

Il mio progetto di ricerca è incentrato sul metodo di *single particle tracking* (SPT) a due colori. Questa tecnica è ancora poco sviluppata e adoperata in letteratura, a causa di limiti sia sperimentali che di analisi dati. Inoltre, l'applicazione che è di nostro interesse, lo studio di interazioni nel signaling neurotrofinico, richiede di oltrepassare i limiti degli studi finora pubblicati, poiché si vuole osservare molecole con maggiore coefficiente di diffusione, con conseguente peggioramento del SNR, e interazioni più rare, con possibili tempi di interazione minori e costanti di dissociazione più elevate.

Dopo avere individuato varie sorgenti di problemi nel setup di microscopia TIRF e negli algoritmi usati in letteratura, quest'anno ho completato le implementazioni di nuovi metodi computazionali e le ottimizzazioni sul nostro setup. In particolare, ho lavorato sui seguenti aspetti.

- Software per ricostruzione traiettorie in esperimenti di SPT a due colori. Ho completato lo sviluppo di un programma sviluppato sfruttando gli strumenti del calcolo parallelo in MATLAB. Tale approccio permette di integrare le informazioni disponibili nei due canali nel corso dell'analisi, tramite il reciproco e simultaneo scambio di informazioni tra due worker, ognuno dei quali conduce l'analisi su uno dei due canali. Questo approccio consente di minimizzare gli errori nella ricostruzione delle interazioni: questi possono essere infatti dovuti al cumulo di errori derivanti da ognuno dei due canali e, in questo tipo di analisi in parallelo, gran parte dei possibili errori fatti da un canale possono essere corretti tramite le informazioni ricevute dall'altro.
- Analisi post tracking per estrazione dei parametri di interazione. Ho implementato dei metodi di analisi che permettono di estrarre i parametri per una completa caratterizzazione dell'interazione, quali il tempo di interazione e la costante di dissociazione. Dopo la ricostruzione delle traiettorie, devono essere considerate diverse correzioni, per tenere conto ad esempio dell'effetto del bleaching o dell'effetto di avvicinamenti di spot oltre i limiti dovuti all'incertezza di localizzazione (caso in cui le due molecole sono rilevate come colocalizzate anche se non realmente interagenti).
- Simulazioni. Ho completato lo sviluppo degli algoritmi per simulare diffusione e interazioni di singole molecole. Possono essere inclusi diversi effetti per riprodurre le condizioni sperimentali, come bleaching, mancate rilevazioni, diversi valori di incertezza di localizzazione. È possibile simulare i risultati di un algoritmo di detection per testare indipendentemente la fase di tracking oppure simulare dei filmati simili a quelli ottenuti in un esperimento, con diversi livelli di SNR, per testare un'analisi completa, costituita da detection, localizzazione e tracking. Le simulazioni sono implementate sfruttando la programmazione orientata agli oggetti in Python, per avere una maggiore versatilità. I metodi di analisi sono stati testati su simulazioni in diverse condizioni e finora abbiamo ottenuto stime affidabili dei parametri per valori della costante di dissociazione almeno in un range di ordini di grandezza 1-100 spot/ $\mu\text{m}^2$  e tempo di interazione in un range di circa 90-1500 ms, superando i limiti di quanto finora presente in letteratura.
- Prima applicazione dei metodi sviluppati. Il primo esperimento su cui sono stati applicati i metodi sviluppati ha riguardato l'omodimerizzazione del recettore TrkA. Questo è stato marcato con i fluorofori a due lunghezze d'onda diverse ed è stato possibile estrarre la vita media dei dimeri e la costante di dissociazione.
- Ottimizzazioni sperimentali sul setup di microscopia. I principali problemi che limitano il rapporto segnale/rumore in questi esperimenti sono dovuti ad autofluorescenza che viene eccitata soprattutto alle lunghezze d'onda minori utilizzabili per il primo canale e rilevata in entrambi i canali; in particolare, il contributo è molto alto nel canale del far red, tipicamente utilizzato per esperimenti a singolo colore. Abbiamo individuato come principale sorgente di questo effetto il vetrino su cui sono adese le cellule osservate. Una prima ottimizzazione è consistita nella scelta della migliore coppia di canali, con eccitazioni a 488 nm e 561 nm e rivelazioni attorno a 525 nm e 600 nm, per minimizzare l'impatto dell'autofluorescenza. In queste condizioni è stato possibile effettuare l'esperimento sul recettore TrkA. Nelle successive applicazioni si vorrebbe osservare anche il recettore p75, caratterizzato da dinamica più veloce e che quindi tende a peggiorare il rapporto

