1. Principi fisici della risonanza magnetica nucleare

- Quali spin nucleari possono dar luogo ad un segnale NMR ?

- Quanti sono i livelli di spin per un nucleo con numero quantico I = ½ ? E per un nucleo con I = 1 ?

- Perché è necessario un campo magnetico per osservare un segnale NMR ?

- Perché la tecnica NMR è poco sensibile rispetto a spettroscopie come Assorbimento UV o raggi X ?

- Qual è la relazione tra energia e frequenza ? Tra energia e campo magnetico ?

- Qual è l’effetto della costante giromagnetica sulla sensibilità dell’esperimento NMR ?

- Cos’è il moto di precessione dello spin?

- Cos’è la magnetizzazione ?

- Descrivere l’esperimento NMR mediante la notazione vettoriale della magnetizzazione.

- Cos’è la risonanza ?

- Descrivere la differenza tra esperimento in onda continua e spettroscopia ad impulsi.

- Cosa produce la trasformata di Fourier ?

- Che relazione c’è tra durata di impulso e finestra di eccitazione ?

- Cosa produce un impulso di 90° ?

- Cos’è il Free Induction Decay?

- L’intensità del segnale NMR può essere valutata quantitativamente ?

1. Chemical shift

- Perché due nuclei identici possono avere frequenze di risonanza diverse ?

- Descrivere la scala utilizzata per descrivere la posizione dei segnali in uno spettro NMR.

- Che caratteristiche hanno gli standard di riferimento per la scala dei chemical shifts ?

- Come si distribuiscono i segnali nello spettro rispetto alle loro caratteristiche chimiche ?

- Cos’è il campo magnetico locale ?

- Descrivere i contributi alla costante di schermo.

- Che effetto ha l’elettronegatività di un atomo sulla posizione di un segnale?

- Descrivere l’effetto mesomero (di risonanza) in relazione al chemical shift.

- Quali sono gli effetti anisotropici dovuti ai legami chimici?

- Come si distribuiscono i chemical shift per una proteina foldata? E per una proteina denaturata ?

- Descrivere la distribuzione dei chemical shift per il nucleo dl carbonio.

- In quale applicazione è utilizzato lo spettro del deuterio ?

1. Accoppiamento scalare

- In quali situazioni un segnale può presentarsi come multipletto ?

- Spiegare come si origina l’accoppiamento scalare.

- Qual è la relazione tra energia e costante di accoppiamento ?

- Perché in un tripletto si osservano intensità relative 1:2:1 ?

- Rappresentare l’accoppiamento scalare nella notazione vettoriale della magnetizzazione.

- Come si prevede la molteplicità di un segnale ?

- Qual è l’effetto di più accoppiamenti non equivalenti ?

- L’accoppiamento 3J dipende da qualche angolo nella molecola ?

- Come si può utilizzare la costante JHNHa per ottenere informazioni strutturali su un peptide ?

- Per quanti legami si estende l’effetto dell’accoppiamento scalare ?

- Determinare la formula dell’isomero C3H7Br corrispondente allo spettro mostrato.

- Altri esempi di spettri da interpretare.

1. Rilassamento di spin

- In cosa consiste il rilassamento ?

- Come deve essere impostato l’intervallo tra una scansione ed un’altra in un esperimento NMR ?

- Qual è la funzione che descrive il ripristino della magnetizzazione longitudinale ?

- Cosa indica T1 ?

- Come si misura il rilassamento spin-reticolo?

- Cosa permette il rilassamento ?

- Come si manifesta il rilassamento spin-spin ?

- Quale funzione descrive il rilassamento trasversale ?

- Che relazione c’è tra larghezza di riga e rilassamento di spin ?

- Perché una molecola grande ha un segnale più largo rispetto ad una molecola piccola?

- Quale esperimento permette di misurare il rilassamento trasversale ?

1. Strumentazione e aspetti pratici

- Quali componenti costituiscono uno spettrometro NMR ?

- Quali caratteristiche deve avere (o non avere) un campione ?

- Quali operazioni sono necessarie allo strumento prima di eseguire un esperimento ?

- Come si calibra un impulso di 90° ?

- Quali vengono effettuate sullo spettro originale per migliorarne le caratteristiche ?

- Descrivere il problema del segnale del solvente.

- Descrivere il metodo della presaturazione per eliminare il segnale dell’acqua.

