

ARGOMENTI PER INTERNATO TESI A.A. 2015/2016

COGNOME E NOME DOCENTE/I: **BERNARDONI Roberto**
INSEGNAMENTO/I: **Genetica Funzionale con Laboratorio**

ARGOMENTO 1: Caratterizzazione in vivo del ruolo delle proteine MYC/MAX/MNT nel controllo della crescita e del differenziamento tissulare

La causa principale del neuroblastoma è l'amplificazione o l'overespressione dell'oncogene *mycn*. MYCN è un fattore di trascrizione noto soprattutto come attivatore trascrizionale capace di legare sequenze specifiche di DNA (e-boxes). MYCN per legare direttamente e stabilmente le E-Boxes deve formare un eterodimero con un partner a lui simile, MAX. Sembra quindi che il complesso MYCN/MAX sulle e-box determini l'attivazione del gene a valle. Questo il paradigma più noto e consolidato. Negli ultimi anni il nostro ed altri laboratori hanno mostrato che MYCN può mediare anche repressione della trascrizione ma attraverso meccanismi differenti. Quando reprime MYCN non si associa alle e-box e non lega direttamente il DNA ma entra in complessi in cui sono presenti altri fattori di trascrizione (es: Sp1, Miz1 nell'uomo) che reclutano sui propri siti un complesso di repressione in cui sono presenti MYCN e a volte, ma non sempre, MAX. In questi complessi MYCN sembra avere la funzione di reclutare per interazione diretta proteine come le Deacetilasi/metilasi istoniche che determinano la signature epigenetica propria dei geni repressi.

Dati clinici e genetici su pazienti e linee cellulari di neuroblastoma umano ci hanno fatto ipotizzare che ciò che è importante non sia tanto la quantità assoluta di MYCN ma il suo livello relativo rispetto al suo partner MAX. Questo sembra confermato da studi su cloni cellulari stabili in cui abbiamo modulato N-MYC e MAX a vari livelli relativi.

Attualmente, stiamo utilizzando *drosophila* per cercare di capire se questo "bilanciamento" MYC/MAX ha un ruolo anche *in vivo* e soprattutto se l'attività di MYC come repressore abbia un ruolo "fisiologico" o solo "patologico". Utilizzando i sistemi di espressione controllata tempo e tessuto specifica stiamo modulando in positivo e in negativo l'espressione di MYC, MAX e MNT in un tessuto dalla crescita e differenziamento complesso come l'occhio, che altresì fornisce la possibilità di seguire i processi biologici e di sviluppo in divenire essendo possibile accedere per dissezione al suo primordio larvale. MNT è un fattore conservato simile a MAX ed è noto legare MAX stesso svolgendo forse il ruolo da una parte di titolare MAX via da MYC e dall'altra di antagonizzare i dimeri MYC/MAX occupandone i siti di legame.

Con questo sistema cercheremo di capire *in vivo* in che modo lo sbilanciamento dei tre fattori influenza la proliferazione cellulare, la crescita dell'organo ed il suo differenziamento.

SEDE DEL LAVORO SPERIMENTALE: : Dip Farmacia e Biotecnologie, Via Selmi, 3

PERIODO: da Marzo 2016 a Marzo 2017

NUMERO POSTI DISPONIBILI: 1

REQUISITI RICHIESTI ALLO STUDENTE: Buona conoscenza delle basi dell'analisi genetica funzionale *in vivo*.

EVENTUALI CONTATTI CON ALTRI LABORATORI ED ENTI DI RICERCA ITALIANI ED ESTERI PER LO SVOLGIMENTO DELLA TESI/TIROCINIO: Da verificare, ma non al momento

DISPONIBILITA' A SVOLGERE ATTIVITA' DI SUPERVISIONE PER TESI/TIROCINI SVOLTI PRESSO ALTRI LABORATORI O ENTI DI RICERCA O AZIENDE: SI, se presso enti di ricerca italiani o stranieri.

COGNOME E NOME DOCENTE/I: **BOI Cristiana, SARTI Giulio Cesare**
INSEGNAMENTO/I: **Bioseparazioni, Principi di Ingegneria Biochimica**

ARGOMENTO 1: Rimozione di tossine in processi di aferesi terapeutica

L'attività di tipo sperimentale consiste nella rimozione di tossine presenti nell'organismo umano a causa di patologie o di malfunzionamento di organi vitali quali fegato e reni. Il progetto si propone di funzionalizzare membrane e di caratterizzarle sperimentalmente con siero per determinare l'effettiva efficacia nella rimozione delle tossine target.

Di particolare interesse sono gli aspetti analitici che verranno sviluppati durante l'internato di tesi.

ARGOMENTO 2: Purificazione di anticorpi monoclonali

La tesi si inserisce nell'ambito delle attività coltivate da tempo sullo sviluppo e sulla caratterizzazione di nuovi processi di separazione e purificazione di anticorpi monoclonali con cromatografia di affinità. L'attività consiste a) nell'ottenere membrane di affinità a partire da supporti attivati, impiegando ligandi sviluppati specificamente, b) mettere a punto monoliti di affinità con ligandi sviluppati specificamente e c) nel determinarne sperimentalmente la capacità e la selettività rispetto all'anticorpo scelto, operando sia in batch sia in flusso. La sperimentazione è largamente basata sull'uso di FPLC dedicato, e diverse metodologie di analisi.

Il progetto è svolto in collaborazione con la KAUST (Arabia Saudita) per la preparazione di membrane e con il Politecnico di Milano per la sintesi di ligandi. L'attività è prevalentemente di tipo sperimentale.

SEDE DELL'INTERNATO: DICAM, laboratorio di via Terracini 34, Bologna

PERIODO: a partire da ottobre 2015

NUMERO POSTI DISPONIBILI: 2 (1+1)

ARGOMENTO 3: Sviluppo di nuovi nanomateriali filtranti per il riciclo del dializzato nella emodialisi.

Il lavoro di Tesi si inserisce all'interno di un progetto che si propone di sviluppare nanomateriali filtranti appositamente funzionalizzati per la purificazione e il conseguente riciclo del dializzato nella emodialisi. L'obiettivo del progetto è lo sviluppo di nuovi sistemi per ridurre il consumo idrico sempre associato ad un trattamento di emodialisi, permettendo di ampliare la diffusione di tale trattamento in paesi in via di sviluppo.

L'attività di tipo sperimentale consiste nella preparazione e funzionalizzazione di membrane da elettrofilatura per micro- ultrafiltrazione di liquidi, additivate opportunamente con zeoliti o altri componenti per la rimozione di urea e creatinina. Le caratteristiche delle membrane (dimensioni delle fibre nano-micrometriche e porosità) saranno studiate per ottimizzare le prestazioni filtranti. Si ottimizzerà poi la dispersione e la concentrazione dell'additivo nelle fibre al fine di ottenere un efficace adsorbimento delle tossine investigate. A tal fine verranno effettuate prove di filtrazione e prove di adsorbimento di urea e creatinina. Parte fondamentale della tesi sarà lo sviluppo di metodi analitici per misurare la concentrazione delle tossine da rimuovere.

