności rzędu 4-5x). W tym miejscu warto zwrócić uwagę no to, że choć dla prostego modelu jakim była 2,3- $^{13}\text{C}_2$ -alanina symulacje numeryczne doskonale zgadzały się z danymi eksperymentalnymi, to w przypadku tak skomplikowanego układu spinowego jak  $\text{U-}^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -fMLF ich wiarygodne przeprowadzenie jest w zasadzie niemożliwe, jeśli chciałoby się uwzględnić obecność protonów w analizowanym układzie spinowym. Z uwagi na ograniczanie ilości spinów możliwych do uwzględnienia w symulacjach do 8-10, nieuwzględnienie obecności protonów będzie źródłem głównych błędów symulacji numerycznych, ponieważ uniemożliwi uwzględnienie efektów wyższych rzędów, takich jak krzyżowe efekty sprzężeń (np.  $J_{\text{CC}}$  i  $D_{\text{CH}}$ ). Mimo to, przeprowadzone symulacje numeryczne bez uwzględnienia oddziaływań z  $^1\text{H}$  pozwoliły na dobre odwzorowanie optymalnych czasów

mieszania<sup>iv</sup> czy wzrostu efektywności wraz ze wzrostem prędkości rotacji, jednakże ranking sekwencji w oparciu o efekty symulacji jak i eksperymentu różnił się. Dlatego też, istotność oddziaływań wyższych rzędów z protonami była siłą napędową do wykonania dodatkowej czasochłonnej eksperymentalnej weryfikacji sekwencji na układzie modelowego białka U-<sup>2</sup>H,<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N-<sup>13</sup>CH<sub>3</sub>(Val,Leu,Ile)-SH<sub>3</sub>.



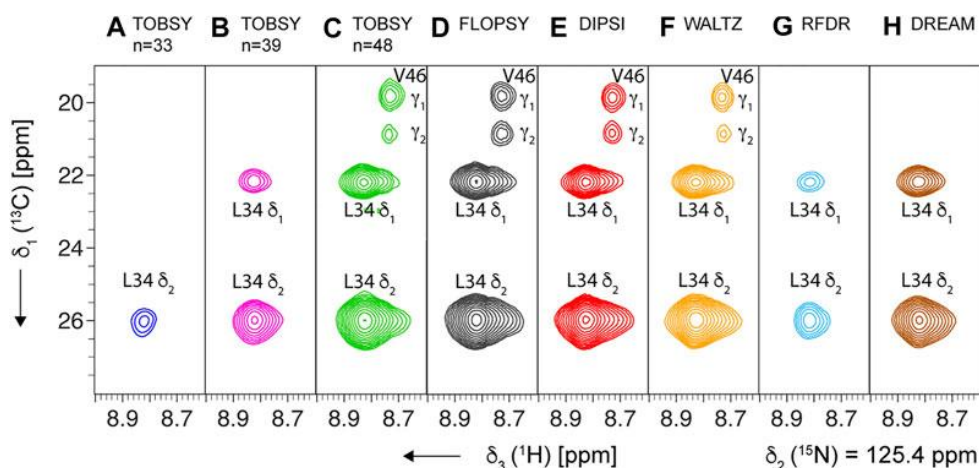
Rysunek 9 Fragmenty widm korelacyjnych <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C zarejestrowanych przy prędkości rotacji 55.5 kHz w polu 18.8 T dla tripeptydu U-<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N-fMLF.

<sup>iv</sup> Czyli taki który jest zgodny z później wykonanymi eksperymentalnie pomiarami.



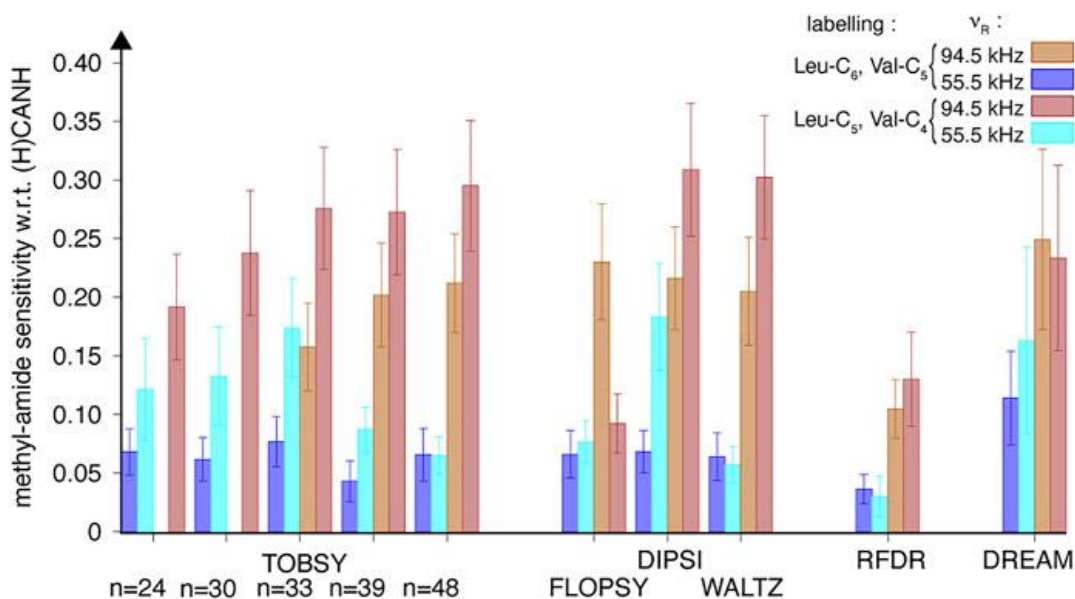
Rysunek 10 Porównanie efektywności transferu magnetyzacji  $C_{\beta 1} \rightarrow C_{\alpha}$  dla leucyny w tripeptydzie U- $^{13}C$ ,  $^{15}N$ -fMLF, w polu 18.8 T przy 2 różnych (55.5 i 98.0 kHz) prędkościach rotacji.

Z wyników uzyskanych dla fMLF należało się spodziewać niskiej efektywności sekwencji TOBSY dla małych wartości n, mimo to zdecydowałem, że analizie na układzie modelowego białka U- $^2H$ ,  $^{13}C$ ,  $^{15}N$ - $^{13}CH_3$ (Val,Leu,Ile)-SH3 zostaną podane wszystkie sekwencje. Wykonana ocena ich przydatności opierała się na analizie szeregu przekrojów (Rysunek 11) z widm 3D  $(H)C^{MET}(CC)(CA)NH$  zarejestrowanych z różnymi sekwencjami mieszania i ocenie średniej efektywności transferu magnetyzacji dla wszystkich 14 aminokwasów metylowych w łańcuchu polipeptydowym białka SH3.



Rysunek 11 Wybrane przekroje z widm 3D  $(H)C^{MET}(CC)(CA)NH$  zarejestrowanych z różnymi sekwencjami mieszania dla białka U- $^2H$ ,  $^{13}C$ ,  $^{15}N$ - $^{13}CH_3$ (Val,Leu,Ile)-SH3 (bez linearyzacji łańcucha), w polu 18.8 T przy prędkości rotacji 94.5 kHz.

Podobnie jak w przypadku tripeptydu, przeanalizowałem efektywność sekwencji mieszających przy 2 różnych prędkościach rotacji stosowanych typowo z rotorami o średnicy 1.2-1.3 mm i rotorami o średnicy 0.8-0.7 mm. Analogicznie jak dla fMLF, wzrost prędkości rotacji znacznie poprawia efektywność wszystkich sekwencji (**Rysunek 12**). W tym przypadku ponownie sekwencja DIPSI wydaje się być najlepsza.



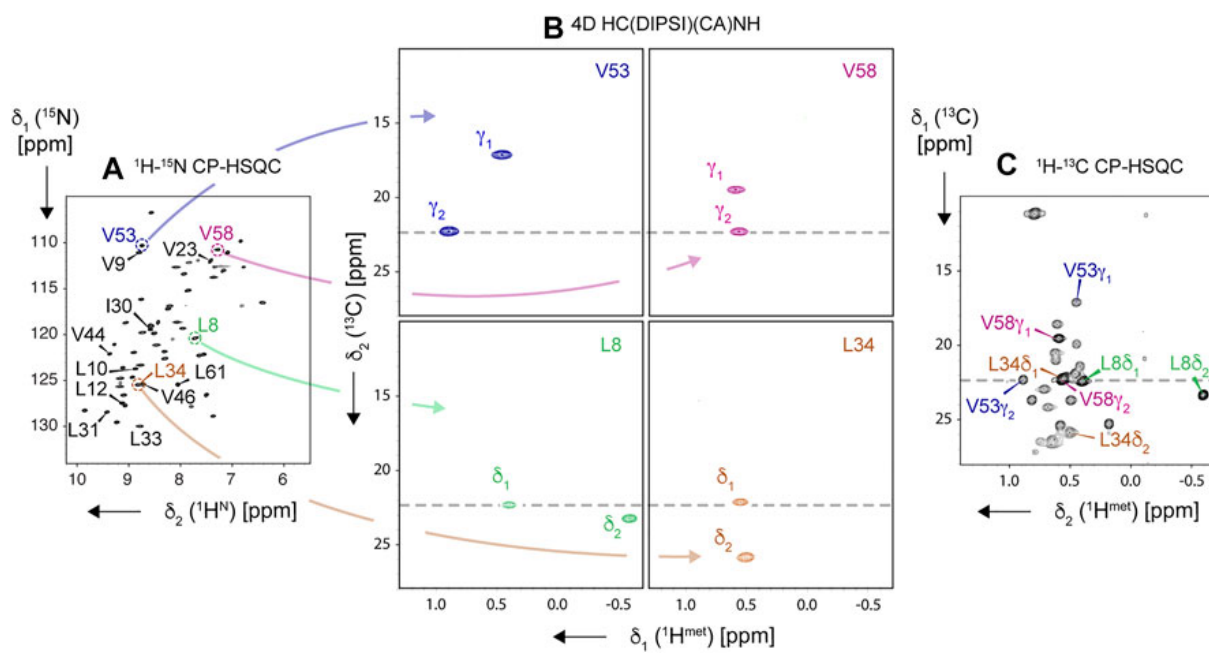
**Rysunek 12** Porównanie efektywności transferu magnetyzacji  $C_{\delta 1} \rightarrow C_{\alpha}$  dla waliny i leucyny w polu 18.8 T przy 2 różnych (55.5 i 94.5 kHz) prędkościach rotacji dla białka  $U-^2H, ^{13}C, ^{15}N-^{13}CH_3(Val, Leu, Ile)-SH_3$  w wariancie bez linearyzacji (Leu-C<sub>6</sub>, Val-C<sub>5</sub>) i z linearyzacją łańcucha (Leu-C<sub>5</sub>, Val-C<sub>4</sub>).

Jak pokazuje **Rysunek 12**, istotnym czynnikiem ograniczającym wydajność transferu jest rozgałęzienie łańcucha bocznego aminokwasu, charakterystyczne dla leucyny i waliny. W leucynie atom węgla  $C_{\gamma}$  połączony jest z dwiema grupami metylowymi ( $C_{\delta 1}$  i  $C_{\delta 2}$ ), a w walinie analogiczną rolę „węzła” pełni  $C_{\beta}$  (do  $C_{\gamma 1}$  i  $C_{\gamma 2}$ ). Przy pełnym znakowaniu  $^{13}C$  taki „węzeł rozgałęzienia” zwiększa liczbę równoległych ścieżek  $^{13}C-^{13}C$  oraz zagęszcza lokalną sieć dipolową  $^1H$ . W praktyce będzie to powodować zmniejszenie efektywności transferu (zwyfikowałem to wcześniej poprzez symulacje numeryczne) oraz nieznaczne zwiększenie szerokości linii  $^1H$ . W związku z tym, w dalszej części pracy zastosowano strategię „linearyzacji” łańcucha poprzez odpowiedni dobór schematu znakowania izotopowego (użycie odpowiedniego prekursora). Taki zabieg ogranicza liczbę bocznych „dróg” transferu magnetyzacji, zwiększając tym samym czułość, a dodatkowo rozrzedza lokalną sieć  $^1H$

i zawęża linie, co w efekcie powoduje dalszy wzrost czułości. Przejście od układu rozgałęzionego Leu-C<sub>6</sub>,Val-C<sub>5</sub> do układu liniowego Leu-C<sub>5</sub>,Val-C<sub>4</sub>, mimo iż wiąże się z 50% utratą sygnału, powoduje dla sekwencji ze skalarnym transferem (TOBSY, FLOPSY,DIPSI,WALTZ), że sumaryczna czułość jest wyraźnie lepsza ze względu na znaczny wzrost efektywności transferu (2-3 krotny wg. symulacji). Z przeprowadzonych analiz można jasno stwierdzić, że najlepszym wyborem sekwencji dla transferu C<sub>δ1</sub> -> C<sub>α</sub> jest sekwencja DIPSI użyta przy możliwie dużej prędkości rotacji kiedy dodatkowo stosuje się linearyzację łańcucha.

Ostatni etap projektu dotyczył problemu związanego z tym, że sekwencja 3D może nie być wystarczająca do przypisania zarówno sygnałów <sup>1</sup>H jak i <sup>13</sup>C wszystkich aminokwasów metylowych. Mimo tego, że białko SH3 jest małym białkiem, to wiele sygnałów <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C w zakresie metylowym charakteryzuje się degeneracją przesunięć chemicznych. Przez to jednoznaczne przypisanie niektórych z nich wyłącznie na podstawie eksperymentów 3D staje się niemożliwe. Jako rozwiązanie tego problemu zaproponowałem rejestrację widma 4D HC(DIPSI)(CA)NH. Zarejestrowane widmo (**Rysunek 13**) charakteryzuje się doskonałą rozdzielczością i pozwala rozstrzygnąć wszystkie ewentualne niejednoznaczności. Warto podkreślić, że stosując technikę próbkowania niejednorodnego NUS (ang. *Non-uniform sampling*) wraz ze wspomnianą w poprzednim rozdziale techniką przyśpieszenia relaksacji T<sub>1</sub> (PACC), możliwa jest rejestracja takiego widma w rozsądnym czasie eksperymentalnym rzędu 40h, z zadowalającym stosunkiem S/N (25±7). Pozwala to oszacować, że dla dużego (z punktu widzenia NMR) białka, zawierającego 400 aminokwasów, rejestracja takiego widma z podobnym S/N byłaby możliwa w czasie nieprzekraczającym tygodnia.

Przedstawiona pogłębiona analiza sekwencji mieszania stosowanych do przypisań grup metylowych aminokwasów dostarczyła cennej wiedzy odnośnie istotnych parametrów eksperymentalnych w tego typu eksperymentach. W szczególności, zwraca ona uwagę na wartość prowadzenia eksperymentów z najszybszą dostępną prędkością rotacji próbki. Wprawdzie prowadzi to do konieczności zastosowania mniejszych rotorów, co zmniejsza ilość badanej próbki, jednak wzrost efektywności transferu magnetyzacji jest na tyle znaczący, by z nadmiarem skompensować tę stratę.

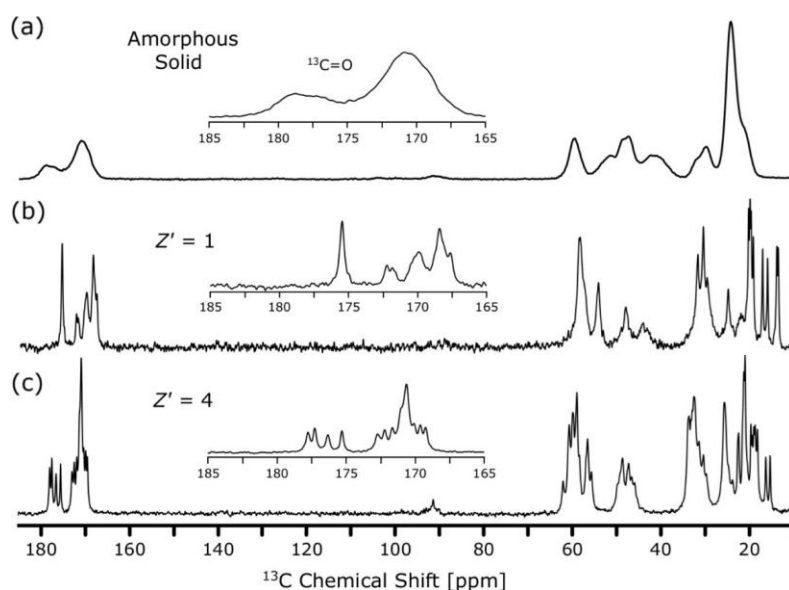


Rysunek 13 A) Widmo hNH, B) przekroje z widma 4D HC(DIPSI)(CA)NH i C) zakres metylowy widma hCH zarejestrowane dla U- $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{CH}_3$ (Val,Leu,Ile)-SH3 (z linearyzacją łańcucha).

