



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

Scuola di Scienze  
Matematiche, Fisiche e Naturali

corso di laurea magistrale

**Biotechnologie molecolari**

## Programma dei Corsi

### **Analisi dei processi biologici con approccio bioinformatico (Prof. Matteo Ramazzotti)**

Analisi funzionale di dati high-throughput. Biostatistica (univariata e multivariata). Sistemi di integrazione (geni, trascritti, proteine, metaboliti). Applicazioni in genomica, metagenomica, trascrittomica, proteomica e metabolomica. Over Representation Analysis. Functional Class Scoring. Topology analysis. Ricostruzione metabolica, biomodelli e analisi dei flussi.

### **Biofisica cellulare e molecolare (Prof. Massimo Reconditi)**

Biofisica molecolare. Il mondo a livello microscopico: forze determinanti per la struttura, il movimento e l'interazione tra macromolecole biologiche. Importanza delle forze di tipo viscoso: la vita a bassi numeri di Reynolds. Random walk e diffusione: derivazione dell'eq di Fick. Biofisica cellulare. Potenziale elettrochimico: derivazione dell'eq di Nernst-Planck e integrazione attraverso la membrana cellulare. L'eq di Goldman e l'equilibrio multi-ionico nella cellula. Generazione e propagazione dell'impulso nervoso: i canali ionici. Motilità cellulare: muscolo e motori molecolari. Tecniche biofisiche. Diffrazione a raggi X: principi generali; determinazione di strutture molecolari tramite cristallografia; diffrazione da fibre: studio strutturale della contrazione muscolare. Fluorescenza e anisotropia di fluorescenza applicata allo studio dei movimenti intra ed intermolecolari.

### **Biotechnologie applicate a cellule eucariote con laboratorio (Prof.ssa Francesca Magherini)**

Introduzione ai diversi sistemi cellulari: lieviti, cellule di insetto, linee cellulari umane, cellule staminali, cellule tumorali. Mantenimento di colture in vitro, in sospensione e in adesione. Cellule staminali: mantenimento, supporti, co-colture, fattori di crescita, meccanismi molecolari di differenziamento, cellule staminali embrionali (ESC), e dell'adulto (ASC), cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC). Colture su supporti tridimensionali, sferoidi, organoidi e loro applicazioni. Lievito: condizioni di crescita e mantenimento, manipolazione genetica, espressione di proteine ricombinanti, sistemi di induzione. Cellule di insetto: caratteristiche e crescita di colture, manipolazione genetica tramite infezione di baculovirus, espressione di proteine. Linee cellulari di mammifero: crescita e mantenimento, tecniche di trasfezione. Metodi di espressione in cellule di mammifero: promotori costitutivi e inducibili, Tet-On/Tet-Off, espressione di proteine ricombinanti, secrezione, modificazioni post-traduzionali. Metodi per la selezione di linee cellulari stabili, marker di selezione, reporter fluorescenti. Manipolazione genetica mediante uso di trasposoni. Tecniche di genome editing: zinc finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs), sistema CRISPR/Cas9.

### **Genomica e biologia dei sistemi (Prof. Alessio Mengoni)**

Introduzione alla biologia dei sistemi. Riduzionismo ed olistico. Network e loro rappresentazioni. Proprietà dei grafi. Complessità e misure. Indice di Shannon. Contenuto genico nei genomi di Archei, Batteri ed Eucarioti. Il DNA ripetuto. I genomi nucleari e degli organelli. Genomica comparata ed evoluzione delle cellule. Il genoma minimo. Evoluzione dei geni. Famiglie geniche. Le strutture genomiche di ordine superiore: le isocore. Evoluzione dell'architettura dei genomi. Principi di analisi di genomica funzionale. Studio dell'espressione genica. Il concetto di gene e la genomica funzionale. Il controllo dell'espressione genica in

una visione genomica. Trascrittomica comparata. Modelli metabolici da dati genomici. Analisi statistica della variabilità genomica. La genomica ambientale: scoperte ed applicazioni. Tecniche bioinformatiche per lo studio della struttura e della funzione del genoma. Metodi computazionali in omica integrata