In parallelo si caratterizzeranno membrane commerciali per adsorbimento ioni e ad interazioni idrofobiche.

Progetto in collaborazione con i docenti **De Angelis Maria Grazia** (DICAM), **Focarete Maria Letizia** (Ciamician).

SEDI DELL'INTERNATO: DICAM, laboratorio di via Terracini 34, Bologna

Dipartimento di Chimica "Ciamician", via Selmi 2, Bologna

PERIODO: a partire da ottobre 2016

NUMERO POSTI DISPONIBILI: 1

COGNOME E NOME DOCENTI: **BONSI Laura / ALVIANO Francesco**
INSEGNAMENTO: **Cellule Staminali**

ARGOMENTO 1: **Isolamento, caratterizzazione e differenziamento in vitro di cellule staminali isolate dalla membrana amniotica in cellule insulino-secermenti.**

La placenta umana e gli annessi extraembrionali rappresentano una fonte interessante di cellule staminali pluripotenti, facilmente disponibili in quanto considerati tessuti di scarto. Nella membrana amniotica in particolare sono presenti due popolazioni cellulari diverse: le cellule epiteliali amniotiche (AECs) capaci di acquisire fenotipo e funzionalità di cellule beta dopo il trattamento di induzione in senso pancreatico; le cellule mesenchimali dello stroma connettivale (AM-MSCs) candidate per generare in vitro strutture simili alle isole pancreatiche sulla base del potenziale angiogenico, trofico ed immunomodulatorio. Per caratterizzare i cambiamenti che occorrono durante il processo di differenziamento dalle cellule staminali alle cellule mature terminalmente funzionali come le cellule insulino-secermenti, nuovi approcci di indagine molecolare come l'epigenetica, la metabolomica e la secretomica potrebbero fornire un importante contributo.

L'attività di ricerca presentata si propone di studiare nello specifico le potenzialità delle cellule staminali epiteliali e mesenchimali derivanti da membrana amniotica per generare strutture simili alle isole pancreatiche per migliorare la resa quantitativa e qualitativa del processo di differenziamento in vitro.

SEDE DEL LAVORO SPERIMENTALE: Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale - sede operativa di Istologia, Embriologia e Biologia Applicata – Via Belmeloro 8

PERIODO: da Gennaio/Marzo 2016 a Gennaio/Marzo 2017

NUMERO POSTI DISPONIBILI: 1 (tra studenti di Biotec Molecolari, Biotec Mediche e Biotec Farmaceutiche).

REQUISITI RICHIESTI ALLO STUDENTE: Curriculum compatibile al lavoro che verrà svolto nel tirocinio

EVENTUALI CONTATTI CON ALTRI LABORATORI ED ENTI DI RICERCA ITALIANI ED ESTERI PER LO SVOLGIMENTO DELLA TESI/TIROCINIO: Diabetes Research Institute University of Miami - Miller School of Medicine

DISPONIBILITA' A SVOLGERE ATTIVITA' DI SUPERVISIONE PER TESI/TIROCINI SVOLTI PRESSO ALTRI LABORATORI O ENTI DI RICERCA O AZIENDE: SI

COGNOME E NOME DOCENTE/I: **DANIELLI Alberto**
INSEGNAMENTO/I: **Biologia Molecolare Avanzata**

ARGOMENTO 1: **Omeostasi degli ioni metallici in *Helicobacter pylori*.**

Siamo interessati a comprendere i meccanismi molecolari che sottendono il signaling dovuto a ioni metallici e la derivante regolazione di metallo-proteine essenziali, associate alla virulenza di *H. pylori*. Due regolatori trascrizionali, Fur e NikR, sono coinvolti nel controllo dell'espressione genica in modo metallo-dipendente, rispettivamente a ferro e nichel. Il nostro obiettivo è di dissezionare i circuiti di regolazione di Fur e NikR integrando approcci molecolari, biochimici e genomici, identificando i meccanismi di interazioni regolatore-DNA, ed eseguendo esperimenti di legame-compete utilizzando anche differenti stati delle proteine regolatrici con i metalli, incluse analisi trascrizionali.

ARGOMENTO 2: **Screening di inibitori dell'attività regolativa di NikR e Fur**

Description: to screen (compound) libraries for molecules active against the *H. pylori* metallo-regulators Fur and NikR we will implement an in vivo high-throughput approach using a multiplate reader. Briefly, we will drive the heterologous expression of each regulator in *E. coli*, from a tightly controllable pBAD vector, in combination with a second vector carrying a bioluminescent reporter, encompassing the *Photobacterium luminescens luxCDABE* luciferase operon, under the transcriptional control of HpFur and HpNikR responsive promoters. Upon transformation of both vectors in the appropriate *E. coli* strain, the expression levels of each regulator will be precisely modulated by arabinose in a dose-dependent manner, while their activity will be monitored through the regulation of the bioluminescent reporter.

Upon optimization of the setup, the effect of molecules active against each regulator can be monitored in vivo in the wells of 96-plates using a multiplate reader.

ARGOMENTO 3: Caratterizzazione del circuito di regolazione heat-shock di *H. pylori*.

In *H. pylori*, il circuito di regolazione preposto alla risposta da stress è controllato dai regolatori trascrizionali, HrcA e HspR, che reprimono congiuntamente tre operoni di risposta heat shock, tra cui l'operone che codificano per le chaperonine GroESL. Recenti evidenze suggeriscono che i regolatori e l'operone groESL sono connessi in uno schema (network motif) di feedforward loop (FFL) incoerente di tipo 2, che appare importante per accelerare notevolmente la cinetica di risposta in seguito al segnale di stimolo del circuito. Network motifs come questo FFL rappresentano interessanti esempi di circuitazione, sia per quanto riguarda la biologia sintetica, come anche nel campo della biologia dei sistemi. La tesi di laurea proposta mira a caratterizzare nel dettaglio i meccanismi molecolari che sottendono questo circuito, e a ricostituire un modello eterologo del FFL di *H. pylori* in *Escherichia coli* in cui l'output del circuito controlli l'espressione di geni reporter per l'analisi delle dinamiche di risposta in vivo.

SEDE DELL'INTERNATO: SKA!LAB - Dip. di Farmacia e Biotecnologie (FaBiT) - via Selmi 3

PERIODO: Da concordare con lo studente

NUMERO POSTI DISPONIBILI: 0-2 (in base ai fondi disponibili)

REQUISITI RICHIESTI ALLO STUDENTE: entusiasmo, dedizione, preparazione, bonanza.

