

Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Biologia
Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Industriali



**Strategie NMR per la profilazione di catecolamine nella
diagnosi e nella prognosi del neuroblastoma: un
approccio basato su chemosensori**

Relatore: Prof. Federico Rastrelli
Dipartimento di Scienze Chimiche

Controrelatore: Prof. Massimo Bellanda
Dipartimento di Scienze Chimiche

Laureando: Giacomo Zuccon

Anno Accademico 2022/2023

Indice

Glossario	1
1. Introduzione	3
1.1 L'impatto del Neuroblastoma	3
1.2 Metodologie di analisi	5
2. Scopo della tesi	7
3. Principi di base della spettroscopia NMR	8
3.1 Fondamenti	8
3.2 Introduzione ai fenomeni di rilassamento	10
3.3 Il <i>chemical shift</i>	11
3.4 Integrazione dei segnali NMR quantitativo	13
3.5 <i>J-coupling</i> e struttura iperfine	13
3.6 Soppressione del segnale dell'H ₂ O	14
3.7 Sequenze di singolo e doppio spin-echo	16
4. Origine del rilassamento NMR	18
4.1 Campi magnetici locali	18
4.2 Origine dei campi magnetici locali	19
4.3 Descrizione del moto casuale	20
4.4 Densità spettrale	21

4.5 Rilassamento di spin	22
4.6 Origine del NOE (<i>Nuclear Overhauser Effect</i>)	23
4.7 Esperimenti NOE	24
4.7.1 Esperimento NOE transiente	25
4.7.2 Esperimento <i>Steady state</i> NOE	26
5. Tecniche sperimentali NOE-based	27
5.1 <i>Saturation Transfer Difference Spectroscopy</i>	27
5.2 <i>water-Mediated Saturation Transfer</i> (wSTD)	30
6. Risultati e discussione	33
6.1 Scelta del recettore	34
6.2 Valutazione della selettività basata sul trasferimento della saturazione	36
6.3 Selettività in funzione della variazione dei parametri NMR	42
6.4 Determinazione del limite di rilevabilità dell'HPwSTD	45
6.5 Valutazione dell'efficienza delle tecniche di trasferimento di saturazione	46
6.5.1 Esperimenti in assenza di tampone	47
6.5.2 Esperimenti in tampone HEPES	49
6.5.3 Esperimenti in tampone fosfato	51
6.5.4 Esperimenti in Sigmatrix®	51
6.6 Esperimenti <i>Double Pulse Field Gradient Perfect Echo</i> (DPFGPE) selettivi a bande	54
7. Conclusioni	55

8. Materiali e metodi	57
8.1 Sequenza WaterSTD	57
9. Bibliografia	59

Glossario

AuNP	Nano particella d'oro
B_0	Campo magnetico esterno
DPFGPE	<i>Double Pulsed Field Gradient Perfect Echo</i>
DPFGSE	<i>Double Pulsed Field Gradient Spin Echo</i>
EFS	<i>Event free survival</i>
HPwSTD	<i>High power water STD</i>
INSS	<i>International Neuroblastoma Staging system</i>
LC-MS/MS	cromatografia liquida con spettrometro di massa
LPwSTD	<i>Low power water STD</i>
MNA	<i>MYCN oncogene amplification</i>
M_z	magnetizzazione lungo l'asse z
NB	Neuroblastoma
NOE	<i>Nuclear Overhauser effect</i>
OS	Overall survival
RF	radiofrequenza
R_z	<i>self relaxation rate</i>
STD	<i>Saturation Transfer Difference</i>
T_1	tempo di rilassamento longitudinale
T_2	tempo di rilassamento trasversale
ν_0	frequenza di <i>Larmor</i>
wSTD	water-mediated Saturation Transfer Difference
σ	<i>cross-relaxation rate</i>

1. Introduzione e scopo della tesi

1.1. L'impatto del Neuroblastoma

Il Neuroblastoma (NB) è il secondo tumore solido extracranico più comune in età pediatrica (<18 anni) e la forma di cancro più diffusa in soggetti di età minore di un anno.¹ Il tasso di incidenza del NB diminuisce con l'età, da 25-50 casi per milione per individui di età inferiore ad un anno a 1-1.5 casi per milione per i bambini di età superiore a 10 anni. Nonostante il NB sia molto meno comune di altre forme tumorali pediatriche (es. leucemia linfoblastica), conta dal 10 al 15% della mortalità correlata all'oncologia pediatrica.² La stadiazione del neuroblastoma segue l'*International Neuroblastoma Staging System* (INSS) che è stato creato per classificare i tumori prima della resezione chirurgica.³ Diagnosi ad uno stadio avanzato, diagnosi ad età superiori ai 18 mesi, MYCN *oncogene amplification* (MNA) sono alcuni dei fattori che determinano uno esito clinico sfavorevole.^{2,3} In generale, in base alla valutazione di gruppo di rischio, i pazienti sono sottoposti alla terapia più opportuna per massimizzarne l'effetto evitando danni non necessari dovuti alla tossicità della terapia stessa.

Nei pazienti classificati a basso rischio si prevede che il tumore regredisca o rimanga presente senza complicazioni. Pertanto, per questi pazienti classificati come *low risk*, con l'eccezione di quelli con particolari sintomi e/o progressioni locali, è applicata una politica vigile di '*wait and see*'. La prognosi attesa per i pazienti a basso rischio è eccellente, ovvero una *Overall Survival* (OS) a 5 anni del 90%). Pazienti a rischio intermedio vengono trattati con cicli di chemioterapia seguita da chirurgia e radioterapia, per loro L'EFS (*Event-free survival*) e l'OS a cinque anni sono rispettivamente del 50-75% e 70-90%.

Il trattamento di pazienti ad alto rischio è migliorato enormemente negli ultimi 40 anni con un incremento significativo dell'OS a cinque anni dal 20% al 50%. Le migliorate aspettative di vita sono da attribuirsi alle terapie rivolte ai pazienti ad alto rischio, che si sviluppano in tre fasi: induzione, consolidamento e mantenimento.^{3,4} La fase di induzione ha l'obiettivo di eliminare il tumore primario ed il grosso del carico metastatico combinando chemioterapia e chirurgia. La fase di consolidamento prevede chemioterapia ad alta dose seguita da trapianto di cellule staminali del sangue autologhe. Infine, la fase di mantenimento combina immunoterapia con o senza citochine ed acido retinoico. Tuttavia, i parametri che guidano l'assegnazione del rischio non sono completamente soddisfacenti e pertanto pazienti riceventi un trattamento simile possono sperimentare effetti molto diversi.⁵

Sarebbe utile quindi sviluppare metodi capaci di migliorare l'identificazione di casi ad alto rischio per diminuire ulteriormente la mortalità ed allo stesso momento evitare terapie altamente aggressive quando non necessarie.

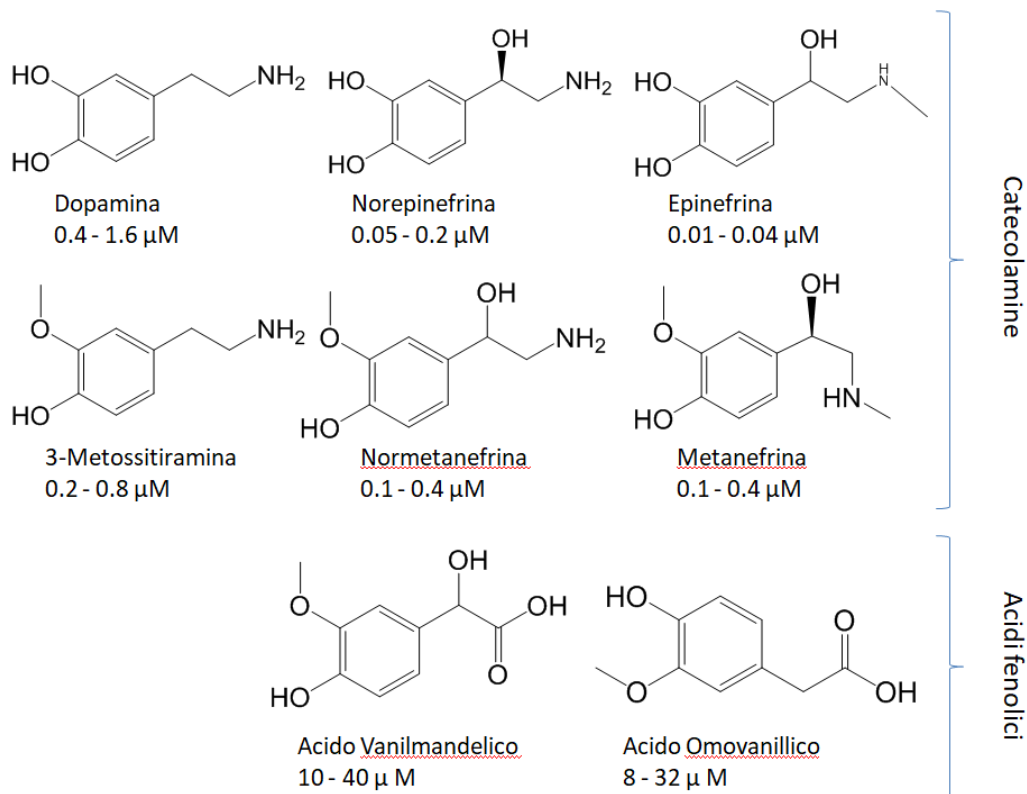


Figura 1.1 Metaboliti delle catecolamine e la loro concentrazione standard nell'urina dei bambini.

È noto che al NB sia associata una produzione ed una secrezione aumentata dei metaboliti della tirosina, che comprendono due classi chimiche: catecolamine ed acidi fenolici.^{1,2} L'analisi delle catecolamine urinarie, così vengono definite complessivamente, rappresenta uno dei primi step nella diagnosi del NB. Attualmente il Neuroblastoma è diagnosticato analizzando, all'interno di questa classe di molecole, quelle più abbondanti, ovvero l'acido omovanillico (HVA) e l'acido vanilmandelico (VMA) attraverso una raccolta delle urine nelle 24 ore. L'escrezione di questa classe di molecole è un processo continuo e si è visto che il Neuroblastoma è diagnosticabile anche a partire da un singolo campione di urina.⁶

Molti studi hanno dimostrato che la valutazione della concentrazione dell'HVA in combinazione a quella del VMA è in grado di diagnosticare l'85% dei pazienti affetti da Neuroblastoma.⁷ Tuttavia, è stato recentemente mostrato che una diagnosi basata su un insieme di catecolamine più ampio, che include gli otto analiti presenti in Figura 1.1, permette di individuare il 95% dei pazienti affetti. Il

rimanente 5% dei pazienti, quelli con concentrazione di catecolamine urinarie nella norma, presenta caratteristiche cliniche favorevoli, quali una malattia localizzata, assenza di MNA ed ha una prognosi favorevole.² Si è visto anche come un rapporto tra VMA e HVA minore di 0.5 abbia un ruolo prognostico indipendente per quei pazienti con il tumore localizzato e con mancanza di MNA,⁸ e che il rilevamento di concentrazioni elevate di 3-metossitiramina (3-MT) è associato ad una prognosi peggiore anche quando sono stati applicati trattamenti per i pazienti ad alto rischio, tanto che la combinazione di elevati livelli di 3-MT e una diagnosi tardiva (> 18 mesi) identifica un sottogruppo di pazienti ad alto rischio con un EFS e OS a cinque anni di 14,3% e del 21% rispettivamente, che potrebbe quindi rappresentare il gruppo dei pazienti ad altissimo rischio.⁹ Infine uno studio recente ha anche dimostrato che anche la sottoclasse delle metanefrine (metanefrina, normetanefrina, norepinefrina ed epinefrina) nel sangue possiede una simile sensibilità diagnostica per il NB¹⁰, ed è pertanto ipotizzabile una loro rilevanza diagnostica anche nell'urina.

Quello che emerge è che una profilazione completa degli otto metaboliti potrebbe rappresentare un tool per l'identificazione di pazienti ad alto rischio.

Un nuovo protocollo per i pazienti ad alto rischio potrebbe includere la valutazione completa del profilo delle catecolamine a differenti *timepoints* per monitorare e predire la risposta alla terapia.

1.2. Metodologie di analisi

L'analisi di miscele biologiche complesse come l'urina può essere affrontata mediante diverse strategie. Nel caso specifico dei metaboliti delle catecolamine la tecnica attualmente in uso presso l'istituto G. Gaslini, centro di riferimento per il NB in Italia, è la cromatografia liquida con spettrometro di massa (LC-MS/MS) dopo averle precedentemente purificate mediante estrazione in fase solida (SPE). Tuttavia, la cromatografia non è in grado di fornire informazioni dettagliate sugli analiti.

Al contrario, la spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) fornisce una quantità di informazioni (in primis strutturali) molto elevata e soprattutto con una manipolazione minima del campione. Tuttavia, l'analisi NMR diretta di miscele complesse è spesso compromessa dall'eccesso di informazioni dovuto alla sovrapposizione tra i segnali delle singole molecole. Nella pratica

sperimentale il rilevamento di una molecola target o di una classe di molecole via NMR è spesso reso impossibile a causa del mascheramento da parte dei segnali provenienti dalle molte componenti che costituiscono la matrice.

Nel trattare campioni complessi, un approccio comunemente adottato in NMR consiste nell'utilizzo di esperimenti multidimensionali. Tuttavia, mentre questa strategia è generalmente efficace nel risolvere spettri intrinsecamente complessi di singole specie, la sua applicazione non è efficace nel caso di miscele, dove la complessità nasce dalla sovrapposizione di segnali appartenenti a molte specie diverse.

Un approccio alternativo per diminuire la complessità nell'analisi delle miscele consiste nella rilevazione mirata di particolari analiti o classi di analiti. In questo contesto sono state sviluppate diverse tecniche basate su chemosensori che hanno la capacità di rilevare particolari composti in una miscela complessa.

Una di queste tecniche è l'*NMR chemosensing*, che mira ad ottenere uno spettro ^1H NMR contenente tutti e solo gli analiti selezionati mediante l'utilizzo di un recettore, nel caso in esame nano particelle d'oro (AuNPs) opportunamente funzionalizzate. In particolare, tecniche NMR basate sul rilassamento di spin possono essere sfruttate per rilevare e identificare analiti interagenti mediante trasferimento di saturazione tra gli spin del monostrato (o quelli delle molecole di H_2O associate al monostrato) e quelli degli analiti interagenti.

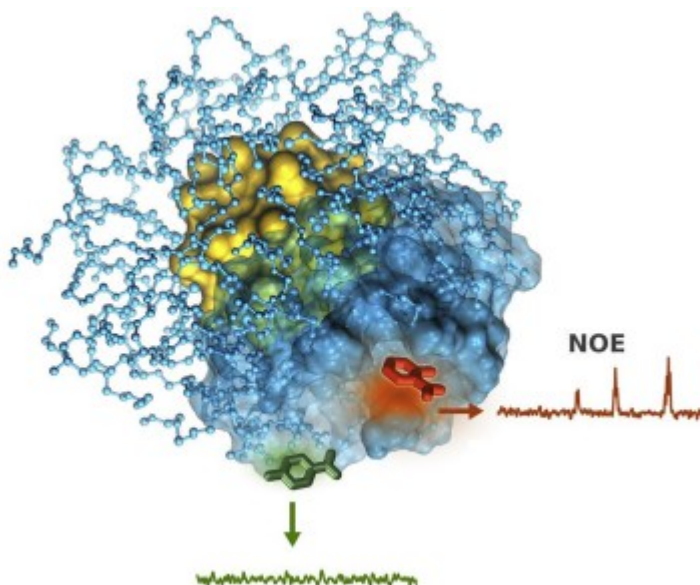


Figura 1.2 Rappresentazione ideale di un esperimento di *chemosensing* assistito da nanoparticelle d'oro protette da un monostrato organico. La molecola arancione interagisce con la macromolecola, quella verde no.

2. Scopo della tesi

Lo scopo di questa tesi consiste nell'esplorare l'uso dell'NMR come possibile alternativa alle tecniche attualmente in uso per la profilazione delle catecolamine urinarie e dei loro metaboliti, data la loro importanza nella diagnosi del neuroblastoma. Trattandosi di uno studio preliminare, le analisi verranno effettuate su campioni costruiti ad hoc in prospettiva di un'applicazione futura su un campione reale di urina.

Nello specifico verranno indagati i punti di forza e i limiti della tecnica dell'NMR *chemosensing*, che consistono rispettivamente nella semplificazione dello spettro e in una relativamente bassa sensibilità.

Il recettore molecolare impiegato come chemosensore nell'ambito di questo lavoro di tesi consiste in una nanoparticella d'oro (AuNP) opportunamente funzionalizzata, mentre gli esperimenti NMR sono basati sul trasferimento di saturazione selettivo per effetto *Overhauser* nucleare.

Mediante *NMR chemosensing* si cercherà inizialmente una conferma della selettività di una particolare nanoparticella, già sottoposta ad uno studio di dinamica molecolare curato dal gruppo del dr. De Vivo (IIT Genova), verso la classe dei metaboliti di interesse.

Con riferimento al problema della sensibilità, verranno poi paragonate le prestazioni delle tecniche che si basano sulla saturazione diretta degli spin ^1H del *monolayer* e sulla saturazione degli spin ^1H dell' H_2O associata al *monolayer*. Questo secondo approccio ha infatti dimostrato un netto miglioramento del limite di rilevabilità in contesti analoghi a quelli del *chemosensing* assistito da nanoparticelle.

Infine verrà studiata l'efficienza dell'NMR *chemosensing* in diverse condizioni, esaminando in particolare l'effetto della matrice nel momento in cui viene utilizzata una soluzione di urina sintetica al posto di H_2O .

3. Principi di base della spettroscopia NMR

3.1. Fondamenti

I nuclei di tutti gli atomi sono caratterizzati da un numero quantico di spin nucleare I che può assumere valore zero, intero o semiintero. Il valore di I dipende dal numero atomico Z e dal numero di massa A dei suoi isotopi. Gli atomi per i quali Z o A (o entrambi) sono dispari sono dotati di un momento angolare di spin e danno luogo ai fenomeni della risonanza magnetica (ad es. ^1H , ^{13}C). Altri nuclei di interesse in chimica organica (^{12}C e ^{16}O) hanno $I = 0$ e non sono NMR-attivi.

I nuclei dotati di $I \neq 0$ possiedono un momento magnetico μ , dato da

$$\mu = \gamma I \hbar \quad (3.1)$$

dove h è la costante di Planck e γ è il rapporto giromagnetico, una grandezza fisica caratteristica di ogni isotopo.

La maggior parte degli elementi chimici presenta almeno un isotopo con $I \neq 0$; uno dei più importanti ai fini sperimentali è ^1H , l'isotopo dell'idrogeno più abbondante in natura. Per quanto riguarda il carbonio, il solo isotopo naturale dotato di spin nucleare è il ^{13}C , che ha lo svantaggio di essere presente in natura in quantità relativamente bassa (1.1%).

Sia il momento angolare sia il momento magnetico sono quantità vettoriali e come tali hanno un modulo ed una direzione. All'equilibrio termico questi vettori sono orientati casualmente, ma quando i nuclei vengono immersi in un campo magnetico statico B_0 (per convenzione diretto lungo l'asse z di un sistema cartesiano), i momenti magnetici microscopici tendono ad allinearsi debolmente lungo il campo magnetico esterno. Associato al numero quantico di spin I , che rappresenta il *valore assoluto* del momento angolare di spin, esiste un secondo numero quantico m che specifica l'*orientazione* del momento angolare rispetto all'asse del campo B_0 . Questo numero quantico può assumere $2I + 1$ valori compresi tra $+I$ e $-I$ inclusi con incrementi di 1 unità: ad esempio, se $I = \frac{1}{2}$ i possibili valori di m sono $+\frac{1}{2}$ e $-\frac{1}{2}$. A questi valori vengono associate le due possibili orientazioni rispetto al campo statico: se parallelo al campo viene associato un valore $m = +\frac{1}{2}$ (stato α), mentre se antiparallelo $m = -\frac{1}{2}$ (stato β).

L'effetto del campo magnetico B_0 è quello di indurre un moto di precessione del vettore momento magnetico μ attorno a B_0 ad una frequenza ν proporzionale al

campo applicato e caratteristica per ciascun nucleo, poiché dipendente dal rapporto giromagnetico γ . Tale frequenza, detta "di Larmor", vale

$$\nu_0 = -\gamma B_0 / 2\pi \text{ (in Hz)} \quad (3.2)$$

Come detto in precedenza, il protone possiede due possibili stati associati α e β , che assumono energie diverse in presenza di un campo magnetico esterno (*effetto Zeeman*): la differenza di energia dei due stati è pari a

$$\Delta E = h\nu = -\gamma h B_0 / 2\pi \quad (3.3)$$

In presenza di un campo magnetico esterno e in condizioni di equilibrio termico esisterà quindi un eccesso di popolazione dello stato a minor energia (α) e un difetto di popolazione dello stato a maggior energia (β), secondo la distribuzione di Boltzmann:

$$N_\alpha / N_\beta = e^{-\Delta E / K_B T} \quad (3.4)$$

dove $N_{\alpha,\beta}$ è la popolazione di ciascuno stato, K_B la costante di Boltzmann e T la temperatura assoluta. Questa situazione può essere rappresentata da un insieme di vettori distribuiti casualmente sul cono di precessione e tale che il leggero eccesso di popolazione degli spin α genera complessivamente un vettore magnetizzazione macroscopica M_0 diretto lungo l'asse z , mentre lungo le direzioni trasversali la stessa magnetizzazione macroscopica ha una componente mediamente nulla.

