



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

Scuola di Scienze
Matematiche, Fisiche e Naturali

corso di laurea magistrale

Biotecnologie molecolari

Argomenti di tirocinio/tesi

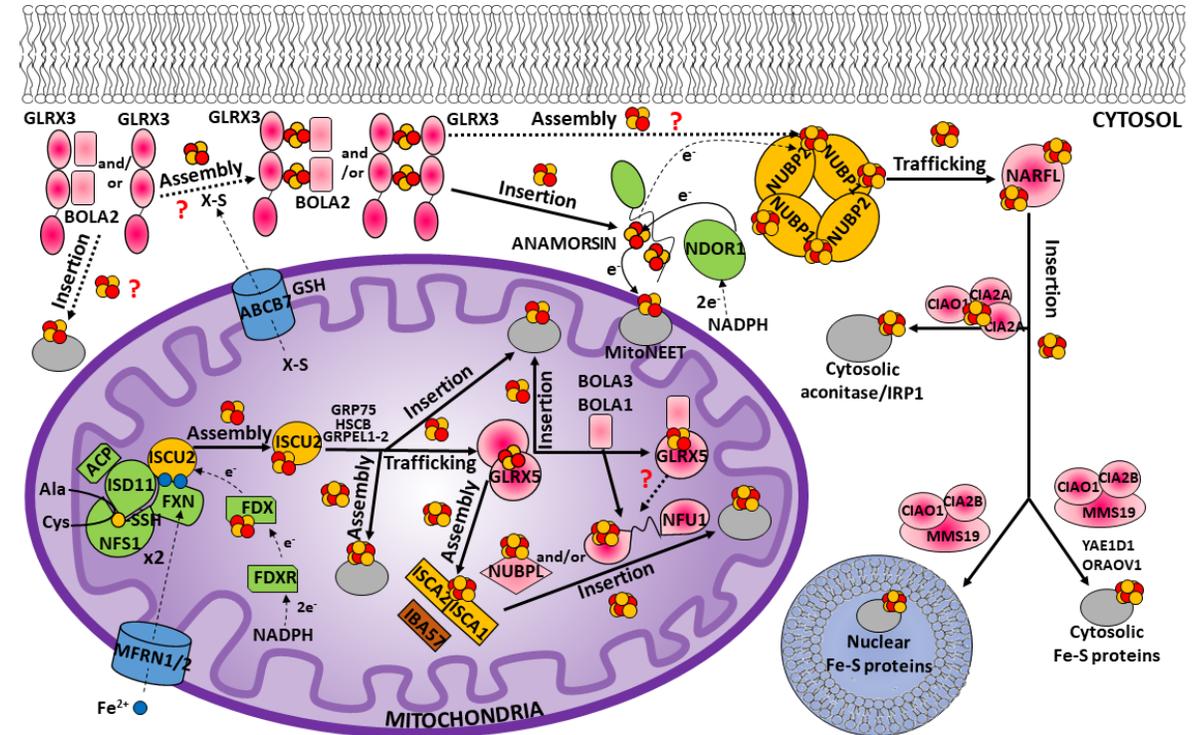
CdS Biotecnologie Molecolari

Università degli Studi di Firenze

Produzione e caratterizzazione di proteine coinvolte nelle biogenesi dei clusters Fe/S

I cluster Fe-S sono cofattori essenziali presenti in quasi tutti gli organismi viventi. Negli eucarioti, le proteine con cluster Fe-S sono presenti nel mitocondrio, nel citosol e nel nucleo. La sintesi dei cluster Fe-S e il loro inserimento nelle apo-proteine coinvolge un complesso network di proteine mitocondriali e citosoliche. Il malfunzionamento di alcune delle proteine coinvolte nella biogenesi dei cluster Fe-S è la causa di gravi malattie mitocondriali. Il progetto riguarda lo studio di alcune proteine citosoliche umane coinvolte nella biogenesi dei cluster Fe-S. Le proteine clonate, espresse e purificate tramite tecniche di DNA ricombinante saranno studiate tramite varie tecniche quali, cromatografia ad esclusione molecolare, UV-VIS, dicroismo circolare e EPR. Lo studio dell'interazione tra proteine leganti i cluster Fe-S permetterà di comprendere a livello molecolare come avviene il trasferimento del cluster alla proteina target. Inoltre la spettroscopia NMR e la cristallografia a raggi X potranno essere utilizzate per caratterizzare strutturalmente a livello atomico sia le singole proteine di interesse che i suoi complessi proteici

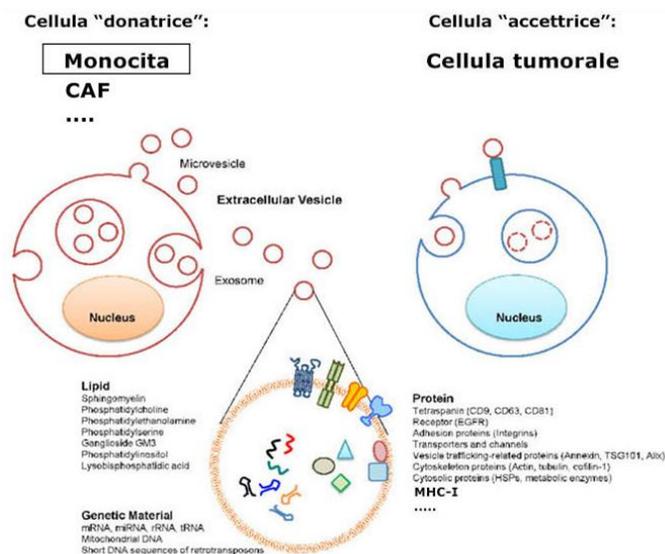
Scopo del presente argomento di tirocinio/tesi è la caratterizzazione biofisica, strutturale e dinamica di proteine umane coinvolte nella biogenesi dei cluster Fe/S e loro complessi mediante un approccio integrato.



Referente: Prof.ssa Francesca Cantini (CERM, Dipartimento di Chimica), cantini@cerm.unifi.it
È disponibile da subito 1 posizione, tempistiche da concordare con lo studente

CROSS-TALK NEL MICROAMBIENTE TUMORALE

I tumori solidi sono tessuti complessi costituiti da cellule cancerose altamente eterogenee e da molti altri tipi cellulari (es. Fibroblasti Attivati dal Cancro o CAFs e cellule del sistema immunitario) inseriti in una caratteristica matrice. Globalmente si parla di "microambiente tumorale". Nel microambiente tumorale le cellule comunicano fra loro attraverso vari sistemi quali ad esempio la secrezione di fattori solubili e di vescicole extracellulari, EVs. EVs rilasciate da cellule quali CAFs o monociti, possono essere captate ed incorporate dalle cellule cancerose, che in questo modo acquisiscono "nuovo" materiale biologico (proteine, lipidi e acidi nucleici) modificando, conseguentemente, alcune delle loro caratteristiche.