EVENTUALI CONTATTI CON ALTRI LABORATORI ED ENTI DI RICERCA ITALIANI ED ESTERI PER LO SVOLGIMENTO DELLA TESI/TIROCINIO: dati riservati

DISPONIBILITA' A SVOLGERE ATTIVITA' DI SUPERVISIONE PER TESI/TIROCINI SVOLTI PRESSO ALTRI LABORATORI O ENTI DI RICERCA O AZIENDE: sì (se attinenti alla preparazione del docente)

COGNOME E NOME DOCENTE/I: **CIURLI Stefano**

INSEGNAMENTO/I: **Spettroscopia NMR biomolecolare**

ARGOMENTO 1: Meccanismi molecolari che governano la risposta trascrizionale metallo- dipendente

La presenza di ioni metallici nell'ambiente intracellulare regola l'espressione genica attraverso specifici fattori di trascrizione che, in risposta al legame di uno ione metallico, modificano la loro struttura terziaria e legano il DNA su un promotore, aumentando o diminuendo l'espressione di importanti geni bersaglio. I prodotti dell'espressione di questi geni sono di solito proteine direttamente coinvolte nel metabolismo e nell'omeostasi del metallo, oppure enzimi che dipendono dalla presenza dello ione metallico nel loro sito attivo per svolgere la loro funzione catalitica. La regolazione genica metallo-dipendente è alla base di numerosi eventi di patogenicità batterica. Pertanto, lo studio a livello molecolare dei meccanismi di questa regolazione può configurarsi come un primo passo per elaborare possibili strategie antibatteriche efficaci. Nella ricerca proposta, l'interazione metallo-dipendente tra la proteina di interesse e il DNA verrà studiata attraverso metodologie molecolari, biochimiche e strutturali per comprendere, a livello molecolare, le interazioni specifiche proteina-metallo e proteina-DNA. L'approccio utilizzato ha caratteristiche di multidisciplinarietà, attraverso l'impiego sinergico di diverse tecniche di tipo biochimico, biologico-molecolare, strutturale e bio-informatico.

ARGOMENTO 2: Studio di metallo-proteine coinvolte nel traffico intracellulare e nell'omeostasi di metalli di transizione

Le cellule si sono evolute imparando ad utilizzare i metalli di transizione in un grande numero di processi biochimici, inserendoli come componenti essenziali di macromolecole biologiche: in questa sede, i metalli di transizione svolgono numerose funzioni, ad esempio catalizzano reazioni enzimatiche, sono responsabili del trasporto dell'ossigeno o del trasferimento elettronico, influenzano fortemente la struttura terziaria di numerose proteine dettandone la funzione e l'attività. Il traffico intracellulare dei metalli di transizione viene controllato finemente attraverso proteine di trasporto specifiche, che hanno la duplice funzione da una parte di neutralizzare la tossicità che il metallo avrebbe in forma libera, e dall'altra di portare i metalli nella loro corretta localizzazione subcellulare. In assenza di queste proteine accessorie, molte reazioni biochimiche catalizzate da enzimi contenenti ioni metallici, fondamentali per la vita, non potrebbero sussistere.

La ricerca punterà a caratterizzare le proteine coinvolte nel trasporto intracellulare degli ioni metallici, a livello molecolare, biochimico e strutturale, attraverso la loro identificazione, l'isolamento e la determinazione delle relazioni struttura-funzione, con l'impiego di diverse tecniche di tipo biochimico, biologico-molecolare, strutturale e bio-informatico.

ARGOMENTO 3: Studio di inibitori di ureasi

L'ureasi è un enzima nichel-dipendente presente in numerosi batteri, piante, funghi, alghe ed invertebrati. Esso catalizza la reazione di idrolisi dell'urea in ammoniaca e carbammato, provocando un globale aumento del pH e determinando conseguenze negative sia in campo medico che agroambientale. Il batterio patogeno umano *Helicobacter pylori*, ad esempio, utilizza l'ureasi per creare un microclima favorevole nello stomaco, dove il pH è molto basso, riuscendo a colonizzarlo. In agricoltura, l'ureasi presente nei suoli idrolizza l'urea fornita alle piante come fertilizzante, determinando sia una diminuzione della quantità di azoto disponibile per le piante stesse, sia un aumento del pH del suolo, nocivo alla vitalità delle radici vegetali.

L'obiettivo di questa ricerca è dunque lo studio e lo sviluppo di nuovi inibitori dell'ureasi, al fine di caratterizzarne la loro azione inibitoria dal punto di vista cinetico, strutturale e molecolare. Lo studio sarà effettuato mediante l'impiego di diverse tecniche di tipo biochimico, biologico- molecolare, strutturale e chimico-fisico.

SEDE DELL'INTERNATO: Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie, Via Fanin 40, 40127 Bologna

PERIODO: da marzo 2016 a marzo 2017

NUMERO POSTI DISPONIBILI: 2

REQUISITI RICHIESTI ALLO STUDENTE: Conoscenza di base di tecniche di clonaggio ed espressione genica e di purificazione di proteine. Disponibilità all'apprendimento di tecniche nuove, biofisiche e strutturali, di caratterizzazione di proteine.

EVENTUALI CONTATTI CON ALTRI LABORATORI ED ENTI DI RICERCA ITALIANI ED ESTERI PER LO SVOLGIMENTO DELLA TESI/TIROCINIO: Centro di Risonanze Magnetiche, Università di Firenze; Facoltà di Scienze e Tecnologie, Libera Università di Bolzano; Altri laboratori all'estero di cui valutare la disponibilità

DISPONIBILITA' A SVOLGERE ATTIVITA' DI SUPERVISIONE PER TESI/TIROCINI SVOLTI PRESSO ALTRI LABORATORI O ENTI DI RICERCA O AZIENDE: NO

COGNOME E NOME DOCENTE/I: FRANCIA Francesco

INSEGNAMENTO: Biochimica cellulare e strutturale con laboratorio di bioinformatica

ARGOMENTO 1: Studio delle interazioni molecolari delle Lamine A/C con proteine muscolo-specifiche in condizioni di stress ossidativo, in modelli cellulari controllo e patologici.

DOCENTE: CENNI Vittoria, FRANCIA Francesco (tutor)

La lamina nucleare svolge l'importante ruolo di preservare l'integrità strutturale del nucleo in presenza di sollecitazioni meccaniche. La lamina è inoltre in grado di trasmettere alla cromatina segnali di stimoli differenziativi, proliferativi o di stress, agendo direttamente sulla trascrizione di geni bersaglio. Mutazioni delle proteine della lamina nucleare determinano la produzione di una lamina aberrante che non è più in grado di rispondere adeguatamente a questi stimoli, con conseguenze devastanti per la fisiologia della cellula. Le Lamine A/C sono i costituenti principali della lamina nucleare; il loro coinvolgimento è stato dimostrato in numerosi "pathway" nucleari. Mutazioni a carico del gene LMNA, che codifica per queste Lamine, sono responsabili dell'insorgenza di malattie genetiche note con il termine di laminopatie.

Le laminopatie possono essere i: tessuto specifiche, come Distrofie Muscolari di Emery-Dreifuss, Distrofie dei Cingoli Cardiomiopatie, tipiche del tessuto muscolare cardiaco e scheletrico, o Lipodistrofie, che colpiscono il tessuto adiposo; o ii: sistemiche, sindromi progerioidi come la Progeria di Hutchison-Gilford, o malattia dell'invecchiamento precoce o la Displasia Mandibuloacrale.