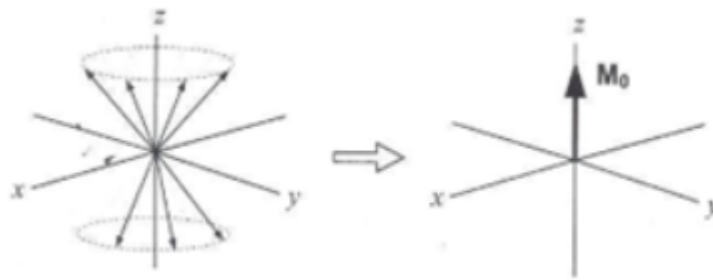


Figura 3.1 : Comportamento di un nucleo con $I = \frac{1}{2}$ in un campo magnetico.

In ultima analisi, la dinamica di un insieme di spin viene quindi rappresentata semplicemente come un unico vettore M_0 .

Un aspetto fondamentale della spettroscopia NMR risiede nel fatto che la direzione di M_0 può essere manipolata applicando un opportuno campo magnetico oscillante alla frequenza di *Larmor*. Per far ciò si accende un

trasmettitore di radiofrequenza (RF) che genera un impulso di durata t_p perpendicolarmente al vettore M_0 (ad esempio lungo l'asse x). Il vettore magnetizzazione risponde all'impulso ruotando verso l'asse y e l'angolo di rotazione ϑ ("flip angle") è proporzionale al valore del campo B_1 applicato e alla sua durata:

$$\vartheta = (360/2\pi) \gamma B_1 t_p \text{ (in gradi)} \quad (3.5)$$

Per definizione un impulso di 90° porta tutta la magnetizzazione nel piano xy . Una volta cessato l'impulso, la magnetizzazione tende a ritornare spontaneamente verso lo stato di equilibrio (ossia con M allineato lungo l'asse z) tramite una varietà di processi che concorrono a produrre il fenomeno del *rilassamento*. Prima che ciò avvenga, il vettore magnetizzazione, che precede nel piano xy attorno l'asse z , induce un debole voltaggio oscillante all'interno di una bobina che avvolge il campione. L'effetto combinato della precessione e del ritorno verso l'equilibrio genera un segnale NMR transiente detto *free induction decay* (FID). Nei moderni spettrometri NMR i nuclei della specie di interesse vengono eccitati simultaneamente con un unico breve impulso a radiofrequenza. Una volta registrato il FID, per passare dal dominio del tempo a quello della frequenza è necessaria un'operazione matematica (trasformata di Fourier) che restituisce lo spettro convenzionale nel quale l'intensità dei picchi è proporzionale al numero dei protoni risonanti (includendo eventuali strutture iperfini dei segnali).

3.2. Introduzione ai fenomeni di rilassamento

Ogniqualevolta la magnetizzazione viene spostata dal suo valore di equilibrio, essa tende a ritornare all'equilibrio attraverso differenti meccanismi, il più importante dei quali coinvolge l'interazione dipolare tra i momenti magnetici degli spin.

Esistono due principali modalità di rilassamento: longitudinale e trasversale. Il rilassamento longitudinale è un processo caratterizzato da una costante di tempo T_1 e coinvolge la cessione di energia al microambiente circostante. Il tempo di rilassamento T_1 dipende da numerosi fattori tra cui l'intensità del campo magnetico esterno B_0 , il tipo di solvente (maggiore è la sua viscosità, minore è il T_1 e più in generale dal regime di *tumbling* molecolare).

Il rilassamento trasversale è invece un processo caratterizzato da una costante di tempo T_2 (inferiore o uguale a T_1) ed indica il tempo necessario affinché gli spin perdano coerenza di fase. Questo processo è responsabile del caratteristico

decadimento della magnetizzazione trasversale (FID). Il rilassamento trasversale è anch'esso descritto da un decadimento esponenziale la cui costante di velocità, $1/T_2$, dipende da fattori simili a quelli già elencati per il rilassamento longitudinale.

A causa della non perfetta omogeneità del campo magnetico esterno, poi, la perdita della coerenza di fase è accelerata rispetto a quanto avverrebbe in presenza di un campo magnetico perfettamente omogeneo, e ciò porta ad avere un valore della costante di tempo effettiva (T_2^*) tale che $T_2^* < T_2$.

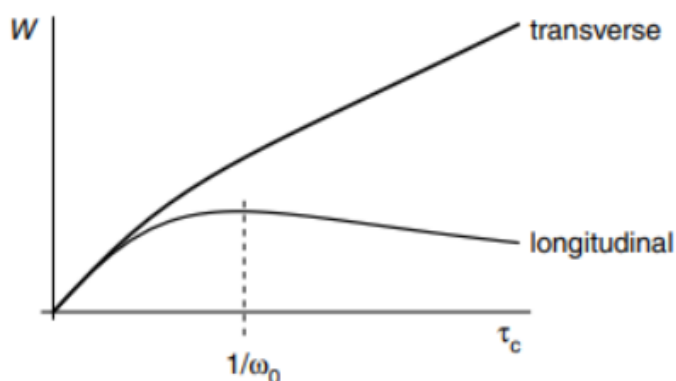


Figura 3.2 Confronto tra la velocità W di rilassamento longitudinale e trasversale in funzione del tempo di correlazione τ_c (legato al *tumbling* molecolare) ad una frequenza di *Larmor* fissata. La costante di velocità di rilassamento longitudinale mostra un massimo, mentre quella di rilassamento trasversale semplicemente aumenta.

3.3. Il chemical shift

Come detto in precedenza, ciascuna specie atomica magneticamente attiva possiede una propria frequenza di precessione (o di *Larmor*). Se in un composto chimico tutti i nuclei dello stesso tipo (ad esempio ^1H) risuonassero alla stessa frequenza, l'analisi NMR non sarebbe di alcuna utilità.

Nella realtà si hanno piccole variazioni delle frequenze di risonanza rispetto a quella di *Larmor* dovute alla presenza degli elettroni attorno all'atomo stesso e a quelli vicini. Il campo magnetico esterno (B_0) induce, sull'intorno elettronico di ogni nucleo, un campo magnetico locale opposto. La nube elettronica provoca cioè una schermatura locale del campo applicato. Il campo *effettivo* viene indicato come $B_{\text{eff}} = B_0(1 - \sigma)$ dove σ è la costante di schermo. Rivisitando l'equazione della frequenza di *Larmor* si ha quindi che:

$$\nu_0 = -\gamma B_0(1 - \sigma)/2\pi \quad (3.6)$$

Cioè, a seconda dell'intorno chimico di un certo nucleo, la frequenza di risonanza può risultare più bassa di un fattore $1-\sigma$, poiché solitamente il campo magnetico indotto è opposto a quello applicato. La differenza tra le intensità B_0 e B_{eff} è molto piccola, nell'ordine dei ppm (parti per milione). Nel caso di ^1H , atomi di idrogeno che occupano posizioni diverse all'interno di un composto avranno intorni chimici differenti e risuoneranno a frequenze diverse. Diversamente, atomi di idrogeno che occupano posizioni "chimicamente equivalenti" (ovvero posizioni scambiabili in base agli elementi di simmetria della molecola) risuoneranno alla stessa frequenza.

Poiché la frequenza di risonanza dipende anche dal campo applicato, negli spettri NMR viene riportata sull'asse delle ascisse non la frequenza di risonanza assoluta dei nuclei, bensì lo spostamento chimico (*chemical shift*) che risulta dalla differenza tra la frequenza di risonanza del nucleo in esame (ν) e quella del nucleo di una molecola di riferimento (ν_{rif}). Per i nuclei ^1H e ^{13}C viene generalmente usato il tetrametilsilano (TMS) come riferimento. Lo spostamento chimico viene espresso in ppm secondo una scala detta dei "delta" (δ) con $\delta = [(\nu - \nu_{rif})/\nu_{rif}] \cdot 10^6$. Il segnale del TMS cade all'estrema destra dello spettro e corrisponde al valore zero, e i valori della scala crescono da destra verso sinistra. Tale sistema di scala rende i valori di spostamento chimico indipendenti dall'intensità del campo, facendo emergere la dipendenza dei segnali NMR dalla struttura della molecola.

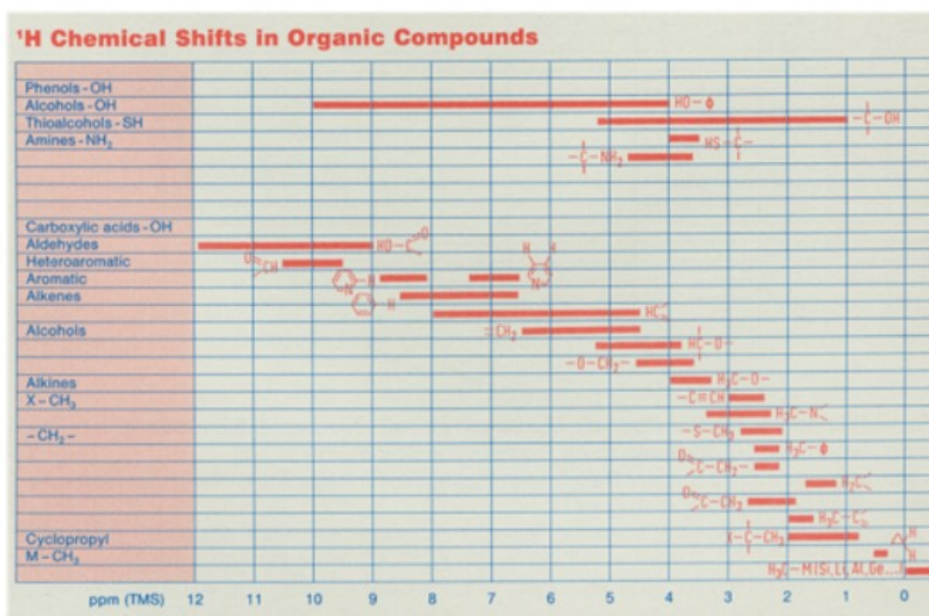


Figura 3.3 : Dipendenza del chemical shift dai gruppi funzionali.

3.4. Integrazione dei segnali e NMR quantitativo

Una proprietà particolarmente interessante dei segnali NMR risiede nel fatto che la loro intensità integrata è proporzionale al numero di spin risonanti che li generano. A titolo di esempio, un frammento di molecola del tipo $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ produrrà due gruppi di segnali le cui aree relative stanno tra loro in rapporto 2:3. Similmente, una miscela equimolare di CHCl_3 e CH_2Cl_2 produrrà due segnali distinti le cui aree relative stanno tra loro in rapporto 1:2.

Dal punto di vista sperimentale, l'aderenza a questa proprietà "quantitativa" dipende dal modo in cui viene acquisito lo spettro NMR. È infatti necessario che gli spin abbiano il tempo di riportarsi all'equilibrio prima di ciascun impulso di 90° .

3.5. *J*-coupling e struttura iperfine

L'accoppiamento scalare o *J-coupling* è un'interazione che si propaga attraverso i legami tra gli atomi ed è dovuta al fatto che lo spin di un nucleo perturba (polarizza) gli spin degli elettroni di legame in modo tale che i livelli di energia dei nuclei vicini sono a loro volta perturbati dagli elettroni polarizzati. L'accoppiamento scalare è espresso tramite una costante *J* (in Hz) ed è indipendente dal campo magnetico esterno; esso è responsabile delle cosiddette "strutture iperfini" spesso osservate negli spettri NMR. Poiché questa interazione si propaga attraverso gli elettroni di legame, la grandezza di *J* diminuisce rapidamente all'aumentare del numero di legami che separano i nuclei. Gli accoppiamenti attraverso uno (1J), due (2J) e tre (3J) legami sono quelli che di solito dominano la struttura iperfine degli spettri NMR, ma possono emergere anche accoppiamenti attraverso quattro e cinque legami, specialmente attraverso i legami π (doppi e tripli legami, carboni aromatici) o conformazioni di legame rigide (*W*). Nel caso più semplice (*weak coupling*), ogni gruppo di *n* protoni equivalenti genera *n*+1 segnali (separati della costante *J*) nei protoni ad esso accoppiati. In un generico gruppo CH_2-CH_3 , ad esempio, il segnale ^1H del CH_3 appare come un tripletto e quello del CH_2 come un quartetto (Fig. 3.4).

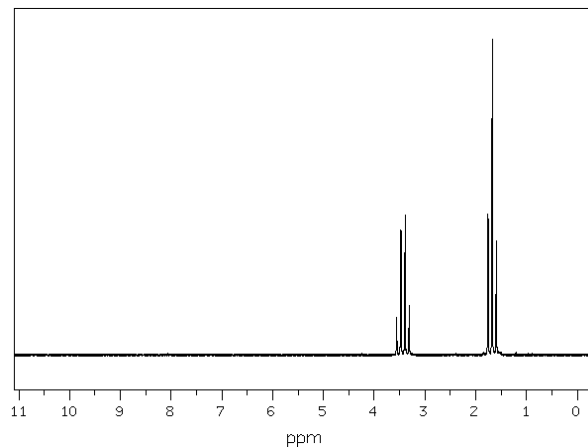


Figura 3.4 Spettro ^1H del bromoetano.

3.6. Soppressione del segnale dell' H_2O

I solventi usati nella spettroscopia NMR sono disponibili nella forma deuterata. Tuttavia, dato che l'obiettivo finale è quello di usare un campione di urina senza pretrattamenti, è opportuno eseguire gli studi preliminari in H_2O con aggiunta 5-10% di D_2O per generare un segnale di riferimento (*lock*). Considerato che l' H_2O è 110 M in protoni e la concentrazione delle catecolamine nell'urina è dell'ordine del micro-molare, è necessario usare delle sequenze in grado di attenuare il segnale troppo intenso dell' H_2O .

La capacità di uno spettrometro NMR di registrare i segnali deboli in presenza di segnali intensi dipende infatti dal *range dinamico* del convertitore analogico-digitale (ADC): quando la maggior parte di questo *range* è impiegato per digitalizzare i segnali più intensi, i segnali più deboli possono cadere al di sotto del limite di rilevabilità.

Gli ADC a 16 bit dei moderni spettrometri NMR possiedono un *range* dinamico di 32767:1. Ciò implica che il più debole segnale rilevabile non può essere inferiore a circa 30 parti per milione rispetto al più intenso segnale di input. Anche se questa condizione limite dovesse essere soddisfatta, tuttavia, i segnali più deboli soffrirebbero comunque di una sotto-digitalizzazione e i loro integrali sarebbero poco accurati. A titolo di esempio si noti che una risoluzione digitale di un solo bit ridurrebbe un segnale qualsiasi ad una serie di rettangoli. Diversamente, amplificare il FID oltre il limite massimo imposto dall'hardware del convertitore analogico-digitale comporterebbe il "*clipping*" (o saturazione) del FID stesso, con conseguente distorsione del segnale digitalizzato. Questa situazione è del tutto

analoga a quella di un altoparlante che riceva dall'amplificatore un segnale eccedente la propria potenza nominale.



Figura 3.5 (a) FID acquisito correttamente, (b) FID acquisito con eccessiva amplificazione

A questo punto appare chiaro come la soppressione dei segnali più intensi permetta di ricalibrare l'intero *range* dinamico a vantaggio dei segnali più deboli, ottenendo per essi una miglior digitalizzazione, errori di integrazione più piccoli e, in ultima analisi, una loro più accurata quantificazione.

Un ulteriore vantaggio nel sopprimere i segnali intensi sta nel fenomeno del *radiation damping*, che porta ad un indesiderato allargamento del segnale del solvente stesso, il quale potrebbe a sua volta mascherare le risonanze degli analiti. Ciò è dovuto al fatto che l'elevata intensità del segnale NMR prodotto dagli spin dell' H_2O , ad esempio, genera una forte corrente a radiofrequenza nella bobina di detection, e questa corrente a sua volta genera un campo a radiofrequenza che riporta la magnetizzazione dell' H_2O verso l'equilibrio accelerando il processo di rilassamento e producendo un segnale più largo.

L'obiettivo della soppressione del solvente è pertanto quello di ridurre la magnetizzazione del solvente prima che il segnale raggiunga il ricevitore. A tale scopo gli approcci più usati sono:

- metodi che saturano la risonanza dell'acqua
- metodi che defasano selettivamente i segnali dell' H_2O tramite l'uso di gradienti di campo magnetico (Pulse field gradients (PFGs))

La tecnica utilizzata in questo lavoro si basa principalmente sull'utilizzo di *pulsed field gradient spin echoes* (PFGSEs) di tipo G_1 -S- G_1 dove entrambi i gradienti G sono applicati nello stesso senso. L'elemento S, nel nostro caso un cluster di impulsi di tipo W5, è scelto in maniera da causare una rotazione nulla della magnetizzazione del solvente e una rotazione di 180° nel resto dello spettro.

Ciò fa sì che la magnetizzazione del solvente sperimenti uno sfasamento cumulativo per effetto dei due gradienti, portando alla sua soppressione, mentre tutte le altre risonanze vengono rifasate dal secondo gradiente.

Se l'elemento S è un impulso selettivo che copre una determinata banda spettrale è possibile rifocalizzare solo i segnali che cadono all'interno di questa banda, escludendone i segnali esterni (tra cui ad esempio quelli del solvente). Si realizza in questo modo un esperimento "band selective".

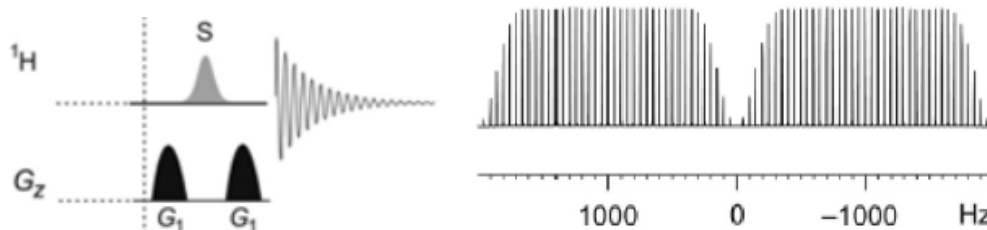


Figura 3.6 Sinistra: schema di soppressione del solvente *pulsed field gradient spin echo* (PFGSE), destra: profilo di eccitazione tipico di un modulo PFGSE dove S è un cluster di impulsi di tipo W5. Quando la risonanza del solvente si trova in corrispondenza dell'offset pari a zero il suo segnale viene soppresso.

3.7. Sequenze di singolo e doppio spin-eco

Una possibile difficoltà con le sequenze PFGSE è che la fase della magnetizzazione che emerge da queste sequenze dipende in generale dalle proprietà dell'impulso di 180° ed in modo particolare dall'offset rispetto alla frequenza centrale dell'impulso stesso; tale difficoltà viene superata usando due blocchi PFGSE in serie (Figura 3.7b) per formare un *doppio* PFGSE (DPFGSE).

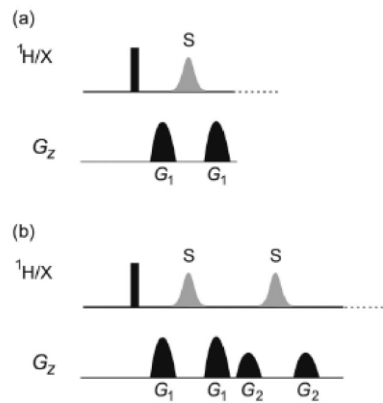


Figura 3.7 Schemi delle sequenze di impulsi PFGSE **(a)** e DPFGE **(b)**. Gli impulsi di 180° tra le coppie di gradienti possono essere resi selettivi per eccitare o escludere una ristretta banda spettrale.

È importante notare che le sequenze che includono gradienti di campo magnetico possono portare ad un leggero riscaldamento del campione, ed è quindi importante effettuare delle pre-scansioni “a vuoto” (*dummy scans*) per equilibrare il campione quando si registrano gli spettri.

Un problema tipico delle sequenze DPFGE è dovuto al fatto che uno *spin echo* rifocalizza la magnetizzazione associata al chemical shift ma non quella associata all'accoppiamento scalare, il quale continua ad evolvere introducendo delle modulazioni in antifase dei segnali.

È possibile rimuovere le distorsioni causate dagli accoppiamenti scalari incorporando un impulso di 90° tra i due *spin echo*. Formalmente il ruolo dell'impulso a 90° è quello di scambiare alcune coerenze che si generano tra gli spin accoppiati. L'esperimento risultante è detto *Double Pulse Field Gradient “Perfect” echo* (DPFGPE) e verrà utilizzato negli esperimenti di tecniche di *saturation transfer difference*.

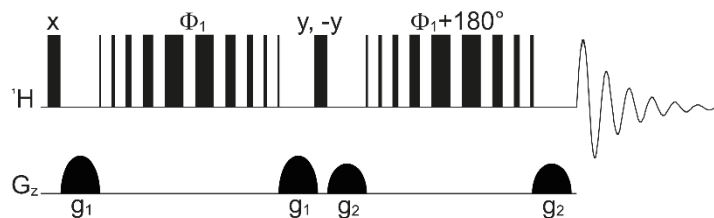


Figura 3.8. Schemi della sequenza di impulsi DPFGE con cluster W5

4. Origine del rilassamento NMR

Nel contesto della risonanza magnetica nucleare, il rilassamento è il processo che riporta la magnetizzazione macroscopica all'equilibrio in seguito ad una perturbazione. Il fenomeno del rilassamento NMR è particolarmente lento (nell'ordine dei secondi) se paragonato ad altri tipi di spettroscopie, caratteristica che lo rende relativamente facile da misurare sperimentalmente. Inoltre, poiché questo fenomeno è guidato dal moto delle molecole, è possibile usare il rilassamento come probe per lo studio della dinamica molecolare in soluzione. Una delle manifestazioni più importanti del rilassamento NMR è il *Nuclear Overhauser Effect* (NOE).