OBIETTIVI DELLA RICERCA

- Studio del proteoma delle EVs
- Studio delle variazioni del proteoma delle cellule tumorali dopo incorporazione di EVs
- Analisi del ruolo delle proteine acquisite dalle cellule tumorali tramite Evs

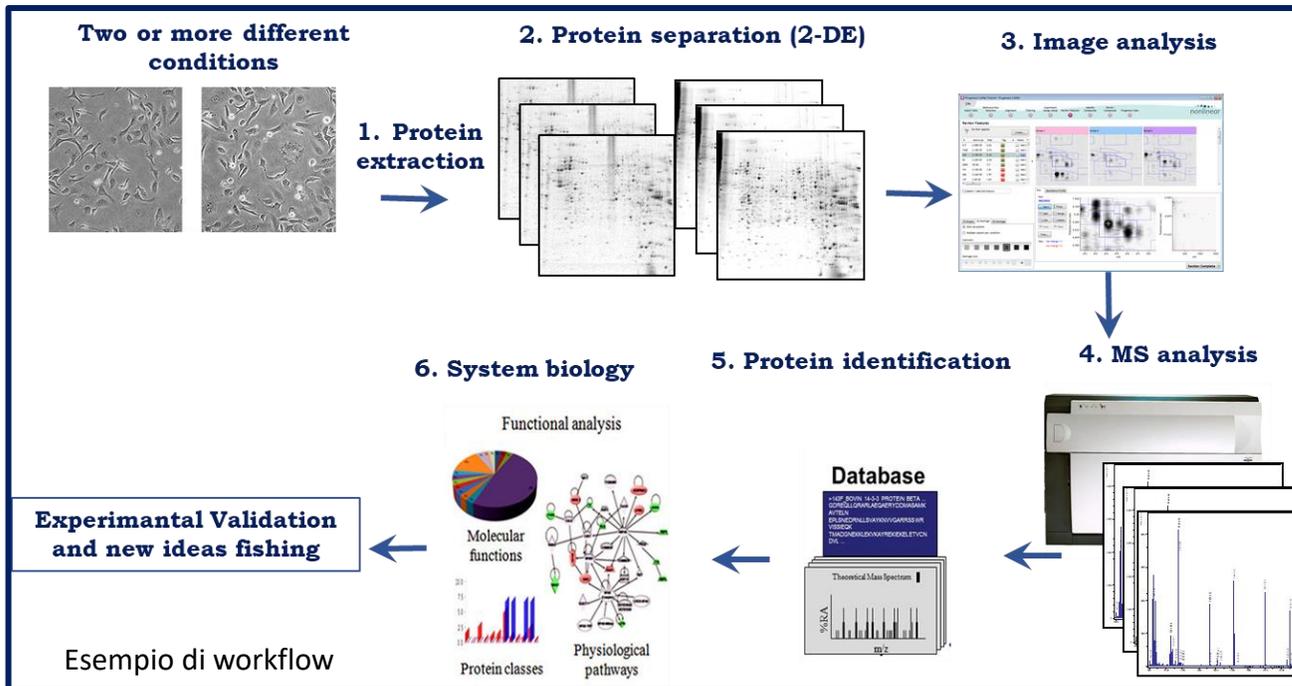
Referente: Prof.ssa Anna Caselli

Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche
Sez. Biochimica
anna.caselli@unifi.it

Laboratorio di proteomica funzionale e biologia applicata

La nostra ricerca si basa principalmente sull'utilizzo di tecniche di proteomica e redox-proteomica (in particolare elettroforesi bidimensionale e spettrometria di massa) in due contesti principali:

- ❖ Studio dell'attività citotossica e potenzialmente antitumorale di composti dell'oro in linee cellulari di cancro ovarico.
- ❖ Studio delle modificazione di espressione proteica e di ossidazione proteica nel muscolo in condizioni fisiologiche (esercizio fisico) o patologiche (distrofia muscolare).



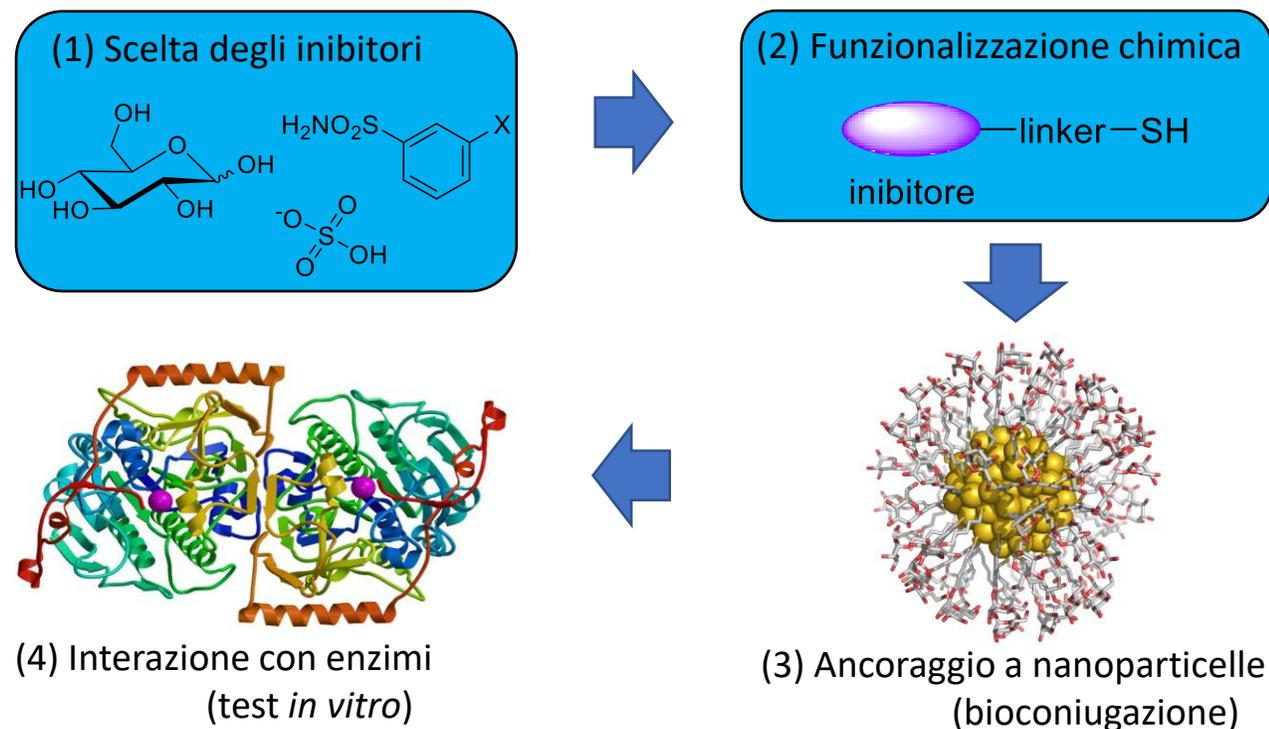
Referente: Prof.ssa Francesca Magherini
(Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche Mario Serio),
francesca.magherini@unifi.it

Nanoparticelle di oro decorate con molecole biologicamente attive: potenziali modulatori di enzimi coinvolti in processi patologici

Lo sviluppo di nuovi sistemi multivalenti per la modulazione dell'attività di enzimi coinvolti in processi patologici, per es. il corretto *folding* della solfatasi GALNS mutata (implicata in malattie da accumulo lisosomiale) e l'inibizione selettiva di specifiche isoforme di anidrasi carbonica CA (implicate nella diffusione di metastasi tumorali), può portare all'ottenimento di nuovi farmaci.

Lo scopo del progetto è funzionalizzare inibitori noti (benzensolfonammidi per CA e solfati per GALNS) con linker tiolati per il successivo ancoraggio su nanoparticelle. La presentazione multivalente degli inibitori sarà modulata (i) modificando la loro densità rispetto ai componenti interni (zuccheri) e (ii) mediante variazione della lunghezza e della natura dei linker. I nuovi nanosistemi multivalenti saranno caratterizzati e testati in saggi di inibizione sugli enzimi CA e GALNS, paragonando la loro attività con gli inibitori monovalenti. Ci si aspetta un aumento dell'interazione per effetto multivalente.

Rif: Marradi *et al.* *Org. Biomol. Chem.* 2018, 16, 8604.



Referente: Prof. Marco Marradi (Dipartimento di Chimica)
marco.marradi@unifi.it

È disponibile da giugno 1 posizione, tempistiche da concordare con lo studente.