### 3.3.5. Publikacja 4

Ostatnia praca poświęcona zagadnieniom związanym z zastosowaniem NMR w badaniach układów biologicznych ma nieco odmienny charakter niż poprzednie publikacje, w których główny nacisk położony był na rozwój metodologii spektroskopii NMR ciała stałego. W tym przypadku wykorzystałem przede wszystkim wcześniej zaimplementowane metody do analizy strukturalnej krystalicznego tetrapeptydu PVPV, krystalizującego w dwóch formach krystalicznych.

Peptyd ten otrzymano klasyczną metodą syntezy w roztworze, a następnie wytrącono z mieszaniny reakcyjnej. Tak uzyskana próbka charakteryzowała się szerokimi, słabo rozdzielonymi sygnałami w widmie  $^{13}\text{C}$  CP-MAS, co jest typowe dla fazy amorficznej (**Rysunek 14a**). Rekrystalizacja formy amorficznej z mieszaniny metanolu i wody (1:1) prowadziła natomiast do otrzymania próbki, dla której sygnały w widmie  $^{13}\text{C}$  CP-MAS były wyraźnie węższe i dobrze rozdzielone, co wskazywało na obecność dobrze uporządkowanej formy krystalicznej (**Rysunek 14b**). Drugą formę krystaliczną uzyskano poprzez przechowywanie próbki amorficznej w atmosferze o kontrolowanej wilgotności. Zarejestrowane dla niej widmo  $^{13}\text{C}$  CP-MAS charakteryzowało się znacznie większą złożonością, jednak sygnały pozostawały wąskie i zasadniczo dobrze rozdzielone, co prowadziło do wniosku, że próbka ta stanowi inną, również dobrze uporządkowaną formę krystaliczną (**Rysunek 14c**).



**Rysunek 14** Widma  $^{13}\text{C}$  CP-MAS zarejestrowane dla różnych form peptydu PVPV a) forma amorficzna, b) forma tetragonalna, c) forma trójskośna.

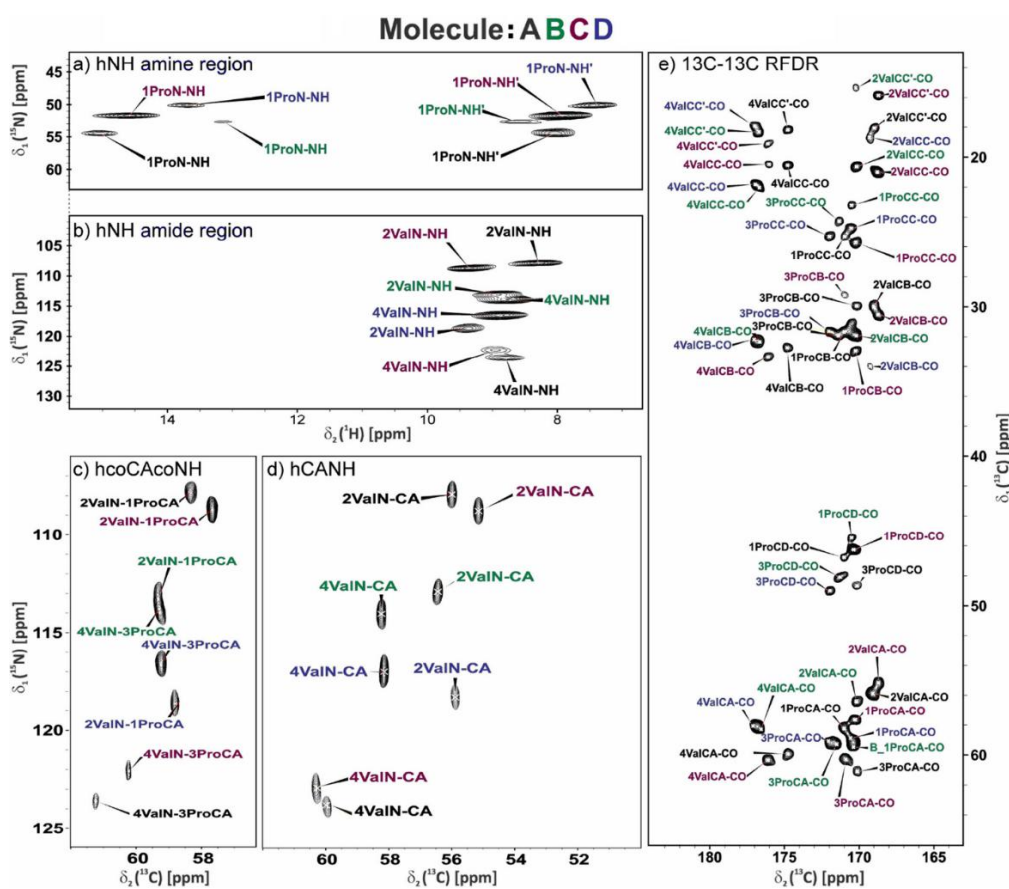
Dalsza analiza próbek z wykorzystaniem technik dyfrakcyjnych (sc-XRD) pozwoliła ustalić ich strukturę i wykazała, że peptyd ten krystalizuje w dwóch formach: tetragonalnej oraz trójskośnej. Dla formy tetragonalnej obserwowany był pojedynczy zestaw sygnałów w widmie  $^{13}\text{C}$  CP-MAS (**Rysunek 14b**), zgodny z obecnością jednej cząsteczki w asymetrycznej części komórki elementarnej ( $Z' = 1$ ). Dla formy trójskośnej pojawiały się cztery odrębne zestawy sygnałów w widmie  $^{13}\text{C}$  CP-MAS (**Rysunek 14c**), co jednoznacznie wskazywało na obecność czterech niezależnych cząsteczek w asymetrycznej części komórki elementarnej ( $Z' = 4$ ). Wspomniane różnice w liczbie obserwowanych sygnałów są szczególnie dobrze widoczne w zakresie karbonylowym.

Mimo ustalenia struktur obu form krystalicznych peptydu PVPV, otwartym problemem pozostawało przypisanie sygnałów w widmach  $^{13}\text{C}$  CP-MAS. W przypadku próbki krystalizującej w formie tetragonalnej zagadnienie to było stosunkowo proste i mogło zostać rozwiązane w oparciu o teoretycznie obliczone wartości przesunięć chemicznych. Podejście takie nie mogło jednak zostać skutecznie zastosowane dla układu krystalizującego w formie trójskośnej o  $Z' = 4$ . W tym przypadku różnice wartości przesunięć chemicznych  $^{13}\text{C}$  pomiędzy poszczególnymi cząsteczkami w sieci krystalicznej są niewielkie, co uniemożliwia ich wiarygodne przypisanie wyłącznie na podstawie danych teoretycznych. W praktyce przypisanie sygnałów w układzie o  $Z' = 4$ , który dodatkowo – ze względu na stosunkowo symetryczną strukturę molekularną (dwie proliny i dwie waliny) – charakteryzuje się wąskim zakresem obserwowanych przesunięć chemicznych, jest zadaniem w zasadzie niewykonalnym przy użyciu prostej korelacji danych eksperymentalnych z wynikami obliczeń. Złożoność problemu przypisań w takim układzie jest zbliżona do tej, z jaką mamy do czynienia w przypadku widm białek, i wymaga zastosowania eksperymentów typowych dla badań biomolekuł. W omawianej publikacji zdecydowano się zatem na otrzymanie próbki w pełni znakowanej izotopowo  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$  oraz wykorzystanie serii eksperymentów 2D i 3D z detekcją  $^1\text{H}$ , rejestrowanych w warunkach bardzo szybkiej rotacji pod kątem magicznym (UF-MAS). Pary eksperymentów 3D hCONH, hCOcaNH oraz hcoCAcoNH i hCANH (**Rysunek 15c,d**), a także eksperyment dedykowany prolinie – 3D hCONCAH<sup>v</sup> – pozwoliły na wykonanie sekwencyjnych przypisań sygnałów  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ , Ca i CO. Przypisanie pozostałych sygnałów (C $\beta$ ,

---

<sup>v</sup> Prolina występując w środku łańcucha peptydowego nie zawiera protonów NH które są wykorzystywane w większości eksperymentów. W takiej sytuacji jeśli wciąż stosowana jest detekcja  $^1\text{H}$  konieczne jest przejście na detekcję HA co wiąże się często z nieco gorszą rozdzielczością w wymiarze  $^1\text{H}$ .

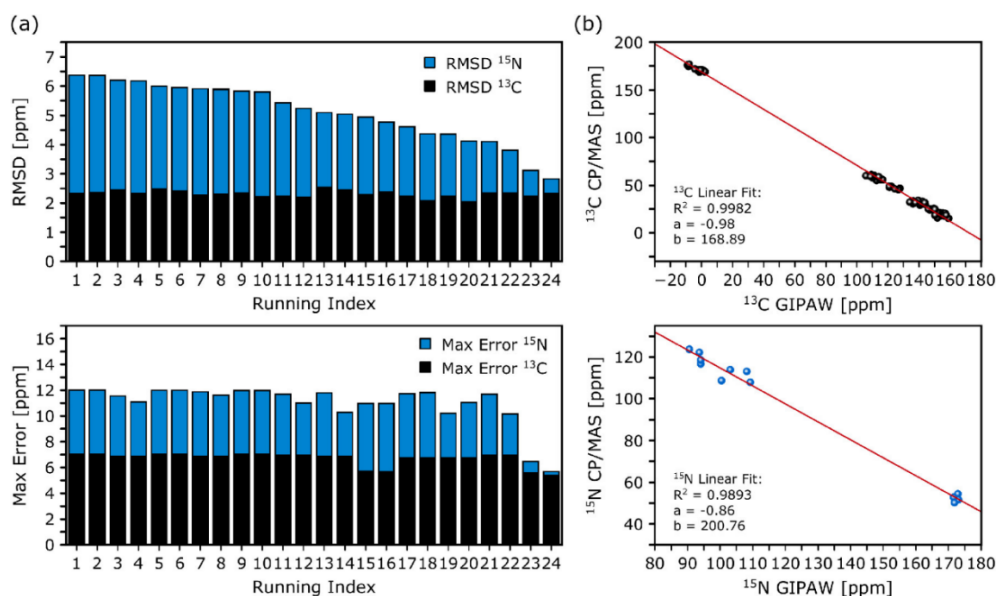
C $\gamma$ , C $\delta$ ) wykonano z wykorzystaniem homojądrowego eksperymentu  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  RFDR (Rysunek 15e), umożliwiającego obserwację korelacji w obrębie pojedynczej reszty aminokwasowej.



Rysunek 15 Wielowymiarowe widma NMR ciała stałego wykorzystane do przypisania sygnałów rezonansowych jednorodnie znakowanego izotopowo peptydu PVPV ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) w formie trójskońszej. (a, b) Widma hNH przedstawiające korelacje  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ . (c) Dwuwymiarowa projekcja C $\alpha$ -N z trójwymiarowego eksperymentu hcoCAcoNH, (d) Dwuwymiarowa projekcja C $\alpha$ -N z widma 3D hCANH, pokazująca wewnątrzresztowe korelacje C $\alpha$ -N. (e) Widmo  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  RFDR wykorzystane do przypisań atomów węgla w łańcuchach bocznych.

Otrzymany zestaw danych pozwalał na przypisanie sygnałów w obrębie poszczególnych cząsteczek peptydu w strukturze krystalicznej, jednak nie było możliwe określenie która z cząsteczek jest która. Rozwiązaniem tego problemu było połączenie obliczeń teoretycznych przesunięć chemicznych w oparciu o dostępne dane rentgenograficzne i skorelowanie ich z danymi eksperymentalnymi. W tej sytuacji dane teoretyczne i dane

eksperymentalne zawierają 4 komplety przesunięć chemicznych  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$  dla każdej cząsteczki tetrapeptydu. Daje to razem 24 możliwe permutacje danych eksperymentalnych i teoretycznych. Dla każdej z tych permutacji policzono RMSD a także maksymalną różnicę przesunięć chemicznych  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$  (**Rysunek 16**).



**Rysunek 16** Analiza statystyczna izotropowych przesunięć chemicznych dla trójskośnej formy peptydu PVPV o  $Z' = 4$ . (a) Wartości RMSD oraz maksymalne odchylenia pomiędzy przewidywanymi i eksperymentalnymi przesunięciami chemicznymi  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$  dla wszystkich 24 możliwych przyporządkowań obliczonych i eksperymentalnie obserwowanych cząsteczek. Dane uporządkowano według malejących błędów dla  $^{15}\text{N}$  w każdej permutacji. (b) Wykresy korelacyjne porównujące eksperymentalne i teoretyczne (GIPAW) izotropowe przesunięcia chemiczne  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$ .

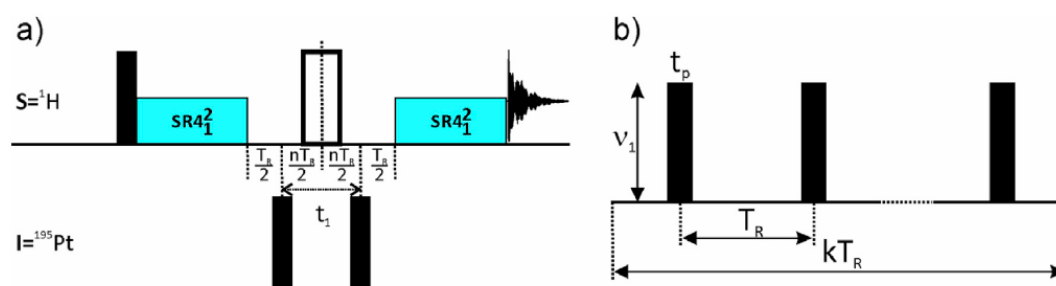
Z analizy otrzymanych danych wynika, że wartości RMSD między eksperymentalnymi a teoretycznymi przesunięciami  $^{13}\text{C}$  nie są dobrym wskaźnikiem pozwalającym na wykonanie przypisań poszczególnych cząsteczek, bo oscylują dla wszystkich 24 permutacji w granicach 2.5 ppm. Zdecydowanie bardziej miarodajny jest tutaj RMSD dla  $^{15}\text{N}$  który zmienia się od 7 do 3 ppm. Dobrym parametrem pozwalającym na przypisanie poszczególnych sygnałów na widmie do molekuł w strukturze krystalicznej jest również porównanie maksymalnych różnic przesunięć chemicznych. Obie metody wskazywały ten sam wariant przypisań jako najbardziej zgodny z eksperymentem.

<sup>vi</sup> A także  $^1\text{H}$ , ale dane te nie były wykorzystane w analizie.

### 3.3.6. Publikacje 5-7

Kolejne trzy publikacje, stanowiące podstawę przedstawianego autoreferatu, dotyczą rozwoju technik typu HMQC i ich aplikacji do detekcji trudnych jąder i dlatego też zostaną omówione razem.

Pierwsze dwie prace skupione są na analizie efektywności różnych schematów pobudzenia jądra X w eksperymencie  $^1\text{H-X D-HMQC}$  w warunkach szybkiego wirowania pod kątem magicznym. W **Publikacji 5** skupiono się na analizie tej sekwencji w przypadku gdy jądro X to izotop platyny  $^{195}\text{Pt}$ , jednakże przedstawione analizy i wnioski są ogólne i mogą być rozszerzone na dowolne jądra o spinie  $\frac{1}{2}$  i dużej anizotropii przesunięcia (np.  $^{119}\text{Sn}$ ,  $^{207}\text{Pb}$ ). Druga omawiana w tym rozdziale praca, **Publikacja 6**, dotyczy analizy sekwencji  $^1\text{H-}^{14}\text{N D-HMQC}$  i w ogólności wnioski w niej zawarte mogłyby być rozszerzone na inne jądra o spinie 1 i znaczącym sprzężeniu kwadrupolowym, jednakże w praktyce jedynie jądro  $^{14}\text{N}$  spełnia ten warunek<sup>vii</sup>.



Rysunek 17 a) Sekwencja  $^1\text{H-X D-HMQC}$  wykorzystująca sekwencję recouplingową  $\text{SR4}_1^2$  b) schemat pobudzenia DANTE synchronizowany z rotacją.

Ze względu na dużą wartość anizotropii przesunięcia chemicznego (CSA) lub sprzężenia kwadrupolowego ( $C_Q$ ), nawet przy szybkiej rotacji próbki pod kątem magicznym, widmo jąder takich jak  $^{195}\text{Pt}$  czy  $^{14}\text{N}$  składa się z wielu pasm satelitarnych (ang. spinning-sidebands), których zakres może obejmować nawet kilka MHz. Znacząco obniża to czułość pomiaru, a na dodatek jednorodne pobudzenie tak szerokiego zakresu spektralnego jest w zasadzie niemożliwe przy użyciu klasycznych prostokątnych impulsów. Częściowym

<sup>vii</sup> Pozostałe dwa stabilne izotopy o spinie 1 to  $^2\text{H}$  i  $^6\text{Li}$ , jednak charakteryzują się one znacznie mniejszą wartością sprzężenia kwadrupolowego.

rozwiązaniem problemu jest zastosowanie sekwencji D-HMQC, w której czas ewolucji  $t_1$  synchronizowany jest z rotacją<sup>viii</sup>. Strategia taka pozwala na zawinięcie linii satelitarnych do jednego (najlepiej izotropowego) sygnału, przez co poprawiany jest stosunek sygnału do szumu. W przypadku jąder o spinie  $\frac{1}{2}$  (np.  $^{195}\text{Pt}$ ) możliwe jest również zmodyfikowanie sekwencji D-HMQC do sekwencji aMAT-D-HMQC, która pozwala obserwować widma o większej szerokości spektralnej w wymiarze pośrednim. W obydwu sytuacjach istotnym ograniczeniem jest jednak szerokość pobudzanego zakresu przy zastosowaniu impulsów prostokątnych<sup>ix</sup>. Aby rozwiązać ten problem, w obydwu pracach zbadałem i porównałem, zarówno poprzez symulacje numeryczne w programie SIMPSON jak i eksperymenty, różne strategie pobudzenia jądra X stosując:

- Krótkie (klasyczne) impulsy RF o dużej mocy i kącie wychylenia  $90^\circ$ , oznaczone HP („hard pulse”);
- Impulsy DANTE synchronizowane z rotacją;
- Długie selektywne impulsy pobudzające tylko jedną z linii satelitarnych, oznaczane dalej jako SLP („selective long pulse”);
- Dla jądra  $^{14}\text{N}$  dodatkowo schemat pobudzenia XiX.