4.1. Campi magnetici locali

Come già spiegato nella sezione generale a proposito del modello vettoriale, ogni spin possiede un momento magnetico associato. Il modello vettoriale descrive il comportamento medio della popolazione di questi momenti magnetici, da cui trae origine la magnetizzazione macroscopica.

Si considerino ora due spin $\frac{1}{2}$ come quelli di due nuclei A e B separati tra loro da un legame chimico (ad es. $^{13}\text{C}-^1\text{H}$): il momento magnetico associato allo spin A, genera un piccolo campo magnetico che viene sperimentato dallo spin B e viceversa. La direzione e l'ampiezza di questo campo locale varia a seconda della distanza e dell'orientazione reciproca tra i due spin. Il rilassamento dipolare è causato da questi campi locali che sono attivi solo su brevi distanze (tipicamente minori di 4 Å). Più in generale, ogni spin nel campione sperimenta un campo magnetico locale che è generato dagli spin direttamente vicini ad esso.

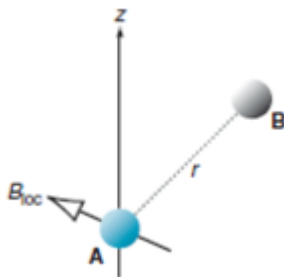


Figura 4.1 Schematizzazione del campo locale generato dal momento magnetico associato allo spin A sullo spin B.

Se assumiamo che questi campi locali varino in modo casuale in ampiezza ed in orientazione, ci si aspetta che la magnetizzazione lungo l'asse z venga mediata a zero. Infatti, se i campi magnetici locali operano in modo casuale e ad intervalli casuali, dopo un tempo sufficientemente lungo i momenti magnetici degli spin saranno orientati casualmente. Quello che si osserva invece è che all'equilibrio e in presenza in un campo magnetico esterno B_0 esiste una magnetizzazione netta lungo l'asse z, la cui origine è di tipo termodinamico.

Immaginiamo infatti di aumentare l'energia di uno degli spin, ovvero di ruotarlo lontano dal campo magnetico statico B_0 e che l'energia necessaria per fare ciò provenga dall'ambiente circostante (in altre parole dai moti "termici" nel campione). Se lo spin passa ad uno stato ad energia maggiore significa che qualcosa nell'ambiente circostante è passato ad uno stato energetico minore, al contrario se uno spin perde energia questa verrà ceduta all'ambiente circostante. I due processi (assorbimento e cessione di energia) tuttavia non sono ugualmente probabili. Possiamo infatti immaginare l'ambiente circostante come costituito da una serie di livelli energetici in cui, per la distribuzione di *Boltzman*, i livelli più popolati sono quelli a più bassa energia, e per questa ragione è più probabile che l'ambiente circostante assorba energia piuttosto che la ceda. La conseguenza di questo è che, quando si raggiunge l'equilibrio, la magnetizzazione lungo z è diversa da zero.

4.2. Origine dei campi locali

Il campo magnetico generato da uno spin è sperimentato da un secondo spin per interazione dipolare. Il modulo di questa interazione varia in modo inversamente proporzionale al cubo della distanza tra i due nuclei ed in maniera proporzionale al prodotto dei rapporti giromagnetici γ dei due nuclei coinvolti.

$$\gamma_1\gamma_2/r^3 \quad (4.1)$$

Questo meccanismo risulta essere la fonte di rilassamento dominante nei campioni NMR in soluzione. Altre fonti di campi locali fluttuanti sono date data *dall' anisotropia di chemical shift* ed eventualmente dalla presenza di specie paramagnetiche, nelle quali gli elettroni spaiati generano intensi campi locali. In questo contesto è bene ricordare che la molecola di ossigeno è paramagnetica e la sua presenza (soprattutto in solventi organici) può essere una notevole (e indesiderata) fonte di rilassamento di spin.

4.3. Descrizione del moto casuale

La condizione necessaria affinché ci sia rilassamento di spin è la presenza di campi locali trasversali oscillanti alla frequenza di *Larmor*. In soluzione, il tipo di moto che fornisce una variazione dei campi locali alla giusta frequenza sono le collisioni molecolari. Ciascuna collisione altera l'orientazione delle molecole di una piccola quantità, e questo fenomeno è descritto dal tempo di correlazione rotazionale τ_c , ovvero dal tempo medio che una molecola impiega a ruotare di un radiante. Indirettamente, il tempo di correlazione descrive quindi la scala temporale del moto casuale delle molecole.

Il tempo di correlazione rotazionale τ_c è un parametro della funzione di correlazione così descritta:

$$G(\tau) = \overline{B_{loc}^2} \exp(-|\tau|/\tau_c) \quad (4.2)$$

dove B_{loc} è l'ampiezza della fluttuazione del campo locale. Questa funzione misura la "persistenza" delle fluttuazioni casuali e, in casi ideali, essa assume la forma di un decadimento esponenziale.

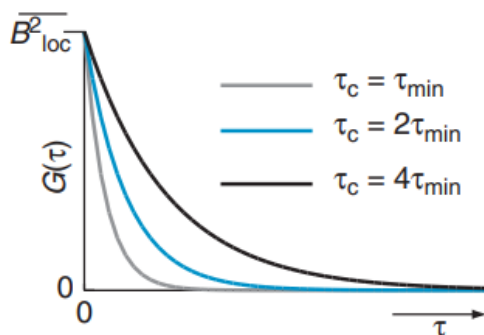


Figura 4.2 Grafico della funzione di correlazione rotazionale in forma esponenziale per tre diversi valori di τ_c .

Si nota che il decadimento della funzione di correlazione rallenta all'aumentare del tempo di correlazione. La parte esponenziale della funzione di correlazione è indipendente dalla fonte dei campi magnetici locali, i quali determinano l'ampiezza del decadimento attraverso il termine B_{loc}^2 .

4.4. Densità spettrale

L'importanza di aver definito la funzione di correlazione $G(\tau)$ sta nel fatto che la sua trasformata di Fourier è la funzione densità spettrale $J(\omega)$, che descrive la quantità di perturbazione (B_{loc} nel nostro caso) disponibile ad una particolare frequenza ω .

Nel caso della funzione di correlazione definita in precedenza si ha che

$$\overline{B_{loc}^2} \exp(-|\tau|/\tau_c) \xrightarrow{FT} \overline{B_{loc}^2} \frac{2\tau_c}{1 + \omega^2\tau_c^2} \quad (4.3)$$

$$J(\omega) = \overline{B_{loc}^2} \frac{2\tau_c}{1 + \omega^2\tau_c^2} \quad (4.4)$$

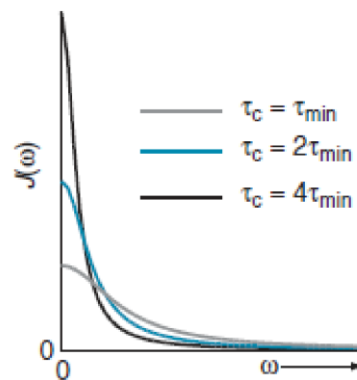


Figura 4.3 Grafico della funzione densità spettrale, $J(\omega)$ per tre diversi valori di τ_c . Da notare che più τ_c diminuisce, più aumenta la frequenza alla quale la funzione $J(\omega)$ si estende

Il massimo della funzione $J(\omega)$ si ha a frequenza 0, e la funzione diminuisce all'aumentare della frequenza. Inoltre più il tempo di correlazione è piccolo (più velocemente le molecole si muovono) maggiore è la densità spettrale ad alta frequenza.

Definita la densità spettrale alla frequenza di Larmor come:

$$J(\omega_0) = \overline{B_{loc}^2} \frac{2\tau_c}{1 + \omega_0^2\tau_c^2} \quad (4.5)$$

È possibile distinguere due casi limite:

1. regime di *fast motion*, ovvero per $\omega_0\tau_c \ll 1$, caso tipico delle soluzioni non viscosi e di molecole piccole, dove:

$$j(\omega_0) = 2\tau_c \quad (4.6)$$

Ciò significa che nel limite di *fast motion* la funzione densità spettrale è indipendente dalla frequenza

2. regime di *slow motion*, ovvero per $\omega_0 \tau_c \gg 1$, dove:

$$J(\omega_0) = \frac{2}{\omega_0^2 \tau_c} \quad (4.7)$$

Tipicamente piccole molecole possiedono un tempo di correlazione di circa 10 ps e quindi ricadono all'interno del regime di *fast motion*, mentre piccole proteine possiedono un tempo di correlazione di circa 10 ns, e pertanto cadono nel regime di *slow motion*.

Riassumendo quanto detto finora, il processo di diffusione rotazionale, che non è altro che una riorientazione casuale delle molecole, fornisce un moto alla giusta scala temporale per indurre rilassamenti NMR.

Si può caratterizzare la diffusione rotazionale attraverso un tempo di correlazione, da cui è possibile scrivere la densità spettrale per una particolare frequenza ω .

Per avere rilassamento longitudinale è necessario avere densità spettrale alla frequenza di *Larmor*, e questa quantità è massima quando il tempo di correlazione è pari al reciproco della frequenza di *Larmor*.

4.5. Rilassamento di spin

Nel caso di un singolo spin è possibile dimostrare che il rilassamento della sua magnetizzazione verso l'equilibrio è descritto dalla seguente equazione differenziale:

$$\frac{dM_z(t)}{dt} = -\frac{1}{T_1} [M_z(t) - M_z^0] \quad (4.8)$$

dove T_1 è il tempo del rilassamento longitudinale. È possibile integrare l'equazione precedente usando diversi valori di M_z al tempo $t = 0$, ottenendo la famiglia di curve in figura 4.4

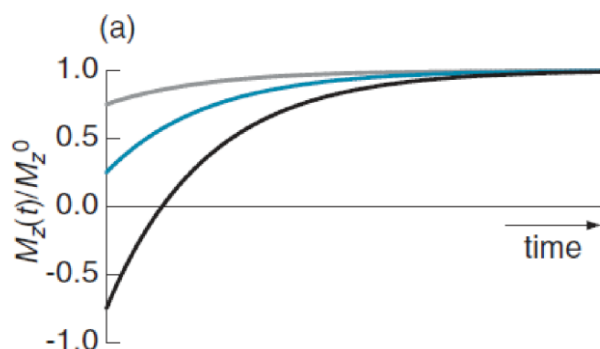


Figura 4.4 Andamento del rilassamento longitudinale in condizioni iniziali diverse e a parità di R_z

4.6. Origine del NOE (*Nuclear Overhauser Effect*)

Per la descrizione del rilassamento longitudinale in un sistema omonucleare costituito da due spin è stato sviluppato un set di equazioni meglio note come equazioni di *Solomon*.

Nella loro formulazione tipica queste equazioni vengono scritte come:

$$\frac{dI_{1z}}{dt} = -R_z^{(1)}(I_{1z} - I_{1z}^0) - \sigma_{12}(I_{2z} - I_{2z}^0) \quad (4.9)$$

$$\frac{dI_{2z}}{dt} = -\sigma_{12}(I_{1z} - I_{1z}^0) - R_z^{(2)}(I_{2z} - I_{2z}^0) \quad (4.10)$$

Il termine R_z^1 descrive la velocità di *self relaxation* della magnetizzazione spin 1, ovvero la costante di velocità con cui la magnetizzazione I_{1z} tende ritornare all'equilibrio. In modo simile il termine R_z^2 descrive la velocità di *self relaxation* dello spin 2. Il termine σ_{12} descrive la velocità alla quale la magnetizzazione dallo spin 1 è trasferita per rilassamento allo spin 2. Questo trasferimento della magnetizzazione longitudinale mediato dal rilassamento da uno spin a un altro è chiamato *cross-relaxation* ed è responsabile dell'effetto *Overhauser* nucleare (NOE).

Qualitativamente, le equazioni di *Solomon* evidenziano il fatto che, se abbiamo due spin non isolati, ogniqualvolta la magnetizzazione dello spin 1 è portata fuori dall'equilibrio quella dello spin 2 risponde con una polarizzazione e viceversa.

Quantitativamente, i termini R_z^1 , R_z^2 e σ_{12} sono combinazioni lineari di densità spettrali:

$$R_z^{(1)} = b^2 \left[\frac{3}{20} j(\omega_{0.1}) + \frac{3}{10} j(\omega_{0.1} + \omega_{0.2}) + \frac{1}{20} j(\omega_{0.1} - \omega_{0.2}) \right] \quad (4.11)$$

$$R_z^{(2)} = b^2 \left[\frac{3}{20} j(\omega_{0.2}) + \frac{3}{10} j(\omega_{0.1} + \omega_{0.2}) + \frac{1}{20} j(\omega_{0.1} - \omega_{0.2}) \right] \quad (4.12)$$

$$\sigma_{12} = b^2 \left[\frac{3}{10} j(\omega_{0.1} + \omega_{0.2}) - \frac{1}{20} j(\omega_{0.1} - \omega_{0.2}) \right] \quad (4.13)$$

dove $b = \frac{\mu_0 \gamma_1 \gamma_2 \hbar}{4\pi r^3}$ è un termine che dipende dalla distanza r tra gli spin.

La costante σ_{12} che descrive la *cross relaxation* può assumere valori positivi o negativi a seconda del regime dinamico che coinvolge i due spin: in particolare, nel caso del *fast motion limit* σ_{12} è positiva mentre nel caso dello *slow motion limit* σ_{12} è negativa.

4.7. Esperimenti NOE

L'equazione *di Solomon* per il comportamento della magnetizzazione dello spin 1 (I_{1z})

$$\frac{dI_{1z}}{dt} = -R_z^{(1)} (I_{1z} - I_{1z}^0) - \sigma_{12} (I_{2z} - I_{2z}^0) \quad (4.14)$$

suggerisce che, per osservare un NOE tra i due spin, è necessario spostare la magnetizzazione dello spin 2 dall'equilibrio e osservare quello che succede allo spin 1. Se non si osserva alcuna polarizzazione del segnale dello spin 1 significa che i due protoni non sono accoppiati dipolarmente (perché troppo distanti) o che il regime di *tumbling* è tale per cui $\sigma_{12}=0$.

A seconda che venga effettuata un'inversione o una saturazione dello spin 2 si distinguono due esperimenti principali, rispettivamente detti *transient* e *steady-state* NOE.

4.7.1. Esperimento NOE transiente

La magnetizzazione dello spin 2 viene selettivamente invertita e, dopo un certo intervallo di tempo, si rileva la magnetizzazione di entrambi gli spin con un impulso di 90°. Allo spettro ottenuto da questo esperimento si sottrae uno spettro all'equilibrio per meglio evidenziare eventuali segnali NOE.

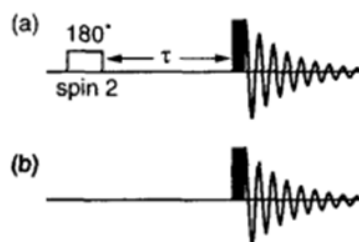


Figura 4.5 Schema dell'esperimento *transient NOE*. **(a)** perturbare lo spin 2 con un impulso selettivo di inversione - aspettare un tempo τ affinché il cross relaxation si possa verificare - impulso di 90° ed osservare lo spettro risultante. **(b)** ripetere l'esperimento senza impulso di inversione (spettro di riferimento). Fare la differenza tra lo spettro (a) e lo spettro (b) per rilevare cambiamenti di intensità sullo spin 1.

La traiettoria della magnetizzazione longitudinale durante un esperimento NOE transiente è rappresentata in figura 4.6 per i casi *fast* (A) e *slow* (B) *motion*.

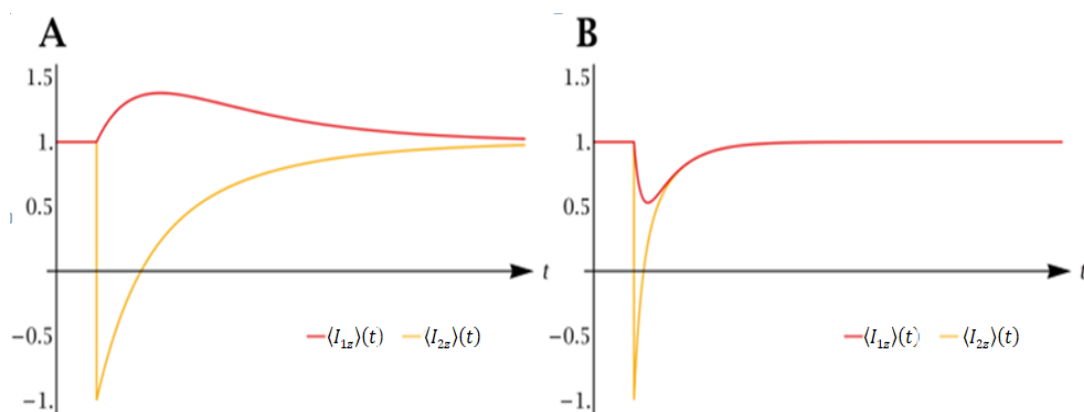


Figura 4.6 *Transient NOE* osservato in un sistema omonucleare AX in seguito ad una inversione selettiva dello spin 2. Le curve sono state ottenute attraverso simulazioni con SpinDynamica per due protoni in un campo magnetico di 11.74 T ($\omega_0 = -2\pi \cdot 500 \times 10^6 \text{ rad s}^{-1}$) separati da una distanza di 3Å.

A $\tau_c = 30 \text{ ps}$ ($\omega_0 \tau_c < 1$). *Extreme narrowing limit*

B $\tau_c = 1 \text{ ns}$ ($\omega_0 \tau_c > 1$). *Spin diffusion limit*

4.7.2. Esperimento *Steady state* NOE

La magnetizzazione dello spin 2 viene selettivamente saturata per un certo intervallo di tempo, trascorso il quale si rileva la magnetizzazione di entrambi gli spin con un impulso di 90°. Allo spettro ottenuto da questo esperimento si sottrae uno spettro all'equilibrio per meglio evidenziare eventuali segnali NOE.

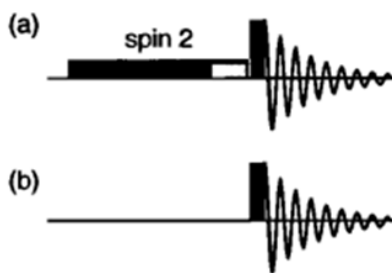


Figura 4.7 Schema dell'esperimento steady-state NOE. **(a)** Irradiare lo spin 2 con un impulso lungo per saturare lo spin 2 (I_{2z} va a 0) - attendere fino al raggiungimento dello steady state - impulso a 90° per osservare lo spettro risultante. **(b)** ripetere l'esperimento senza la saturazione. Fare lo spettro differenza

La traiettoria della magnetizzazione longitudinale durante un esperimento *steady state* NOE è rappresentata in Figura 4.8 per i casi *fast* (A) e *slow* (B) *motion*.

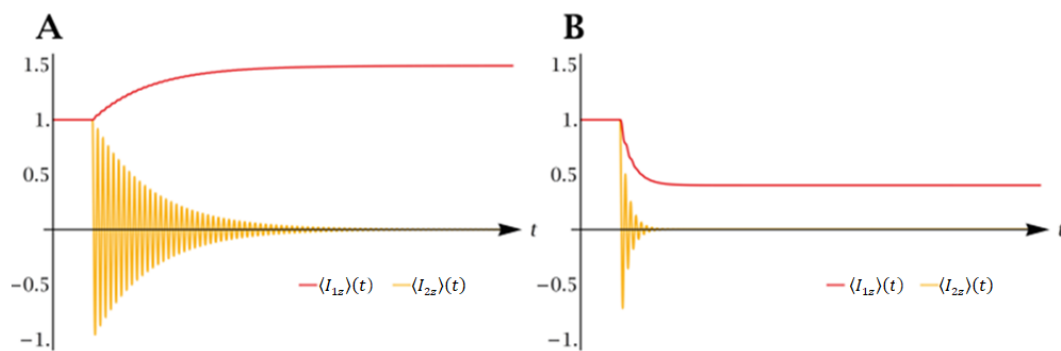


Figura 4.8. Steady-state NOE osservato in un sistema omonucleare AX in seguito a saturazione selettiva dello spin 2. Le curve sono state ottenute attraverso simulazioni con SpinDynamica per due protoni in un campo magnetico di 11.74 T ($\omega_0 = -2\pi 500 \times 10^6 \text{ rad s}^{-1}$) separati da una distanza di 3Å.

A $\tau_c = 30 \text{ ps}$ ($\omega_0 \tau_c < 1$). Extreme narrowing limit

B $\tau_c = 1 \text{ ns}$ ($\omega_0 \tau_c > 1$). Spin diffusion limit

Gli esperimenti utilizzati in questo lavoro, STD (*saturation transfer difference*) e wSTD (*water saturation transfer difference*), si basano sullo *Steady State* NOE.

5. Tecniche sperimentali NOE-based

5.1. Saturation Transfer Difference Spectroscopy

Gli esperimenti di Saturation Transfer Difference (STD) sono stati originariamente introdotti per la caratterizzazione di interazioni ligando proteina¹¹: l'idea di base è quella di sfruttare il trasferimento selettivo della saturazione della magnetizzazione dal recettore al ligando nella forma legata. In particolare, nell'STD il network di spin del recettore è saturato usando un treno di impulsi *shaped* per indurre uno steady-state NOE. L'STD richiede l'acquisizione di due esperimenti separati, un primo in cui il recettore viene saturato ed un secondo in cui l'impulso di saturazione viene spostato lontano dalla regione di interesse. Questo ultimo step ha come obiettivo quello di indurre lo stesso effetto termico sul campione senza andare ad influenzare la magnetizzazione all'equilibrio delle specie in soluzione. I ligandi interagenti con la nanoparticella sono rivelati sottraendo i due spettri: nello spettro differenza, infatti, appariranno solo i segnali degli analiti in soluzione in grado di interagire con il recettore, dato che solo questi hanno subito un trasferimento della saturazione.