Microscopia di super-risoluzione in batteri e cellule eucariote

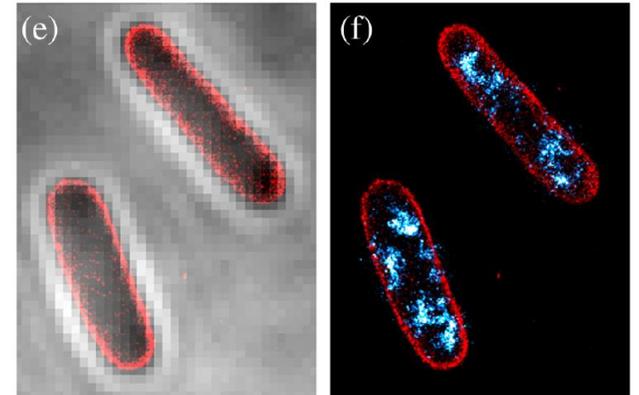
Le tecniche di super-risoluzione sono tecniche avanzate di microscopia ottica a fluorescenza che consentono di ottenere immagini con risoluzione ben al di sotto del limite di diffrazione della luce. Tali tecniche negli ultimi anni si sono rivelate fondamentali per l'osservazione di strutture cellulari di dimensioni anche di pochi nanometri e per lo studio delle interazioni tra proteine che avvengono su scale spaziali nanometriche.

Scopo del presente argomento di tirocinio/tesi è l'applicazione delle tecniche di microscopia di super-risoluzione allo studio di alcuni temi di impatto quali:

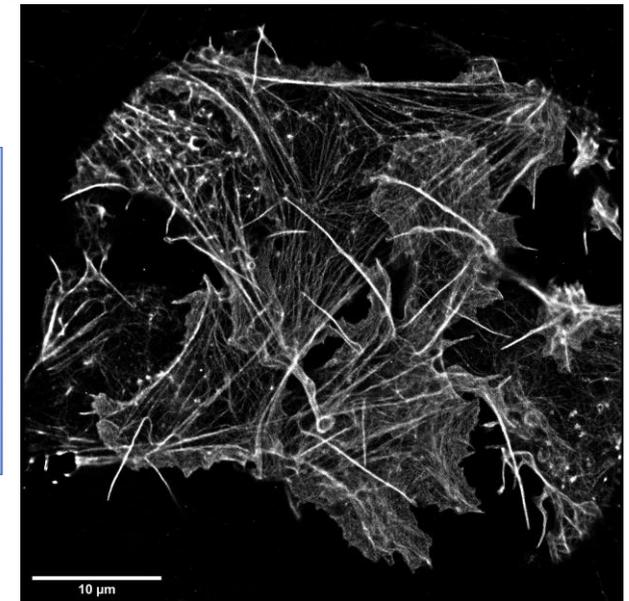
i) Lo studio dei meccanismi molecolari alla base dell'aumentata resistenza agli antibiotici di batteri organizzati in biofilm

ii) lo studio dell'organizzazione del citoscheletro di actina in prossimità di canali di membrana meccanosensibili in cellule di mammifero e gli effetti di tale organizzazione sulla mobilità delle cellule

iii) lo studio della localizzazione di proteine segnale coinvolte in processi cellulari fondamentali, come ad esempio ERK5, e la loro interazione con il DNA nel nucleo delle cellule.



Referente: Prof. Marco Capitanio
(Dipartimento di Fisica e
Astronomia), capitanio@lens.unifi.it
È disponibile da subito 1 posizione,
tempistiche da concordare con lo
studente

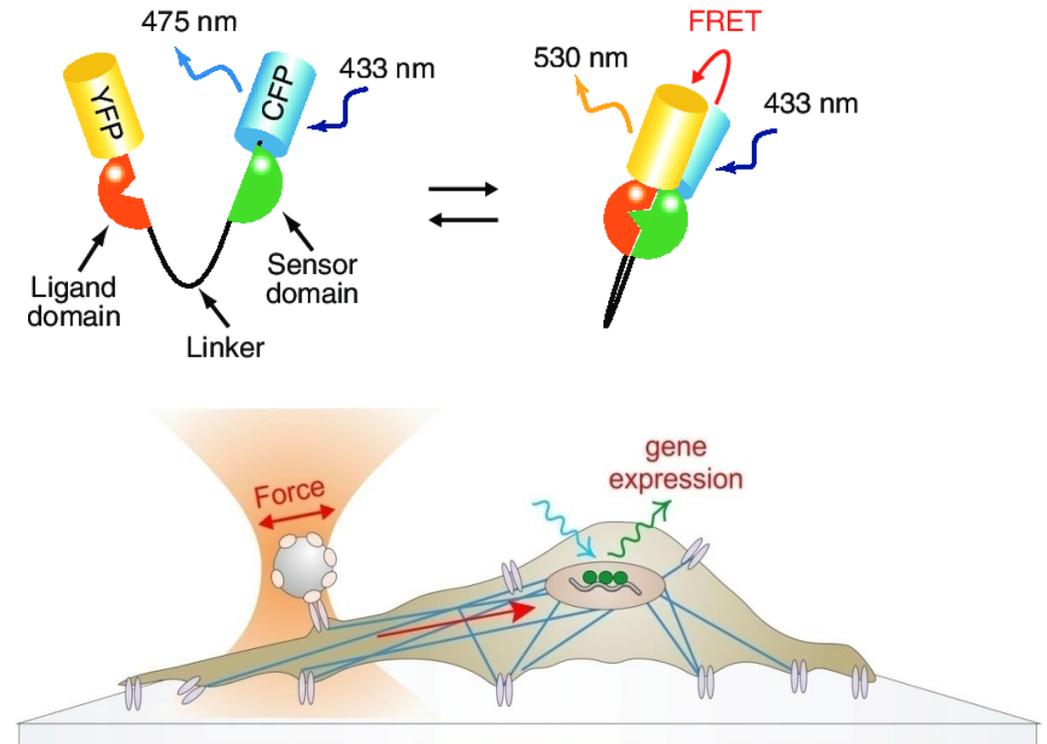


Studio dei meccanismi molecolari della meccanotrasduzione dalla singola molecola alle cellule viventi

Nelle cellule viventi, la presenza di uno stimolo meccanico è in grado di indurre una risposta immediata, sia essa associata alla generazione di correnti ioniche o all'attivazione di pathway di segnalazione intracellulare. Tale stimolazione, se protratta, può portare all'attivazione di specifici geni e quindi, su tempi lunghi, alla manifestazione di caratteri fenotipici alterati.

I dettagli molecolari del processo di meccanotrasduzione in cellule viventi sarà studiato mediante l'utilizzo di un sistema che consente la stimolazione di recettori di membrana cellulare tramite optical tweezers e real time imaging su un ampio intervallo di scale temporali e di sensibilità.

Da un punto di vista molecolare, la tensione intracellulare di specifiche proteine target sarà inoltre misurata mediante l'utilizzo di sensori di forza basati sulla FRET. Questi ultimi sono stati già precedentemente sviluppati per proteine meccanosensitive quali la spettina e altre proteine che legano l'actina. Con tali sensori sarà possibile stimare le forze locali a livello di strutture specializzate quali le focal adhesions e così anche valutare la riorganizzazione cellulare in seguito ad uno stimolo di forza esterno.