Do teoretycznej analizy efektywności sekwencji D-HMQC wykorzystałem symulacje numeryczne, w których analizowałem równocześnie wpływ 2 parametrów na pobudzenia jądra X ( $^{195}\text{Pt}$  lub  $^{14}\text{N}$ ) przy różnych typach impulsów na kanale X. Przykładowo, w otrzymanych mapach 2D analizowałem wpływ:

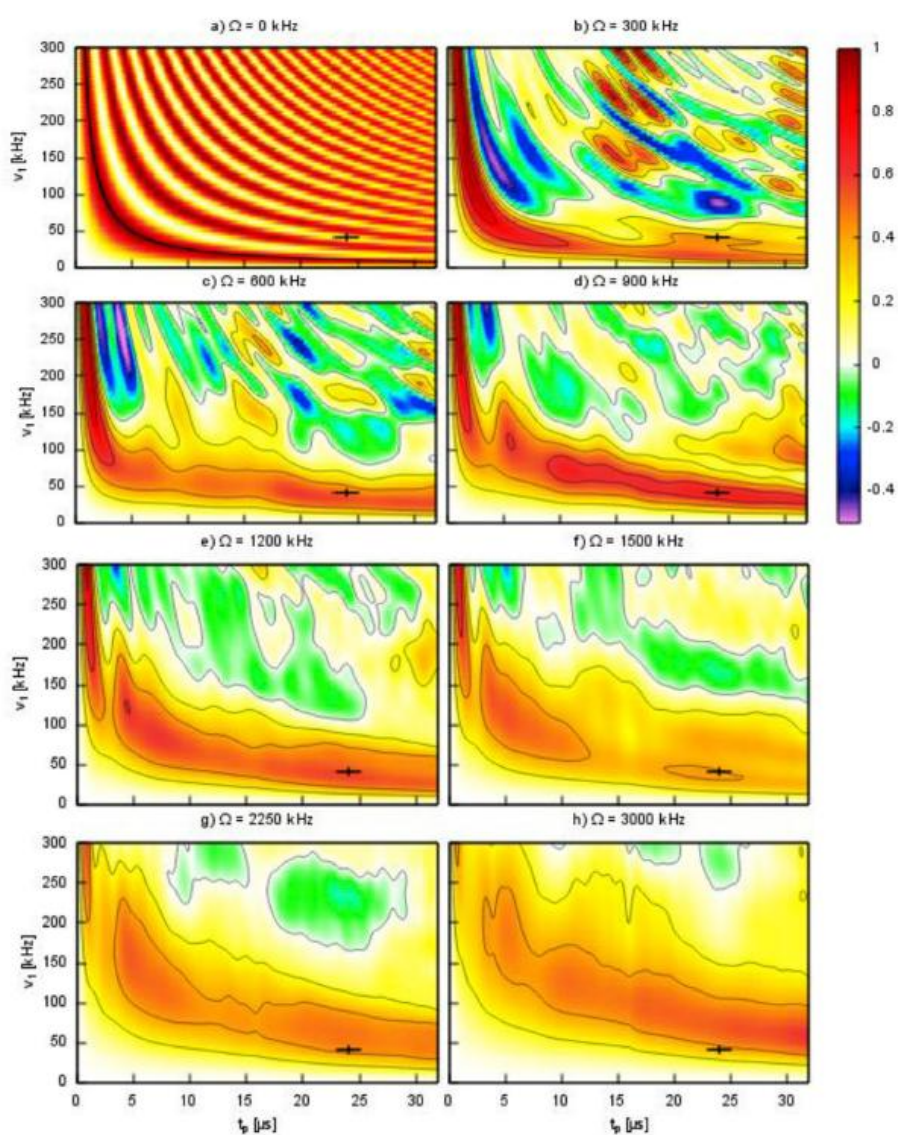
- a) Długości impulsu ( $t_p$ ) i jego mocy ( $v_1$ ) przy zadanych wartościach anizotropii przesunięcia chemicznego jądra X ( $\Omega=0, 300, 600, 900, 1200, 1500, 2250, 3000$  kHz).  
**(Rysunek 18)**
- b) Mocy impulsu ( $v_1$ ) i anizotropii przesunięcia chemicznego ( $\Omega$ ) przy założonej długości impulsu ( $t_p= 1.25, 2.50, 5.0, 24.0$   $\mu\text{s}$ ).
- c) Długości impulsu ( $t_p$ ) i anizotropii przesunięcia chemicznego ( $\Omega$ ) przy założonej mocy impulsu ( $v_1=250, 100, 50, 42$  kHz)
- d) Offsetu i anizotropii przesunięcia chemicznego ( $\Omega$ ) przy wybranej mocy i długości impulsu.

<sup>viii</sup> Oznacza to że w każdym kolejnym punkcie  $t_1$  czas ten wydłużany jest dokładnie o jeden okres obrotu rotora lub jego wielokrotność.

<sup>ix</sup> Ograniczenie to związane jest z limitem mocy jaką można bezpiecznie dostarczyć do sondy.

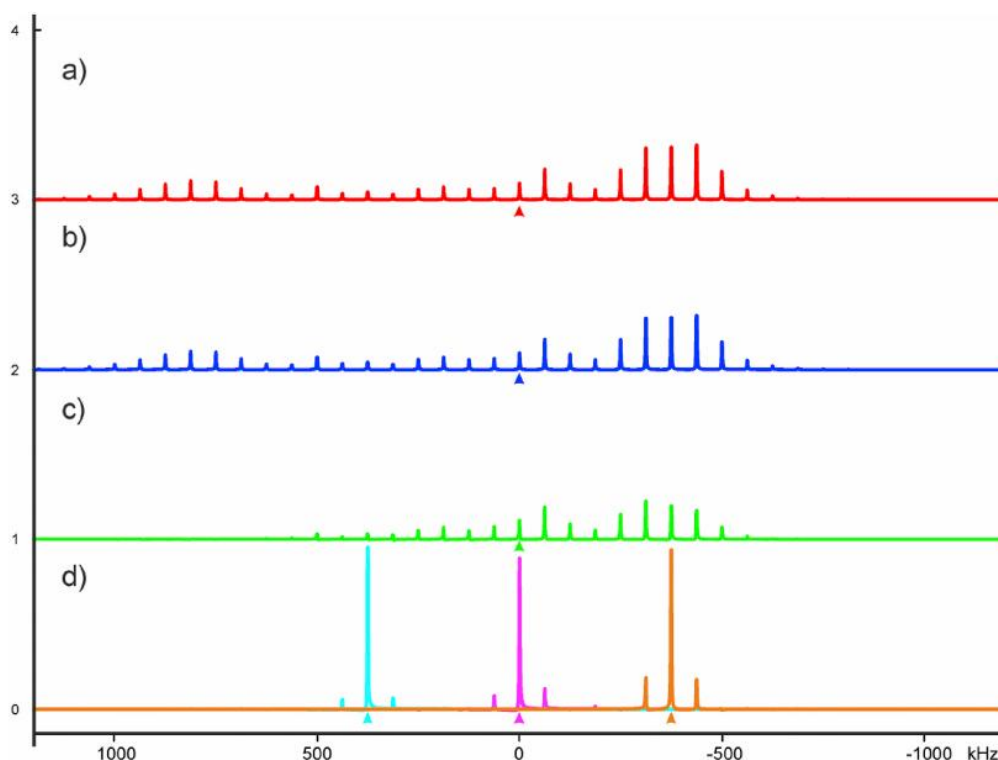
Dodatkowo wykonałem m.in. symulacje numeryczne projekcji widm 2D HMQC na pośrednio obserwowaną oś ( $^{195}\text{Pt}$ ) stosując różne schematy pobudzenia (**Rysunek 19**).

Na podstawie przeprowadzonych symulacji wykazałem, że przy znacznej anizotropii przesunięcia chemicznego (wartość  $\Omega \geq 600$  kHz, co jest wartością typową dla  $^{195}\text{Pt}$ ) najefektywniejszy schemat pobudzenia to ten wykorzystujący długie selektywne impulsy (SLP), pobudzające wyłącznie jedną z linii satelitarnych.



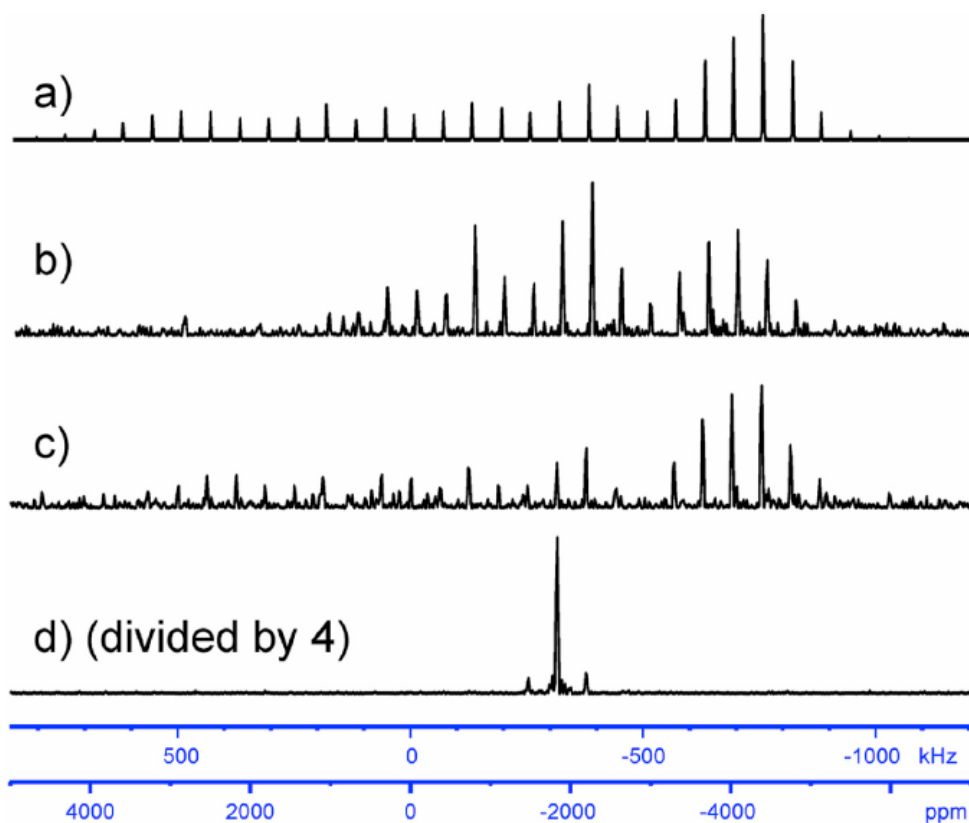
**Rysunek 18** Symulowana efektywność  $^1\text{H}$ - $^{195}\text{Pt}$  D-HMQC w funkcji długości impulsu ( $t_p$ ) i mocy RF ( $v_1$ ) dla różnych wartości CSA jądra  $^{195}\text{Pt}$ .

Ponadto wykazałem, że użycie synchronizowanych z rotacją impulsów DANTE w przypadku  $^{195}\text{Pt}$  pozwala na równie efektywne pobudzenie co wykorzystanie impulsów SLP, jednakże w przypadku użycia impulsów typu DANTE trzeba z góry znać dość precyzyjnie przesunięcie chemiczne, ze względu na stosunkowo wąski zakres pobudzenia w obrębie jednej linii satelitarnej. Z drugiej strony, impulsy typu DANTE pozwalają na pobudzenie linii satelitarnych w bardzo szerokim zakresie, co jest niezbędne jeśli konieczne jest wyznaczenia wartości głównych składowych tensora przesunięcia chemicznego. Schematyczne porównanie efektywności różnych schematów pobudzenia przedstawia **Rysunek 19**. Z zaprezentowanych projekcji wyraźnie widać, że użycie impulsów SLP znacząco zwiększa intensywność obserwowanych sygnałów, natomiast użycie impulsów DANTE pozwala na efektywne pobudzenie wszystkich satelit obrotowych nawet jeśli oddalone są od linii izotropowej o 1 MHz.



**Rysunek 19** Symulowane projekcje na oś  $^{195}\text{Pt}$  z eksperymentu CT-D-HMQC wykorzystujące a) idealny nieskończenie krótki impuls, b) impuls DANTE synchronizowany z rotacją, c) impuls prostokątny dużej mocy, d) impuls SLP (zaprezentowano widmo przy 3 różnych offsetach).

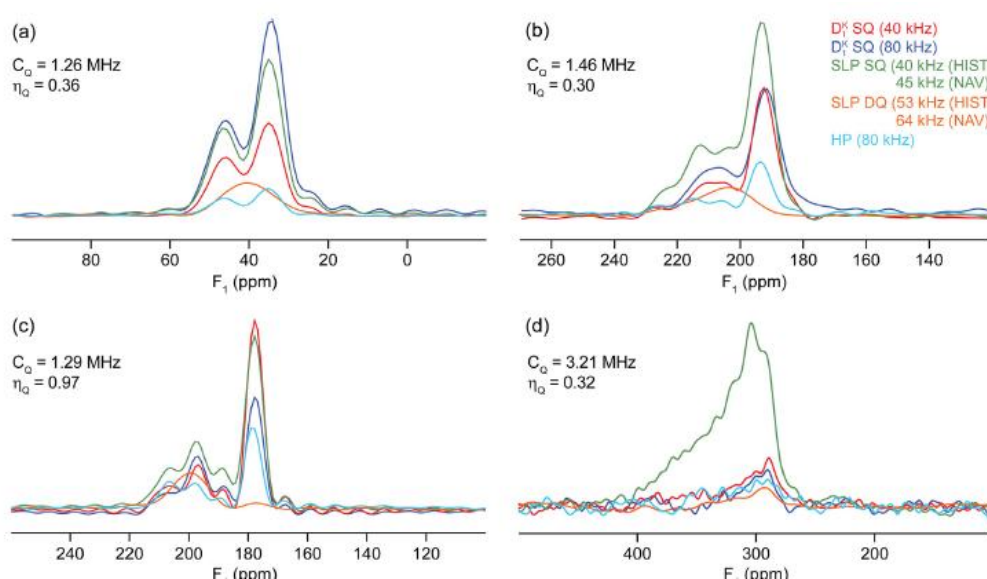
W celu rzetelnej weryfikacji informacji otrzymanych z wykorzystaniem symulacji numerycznych, wykonałem szereg eksperymentów pozwalających porównać efektywność opracowanych metod, szczególnie w przypadku pobudzenia typu SLP. Zgodnie z symulacjami, eksperymenty wykazały istotną poprawę pobudzenia wszystkich sidebandów rotacyjnych, jeżeli do pobudzenia wykorzystano impulsy DANTE zamiast impulsów prostokątnych dużej mocy, natomiast użycie impulsów typu SLP znacząco poprawia stosunek sygnału do szumu pobudzając tylko jedną z linii satelitarnych. Należy jednak podkreślić, że widma rejestrowane w szerokim zakresie spektralnym w osi pośredniej, czyli bez synchronizacji z rotacją, charakteryzują się dość dużym szumem  $t_1$  nawet z wykorzystaniem impulsów DANTE.



Rysunek 20 a) Symulowane i b-d) eksperymentalne projekcje z widma  $^1\text{H}$ - $^{195}\text{Pt}$  CT-D-HMQC zarejestrowane dla cis-platyny z wykorzystaniem a) idealnego impulsu, b) prostokątnego impulsu dużej mocy, c) impulsu DANTE synchronizowanego z rotacją, d) impulsu SLP.

Analogiczne podejście zarówno w odniesieniu do symulacji, jak i eksperymentów, zastosowałem w analizie sekwencji D-HMQC, korelującej jądro  $^1\text{H}$  i  $^{14}\text{N}$ , przy czym dla skrócenia czasu obliczeń numerycznych w ich przypadku rozważałem sekwencje J-HMQC.