Lo scopo del tirocinio è quello di indagare, attraverso diversi approcci di Biologia Cellulare e Molecolare, le interazioni molecolari che si instaurano tra le Lamine A/C ed alcune proteine muscolo-specifiche, e se tali interazioni sono rafforzate o perdute in condizioni fisio-patologiche.

Le tecniche utilizzate spazieranno dalla Biologia Cellulare (allestimento e mantenimento di colture primarie ottenute da biopsie di donatori controllo o affetti da laminopatie, mantenimento e amplificazione di linee cellulari, transfezione di DNA plasmidico, analisi della localizzazione di proteine attraverso tecniche di immunofluorescenza), alla Biochimica (studio delle interazioni molecolari attraverso saggi di co-immunoprecipitazione, frazionamento cellulare, allestimento di matrici cellulari, SDS-PAGE, Western blot), alla Biologia Molecolare (estrazione di DNA plasmidico da colture batteriche, introduzione di mutazioni su cDNA wild type che riproducono mutazioni patologiche, RT-PCR).

SEDE DEL LAVORO SPERIMENTALE: Il lavoro sperimentale sarà seguito dalla Dott.ssa Vittoria Cenni presso il Laboratorio di Biologia Cellulare Muscoloscheletrica/IGM-CNR dell'Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna.

PERIODO: da concordare

NUMERO POSTI DISPONIBILI: 1

REQUISITI RICHIESTI ALLO STUDENTE: La durata del tirocinio dovrà essere di 12 mesi. Per garantire una continuità all'attività di laboratorio, si richiede inoltre che lo studente inizi il tirocinio con al massimo due o tre esami universitari da sostenere prima della dissertazione finale di Laurea.

ARGOMENTO 2: Studi funzionali e strutturali di enzimi coinvolti nell'organizzazione del carbonio nella microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: effetto di modificazioni redox a carico di tioli proteici

I sistemi di regolazione dell'attività enzimatica basati sulla chimica dei residui di cisteina sono universalmente distribuiti. Nei cloroplasti la quasi totalità degli enzimi del ciclo di Calvin risulta regolata dalla formazione/rottura tioredossina-dipendente di ponti disolfuro. Questa regolazione garantisce l'attivazione e l'inattivazione del ciclo in risposta alle condizioni di luce. Verrà studiato con saggi in vitro l'effetto della regolazione tioredossina-dipendente sui parametri cinetici delle reazioni catalizzate dagli enzimi bersaglio. Al sistema regolatorio appena descritto si affiancano altri meccanismi di regolazione redox basati su modificazioni post-traduzionali (PTMs), come ad esempio S-glutationilazione e S-nitrosilazione, che si verificano a carico di specifiche cisteine localizzate su proteine bersaglio. In condizione di stress, soprattutto in presenza di luce, le ROS (tra cui il perossido di idrogeno) prodotte abbondantemente nei cloroplasti possono reagire con i tioli proteici e, oltre ad indurre la formazione di ponti disolfuro, possono portare all'ossidazione irreversibile dei tioli ad acido sulfinico o sulfonico. Questa seconda reazione, estremamente svantaggiosa per l'organismo, può essere efficacemente contrastata dal glutathione che forma disolfuri misti con le cisteine proteggendoli da eventi di ossidazione irreversibili. In questo caso approcci di proteomica redox hanno evidenziato che tutti gli 11 enzimi del ciclo di Calvin in *C. reinhardtii* sono potenziali bersagli della glutathionilazione. E' quindi nostro interesse verificare l'effetto delle PTMs sulla cinetica enzimatica ed individuare i residui di cisteina coinvolti in tale regolazione al fine di procedere ad eventuali loro mutazioni.

SEDE DEL LAVORO SPERIMENTALE: Dip. FaBit, Lab. di Biochimica e Biofisica, Via Irnerio n.42

PERIODO: da Gennaio 2016

NUMERO POSTI DISPONIBILI: 1

REQUISITI RICHIESTI ALLO STUDENTE: buona conoscenza della lingua inglese e della biochimica.

COGNOME E NOME DOCENTE/I: **HOCHKOEPPPLER Alejandro**
INSEGNAMENTO: **Ingegneria proteica e Biochimica Industriale**

ARGOMENTO 1: Studio di sub-assemblaggi della DNA Polimerasi III di *Escherichia coli*.

Il core catalitico della DNA polimerasi III di *Escherichia coli* è composto da tre subunità, denominate rispettivamente alfa, epsilon e teta. Alfa possiede attività polimerasica, epsilon costituisce la subunità che corregge gli errori di replicazione (attività esonucleasica 3'-5', proofreading), mentre il ruolo di teta non è ancora definito. La subunità τ della DNA polimerasi III permette la formazione di un complesso trimetrico $\tau_3\alpha_3\epsilon_3\theta_3$, recentemente caratterizzato presso il nostro laboratorio. Il presente progetto di tesi mira alla sovraespressione e purificazione dell'oloenzima DNA polimerasi III*, costituito dalle subunità τ , α , ϵ , θ , δ , δ' , ψ e χ . Tale obiettivo sarà perseguito mediante la co-espressione delle otto differenti subunità in *E. coli*, evitando così di ricostituire il complesso proteico a partire dai singoli componenti purificati.

In particolare, lo studente utilizzerà appositi plasmidi compatibili, costruiti presso il laboratorio ospitante, mediante i quali è possibile co-esprimere le otto diverse subunità. Le condizioni di co-espressione sono già state ottimizzate. I corrispondenti estratti proteici saranno quindi utilizzati per perseguire la purificazione del complesso, mediante tecniche di cromatografia a scambio ionico, gel filtrazione e di affinità. Il complesso così purificato sarà caratterizzato dal punto di vista catalitico, impiegando un saggio di attività messo recentemente a punto presso il laboratorio ospitante. Inoltre, lo studente costruirà, se necessario, mutanti sito-specifici delle tre subunità del core, in modo da facilitarne la marcatura selettiva.

Al termine del periodo di tirocinio lo studente avrà raggiunto una buona padronanza delle tecniche utilizzate, consentendogli di poter operare in autonomia sia dal punto di vista sperimentale che per quanto concerne la impostazione degli esperimenti.

Contatto: Prof. Alejandro Hochkoeppler, a. hochkoeppler@unibo.it

ARGOMENTO 2: Studio della ricombinazione del DNA mediata dalla DNA polimerasi di *Deinococcus radiodurans*.

Il presente Progetto è finalizzato alla caratterizzazione in vitro di reazioni di ricombinazione mediate dalla DNA polimerasi III di *E. coli* e dall'omologo enzima di *Deinococcus radiodurans*. Quest'ultimo è noto per la sua capacità di ricostruire il proprio genoma a partire dai frammenti di cromosoma prodotti dall'esposizione a radiazioni ionizzanti. In particolare, il laboratorio dispone di entrambe le polimerasi in forma pura ed ha recentemente messo a punto un saggio in grado di rilevare in continuo reazioni ricombinative. Lo studente utilizzerà a questo scopo molecole di DNA differenti per valutare l'influenza della loro sequenza nei confronti della ricombinazione. A tale proposito si prevede di utilizzare la proteina RecA per valutarne la necessità in reazioni di ricombinazione.