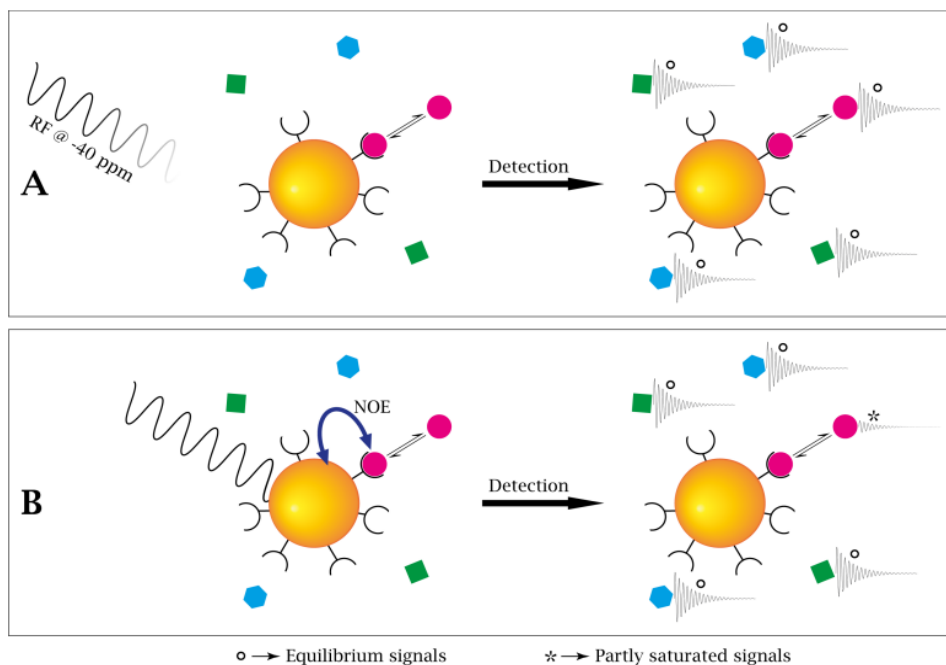


Figura 5.1 Rappresentazione ideale un esperimento di *Saturation Transfer Difference*. Un primo spettro è acquisito irradiando il campione fuori dalla regione spettrale di interesse (A) mentre un secondo viene raccolto spostando il treno di impulsi di saturazione in risonanza con il recettore (B). I ligandi interagenti vengono rilevati sottraendo i due spettri.

La sequenza di impulsi STD è riportata nella Figura 5.2. Questo comprende un treno di impulsi selettivi, seguito da un impulso hard di 90° prima dell'acquisizione. Dato che gli spettri *on* ed *off* sono acquisiti in maniera intervallata, è introdotto uno schema di trim prima del *relaxation delay* per equilibrare la magnetizzazione all'inizio di ciascuno scan.¹¹ Gli impulsi *shaped* sfruttati nell'STD sono particolarmente selettivi, dato che devono irradiare solo le risonanze relative agli spin della macromolecola ed evitare che il profilo di saturazione dell'impulso 'tocchi' le risonanze degli analiti in soluzione.

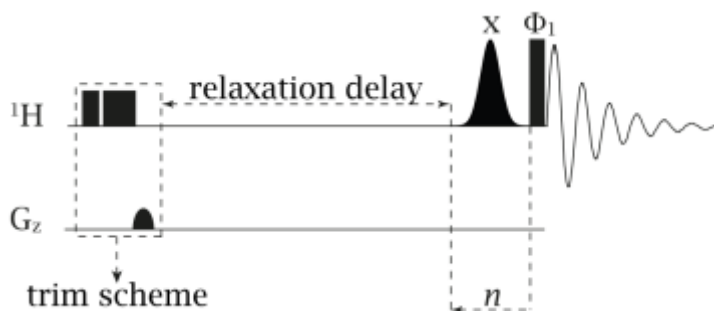


Figura 5.2 Sequenza di impulsi standard per un esperimento di Saturation Transfer Difference.

Dal profilo dell'impulso di saturazione (Figura 5.3) è evidente che solo una piccola porzione degli spin del recettore sono interessati direttamente dalla saturazione: tuttavia, se il recettore è sufficientemente grande, le interazioni dipolo-dipolo sono abbastanza forti da far sì che la saturazione venga propagata quasi istantaneamente a tutti gli spin della macromolecola per *spin diffusion*.

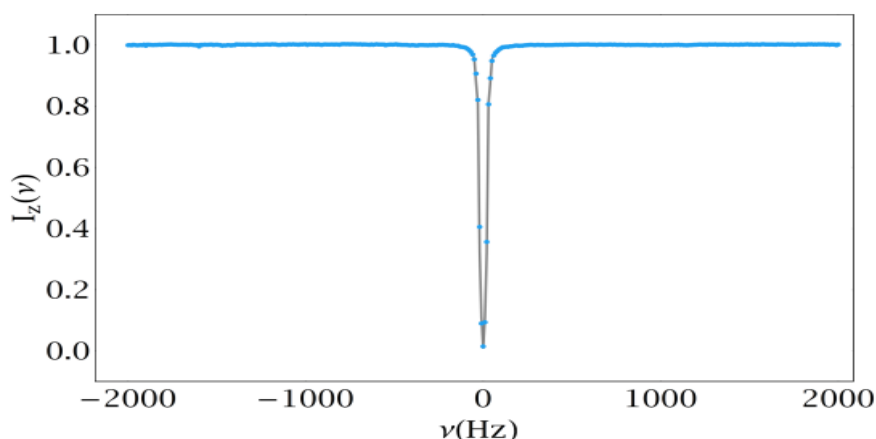


Figura 5.3 Profilo sperimentale di saturazione (punti azzurri) di un treno di 40 impulsi Gaussiani di 50 ms (1% di troncamento) e $\nu B_{1,max} = 24.3$ Hz (corrispondenti a una rotazione di 180°), simulazione con SpinDinamica dello stesso treno di impulsi (linea grigia).¹²

Nanoparticelle d'oro con core di diametro di circa 1,8 nm mostrano una efficienza di *spin diffusion* abbastanza elevata, i tioli che costruiscono il monostrato contengono uno spacer alchilico che fornisce un punto di partenza a bassi ppm per la propagazione della saturazione. Ciò nonostante, la presenza di discontinuità nel network delle interazioni dipolari nel monostrato, come ad esempio legami ammidici, potrebbe causare una diminuzione importante nell'efficienza del fenomeno della *spin diffusion*.

Pertanto, alcune parti del monostrato potrebbero non essere saturate a sufficienza ed un analita interagente potrebbe non essere rilevato perché il sito di legame non è in grado di trasferire saturazione. Ad ogni modo, quello che sembra essere una forte limitazione nell'STD *chemosensing* assistito da nanoparticelle può rivelarsi un vantaggio quando si vuole studiare le modalità di binding di una molecola con il recettore. Infatti se la *spin diffusion* è confinata ad una sola porzione del monostrato, è possibile dedurre come l'analita si lega alla nanoparticella andando a guardare quale segnale appare nello spettro STD al variare della zona del monostrato che viene irradiata. Tuttavia, questo approccio deve essere valutato con cura perché la saturazione potrebbe 'fuoriuscire' verso il resto del monostrato. Ad ogni modo la parte saturata delle nanoparticelle può essere facilmente rintracciata andando ad osservare quali segnali del recettore sono presenti nello spettro STD.^{13,14}

Il trasferimento di saturazione più intenso si osserva quando il treno di impulsi irradia il recettore molto vicino al sito di interazione, perché questa situazione massimizza la quantità di saturazione che viene trasferita all'analita interagente. Sfortunatamente, la scelta su dove irradiare il recettore è dettata più dalla necessità di non saturare le risonanze delle piccole molecole che dalla scelta della risonanza da irradiare per ottimizzare la propagazione della saturazione nel recettore per *spin diffusion*.

Una strategia comune per migliorare la sensibilità della tecnica e di conseguenza migliorare il limite di rilevamento consiste nell'applicare un impulso di saturazione con un profilo più largo. In questo modo, la quantità di spin che vengono direttamente 'toccati' dall'impulso di saturazione aumenta e la saturazione si può propagare a partire da un numero maggiore di 'punti'.

L'ampliamento della banda di saturazione è ottenibile, ad esempio, aumentando la potenza dell'impulso. Questo però comporta che se le risonanze degli analiti si trovano nelle vicinanze della risonanza irradiata, anche quest'ultimi verranno parzialmente saturati in modo diretto e ciò è all'origine dei falsi positivi.

5.2. Water-Mediated Saturation Transfer (wSTD)

L'esperimento STD richiede che almeno una risonanza del recettore sia isolata, dalla quale la saturazione può essere trasferita per spin diffusion a tutta la macromolecola. Non solo: affinché la saturazione possa essere trasferita attraverso l'intero network di spin del recettore è necessario che il meccanismo di *spin diffusion* sia molto efficiente, una condizione difficilmente ottenibile in AuNPs di circa 1,8 nm.

I problemi sopra elencati possono essere in parte alleviati dalla presenza di una fonte di magnetizzazione più intensa.

L'idea è quella di sfruttare le molecole di H₂O direttamente a contatto con il monostrato del recettore. Così come in soluzione la superficie delle proteine è circondata da molte molecole di H₂O con un tempo di residenza lungo,¹⁵ anche le nanoparticelle d'oro in soluzione possiedono molecole d'H₂O in associazione al monostrato¹⁶ che possono fornire una fonte aggiuntiva di magnetizzazione che può essere trasferita agli analiti interagenti.

Gli esperimenti in cui l'impulso di saturazione riguarda la risonanza dell'acqua sono chiamati WaterSTD.¹⁷ La sequenza di impulsi relativa consiste in un STD standard con un blocco addizionale W5 DPGSE-PE aggiunto prima dell'acquisizione del segnale con lo scopo di sopprimere il segnale dell'acqua.

La maggior parte dei problemi di questo esperimento consiste nello sviluppo di NOE positivo sui segnali di tutti gli analiti in soluzione (la frazione libera degli analiti interagenti e il 100% degli analiti non interagenti). In particolare, l'*enhancement* negativo sperimentato dalla frazione legata dei substrati interagenti è controbilanciata dal NOE positivo agente sulla loro frazione libera.

Per le ragioni appena discusse il rapporto segnale rumore delle risonanze rilevate utilizzando il waterSTD non è migliore di quello osservato con gli esperimenti STD, tant'è che quest'ultimo risulta spesso una scelta migliore nella pratica, dato che solo le specie interagenti appaiono nello spettro differenza.

Esiste tuttavia la possibilità di aggirare questo problema attraverso l'adozione di un impulso di saturazione ad alta potenza. I due grafici A e C in Figura 5.4 si riferiscono allo steady state NOE *nell'extreme narrowing limit* e nel *diffusion limit* quando un impulso a bassa potenza è usato per saturare uno spin S.

Allo stesso modo, i grafici B e D riportano l'evoluzione della magnetizzazione longitudinale dello spin I e dello spin S quando è applicato un impulso di saturazione ad alta potenza. Ciò che si nota è che, se la potenza dell'impulso è aggiustata opportunamente, è possibile riportare verso l'equilibrio la

magnetizzazione longitudinale dello spin I nel solo caso di spin nel regime di *extreme narrowing*, con invece un solo piccolo impatto sugli spin legati (che si trovano nel regime di *spin diffusion*).

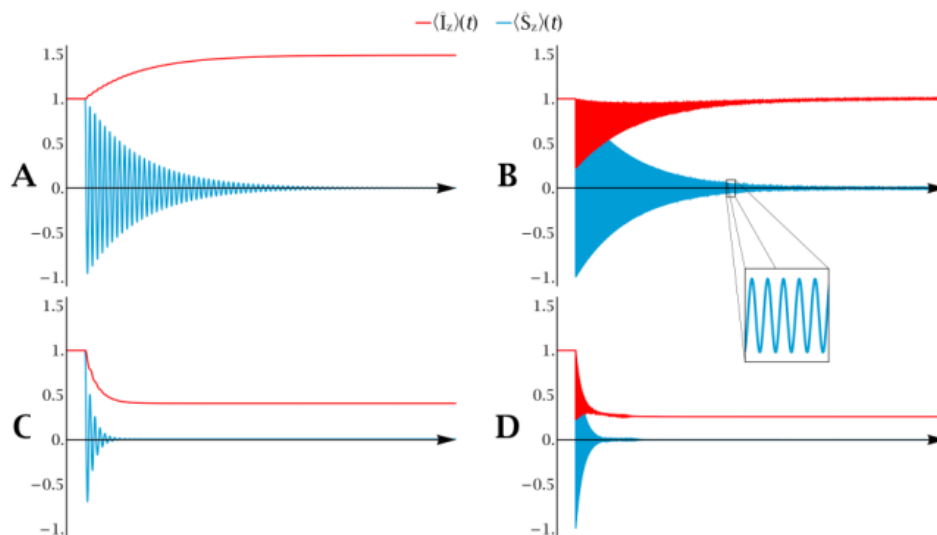


Figura 5.4 FD: Simulazione in SpinDynamica che illustra l'evoluzione della componente z della magnetizzazione per un sistema di due spin I e S accoppiati da interazione dipolare dopo aver saturato gli spin S utilizzando una radiazione a bassa potenza (A e C) e una ad alta potenza (B e D). Gli spin sono separati da 3Å e le molecole a cui appartengono hanno τ_c di 30 ps (A e B regime di fast tumbling) e di 1 ns (C e D, regime di slow tumbling). Il campo magnetico esterno è di 11.74 T (corrispondente a 500 MHz). Le tracce rosse in B e D sono calcolate per un offset di 1 kHz dalla frequenza di saturazione.¹⁷

Per razionalizzare questo fenomeno, è stato proposto un modello¹² per replicare l'effetto osservato allo *steady state* in presenza di irraggiamento ad alta potenza. La figura 5.5 riporta l'evoluzione della magnetizzazione longitudinale in un sistema di spin AX, in cui lo spin I e lo spin S sono separati da una distanza di 3 Å. Nei calcoli la popolazione dello spin S è equalizzata da un campo a radiofrequenza B_1^S . Sono state ripetute simulazioni a differenti valori del campo a radiofrequenza secondario B_1^I agente sulla risonanza dello spin I, per replicare l'effetto del campo 'leaked' nel treno di impulsi ad alta potenza. Come si può vedere esiste un valore critico di B_1^I che riporta la magnetizzazione dello spin I all'equilibrio. Pertanto, nell'esperimento High-Power waterSTD il contributo dello spin I nello stato "libero" è cancellato dalla sottrazione dello spettro di riferimento. Dall'altra parte lo stato della magnetizzazione dello stesso spin nel regime di *slow tumbling* non è influenzato da nessuna delle intensità di B_1^I esplorate. È evidente che l'uso di un protocollo High-Power può dare vita a falsi positivi, dato che il profilo dell'impulso di saturazione è più largo, ma questo

fenomeno può essere evitato calibrando la potenza dell'impulso di saturazione usando un campione contenente la miscela da analizzare senza il recettore e ripetendo l'esperimento finché non sono presenti segnali nello spettro differenza.

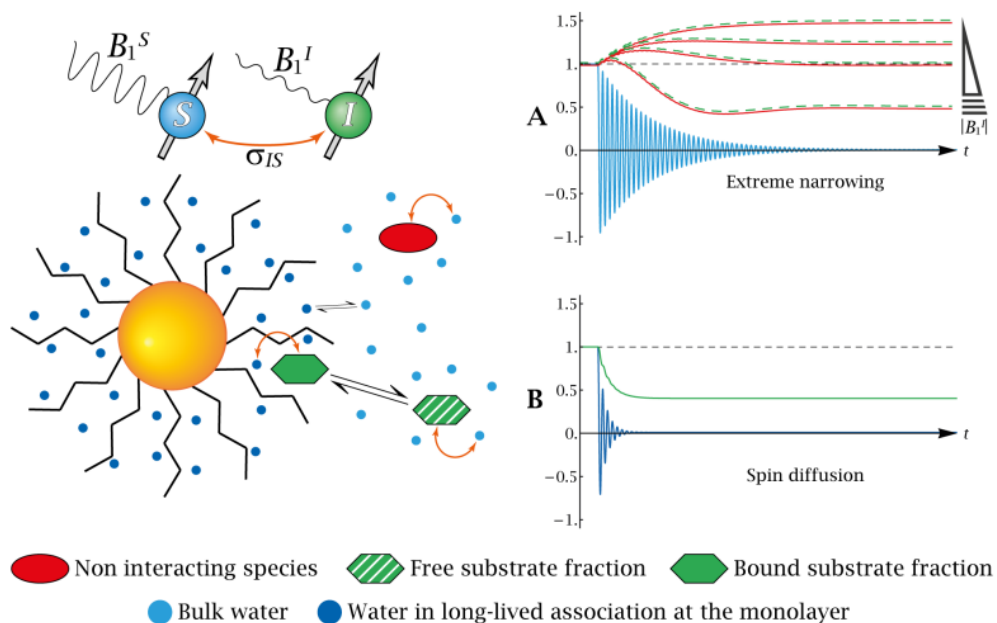


Figura 5.5 Rappresentazione schematica di diversi livelli di potenza dell'impulso di saturazione in un esperimento wSTD.¹²

6. Risultati e Discussione

È già stata chiarita nell'introduzione quale sia l'importanza diagnostica delle catecolamine e dei suoi derivati nelle urine nel contesto del neuroblastoma. Detto ciò, non è ovviamente possibile applicare consapevolmente le tecniche di *chemosensing* NMR su un campione reale di urina senza prima aver condotto uno studio preliminare su campioni semplificati, nei quali osservare i punti di forza ed i limiti della tecnica.

È interessante iniziare la discussione analizzando visivamente lo spettro ^1H NMR di un campione di urina di un soggetto sano (Figura 6.1).¹⁸

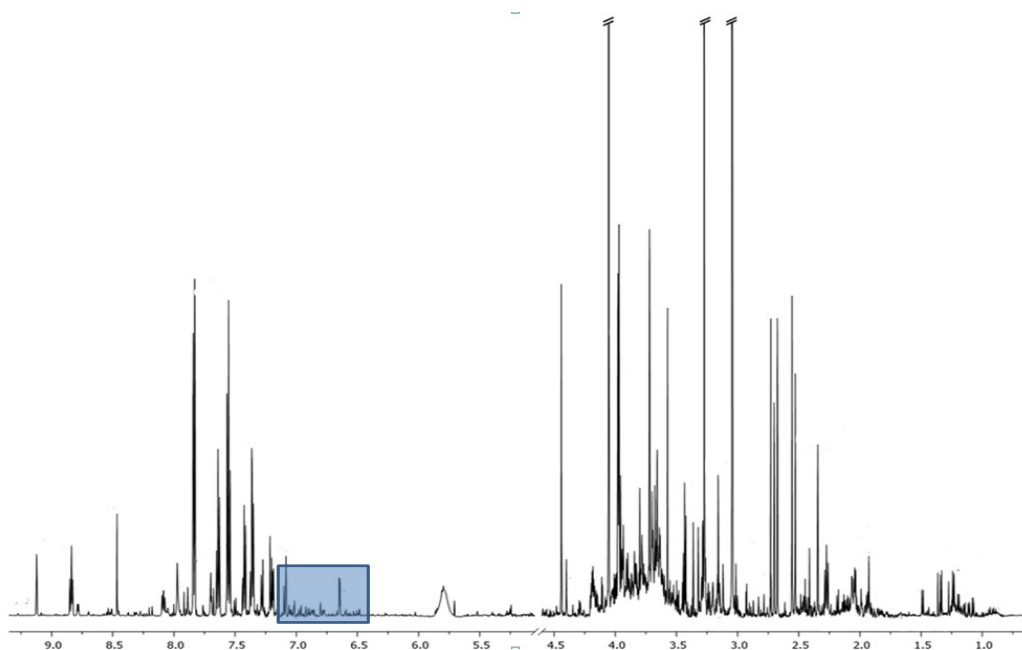


Figura 6.1 Spettro ^1H CPMG con soppressione dell' H_2O di un campione di urina proveniente da un soggetto sano. L'esperimento ^1H con filtro CPMG è una sequenza che sfrutta un treno di impulsi di 180° che consente alla magnetizzazione trasversale di essere continuamente rifocalizzata.

Ciò che appare immediatamente evidente è l'elevatissimo numero di segnali presenti e conseguentemente la sovrapposizione tra i segnali stessi, i quali derivano da numerosi metaboliti (a titolo di esempio l'*Urine Metabolome Database* raccoglie informazioni relative a circa 3100 metaboliti).¹⁹ Questa caratteristica dei fluidi biologici e più in generale delle miscele complesse rende fondamentalmente impossibile l'assegnazione univoca dei segnali e pertanto una chiara identificazione delle singole molecole presenti in soluzione. Il problema della sovrapposizione, però, risulta fortemente attenuato nella regione spettrale da 7.0 a 6.5 ppm dove, inoltre, non sono presenti segnali particolarmente intensi. Questa osservazione rappresenta un fondamentale punto di partenza nella trattazione del problema, dato che la frequenza di risonanza degli spin relativi ai

protoni aromatici dei metaboliti in studio cade proprio all'interno di questo range spettrale, come mostra la Figura 6.2.