Jest to umotywowane tym, że z punktu widzenia pobudzenia jądra  $^{14}\text{N}$  nie należy oczekiwać różnic między tymi dwoma sekwencjami. W przypadku  $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$  D-HMQC zdecydowanie najlepszą metodą (szczególnie eksperymentalnie) okazała się sekwencja korzystająca z impulsów SLP, co przedstawia **Rysunek 21**. Warto również podkreślić, że w przypadku  $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$  D-HMQC efektywność pobudzenia typu SLP w stosunku do innych metod wyraźnie rośnie wraz ze wzrostem wartości sprzężenia kwadrupolowego. W przypadku NH typu amidowego, o wartości  $C_Q=3.2$  MHz, pobudzenie takie jest kilka razy bardziej efektywne niż osiągalne innymi metodami.



**Rysunek 21** Eksperymentalne projekcje na oś  $^{14}\text{N}$  z korelacji  $^1\text{H}$ - $^{14}\text{N}$  D-HMQC wykorzystujących różne schematy pobudzenia, zarejestrowane dla monohydratu chlorowodoru histydyny (a,b,c) oraz dla N-acetylo-waliny. Wartości sprzężenia kwadrupolowego ( $C_Q$ ) pokazano na rysunku.

Należy podkreślić, że w chwili powstawania pracy technika D-HMQC z zastosowaniem impulsów SLP była najlepszą metodą detekcji  $^{14}\text{N}$  lub jąder o spinie  $\frac{1}{2}$  i dużym CSA (np.  $^{195}\text{Pt}$ ). Technika ta była wykorzystywana i dalej rozwijana również w innych zespołach i na jej podstawie opracowano m.in. eksperymenty pozwalające wyznaczyć zarówno przesunięcie chemiczne jak i wartości CSA  $^{195}\text{Pt}$  w rozsądnym czasie. Obecnie, w 2026 roku, szczególnie dla detekcji  $^{14}\text{N}$  rekomendowałbym jednak zastosowanie techniki T-HMQC, lub, o ile to tylko możliwe, zastosowanie technik wykorzystujących transfer przez sprzężenie skalarne (J) jak np.  $^1\text{J}_{195\text{Pt}-31\text{P}}$ .

Kontynuacją prac związanych z detekcją trudnych jąder w spektroskopii NMR w ciecie stałym jest prezentowana praca (**Publikacje 7**) dotycząca jądra  $^{103}\text{Rh}$ . Rezonans  $^{103}\text{Rh}$  w roztworze jest dobrze udokumentowanym w literaturze<sup>14,15</sup> narzędziem do rozwiązywania szeregu problemów strukturalnych w chemii metaloorganicznej i koordynacyjnej. Jak do tej pory zastosowanie tego jądra do analizy próbek stałych było bardzo ograniczone, mimo że jądro to ma spin  $\frac{1}{2}$  i 100% zawartość naturalną. Trudności w ciało stałej detekcji  $^{103}\text{Rh}$  NMR związane są z jego bardzo niskim współczynnikiem żyromagnetycznym, a więc i ekstremalnie niską częstotliwością rezonansową,<sup>x</sup> jak i niskimi sprzężeniami dipolowymi oraz spodziewaną dużą anizotropią przesunięcia chemicznego, co znacznie utrudnia pomiary widm  $^{103}\text{Rh}$ . Dodatkowo, dla pomiarów widm o tak niskiej częstotliwości potrzebne są specjalne głowice pomiarowe pozwalające pracować z tak niską częstotliwością<sup>xi</sup>. Nic więc dziwnego, że w literaturze można znaleźć wyłącznie kilka prac dotyczących rejestracji widm  $^{103}\text{Rh}$  np. wykorzystując polaryzację skrośną (*ang. cross-polarization*) w symetrycznych akwa-hydroxy kompleksach<sup>16</sup> lub technikę BRAIN-CP, możliwą do zastosowania w warunkach statycznych<sup>17</sup>. Podejścia te wymagają zarówno dużej ilości materiału, jak i długiego czasu akwizycji widm (od kilkunastu godzin do kilku dni), a na dodatek, w przypadku widm typu BRAIN-CP, nie pozwalają na rejestrację widm wysokiej rozdzielczości. Ponadto, obydwie metody ograniczone są do układów, w których odległość  $^1\text{H}$  do  $^{103}\text{Rh}$  jest na tyle mała, że polaryzacja skrośna będzie efektywna. Podjęto również próby detekcji pośredniej  $^{103}\text{Rh}$  przez  $^1\text{H}$  w warunkach szybkiego MAS na kompleksach wodorkowych, jednak tutaj podobnie istotnym ograniczeniem jest odległość  $^1\text{H}$ - $^{103}\text{Rh}$ <sup>xii</sup>. Wszystkie te metody nie nadają się zasadniczo do rutynowych pomiarów, szczególnie w przypadku kompleksów fosfinowych wykorzystywanych szeroko w katalizie (42% z prawie 7500 związków rodu w bazie krystalograficznej CCSD ma wiązanie Rh-P). Żeby wyjść naprzeciw tym problemom wykorzystałem doświadczenie zdobyte przy optymalizacji sekwencji D-HMQC dla  $^{195}\text{Pt}$  i  $^{14}\text{N}$  i opracowałem wraz z zespołem profesora Aarona Rosiniego z *Iowa State University Ames USA* efektywne metody oparte o eksperyment J-HMQC lub J-resolved wykorzystujące detekcję  $^{31}\text{P}$  oraz, o ile konieczne jest wyznaczenia parametrów anizotropii przesunięcia chemicznego, wcześniej opisane impulsy typu SLP. Zaletą takiego podejścia jest to, że transfer polaryzacji odbywa od  $^{31}\text{P}$  do  $^{103}\text{Rh}$  z użyciem relatywnie dużych (150-300Hz) stałych sprzężenia skalarnego  $^1\text{J}_{31\text{P}-103\text{Rh}}$  co umożliwia łatwą detekcję

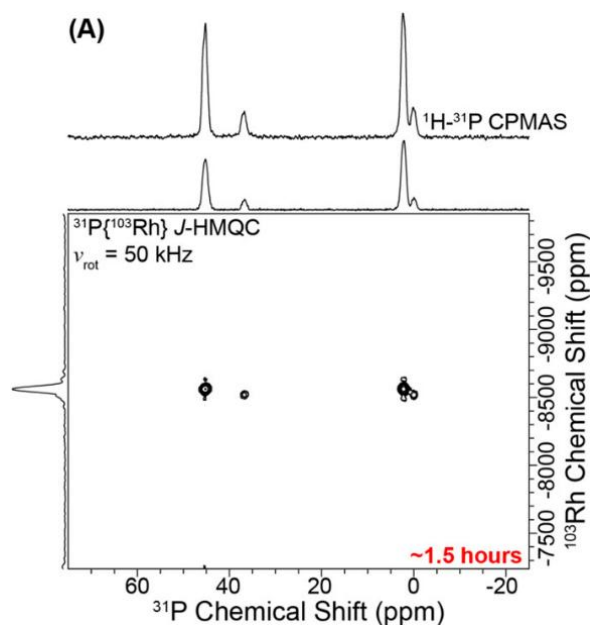
<sup>x</sup> Dla spektrometru pracującego przy częstotliwości  $^1\text{H}$  równej 600.13 MHz częstotliwość rezonansowa  $^{103}\text{Rh}$  to jedynie 19.12 MHz.

<sup>xi</sup> Nawet typowe sondy pomiarowe „low gamma” nie pozwalają na prace z jądrami o tak niskiej częstotliwości.

<sup>xii</sup> A co za tym idzie stała sprzężenia dipolowego.

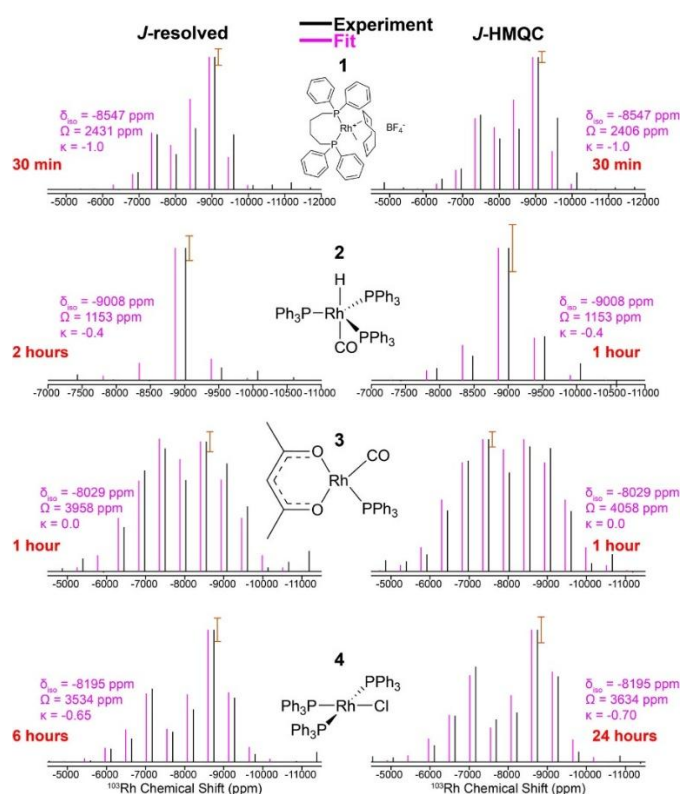
układów, w których niewielkie wartości sprzężenia dipolowego  $^1\text{H}$ - $^{103}\text{Rh}$  uniemożliwiają użycie eksperymentów opartych o transfer  $^1\text{H} \rightarrow ^{103}\text{Rh}$ .

Korzystając z eksperymentu  $^{31}\text{P}$ - $^{103}\text{Rh}$  J-HMQC możliwa była rejestracja widm  $^{103}\text{Rh}$  w czasie rzędu 1-2h na kilku mg próbki kompleksu  $[(\text{cod})\text{Rh}(\text{dppb})]\text{BF}_4$  (**Rysunek 22**) czy innych kompleksów fosfinowych m.in. katalizatora Wilkinsona.



**Rysunek 22** Widmo  $^{31}\text{P}$ - $^{103}\text{Rh}$  J-HMQC zarejestrowane dla kompleksu  $[(\text{cod})\text{Rh}(\text{dppb})]\text{BF}_4$

Dużą zaletą techniki  $^{31}\text{P}$ - $^{103}\text{Rh}$  J-HMQC lub analogicznego eksperymentu typu J-resolved jest możliwość jego zastosowania do pomiarów anizotropii przesunięcia chemicznego  $^{103}\text{Rh}$ , wykorzystując selektywne pobudzenie satelit obrotowych z użyciem impulsów SLP. Podejście takie pozwala na wyznaczenie parametrów tensora ekranowania w czasie od kilkudziesięciu minut do kilku godzin, co nawet w najgorszym wypadku, jest o rząd wielkości szybsze niż stosując metody oparte o CP lub BRAIN-CP i możliwe jest korzystając tylko z kilku mg substancji. Korzystając z tych metod wyznaczono parametry CSA dla 4 kompleksów (**Rysunek 23**). Otrzymane wartości CSA są w dobrej zgodności z wynikami obliczeń teoretycznych, co pozwala przypuszczać że będą bardzo użyteczne w analizie wielu układów, jak np. katalizatory imobilizowane na podłożu stałym (np. krzemionce), gdzie poznanie pierwszej sfery koordynacji metalu może być kluczowe dla zrozumienia aktywności katalitycznej czy trwałości charakteryzowanych materiałów.



Rysunek 23 Rekonstrukcja widm  $^{103}\text{Rh}$  obrazujących anizotropię przesunięcia chemicznego, wykorzystująca technikę J-Resolved lub J-HMQC oraz technikę selektywnego pobudzenia satelit obrotowych.

Warto na koniec podkreślić, że technika J-HMQC wydaje się być obecnie najlepszą metodą do detekcji  $^{103}\text{Rh}$  w kompleksach fosfinowych a także innych jąder metali o spinie  $1/2$  w kompleksach koordynacyjnych (np.  $^{109}\text{Ag}$  czy  $^{183}\text{W}$ ) o ile występuje tylko wiązanie metal-fosfor.

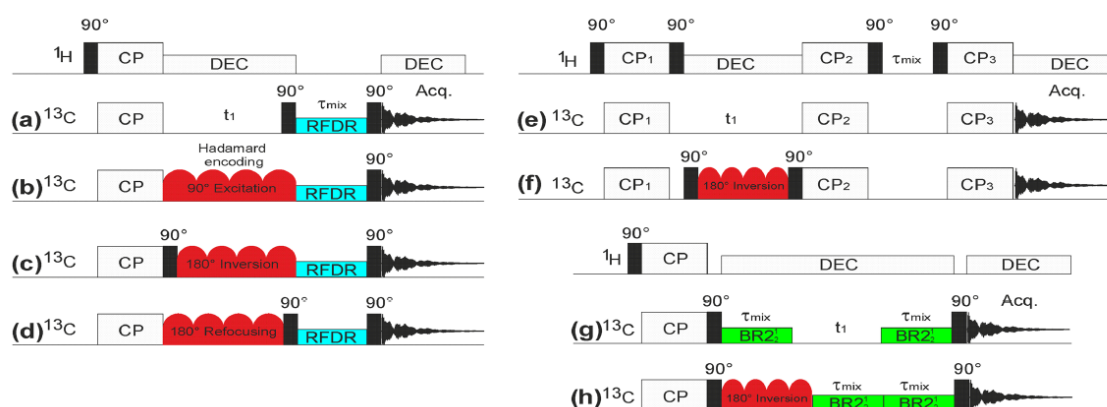
### 3.3.7. Publikacja 8

Ostatnia z prezentowanych prac dotyczy zastosowania techniki HADAMARD do rejestracji homojądrowych korelacji 2D  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  w warunkach szybkiego wirowania pod kątem magicznym. Zwykle stosowane metody rejestracji widm 2D wymagają zebrania serii widm 1D i poddaniu jej kolejnym dwóm transformatom Fouriera. Metoda taka, mimo ogólności i powszechnego stosowania w spektroskopii NMR, ma poważne ograniczenie wynikające z konieczności zebrania wielu punktów w wymiarze pośrednim, co przekłada się na długi czas pomiaru<sup>xiii</sup>. Jednym z najpopularniejszych sposobów ominięcia tego problemu jest zastosowanie próbkowania losowego w wymiarze pośrednim, a następnie wykorzystanie różnych algorytmów przetwarzania danych, pozwalających otrzymać widma wielowymiarowe. Metoda taka została zastosowana do rejestracji widm 4D przedstawionych w autoreferacie w rozdziale 3.3.4 Alternatywnie, szczególnie w przypadku widm 2D, możliwe jest wykorzystanie selektywnego pobudzenia poszczególnych linii rezonansowych, a następnie rekonstrukcja widma 2D. Wymaga to co prawda znajomości *a priori* położenia sygnałów, ale szczególnie w przypadku homojądrowych korelacji  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  dla małych cząsteczek, nie jest to istotne ograniczenie. W przypadku zastosowania selektywnych impulsów pobudzających tylko jedną linię rezonansową (w wymiarze pośrednim), otrzymuje się tak naprawdę serię widm 1D, będących przekrojami z klasycznego widma 2D. Metoda taka jest możliwa do zastosowania i wymaga rejestracji  $m$  widm 1D, gdzie  $m$  to liczba obserwowanych sygnałów. Przy takim podejściu niestety stosunek sygnału do szumu (S/N) nie podlega uśrednianiu wraz z  $m$ . Rozwiązaniem tego problemu jest zastosowanie techniki kodowania HADAMARD wraz ze specjalnymi impulsami MSP (ang. *MultiSelective Pulses*), pobudzającymi wszystkie linie rezonansowe, jednak z różną fazą. W tym przypadku stosuje się serię impulsów MSP  $n \geq m$ , przy czym  $n$  musi być podzielne przez 4. W tym przypadku S/N rośnie wraz z  $\sqrt{m}$ . Technika ta znalazła zastosowanie w spektroskopii NMR w cieczy, jednak jak do tej pory jej aplikacja w ciele stałym była dość ograniczona. Jedną z przyczyn takiego stanu rzeczy jest to, że w przypadku ciał stałych impulsy MSP muszą być nie tylko selektywne wobec linii izotropowej, ale także wobec satelit obrotowych (ang. *spinning sidebands*), a zatem sygnały izotropowe nie mogą się nakładać z żadnymi z satelit obrotowych. Jest to duże ograniczenie

<sup>xiii</sup> Jest to szczególnie uciążliwe kiedy widmo charakteryzuje się dobrą czułością, ale wymagane jest zebranie wielu skanów na każdy punkt pośredni. Tak często dzieje się w przypadku ciał stałych, ze względu na konieczność wyboru ścieżek koherencji przez cykl fazowy, a nie za pomocą gradientów, jak to ma zwykle miejsce w cieczy.

w przypadku rejestracji widm korelacyjnych  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  stosując umiarkowaną rotację próbki rzędu 10-20 kHz, a co więcej problem ten zwiększa się wraz ze wzrostem pola  $B_0$ .