Referente: Prof. Marco Capitanio (Dipartimento di Fisica e Astronomia), capitanio@lens.unifi.it

Genomics of plant-microbe interactions

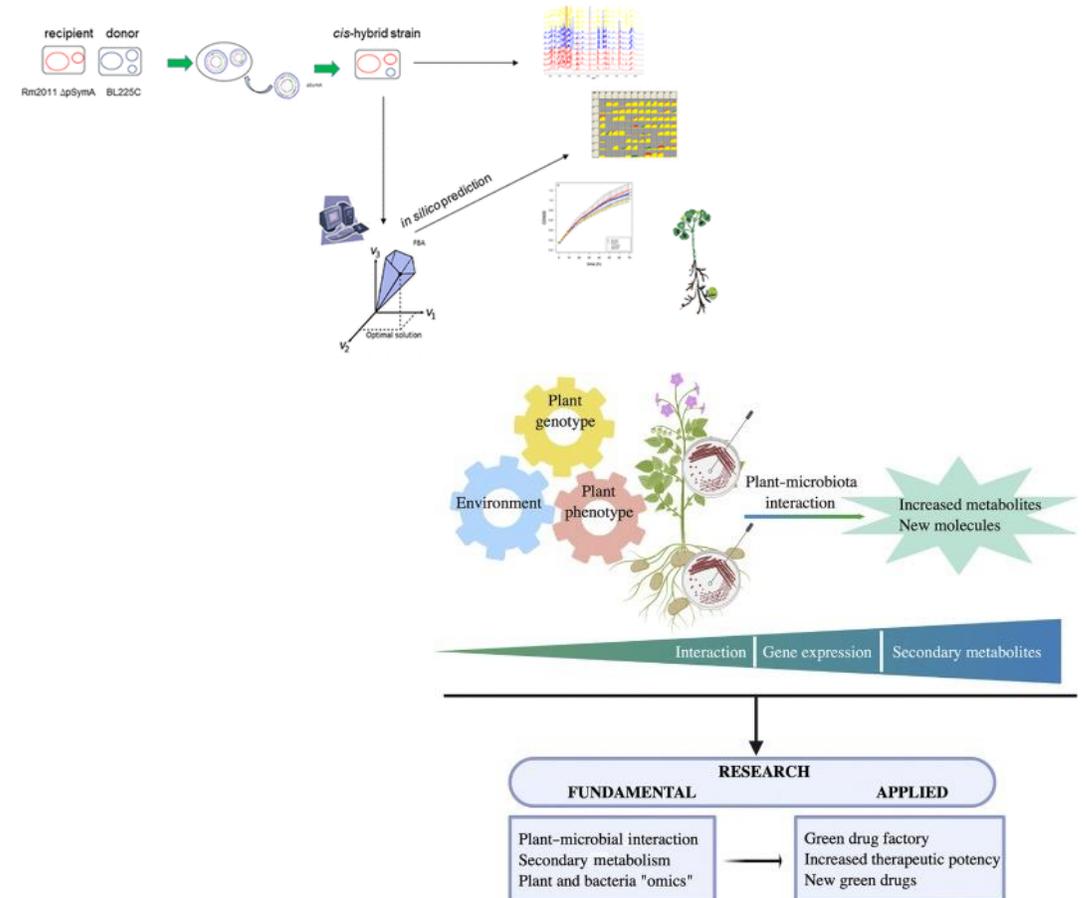
- **Genomic resources for agricultural biotechnologies**
- ✓ Genome manipulation and systems biology of plant-associated bacteria
- ✓ Strain improvement for plant inoculation
- ✓ Evolutionary genomics in bacteria

References:

- Checcucci A. et al. (2018) [Creation and characterization of a genomically hybrid strain in the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Sinorhizobium meliloti*](#). *ACS Synthetic Biology* On line Sept. 17, 2018
- Fagorzi C. et al. (2018) [Harnessing Rhizobia to Improve Heavy-Metal Phytoremediation by Legumes](#). *Genes* 9(11), 542
- Zoledowska S., Presta L., et al. (2019) [Metabolic modeling of *Pectobacterium parmentieri* SCC3193 provides insights into metabolic pathways of plant pathogenic bacteria](#). *Microorganisms* 7(4): 101
- diCenzo G.C. et al. (2019) [Chromids aid genome expansion and functional diversification in the family *Burkholderiaceae*](#). *Molecular Biology and Evolution*. 36: 562-574
- Maggini V., et al. (2020) [Promoting Model Systems of Microbiota–Medicinal Plant Interactions](#). *Trends in Plant Science* DOI: 10.1016/j.tplants.2019.12.013

See for updates <http://www.dblage.unifi.it>

Referente: Prof. Alessio Mengoni



Microbiome analyses

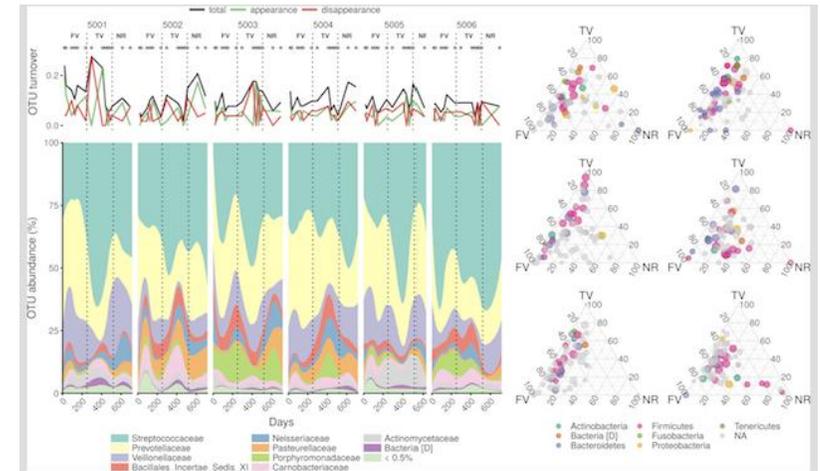
- **Marker discovery and biotech exploitation of microbiomes**
- ✓ Airway microbiome in Cystic Fibrosis patients (see [here](#))
- ✓ Microbiota of animals and human gut
- ✓ Plant-associated microbiome
- ✓ Microbiome of sediments (see [here](#))

References:

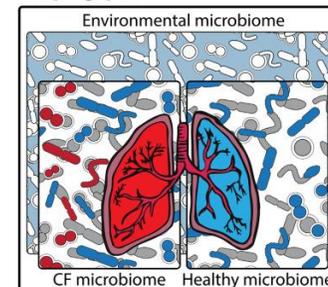
- Bevivino A., et al. (2019) [Deciphering the Ecology of Cystic Fibrosis Bacterial Communities: Towards Systems-Level Integration](#). *Trends in Molecular Medicine* 12: P1110-1122
- Bacci G., et al. (2019) [Microbial community composition of water samples stored inside the International Space Station](#). *Research in Microbiology*. On line 7 May 2019
- Bacci G. et al. (2018) [Applying predictive models to decipher rhizobacterial modifications in common reed dieback-affected populations](#). *Science of the Total Environment* 642: 708-722
- Perrin et al. (2018) [Furnishing spaceship environment: evaluation of bacterial biofilms on different materials used inside International Space Station](#). *Research in Microbiology* May 8, 2018

See <http://www.dblage.unifi.it> &
<https://www.bio.unifi.it/cmpro-v-p-162.html>

Referente: Prof. Alessio Mengoni

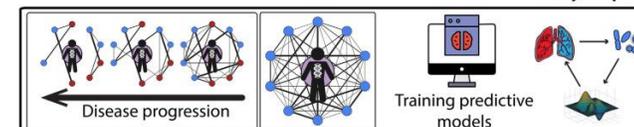


Sampling space



- Environmental microbes that are influencing neither the host nor its microbiome
- Microbes that are part of the lung microbiome but are not influencing the host phenotype
- Microbes that are part of the lung microbiome and positively affect the host phenotype
- Microbes that are characteristic of the CF lung microbiome and negatively affect the host phenotype

Analysis space



Analisi meta-trascrittomica del microambiente tumorale

Il **microambiente tumorale** è un sistema complesso popolato da molti tipi cellulari e molte componenti stromali che impalcano, sostengono e alimentano le cellule cancerose, e posso favorirne la resistenza ai trattamenti farmacologici. Ormai è acclarato che molte delle terapie antitumorali esistenti, prescindendo dal microambiente tumorale, presentano limiti evidenti.