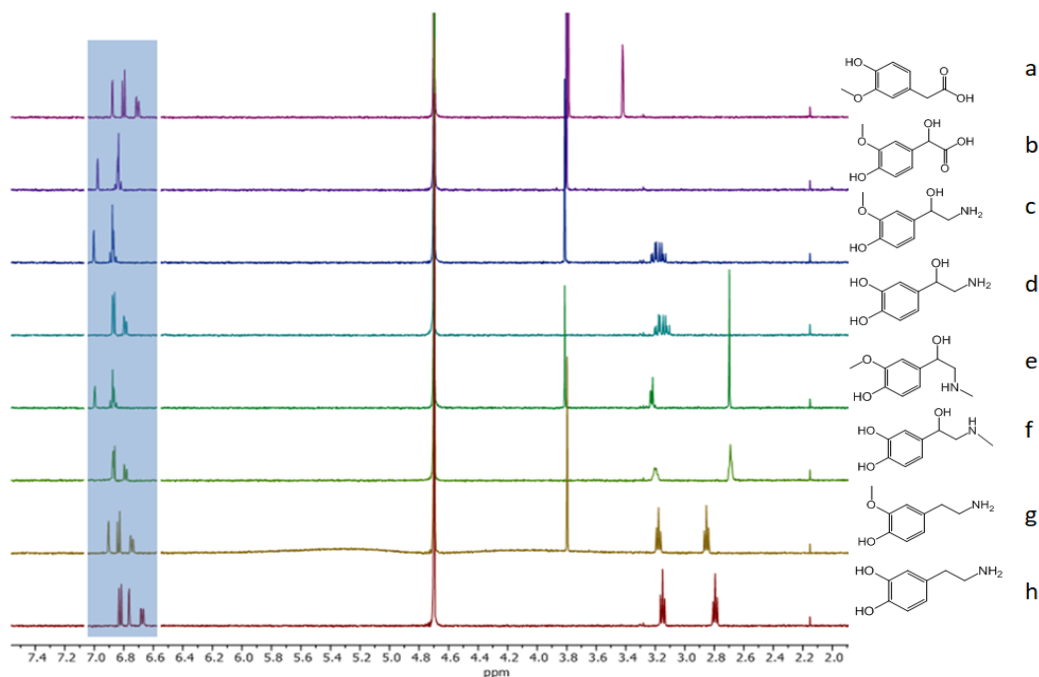


Figura 6.2 Spettro ^1H W5 (500 MHz, 25 °C, 90% H_2O 10% D_2O) 128 ns. **(a)** Acido Omovanillico (HVA) 100 μM , **(b)** Acido Vanilmandelico (VMA) 100 μM , **(c)** Normetanefrina (NORME) 100 μM , **(d)** Norepinefrina (NORE) 100 μM , **(e)** Metanefrina (META) 100 μM , **(f)** Epinefrina (EPI) 100 μM , **(g)** 3-metossitiramina 3-MT 100 μM , **(h)** Dopamina (DOPA) 100 μM

Nell'ipotesi che il nano-recettore selezionato presenti una buona selettività per la classe di molecole in analisi, ci sono buone possibilità di poter rilevare ed identificare queste ultime tramite spettroscopia STD. Tuttavia esiste un problema di sovrapposizione intrinseco a questa classe di molecole, dato che gli analiti condividono buona parte della struttura molecolare, soprattutto a livello dell'anello aromatico.

6.1. Scelta del recettore

L'evoluzione dei sistemi biologici ha portato alla formazione nelle proteine di siti di riconoscimento altamente sofisticati, usando principalmente L-amminoacidi come *building blocks*.

Su tale presupposto, sono stati scelti dei tioli basati su oligopeptidi per la funzionalizzazione di nanoparticelle d'oro di circa 1.8 nm di diametro, una dimensione adatta per applicazioni di *NMR chemosensing*. La 3-MT (**g**), scelta come modello tra gli analiti di interesse, a pH fisiologico possiede il gruppo amminico in forma protonata e può quindi sfruttare un'interazione ionica nei confronti di un recettore. A tale scopo è stata inserita una carica negativa sulla porzione più esterna del ligando attraverso l'inclusione di un aspartato come amminoacido terminale. Il posizionamento della carica ad una estremità della catena consente di sfruttare la porzione interna del tiolo per una ulteriore interazione con la parte più idrofobica dell'analita. La carica, inoltre, aumenta la solubilità in H₂O della nanoparticella.

Due ulteriori amminoacidi sono stati inclusi prima di quello terminale, ed il tripeptide risultante è stato unito al core d'oro attraverso un linker tio-alchil-ammidico che, in precedenti lavori, si è dimostrato efficace per la stabilizzazione delle nanoparticelle.

Sulla base di uno screening basato su simulazioni di dinamica molecolare (a cura del gruppo del Dr. De Vivo, IIT Genova) si è individuato il seguente candidato con affinità maggiore per 3-MT.

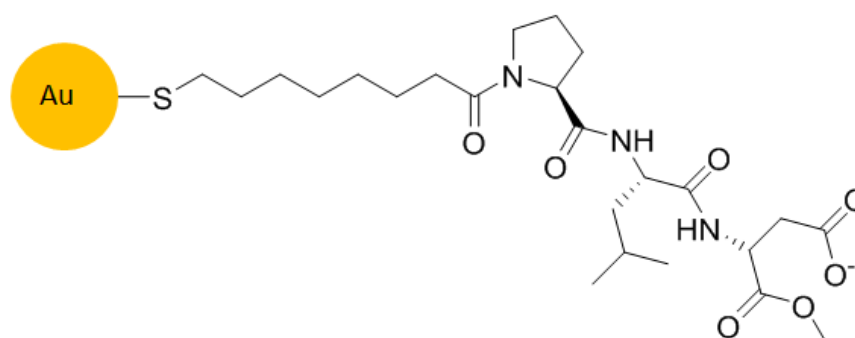


Figura 6.3. Candidato con maggiore affinità per la 3-MT. Il tiolo è costituito da un linker alchilico ad 8 atomi di carbonio a cui è legato un tripeptide: prolina, leucina ed un aspartato terminale.

Il quadro generale che emerge da questi studi è che la flessibilità conformazionale del monolayer può portare alla formazione di tasche transienti con la parte interna costituita dalle catene alchiliche ed i bordi costituiti dai gruppi funzionali inseriti nel tiolo. Tale struttura suggerisce che queste nanoparticelle avranno alta affinità per molecole con carica positiva e con una porzione idrofobica, potendo esse beneficiare sia delle interazioni con la parte superiore sia con la cavità interna della tasca.

Nel caso specifico degli otto metaboliti che si stanno considerando, ci si aspetta pertanto che il sistema mostri selettività per quelli che contengono una carica positiva.

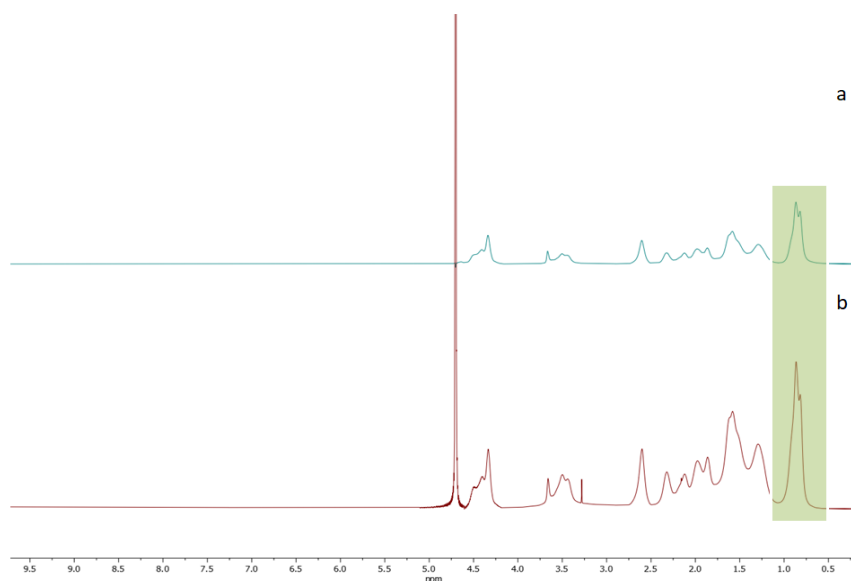


Figura 6.4 (a) Filtro di diffusione nanoparticella in D_2O (b) Spettro 1H nanoparticella in D_2O . È stato evidenziato in verde il picco che corrisponde ai protoni del linker tioalchilammidico, e che viene usato come centro dell'impulso di saturazione nell'STD. Gli NH non sono visibili perché i campioni sono in D_2O .

Il primo passo è quello di testare la selettività predetta dalle analisi di simulazione di dinamica molecolare.

6.2. Valutazione della selettività basata sul trasferimento della saturazione

Lo spettro della Figura 6.5a, cioè l'high power water STD (HPwSTD), mostra che la 3-MT viene riconosciuta efficacemente dalla nanoparticella. Le misure sono state fatte in HEPES 1 mM per garantire che i metaboliti e la nanoparticella vengano tamponati in modo efficace ed a pH=7 per simulare il pH delle urine, anche se potrebbe essere limitativo definire un valore univoco dato che la letteratura considera come 'normale' il range da 4.5 ad 8.0.²⁰ Lo spettro W5 (Figura 6.5b) serve da guida per l'identificazione dei segnali.

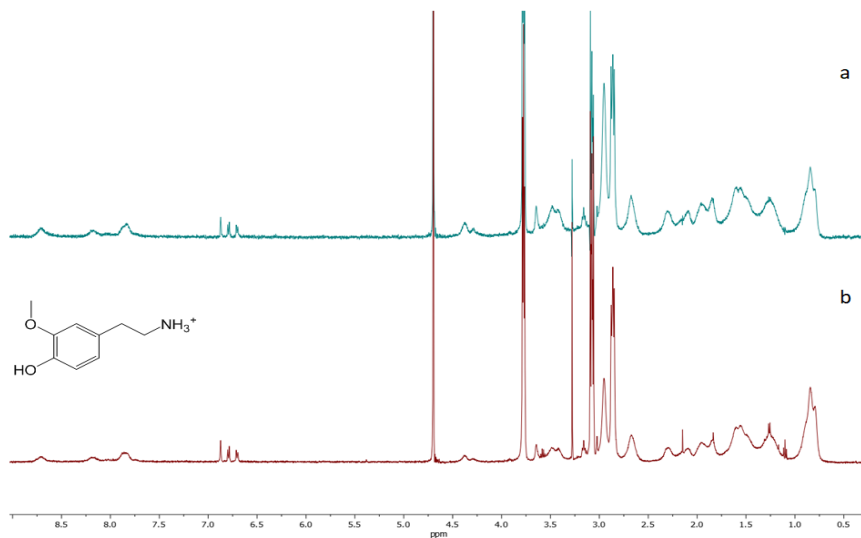


Figura 6.5 (500 MHz, 25 °C, 90% H₂O 10% D₂O) **(a)** HPwSTD 512ns, 3-MET 100 μM, nanoparticella 500 μM,, HEPES 1 mM pH=7 **(b)** W5 128 ns, 3-MET 100 μM, nanoparticella 500 μM,, 1 mM HEPES pH=7.

Per avere un controllo negativo è opportuno testare l'affinità della medesima nanoparticella nei confronti di un analita che ci si aspetta non interagire. A tal fine è stato scelto uno dei metaboliti sotto indagine, ovvero l'HVA, che assieme al VMA a pH=7, è carico negativamente. A parità di condizioni sperimentali, l'HPwSTD (Figura 6.6a) mostra che l'HVA non viene riconosciuto dalla nanoparticella, o più correttamente che non possiede un'affinità nei confronti della nanoparticella tale da dare un segnale quantificabile.

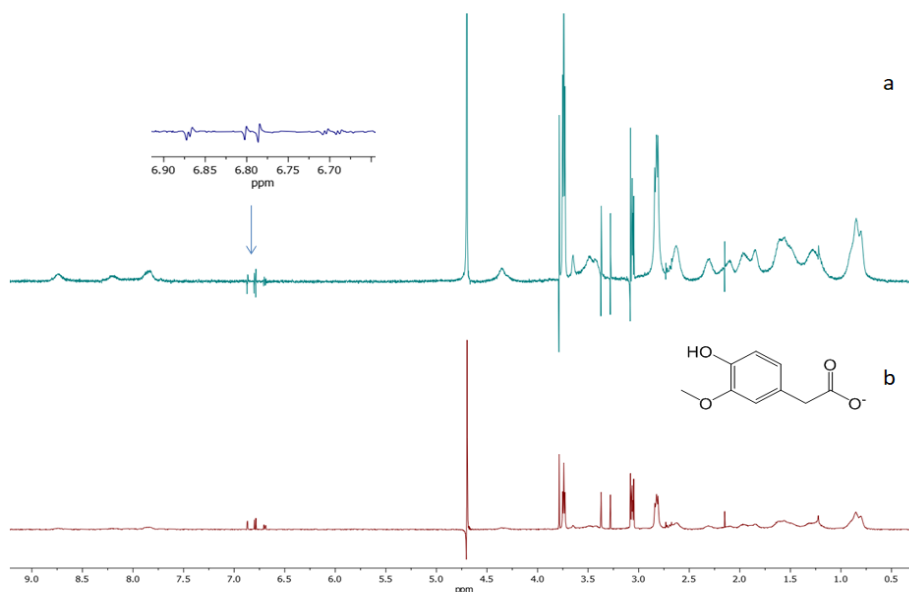


Figura 6.6. (500 MHz, 25 °C, 90% H₂O 10% D₂O) **(a)** HPwSTD 512ns, HVA 100 μM, nanoparticella 500uM, HEPES 1 mM pH=7 **(b)** W5 128 ns, 3-MET 100 μM, nanoparticella 500 μM,, 1 mM HEPES pH=7.

Il passo successivo è quello di verificare se la selettività viene mantenuta quando il sistema viene reso più complesso, ovvero in presenza di più analiti. Si è scelto quindi di verificare la selettività in una miscela contenente 3-MT, tiramina (TYRA), e HVA, molecole che contengono una regione aromatica simile e che a pH=7 sono rispettivamente carica positivamente, carica positivamente e carica negativamente. Quello che emerge dallo spettro HPwSTD (Figura 6.7a) è che la tiramina risponde dato che è possibile identificare in maniera chiara uno dei suoi segnali, quello a 7.10 ppm. Nel caso della 3-MT e dell'HVA è invece più difficile concludere qualcosa visto che i segnali corrispondenti in queste condizioni sono fortemente sovrapposti. Pertanto lo spettro HPwSTD risulta essere poco indicativo, in particolare nella regione tra i 6.90 e 6.85 ppm, dove oltre alla 3-MT sembrerebbe rispondere anche l'HVA. Questo punto verrà ripreso successivamente.

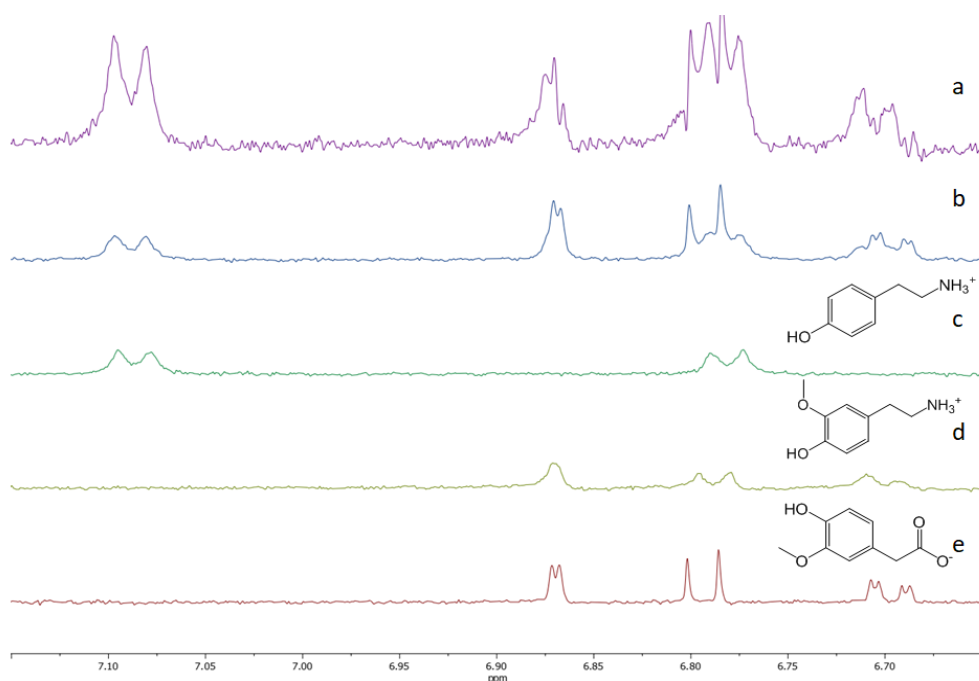


Figura 6.7 (500 MHz, 25 °C, 90% H₂O 10% D₂O) Valutazione della selettività sistema **(a)** HPwSTD 512ns, 3-MET 100 μM, HVA 100μM, TYRA 100 μM, nanoparticella 500 μM,, HEPES 1 mM pH=7. **(b)** W5 32 ns, 3-MET 100 μM, HVA 100 μM, TYRA 100 μM, nanoparticella 500 μM,, 1 mM HEPES pH=7. **(c)** W5 32 ns, TYRA 100 μM, nanoparticella 500 μM,, 1 mM HEPES pH=7. **(d)** W5 32 ns, 3-MET 100 μM, nanoparticella 500 μM,, 1 mM HEPES pH=7. **(e)** W5 32 ns, HVA 100 μM, nanoparticella 500 μM, 1 mM HEPES pH=7.

Ci si è poi chiesti come potesse rispondere una molecola contenente un anello aromatico ma che a pH=7, contenesse sia una carica positiva sia una negativa (ovvero uno zwitterione) come nel caso della tirosina. È stato quindi preparato un campione contenente 3-MT, tirosina ed HVA.

Ciò che emerge (Figura 6.8), è che la tirosina non risponde, basti osservare la mancanza del picco corrispondente tra i 7.10 ed i 7.15 ppm (i segnali in dispersione sono da considerare artefatti di sottrazione). Questa osservazione ci permette di affermare che la presenza della regione aromatica non è sufficiente a garantire un'alta affinità e che pertanto la carica ha un ruolo fondamentale nell'interazione. Come nell'esperimento precedente, anche qui per la stessa ragione è difficile giungere a delle conclusioni riguardo alla 3-MT e all'HVA.

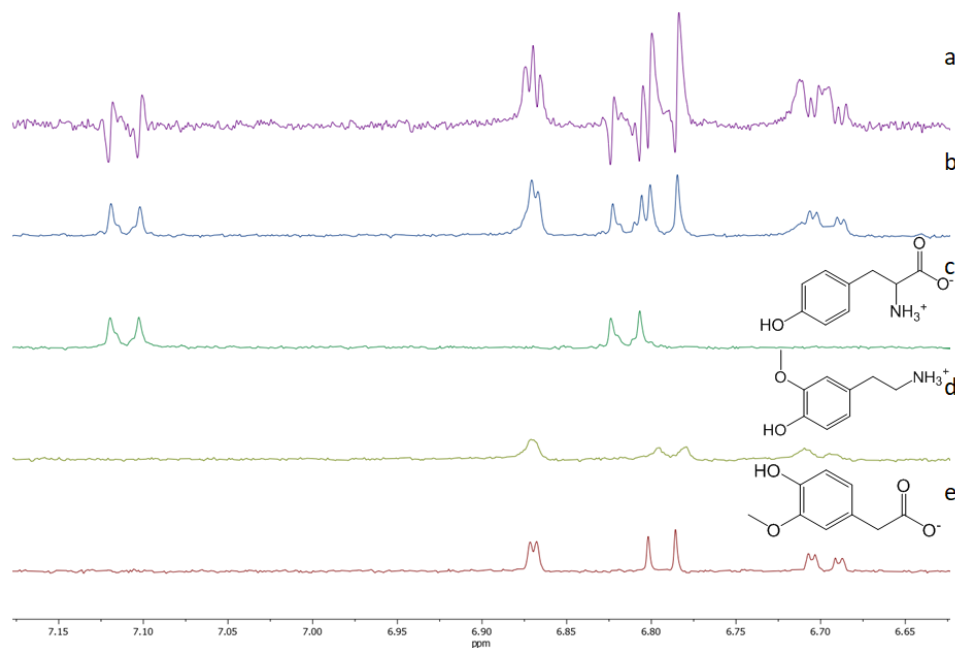


Figura 6.8 (500 MHz, 25 °C, 90% H₂O 10% D₂O). Valutazione della selettività sistema **(a) HPwSTD** 512ns, 3-MET 100 μM, HVA 100 μM, TYRO 100 μM, nanoparticella 500 μM, HEPES 1 mM pH=7. **(b) W5** 32 ns, 3-MET 100 μM, HVA 100 μM, TYRO 100 μM, nanoparticella 500 μM, 1 mM HEPES pH=7. **(c) W5** 32 ns, TYRO 100 μM, nanoparticella 500 μM, 1 mM HEPES pH=7. **(d) W5** 32 ns, 3-MET 100 μM, nanoparticella 500 μM, 1 mM HEPES pH=7. **(e) W5** 32 ns, HVA 100 μM, nanoparticella 500 μM, 1 mM HEPES pH=7.

Il tentativo di risolvere il problema legato alla sovrapposizione dei segnali tra la 3-MT e l'HVA offre la possibilità di fare delle riflessioni sulle diverse variabili in gioco al momento delle misure: in questo caso verranno prese in esame la concentrazione e la natura del tampone. In generale, per rendere più selettivo il sistema, si può pensare di aumentare la concentrazione di tampone così da aumentare gli effetti competitivi. Ma quale tampone usare ed a quale concentrazione?

