SCUOLA NORMALE SUPERIORE

RELAZIONE ATTIVITA' ANNUALE DEI PERFEZIONANDI/DOTTORANDI – SECONDO ANNO
REPORT ON THE PHD ACTIVITY – SECOND YEAR

NOME E COGNOME NAME AND SURNAME	Gabriele Nardi
DISCIPLINA PHD COURSE	Nanoscienze

CORSI FREQUENTATI CON SOSTENIMENTO DI ESAME FINALE ATTENDED COURSES (WITH FINAL EXAM)	**VOTAZIONE RIPORTATA MARK**	**NUMERO DI ORE HOURS**
Seminari di Biofisica	Data d'esame da concordare	45

CORSI FREQUENTATI SENZA SOSTENIMENTO DI ESAME FINALE ATTENDED COURSES (ATTENDANCE ONLY)	**NUMERO DI ORE HOURS**

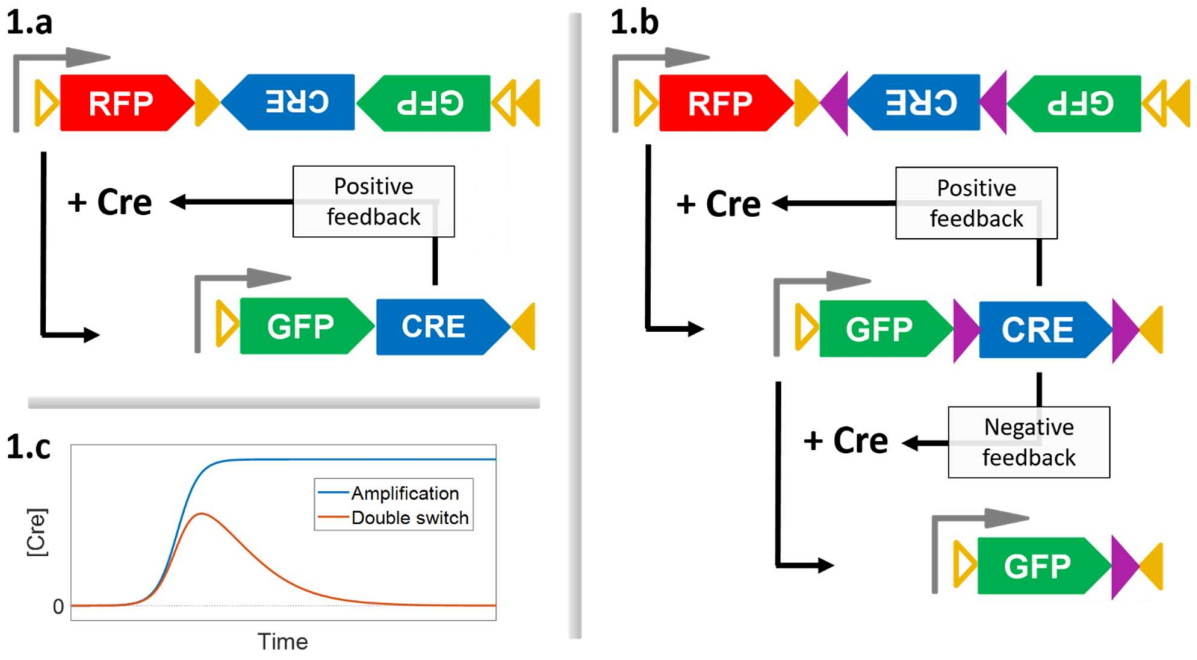
ALTRE ATTIVITÀ FORMATIVE (SEMINARI, WORKSHOP, SCUOLE ESTIVE, ECC.) – DESCRIZIONE OTHER PHD ORIENTED ACTIVITIES (SEMINARS, WORKSHOPS, SUMMER SCHOOLS, ETC) – DESCRIPTION	**NUMERO DI ORE HOURS**
Data Analysis School	32

SCUOLA
NORMALE
SUPERIORE

ATTIVITÀ DI RICERCA SVOLTA (MAX. 8.000 CARATTERI)*
RESEARCH ACTIVITY (MAX. 8000 CHARACTERS)

Durante questo secondo anno di perfezionamento:

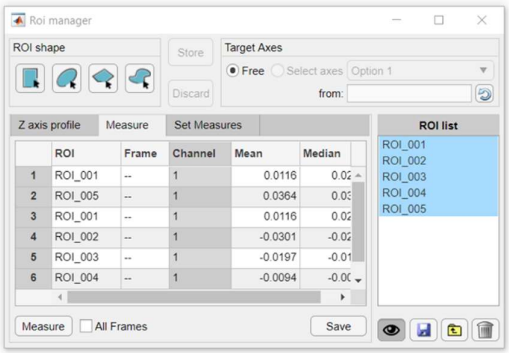
- Ho contribuito alla finalizzazione del tool molecolare Beatrix, un amplificatore e reporter fluorescente bistabile della Cre ricombinasi (Cre). Ho applicato Beatrix per studiare gli effetti della delezione del gene PTEN in una sottopopolazione di neuroni piramidali della corteccia cerebrale dei topi, mimando una condizione patologica umana nota come Displasia Corticale di tipo II, che causa autismo ed epilessia. Tale studio ha mostrato che il modello murino generato grazie all'utilizzo di Beatrix ricapitola numerosi aspetti della patologia umana ed è pertanto utilizzabile per studiare il ruolo fisio-patologico del gene PTEN *in vivo* nel sistema nervoso centrale.
- Ho ideato e realizzato una modifica di Beatrix per diminuirne eventuali effetti collaterali al livello della cellula che lo esprime. In estrema sintesi: Beatrix è un plasmide che amplifica e riporta la presenza dell'enzima Cre, anche quando quest'ultima è bassa e temporanea. Tale effetto amplificativo è consentito del gene CRE flexato: la presenza di una minima quantità iniziale della Cre, sufficiente a mediare la ricombinazione di Beatrix, porta ad una espressione costitutiva della Cre (Fig 1.a) risultando in una amplificazione che perdura indefinitamente nel tempo (Fig 1.c, "Amplification"). Tuttavia l'espressione continuativa e per periodi prolungati della Cre può danneggiare alcuni tipi di cellule. Per ovviare a questo problema, ho inserito delle sequenze Lox (target della Cre) a bassa affinità alle estremità del gene CRE: questo fa sì che Beatrix possa andare incontro ad un altro evento di ricombinazione che rimuove il gene CRE stesso, "spegnendo" l'interruttore e limitando l'amplificazione ad una finestra temporale delimitata (Fig 1.b e 1.c "double switch").



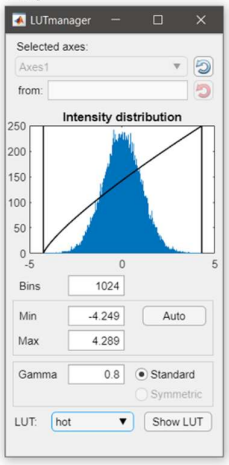
SCUOLA
NORMALE
SUPERIORE

- Ho contribuito alla realizzazione e alla messa in opera di una modifica al sensore del calcio geneticamente codificato GCaMP6f, volta a ridurne la tossicità neuronale. Tale tossicità è dovuta sia all'interferenza del sensore con le dinamiche del Ca^{++} nel neurone, che alla presenza, nel sensore, di una subunità della proteina calmodulina, che può competere con la calmodulina endogena andando ad alterare il suo importante pathway di segnalazione. Durante quest'anno abbiamo realizzato ddGCaMP, un GCaMP6f fuso ad un dominio di degradazione (dd = degradation domain) che ne comporta la degradazione continua, riducendone drasticamente le concentrazioni all'interno delle cellule. Al momento dell'esperimento, tramite la somministrazione di un farmaco, è possibile arrestare la degradazione ottenendo gli alti livelli di espressione richiesti per l'imaging di fluorescenza *in vivo*. Questa strategia permette così di ridurre al minimo la presenza del sensore quando non richiesto dalle necessità sperimentali, ad esempio durante lo sviluppo, quando interferenze esterne sui sistemi di segnalazione cellulari possono rivelarsi particolarmente deleterie. A differenza degli altri sistemi inducibili ha il vantaggio di agire tramite eventi post-traduzionali.
- Ho programmato un sistema custom-made per controllare l'acquisizione di filmati tramite una camera scientifica per wide-field imaging basato su Arduino e MATLAB.
- Ho realizzato una coppia di strumenti per l'analisi di immagini e di filmati con MATLAB. Il primo, ImageManager, è una "suite" per la gestione di immagini e filmati, comprendente alcune funzioni di visualizzazione e di analisi ROI-based. Il secondo, in corso di realizzazione, è una pipeline di analisi ROI-free di registrazioni di calcium imaging mirata all'identificazione automatica dei neuroni presenti nel campo in esame.

2.a



2.b



*se si intende sottoporre una relazione di ricerca più estesa, utilizzare il campo per una descrizione sintetica e allegare il documento in formato .pdf

If you are going to submit a longer report, please fill the box with a synthetic abstract and attach a document in pdf format

EVENTUALI PUBBLICAZIONI **PUBLICATIONS (IF AVAILABLE)**
Trovato et al, 2020, Nature Communications. (Accettato, in fase di pubblicazione)

SCUOLA
NORMALE
SUPERIORE

NOME DEL RELATORE THESIS ADVISOR
Gian Michele Ratto

DATA DATE	16/10/2020	FIRMA SIGNATURE	