W referowanej pracy postanowiłem wyjść naprzeciw tym problemom i podjąłem próby rejestracji widm 2D wykorzystując technikę HADAMARD połączoną z bardzo szybkim wirowaniem pod kątem magicznym. Przeanalizowałem 3 typowo stosowane homojądrowe sekwencje impulsowe: RFDR, CHHC oraz zmodyfikowaną sekwencję DQ-SQ do sekwencji z filtrem dwukwantowym (DQF)<sup>xiv</sup> (**Rysunek 24**).



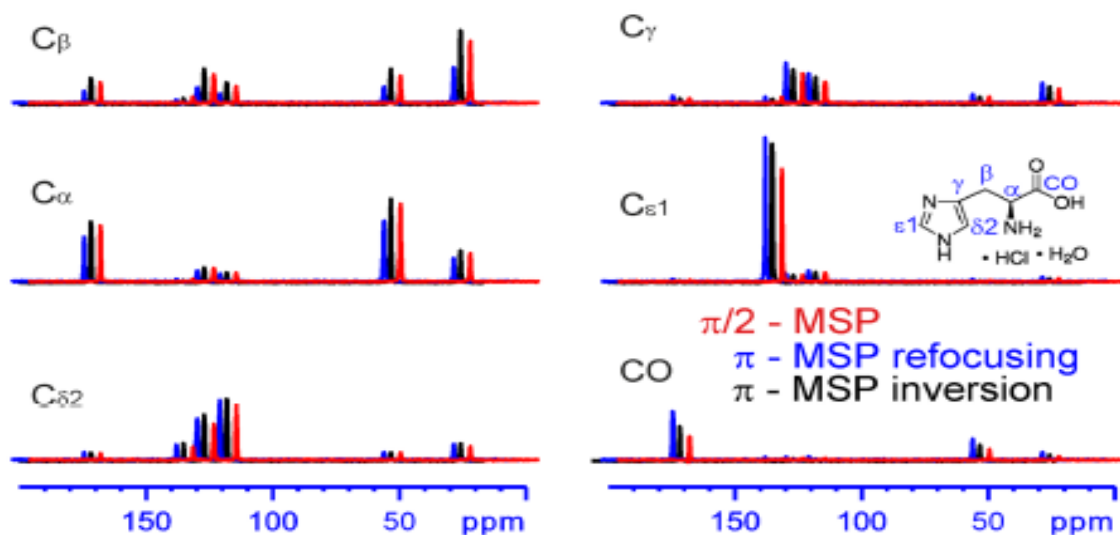
**Rysunek 24** Homojądrowe sekwencje  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  (a-d) SQ-SQ z mieszaniem RFDR: a) sekwencja konwencjonalna, (b-d) sekwencje umożliwiające zastosowanie techniki HADAMARD, korzystające z b) impulsu MSP  $\pi/2$ , c) impulsu MSP inwersyjnego  $\pi$ , d) impulsu MSP ogniskującego (ang. *Refocusing*)  $\pi$ ; e) konwencjonalna sekwencja CHHC ( $\text{CP}^3$ ), f) sekwencja CHHC z ogniskującym impulsem MSP  $\pi$ , g) konwencjonalna sekwencja z filtrowaniem dwukwantowym (DQF), h) sekwencja z filtrowaniem dwukwantowym (DQF) z ogniskującym impulsem MSP  $\pi$ .

Stosując technikę HADAMARD możliwe jest wykorzystanie przynajmniej 3 typów selektywnych impulsów MSP: impulsu pobudzającego o kącie wychylenia  $\pi/2$ , impulsu inwersyjnego  $\pi$ , oraz impulsu ogniskującego (ang. *refocusing*)  $\pi$ . Zgodnie z oczekiwaniami, dla próbki  $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$  znakowanego chlorowodoru histydyny najefektywniejsze okazały się selektywne impulsy inwersyjne (m.in. dlatego że impulsy takie są najkrótsze), co przedstawia **Rysunek 25**. Określiłem również wpływ selektywności impulsu na ilość obserwowanych artefaktów i intensywność sygnałów. Co ważne, pokazałem w ten sposób, że artefakty związane

<sup>xiv</sup> W przypadku sekwencji DQ-SQ wymagana byłaby rejestracja odrębnych  $m^2$  widm, co nie skracałoby znacząco czasu pomiaru.

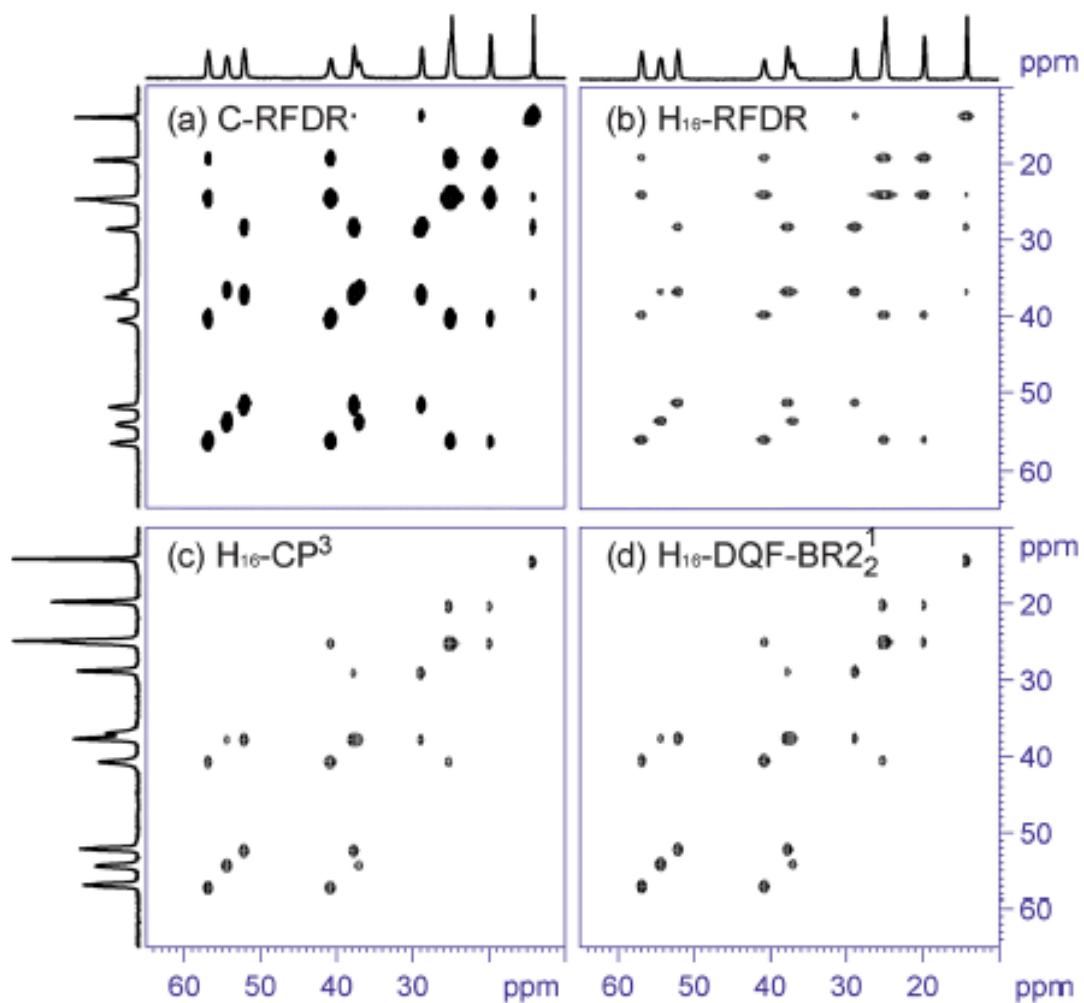
z niewystarczającą selektywnością impulsu będą zawsze w przeciwfazie do rzeczywistych sygnałów, co pozwala na ich łatwe odróżnienie.

Zastosowanie techniki HADAMARD wydawało się szczególnie interesujące do rejestracji krzywych narostu (ang. *buildup curves*) intensywności pików korelacyjnych w widmach 2D. Krzywe takie można zastosować do oszacowania odległości międzyatomowych czy optymalizacji sekwencji.



**Rysunek 25** Porównanie efektywności różnych schematów pobudzenia MSP zastosowanych w sekwencji RFDR: czerwony: impuls MSP  $\pi/2$ , niebieski: ogniskujący impuls MSP  $\pi$ , czarny: inwersyjny impuls MSP  $\pi$ .

Stosując technikę HADAMARD możliwe było zarejestrowanie jednego punktu takiej krzywej narostu w czasie nieprzekraczającym 5 minut, co w przypadku widm rejestrowanych konwencjonalnymi technikami wymaga czasu pomiaru rzędu 1 godziny. Jest to bardzo duży wzrost ( $\sim 12x$ ) szybkości rejestracji takich krzywych i pozwala na znaczne zwiększenie ich rozdzielczości. Ostatecznie, użyteczność techniki HADAMARD potwierdziłem rejestrując widma korelacyjne  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  dla w pełni znakowanego  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  tripeptydu fMLF, w którym obecne jest 14 dobrze rozdzielonych sygnałów  $^{13}\text{C}$ . W tym przypadku możliwa była rejestracja takich widm w czasie ponad 8-krotnie mniejszym niż widma rejestrowane metodami konwencjonalnymi (**Rysunek 26**).



Rysunek 26 Homojądrowe korelacje <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C zarejestrowane dla peptydu U-<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N-fMLF z użyciem a) konwencjonalnej sekwencji RFDR oraz b)-d) techniki HADAMARD i sekwencji b) RFDR, c) CHHC, d) DQF.

### 3.3.8. Perspektywy

Obecnie kieruję grantem NCN SONATA pt. „Nowoczesna spektroskopia NMR w ciele stałym jako uniwersalne narzędzie w badaniu nowych cząsteczek używanych w systemach wytwarzania energii i w aplikacjach farmaceutycznych”. Projekt koncentruje się na dwóch komplementarnych nurtach badawczych:

a) Rozwój detekcji  $^1\text{H}$  do precyzyjnych pomiarów odległości międzyatomowych

Celem jest opracowanie i walidacja sekwencji impulsowych umożliwiających dokładny pomiar odległości dla par jąder takich jak  $^1\text{H}-^{19}\text{F}$ ,  $^1\text{H}-^{31}\text{P}$ ,  $^{31}\text{P}-^{19}\text{F}$ ,  $^{13}\text{C}-^{19}\text{F}$  i innych. Zamierzam wykorzystać te eksperymenty do krytalografii NMR związków farmaceutycznych (API) o złożonej przestrzeni konformacyjnej, dla których istnieje wiele energetycznie korzystnych konformacji, co uniemożliwia zastosowanie klasycznych protokołów CSP (*Crystal Structure Prediction*) do określenia ich struktury. Modelami w tych badaniach będą m.in. fostamatynib (inhibitor kinazy tyrozynowej) oraz szereg API zawierających fluor (np. pochodne flunitrazepamu) i/lub fosfor. Planowane jest oszacowanie restrykcji odległościowych z eksperymentów typu REDOR i następnie sprzęgnięcie ich z obliczeniami DFT/CSP. Oczekiwanym rezultatem są: (i) wiarygodne modele krystaliczne trudnych systemów cząsteczkowych, (ii) protokoły „best-practice” możliwe do wdrożenia w laboratoriach analitycznych przemysłu farmaceutycznego.

b) Nowe techniki NMR do analizy struktury perowskitów

Drugi nurt badań w grantie SONATA dotyczy metodologii NMR dla hybrydowych perowskitów. Planuję opracować wielowymiarowe eksperymenty 3D, takie jak  $^1\text{H}-^{14}\text{N}-^{207}\text{Pb}$ ,  $^1\text{H}-^{15}\text{N}-^{207}\text{Pb}$  oraz  $^1\text{H}-^{13}\text{C}-^{207}\text{Pb}$  przy szybkiej rotacji MAS z detekcją  $^1\text{H}$  zapewniającą wysoką czułość pomiarów. Zwiększona rozdzielczość i lepsze odwzorowanie korelacji heteronuklearnych umożliwią jednoznaczne rozróżnienie domen, defektów i organizacji warstw w wielowarstwowych perowskitach oraz porównanie stanów krystalicznych i amorficznych. Wyniki te będą istotne dla zrozumienia zależności „struktura–własności” w materiałach do konwersji energii.

Poza projektem SONATA kontynuuję badania nad pośrednią detekcją jąder metali o niskim współczynniku żyromagnetycznym i spinie  $\frac{1}{2}$  (np.  $^{103}\text{Rh}$ ,  $^{109}\text{Ag}$ ,  $^{187}\text{Os}$ ,  $^{57}\text{Fe}$ ,  $^{183}\text{W}$ ). Skupiam się na implementacji wielokrotnego transferu magnetyzacji, np. schematów typu

$^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P} \rightarrow ^{103}\text{Rh}(t_1) \rightarrow ^{31}\text{P} \rightarrow ^1\text{H}$  (akq.,  $t_2$ ), łączących rozwijane przeze mnie metody detekcji jąder niskoczułych z technikami wieloetapowych transferów znanych z BioNMR. Takie sekwencje powinny istotnie poprawić czułość i pozwolić na równoczesne wyznaczenie przesunięć chemicznych oraz anizotropii przesunięcia chemicznego (CSA), co przełoży się na lepszą charakterystykę katalizatorów (np. kompleksów rodowych) immobilizowanych na nośnikach krzemionkowych lub polimerowych oraz innych materiałów funkcjonalnych.

Równolegle aktywnie rozwijam metodologię BioNMR w ciele stałym. Wspólnie z dr Janem Stankiem (Uniwersytet Warszawski) implementujemy eksperymenty 3D i 4D z wykorzystaniem sekwencji czterokanałowych ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ), wykorzystujące odsprzęgnięcie  $^2\text{H}$  w celu jednoczesnej poprawy rozdzielczości i czułości. Z kolei we współpracy z dr Alonsem Lendsem (Łotewski Instytut Syntezy Organicznej) wdrażam rezonans  $^{19}\text{F}$  do badań modyfikowanych biocząsteczek (białka, cukry), co otwiera drogę do selektywnego znakowania i sondowania mikro-środowiska funkcjonalnych grup w skali atomowej.

Łącznie, zaproponowane metody powinny dostarczyć ugruntowanej, uniwersalnej metodologii NMR w ciele stałym dla systemów, w których klasyczne podejścia strukturalne (SCXRD, same CSP) są niewystarczające, oraz istotnie poszerzyć wachlarz narzędzi spektroskopii jąder trudnych (metale przejściowe), z bezpośrednimi konsekwencjami dla chemii materiałów i nauk farmaceutycznych.

### 3.3.9. Podsumowanie

Przedstawiony cykl ośmiu publikacji stanowi spójny i konsekwentnie realizowany program badawczy ukierunkowany na rozwój metod wielowymiarowej spektroskopii NMR ciała stałego, ze szczególnym uwzględnieniem warunków szybkiego i bardzo szybkiego wirowania próbek pod kątem magicznym (ang. *fast/ultrafast MAS*). Wspólnym mianownikiem wszystkich prac jest dążenie do zwiększenia użyteczności eksperymentów NMR w praktyce laboratoryjnej: skrócenia czasu akwizycji, poprawy czułości i rozdzielczości.

Istotnym filarem mojej działalności naukowej był rozwój metod opartych na pomiarach sprzężeń dipolowych  $^1\text{H}-\text{X}$ . Zaproponowane i rozwijane przeze mnie eksperymenty z rodziny CP-VC, w szczególności w połączeniu z detekcją protonową, umożliwiają bezpośredni dostęp do informacji o procesach dynamicznych w ciele stałym. Wykazałem, że metody te mogą być skutecznie stosowane nie tylko do typowo badanych par jąder  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ , lecz również do innych układów spinowych, takich jak np.  $^1\text{H}-^{31}\text{P}$ . Co szczególnie istotne, pomiary te pozwalają na ilościową ocenę wpływu procesów dynamicznych na obserwowane sprzężenia dipolowe, a tym samym na opis ruchów lokalnych w kryształach jonowych oraz w biomolekułach. Rozszerzenie CP-VC do eksperymentów 3D z detekcją  $^1\text{H}$  umożliwiło z kolei wyznaczanie profili dynamiki wzdłuż łańcucha głównego białek w sposób komplementarny do klasycznych metod relaksacyjnych, przy jednoczesnym znacznym skróceniu czasu pomiaru.

Drugim ważnym nurtem badań było opracowanie i optymalizacja eksperymentów wielowymiarowych służących przypisaniu sygnałów w krystalicznych białkach. W szczególności zaproponowałem nowe sekwencje 3D i 4D umożliwiające efektywne przypisanie grup metylowych aminokwasów w warunkach bardzo szybkiego MAS. Przeprowadzona przeze mnie systematyczna analiza różnych schematów mieszania homojądrowego  $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$ , zarówno na drodze symulacji numerycznych, jak i weryfikacji eksperymentalnej, dostarczyła praktycznych wytycznych dotyczących doboru sekwencji, prędkości MAS oraz schematów znakowania izotopowego. Wykazałem, że odpowiednie połączenie bardzo szybkiego wirowania, detekcji  $^1\text{H}$ , linearyzacji łańcuchów bocznych oraz technik przyspieszania relaksacji umożliwia rejestrację złożonych widm 4D w czasie, który pozostaje akceptowalny nawet dla dużych białek. Wyniki te mają bezpośrednie znaczenie dla badań strukturalnych, dynamiki i oddziaływań w układach biologicznych o rosnącej złożoności.