Sino ad ora è stato utilizzato HEPES 1 mM sulla base di studi precedenti. Per un campione reale di urina, in condizioni fisiologiche, la letteratura riporta le seguenti concentrazioni di ioni: sodio (220 mM), potassio (125 mM), calcio (10 mM), magnesio (15 mM), manganese (1 mM), nickel (1 mM) ed ammonio (70 mM).²¹ Ciò corrisponde ad una concentrazione di ioni di circa 0.44 M ed una forza ionica di 0.2345 M, condizioni che poco si sposano con le tecniche di chemosensing basate su nanoparticelle, dato che gli equilibri analita/nanoparticella sono molto veloci e concentrazioni saline così elevate comportano un'eccessiva competizione e una eccessiva schermatura delle interazioni elettrostatiche. Per queste ragioni, e sempre sulla base di studi precedenti, si è scelto di aumentare la concentrazione del tampone a 10 mM, nella speranza che questa scelta possa anche permettere di differenziare i chemical shift dei protoni aromatici della 3-MT e dell'HVA.

Per quanto riguarda la natura del tampone, la scelta dell'HEPES può essere in parte giustificata da ragioni legate alla sensibilità delle misure NMR. È noto che la sensibilità subisce una forte riduzione in campioni ad elevata forza ionica. Questo problema può essere in parte risolto minimizzando la concentrazione di sale nei campioni. Si è rilevato però che il fattore decisivo non è la concentrazione salina in sé ma piuttosto la conduttività, che è una funzione sia della concentrazione che della mobilità degli ioni in soluzione. È stato mostrato che, scegliendo buffers con una mobilità ionica bassa, la conduttività nel campione può essere ridotta in maniera significativa e conseguentemente la sensibilità aumenta rispetto alla stessa misura fatta in un campione preparato con un buffer standard come il fosfato (che però ha il pregio di non contribuire allo spettro con ulteriori segnali). In particolare, si è visto che l'aumento di sensibilità di un buffer rispetto ad un altro è uguale alla radice del rapporto delle loro mobilità ioniche.²² Per verificare quanto sopra descritto sono stati preparati due campioni di dopamina 100 μ M, rispettivamente in HEPES 10 mM e fosfato 10 mM, e sono stati registrati i due spettri W5 (Figura 6.9) corrispondenti con i medesimi parametri di acquisizione.

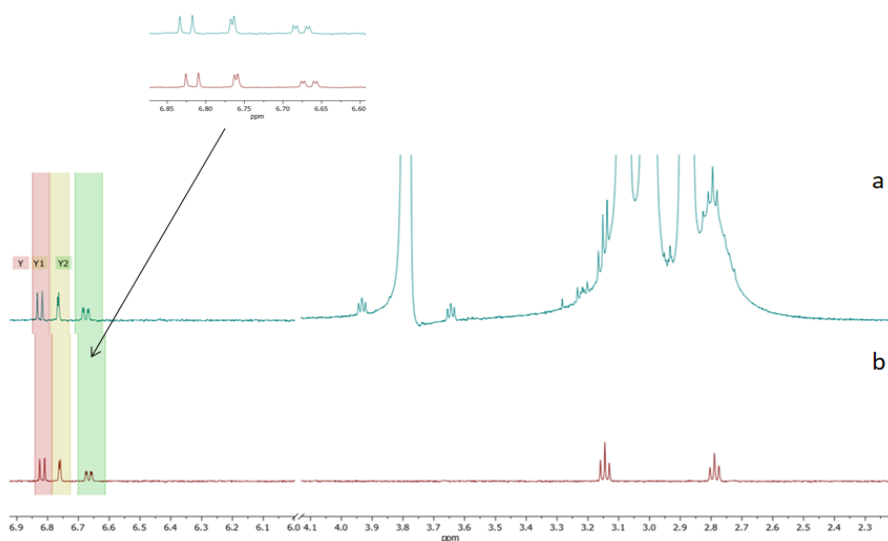


Figura 6.9 (500 MHz, 25 °C, 90% H₂O 10% D₂O) **(a)** W5 128 ns DOP 100 μM, HEPES 10 mM **(b)** W5 128 ns DOP 100 μM, fosfato 10 mM.

È stato quindi calcolato il rapporto segnale-rumore (SNR) relativo ai segnali aromatici, sono stati calcolati i rapporti segnale per segnale tra i due campioni ed è stata calcolata la media. Come mostra la tabella, in media l'SNR nel campione in HEPES è maggiore di 1.2 volte.

Segnali (ppm)	6.849-6.786	6.789-6.727	6.711-6.612	
SNR in HEPES	24.8	23.7	10.9	
SNR in FOSFATO	20.4	19.4	9.2	Media
Rapporto	1.2	1.2	1.2	1.2

Tabella 1 Dati relativi al rapporto segnale rumore in riferimento agli spettri W5 in Figura 6.9.

A questo punto è stata fatta una nuova serie di misure su un campione contenente 3-MT ed HVA, questa volta in HEPES 10 mM (Figura 6.10).

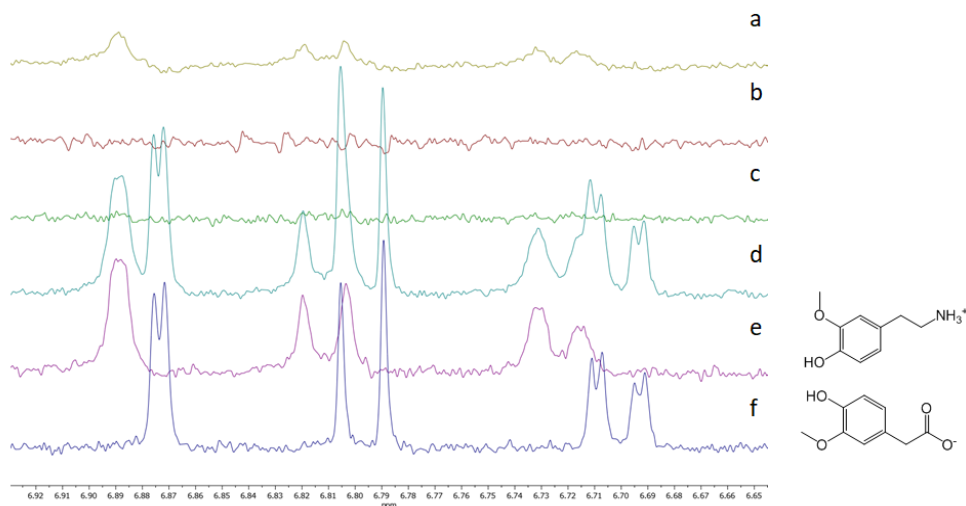


Figura 6.10 Valutazione della selettività sistema (500 MHz, 25 °C, 90% H₂O 10% D₂O) **(a) HPwSTD** 128ns, 3-MET 100 μM, HVA 100 μM, nanoparticella 500 μM, HEPES 10 mM pH=7. **(b) BIANCO HPwSTD** 128ns, 3-MET 100 μM, HVA 100 μM, HEPES 10 mM pH=7. **(c) STD** 128ns, 3-MET 100 μM, HVA 100 μM, nanoparticella 500 μM, HEPES 10 mM pH=7. **(d) W5** 128 ns, 3-MET 100 μM, HVA 100 μM, nanoparticella 500 μM, HEPES 10 mM, pH=7 **(e) W5** 128 ns, 3-MET 100 μM, nanoparticella 500 μM, HEPES 10 mM, pH=7. **(f) W5** 128 ns, HVA 100 μM, nanoparticella 500 μM, HEPES 10 mM pH=7.

Ciò che emerge è che con HEPES 10 mM lo spettro HPwSTD, (Figura 6.10a) risulta più chiaro rispetto quello in HEPES 1 mM: nella nuova condizione è evidente che la 3-MT è un ligando per la nanoparticella, mentre l'HVA no. In questo set di esperimenti è stato incorporato anche il bianco dell'HPwSTD (Figura 6.10b) che, come spiegato nel capitolo sulle tecniche di trasferimento di saturazione (capitolo 5), è necessario per verificare eventuali saturazioni dirette e quindi evidenziare eventuali falsi positivi. Inoltre, è stato riportato l'esperimento STD (Figura 6.10c) che, dal momento che non contiene i segnali aromatici della 3-MT, si dimostra non sufficientemente sensibile per rilevarla a queste concentrazioni.

6.3. Selettività in funzione della variazione dei parametri NMR

È possibile valutare l'affinità analita/nanoparticella anche andando a valutare come la presenza della nanoparticella modifica alcuni parametri spettrali dei ligandi. In tutti i sistemi studiati finora, si è osservato un unico insieme di segnali

per gli analiti interagenti; pertanto, questi sono in scambio rapido con il recettore. Nel limite di scambio veloce, definito Q un parametro NMR (*chemical shift*, larghezza di riga, ecc.), si ha che:

$$\langle Q \rangle = P_B Q_B + P_F Q_F \quad (6.1)$$

dove $\langle Q \rangle$ è il parametro mediato dallo scambio tra la forma legata (B, bound) e la forma libera (F, free) e P_B e P_F indicano le popolazioni corrispondenti. L'osservazione di differenze tra $\langle Q \rangle$ e Q_F fornisce un metodo per discriminare gli analiti affini per un determinato recettore da quelli che non lo sono. La capacità di rilevare delle interazioni con una sensibilità adeguata dipende in modo critico dal contributo dello stato legato $P_B Q_B$, in particolare questo deve essere significativo rispetto al contributo dello stato libero $P_F Q_F$. In generale si osserveranno allargamento e variazione di chemical shift nei sistemi analita/nanoparticella caratterizzati da alte costanti di associazione o in presenza di un'elevata concentrazione di recettore, vale a dire in tutti i casi in cui l'equilibrio è più spostato verso lo stato legato.

Sono quindi stati preparati, per ciascuno degli 8 analiti in analisi, due campioni, con HEPES 10 mM a pH=7, di cui uno contenente anche la nanoparticella (quelli contrassegnati dall'apice 1) e sono stati registrati gli spettri W5 corrispondenti (Figura 6.11).

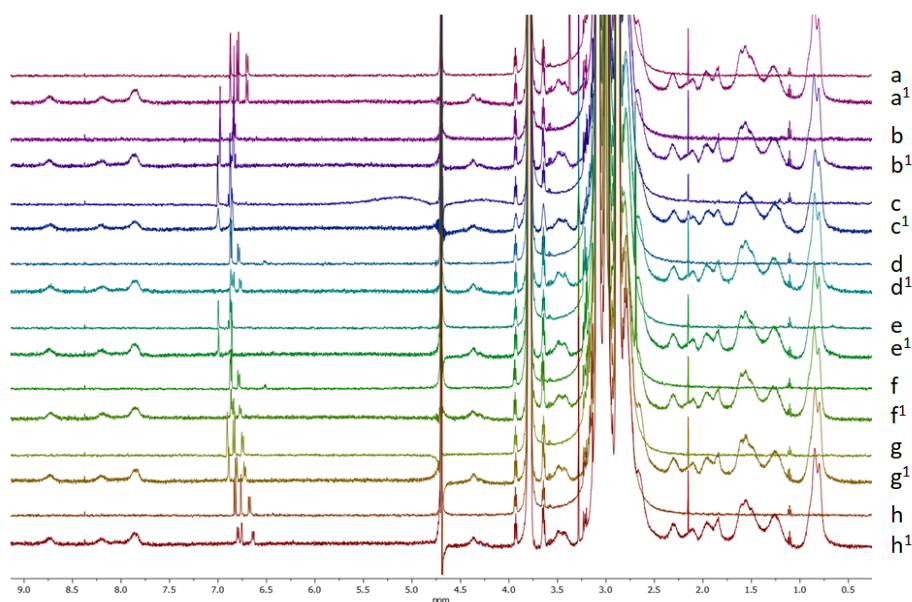


Figura 6.11 Spettri ^1H W5, 128ns, analiti 100 μM , HEPES 10mM, pH=7, gli esperimenti contrassegnati dall'apice 1 contengono anche la nanoparticella 500 μM (500 MHz, 25 $^\circ\text{C}$, 90% H_2O 10% D_2O) **(a)** HVA 100 μM **(b)** VMA 100 μM **(c)** NORME 100 μM **(d)** NORE 100 μM **(e)** META 100 μM **(f)** EPI 100 μM **(g)** 3-MET 100 μM **(h)** DOPA 100 μM .

La Figura 6.12 conferma le considerazioni precedenti: si osservano infatti sia variazioni di *chemical shift* sia allargamento dei segnali per gli analiti carichi positivamente (spettri **c,d,e,f,g,h**); i due acidi invece non mostrano variazioni significative.

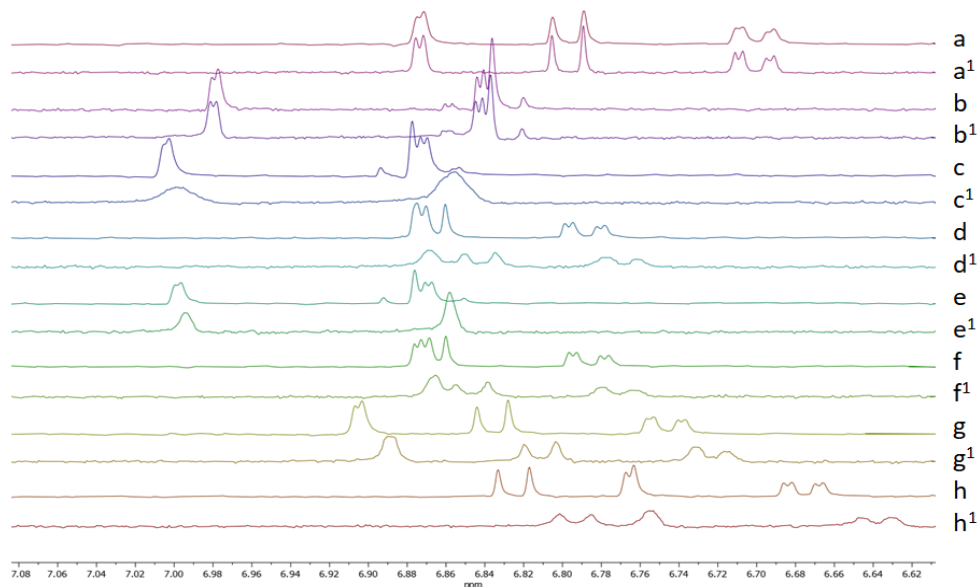


Figura 6.12 Ingrandimento degli spettri precedenti a livello della zona aromatica. Spettri 1H W5, 128ns, analiti 100uM, HEPES 10mM, pH=7, gli esperimenti contrassegnati dall'apice 1 contengono anche la nanoparticella 500uM (500 MHz, 25 °C, 90% H₂O 10% D₂O) (a) HVA 100 μM (b) VMA 100uM (c) NORME 100 μM (d)NORE 100 μM (e)META 100 μM (f)EPI 100 μM (g)3-MET 100 μM (h)DOPA 100 μM.

È però importante evidenziare che un eccessivo allargamento rende gli analiti interagenti difficilmente rilevabili nello spettro finale; pertanto, ai fini degli esperimenti basati su trasferimento della saturazione, è auspicabile che l'affinità del ligando per la nanoparticella non sia troppo elevata (costanti di associazioni $K_a \approx 10^3-10^5 \text{ M}^{-1}$). In caso di eccessiva affinità si può intervenire diminuendo la concentrazione della nanoparticella per spostare l'equilibrio verso la forma libera dell'analita, sebbene si debba comunque garantire una sufficiente concentrazione del complesso analita/nanoparticella all'equilibrio.

La concentrazione del recettore deve essere quindi attentamente regolata in base alle specifiche condizioni sperimentali al fine di ottimizzare il rapporto segnale-rumore (SNR) dei segnali dei ligandi.

Fino ad ora sono state fatte delle valutazioni di carattere generale sulla selettività e per fare ciò sono state usate delle concentrazioni di analita sufficientemente elevate. Solo conoscendo a priori il limite di rilevabilità, ovvero 100 μM, (valore superiore di circa due/tre ordini di grandezza rispetto a quelli fisiologici) si possono fare delle deduzioni in modo chiaro. Ci si è pertanto chiesti quale sia il

limite di rilevabilità dell'HPwSTD rispetto al sistema nanoparticella-analita, nello specifico per la 3-MT.

6.4. Determinazione del limite di rilevabilità dell'HPwSTD

In generale la sensibilità dell'esperimento HPwSTD oltre a essere determinata, come già detto, dall'equilibrio che si instaura tra l'analita e la nanoparticella, è soprattutto limitata dall'efficienza del trasferimento di saturazione dal recettore al ligando. Un fattore che limita l'effetto del trasferimento di saturazione è la velocità di rilassamento longitudinale del ligando (R_{1L}). Poiché i ligandi sono generalmente a bassa massa molecolare, i valori R_{1L} nello stato libero sono piccoli e quindi la saturazione si dissipa abbastanza lentamente. Al contrario, quando legato al recettore, R_{1L} può essere molto maggiore.

Quindi, una risposta visibile al trasferimento di saturazione richiede che il ligando si dissocia dal recettore ad una velocità superiore rispetto al tempo di rilassamento dello stato legato.

Al fine di determinare il limite di rilevabilità sono stati preparati nove campioni contenenti nanoparticelle con concentrazioni di 500 μM , HEPES 10 mM e 3-MT a concentrazione crescente (10, 20, 50, 80, 100, 120, 150, 180, 200 μM), registrandone quindi gli spettri HPwSTD (Figura 6.13)

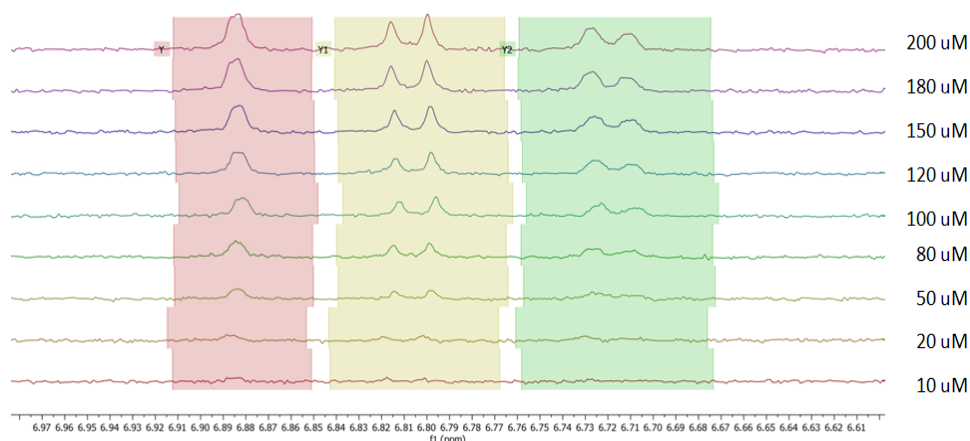


Figura 6.13 Valutazione del rapporto segnale rumore dei segnali aromatici della 3-MT a concentrazione crescente (10, 20, 50, 80, 100, 120, 150, 180, 200 μM), HPwSTD 256ns, nanoparticella 500 μM , HEPES 10 mM pH=7. (500 MHz, 25 °C, 90% H₂O 10% D₂O)

Sono quindi stati riportati in grafico (Figura 6.14) i valori di SNR relativi ai tre segnali aromatici: dall'equazione della linea di tendenza relativa all'andamento dell'SNR del doppietto tra i 6.91 e 6.84 ppm, si è ricavato che il limite di rilevabilità del sistema, definito come la concentrazione minima richiesta per dare un rapporto segnale rumore (SNR) almeno di 3, è 41.7 μM .

La sensibilità, quindi, dato che i metaboliti che vogliamo rilevare hanno una concentrazione dell'ordine di 0.1-1 μM , rappresenta un limite importante ma potenzialmente trattabile.

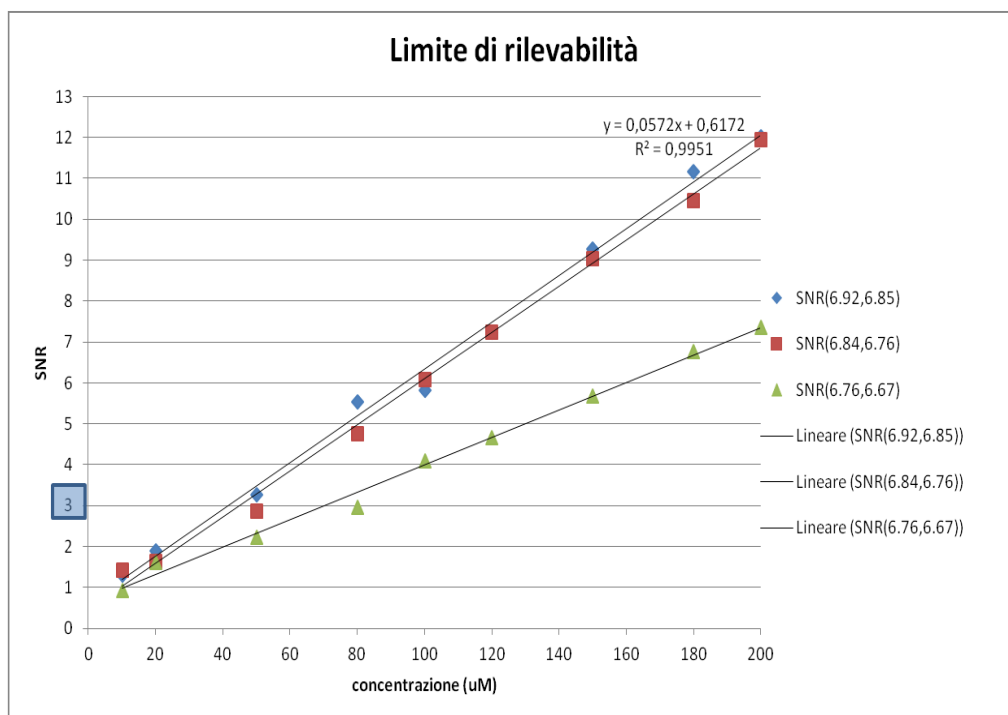


Figura 6.14 Grafico che rappresenta l'andamento del rapporto segnale rumore (SNR) dei segnali aromatici relativo all'HPwSTD.