### **Immunologia e tecniche immunologiche (Prof.ssa Annarosa Arcangeli)**

La risposta immunitaria naturale e acquisita. Le immunoglobuline: struttura e funzione. La produzione e ingegnerizzazione di anticorpi e frammenti anticorpali. Le cellule dell'immunità naturale e dell'immunità acquisita: aspetti morfologici e molecolari. La maturazione dei linfociti B e dei linfociti T. Aspetti molecolari e biofisici della attivazione linfocitaria: il ruolo dei canali ionici nella attivazione dei linfociti T e B. Basi biologiche e meccanismi patogenetici delle malattie da ipersensibilità, delle malattie autoimmuni e delle immunodeficienze

Le principali tecniche immunologiche (lezioni teoriche e pratiche): colture cellulari, produzione di anticorpi monoclonali (tecniche in vitro e in vivo), citofluorimetria, immunofluorescenza, immunoistochimica, la tecnologia del DNA ricombinante applicate alla immunologia, test Elisa etc.

### **Interazioni biomolecolari: metodi in silico ed in vitro**

#### **Interattomica: struttura, termodinamica e cinetica (Prof.ssa Paola Turano)**

Le interazioni tra proteine ed altre molecole sono alla base di tutti i processi biologici e la determinazione dell'interattoma di un organismo vivente fornisce la cornice necessaria alla comprensione della biologia come sistema integrato. Il corso si propone di affrontare gli aspetti termodinamici e cinetici alla base delle interazioni biomolecolari quali quelle proteina-proteina, proteina-acido nucleico, proteina-piccola molecola, proteina-ione-metallico, proteina-membrana. Saranno affrontati i principali approcci metodologici per l'identificazione di partner nell'interazione, per l'ottenimento di informazioni strutturali su addotti intermolecolari, e per la definizione dell'entità delle interazioni tra biomolecole. Saranno descritti i principi della metabolomica, intesa come analisi sistematica delle piccole molecole nei campioni biologici.

#### **Proteine e loro interazioni con laboratorio (Prof.ssa Francesca Cantini, Dott.ssa Silvia Ciambellotti)**

Tecniche di over-espressione di proteine ricombinanti in organismi batterici: vettori di espressione, strategie per incrementare la quantità di proteina espressa, ceppi cellulari, promotori, induzione dell'espressione, proteine di fusione. Espressione cell-free. Produzione di proteine di membrana e di proteine per l'ottimizzazione della produzione di vaccini. Arricchimento isotopico di proteine ricombinanti. Tecniche di marcatura isotopica uniforme e selettiva. Modificazioni post-traduzionali di proteine. Metalloproteine e cenni sull'omeostasi dei metalli. Caratterizzazione delle interazioni proteina-proteina o proteina-piccola molecola o proteina-ione metallico. Programmi di docking per la caratterizzazione in silico dell'interazione proteina-proteina.

Laboratorio: produzione e purificazione di due proteine ricombinanti. Esperienza di calorimetria (ITC); esperienza di dicroismo circolare su proteine contenenti cluster Fe-S. Acquisizione di spettri NMR per la caratterizzazione dell'interazione proteina-metallo e proteina-proteina. In particolare, l'esercitazione prevede l'acquisizione ed analisi degli esperimenti NMR acquisiti sulle proteine prodotte in laboratorio e mappatura delle variazioni dei chemical shifts sulla loro struttura 3D. I dati ottenuti verranno utilizzati come input in programmi di docking

### **Metodi ottici in biologia con laboratorio (Prof. Marco Capitanio, Dott. Riccardo Cicchi)**

Introduzione

1. Luce e proprietà (3 ore) – Radiazione Elettromagnetica – Campo Elettromagnetico - Onde – Equazioni di Maxwell – Proprietà della Radiazione Elettromagnetica: monocromaticità, coerenza, polarizzazione - Dualismo onda-corpuscolo - Fotoni – Spettro ed Energia - Indice di rifrazione – Interferenza