Al termine del periodo di tirocinio lo studente avrà raggiunto una buona padronanza delle tecniche utilizzate, consentendogli di poter operare in autonomia sia dal punto di vista sperimentale che per quanto concerne la impostazione degli esperimenti.

Contatto: Prof. Alejandro Hochkoeppler, a. hochkoeppler@unibo.it

ARGOMENTO 3: Cinetica di DNA polimerasi determinata con singole molecole di enzima.

Il Presente Progetto si prefigge di caratterizzare la cinetica di reazioni catalizzate da DNA polimerasi utilizzando metodologie che permettono di rilevare il comportamento di singole molecole di enzima. In particolare, si perseguirà la individuazione dei rapporti tra la struttura del substrato (DNA) e la velocità di reazione. A questo proposito saranno utilizzati opportuni supporti contenenti l'enzima immobilizzato e molecole di DNA marcate. Grazie a questa strategia sarà possibile determinare il decorso della reazione mediante FRET, come è già stato possibile verificare utilizzando l'enzima Klenow. Si prenderà inoltre in considerazione la possibilità di confrontare l'azione catalitica di enzimi wild-type con quella esercitata da varianti sito-specifiche.

Contatto: Prof. Alejandro Hochkoeppler, a. hochkoeppler@unibo.it

SEDE DEL LAVORO SPERIMENTALE:

Argomento 1-2: Dipartimento di Chimica Industriale; Viale Risorgimento 4, 40136 Bologna

Argomento 3: Università di Wageningen; Referente: Prof. Johannes Hohlbein

PERIODO: Marzo 2016 a Marzo 2017

NUMERO POSTI DISPONIBILI: 3

COGNOME E NOME DOCENTI: **LOLLINI Pier-Luigi - NANNI Patrizia**
INSEGNAMENTO: **Oncologia Molecolare**

ARGOMENTO 1: Vaccini per la prevenzione e la cura del cancro

L'immunoprevenzione del cancro è basata sull'idea che un'appropriata stimolazione del sistema immunitario in individui sani possa ridurre il rischio di sviluppo di tumori. Per i tumori virali sono già disponibili vaccini per uso umano (virus dell'epatite B e papilloma virus), ma oltre l'80% dei tumori umani non ha un'eziologia virale. E' possibile prevenire con sistemi immunologici i tumori non virali? Il nostro laboratorio ha dimostrato che si possono disegnare vaccini che bloccano quasi completamente lo sviluppo di carcinomi della mammella ed altri tipi tumorali in modelli murini transgenici e knockout. Gli studi in corso riguardano lo studio dei meccanismi immunitari dell'immunoprevenzione dei tumori, varie strategie per il miglioramento del disegno dei vaccini, anche per facilitarne il trasferimento all'applicazione umana, l'applicazione a nuovi modelli tumorali, in particolare basati sull'oncogene umano HER-2 nel carcinoma mammario.

Per saperne di più:

P.-L. Lollini et al., Vaccines for tumour prevention. Nat. Rev. Cancer, 6: 204-216, 2006.

P.-L. Lollini et al., Preclinical HER-2 vaccines: From rodent to human HER-2. Front. Oncol. 2013 Jun 10;3:151. doi: 10.3389/fonc.2013.00151. eCollection 2013

ARGOMENTO 2: Progressione tumorale e diffusione metastatica

I principali ostacoli alla cura dei tumori maligni sono la disseminazione delle cellule tumorali nell'organismo (metastasi) e la selezione di varianti cellulari resistenti alle terapie. Le ricerche del laboratorio riguardano sia i tumori epiteliali, in particolare il carcinoma mammario, che quelli mesenchimali, in particolare il rhabdomyosarcoma, ed hanno anche prodotto vari modelli originali (linee e cloni cellulari, topi geneticamente modificati) diffusi nel mondo. Le ricerche attuali riguardano la genesi di varianti di carcinoma mammario resistenti alle terapie anti-HER-2, la metastatizzazione multiorgano del carcinoma mammario e le caratteristiche molecolari dei sarcomi con difetti di p53.

Per saperne di più:

Nanni et al., Multiorgan metastasis of human HER-2+ breast cancer in Rag2-/-;Il2rg-/- mice and treatment with PI3K inhibitor. PLoS One. 2012;7(6):e39626.

C. De Giovanni et al., Molecular and cellular biology of rhabdomyosarcoma. Future Oncology, 5: 1449-1475, 2009.

SEDE DELL'INTERNATO: Laboratorio di Immunologia e Biologia delle Metastasi, Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale, Viale Filopanti 22, 40126 Bologna. Tel: 051-209-4786 (Lollini), 051-209-4793 (Nanni); Email: pierluigi.lollini@unbo.it; Web: www.lollini.it

PERIODO: da gennaio 2016 a dicembre 2016

NUMERO POSTI DISPONIBILI: 2

REQUISITI RICHIESTI ALLO STUDENTE: la scelta dei tirocinanti viene effettuata sulla base del curriculum universitario, inclusi gli studi di primo livello.

EVENTUALI CONTATTI CON ALTRI LABORATORI ED ENTI DI RICERCA ITALIANI ED ESTERI PER LO SVOLGIMENTO DELLA TESI/TIROCINIO: Sono in corso varie collaborazioni con laboratori bolognesi, italiani ed esteri, da cui possono scaturire risultati e contatti interessanti per lo studente, ma il tirocino ed il lavoro di tesi vengono svolti interamente in sede. **DISPONIBILITA' A SVOLGERE ATTIVITA' DI SUPERVISIONE PER TESI/TIROCINI SVOLTI PRESSO ALTRI LABORATORI O ENTI DI RICERCA O AZIENDE:** SI.

COGNOME E NOME DOCENTE: **PORCELLI Anna Maria**
INSEGNAMENTO: **Biochimica cellulare e strutturale**