6.5 Valutazione dell'efficienza delle tecniche di trasferimento di saturazione

Dato che il tempo di analisi è un parametro fondamentale nelle analisi di screening, è interessante valutare l'efficienza delle tecniche STD a parità di un numero relativamente basso di scansioni e in diverse condizioni. A tale scopo sono stati preparati quattro campioni, ciascuno contenente tutti gli 8 analiti ad

una concentrazione di 100 μM ma in quattro diverse condizioni: 1) in assenza di tampone, 2) in HEPES 10 mM, 3) in fosfato 10 mM e 4) in Sigmatrix® (una soluzione simil-urina).

6.5.1. Esperimenti in assenza di tampone

Nelle condizioni riportate in Figura 6.15, nello spettro STD (c), nonostante sia avvenuta la saturazione della nanoparticella come testimoniato dalla presenza dei segnali ad essa relativi, non appare alcun segnale degli analiti.

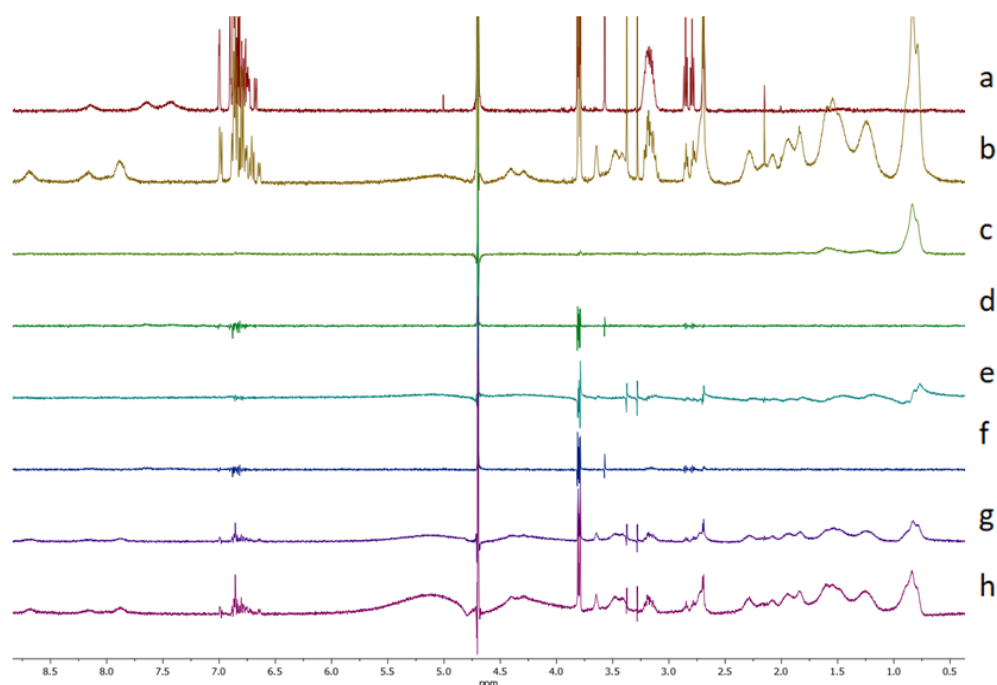


Figura 6.15. Valutazione efficienza degli esperimenti di trasferimento di saturazione, campione contenente tutti gli 8 analiti concentrati 100 μM , nanoparticella 500 μM , fatti in H_2O in assenza di tampone. (500 MHz, 25 °C, 90% H_2O 10% D_2O) (a) bianco del W5, 64 ns (b) W5, 64 ns (c) STD, 64 ns (d) bianco LPWSTD, 64 ns (e) LPWSTD, 64 ns (f) bianco HPWSTD, 64 ns (g) HPWSTD, 64 ns (h) HPWSTD 128 ns

Come già detto in precedenza, un requisito fondamentale per gli esperimenti che sfruttano la saturazione dell' H_2O è quello di acquisire uno spettro di controllo eseguito in assenza del recettore per fornire un riferimento contro il quale valutare gli spettri ottenuti in presenza della nanoparticella. Questa necessità deriva dal fatto che il ligando nella forma libera sperimenta un trasferimento della saturazione dall' H_2O bulk tramite NOE positivo (vedi sezione 5.2.). Qualitativamente nel bianco del waterSTD a bassa potenza (LPwSTD) (d) nella

regione aromatica la maggior parte dei segnali è vicino a zero ma ci sono alcuni picchi negativi, ciò significa che nonostante il NOE positivo dovuto all'H₂O bulk sia abbastanza basso, esiste comunque questo contributo che competerà con il NOE negativo che gli analiti affini alla nanoparticella sperimentano in sua presenza. Complessivamente invece come ci si aspetta nel bianco del wSTD ad alta potenza (HPwSTD) (f), nella regione aromatica è stato rimosso il contributo del NOE positivo dato dall'H₂O bulk.

Per quanto riguarda gli esperimenti di waterSTD veri e propri, confrontando il LPwSTD (e) e l'HPwSTD (g) è visivamente evidente la maggiore saturazione della nanoparticella dato che l'ampliamento della banda di saturazione investe anche parte dei segnali della nanoparticella, ciò comporta una maggiore quantità di saturazione trasferibile agli analiti interagenti. Infatti a parità di condizioni nel LPwSTD (e) non compaiono i segnali aromatici mentre nell'HPwSTD (g,h) sì, effetto dovuto anche al fatto che nell'HPwSTD il contributo NOE positivo è stato rimosso.

Quindi anche in assenza di tampone c'è una risposta, dovuta probabilmente all'uso di ammine come sali cloridrati e parziali protonazioni a carico di HVA e VMA, oltre al contributo di interazioni idrofobiche.

Un aspetto critico è però costituito dalla presenza nel bianco dell'HPwSTD (f), in corrispondenza della risonanza dei protoni metossilici, di segnali con una tendenza positiva, dei quali è però difficile valutare la significatività. Se questo effetto non fosse trascurabile le intensità dei segnali relative agli analiti contenenti protoni metossilici potrebbero contenere un contributo derivante da saturazione diretta. Ciò che comunque fa pensare che i segnali metossilici non vengano saturati in maniera diretta è che nel bianco i segnali aromatici sono mediati a zero, inoltre il sistema di spin aromatici-metossilici non comunica direttamente, per la presenza dell'ossigeno, e quindi la *spin diffusion* è poco efficiente.

6.5.2. Esperimenti in tampone HEPES

Così come nel caso dell'analisi senza tampone, anche nello spettro STD del campione in HEPES (Figura 6.16c) non compaiono i segnali relativi agli analiti. Per quanto riguarda i bianchi degli esperimenti wSTD la situazione riflette quella della serie di esperimenti in H₂O.

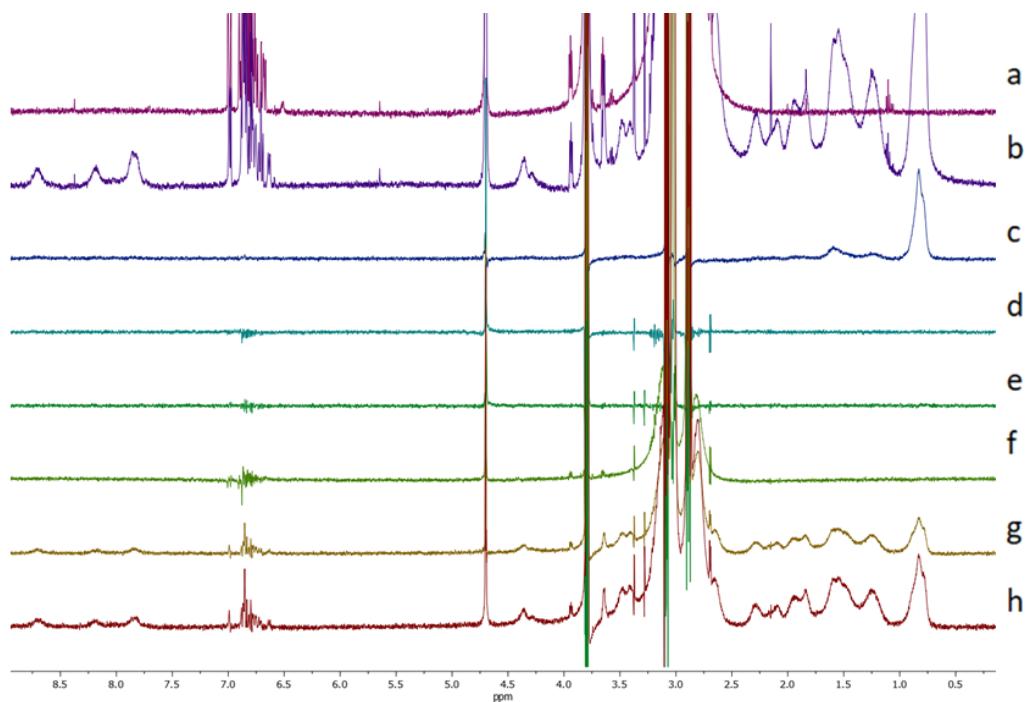


Figura 6.16. Valutazione dell'efficienza degli esperimenti di trasferimento di saturazione, campione contenente tutti gli 8 analiti concentrati 100 μ M, nanoparticella 500uM, fatti in HEPES 10 mM. (500 MHz, 25 °C, 90% H₂O 10% D₂O) (a) bianco del w5, 64 ns (b) w5, 64 ns (c) std, 64 ns (d)bianco LPWSTD, 64 ns (e) LPWSTD, 64 ns (f) bianco HPWSTD, 64 ns (g) HPWSTD, 64 ns (h) HPWSTD 128 ns.

Inoltre, riguardo agli esperimenti di wSTD veri e propri, nel LPwSTD (e) non appaiono i segnali della nanoparticella a bassi ppm (indice del fatto che non è avvenuta la saturazione diretta della nanoparticella), mentre i segnali degli analiti appaiono solo nel HPwSTD (g,h). Ciò che si nota nel bianco dell'HPwSTD (Figura 6.17f) è la presenza dei segnali dell'HEPES, il quale viene saturato in maniera diretta: questo potrebbe rappresentare un secondo contributo NOE positivo e quindi diminuire l'efficienza della tecnica.

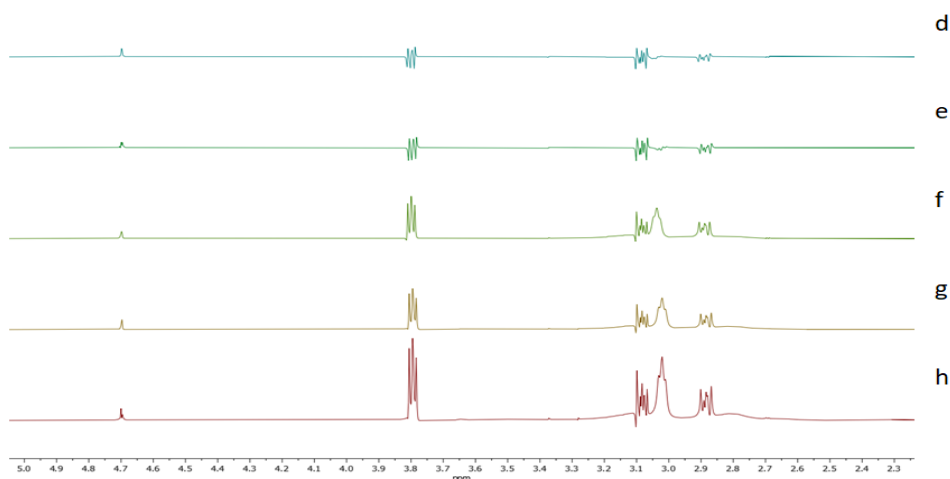


Figura 6.17 Ingrandimento nella zona tra i 5.0e 2.3 ppm. (500 MHz, 25 °C, 90% H₂O 10% D₂O) **(d)** bianco LPwSTD, 64 ns **(e)** LPwSTD, 64 ns **(f)** bianco HPwSTD, 64 ns **(g)** HPwSTD, 64 ns **(h)** HPwSTD 128 ns.

Si è poi proceduto ad assegnare i diversi segnali aromatici presenti nell'HPwSTD (Figura 6.18). La cosa importante da notare è che viene mantenuta la selettività per gli analiti carichi positivamente, come nei sistemi più semplici analizzati precedentemente.

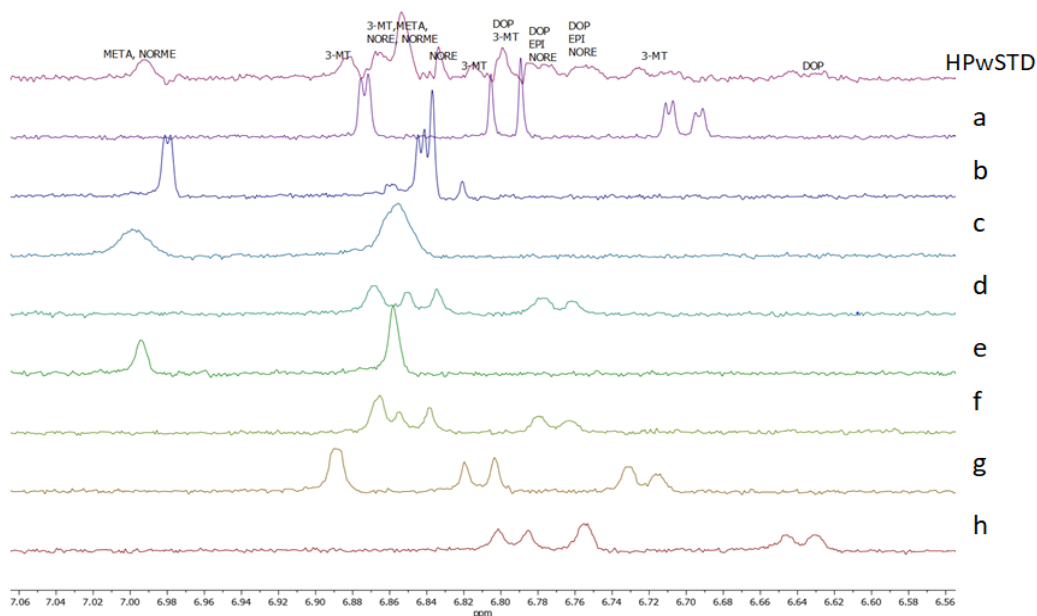


Figura 6.18. Assegnazione dei picchi dell'HPwSTD 128 ns, campione contenente tutti gli 8 analiti concentrati 100 μ M, nanoparticella 500 μ M, in HEPES 10 mM. (500 MHz, 25 °C, 90% H₂O 10% D₂O) **(a)** HVA 100 μ M **(b)** VMA 100 μ M **(c)** NORME 100 μ M **(d)** NORME 100 μ M **(e)** META 100 μ M **(f)** EPI 100 μ M **(g)** 3-MET 100 μ M **(h)** DOPA 100 μ M.

6.5.3 Esperimenti in tampone fosfato

Le considerazioni fatte sul campione in assenza di tampone valgono anche per il campione in fosfato (Figura 6.19).

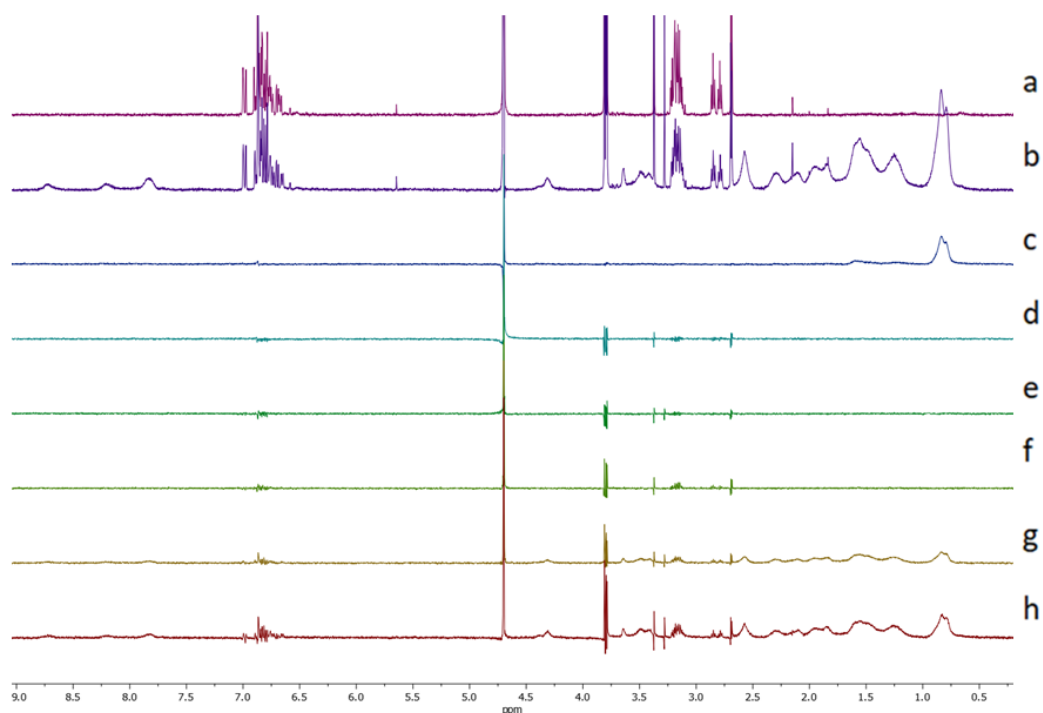


Figura 6.19. Valutazione efficienza degli esperimenti di trasferimento di saturazione, campione contenente tutti gli 8 analiti concentrati 100 μ M, nanoparticella 500 μ M, in fosfato 10 mM. (500 MHz, 25 $^{\circ}$ C, 90% H₂O 10% D₂O) (a) bianco del W5, 64 ns (b) W5, 64 ns (c) STD, 64 ns (d) bianco LPwSTD, 64 ns (e) LPwSTD, 64 ns (f) bianco HPwSTD, 64 ns (g) HPwSTD, 64 ns (h) HPwSTD 128 ns

6.5.4. Esperimenti in Sigmatrix®

Fino ad ora sono stati considerati campioni in condizioni distanti da quelle dell'urina, ed è quindi importante avvicinarsi a delle condizioni che mimino almeno in parte quelle di un campione reale. A questo scopo è stata usata una soluzione simil-urina chiamata Sigmatrix® con le seguenti caratteristiche dichiarate nel sito Sigma-Aldrich:

«soluzione tamponata a pH 6.5 - 7.2, contenente cloruro di calcio, cloruro di magnesio, cloruro di potassio, cloruro di sodio, fosfato di sodio, solfato di sodio, urea, e creatinina con sodio azide come conservante» e che replica la forza ionica

di un campione di urina reale. Nello spettro ^1H della sola Sigmatrix si nota un segnale a 5.7 ppm (Figura 6.20) generato dai protoni NH_2 dell'urea: la larghezza del segnale è dovuta al fatto che questi protoni sono legati all'N in scambio con l' H_2O . Vi sono inoltre segnali a 4.0 e 3.0 ppm attribuibili alla creatinina.

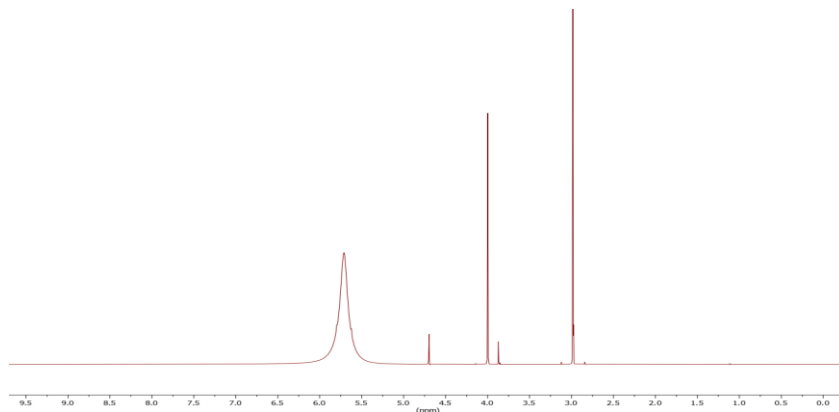


Figura 6.20 Spettro ^1H W5 di Sigmatrix. (500 MHz, 25 °C, 90% Sigmatrix 10% D_2O)

Per quanto riguarda gli esperimenti STD (6.21c), LPwSTD sui bianchi (d) e HPwSTD (e) in Sigmatrix, i risultati ricalcano quelli ottenuti nelle altre condizioni. Quello che però appare evidente è che in questo caso la presenza del segnale intenso dell'urea a 5.7 ppm ostacola la valutazione dell'efficienza dell'esperimento HPwSTD (g,h), dato che i segnali aromatici cadono tra i 6.5 e i 7 ppm. Questo fatto ostacola sia il rilevamento che l'identificazione degli analiti.