2. Ottica Geometrica (3 ore) – Postulati dell'ottica geometrica – Principio di Fermat – Riflessione da uno specchio piano, sferico, parabolico e ellittico – Rifrazione tra due mezzi separati da una superficie piana – Legge di Snell – Rifrazione da una superficie sferica – lenti sottili convergenti e divergenti – formazione delle immagini – telescopio
3. Molecole e interazione con luce (3 ore) - Struttura elettronica – Interazione con luce – Assorbimento – Scattering Rayleigh – Fluorescenza – Cenni di Spettroscopia – Spettri e Stokes shift - Struttura molecolare roto-vibrazionale – Scattering Raman – Fosforescenza – Intersystem crossing e Photo-bleaching Microscopia
4. Il microscopio ottico (3 ore) – Componenti di un microscopio ottico – Epi e trans-illuminazione – sorgenti – condensatori – Illuminazione critica e illuminazione Koehler – Rivelazione – Obiettivo, tube lens, oculari – Apertura numerica, risoluzione e profondità di campo – microscopia in fluorescenza – telecamere.
5. Microscopia a scansione laser confocale (3 ore) – Assorbimento – Emissione spontanea – Emissione stimolata – Principio del Laser – Ottica del laser scanning – Laser scanning vs wide field – Microscopio confocale – Risoluzione spaziale – Sezionamento ottico – Sistemi di scansione (Disco di Nipkow – Specchi galvanometrici – Deflettori acusto-ottici – Specchi poligonali) – Rivelatori (fotodiodi – APD- fotomoltiplicatori) – Spectral imaging – Spectral unmixing
6. Applicazioni biologiche della microscopia in fluorescenza (3 ore) - Immuno labeling – Preparazione campioni – Selezione anticorpi e fluorofori – Coloranti organici compartimento specifici – Selezione filtri – Genetic labeling – Proteine fluorescenti: GFP e varianti
7. Microscopia in fluorescenza (TIRFM – FLIM - FRET) (3 ore) – Rifrazione e Riflessione interna totale – Onda evanescente - Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (principi base) – Schema ottico per la TIRFM – Applicazioni biologiche della TIRFM – Fluorescenza e Vita Media – Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy – FLIM nel dominio dei tempi – FLIM nel dominio delle frequenze – FRET (Foster Resonance Energy Transfer) – Accettore e Donatore – Interazione molecolare e trasferimento di energia – Efficienza e raggio di Foster – Quenching del donatore
8. Microscopia a due fotoni (3 ore) – Microscopia lineare e Microscopia non-lineare – Fluorescenza a due fotoni - Confronto con la microscopia Confocale – Risoluzione – Profondità di penetrazione – Sorgenti laser impulsate – Tessuti e fluorofori endogeni – Descanning e Non-descanning – Microscopia in Seconda-armonica – Somma coerente – Emissione angolare – Sorgenti endogene di SHG – Scansione in polarizzazione
9. Optical manipulation #1 (2 ore) – Meccanica dei sistemi biologici: rivelazione, regolazione e adattamento dei sistemi biologici a stimoli meccanici – Meccanotrasduzione – Esempi di meccanica dei sistemi biologici: motori molecolari, muscolo, orecchio, cellule staminali – Forze in biologia – diffusione – Dinamica delle molecole biologiche in cellula – Meccanismi molecolari di regolazione meccanica.
10. Optical manipulation #2 (2 ore) – Pinzette ottiche (optical tweezers) – Forze negli optical tweezers – Rivelazione di movimento – Calibrazione – Configurazioni di misura di forza e spostamento su singole molecole biologiche con optical tweezers: single-trap, double-trap, and three-bead assay – misura di forza e passo di singoli motori molecolari – proprietà meccaniche del DNA – Force-clamp
11. Optical manipulation #3 (2 ore) – Risoluzione spaziale negli optical tweezers – Rumore termico e strumentale – Risoluzione temporale negli optical tweezers – tempo di rilassamento – tempo morto – ultra-fast force-clamp
12. Microscopia Vibrazionale (3 ore) – Struttura molecolare – Scattering Rayleigh vs Scattering Raman – Spettroscopia Raman - Fingerprint molecolare - Micro-spettroscopia Raman – Clustering – Applicazioni – Coherent Antistokes Raman Scattering (CARS) microscopy – Principi del CARS – Sorgenti al ps – Detuning – Applicazioni – Imaging di lipidi – Imaging non-lineare multimodale – Schema ottico e limitazioni – Stimulated Raman Scattering (SRS) microscopy – Pump & Stokes – Modulazione e lock-in – Applicazioni
13. Microscopia di singola molecola (3 ore) – Limite di diffrazione – Risoluzione e Point Spread Function (PSF) – Localizzazione di singole molecole biologiche (FIONA) – Colocalizzazione (SHREC) – Single Particle Tracking (SPT) – Mean square displacement (MSD) – SHRIMP – Combinazione di localizzazione e manipolazione di singola molecola – localizzazione 3D

14. Super-risoluzione ottica (3 ore) – Metodi di super-risoluzione basati sulla localizzazione di singole molecole: PALM e STORM – Metodi di super-risoluzione depletion-based: STED e RESOLFT – Super-risoluzione 3D – applicazioni biologiche

### **Metodologie di sintesi di molecole bioattive (Prof. Marco Marradi, Prof. Andrea Trabocchi)**

Introduzione al corso. Importanza della sintesi di laboratorio di composti organici bioattivi. Concetti di base della sintesi organica: principali strategie di sintesi, isolamento e di purificazione, gruppi funzionali, gruppi protettori, reazioni di base, atom economy, click chemistry.