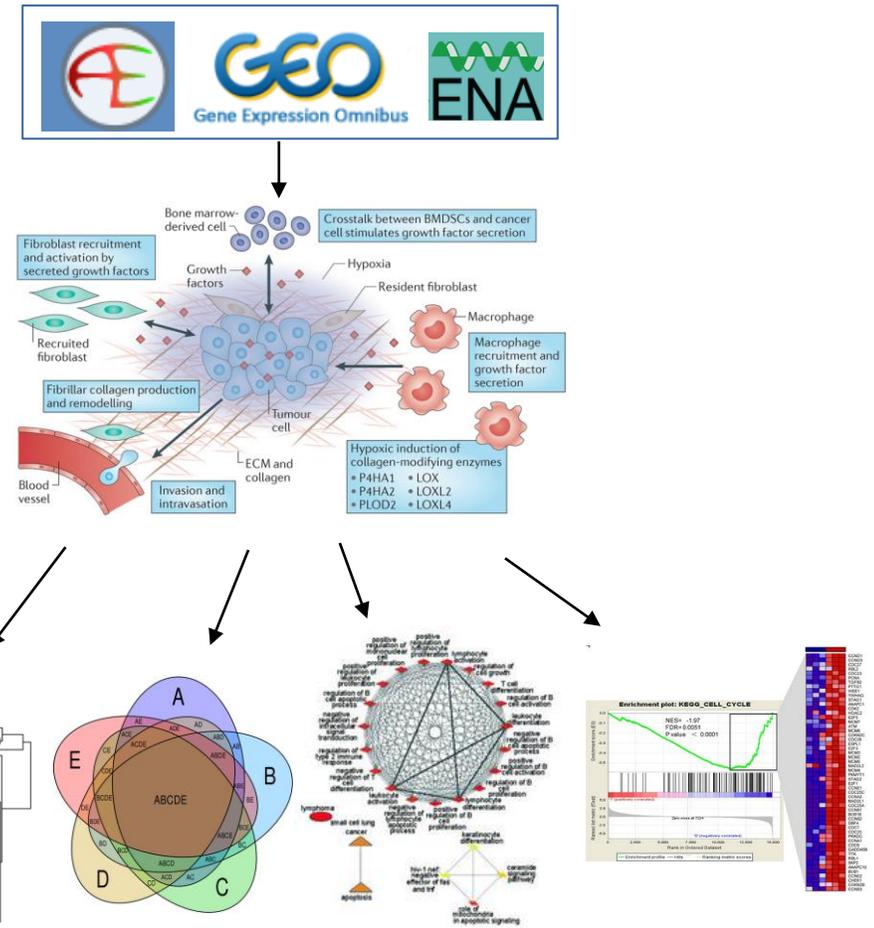
I progetti in questo ambito, portati avanti presso il Dipartimento di Scienze Biomediche, Sperimentali e Cliniche, mirano alla caratterizzazione **mediante tecniche -omiche e integrative** (analisi bioinformatica, systems biology, modellazione metabolica) del microambiente tumorale allo scopo di **capire** in modo sistematico i **meccanismi di cross-talk** esistenti nelle masse tumorali.

Referente:

Prof. Matteo Ramazzotti (SBSC), matteo.ramazzotti@unifi.it

<https://www.sbsc.unifi.it/vp-245-gruppo-ramazzotti.html>

Sarà disponibile 1 posizione, con tempistiche e dettagli da concordare con lo studente



Ruolo del DNA ambientale nei fanghi di depurazione

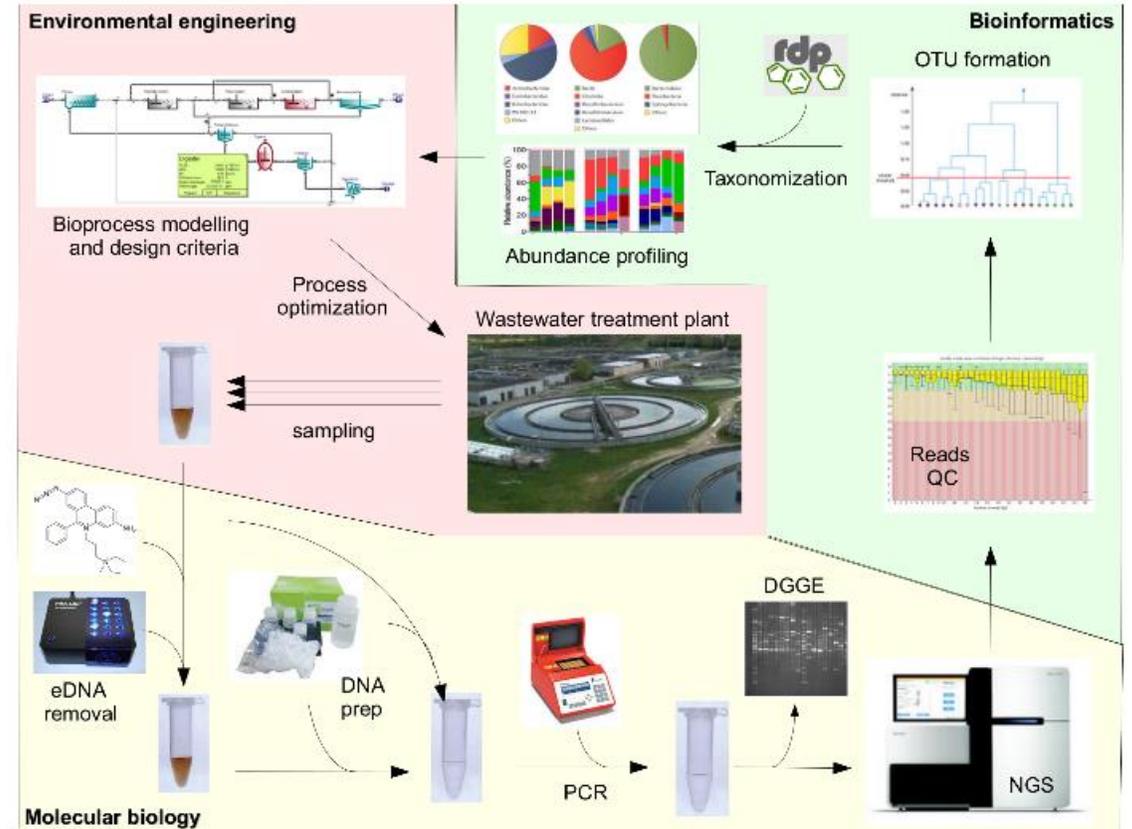
Le **comunità microbiche** operanti nella depurazione delle acque fognarie rappresentano un **affascinante sistema biologico** in cui procarioti e eucarioti interagiscono, sinergizzando e competendo allo stesso tempo. Il **profiling dinamico dell'abbondanza microbica** è oggi possibile mediante tecniche NGS, e molti progetti in questo senso sono già attivi. Uno dei possibili scogli però è rappresentato dall'esistenza nell'ambiente di **DNA libero (eDNA)**, derivante da cellule morte o morenti, che viene **co-estratto** insieme a quello delle cellule attive. Diventa quindi determinante stabilire se, e a quale livello, l'eDNA possa alterare i profili microbici. Il **progetto**, finanziato dall'ateneo di Firenze, **unisce tecniche di biologia molecolare applicata, NGS e strumenti bioinformatici** allo scopo di migliorare i controlli di processo negli impianti di depurazione.