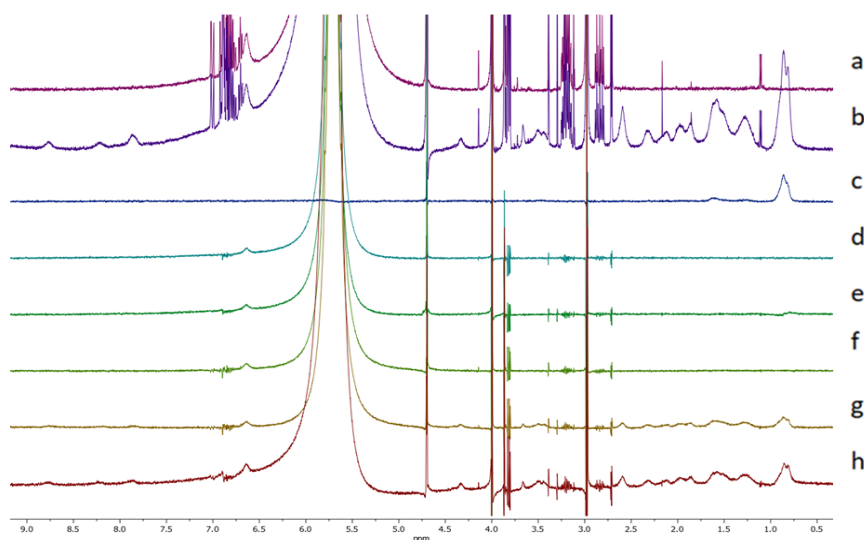


Figura 6.21. Valutazione efficienza degli esperimenti di trasferimento di saturazione, campione contenente tutti gli 8 analiti concentrati 100 μM , nanoparticella 500 μM , sigmatrix 10 mM. (500 MHz, 25 °C, 90% Sigmatrix 10% D_2O) (a) bianco del W5, 64 ns (b) W5, 64 ns (c) STD, 64 ns (d) bianco LPwSTD, 64 ns (e) LPwSTD, 64 ns (f) bianco HPwSTD, 64 ns (g) HPwSTD, 64 ns (h) HPwSTD 128 ns.

Una possibile soluzione potrebbe essere quella di incorporare nell'esperimento una sequenza noesyprsat anziché una sequenza W5 sopprimendo, oltre al segnale dell'H₂O, anche tutti i segnali dei protoni in scambio con l'H₂O.

Sono stati infine confrontati gli HPwSTD in Sigmatrix e nei tre diversi tamponi (Figura 6.22). Per valutare l'efficienza relativa degli esperimenti è stato calcolato l'integrale nella regione indicata in figura. Nel caso del campione in Sigmatrix è stato applicato l'algoritmo di correzione della linea di base *Whittaker Smoother*.

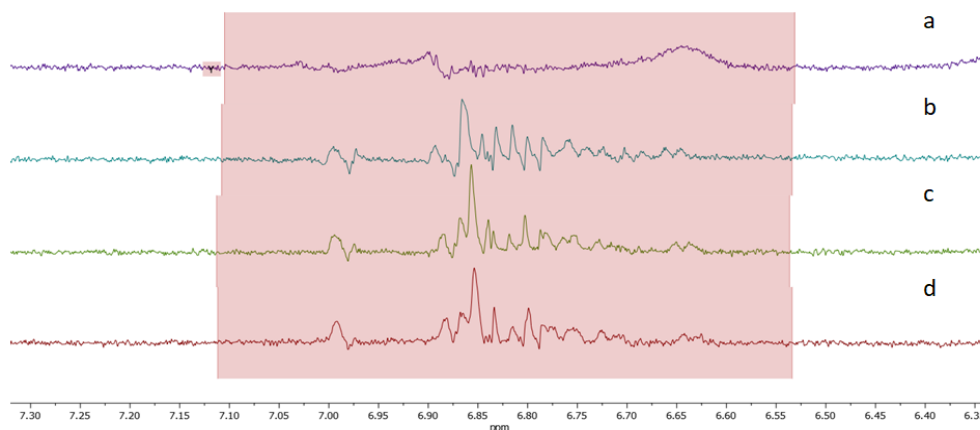


Figura 6.22 (500 MHz, 25 °C, 90% Sigmatrix 10% D₂O) **(a)** HPwSTD in Sigmatrix **(b)** HPwSTD in fosfato 10 mM **(c)** HPwSTD in assenza di tampone **(d)** HPwSTD in HEPES 10 mM.

Solvente	Integrale (7.113, 6.531)
Sigmatrix (a)	13803
H ₂ O (b)	16816
Fosfato (c)	15347
HEPES (d)	21732

Tabella 2 Dati relativi al calcolo dell'integrale della regione aromatica nei 4 diversi solventi in riferimento agli spettri HPwSTD di Figura 6.22.

Quello che emerge è che la Sigmatrix influenza negativamente la sensibilità dell'HPwSTD, mentre il risultato migliore si ottiene in HEPES.

6.6. Esperimenti Double Pulse Field Gradient Perfect Echo (DPFGPE) selettivi a bande

Un'alternativa *brute force* agli esperimenti di *chemosensing* è rappresentata dall'osservazione diretta di una ristretta banda spettrale di interesse. Un esperimento di questo tipo si può facilmente realizzare con la sequenza DPGPE e permette di osservare analiti fino a 10 μM , come mostrato nella Figura 6.23. Il limite di questo approccio nell'identificazione di analiti target sta nel fatto che, in presenza di una miscela complessa, appaiono i segnali di tutti gli analiti che possiedono risonanze all'interno della banda selezionata: non esiste ossia alcun "filtraggio" sul tipo di molecola, come avviene invece nel caso degli esperimenti di *chemosensing* STD e wSTD.

La figura 6.23 paragona l'efficienza della sola soppressione del solvente (W5) con la selezione DPGPE di una banda di 500 Hz centrata a 6.5 ppm. Nello spettro (d) è evidente una peculiarità dell'esperimento DPGPE nel caso del campione in Sigmatrix: la banda selezionata esclude infatti il segnale dell'urea che, come abbiamo visto, rappresenta invece un limite delle tecniche di *chemosensing* basate sul trasferimento di saturazione.

In linea di principio è possibile coniugare esperimenti di *chemosensing* con una selezione della banda di osservazione, ma questo comporta un allungamento della sequenza di impulsi con possibile perdita di sensibilità a causa del rilassamento trasversale.

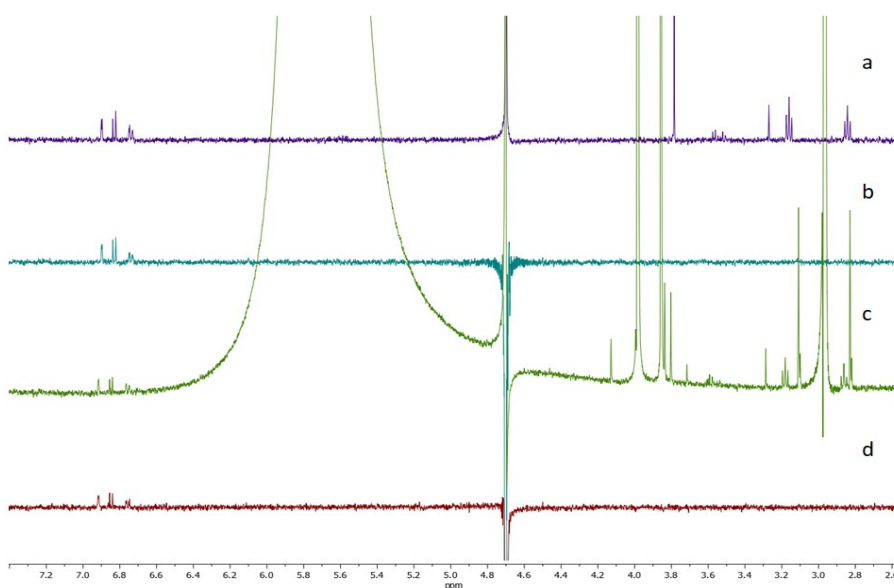


Figura 6.23. (500 MHz, 25 °C, 90% H₂O 10% D₂O) (a) Spettro 1H W5 3-MT 10 μM , fosfato 100 mM (b) Spettro 1H DPGPE 3-MT 10 μM , fosfato 100 mM (c) Spettro 1H W5 3-MT 10 μM , sigmatrix (d) Spettro 1H DPGPE 3-MT 10 μM , Sigmatrix.

7. Conclusioni

Come primo risultato di questo lavoro è stato verificato che l'affinità predetta dalle simulazioni di dinamica molecolare per la nanoparticella riportata in fig. 4.3 viene confermata sperimentalmente: la nanoparticella in esame è infatti in grado di riconoscere con affinità opportuna i metaboliti delle catecolamine che presentano una carica positiva. Ciò fa supporre che, per riconoscere anche i metaboliti carichi negativamente, si possa tentare di sostituire l'aspartato terminale con un amminoacido con carica positiva, coprendo in tal modo l'intero *panel* dei metaboliti di interesse.

Per quanto riguarda le tecniche di *NMR chemosensing* si è visto che gli spin dell'H₂O direttamente a contatto con il monostrato del nanorecettore forniscono una fonte di saturazione che porta ad un netto miglioramento della sensibilità negli esperimenti di Saturation Transfer Difference. In particolare, aumentando in modo controllato la potenza dell'impulso di saturazione, la sensibilità subisce un incremento per via della saturazione simultanea degli spin dell'H₂O e del monolayer. A questo fenomeno si aggiunge la cancellazione del contributo NOE positivo dell'H₂O bulk. La convergenza di questi effetti fa scendere il limite di rilevabilità della 3-metossitiramina fino a 41.7 µM in un esperimento HPwSTD effettuato su uno spettrometro standard a 500 MHz.

Alla luce di quanto sopra esposto, la profilazione dei metaboliti delle catecolamine nelle urine di pazienti affetti da neuroblastoma (in concentrazioni comprese tra 0.1 e 1 µM) non sembra essere accessibile in modo diretto tramite le tecniche NMR utilizzate, ma si ritiene che il problema sia potenzialmente trattabile. È infatti prevedibile che, qualora le strategie discusse in questo lavoro vengano applicate tramite spettrometri con campi magnetici elevati e dotati sonde criogeniche, i notevoli guadagni di sensibilità possano rendere accessibile l'analisi di miscele nel range micromolare.

Nel medesimo contesto è possibile valutare una pre-concentrazione delle urine tramite liofilizzazione, ma tale approccio non è in linea con l'idea che ispira questo lavoro, ovvero la minima manipolazione dei campioni in esame.

Un'ulteriore complicazione che si è riscontrata nell'applicazione delle tecniche NMR è data dall'utilizzo della Sigmatrix®, una soluzione utilizzata per mimare le caratteristiche chimico-fisiche dell'urina. I risultati ottenuti mostrano infatti che l'efficienza dell'esperimento HPwSTD sul campione preparato in Sigmatrix® risulta minore rispetto a quelli preparati in soluzioni meno complesse. Questo fenomeno può essere legato a diversi fattori: ad esempio in alcuni esperimenti di *chemosensing* NMR sono stati osservati effetti specifici di alcuni ioni sulla sensibilità delle misure, e in particolare è stato osservato che diversi tamponi

(allo stesso pH) possono avere effetti marcati sull'efficienza di rilevamento degli analiti, soprattutto quando questi sono presenti in piccole concentrazioni. Ulteriori indagini su questo fenomeno sono tuttora in corso nel gruppo di ricerca presso il quale si è svolto l'internato di tesi.

8. Materiali e Metodi

Tutti i reagenti ed i solventi disponibili commercialmente sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni. Tutti i reagenti sono stati acquistati dalla *Sigma-Aldrich*,

Gli spettri NMR sono stati registrati utilizzando uno spettrometro Bruker Avance III 500 che opera a 500.13 MHz.

8.1. Sequenza WaterSTD

La sequenza di impulsi utilizzata in questo lavoro per l'esperimento WaterSTD è riportata in Figura 8.1

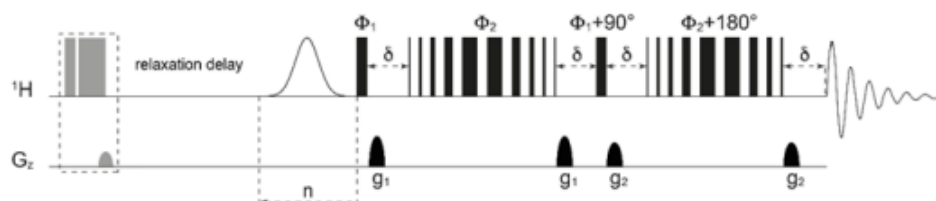


Figura 8.1 Sequenza di impulsi impiegata in esperimenti WaterSTD.

È evidente la similitudine della sequenza con quella utilizzata per l'esperimento STD standard (Figura 5.2), dalla quale si distingue per l'aggiunta del blocco W5 DPFGE-PE per la soppressione del solvente.

Anche l'esperimento WaterSTD prevede l'acquisizione di spettri on e off-resonance alternati, in cui vengono saturati rispettivamente l'acqua e una regione spettrale priva di segnali di interesse (~ -40 ppm). Se richiesto, l'intervallo di tempo δ può essere esteso per ottenere un filtraggio T_2 dei segnali larghi. A seconda della potenza impostata si avranno esperimenti di LP-WaterSTD, *low power*, o HP-WaterSTD, *high power*. Tra la versione LP e quella HP cambia l'entità di saturazione che ricevono le varie zone dello spettro, come si nota nel profilo sperimentale di saturazione (Figura 8.2).

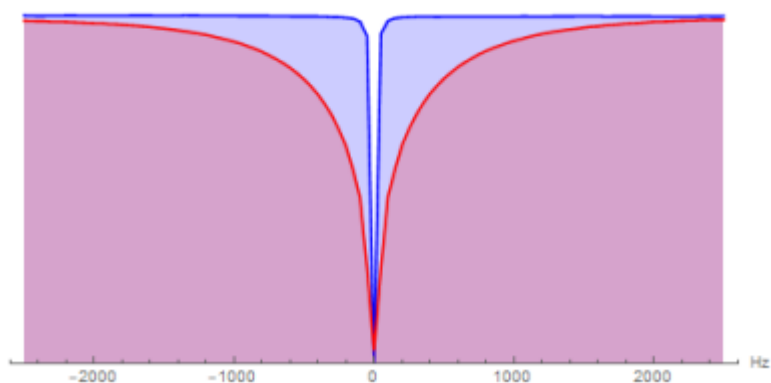


Figura 8.2 Profili sperimentali di saturazione ottenuti con un treno di 40 impulsi Gaussiani di 50 ms a bassa potenza ($\gamma B_{1,max} = 24.3$ Hz, rotazione di 180° , blu) e ad alta potenza ($\gamma B_{1,max} = 750$ Hz, rotazione di 5560° , rosso). I profili sono stati misurati alla frequenza ^1H di 500 MHz su un campione contenente una soluzione di GdCl_3 0.3 mM in $\text{H}_2\text{O} : \text{D}_2\text{O} = 1 : 9$ ($T_{1,\text{water}} = 0.210$ s, $T_{2,\text{water}} = 0.194$ s).¹²

Dal confronto tra i due profili di saturazione è evidente che, aumentando la potenza degli impulsi di saturazione, i protoni che risuonano vicino alla risonanza dell'acqua sono influenzati significativamente dal campo di RF. Al contrario, il profilo di saturazione per il WaterSTD a bassa potenza presenta una banda efficace stretta che copre solo la risonanza dell'acqua.

9. Bibliografia

- 1) Park JR, Eggert A, Caron H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Hematol Oncol Clin North Am.* **2010** Feb;24(1):65-86.
- 2) Verly IR, van Kuilenburg AB, Abeling NG, Goorden SM, Fiocco M, Vaz FM, van Noesel MM, Zwaan CM, Kaspers GL, Merks JH, Caron HN, Tytgat GA. Catecholamines profiles at diagnosis: Increased diagnostic sensitivity and correlation with biological and clinical features in neuroblastoma patients. *Eur J Cancer.* **2017** Feb;72:235-243.
- 3) Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, Faldum A, Hero B, Ichihara T, Machin D, Mosseri V, Simon T, Garaventa A, Castel V, Matthay KK; INRG Task Force. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol.* **2009** Jan 10;27(2):289-97.
- 4) Simon T, Berthold F, Borkhardt A, Kremens B, De Carolis B, Hero B. Treatment and outcomes of patients with relapsed, high-risk neuroblastoma: results of German trials. *Pediatr Blood Cancer.* **2011** Apr;56(4):578-83.
- 5) Oberthuer A, Juraeva D, Hero B, Volland R, Sterz C, Schmidt R, Faldum A, Kahlert Y, Engesser A, Asgharzadeh S, Seeger R, Ohira M, Nakagawara A, Scaruffi P, Tonini GP, Janoueix-Lerosey I, Delattre O, Schleiermacher G, Vandesompele J, Speleman F, Noguera R, Piqueras M, Bénard J, Valent A, Avigad S, Yaniv I, Grundy RG, Ortmann M, Shao C, Schwab M, Eils R, Simon T, Theissen J, Berthold F, Westermann F, Brors B, Fischer M. Revised risk estimation and treatment stratification of low- and intermediate-risk neuroblastoma patients by integrating clinical and molecular prognostic markers. *Clin Cancer Res.* **2015** Apr 15;21(8):1904-15
- 6) Cangemi G, Barco S, Reggiardo G, Viscardi E, Di Cataldo A, Garaventa A, Melioli G, Conte M. Interchangeability between 24-hour collection and single spot urines for vanillylmandelic and homovanillic acid levels in the diagnosis of neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer.* **2013** Dec;60(12):E170-2.
- 7) Barco S, Gennai I, Reggiardo G, Galleni B, Barbagallo L, Maffia A, Viscardi E, De Leonardi F, Cecinati V, Sorrentino S, Garaventa A, Conte M, Cangemi G. Urinary homovanillic and vanillylmandelic acid in the diagnosis of neuroblastoma: report from the Italian Cooperative Group for Neuroblastoma. *Clin Biochem.* **2014** Jun;47(9):848-52.
- 8) Cangemi G, Reggiardo G, Barco S, Barbagallo L, Conte M, D'Angelo P, Bianchi M, Favre C, Galleni B, Melioli G, Haupt R, Garaventa A, Corrias

- MV. Prognostic value of ferritin, neuron-specific enolase, lactate dehydrogenase, and urinary and plasmatic catecholamine metabolites in children with neuroblastoma. *Onco Targets Ther.* **2012**;5:417-23.
- 9) Verly IRN, van Kuilenburg ABP, Abeling NGGM, Goorden SMI, Fiocco M, Vaz FM, van Noesel MM, Zwaan CM, Kaspers GJL, Merks JHM, Caron HN, Tytgat GAM. 3-Methoxytyramine: An independent prognostic biomarker that associates with high-risk disease and poor clinical outcome in neuroblastoma patients. *Eur J Cancer.* **2018** Feb;90:102-110.
 - 10) Barco S, Verly I, Corrias MV, Sorrentino S, Conte M, Tripodi G, Tytgat G, van Kuilenburg A, van der Ham M, de Sain-van der Velden M, Garaventa A, Cangemi G. Plasma free metanephrines for diagnosis of neuroblastoma patients. *Clin Biochem.* **2019** Apr;66:57-62.
 - 11) M. Mayer and B. Meyer. Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 38:1784–1788, **1999**.
 - 12) Federico De Biasi, Fabrizio Mancin, Federico Rastrelli, Nanoparticle-assisted NMR spectroscopy: A chemosensing perspective, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, Volume 117, **2020**.
 - 13) B. Perrone, S. Springhetti, F. Ramadori, F. Rastrelli, and F. Mancin. “NMR Chemosensing” Using Monolayer-Protected Nanoparticles as Receptors. *J. Am. Chem. Soc.*, 135:11768–11771, **2013**.
 - 14) F. De Biasi, D. Rosa-Gastaldo, X. Sun, F. Mancin, and F. Rastrelli. Nanoparticle Assisted NMR Spectroscopy: Enhanced Detection of Analytes by Water-Mediated Saturation Transfer. *J. Am, Chem, Soc.*, 141:4870–4877, **2019**.
 - 15) G. Otting, E. Liepinsh, and K. Wuthrich. Protein Hydration in Aqueous Solution. *Science*, 254:974–980, **1991**.
 - 16) L. Riccardi, L. Gabrielli, X. Sun, F. De Biasi, F. Rastrelli, F. Mancin, and M. De Vivo. Nanoparticle-Based Receptors Mimic Protein-Ligand Recognition. *Chem*, 3:92–109, **2017**.
 - 17) Federico De Biasi; Supervisor Federico Rastrelli. *Ph.D. Thesis Matrix-Assisted NMR*; **2018**.
 - 18) Wojtowicz, W., Zabek, A., Deja, S. *et al.* Serum and urine ¹H NMR-based metabolomics in the diagnosis of selected thyroid diseases. *Sci Rep* 7, 9108 (**2017**).
 - 19) Bouatra S, Aziat F, Mandal R, Guo AC, Wilson MR, et al. (**2013**) *The Human Urine Metabolome*. PLoS ONE 8(9): e73076.
 - 20) Manissorn J, Fong-Ngern K, Peerapen P, Thongboonkerd V. Systematic evaluation for effects of urine pH on calcium oxalate crystallization,

crystal-cell adhesion and internalization into renal tubular cells. *Sci Rep.* **2017** May 11;7(1):1798.

- 21) Ghaderinezhad, F., Ceylan Koydemir, H., Tseng, D. *et al.* Sensing of electrolytes in urine using a miniaturized paper-based device. *Sci Rep* 10, 13620 (**2020**)
- 22) Kelly AE, Ou HD, Withers R, Dötsch V. Low-conductivity buffers for high-sensitivity NMR measurements. *J Am Chem Soc.* **2002** Oct 9;124(40):12013-9.