Fondamenti di stereochimica, isomeria configurazionale, conformazionale ed attività farmacologica. Caratteristiche generali degli amminoacidi e dei peptidi. Esempi di peptidi bioattivi. Gruppi protettori nella sintesi peptidica. Formazione del legame peptidico: metodi di attivazione e accoppiamento. Sintesi in soluzione e in fase solida. Studi conformazionali: metodologie CD, NMR, IR per definire la conformazione secondaria del peptide. Peptidomimetici: ruolo e caratteristiche. Sintesi di peptidomimetici mediante l'utilizzo di amminoacidi non naturali e sintesi di foldameri.

Chimica combinatoria applicata a librerie di peptidi. Analisi dei peptidi. Preparazione di librerie di composti organici e metodi di screening biologico.

Tecniche di bioconiugazione per il monitoraggio e studio di biomolecole attraverso la formazione di legami covalenti con molecole di facile rilevamento e radionuclidi. Importanza e applicazioni delle tecniche di bioconiugazione nelle discipline proprie delle scienze della vita.

Analisi dei gruppi funzionali disponibili per la bioconiugazione e strategie di sintesi impiegabili per esprimere su di esse gruppi funzionali non normalmente presenti nelle biomolecole di principale interesse, peptidi e proteine, zuccheri e polisaccaridi, acidi nucleici ed oligonucleotidi. Proprietà utilizzate per il rilevamento: assorbimento, radioattività, fluorescenza, marcatori della biotina, seguite dall'esame delle principali molecole capaci di esprimere tali proprietà anche alla luce della loro reperibilità in commercio. Tipologie di fluorofori e applicazioni in bioconiugazione: fluoresceine, rodamine, cianine, cumarine.

Imaging molecolare: Principi generali di Imaging Molecolare, principali tecniche di Imaging (MRI, PET, SPECT, CT, fluorescenza), sonde per Imaging Molecolare (agenti di contrasto per MRI, traccianti PET, SPECT), applicazioni dell'Imaging Molecolare in ambito Oncologico, Cardiovascolare, Neurologico. Tecniche di bioconiugazione covalente e non covalente per "Antibody Drug Conjugates" (ADC) e nanoparticelle (NP). Definizione e classificazione di NP ("soft", "hard", "hybrid"); cenni di sintesi e caratterizzazione chimica e chimico-fisica di NP e caratterizzazione biologica in vitro. NP come vettori per somministrazione di farmaci (anticancro, "gene delivery", vaccini, ecc.) e NP con risposta a stimoli per "smart delivery". Uso di NP in imaging molecolare e multimodale (SPION, QD, Gd-NP, funzionalizzate con fluorofori, radionuclidi, ecc.) NP multifunzionali. Modifica di zuccheri e glicoconiugati: gliconanotecnologia.

### **Proteomica (Prof.ssa Anna Caselli)**

Il Proteoma. Strategie per lo studio proteomico. Preparazione del campione. Elettroforesi bidimensionale. Rivelazione delle proteine su gel. Tecniche di western-blotting. Analisi delle immagini. Tecniche cromatografiche (HPLC). Spettrometria di massa applicata all'analisi di proteine: metodi di ionizzazione e analizzatori. Digestione in-gel e finger print. Identificazione di proteine. Metodi per il sequenziamento polipeptidico. Accoppiamento LC-MS. LC-MS/MS. Analisi quantitativa delle proteine. Metodi per l'analisi proteomica differenziale (DIGE; ICAT, iTraQ..). SILAC. Modificazioni covalenti delle proteine e loro analisi. Proteomica differenziale e funzionale. Protein arrays. Analisi in vitro e in vivo dei complessi proteici. Identificazione e caratterizzazione dei siti di interazione.