Trzecim obszarem, który stanowi istotny wkład metodologiczny, jest rozwój pośredniej detekcji jąder „trudnych”, charakteryzujących się niską czułością, bardzo szerokimi widmami lub niekorzystnymi właściwościami relaksacyjnymi. W serii prac poświęconych eksperymentom typu HMQC przeprowadziłem szczegółową analizę schematów pobudzenia jąder o dużej anizotropii przesunięcia chemicznego lub znaczącym sprzężeniu kwadrupolowym, takich jak  $^{195}\text{Pt}$  czy  $^{14}\text{N}$ . Zaproponowane i zweryfikowane strategie, wykorzystujące długie impulsy selektywne oraz impulsy DANTE, umożliwiły istotną poprawę czułości i stanowiły praktyczny przewodnik dla projektowania tego typu eksperymentów. Doświadczenia te stały się również punktem wyjścia do opracowania metod szybkiej rejestracji widm  $^{103}\text{Rh}$  w ciele stałym z wykorzystaniem pośredniej detekcji  $^{31}\text{P}$  i transferu przez sprzężenia skalarnie. Zaproponowane podejście znacząco rozszerza możliwości wykorzystania NMR ciała stałego w chemii kompleksów metali przejściowych i katalizie, gdzie dotychczas dostęp do informacji strukturalnej był bardzo ograniczony.

Całość przedstawionego dorobku ma charakter metodologiczny, lecz jest silnie osadzona w realnych problemach badawczych chemii i biofizyki. Zaproponowane przeze mnie sekwencje, strategie akwizycji oraz zalecenia dotyczące doboru parametrów eksperymentalnych zwiększają dostępność zaawansowanych technik NMR ciała stałego dla szerszego grona użytkowników. Istotnym elementem mojej pracy jest również dbałość o to, aby uzyskiwane parametry – takie jak sprzężenia dipolowe, parametry CSA czy wskaźniki dynamiki – były możliwe do jednoznacznej interpretacji ilościowej. Dzięki temu opracowane metody mogą być stosowane zarówno w badaniach biomolekuł, jak i w chemii materiałów oraz chemii metaloorganicznej.

Podsumowując, opracowane metody skracają czas eksperymentów, poprawiają ich czułość i rozdzielczość oraz umożliwiają badanie układów dotychczas trudno dostępnych eksperymentalnie. Jednocześnie tworzą one spójny zestaw narzędzi, który może być dalej rozwijany i adaptowany do nowych wyzwań badawczych, związanych zarówno z dynamicznymi biomolekułami, jak i złożonymi układami nieorganicznymi i metaloorganicznymi.

#### 4. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej w szczególności zagranicznej

- 1) 11 miesięczny pobyt naukowy (2023-2024) na stanowisku starszego badacza w grupie Luisa Mafry, na **Uniwersytecie Aveiro, Portugalia**. Badania skupiały się na implementacji UF-MAS w badaniach materiałów porowatych i ich wyniki będą w najbliższym czasie opublikowane w dwóch publikacjach.
- 2) Współpraca z Uniwersytetem we **Fryburgu, Szwajcaria** (trzy tygodniowe wizyty) z zakresu badań farmaceutyków i nowych materiałów z wykorzystaniem NMR w ciele stałym.
- 3) 52 miesięczny staż doktorski skoncentrowany na rozwoju nowych metod NMR w stanie stałym w badaniach białek w grupie dr J. Stanka i prof. W. Koźmińskiego na **Uniwersytecie Warszawskim** (01.09.2019–30.12.2023). Bezpośrednim efektem współpracy są 4 publikacje.
- 4) 18 miesięczny staż doktorski ukierunkowany na rozwój nowych metod NMR w stanie stałym w badaniach materiałów w grupie prof. J. P. Amoureux i prof. O. Lafone, **Lille, Francja** (2018–2019). Projekt finansowany z programu Mobilność Plus. W czasie odbytego stażu naukowego powstały 3 publikacje naukowe.
- 5) Miesięczny pobyt naukowy w grupie prof. J. P. Amoureux i prof. O. Lafone, **Lille, Francja** (2016). Projekt finansowany z programu START FNP. Efektem odbytego stażu było nawiązanie wieloletniej współpracy z uniwersytetem w Lille i opublikowanie licznych prac naukowych.

Efektem aktywności naukowej w wyżej wymienionych ośrodkach akademickich jest łącznie 14 publikacji z moim udziałem.

**5. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę.**

- 1) Prowadzenie zajęć „Zaawansowane techniki spektroskopii NMR” w Szkole Doktorskiej BioMedChem (1 semestr 2025/2026).
- 2) Pełnienie funkcji promotora pomocniczego mgr Eweliny Kuc, doktorantki Szkoły Doktorskiej BioMedChem (doktorat realizowany w CBMiM PAN Łódź).
- 3) Członek lokalnego komitetu naukowego konferencji SMARTER 8, 22-25 Wrzesień 2024, Aveiro, Portugalia.
- 4) Członek lokalnego komitetu organizacyjnego, PANACEA NMR Third Annual User Meeting, 25-26 Wrzesień 2024, Aveiro, Portugalia.
- 5) Prowadzący zajęcia praktyczne w trakcie szkolenia Nuclear Magnetic Resonance Symposium, 4-5 Maj, 2023 Institute of Science and Technology, Klosterneuburg, Austria.
- 6) Członek komitetu organizacyjnego konferencji CEUM NMR 2022 (Central European NMR Symposium & Bruker users meeting), 21-23 Wrzesień 2022, Warszawa, Polska.

## 6. Inne istotne informacje:

### 6.1 Inne istotne osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora.

Po uzyskaniu stopnia doktora brałem udział w wielu projektach badawczych, których rezultatem jest łącznie 36 publikacji naukowych, z których 8 stanowi podstawę niniejszego autoreferatu. Wszystkie prace opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora to pozycje o numerach 1–36 w rozdziale 6.4.

Osiągnięcia i publikacje niewchodzące w główną część autoreferatu można podzielić na cztery wątki tematyczne:

#### a) Prace spoza głównej części autoreferatu dotyczące NMR-u w ciele stałym w badaniach biomolekuł

Spośród czterech publikacji w tym obszarze za najistotniejsze uważam jedną pracę oryginalną oraz jedną pracę przeglądową. W pierwszej z nich (publikacja nr 23 w rozdziale 7.4) zaprezentowano metodę rejestracji sześciu widm korelacyjnych 3D w jednym eksperymencie. W tej pracy analizowałem efektywność równoczesnego transferu  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  i  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  w funkcji natężenia pola RF oraz prędkości rotacji. Druga praca (publikacja nr 15 w rozdziale 7.4) to artykuł przeglądowy opublikowany w renomowanym czasopiśmie Chemical Reviews, w którym szczegółowo opisano możliwości i rozwój metod detekcji  $^1\text{H}$  w biocząsteczkach na przestrzeni ostatnich 20 lat.

#### b) Zastosowanie NMR-u i metod CSP (ang. crystal structure prediction) w badaniach struktury i polimorfizmu leków oraz kokryształów o znaczeniu farmaceutycznym

Badania dotyczyły m.in. apremilastu, furazydyny, meloksykamu i teriflunamidu. We wszystkich tych pracach rejestrowałem i analizowałem widma NMR, głównie w warunkach szybkiej rotacji. Za szczególnie interesujące uważam badania opisane w publikacji nr 13 (rozd. 7.4), dotyczącej soli teriflunamidu. Wykorzystałem tam szereg technik NMR, m.in. korelacje  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  z detekcją  $^1\text{H}$ , eksperyment  $^{23}\text{Na}$  MQ-MAS oraz – rzadko dotąd stosowane – korelacje  $^1\text{H}$ - $^7\text{Li}$  i  $^1\text{H}$ - $^{133}\text{Cs}$  (HETCOR) do analizy struktury kryształów soli anionu teriflunamidu z kationami  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ . Na podstawie zebranych danych potwierdzono poprawność struktur uzyskanych metodą dyfrakcji rentgenowskiej (SCXRD) dla soli  $\text{Na}^+$ ,

$\text{NH}_4^+$  i  $\text{Cs}^+$ . Szczególnie istotny był tu eksperyment  $^{23}\text{Na}$  MQ-MAS, który pozwolił potwierdzić wysokie  $Z' = 6$  dla soli sodowej teriflunamidu. Dodatkowo, dla soli z kationem  $\text{Li}^+$ , dla której nie udało się uzyskać monokryształów odpowiedniej jakości do badań dyfrakcyjnych, na podstawie widm NMR określono obecność dwóch cząsteczek w niezależnej części komórki elementarnej ( $Z' = 2$ ), a korzystając z korelacji  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  i  $^{19}\text{F}$ - $^{19}\text{F}$  wykluczono, że otrzymany materiał jest mieszaniną form polimorficznych.

### c) Badania perowskitów

Badania prowadziłem we współpracy z francuską grupą prof. Manjunathy Reddy'ego z Uniwersytetu w Lille. W pierwszej pracy (publikacja nr 20 w rozdziale 7.4) analizowałem dynamikę perowskitów z wykorzystaniem zaproponowanej i rozwijanej przeze mnie techniki 2D CP-VC. Wykazałem, że dynamika perowskitu  $(\text{PEA})_2\text{PbI}_4$  istotnie różni się od dynamiki jego prekursora – jodku fenyletyloamoniowego. Analizie poddałem także trzy inne perowskity, wykorzystując kinetykę polaryzacji skrośnej. Druga praca (publikacja nr 7 w rozdziale 7.4) dotyczy porównawczej analizy chiralnych perowskitów w stanie krystalicznym i amorficznym; zaimplementowałem w niej techniki odwrotnej detekcji do rejestracji widm korelacyjnych  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$ - $^{207}\text{Pb}$  przy szybkiej rotacji.

### d) Badanie procesów chemicznych zachodzących w ciele stałym

Badania te dotyczyły m.in. procesów tautomeryzacji kwasu barbiturowego i katechiny (publikacja nr 34 w rozdziale 7.4) gdzie zaimplementowałem i wykorzystałem w tym celu eksperyment  $^2\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  zarejestrowany przy naturalnej zawartości  $^{13}\text{C}$ . Innymi ważnymi projektami związanymi z procesami chemicznymi w fazie stałej są publikacje dotyczące analizy mechanizmów reakcji odczynników sprzęgających wykorzystywanych w syntezie peptydów (publikacja nr 8 i 35 w rozdziale 7.4). W projektach tych wykorzystywałem zarówno typowe pomiary  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$  CP-MAS, jak i bardziej „egzotyczne” podejścia korzystające np. z widm  $^{133}\text{Cs}$ .

### e) Inne projekty

Pozostałe projekty dotyczyły głównie syntezy i analizy strukturalnej peptydów oraz związków organicznych (np. porfiryroidy, pochodne kwasu abietynowego, ferocenofany) i

nieorganicznych (interkalaty trójtlenku arsenu), zarówno w roztworze, jak i w ciele stałym. Mój wkład obejmował rejestrację, analizę i interpretację widm NMR oraz dyskusję wyników.

## 6.2 Zdobyte granty:

- 1) 01.10.2024 - obecnie (do 30.09.2027) – Kierownik grantu NCN „Nowoczesna spektroskopia NMR w ciele stałym jako uniwersalne narzędzie w badaniu nowych cząsteczek używanych w systemach wytwarzania energii i w aplikacjach farmaceutycznych.” SONATA. Kwota: 2 313 900 zł
- 2) 01.03.2018 - 31.08.2019 – Kierownik grantu MNiSW „New methods of acquiring NMR spectra in solid state of nuclei with large anisotropic interaction.”, MOBILNOŚĆ PLUS. Kwota: 241 000 zł
- 3) 20.08.2012 - 19.08.2015 – Kierownik grantu NCN „Zastosowanie nowoczesnej spektroskopii NMR w badaniach kompleksów supramolekularnych i koordynacyjnych.” PRELUDIUM-2. Kwota: 167 800 PLN

## 6.3 Nagrody, wyróżnienia i stypendia:

- 1) 2016 – Stypendium Prezesa Polskiej Akademii Nauk dla młodych naukowców.
- 2) 2016 – Stypendium START Fundacji na rzecz Nauki Polskiej.
- 3) 2015 – Stypendium START Fundacji na rzecz Nauki Polskiej.
- 4) 2015 – Stypendium firmy HRP w programie „Nauka drogą do biznesu – program stypendialny dla doktorantów z woj. łódzkiego”, współfinansowanym ze środków UE.
- 5) 2010 – Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za wybitne osiągnięcia w nauce.
- 6) 2010 – Stypendium Marszałka Województwa Łódzkiego.
- 7) 2009 – Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za wybitne osiągnięcia w nauce.
- 8) 2009 – Tytuł najlepszego studenta roku 2008/2009 Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej.
- 9) 2008 – Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za wybitne osiągnięcia w nauce.

- 10) 2005 – Brązowy medal na 37. Międzynarodowej Olimpiadzie Chemicznej (Tajpej, Tajwan).
- 11) 2005 – 3. miejsce w 51. Olimpiadzie Chemicznej.
- 12) 2004 – Laureat 50. Olimpiady Chemicznej.

#### 6.4 Lista wszystkich publikacji z cytowaniami i *Impact Factor*:

(liczba cytowań podana według bazy Scopus na dzień 04.05.2026; Impact Factor podany według Journal Citation Reports 2025, tj. IF 2024)

- 1) Druźbicki, Kacper; Paluch, **Piotr**; Dolot, Rafał; Bąk-Sypień Irena; Kuc, Ewelina; Jeziorna, Agata; Potrzebowski, Marek J. „From Amorphous Bundles to Nanoporous Peptide Frameworks: Solvent-Driven Self-Assembly of Pro-Val-Pro-Val” (2026) *Biomacromolecules*, 27, 549–566.  
DOI: 10.1021/acs.biomac.5c01800 | Liczba cytowań: 0 | IF: 5.5
- 2) Przemysław Nowak, Agata Jeziorna, Marcin Oszejca, **Piotr Paluch**, Dineshchakravarthy Senthurpandi, Marta K. Dudek. NMR crystallography at 1 GHz: insight into a rich world of binary forms of meloxicam. *Molecular Pharmaceutics* 2026, 23, 2638–2658.  
DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.5c01739 | Liczba cytowań: 0 | IF: 4.5
- 3) Atterberry, Benjamin A.; **Paluch, Piotr**; Lamkins, Andrew R.; Huang, Wenyu; Rossini, Aaron J., Rapid Acquisition of 103Rh Solid-State NMR Spectra by 31P Detection and Sideband Selective Methods. *Journal of the American Chemical Society*, 2025, 147 (17), 14411–14421.  
DOI: 10.1021/jacs.5c00784 | Liczba cytowań: 5 | IF: 15.7
- 4) Jeziorna, Agata; Malinska, Maura; Sugden, Isaac J.; **Paluch, Piotr**; Dolot, Rafał; Dudek, Marta Katarzyna, SCXRD, CSP-NMRX and microED in the quest for three elusive polymorphs of meloxicam. *IUCrJ*, 2025, 12 (Pt 1), 109–122.  
DOI: 10.1107/S2052252524011898 | Liczba cytowań: 3 | IF: 3.6
- 5) Toleikis, Zigmantas; **Paluch, Piotr**; Kuc, Ewelina; Petkus, Jana; Šulskis, Darius; Org-Tago, Mai Liis; Samoson, Ago; Smirnovas, Vytautas; Stanek, Jan; Lends, Alons, Solid-

state NMR backbone chemical shift assignments of  $\alpha$ -synuclein amyloid fibrils at fast MAS regime. *Biomolecular NMR Assignments*, 2024, 18 (2), 181–186.

DOI: 10.1007/s12104-024-10186-2 | Liczba cytowań: 1 | IF: 0.6

- 6) Bąk-Sypień, Irena I.; Pawlak, Tomasz; **Paluch, Piotr**; Wróblewska, Aneta; Dolot, Rafał; Pawłowicz, Aleksandra; Szczesio, Małgorzata; Wielgus, Ewelina; Kaźmierski, Sławomir; Górecki, Marcin, Influence of heterochirality on the structure, dynamics, biological properties of cyclic(PFPF) tetrapeptides obtained by solvent-free ball mill mechanosynthesis. *Scientific Reports*, 2024, 14 (1), 12825.

DOI: 10.1038/s41598-024-63552-4 | Liczba cytowań: 1 | IF: 3.9

- 7) Singh, Akash; Dayton, Damara G.; Ladd, Dylan M.; Reuveni, Guy; **Paluch, Piotr**; Montagne, Lionel; Mars, Julian E.; Yaffe, Omer; Toney, Michael F.; Manjunatha Reddy, G. N., Local Structure in Crystalline, Glass and Melt States of a Hybrid Metal Halide Perovskite. *Journal of the American Chemical Society*, 2024, 146 (37), 25656–25668.