ARGOMENTO 1: Mutazioni del DNA mitocondriale e cancro

Il contributo delle mutazioni del DNA mitocondriale (mtDNA) e delle alterazioni funzionali della fosforilazione ossidativa ad esse associate nella progressione tumorale è ancora dibattuto, dato che tali mutazioni possono sia stimolare che inibire il potenziale tumorigenico delle cellule tumorali. Recenti studi effettuati dal nostro gruppo di ricerca hanno dimostrato che le alcune mutazioni nel mtDNA ed in particolare quelle che causano il disassemblaggio del complesso I della catena respiratoria (CI) inibiscono la crescita tumorale sia in vitro che in modelli animali. E' stato inoltre dimostrato che in questi tumori esiste una stretta correlazione tra la mancanza del CI e la degradazione del fattore indotto da ipossia (HIF1 α), il quale regola i processi di adattamento metabolico ed ipossico necessari per la progressione verso la malignità. I livelli di HIF1 α sono modulati a livello post-trascrizionale dalle prolin-idrossilasi (PHDs) la cui attività dipende dalla pO₂ e dai livelli di α -chetoglutarato (α KG) e succinato (SA), intermedi del ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA). In normossia le PHDs idrossilano HIF1 α e lo indirizzano al proteasoma, inducendone la degradazione. Invece, in ipossia le PHDs non sono attive e permettono la stabilizzazione di HIF1 α e la sua attività trascrizionale. Recentemente, abbiamo dimostrato che il disassemblaggio del CI induce un accumulo di NADH e di α KG permettendo la destabilizzazione cronica di HIF1 α anche in condizioni di normossia (pseudonormossia) inibendo la crescita tumorale sia in vitro che in vivo. Tuttavia, è stato riportato che in un modello di cancro della mammella l'aumento del consumo di NADH riduce il potenziale tumorigenico e la formazione di metastasi mediante inibizione del pathway regolato da Akt/mTORC1 ed induzione dell'autofagia. È dunque evidente come il ruolo dell'omeostasi del NADH e del TCA nella regolazione della progressione tumorale sia ancora da definire. Inoltre, risulta chiaro come il CI possa rappresentare un potenziale target terapeutico nel cancro, in particolare per quei tumori dipendenti dalla fosforilazione ossidativa.

L'obiettivo di questo progetto di ricerca è quello di chiarire i meccanismi molecolari che correlano l'induzione della pseudonormossia con l'arresto della crescita tumorale in assenza del CI. In particolare, si analizzerà come i livelli di NADH, diversamente regolati dalle mutazioni nel genoma mitocondriale, regolino l'adattamento ipossico e metabolico, l'autofagia e, in ultima istanza, la progressione tumorale. Inoltre, questo progetto si propone di dimostrare che l'induzione della pseudonormossia altera il potenziale tumorigenico sia in vitro che in vivo in diversi modelli tumorali. A tale scopo verranno utilizzati composti che inducono (i) un completo disassemblaggio del CI, (ii) un aumento dei livelli di NADH, (iii) l'attivazione delle PHDs mediante accumulo di α KG.

Articoli pubblicati dal laboratorio

Vatrinet R. et al., *Targeting respiratory complex I to prevent the Warburg effect. Int J Biochem Cell Biol*, 2015;
Iommarini L. et al., *Different mtDNA mutations modify tumor progression in dependence of the degree of respiratory complex I impairment. HMG*, 2014; Calabrese C. et al., *Respiratory complex I is essential to induce a Warburg profile in mitochondria-defective tumor cells. Cancer Metab*, 2013; Iommarini L. et al., *Complex I impairment in mitochondrial diseases and cancer: parallel roads leading to different outcomes. Int J Biochem Cell Biol*, 2013;
Gasparre G. et al., *A mutation threshold distinguishes the antitumorigenic effects of the mitochondrial gene MTND1, an oncojanus function. Cancer Research*, 2011; Porcelli AM. et al., *The genetic and metabolic signature of oncocyctic transformation implicates HIF1 α destabilization. HMG*, 2010.

SEDE DEL LAVORO SPERIMENTALE: Dip di Farmacia e Biotecnologie, Via Imerio 42, Bologna

PERIODO: da marzo 2016 a gennaio 2017

NUMERO POSTI DISPONIBILI: 1

REQUISITI RICHIESTI ALLO STUDENTE: in debito di 1 esame, flessibilità di orario, entusiasmo, voglia d'imparare. Sono previste due settimane di prova pratica in laboratorio.

EVENTUALI CONTATTI CON ALTRI LABORATORI ED ENTI DI RICERCA ITALIANI ED ESTERI PER LO SVOLGIMENTO DELLA TESI/TIROCINIO: Dr. Giuseppe Gasparre, DIMEC, UNIBO; Dr. Valerio Carelli, DIBINEM, UNIBO; Prof. Paolo Pinton, Università di Ferrara; Dr. Leo Nijtmans, NCLMS, Nijmegen, Olanda; Dr.ssa Apollonia Tullo, CNR, Bari.

DISPONIBILITA' A SVOLGERE ATTIVITA' DI SUPERVISIONE PER TESI/TIROCINI SVOLTI PRESSO ALTRI LABORATORI O ENTI DI RICERCA O AZIENDE: SI

COGNOME E NOME DOCENTE/I: **ZANNONI Davide - FEDI Stefano**
INSEGNAMENTO/I: **Microbiologia e Virologia molecolare – con Laboratorio**

ARGOMENTO 1: Studio della biodegradazione aerobica di sostanze organiche inquinanti in *Rhodococcus sp.*

LINEA 1: Ceppi batterici della specie *Rhodococcus* sono in grado di degradare diversi composti organici recalcitranti e di rilevante impatto ambientale che sono presenti in falde contaminate, in acque reflue derivanti da processi industriali oppure, accumulati in sedimenti fluviali e marini. I processi degradativi possono coinvolgere sia meccanismi diretti, attraverso l'utilizzo delle sostanze organiche come fonti di carbonio e di energia, sia processi di tipo co-metabolico, che sfruttano cioè il metabolismo batterico attivo nella degradazione di un substrato primario (ad es. metano, butano o bifenile) e che può essere anche utilizzato nella degradazione del composto inquinante (substrato co-metabolizzato). Il progetto di tesi prevede di studiare il ruolo di alcano monoossigenasi (AlkB, PrmA) di ceppi batterici di *Rhodococcus* nel processo di degradazione degli n-alcani e degli acidi naftenici. Lo studio prevede l'analisi di sistemi di regolazione delle diverse alcano monoossigenasi con metodiche molecolari e con analisi enzimatiche e lo studio delle cinetiche di degradazione dei solventi mediante gascromatografia. Parte dello studio potrà avvenire in collaborazione con i gruppi di ricerca dei Proff.ri Pinelli D. e Frascar D. afferenti al Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica, Ambientale e dei Materiali.

SEDE DEL LAVORO SPERIMENTALE: : Laboratorio di Microbiologia Generale, Dipartimento FaBit, Sede di via Irnerio 42, Bologna

PERIODO: ottobre-novembre 2015

NUMERO POSTI DISPONIBILI: 1

LINEA 2: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 è in grado di utilizzare il bifenile come unica fonte di carbonio ed energia e, mediante un processo co-metabolico aerobio degradare numerosi congeneri di policloro bifenile (PCB). Inoltre questo ceppo batterico presenta una elevata resistenza a numerosi metalli pesanti e mostra una risposta chemiotattica positiva verso alcuni contaminanti ambientali che ne favoriscono la capacità di aggregarsi in una matrice polimerica extracellulare ed aderire a superfici solide per formare biofilms. Il genoma del microrganismo è stato recentemente sequenziato dal nostro laboratorio e questo permetterà di studiare in dettaglio le proprietà genetiche e metaboliche del microrganismo. Il progetto di tesi si incentra sullo studio di alcuni geni coinvolti nei meccanismi di risposta stringente (relA e spoT) ed del loro ruolo nei sistemi di regolazione delle vie di degradazione di composti aromatici tra cui l'acido benzoico gli acidi cloro benzoici nonché nel sistema di regolazione del processo chemiotattico.

