

Ottimizzazione del microscopio wide field per stimolazione optogenetica e rivelazione dell'attività neuronale in vivo

Candidato: Lorenzo Baldi

Relatore: Francesco Saverio Pavone (francesco.pavone@unifi.it)

Correlatore: Anna Letizia Allegra Mascaro (allegra@lens.unifi.it)

La microscopia wide field, combinata ad indicatori fluorescenti dell'attività cellulare, permette di monitorare l'attività dei neuroni in tempo reale. In dettaglio, l'utilizzo di indicatori calcio geneticamente codificati ha consentito di espandere le potenzialità della microscopia in fluorescenza per l'analisi della plasticità funzionale in vivo. In parallelo è stata sviluppata una tecnica, chiamata optogenetica, che utilizza proteine fotosensibili (e.g. le rodopsine canale, o ChR) per effettuare stimolazione ottica dei neuroni. Questa metodica consente di manipolare con impulsi luminosi l'attività di popolazioni neuronali geneticamente selezionate.

Nel presente lavoro di tesi sono state combinate la microscopia wide field e la stimolazione optogenetica per studiare la funzionalità neuronale tramite simultanea rivelazione e manipolazione dell'attività cerebrale.

A tale scopo è stato utilizzato un animale esprime il sensore del calcio fluorescente GCaMP6f in cui viene indotta l'espressione di ChR2 nella corteccia motoria tramite un vettore virale. Il microscopio wide field è stato ottimizzato in modo tale da combinare rivelazione di GCaMP6f in un emisfero e stimolazione ChR2 nell'altro per studiare la connettività funzionale inter-emisferica. La stimolazione optogenetica nella corteccia sinistra determina l'insorgenza di onde di attività neuronale correlata al calcio nell'emisfero controlaterale. L'analisi dei segnali di fluorescenza evidenzia l'eterogeneità spaziale e temporale dei pattern di propagazione del segnale calcio nella corteccia controlaterale.

Questo sistema completamente ottico di rivelazione e manipolazione dell'attività neuronale in vivo, ottimizzato nel presente lavoro di tesi, verrà applicato in futuro allo studio della plasticità neuronale a seguito di danneggiamento neuronale.