Referente:

Prof. Matteo Ramazzotti (SBSC), matteo.ramazzotti@unifi.it

<https://www.sbsc.unifi.it/vp-245-gruppo-ramazzotti.html>

Sarà disponibile 1 posizione, con tempistiche e dettagli da concordare con lo studente

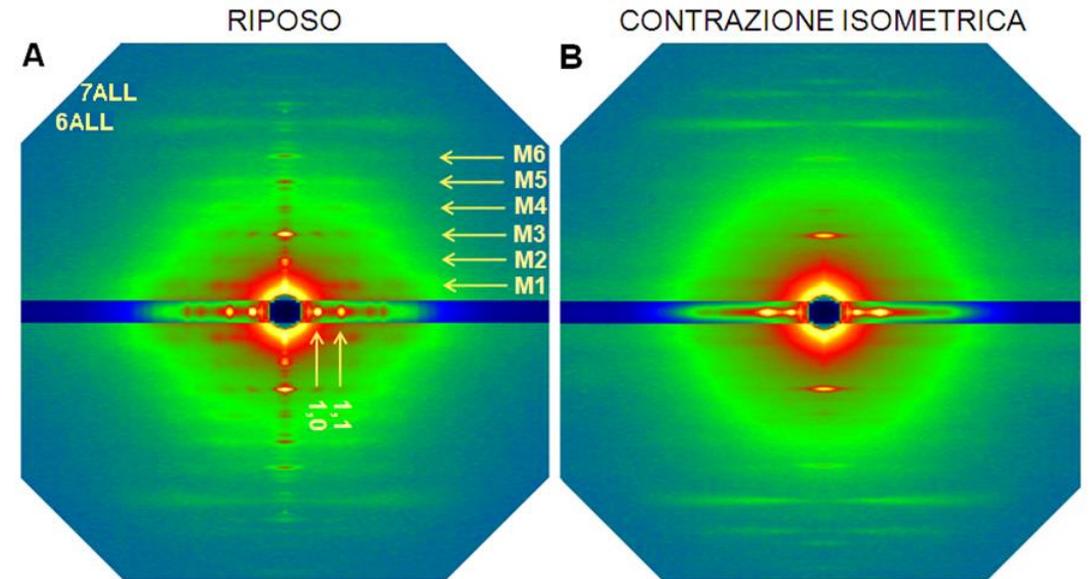


Relazione struttura-funzione nel muscolo scheletrico

La contrazione muscolare avviene per l'azione di due proteine: la miosina di classe II e l'actina, polimerizzate rispettivamente in filamenti spessi e sottili che si sovrappongono nell'unità strutturale del muscolo, il sarcomero, lungo circa $2 \mu\text{m}$. Lo sviluppo di forza e/o l'accorciamento durante la contrazione sono prodotti dall'interazione ciclica tra la porzione globulare della molecola di miosina (la testa o frammento S1), che protrude dal filamento spesso, e i monomeri di actina.

La ripetizione regolare sui filamenti spessi e sottili delle proteine coinvolte nella generazione di forza e nella regolazione della contrazione permette di studiare la loro dinamica strutturale nel sistema nativo, in condizioni fisiologiche, con la diffrazione di raggi X a piccolo angolo in combinazione con tecniche di meccanica con risoluzione a livello del sarcomero.

Scopo del presente argomento di tirocinio/tesi è la descrizione delle basi molecolari della contrazione e delle miopatie connesse a mutazioni nelle proteine contrattili attraverso l'analisi dei diagrammi di diffrazione a raggi X da muscolo striato e lo sviluppo di modelli strutturali per la simulazione dei risultati.



Diagrammi di diffrazione raccolti da singola fibra muscolare intatta di rana (4°C) alla linea di luce ID02, del Sincrotrone Europeo ESRF

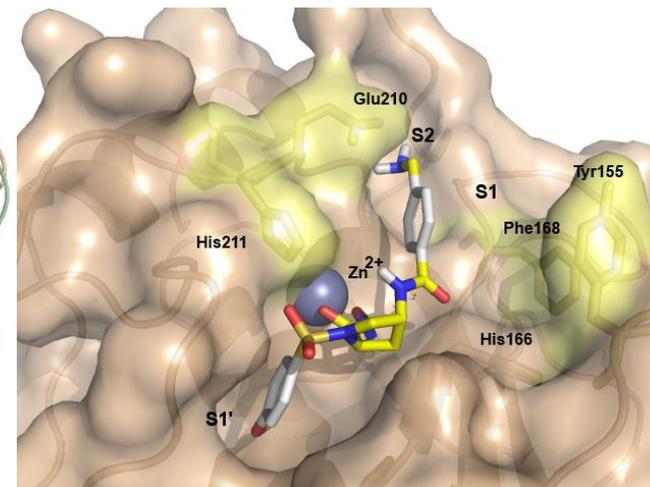
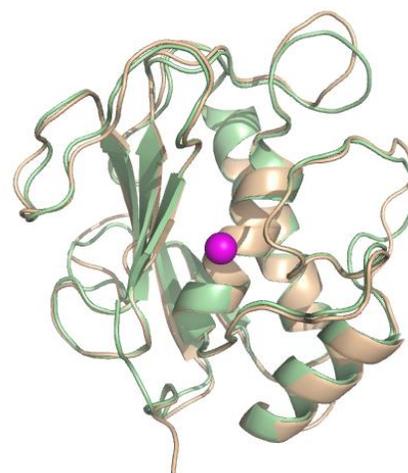
Referente: Prof. Massimo Reconditi
(Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica), massimo.reconditi@unifi.it
È disponibile da subito 1 posizione,
tempistiche da concordare con lo studente



Sviluppo di costrutti molecolari di ligandi per MMP con agenti di contrasto T1 per imaging oncologico con MRI

Le terapie mirate all'angiogenesi e metastasi sono oggi utilizzate in molti tumori maligni e, tra i molti bersagli molecolari, le metalloproteinasi della matrice (MMP) stanno ricevendo un rinnovato interesse, non solo per lo sviluppo di nuovi farmaci, ma anche come biomarcatori diagnostici e prognostici. Gli agenti di contrasto T1 sono caratterizzati da molecole contenenti ioni paramagnetici come Gd(III), il quale permette di ridurre notevolmente il tempo di rilassamento T1. Questo è installato su molecole di interesse attraverso complessi con leganti macrociclici, tipicamente DOTA e DTPA, per imaging molecolare MRI.

Scopo del presente argomento di tirocinio/tesi è la sintesi e valutazione dell'attività biologica di costrutti molecolari aventi agenti di contrasto T1 bioconiugati a inibitori selettivi di MMP (MMP2, MMP9, MMP14).



Referente: Prof. Andrea Trabocchi
(Dipartimento di Chimica),
andrea.trabocchi@unifi.it
È disponibile 1 posizione,
tempistiche da concordare con lo
studente

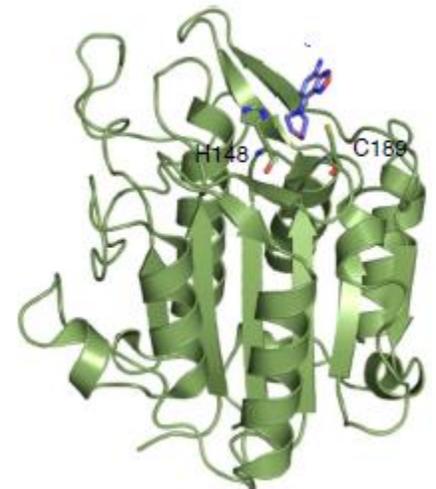
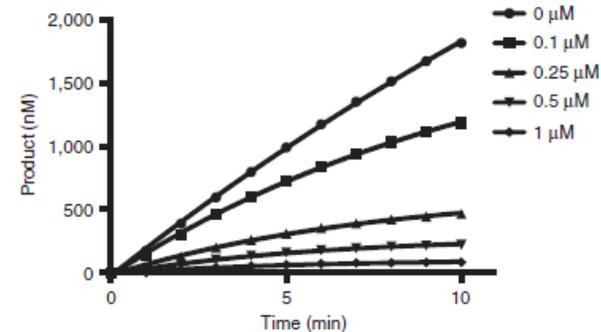
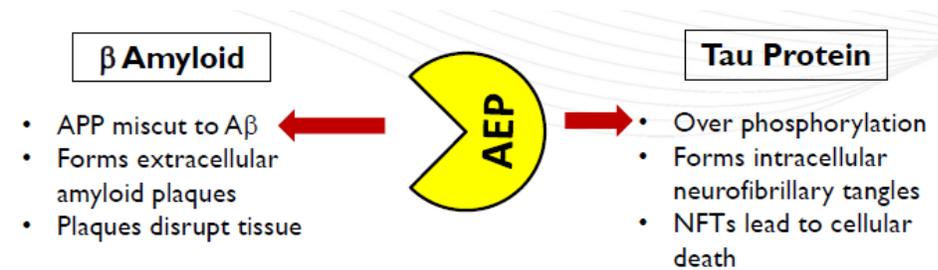