Inoltre, alcune prove preliminari, incentrate sull'analisi della catena respiratoria di KF707 durante la crescita del microrganismo con fonti di carbonio aromatiche (fenolo, bifenile, acido benzoico), indicano che la sintesi di alcune ossidasi terminali è modulata dalla fonte di carbonio di crescita. Il progetto di ricerca prevede l'approfondimento dello studio dei meccanismi molecolari che regolano a livello di trascrizione e traduzione la sintesi delle ossidasi terminali alternative in KF707.

SEDE DEL LAVORO SPERIMENTALE: : Laboratorio di Microbiologia Generale, Dipartimento FaBit, Sede di via Irnerio 42, Bologna

PERIODO: maggio 2016

NUMERO POSTI DISPONIBILI: 1 - 2

COGNOME E NOME DOCENTE/I: SCOTLANDI Katia
INSEGNAMENTO/I: Biologia Molecolare Avanzata

ARGOMENTO 1: DNA circolante ed exosomi: il loro impatto nel modulare il processo metastatico in cellule di sarcoma

Gli exosomi e i cDNA stanno attirando sempre più l'attenzione come modalità da parte delle cellule per comunicare a distanza ed inviare messaggi sia sulle cellule dello stesso tipo che su cellule di organi diversi. Il progetto si propone di studiare il contenuto in termini di miRNA e di proteine degli exosomi di cellule di sarcoma modificate geneticamente e caratterizzate da un diverso comportamento metastatico nell'ottica di individuare singole molecole di potenziale interesse terapeutico. Il percorso di tesi prevederà un'analisi attenta anche del signaling intracellulare nelle cellule recipienti, siano queste tumorali che normali. Particolare attenzione verrà infatti posta all'analisi delle modulazioni imposte nelle cellule normali del microambiente tumorale ed osseo, siano queste cellule immunitarie che mesenchimali o endoteliali.

ARGOMENTO 2: Analisi dei Polimorfismi Genici nella Farmacogenetica

I polimorfismi genici sono alla base della variabilità nella risposta ai farmaci. La scienza che studia questi aspetti prende il nome di farmacogenetica. Grazie alla più recente tecnologia è oggi possibile avere un quadro completo dei polimorfismi e associarli alla diversa risposta ai trattamenti chemioterapici e quindi alla diversa risposta dei pazienti oncologici sia in termini di efficacia che di tossicità. Questi aspetti verranno studiati per quanto riguarda i polimorfismi di geni coinvolti nei meccanismi di azione e di resistenza ai principali farmaci chemioterapici che vengono utilizzati nel trattamento dei sarcomi ossei.

SEDE DEL LAVORO SPERIMENTALE: Istituto Ortopedico Rizzoli, Laboratorio di Oncologia Sperimentale

PERIODO: da marzo 2016 a marzo 2017

NUMERO POSTI DISPONIBILI: 2

REQUISITI RICHIESTI ALLO STUDENTE: Elevato esito delle prove finora sostenute, esami quasi completati, entusiasmo, voglia d'imparare, passione e una buona dose d'umiltà

COGNOME E NOME DOCENTE/I: ZUCCHERI Giampaolo
INSEGNAMENTO/I: Nanobioteχνologie

ARGOMENTO 1: Nanoarchitetture basate sul DNA e biosensori per acidi nucleici

La sequenza delle basi degli acidi nucleici rappresenta il codice informativo più ricco per l'autoassemblaggio di strutture nanometriche complesse. Nanostrutture e nanomotori possono essere costruiti in modo automatico mescolando oligonucleotidi di sequenza ottimizzata. Diverse applicazioni sono previste per nanostrutture autoassemblanti a geometria ben definita e a funzionalità programmabile.

Il laboratorio intende sviluppare nanostrutture funzionali innovative e caratterizzarle dal punto di vista strutturale e funzionale. Il progetto si compone di due linee che condividono tecniche e metodi, ma con diversi obiettivi:

- 1) Negli ultimi tempi abbiamo messo a punti strategie per inserire nanostrutture autoassemblanti di DNA in sistemi di cellule vive in coltura. Durante lo svolgimento del progetto il candidato parteciperà alla preparazione di nanostrutture funzionali che possano poi essere impiegate come nanosensori intracellulari per cellule in coltura, al fine di evidenziare caratteristiche di fisiologia cellulare.
- 2) L'autoassemblaggio programmato di acidi nucleici può essere impiegato ai fini della rilevazione della presenza di specifici acidi nucleici in soluzione, per applicazioni bioanalitiche e di biosensori. Sfruttando piattaforme di biosensori elettrochimici e altre tecnologie (fluorescenza, luminescenza) si lavorerà allo sviluppo di strategie di autoassemblaggio volute alla rilevazione specifica e sensibile di acidi nucleici con in vista applicazioni quali la rilevazione di miRNA (diagnostica molecolare) o la rilevazione di marker genici di patogeni (per analisi ambientale).

SEDE DEL LAVORO SPERIMENTALE: Dipartimento FaBiT

PERIODO: da Ottobre 2015 o dopo, durata 1 anno solare circa

NUMERO POSTI DISPONIBILI: max 2

REQUISITI RICHIESTI ALLO STUDENTE: familiarità con i personal computers, conoscenze basilari di gel elettroforesi e manipolazione di campioni biologici. Conoscenze di base sulle colture cellulari sono utili.

ARGOMENTO 2: Sviluppo di aptameri per sensing di farmaci

Di recente introduzione, gli aptameri stanno rivoluzionando il sensing di molecole e strutture biologiche, in parte sostituendo gli anticorpi. Sono leganti sintetici sviluppati *in vitro* usando oligonucleotidi. Sono di interesse anche per l'industria farmaceutica, che può così disporre di leganti per misurare la concentrazione di farmaci per valutazioni terapeutiche.

Al Politecnico di Losanna stanno sviluppando aptameri da utilizzare per sistemi di biosensing basati sulla tecnologia 'surface plasmon resonance.' Il lavoro di tesi consiste nella partecipazione ad un progetto di selezione e sviluppo di aptameri e alla loro caratterizzazione come leganti di farmaci per lo studio dell'andamento delle terapie antitumorali.

SEDE DEL LAVORO SPERIMENTALE: Laboratorio CLSE, EPFL (Losanna, Svizzera)

PERIODO: da concordare con il responsabile del laboratorio

NUMERO POSTI DISPONIBILI: 1.

REQUISITI RICHIESTI ALLO STUDENTE: Lingua Inglese. Disponibilità e capacità a lavorare all'interfaccia tra diverse discipline. Propensione all'impiego di strumentazione analitica avanzata e all'analisi dei dati.

EVENTUALI CONTATTI CON ALTRI LABORATORI ED ENTI DI RICERCA ITALIANI ED ESTERI PER LO SVOLGIMENTO DELLA TESI/TIROCINIO: SI: si veda il testo dei singoli progetti.

