

**Titolo: Progettazione e costruzione di un apparato sperimentale per lo studio della meccanotrasduzione nelle giunzioni cellulari mediante spettroscopia force-clamp combinata a microscopia di fluorescenza di singola molecola.**

*Relatore:* Marco Capitanio

marco.capitanio@unifi.it

*Candidato:* Lorenzo Zolfanelli

lorenzo.zolfanelli93@gmail.com

Alcuni meccanismi fondamentali per la comprensione del funzionamento dei tessuti e degli organismi multicellulari sono ancora largamente incompresi. In particolare la meccanotrasduzione, ovvero la traduzione di stimoli e sollecitazioni meccaniche in segnali biochimici, è un fenomeno di fondamentale importanza per molte funzioni critiche degli organismi viventi, come quelle responsabili dell'organizzazione e dell'equilibrio dei tessuti cellulari. La meccanotrasduzione ha origine dall'interazione tra due o più proteine che, modificando in base alle sollecitazioni esterne le proprie caratteristiche conformazionali, possono modulare la loro attività in funzione dell'ambiente meccanico circostante. In questo lavoro di tesi viene proposto l'utilizzo di tecniche laser avanzate per la caratterizzazione di questi meccanismi di interazione. Viene descritta la realizzazione di un apparato sperimentale adatto a misurare e quantificare la cinetica di legame tra le proteine coinvolte al variare della forza applicata su esse. Per questo scopo viene implementato un sistema in grado di applicare una forza controllata con estrema precisione su singole molecole biologiche, sfruttando le proprietà dell'interazione tra radiazione-materia e in particolare la possibilità di intrappolare otticamente microsferie dielettriche usando un fascio gaussiano altamente focalizzato. Un elemento di particolare novità che caratterizza l'apparato realizzato è la combinazione di tecniche di spettroscopia di forza con tecniche di imaging di singola molecola: in questo modo viene proposto un metodo per analizzare contemporaneamente l'interazione di più di due proteine per volta – ad esempio osservando la presenza di eventuali altri co-fattori legati e misurando come essi possano modificare l'interazione studiata. Utilizzando fasci di luce inclinati o l'onda evanescente prodotta in caso di riflessione interna totale è possibile rivelare co-fattori marcati con sonde fluorescenti in prossimità delle proteine studiate. Correlando temporalmente le informazioni sulla localizzazione dei co-fattori con le cinetiche di interazione acquisite a forza costante è possibile andare a caratterizzare più completamente meccanismi di meccanotrasduzione come quelli responsabili dell'adesione tra le cellule nei tessuti degli organismi viventi, in un ambiente estremamente controllato dove il tipo e il numero di elementi interagenti è esattamente determinato.