1. Metabolomica

- Definire la metabolomica

- Che relazione c’è tra metabolomica e le altre discipline ‘omiche’ ?

- Perché è utile studiare i metaboliti ?

- Qual è la numerosità di un metaboloma ?

- Quali tecniche si possono usare per analizzare un metaboloma ?

- Quali approcci si possono usare per studi metabolomici mediante NMR ?

- Come si prepara un campione per analisi metabolomica ?

- Come si possono indentificare i segnali di un profilo metabolico ottenuto mediante NMR ?

- A cosa servono le analisi statistiche multivariate ?

1. Esperimenti bidimensionali omonucleari

- Come si ottiene praticamente una seconda dimensione di frequenza?

- Come si presenta uno spettro bidimensionale?

- Spiegare l’effetto di una sequenza COSY su un sistema non accoppiato.

- Quali picchi sono informativi in un esperimento COSY ?

- Quale relazione esiste tra i nuclei che danno origine a picchi COSY?

- Che differenza c’è tra uno spettro COSY ed un TOCSY ?

- Quale relazione esiste tra i nuclei che danno origine a picchi NOESY?

- Interpretare spettri mostrati come esempio.

1. Esperimenti di correlazione eteronucleare

- Spiegare il trasferimento di polarizzazione mediante saturazione selettiva (SPT) in un sistema omonucleare accoppiato utilizzando il diagramma di livelli energetici

- Spiegare il trasferimento di polarizzazione mediante inversione selettiva (SPI) come sopra

- Spiegare il trasferimento di polarizzazione mediante saturazione selettiva (SPT) in un sistema eteronucleare accoppiato utilizzando il diagramma di livelli energetici

- Spiegare il trasferimento di polarizzazione mediante inversione selettiva (SPI) come sopra

- Come si può ottenere la rifocalizzazione delle due transizioni di un segnale accoppiato?

- Quale sequenza permette di ottenere trasferimento di polarizzazione mediante impulsi non selettivi?

- Come si può ottenere il trasferimento di polarizzazione simultaneamente per tutti i nuclei coinvolti?

- Spiegare la sequenza INEPT

- Spiegare l’esperimento HETCOR

- Quali sono gli elementi in comune tra le sequenze COSY e HETCOR?

- Che relazione c’è tra la sensibilità di un esperimento ed i rapporti giromagnetici dei nuclei eccitati e dei nuclei rilevati ?

- Qual è la sensibilità di un esperimento HSQC rispetto al corrispondente 1D eteronucleare?

1. NMR di proteine

- Quali informazioni si ottengono da uno spettro 1H-1D di una proteina ?

- Quali informazioni si ottengono da uno spettro 1H,15N-HSQC di una proteina ?

- Quali sono le regioni caratteristiche in uno spettro 1H,13C-HSQC di una proteina ?

- Descrivere il procedimento di assegnazione sequenziale basato su spettri 2D omonucleari.

- Descrivere lo spettro 1H,15N-HSQC-TOCSY.

- Descrivere lo spettro 1H,15N-HSQC-NOESY

- Descrivere il procedimento di assegnazione sequenziale basato su spettri 3D in doppia risonanza.

- Descrivere lo spettro 1H,15N,13C-HNCA

- Descrivere lo spettro 1H,15N,13C-HNCO

- Descrivere il procedimento di assegnazione sequenziale basato su spettri 3D in tripla risonanza.

1. Espressione di proteine ricombinanti e marcatura isotopica

- Quali passaggi sperimentali sono necessari per la produzione di proteine ricombinanti ?

- Scelta dell’organismo ospite.

- Criteri di scelta di un plasmide.

- Quali fattori possono essere variati nei test di espressione ?

- Come si ottiene l’arricchimento isotopico ?

- Come si ottiene un campione deuterato ?

- E’ possibile ottenere un arricchimento isotopico specifico per tipo di amminoacido ?

- Descrivere i principali metodi di purificazione del campione proteico.

- Quali spettri sono utili per valutare la qualità del prodotto ottenuto ?

1. Determinazione strutturale

- Quali sono i passaggi necessari per la determinazione della struttura di una proteina ?

- Descrivere l’effetto NOE e la sua dipendenza da fattori geometrici.

- Descrivere la dipendenza delle costanti di accoppiamento scalare da fattori geometrici.

- Descrivere la dipendenza del chemical shift da fattori geometrici.