DISPONIBILITÀ A SVOLGERE ATTIVITÀ DI SUPERVISIONE PER TESI/TIROCINI SVOLTI PRESSO ALTRI LABORATORI O ENTI DI RICERCA O AZIENDE: SI, ma in numero molto limitato, solo per progetti organizzati e concordati insieme al docente, su argomenti molto attinenti l'attività di ricerca del docente e se organizzabili in modo che permettano di assicurarsi della qualità del lavoro svolto.

COGNOME E NOME DOCENTE: **PORCELLI Anna Maria**

COGNOME E NOME DOCENTE/I: **DANIELLI Alberto**

Possibilità di svolgimento del tirocinio presso il “ Gene Center of the University of Munich” (Ludwig-Maximilians_ universität München).

In caso di interesse contattare i docenti per avere maggiori informazioni.

The Gene Center of the University of Munich carries out interdisciplinary research and teaching in the modern life sciences. The city of Munich is located in the south of Germany close to the Alps and offers a large variety of cultural events and leisure activities.

- Master thesis research project 1

Role of glutamylation of Nap1 histone chaperone in binding different histone substrates.

A rare posttranslational modification called glutamylation, which adds glutamate residues to the [?]carboxyl group of an existing glutamate residue, within Nap1 histone chaperone was discovered few years ago. Recently it was shown that glutamylation of Nap1 is important for proper deposition of H1 histone in *Xenopus laevis*. Our lab is working on different histone-histone chaperone interactions. Therefore, we are interested into expanding our current studies on Nap1-histone interactions. Our aim is to evaluate the contribution of Nap1 glutamylation for different histone substrates (H2A- H2B dimer, H1 histone) binding. We will use different biophysical methods (pull-down, native PAGE, thermophoresis, ITC, negative stain EM) to study the strength of the interactions. Our research will include working with different mutants of the proteins, as well as glutamylation modified and not modified Nap1 chaperone.

During the master thesis research, the internship will become familiar with different methods used to work with DNA (DNA isolation, cloning, mutagenesis), proteins (protein expression and purification, protein interaction assays: pull-down, native PAGE, thermophoresis, ITC, negative stain EM). The internship will be actively involved in planning the experiments and dealing with technical issues, optimization of the reaction parameters and data analysis.

During the stay in the host institution the internship will be guided and directly supervised by senior postdoc in the lab what will enable the student to gain good scientific knowledge and skills. In

addition, the internship will participate in our journal club seminars thus improving the skills required for critically reading and understanding the scientific papers. The internship will give short presentation of its own work at our group meeting, thus learning how to present and promote own scientific achievements.

- Master thesis research project 2

***S. pombe* histone octamer and nucleosome formation**

The work in Halic group is focused on molecular mechanisms of the heterochromatin formation. We combine functional studies on the systemic level with genetic, biochemical and structural approaches, to work towards a mechanistic understanding of gene regulation in eukaryotic cells. Our group is focused on the work with *S. pombe* as the model organism. To further our biophysical and structural approaches we are interested into forming *S. pombe* nucleosomes *in vitro*. The nucleosome reconstitution is established for *X. laevis* while the reaction needs optimization for *S. pombe*. As our proteins of interest, which participate in the heterochromatin formation, are from *S. pombe* it is also required to use histone octamers and nucleosomes from *S. pombe* to mimic the conditions *in vivo* in the best possible way.

The focus of this project is *in vitro* formation of *S. pombe* nucleosomes and studying their interaction with the binding proteins using different biophysical methods.

During the master thesis research, the internship will become familiar with different methods used to work with DNA (DNA isolation, cloning, mutagenesis, small DNA purification), proteins (protein expression and purification under native and denaturing conditions, *in vitro* histone octamer and nucleosome formation, methods to check quality of nucleosomes: native PAGE and electron microscopy, protein interaction assays). The internship will be actively involved in planning the experiments and dealing with technical issues, optimization of reaction parameters and data analysis. During the stay in the host institution the internship will be guided and directly supervised by senior postdoc in the lab what will enable the student to gain good scientific knowledge and skills. In addition, the internship will participate in our journal club seminars thus improving the skills required for critically reading and understanding the scientific papers. The internship will give short presentation of its own work at our group meeting, thus learning how to present and promote own scientific achievements.

- Master thesis research project 3

Role of histone posttranslation modification for karyopherin binding

Before histones can be assembled into chromatin, they must get transported from the cytoplasm to the nucleus. The transport of H3–H4 histone dimer is mediated by the histone chaperone and karyopherins. Karyopherins are proteins which are dedicated to transport different nuclear proteins from the cytosol, the site of their synthesis, into the nucleus. Only the H3–H4 dimers associated with Asf1 chaperone can bind karyopherin and get transported into the nucleus. During histone synthesis in the cytosol, H3 and H4 gain different posttranslation modifications. We are interested in studying the contribution of the different posttranslation modifications for the Asf1:H3-H4:Kap123 complex stability.

The research project will involve construction of different histone protein mutants that will mimic the posttranslation modification. These mutants will be used to establish their influence onto the complex stability using different biophysical methods.

During the master thesis research, the internship will become familiar with different methods used to work with DNA (DNA isolation, cloning, mutagenesis), proteins (protein expression and purification, *in vitro* histone:histone chaperone refolding, complex purification, protein interaction assays: pull-down, native PAGE, thermophoresis, fluorescence anisotropy). The internship will be actively involved in planning the experiments and dealing with technical issues, optimization of reaction parameters and data analysis.

During the stay in the host institution the internship will be guided and directly supervised by senior postdoc in the lab what will enable the student to gain good scientific knowledge and skills. In addition, the internship will participate in our journal club seminars thus improving the skills required for critically reading and understanding the scientific papers. The internship will give short presentation of its own work at our group meeting, thus learning how to present and promote own scientific achievements.

- Master thesis research project 4

Structural studies of the fibrillarin interactions with the nucleosome

Nucleosomes are decorated with numerous post-translational modifications capable of influencing many DNA processes. A new class of histone H2A modification, methylation of glutamine, was recently described. It was shown that the fibrillarin is the methyltransferase that performs glutamine methylation of H2A.

The focus of this research project is purification of the fibrillarin and studying its interactions with the nucleosome. The aim is to obtain the stable complex that could be used for the structural analysis. During the master thesis research, the internship will become familiar with different methods used to work with DNA (DNA isolation, cloning, mutagenesis, small DNA purification), proteins (protein expression and purification under native and denaturing conditions; *in vitro* *X. laevis* nucleosome formation; methods to check quality of nucleosomes: native PAGE and electron microscopy; protein interaction assays: native PAGE, pull-down, size exclusion, negative stain EM, thermophoresis). The internship will be actively involved in planning the experiments and dealing with technical issues, optimization of reaction parameters and data analysis.

During the stay in the host institution the internship will be guided and directly supervised by senior postdoc in the lab what will enable the student to gain good scientific knowledge and skills. In addition, the internship will participate in our journal club seminars thus improving the skills required for critically reading and understanding the scientific papers. The internship will give short presentation of its own work at our group meeting, thus learning how to present and promote own scientific achievements.