DOI: 10.1021/jacs.4c07411 | Liczba cytowań: 25 | IF: 15.7

- 8) Wróblewska, Aneta; Bąk-Sypień, Irena I.; **Paluch, Piotr**; Wielgus, Ewelina; Zając, Justyna; Jeziorna, Agata; Kaźmierski, Sławomir; Potrzebowski, Marek J., Solvent-Free Mechanosynthesis of Oligopeptides by Coupling Peptide Segments of Different Lengths – Elucidating the Role of Cesium Carbonate in Ball Mill Processes. *Chemistry – A European Journal*, 2024, 30 (44), e202400177.

DOI: 10.1002/chem.202400177 | Liczba cytowań: 4 | IF: 3.7

- 9) Rawiak, Karol; Mazur, Maria; Enkhbold, Tsenguun; Sitek, Michał; Kulczyk, Stanisław; **Paluch, Piotr**; Guńka, Piotr A.; Jarzemska, Katarzyna Natalia; Koszytkowska-Stawińska, Mariola; Buchowicz, Włodzimierz, [8]Ferrocenophanes with two nitrogen atoms in bridging positions: Synthesis via olefin metathesis, structure and solution dynamics. *Inorganica Chimica Acta*, 2024, 565, 121995.

DOI: 10.1016/j.ica.2024.121995 | Liczba cytowań: 0 | IF: 3.2

- 10) Roztocky, Kornel; Dudek, Marta Katarzyna; Szufła, Monika; Formalik, Filip; Bon, Volodymyr V.; Krawczuk, Anna; **Paluch, Piotr**; Kaskel, Stefan; Matoga, Dariusz,

Theoretical and Experimental Insights into the Spatial Distribution of Functional Groups in a Multivariate Flexible Metal-Organic Framework. *Chemistry of Materials*, 2024,

DOI: 10.1021/acs.chemmater.4c00406 | Liczba cytowań: 1 | IF: 7.0

11) Jeziorna, Agata; **Paluch, Piotr**; Zając, Justyna; Dolot, Rafał; Dudek, Marta Katarzyna, Crystallization of Elusive Polymorphs of Meloxicam Informed by Crystal Structure Prediction. *Crystal Growth & Design*, 2023, 23 (8), 5998–6010.

DOI: 10.1021/acs.cgd.3c00559 | Liczba cytowań: 11 | IF: 3.4

12) Wrześniewska, Weronika; **Paluch, Piotr**; Guńka, Piotr A., Arsenic(III) oxide intercalate with ammonium chloride: crystal structure revision and thermal characterization. *Acta Crystallographica Section B: Structural Science, Crystal Engineering and Materials*, 2023, 79, 207–212.

DOI: 10.1107/S2052520623003086 | Liczba cytowań: 3 | IF: 1.3

13) Pawlak, Tomasz; **Paluch, Piotr**; Dolot, Rafał; Bujacz, Grzegorz D.; Potrzebowski, Marek J., New salts of teriflunomide (TFM) – Single crystal X-ray and solid state NMR investigation. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, 2022, 122, 101820.

DOI: 10.1016/j.ssnmr.2022.101820 | Liczba cytowań: 4 | IF: 2.4

14) Khalaji, Mehrnaz; **Paluch, Piotr**; Potrzebowski, Marek J.; Dudek, Marta Katarzyna, Narrowing down the conformational space with solid-state NMR in crystal structure prediction of linezolid cocrystals. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, 2022, 121, 101813.

DOI: 10.1016/j.ssnmr.2022.101813 | Liczba cytowań: 19 | IF: 2.4

15) Le Marchand, Tanguy; Schubeis, Tobias; Bonaccorsi, Marta; **Paluch, Piotr**; Lalli, Daniela; Pell, Andrew J.; Andreas, Loren B.; Jaudzems, Kristaps; Stanek, Jan; Pintacuda, Guido, <sup>1</sup>H-Detected Biomolecular NMR under Fast Magic-Angle Spinning. *Chemical Reviews*, 2022, 122 (10), 9943–10018.

DOI: 10.1021/acs.chemrev.1c00918 | Liczba cytowań: 117 | IF: 55.8

- 16) **Paluch, Piotr**; Augustyniak, Rafał; Org, Mai Liis; Vanatalu, Kalju; Kaldma, Ats; Samoson, Ago; Stanek, Jan, NMR Assignment of Methyl Groups in Immobilized Proteins Using Multiple-Bond  $^{13}\text{C}$  Homonuclear Transfers, Proton Detection, and Very Fast MAS. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2022, 9, 828785.  
DOI: 10.3389/fmolb.2022.828785 | Liczba cytowań: 9 | IF: 4.0
- 17) Michalak, Piotr; **Paluch, Piotr**; Guńka, Piotr A., Crystal Structure and Energetics of Arsenic(III)-Oxide Intercalates with Rubidium Chloride and Their Comparison with Isostructural Intercalates of Potassium Halides. *Crystal Growth & Design*, 2022, 22 (1), 711–717.  
DOI: 10.1021/acs.cgd.1c01220 | Liczba cytowań: 5 | IF: 3.4
- 18) Domański, Mateusz; Kraszewski, Karol; **Paluch, Piotr**; Guńka, Piotr A., Arsenic(III)-oxide Intercalates with Potassium Chloride: Water-Induced Varieties and New Synthesis Methods. *Crystal Growth & Design*, 2021, 21 (9), 5215–5222.  
DOI: 10.1021/acs.cgd.1c00555 | Liczba cytowań: 5 | IF: 3.4
- 19) **Paluch, Piotr**; Kupče, Ēriks; Trébosc, Julien; Lafon, Olivier; Amoureux, J. P., Hadamard acquisition of  $^{13}\text{C}$ – $^{13}\text{C}$  2-D correlation NMR spectra. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 2021, 59 (3), 247–256  
DOI: 10.1002/mrc.4969 | Liczba cytowań: 2 | IF: 1.4
- 20) Dahlman, Clayton J.; Kennard, Rhys M.; **Paluch, Piotr**; Venkatesan, Naveen R.; Chabinyč, Michael L.; Manjunatha Reddy, G. N., Dynamic Motion of Organic Spacer Cations in Ruddlesden–Popper Lead Iodide Perovskites Probed by Solid-State NMR Spectroscopy. *Chemistry of Materials*, 2021, 33 (2), 642–656.  
DOI: 10.1021/acs.chemmater.0c03958 | Liczba cytowań: 66 | IF: 7.0
- 21) Dudek, Marta Katarzyna; **Paluch, Piotr**; Śniechowska, Justyna; Nartowski, Karol P.; Day, Graeme M.; Potrzebowski, Marek J., Crystal structure determination of an elusive methanol solvate-hydrate of catechin using crystal structure prediction and NMR crystallography. *CrystEngComm*, 2020, 22 (30), 4969–4981.  
DOI: 10.1039/d0ce00452a | Liczba cytowań: 25 | IF: 2.6

- 22) Dudek, Marta Katarzyna; **Paluch, Piotr**; Pindelska, Edyta, Crystal structures of two furazidin polymorphs revealed by a joint effort of crystal structure prediction and NMR crystallography. *Acta Crystallographica Section B: Structural Science, Crystal Engineering and Materials*, 2020, 76, 322–335  
DOI: 10.1107/S205252062000373X | Liczba cytowań: 20 | IF: 1.3
- 23) Stanek, Jan; Schubeis, Tobias; **Paluch, Piotr**; Güntert, Peter; Andreas, Loren B.; Pintacuda, Guido, Automated Backbone NMR Resonance Assignment of Large Proteins Using Redundant Linking from a Single Simultaneous Acquisition. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142 (12), 5793–5799.  
DOI: 10.1021/jacs.0c00251 | Liczba cytowań: 44 | IF: 15.7
- 24) Trzeciak, Katarzyna; **Paluch, Piotr**; Pawlak, Tomasz; Rożański, Artur; Dudek, Marta Katarzyna; Potrzebowski, Marek J., The influence of the stereochemistry and C-end chemical modification of dermorphin derivatives on the peptide-phospholipid interactions. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 2020, 1862 (2), 183066.  
DOI: 10.1016/j.bbamem.2019.183066 | Liczba cytowań: 1 | IF: 2.5
- 25) Dudek, Marta Katarzyna; Wielgus, Ewelina; **Paluch, Piotr**; Śniechowska, Justyna; Kostrzewa, Maciej; Day, Graeme M.; Bujacz, Grzegorz D.; Potrzebowski, Marek J., Understanding the formation of apremilast cocrystals. *Acta Crystallographica Section B: Structural Science, Crystal Engineering and Materials*, 2019, 75, 803–814.  
DOI: 10.1107/S205252061900917X | Liczba cytowań: 22 | IF: 1.3
- 26) Jacek, Paulina; Kubiak, Katarzyna; Ryngajłło, Małgorzata; Rytczak, Przemysław; **Paluch, Piotr**; Bielecki, Stanisław, Modification of bacterial nanocellulose properties through mutation of motility related genes in *Komagataeibacter hansenii* ATCC 53582. *New Biotechnology*, 2019, 52, 60–68.  
DOI: 10.1016/j.nbt.2019.05.004 | Liczba cytowań: 48 | IF: 4.9
- 27) **Paluch, Piotr**; Rankin, Andrew G.M.; Trébosc, Julien; Lafon, Olivier; Amoureux, J. P., Analysis of HMQC experiments applied to a spin ½ nucleus subject to very large CSA. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, 2019, 100, 11–25.  
DOI: 10.1016/j.ssnmr.2019.03.001 | Liczba cytowań: 20 | IF: 2.4

- 28) Rankin, Andrew G.M.; Trébosc, Julien; **Paluch, Piotr**; Lafon, Olivier; Amoureux, J. P., Evaluation of excitation schemes for indirect detection of  $^{14}\text{N}$  via solid-state HMQC NMR experiments. *Journal of Magnetic Resonance*, 2019, 303, 28–41.  
DOI: 10.1016/j.jmr.2019.04.004 | Liczba cytowań: 19 | IF: 1.9
- 29) **Paluch, Piotr**; Pawlak, Tomasz; Ławniczak, Karol; Trébosc, Julien; Lafon, Olivier; Amoureux, J. P.; Potrzebowski, Marek J., Simple and Robust Study of Backbone Dynamics of Crystalline Proteins Employing  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  Dipolar Coupling Dispersion. *Journal of Physical Chemistry B*, 2018, 122 (34), 8146–8156.  
DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b04557 | Liczba cytowań: 4 | IF: 2.9
- 30) Dudek, Marta Katarzyna; Kostrzewa, Maciej; **Paluch, Piotr**; Potrzebowski, Marek J.,  $\pi$ -Philic Molecular Recognition in the Solid State as a Driving Force for Mechanochemical Formation of Apremilast Solvates and Cocrystals. *Crystal Growth & Design*, 2018, 18 (7), 3959–3970.  
DOI: 10.1021/acs.cgd.8b00301 | Liczba cytowań: 12 | IF: 3.4
- 31) Masnyk, Marek; Butkiewicz, Aleksandra; Górecki, Marcin; Luboradzki, Roman; **Paluch, Piotr**; Potrzebowski, Marek J.; Frelek, Jadwiga, In depth analysis of chiroptical properties of enones derived from abietic acid. *Journal of Organic Chemistry*, 2018, 83 (7), 3547–3561.  
DOI: 10.1021/acs.joc.7b02911 | Liczba cytowań: 10 | IF: 3.6
- 32) Śniechowska, Justyna; **Paluch, Piotr**; Pawlak, Tomasz; Bujacz, Grzegorz D.; Danikiewicz, Witold; Potrzebowski, Marek J., New synthetic pathway leading to oxospirochlorins. *RSC Advances*, 2018, 8 (38), 21354–21362.  
DOI: 10.1039/c8ra02445f | Liczba cytowań: 6 | IF: 4.6
- 33) Głodek, Marta; Makal, Anna M.; **Paluch, Piotr**; Kądziołka-Gaweł, Mariola; Kobayashi, Yasuhiro; Zakrzewski, Janusz; Plażuk, Damian, (Ar-CO-CC)(PEt<sub>3</sub>)Au and (Ar-CC)(PEt<sub>3</sub>)Au complexes bearing pyrenyl and ferrocenyl groups: Synthesis, structure, and luminescence properties. *Dalton Transactions*, 2018, 47 (19), 6702–6712.

DOI: 10.1039/c8dt01061g | Liczba cytowań: 7 | IF: 3.3

- 34) Dudek, Marta Katarzyna; Wielgus, Ewelina; **Paluch, Piotr**; Potrzebowski, Marek J., Spontaneous Keto–Enol Tautomerization in the Crystal Lattice Visualized with the Help of Water Encapsulated in Hydrophilic Reservoirs. *ChemPhysChem*, 2017, 18 (20), 2850–2854.

DOI: 10.1002/cphc.201700678 | Liczba cytowań: 6 | IF: 2.2

- 35) Wróblewska, Aneta; **Paluch, Piotr**; Wielgus, Ewelina; Bujacz, Grzegorz D.; Dudek, Marta Katarzyna; Potrzebowski, Marek J., Approach toward the understanding of coupling mechanism for EDC reagent in solvent-free mechanosynthesis. *Organic Letters*, 2017, 19 (19), 5360–5363.

DOI: 10.1021/acs.orglett.7b02637 | Liczba cytowań: 19 | IF: 5.0

- 36) **Paluch, Piotr**; Trébosc, Julien; Amoureux, J. P.; Potrzebowski, Marek J., 1H-31P CPVC NMR method under Very Fast Magic Angle Spinning for analysis of dipolar interactions and dynamics processes in the crystalline phosphonium tetrafluoroborate salts. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, 2017, 87, 96–103.

DOI: 10.1016/j.ssnmr.2017.05.004 | Liczba cytowań: 7 | IF: 2.4

- 37) **Paluch, Piotr**; Potrzebowska, Natalia; Ruppert, Agnieszka M.; Potrzebowski, Marek J., Application of 1H and 27Al magic angle spinning solid state NMR at 60 kHz for studies of Au and Au-Ni catalysts supported on boehmite/alumina. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, 2017, 84, 111–117.

DOI: 10.1016/j.ssnmr.2017.01.005 | Liczba cytowań: 18 | IF: 2.4

- 38) Śniechowska, Justyna; **Paluch, Piotr**; Potrzebowski, Marek J., Structure and dynamics processes in free-base chlorins controlled by chemical modifications of macroring and aryl groups in meso-positions. *RSC Advances*, 2017, 7 (40), 24795–24805.

DOI: 10.1039/c7ra02217d | Liczba cytowań: 12 | IF: 4.6

- 39) Dudek, Marta Katarzyna; Pawlak, Tomasz; **Paluch, Piotr**; Jeziorna, Agata; Potrzebowski, Marek J., A Multi-Technique Experimental and Computational

- Approach to Study the Dehydration Processes in the Crystals of Endomorphin Opioid Peptide Derivative. *Crystal Growth & Design*, 2016, 16 (9), 5312–5322.  
DOI: 10.1021/acs.cgd.6b00831 | Liczba cytowań: 9 | IF: 3.4
- 40) Nishiyama, Yusuke; Malon, Michał; Potrzebowski, Marek J.; **Paluch, Piotr**; Amoureux, J. P., Accurate NMR determination of C–H or N–H distances for unlabeled molecules. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, 2016, 73, 15–21.  
DOI: 10.1016/j.ssnmr.2015.06.005 | Liczba cytowań: 28 | IF: 2.4
- 41) Śniechowska, Justyna; **Paluch, Piotr**; Bujacz, Grzegorz D.; Górecki, Marcin; Frelek, Jadwiga; Gryko, Daniel T.; Potrzebowski, Marek J., Chiral crystals from porphyrinoids possessing a very low racemization barrier. *CrystEngComm*, 2016, 18 (20), 3561–3565.  
DOI: 10.1039/c6ce00530f | Liczba cytowań: 5 | IF: 2.6
- 42) Wielgus, Ewelina; **Paluch, Piotr**; Frelek, Jadwiga; Szczepiek, Wojciech J.; Potrzebowski, Marek J., Full Characterization of Linezolid and Its Synthetic Precursors by Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Mass Spectrometry. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 104 (11), 3883–3892.  
DOI: 10.1002/jps.24606 | Liczba cytowań: 10 | IF: 3.8
- 43) **Paluch, Piotr**; Pawlak, Tomasz; Jeziorna, Agata; Trébosc, Julien; Hou, Guangjin; Vega, Alexander J.; Amoureux, J. P.; Dračinský, Martin; Polenova, Tatyana E.; Potrzebowski, Marek J., Analysis of local molecular motions of aromatic sidechains in proteins by 2D and 3D fast MAS NMR spectroscopy and quantum mechanical calculations. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2015, 17 (43), 28789–28801.  
DOI: 10.1039/c5cp04475h | Liczba cytowań: 18 | IF: 2.9
- 44) Skorupska, Ewa A.; **Paluch, Piotr**; Jeziorna, Agata; Potrzebowski, Marek J., NMR study of BA/FBA cocrystal confined within mesoporous silica nanoparticles employing thermal solid phase transformation. *Journal of Physical Chemistry C*, 2015, 119 (16), 8652–8661.  
DOI: 10.1021/jp5123008 | Liczba cytowań: 30 | IF: 3.2