- Qual è l’equazione centrale nella meccanica molecolare ?

- Come si introducono i vincoli strutturali sperimentali nell’equazione dell’energia ?

- Descrivere il problema della minimizzazione dell’energia.

- Cosa viene introdotto in dinamica molecolare rispetto alla meccanica ?

- A cosa serve il simulated annealing ?

- Perché il calcolo porta ad una famiglia di strutture ?

- Quale parametro definisce la precisione di una famiglia di strutture ?

- Quali sono altri parametri importanti per definire la qualità di una struttura ?

1. Dinamica di proteine

- Quali sono i moti di interesse in una proteina e quali scale di tempi riguardano ?

- In un equilibrio a due stati come si esprimono le costanti cinetiche e termodinamiche ?

- Da cosa è definita la scala di tempi in una osservazione NMR ?

- Come si manifesta su un segnale uno scambio chimico, in relazione alla scala di tempi ?

- Con quali esperimenti si può analizzare uno scambio chimico lento ?

- Descrivere come l’esperimento per la misura del tempo di rilassamento trasversale (CPMG) può rilevare anche informazioni su scambi chimici su scala intermedia.

- Come dipende la larghezza di riga dalla dimensione della molecola osservata ?

- Quali moti influenzano il rilassamento di spin ?

- Cos’è il parametro d’ordine ?

14-15) Interazione proteina-legante

- Descrivere l’equilibrio chimico di associazione proteina-legante ?

- Qual è l’andamento della frazione di proteina legante all’aumentare della concentrazione di legante ?

- Descrivere l’esperimento Saturation Transfer Difference

- Descrivere l’esperimento transfer-NOE

- Descrivere l’esperimento di misura della diffusione traslazionale.

- Quali informazioni si ottengono dall’esperimento HSQC nello studio delle interazioni ?

- Confrontare l’utilità degli esperimenti HN-HSQC ed HC-HSQC.

- Descrivere l’approccio SAR mediante NMR nell’ambito del drug discovery.

- Qual è l’utilità di misurare la mobilità interna di una proteina in seguito a formazione di complesso?

- A cosa serve ottenere un campione proteico deuterato ?

- Quali sono i vantaggi dei filtri spettroscopici in complessi proteina-legante ?

1. Interazione proteina-proteina

Mappatura delle superfici di interazione tramite chemical shifts.

Esperimenti di trasferimento di saturazione.

Scambio idrogeno/deuterio.

Rilassamento paramagnetico.

Il pricipio di data-driven docking.

1. NMR in cellula

Spettri di metaboliti.

Analisi di isotopomeri.

Esperimenti in cellule procariotiche ed eucariotiche.

Spettri di proteine in E.coli.

Metodi di produzione di campioni isotopicamente marcati in cellule eucariotiche.

1. NMR allo stato solido

- A cosa è dovuta la differenza di risoluzione di uno spettro in soluzione e in solido ?

- Come si possono rimuovere la maggior parte delle interazioni anisotropiche ?

- A cosa può servire la tecnica del disaccoppiamento ?

- Come influisce la velocità di rotazione del campione sulla qualità dello spettro ?

- Quali campioni possono essere osservati per NMR in solido ?

- Quali nuclei sono osservati principalmente in spettri bidimensionali ?

- E’ possibile ottenere informazioni strutturali da accoppiamento dipolare in solido ?

- Cosa comporta l’arricchimento isotopico di una proteina ottenuto mediante 1,3-13C-glicerolo e 2-13C-glicerolo ?

- Quali sono i maggiori successi ottenuti in ambito strutturale su campioni proteici ?

1. Risonanza magnetica per immagine

Quali sono le principali applicazioni della tecnica MRI?

Descrivere i fenomeni di rilassamento T1 e T2.

Qual è l’effetto di agenti paramagnetici sul rilassamento?

Descrivere la sequenza di impulsi di saturazione parziale.

Descrivere la sequenza di impulsi di inversion recovery.

Descrivere la sequenza di impulsi di spin-echo.

Come si ottiene informazione spaziale in MRI?

1. Il contrasto in MRI

Ottimizzazione dei parametri di acquisizione per migliorare il contrasto.

Immagini T1-pesate e T2-pesate.

Immagine pesate su densità protonica.

Definizione di agente di contrasto.

Agenti di contrasto paramagnetici.

Agenti di contrasto superparamagnetici.