## **Drug discovery (Prof. Andrea Trabocchi)**

Introduzione al drug discovery; identificazione del target e del ligando; screening virtuale; drug discovery basato su frammenti; trasformazioni del lead; isosteria e bioisosteria; chimica combinatoria e sintesi orientata alla diversità molecolare; microarray; introduzione al QSAR; sintesi di peptidi e SPPS; esempi di studio: HIV e angiogenesi; molecular modeling; principi di analisi conformazionale; database PDB e PubMed; visualizzazione di macromolecole; principi ed applicazioni di docking molecolare; principi di brevettazione; esercitazioni di analisi conformazionale e docking molecolare.

## **Modellistica applicata a molecole di interesse biologico (Prof. Piero Procacci)**

### LEZIONI FRONTALI

Descrizione introduttiva del corso e delle modalità di esame.

Definizione atomistica del sistema farmaco-recettore, funzioni potenziale su spazi multidimensionali

Potenziale bonded (di valenza) e non bonded INTRAmolecolare per ligando e recettore

Potenziale di interazione NonBonded farmaco proteina in solvente implicito

Principi elementari di termodinamica statistica. Insieme microcanonico ed entropia statistica

Insieme canonico e definizione statistica dell'energia libera di Helmholtz Funzione di partizione traslazionale di un gas ideale monoatomico

Funzione di partizione di un gas di molecole non interagenti o di una soluzione ideale. Funzione di partizione elettronica, vibrazionale, rotazionale e traslazionale

Equilibrio chimico  $A+B=AB$ ; costante di dissociazione e funzioni di partizione molecolari in solvente implicito

Energia libera di dissociazione farmaco-proteina come somma di contributi elettronico vibrazionale rotazionale e traslazionale

Calcolo del contributo traslazionale e rotazionale nell'energia libera di dissociazione farmaco-proteina. Energia libera "cratica".

Calcolo del contributo vibrazionale nell'energia libera di dissociazione ed eliminazione dell'energia libera "cratica". Formulazione finale dell'energia libera di dissociazione in ambito RRHO.

### LEZIONI DI LABORATORIO INFORMATICO

Set-up degli account ed ambiente di lavoro. Comandi unix da terminale: pwd, cd, ls, cp, cat; breve introduzione a VMD ed emacs

Esercitazione comandi linux da terminale: grep, less, awk, sed e concatenazione di comandi con "|" ">" e "

Esercitazione: database PDB (proteine) e PUBCHEM (ligandi). Strutture casuali farmaco-proteina generate per combinazione di file PDB e PUBCHEM visualizzate con s/w per visualizzazione grafica di sistemi di interesse biologico VMD

Download e compilazione del un programma "open-source" ORAC di Meccanica Molecolare applicata su sistemi di interesse biologico.

Manipolazione traslazionale (moveby) con VMD/tcl ["set menu tkcon" per la generazione della console VMD/tcl]

Calcolo del COM via VMD/tcl e rotazione del ligando nella tasca di legame.

Lezione di recupero/ripasso VMD/tcl; set, moveby, ROT (subroutine), writpdb

Esercitazione riassuntiva VMD/tcl su FKBP12 con toluene

Esercitazione di meccanica molecolare con ORAC: analisi del file di input ed esecuzione dei file test; generazione di un file topologico per il ligando. Corrispondenza dei label atomici nel file PDB del ligando e nelle specifiche topologiche nel file "tpg".

Esercitazione meccanica molecolare con ORAC: modifica dei file di input e minimizzazione di strutture di ligando e proteina PUBCHEM/PDB

Esercitazione meccanica molecolare con ORAC: preparazione VMD/tcl del complesso-posa ed ottimizzazione di struttura

Esercitazione di prova complessiva per il calcolo della costante di affinità.

Esercitazione individuale finale Comprende: 1) Download di un file PDB dal database RCSB Protein Data Bank 2) sua manipolazione con comandi concatenati unix al fine di isolare la sola struttura del recettore eliminando commenti, eteroatomi e strutture alternative 3) Download del file del ligando in formato SDF dal database pubblico PUBCHEM e sua conversione in formato PDB con babel/primadorac 4) minimizzazione di ligando e recettore con il s/w ORAC/MD. 5) generazione della "posa" utilizzando il s/w VMD 6) minimizzazione della struttura del complesso con ORAC/VMD 7) calcolo della energia libera standard di dissociazione (vedi dispense).