- 45) **Paluch, Piotr**; Pawlak, Tomasz; Oszajca, Marcin; Łasocha, Wiesław; Potrzebowski, Marek J., Fine refinement of solid state structure of racemic form of phospho-tyrosine employing NMR Crystallography approach. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, 2015, 65, 2–11.  
DOI: 10.1016/j.ssnmr.2014.08.002 | Liczba cytowań: 23 | IF: 2.4
- 46) Sierant, Małgorzata; Kaźmierski, Sławomir; Rożański, Artur; **Paluch, Piotr**; Bienias, Urszula; Miksa, Beata J., Nanocapsules for 5-fluorouracil delivery decorated with a poly(2-ethylhexyl methacrylate-co-7-(4-trifluoromethyl)coumarin acrylamide) cross-linked wall. *New Journal of Chemistry*, 2015, 39 (2), 1506–1516.  
DOI: 10.1039/c4nj02053g | Liczba cytowań: 9 | IF: 2.5
- 47) **Paluch, Piotr**; Trébosc, Julien; Nishiyama, Yusuke; Potrzebowski, Marek J.; Malon, Michał; Amoureux, J. P., Theoretical study of CP-VC: A simple, robust and accurate MAS NMR method for analysis of dipolar C–H interactions under rotation speeds faster than ca. 60 kHz. *Journal of Magnetic Resonance*, 2015, 252, 67–77.  
DOI: 10.1016/j.jmr.2015.01.002 | Liczba cytowań: 33 | IF: 1.9
- 48) Bocian, W.; **Paluch, Piotr**; Nowak-Król, Agnieszka; Gryko, Daniel T.; Potrzebowski, Marek J.; Śniechowska, Justyna; Sitkowski, Jerzy; Bednarek, Elżbieta; Kozerski, L. J., The <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, and <sup>19</sup>F NMR chemical shifts assignments in 5,10,15-tris(pentafluorophenyl) tetra-<sup>15</sup>N corrole at 191 K. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 2014, 53 (2), 167–171.  
DOI: 10.1002/mrc.4145 | Liczba cytowań: 1 | IF: 1.4
- 49) Huben, Krzysztof; Jewgiński, Michał Paweł; Pabis, Anna; **Paluch, Piotr**; Luy, Burkhard; Jankowski, Stefan, The structure of cyclolinopeptide A in chloroform refined by RDC measurements. *Journal of Peptide Science*, 2014, 20 (11), 901–907.  
DOI: 10.1002/psc.2683 | Liczba cytowań: 10 | IF: 1.8
- 50) Skorupska, Ewa A.; Jeziorna, Agata; **Paluch, Piotr**; Potrzebowski, Marek J., Ibuprofen in mesopores of mobil crystalline material 41 (MCM-41): A deeper understanding. *Molecular Pharmaceutics*, 2014, 11 (5), 1512–1519.  
DOI: 10.1021/mp400670f | Liczba cytowań: 55 | IF: 4.5

- 51) Szymański, Sławomir; **Paluch, Piotr**; Gryko, Daniel T.; Nowak-Król, Agnieszka; Bocian, W.; Sitkowski, Jerzy; Koszarna, Beata; Śniechowska, Justyna; Potrzebowski, Marek J.; Kozerski, L. J., Insights into the tautomerism in meso-substituted corroles: A variable-temperature <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, and <sup>19</sup>F NMR spectroscopy study. *Chemistry – A European Journal*, 2014, 20 (6), 1720–1730.  
DOI: 10.1002/chem.201303406 | Liczba cytowań: 25 | IF: 3.7
- 52) Jeziorna, Agata; Kaźmierski, Sławomir; **Paluch, Piotr**; Skorupska, Ewa A.; Potrzebowski, Marek J., Recent progress in the solid-state NMR studies of short peptides. Techniques, structure and dynamics. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, 2014, 83, 67–143.  
DOI: 10.1016/B978-0-12-800183-7.00002-2 | Liczba cytowań: 13 | IF: brak
- 53) Pawlak, Tomasz; **Paluch, Piotr**; Jeziorna, Agata; Bujacz, Grzegorz D.; Potrzebowski, Marek J., Slow and very fast MAS solid state NMR study of biopolymers. *Macromolecular Symposia*, 2014, 339 (1), 60–69. DOI: 10.1002/masy.201300139 | Liczba cytowań: 2 | IF: brak
- 54) Kobayashi, Takeshi; Mao, Kanmi; **Paluch, Piotr**; Nowak-Król, Agnieszka; Śniechowska, Justyna; Nishiyama, Yusuke; Gryko, Daniel T.; Potrzebowski, Marek J.; Pruski, Marek, Study of intermolecular interactions in the corrole matrix by solid-state NMR under 100 kHz MAS and theoretical calculations. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52 (52), 14108–14111.  
DOI: 10.1002/anie.201305475 | Liczba cytowań: 90 | IF: 16.9
- 55) **Paluch, Piotr**; Kaźmierski, Sławomir; Jeziorna, Agata; Śniechowska, Justyna; Dąbrowa, Kajetan; Panek, Jarosław Jan; Jezierska, Aneta; Jurczak, Janusz; Potrzebowski, Marek J., Influence of environmental humidity on organization and molecular dynamics of heteromacrocyclic assemblies. *Journal of Physical Chemistry B*, 2013, 117 (46), 14420–14431.  
DOI: 10.1021/jp406308a | Liczba cytowań: 2 | IF: 2.9

- 56) Pawlak, Tomasz; **Paluch, Piotr**; Trzeciak, Katarzyna; Jeziorna, Agata; Potrzebowski, Marek J., Study of the thermal processes in molecular crystals of peptides by means of NMR crystallography. *CrystEngComm*, 2013, 15 (43), 8680–8692.  
DOI: 10.1039/c3ce40090e | Liczba cytowań: 17 | IF: 2.6
- 57) Sierant, Małgorzata; **Paluch, Piotr**; Florczak, Marcin; Rozański, Artur; Miksa, Beata J., Photosensitive nanocapsules for use in imaging from poly(styrene-co-divinylbenzene) cross-linked with coumarin derivatives. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, 111, 571–578.  
DOI: 10.1016/j.colsurfb.2013.07.002 | Liczba cytowań: 12 | IF: 5.4
- 58) Drabik, Ewelina; Jeziorna, Agata; Bienias, Urszula; Trzeciak, Katarzyna; Pawlak, Tomasz; **Paluch, Piotr**; Potrzebowski, Marek J., Study of the mechanism of thermal chemical processes in the crystals of YAF tripeptides by means of mass spectrometry and solid state NMR. *Journal of Physical Chemistry B*, 2013, 117 (43), 13481–13489.  
DOI: 10.1021/jp407080q | Liczba cytowań: 3 | IF: 2.9
- 59) Ghorbanloo, Massomeh; Jaworska, Magdalena; **Paluch, Piotr**; Li, Guodong; Zhou, Lijing, Synthesis, characterization, and catalytic activity for thioanisole oxidation of homogeneous and heterogeneous binuclear manganese(II) complexes with amino acid-based ligands. *Transition Metal Chemistry*, 2013, 38 (5), 511–521.  
DOI: 10.1007/s11243-013-9718-4 | Liczba cytowań: 28 | IF: 1.7
- 60) Deredas, Dariusz; Albrecht, Łukasz; Maniukiewicz, Waldemar; Wojciechowski, Jakub M.; Wolf, Wojciech M.; **Paluch, Piotr**; Janecki, Tomasz; Różalski, Marek; Krajewska, Urszula; Janecka, Anna Ewa, Three-component reaction of 3-(diethoxyphosphoryl)coumarin, enolizable ketones and primary amines: Simple, stereoselective synthesis of benzo[1,3]oxazocine skeletons. *RSC Advances*, 2013, 3 (19), 6821–6832.  
DOI: 10.1039/c3ra40184g | Liczba cytowań: 12 | IF: 4.6
- 61) Midura, Wanda H.; Sobczak, Agata; **Paluch, Piotr**, Stereoselective cyclopropyl phosphonate formation using (S)-dimethylsulfonium-(p-tolylsulfinyl)methylide. Unusual phosphoryl group migration. *Tetrahedron Letters*, 2013, 54 (3), 223–226.

DOI: 10.1016/j.tetlet.2012.11.002 | Liczba cytowań: 8 | IF: 1.5

- 62) **Paluch, Piotr**; Pawlak, Tomasz; Amoureux, J. P.; Potrzebowski, Marek J., Simple and accurate determination of X-H distances under ultra-fast MAS NMR. *Journal of Magnetic Resonance*, 2013, 233, 56–63.

DOI: 10.1016/j.jmr.2013.05.005 | Liczba cytowań: 64 | IF: 1.9

- 63) Jeziorna, Agata; Pawlak, Tomasz; Trzeciak, Katarzyna; **Paluch, Piotr**; Potrzebowski, Marek J., Magic angle spinning NMR study of interaction of N-terminal sequence of dermorphin (Tyr-D-Ala-Phe-Gly) with phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 2012, 1818 (11), 2579–2587.

DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.06.013 | Liczba cytowań: 5 | IF: 2.5

- 64) Nowicka, Katarzyna; Bujacz, Anna; **Paluch, Piotr**; Sobczuk, Adam A.; Jeziorna, Agata; Ciesielski, Włodzimierz; Bujacz, Grzegorz D.; Jurczak, Janusz; Potrzebowski, Marek J., Study of host-guest interactions in benzodiazacoronands by means of solid state NMR spectroscopy, X-ray diffraction and quantum mechanical computations. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2011, 13 (14), 6423–6433.

DOI: 10.1039/c0cp02401e | Liczba cytowań: 14 | IF: 2.9

- 65) **Paluch, Piotr**; Potrzebowski, Marek J., Combined solid state NMR and ONIOM studies of reversible crystalline phase reaction for nickel coordination compounds. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, 2009, 36 (2), 103–109.

DOI: 10.1016/j.ssnmr.2009.07.001 | Liczba cytowań: 8 | IF: 2.4

- 66) Pabis, Anna; **Paluch, Piotr**; Szala-Bilnik, Joanna; Paneth, Piotr, A DFT study of the kinetic isotope effects on the competing SN2 and E2 reactions between hypochlorite anion and ethyl chloride. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2009, 5 (1), 33–36.

DOI: 10.1021/ct800412h | Liczba cytowań: 21 | IF: 5.5



(podpis wnioskodawcy)

## Literatura:

- (1) Paluch, P.; Pawlak, T.; Amoureux, J.-P.; Potrzebowski, M. J. Simple and Accurate Determination of X–H Distances under Ultra-Fast MAS NMR. *J. Magn. Reson.* **2013**, *233*, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2013.05.005>.
- (2) Nishiyama, Y.; Malon, M.; Potrzebowski, M. J.; Paluch, P.; Amoureux, J. P. Accurate NMR Determination of C–H or N–H Distances for Unlabeled Molecules. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **2016**, *73*, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.ssnmr.2015.06.005>.
- (3) Paluch, P.; Trébosc, J.; Nishiyama, Y.; Potrzebowski, M. J.; Malon, M.; Amoureux, J. P. Theoretical Study of CP-VC: A Simple, Robust and Accurate MAS NMR Method for Analysis of Dipolar C–H Interactions under Rotation Speeds Faster than ca. 60kHz. *J. Magn. Reson.* **2015**, *252*, 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2015.01.002>.
- (4) Paluch, P.; Pawlak, T.; Jeziorna, A.; Trébosc, J.; Hou, G.; Vega, A. J.; Amoureux, J.-P.; Dracinsky, M.; Polenova, T.; Potrzebowski, M. J. Analysis of Local Molecular Motions of Aromatic Sidechains in Proteins by 2D and 3D Fast MAS NMR Spectroscopy and Quantum Mechanical Calculations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17* (43), 28789–28801. <https://doi.org/10.1039/C5CP04475H>.
- (5) Wickramasinghe, N. P.; Parthasarathy, S.; Jones, C. R.; Bhardwaj, C.; Long, F.; Kotecha, M.; Mehboob, S.; Fung, L. W.-M.; Past, J.; Samoson, A.; Ishii, Y. Nanomole-Scale Protein Solid-State NMR by Breaking Intrinsic <sup>1</sup>H T<sub>1</sub> Boundaries. *Nat. Methods* **2009**, *6* (3), 215–218. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1300>.
- (6) Frericks Schmidt, H. L.; Sperling, L. J.; Gao, Y. G.; Wylie, B. J.; Boettcher, J. M.; Wilson, S. R.; Rienstra, C. M. Crystal Polymorphism of Protein GB1 Examined by Solid-State NMR Spectroscopy and X-Ray Diffraction. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (51), 14362–14369. <https://doi.org/10.1021/jp075531p>.
- (7) Lamley, J. M.; Lougher, M. J.; Sass, H. J.; Rogowski, M.; Grzesiek, S.; Lewandowski, J. R. Unraveling the Complexity of Protein Backbone Dynamics with Combined <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N Solid-State NMR Relaxation Measurements. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17* (34), 21997–22008. <https://doi.org/10.1039/C5CP03484A>.
- (8) Mollica, L.; Baias, M.; Lewandowski, J. R.; Wylie, B. J.; Sperling, L. J.; Rienstra, C. M.; Emsley, L.; Blackledge, M. Atomic-Resolution Structural Dynamics in Crystalline Proteins from NMR and Molecular Simulation. *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3* (23), 3657–3662. <https://doi.org/10.1021/jz3016233>.
- (9) Tugarinov, V.; Kay, L. E. Ile, Leu, and Val Methyl Assignments of the 723-Residue Malate Synthase G Using a New Labeling Strategy and Novel NMR Methods. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (45), 13868–13878. <https://doi.org/10.1021/ja030345s>.
- (10) Amero, C.; Asunción Durá, M.; Noirclerc-Savoye, M.; Perollier, A.; Gallet, B.; Plevin, M. J.; Vernet, T.; Franzetti, B.; Boisbouvier, J. A Systematic Mutagenesis-Driven Strategy for Site-Resolved NMR Studies of Supramolecular Assemblies. *J. Biomol. NMR* **2011**, *50* (3), 229–236. <https://doi.org/10.1007/s10858-011-9513-5>.
- (11) Stanek, J.; Andreas, L. B.; Jaudzems, K.; Cala, D.; Lalli, D.; Bertarello, A.; Schubeis, T.; Akopjana, I.; Kotelovica, S.; Tars, K.; Pica, A.; Leone, S.; Picone, D.; Xu, Z.; Dixon, N. E.; Martinez, D.; Berbon, M.; El Mammeri, N.; Noubhani, A.; Saupe, S.; Habenstein, B.; Loquet, A.; Pintacuda, G. NMR Spectroscopic Assignment of Backbone and Side-Chain Protons in Fully Protonated Proteins: Microcrystals, Sedimented Assemblies, and Amyloid Fibrils. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55* (50), 15504–15509. <https://doi.org/10.1002/anie.201607084>.
- (12) Agarwal, V.; Reif, B. Residual Methyl Protonation in Perdeuterated Proteins for Multi-Dimensional Correlation Experiments in MAS Solid-State NMR Spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **2008**, *194* (1), 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2008.05.021>.

- (13) Kulminskaya, N.; Vasa, S. K.; Giller, K.; Becker, S.; Kwan, A.; Sunde, M.; Linser, R. Access to Side-Chain Carbon Information in Deuterated Solids under Fast MAS through Non-Rotor-Synchronized Mixing. *Chem. Commun.* **2016**, 52 (2), 268–271. <https://doi.org/10.1039/C5CC07345F>.
- (14) Carlton, L. Rhodium-103 NMR. In *Annual Reports on NMR Spectroscopy*; Elsevier, 2008; Vol. 63, pp 49–178. [https://doi.org/10.1016/S0066-4103\(07\)63003-8](https://doi.org/10.1016/S0066-4103(07)63003-8).
- (15) Iggo, J. A.; Liu, J.; Overend, G. The Indirect Detection of Metal Nuclei by Correlation Spectroscopy (HSQC and HMQC). In *Annual Reports on NMR Spectroscopy*; Elsevier, 2008; Vol. 63, pp 179–262. [https://doi.org/10.1016/S0066-4103\(07\)63004-X](https://doi.org/10.1016/S0066-4103(07)63004-X).
- (16) Phillips, B. L.; Houston, J. R.; Feng, J.; Casey, W. H. Observation of Solid-State<sup>103</sup> Rh NMR by Cross-Polarization. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128 (12), 3912–3913. <https://doi.org/10.1021/ja057347s>.
- (17) Holmes, S. T.; Schönzart, J.; Philips, A. B.; Kimball, J. J.; Termos, S.; Altenhof, A. R.; Xu, Y.; O’Keefe, C. A.; Autschbach, J.; Schurko, R. W. Structure and Bonding in Rhodium Coordination Compounds: A<sup>103</sup> Rh Solid-State NMR and Relativistic DFT Study. *Chem. Sci.* **2024**, 15 (6), 2181–2196. <https://doi.org/10.1039/D3SC06026H>.