Sviluppo di inibitori di delta-secretasi per il trattamento della malattia di Alzheimer – progettazione, sintesi e cinetica di inibizione enzimatica

È noto che l'iperproduzione della proteina beta-Amiloide (A β) ne causa l'accumulo in aggregati formando le placche amiloidi, tipica caratteristica istopatologica della AD. Queste, insieme agli ammassi neurofibrillari determinati dall'iperfosforilazione della proteina Tau (PTau), attivano la neuroinfiammazione alla base della degenerazione neurale e inducono la morte neuronale e il conseguente decadimento cognitivo.

Nel complesso processo di formazione di A β e PTau vi sono numerosi processi enzimatici coinvolti. Fra questi sta recentemente emergendo la *Asparagina Endo-Peptidasi* (AEP), che partecipa alla attività enzimatica sia della formazione di A β che di PTau. Questa proteina, detta anche *delta-secretasi*, è una proteasi della cisteina lisosomiale che taglia il legame proteico C-terminale del residuo asparaginico.

Scopo del presente argomento di tirocinio/tesi è la progettazione, sintesi e screening fluorimetrico di inibitori di delta-secretasi (AEP)



Referente: Prof. Andrea Trabocchi
(Dipartimento di Chimica),
andrea.trabocchi@unifi.it
È disponibile 1 posizione,
tempistiche da concordare con lo
studente

Bioconiugati di ferritina umana per la produzione di nanocarriers e vaccini terapeutici

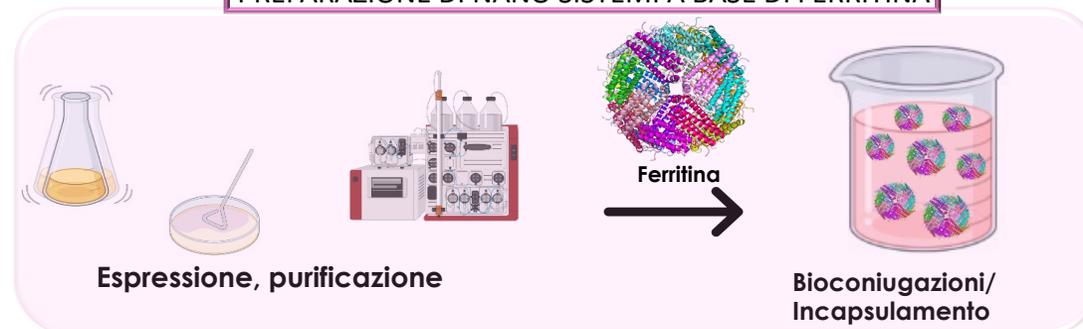
La ferritina è una proteina ubiquitaria coinvolta nel processo di omeostasi del ferro all'interno delle cellule. La sua funzione principale è quella di immagazzinare atomi di ferro all'interno della sua cavità e di rilasciarli ogni qual volta la cellula ne ha bisogno.

La **ferritina** è una piattaforma biotecnologica che ha suscitato molto interesse per la produzione di nano sistemi a scopo biomedico: i) all'interno della sua cavità possono essere ospitate piccole molecole (ad esempio farmaci), che vengono trasportate selettivamente verso specifici bersagli biologici grazie al suo recettore cellulare naturale; la sua superficie esterna può essere decorata con peptidi, antigeni o piccole molecole per ampliarne le potenzialità terapeutiche e favorire il targeted delivery verso cellule di interesse (ad esempio cellule tumorali, cellule del sistema immunitario...) per la **produzione di nanocarriers e vaccini terapeutici**.

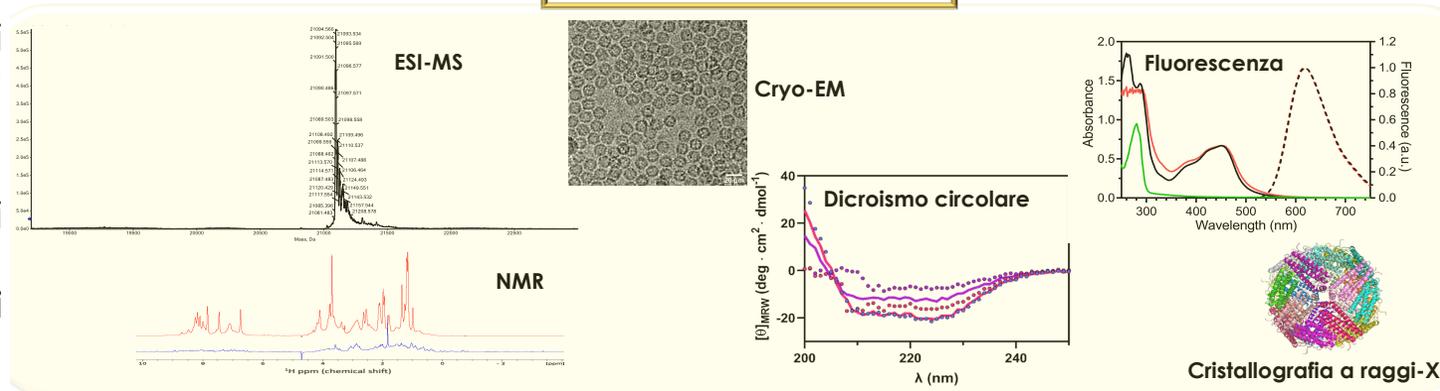
Lo svolgimento di questo tirocinio/tesi prevede:

- **Espressione e purificazione di proteine ricombinanti in E. coli**
- **Bioconiugazioni con piccole molecole, antigeni, peptidi...**
- **Incapsulamento di piccole molecole (metal based drugs...)**
- **Caratterizzazione biofisica dei sistemi (spettrometria di massa, dicroismo circolare, spettroscopia UV, fluorescenza, NMR, Cryo-EM, cristallografia a raggi-X...)**

PREPARAZIONE DI NANO SISTEMI A BASE DI FERRITINA



CARATTERIZZAZIONE BIOFISICA



Referente:

Prof.ssa Paola Turano (CERM), paola.turano@unifi.it

Gruppo di ricerca:

