Progetto di Tesi di Laurea Magistrale in Chimica

Studente: Daniele Panariti

Titolo Tesi di Laurea Magistrale: *Distance Determination by advanced EPR techniques exploiting photo-switchable spin probes in model peptides.*

Il progetto di Tesi di Laurea Magistrale è impostato sullo sviluppo di tecniche di Risonanza Paramagnetica Elettronica (EPR) basate sull'utilizzo di sonde paramagnetiche foto-attivabili per la caratterizzazione strutturale sistemi biologici complessi.

La spettroscopia EPR è una tecnica che consente di raccogliere informazioni sulla struttura elettronica, geometria molecolare e dinamica di specie paramagnetiche, ovvero contenenti uno o più elettroni spaiati. In un generico esperimento EPR si osservano le specie paramagnetiche e l'interazione di quest'ultime con altri stati paramagnetici o con nuclei magneticamente attivi.

Tra le tecniche EPR impulsate, le spettroscopie impulsate dipolari (PDS) sono uno strumento biofisico fondamentale per lo studio delle strutture di macromolecole rilevanti in campo biologico. Le PDS esaminano le interazioni dipolari elettroniche tra due sonde paramagnetiche e consentono quindi di misurarne le distanze medie e le loro distribuzioni. Le sonde di spin possono avere natura endogena o essere inserite attraverso specifiche tecniche di innesto sito-specifico nella macromolecola. Nel caso di sonde rigide o semi-rigide, l'eccitazione parziale dello spettro EPR consente di realizzare selezione orientazionale delle tracce dipolari, ottenendo informazioni aggiuntive sull'orientazione relativa tra le sonde paramagnetiche presenti all'interno di proteine o di subunità delle stesse.

L'utilizzo nelle PDS di stati di tripletto foto-generati come sonde paramagnetiche offre un'alternativa per lo studio di strutture biologiche contenenti un cofattore foto-attivabile. Questi stati di tripletto foto-generati presentano una serie di vantaggi spettroscopici rispetto alle sonde paramagnetiche permanenti comunemente impiegate. La caratteristica polarizzazione di spin degli stati di tripletto foto-eccitati, ovvero la deviazione dalla distribuzione di Boltzmann delle popolazioni dei livelli di spin dovuta al meccanismo di popolazione per *inter-system crossing*, può generare un aumento della sensibilità spettroscopica rispetto alle sonde paramagnetiche di ordinario utilizzo. Inoltre, la generosa estensione di uno spettro EPR di uno stato di tripletto, che è da attribuire all'interazione di *zero field splitting*, consente di selezionare magneticamente orientazioni molecolari diverse separando precise conformazioni negli esperimenti di PDS in maniera più semplice. Alternativamente, la selezione orientazionale di uno stato di tripletto foto-generato può essere realizzata otticamente attraverso l'utilizzo di luce polarizzata linearmente impiegata per eccitare selettivamente cromofori con una determinata orientazione rispetto al campo magnetico statico. Questa tecnica prende il nome di magnetofotoselezione.

Nella prima parte del progetto di tesi si introduce una prima e innovativa applicazione combinata di selezione orientazionale magnetica e ottica nelle PDS foto-indotte per l'investigazione di composti modello contenenti una sonda foto-attivabile. L'introduzione di vincoli addizionali, dovuti all'uso di luce polarizzata linearmente per l'eccitazione del cromoforo, permetterebbe di validare informazioni strutturali sia teoriche che sperimentali con maggiore accuratezza.

Il sistema modello utilizzato nello studio spettroscopico consiste in un peptide legato covalentemente ad una estremità ad un cromoforo, *2,6-diiodo-1,3,5,7-tetrametilBODIPY*, mentre una delle posizioni lungo la sequenza amminoacidica è sostituita con un amminoacido non naturale *acido 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-*

1-ossil-4-ammino-4-carbossilico (TOAC). Il 2-iodo-Bodipy è un cromoforo caratterizzato da una buona fotostabilità, assorbimento nel range del visibile e un'alta resa di tripletto.

In parallelo alle misure spettroscopiche si sono realizzate simulazioni delle tracce sperimentali per ricavare il dato strutturale. Si è quindi dimostrato che l'implementazione proposta della tecnica EPR nella variante PDS fornisce uno strumento innovativo e all'avanguardia per l'indagine strutturale di macromolecole biologiche contenenti un cofattore otticamente attivo.

Nella seconda parte dell'internato di tesi, l'obiettivo principale è stato quello di migliorare la sensibilità della tecnica PDS mediante il trasferimento di polarizzazione di spin dallo stato di tripletto foto-eccitato verso la sonda paramagnetica permanente, coinvolgendo entrambe le sonde paramagnetiche tra le quali viene effettuata la misura di distanza. Il meccanismo di polarizzazione, dovendo soddisfare i vincoli sulle distanze tra le specie interagenti imposti dalle spettroscopie dipolari EPR, tra 1.5 e 8 nm, in un regime di accoppiamento debole, richiede vincoli stringenti e non facilmente realizzabili.

In questi studi è stato utilizzato un righello molecolare costituito da una serie di sistemi modello analoghi a quelli utilizzati nella prima parte del progetto di tesi: il cromoforo (*2,6-diiodo-1,3,5,7-tetrametilBODIPY* o 5-(4-carbossifenil)-10,15,20-trifenilporfirina a base libera e zinco sostituita) è legato attraverso un ponte peptidico al radicale TOAC, a distanze via via crescenti. Misure EPR, nella variante risolta nel tempo, hanno consentito di approfondire e fare chiarezza sul meccanismo di iperpolarizzazione di specie paramagnetiche nel regime di accoppiamento debole.

Si è quindi dimostrato che l'iperpolarizzazione di spin è un requisito importante per l'ottimizzazione delle tecniche EPR dipolari, in presenza di fotoeccitazione.

Considerando un'applicazione più generale, i meccanismi di iperpolarizzazione possono essere utilizzati per aumentare la sensibilità anche nell'ambito delle tecniche di risonanza magnetica nucleare. L'impiego di spin elettronici iperpolarizzati rafforzerebbe significativamente l'utilizzo di meccanismi di polarizzazione dinamica nucleare (DNP) basati sul trasferimento di polarizzazione da elettroni a nuclei. Ordinariamente, le tecniche DNP si basano sull'utilizzo di spin elettronici le cui popolazioni sono descritte dalla distribuzione di Boltzmann, facendo così uso della maggiore polarizzazione dei livelli energetici di spin elettronico rispetto agli stati di spin nucleare. Nuovi meccanismi di iperpolarizzazione basati sull'eccitazione ottica di stati di tripletto potrebbero essere un fondamentale punto di svolta nello sviluppo e nella progettazione di tecniche NMR di nuova generazione.

Il primo periodo di internato di tesi è stato svolto presso l'Università di Oxford al *Centre for Advance Electron Spin Resonance* nell'ambito del progetto di mobilità internazionale Erasmus+. Lo svolgimento delle misure conclusive di magnetofotoselezione e lo studio del meccanismo di trasferimento di polarizzazione in regime di accoppiamento debole ha invece avuto luogo presso il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Padova.