segnale/rumore. Ho quindi lavorato a un ulteriore possibile miglioramento: ho testato diversi tipi di substrati per sostituire il vetrino tipicamente utilizzato e ho individuato un diverso tipo di vetro, che ha un'autofluorescenza dimezzata nel canale corrispondente all'eccitazione a 488nm (Canale in cui è più bassa la brillantezza dei fluorofori). Ciò permette di diminuire il rumore in questo canale e quindi aumentare il rapporto segnale/rumore. Il materiale ha un indice di rifrazione leggermente diverso dal valore standard per la microscopia TIRF, tuttavia sono riuscita a correggere le aberrazioni grazie all'ottimizzazione della posizione del collare dell'obiettivo e all'utilizzo dell'olio di immersione che si è rivelato migliore tra quelli testati. A breve verranno effettuati gli esperimenti in queste nuove condizioni sperimentali, tuttavia i test effettuati indicano un effettivo miglioramento del SNR.

Proseguimento del lavoro. Nel prossimo anno il lavoro vorrebbe proseguire applicando i metodi sviluppati per studiare meccanismi ancora non noti e controversi coinvolti nel signalling neurotrofinico. Questo sembra essere determinato da una complessa coordinazione nell'interazione di diversi ligandi e diversi recettori.

Riporto di seguito i possibili esperimenti di SPT a due colori da svolgere nel corso dell'anno; in ognuno si osserva una coppia di molecole (marcate con fluoroforo grazie al toolbox sviluppato in questi ultimi anni) coinvolte in questi meccanismi, possibilmente in diverse condizioni:

- 1) *Recettore TrkA e recettore p75*, osservati in assenza e in presenza di ligandi NGF e proNGF.
- 2) *Recettore TrkA e ligando (NGF o proNGF)*. Si vorrebbe svolgere questo esperimento sia su cellule non esprimenti p75, sia su cellule esprimenti p75, possibilmente variando il suo livello di espressione.
- 3) *Recettore p75 e ligando (NGF o proNGF)*. Analogamente al precedente si vorrebbe svolgere l'esperimento in condizioni di assenza e presenza di TrkA.

Sono già disponibili le neurotrofine con il tag necessario per poterle marcare e un protocollo per la loro marcatura e purificazione.

Sono disponibili anche costrutti di TrkA e p75 per poter effettuare una doppia infezione delle cellule. Stiamo già preparando questo esperimento per verificare che i livelli di espressione ottenuti per i due recettori siano entrambi nel range adatto per l'esperimento. Altrimenti proveremo ad effettuare una trasfezione del TrkA ed un'induzione controllata del p75 inserito tramite il vettore lentivirale, metodi che sono già stati utilizzati in precedenza in altri esperimenti di SPT a singolo colore.

È disponibile un costrutto di TrkA non marcabile per poter essere utilizzato nell'esperimento in cui si vogliono visualizzare p75 e ligando; bisogna realizzare un costrutto analogo per il p75.

Fra gli esperimenti sopra descritti, il più desiderabile è il primo, che permetterebbe di risolvere il dubbio esistente in letteratura da decine d'anni sul funzionamento e l'eventuale stechiometria dei cosiddetti siti ad alta affinità per l'NGF formati da p75 e TrkA, sfruttando un esperimento in cellule vive ed in condizione di bassa espressione. In ogni caso, anche gli esperimenti 2 e 3 permetterebbero sia di testare, in un esperimento di ampio interesse scientifico, il toolbox completo che ho sviluppato per acquisizione ed analisi di SPT a 2 colori, sia di fare passi avanti per risolvere il dubbio sopra descritto. Tali esperimenti sono di più probabile buona riuscita perché: (i) le (pro)neurotrofine sono costitutivamente dimeriche, per cui gli spot osservati contengono 2 fluorofori, con un miglioramento del rapporto segnale/rumore; (ii) è più semplice dosare la concentrazione delle (pro)neurotrofine fluorescenti per ottenerne la densità ottima per l'esperimento.

Sono quindi confidente di poter concludere ed analizzare almeno uno degli esperimenti sopra citati, ed almeno di finire di preparare un articolo da questo/i derivante, da sottomettere a riviste di importanza internazionale di impatto buono o ottimo.