Dott.ssa Silvia Ciambellotti, ciambellotti@cerm.unifi.it

Lucrezia Cosottini, lucrezia.cosottini@unifi.it

Disponibile 1 posizione, tempistiche da concordare con lo studente

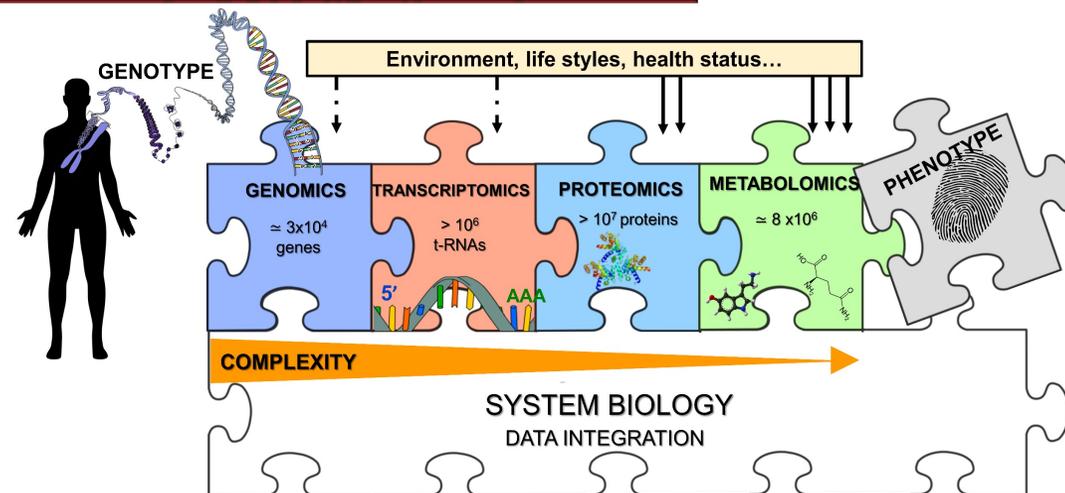


Analisi metabolomica via NMR

La **metabolomica** è la disciplina che studia l'insieme dei metaboliti, il metaboloma, presenti in una cellula, in un tessuto, in un organo o nell'intero organismo. I metaboliti rappresentano i prodotti finali di tutti i processi cellulari ed è per questo che il profilo metabolomico può essere considerato la miglior rappresentazione del fenotipo.

La metabolomica può essere applicata a diverse problematiche in ambito biomedico.

Nel nostro laboratorio (@CERM) ci occupiamo principalmente di :



1) Analisi di biofluidi umani (plasma, siero, urine, saliva) per la caratterizzazione di patologie e medicina personalizzata; progetti in corso:

- Caratterizzazione della **patologia COVID-19** e degli effetti a lungo termine ad essa associati

2) Analisi di lisati e terreni cellulari per **la caratterizzazione del meccanismo d'azione di metal-based drugs a base d'oro**

Lo svolgimento di questo tirocinio/tesi prevede:

- Preparazione dei campioni NMR
- Acquisizione degli spettri NMR
- Identificazione dei metaboliti
- Analisi statistica multivariate e univariata dei dati (creazione di modelli statistici predittivi, identificazione di biomarcatori etc..)
- Identificazione dei pathways e dei meccanismi coinvolti

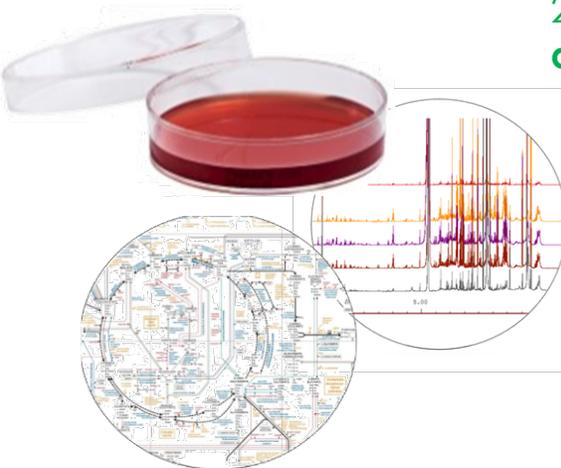
Referente:

Prof.ssa Paola Turano (CERM), paola.turano@unifi.it

Gruppo di ricerca:

Dott.ssa Veronica Ghini, ghini@cerm.unifi.it

Disponibile 1 posizione, tempistiche da concordare con lo studente





Sviluppo di anticorpi e frammenti anticorpali diretti contro canali ionici da utilizzare nella terapia oncologica e loro caratterizzazione

Lo sviluppo di nuovi approcci nella diagnostica e nel trattamento delle neoplasie ha visto un crescente interesse per quanto riguarda lo sviluppo di anticorpi diretti contro specifici target espressi dalle cellule neoplastiche. Gli anticorpi bispecifici (bsAbs) sono anticorpi ricombinanti in grado di unire la specificità di due anticorpi differenti e la capacità di legare due antigeni o epitopi differenti, per questa ragione sono stati oggetto di attenzione per le elevate possibilità di impiego in campo diagnostico e terapeutico.

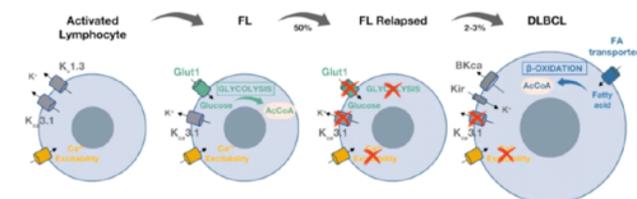
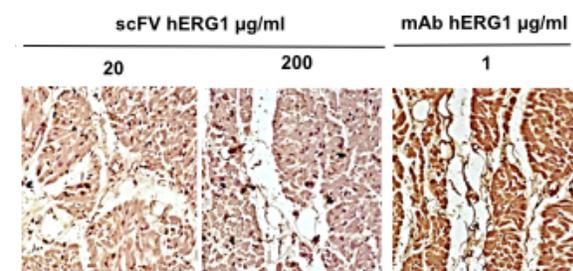
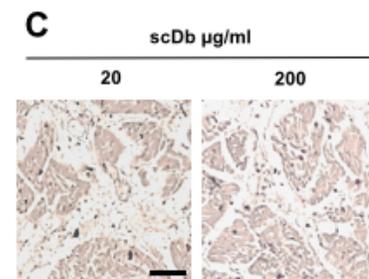
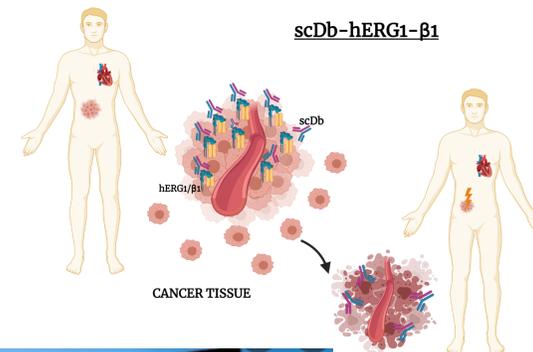
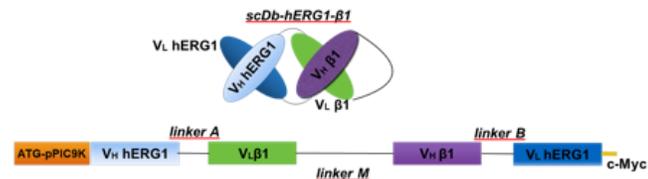
I bsAbs presentano molti vantaggi, tra cui la facilità di produzione e una maggiore penetrazione nel tessuto, inoltre offrono la possibilità di legare epitopi, stericamente inaccessibili alle immunoglobuline intere.

Al fine di sfruttare la versatilità di queste molecole soprattutto in campo oncologico sono necessari efficienti sistemi di espressione e purificazione di anticorpi bifunzionali e l'individuazione di target di interesse.

Per quanto riguarda quest'ultimi, l'over-espressione del canale ionico del potassio hERG1 è stata dimostrata in campioni di tumori primari e linee cellulari tumorali. Il canale è in grado di formare un complesso macromolecolare con l'integrina $\beta 1$, selettivamente espresso in cellule tumorali. L'anticorpo bispecifico, scDb-hERG1- $\beta 1$ riconosce in maniera specifica il complesso hERG1-integrina $\beta 1$.

Scopo del presente progetto di tirocinio/tesi è:

- l'ingegnerizzazione di anticorpi diretti contro canali ionici
- test funzionale di anticorpi su cellule e tessuti tumorali
- test di anticorpi e composti con potenziale terapeutico *in vivo* su modelli animali patologici
- studio dell'espressione di canali ionici in linfociti umani e murini



Referente: Prof.ssa Annarosa Arcangeli (Dipartimento Medicina Sperimentale e Clinica) annarosa.arcangeli@unifi.it
 È disponibile da subito 1 posizione, tempistiche da concordare con lo studente