



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO
Dipartimento di Farmacia

PhD Program
in **Drug Discovery and Development**
XXXVIII Cycle – Academic year 2024/2025

PhD Thesis in

***Classical and innovative applications of
NMR spectroscopy in the metabolomic
profiling of biological samples***

Candidate

Enza Napolitano

Tutor

Prof. *Anna Maria D'Ursi*

Co-Tutor

Dr. *Marco Tessari*

PhD Program Coordinator: Prof. *Alessandra Tosco*

Abstract

Metabolomics is an *omic* science with rapidly expanding applications, including drug discovery. Within this field, pharmacometabolomics has developed as a branch dedicated to studying drug-induced metabolic effects. It plays a crucial role in hypothesis generation, as demonstrated by its ability to uncover previously unrecognized pathways involved in drug action. A major strength of pharmacometabolomics lies in its use to explore cellular mechanisms of action (MoA), offering an unbiased alternative to traditional hypothesis-driven approaches that typically focus on specific receptors or isolated pathways. In contrast, untargeted metabolomics provides a comprehensive view of treatment-induced metabolic changes and can reveal unexpected or off-target effects.

As part of my PhD research, I investigated the *in vitro* biological MoA of nicotine and Nerve Growth Factor (NGF) using the potential of untargeted metabolomics. Employing SH-SY5Y neuroblastoma cells, I analyzed both the exometabolome (culture medium) and endometabolome (cellular extracts) following treatment with these molecules, which are of potential interest for Alzheimer's disease (AD) therapy.

As a preliminary step, we confirmed that exposure to recombinant amyloid- β peptide A β (1–42) reproduced in our model the key metabolic dysregulations characteristic of AD. We then evaluated whether nicotine and NGF could counteract these alterations. To capture the dynamic exchange of metabolites between compartments – essential for interpreting cellular function – we built for the first time a statistical model that combines the quantification matrices of intra- and extracellular metabolites.

Our findings demonstrate that nicotine exerts neuroprotective effects by restoring metabolic imbalances associated with AD pathology. In particular, nicotine reversed the majority of A β (1–42)-induced alterations, including disruptions in neurotransmission-related pathways, energy metabolism, and membrane phospholipid turnover. NGF, by contrast, exhibited neuroprotective activity primarily by reducing

glutamate and glycine concentrations and functioning as an early modulator of key biochemical pathways, thereby preventing redox disequilibrium and alterations in energy metabolism.

During my international research period, I further specialized in NMR spectroscopy with focusing on non-hydrogenative parahydrogen-induced hyperpolarization (nhPHIP). At the Magnetic Resonance Research Center of Radboud University, under the supervision of Dr. Marco Tessari, I conducted the first targeted and chiral metabolomic analysis of amino acid content in animal tissues using this approach. This technique enabled the discrimination between D- and L-amino acid enantiomers and revealed amino acid imbalances associated with altered D-aspartate levels. nhPHIP proved particularly valuable for this study, as several amino acids are directly or indirectly involved in neurotransmission. Taken together, the application of nhPHIP in this context highlights the potential of NMR hyperpolarization techniques for targeted metabolomics investigations of amino acid dysregulation.

La metabolomica è una scienza *omica* con applicazioni in rapida espansione, tra cui la scoperta di farmaci. All'interno di questo campo, la farmacometabolomica si è sviluppata come una branca dedicata allo studio degli effetti metabolici indotti dai farmaci. Essa svolge un ruolo cruciale nella generazione di ipotesi, come dimostrato dalla sua capacità di scoprire percorsi precedentemente sconosciuti coinvolti nell'azione dei farmaci. Uno dei principali punti di forza della farmacometabolomica risiede nel suo utilizzo per esplorare i meccanismi d'azione cellulari (MoA), offrendo un'alternativa imparziale agli approcci tradizionali basati su ipotesi che in genere si concentrano su recettori specifici o percorsi isolati. Al contrario, la metabolomica non mirata fornisce una visione completa dei cambiamenti metabolici indotti dal trattamento e può rivelare effetti inaspettati o *off-target*.

Nell'ambito della ricerca del mio dottorato, ho studiato il MoA biologico *in vitro* della nicotina e del fattore di crescita nervoso (NGF) sfruttando il potenziale della metabolomica non mirata. Utilizzando cellule di neuroblastoma SH-SY5Y, ho analizzato sia l'esometaboloma (terreno di coltura) che l'endometaboloma (estratto cellulare) dopo il trattamento con queste molecole, che sono di potenziale interesse per la terapia del morbo di Alzheimer (AD).

Come passo preliminare, abbiamo confermato che l'esposizione al peptide β amiloide ricombinante $A\beta(1-42)$ riproduceva nel nostro modello le principali disregolazioni metaboliche caratteristiche dell'AD. Abbiamo quindi valutato se la nicotina e l'NGF potessero contrastare queste alterazioni.

Per catturare lo scambio dinamico di metaboliti tra i compartimenti, essenziale per interpretare la funzione cellulare, abbiamo costruito per la prima volta un modello statistico che combina le matrici di quantificazione dei metaboliti intra ed extracellulari.

I nostri risultati dimostrano che la nicotina esercita effetti neuroprotettivi ripristinando gli squilibri metabolici associati alla patologia dell'AD. In particolare, la nicotina ha ripristinato la maggior parte delle alterazioni indotte dall' $A\beta(1-42)$, compresi gli effetti nei *pathway* legati alla neurotrasmissione, al metabolismo energetico e al ricambio dei fosfolipidi di membrana. L'NGF, al contrario, ha mostrato attività neuroprotettiva principalmente riducendo le concentrazioni di glutammato e

glicina e funzionando come modulatore precoce delle vie biochimiche chiave, prevenendo così lo squilibrio redox e le alterazioni nel metabolismo energetico.

Durante il mio periodo di ricerca internazionale, mi sono ulteriormente specializzata nella spettroscopia NMR concentrandomi sulla *non-hydrogenative parahydrogen-induced hyperpolarization* (nhPHIP). Presso il Centro di ricerca sulla risonanza magnetica dell'Università Radboud, sotto la supervisione del dottor Marco Tessari, ho condotto la prima analisi metabolomica mirata e chirale del contenuto di aminoacidi nei tessuti animali utilizzando questo approccio. Tale tecnica ha permesso di distinguere tra enantiomeri D e L degli aminoacidi e ha rivelato squilibri aminoacidici associati a livelli alterati di D-aspartato

nhPHIP si è rivelato particolarmente prezioso per questo studio, poiché diversi aminoacidi sono direttamente o indirettamente coinvolti nella neurotrasmissione. Nel complesso, l'applicazione di nhPHIP in questo contesto evidenzia il potenziale delle tecniche di iperpolarizzazione NMR per indagini metabolomiche mirate sulla disregolazione degli aminoacidi.