



**AL MAGNIFICO RETTORE  
DELL'UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO**

**COD. ID: 6611**

Il sottoscritto chiede di essere ammesso a partecipare alla selezione pubblica, per titoli ed esami, per il conferimento di un assegno di ricerca presso il Dipartimento di Bioscienze

Responsabile scientifico: Professor Achille Pellicoli

## **CURRICULUM VITAE**

### **INFORMAZIONI PERSONALI**

<b>Cognome</b>	Panzeri
<b>Nome</b>	Gabriele

### **OCCUPAZIONE ATTUALE**

<b>Incarico</b>	<b>Struttura</b>
N.A.	N.A.

### **ISTRUZIONE E FORMAZIONE**

<b>Titolo</b>	<b>Corso di studi</b>	<b>Università</b>	<b>anno conseguimento titolo</b>
Laurea Magistrale o equivalente	Biologia applicata alla Ricerca Biomedica	Università degli Studi di Milano	2023
Specializzazione	N.A.		
Dottorato Di Ricerca	N.A.		
Master	N.A.		
Diploma Di Specializzazione Medica	N.A.		
Diploma Di Specializzazione Europea	N.A.		
Altro	N.A.		

### **ISCRIZIONE AD ORDINI PROFESSIONALI**

<b>Data iscrizione</b>	<b>Ordine</b>	<b>Città</b>
22/02/2024	Albo dei Biologi della Lombardia	Milano



## LINGUE STRANIERE CONOSCIUTE

lingue	livello di conoscenza
INGLESE	B1

## PREMI, RICONOSCIMENTI E BORSE DI STUDIO

anno	Descrizione premio
N.A.	N.A.

## ATTIVITÀ DI FORMAZIONE O DI RICERCA

L'attività di formazione pratica parte dal tirocinio della laurea triennale in Biotecnologie Unimi della durata di 6 mesi presso il laboratorio del Professor Angelo Poletti nel Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari dell'Università degli Studi di Milano con la tesi "Tecnica Western Blot applicata allo studio della traduzione ATG indipendente nella sclerosi laterale amiotrofica".

In questo tirocinio ho imparato i primi approcci all'attività laboratoriale nel campo della ricerca. Lo scopo del progetto era di valutare i livelli solubili ed insolubili di poli-GP e poli-GA espressi in cellule NSC34 a seguito della trasfezione di due plasmidi che ne determinano l'espressione in modo ATG dipendente ed indipendente al fine di confrontare l'effetto di Forskolina e H89 sui due meccanismi di traduzione.

Per svolgere gli esperimenti mi sono servito delle cellule NSC34, ho partecipato alla trasfezione sotto la guida del tutor, infatti è stato usato il metodo della trasfezione transiente dove i plasmidi venivano introdotti in cellule NSC34 in modo da non integrarsi nel DNA ma rimanere come frammento extracromosomico, tuttavia oltre ai plasmidi e la linea cellulare NSC34 si utilizzava anche la lipofectamina 3000 e il reagente di trasfezione p3000 per creare il legame DNA-lipide per entrare nella cellula.

Dopo 24 ore dalla trasfezione staccavo le cellule dalla piastra con il medium di crescita, poi le centrifugavo per 5 minuti a 1200 rpm a 4° C, risospese con PBS e inibitore delle proteasi (IP) in rapporto 1:100, successivamente sonicate per rompere la membrana cellulare con 3 cicli ad intensità, questo passaggio veniva fatto sempre per testare le cellule o meglio le proteine al loro interno tramite il saggio dell'acido bicinconico (BCA).

Il saggio veniva fatto tramite una soluzione alcalina PH 11,25 con acido bicinconico, sodio carbonato, sodio bicarbonato, sodio tartrato e rame II solfato pentaidrato.

Il kit della BCA utilizzato aveva due miscele A e B che venivano miscelate in rapporto 1:50 per ottenere la soluzione descritta sopra, si usava una piastra da 96 pozzetti, si poneva il reagente per la curva standard che per i campioni nei pozzetti, poi si aggiungeva 4 ul di campione in ogni pozzetto in duplicato, i campioni poi vengono letti tramite uno strumento chiamato Enspire.

Successivamente per continuare col progetto abbiamo usato un altro metodo ovvero la tecnica del Filter Trap Assay che è stata usata per l'analisi degli aggregati proteici basandosi sulla loro ritenzione sulla membrana di acetato di cellulosa contenente pori.

La metodica consisteva nel diluire il campione in PBS, la membrana del filtro viene disposta su uno strumento dotato di due supporti complementari.

I filtri prima di essere applicati venivano fatti ambientare in PBS, mentre la membrana veniva prima immersa in PBS e poi in metanolo successivamente si faceva un lavaggio di PBS, poi si caricavano i campioni preparati precedentemente e poi si fa un ulteriore lavaggio con PBS, tra un passaggio e l'altro si applicava il vuoto per filtrare la soluzione attraverso la membrana.

Finito l'esperimento le proteine sulla membrana venivano fissate in metanolo e lavata in TBST e successivamente processata per identificare le proteine.

Si saturavano tutti i siti aspecifici di legame col latte e si usavano vari anticorpi primari ad esempio anti-poli GP, anti-FLAG e anti-alfatubulina. Successivamente la membrana veniva incubata con



**l'anticorpo secondario.**

Infine ho imparato ad usare la tecnica del Western Blot, utilizzata come tecnica cardine nel mio progetto e di conseguenza della mia tesi.

Per questa tecnica si preparava il gel di poliaccrilammide al 10% per poli GP.

Il gel era strutturato da due parti, separating e stacking, e la preparazione del gel avveniva grazie alle reazioni dei reagenti che erano acqua distillata, Tris HCl (PH 8,8 per il separating e PH 6,8 per lo stacking), acrilammide 40%, SDS 10%, ammonio persolfato (APS) e 10% N,N,N',N'-tetrametilendiammina (TEMED).

Si preparavano campioni utilizzando il beta mercaptoetanololo per distruggere i ponti disolfuro, successivamente i campioni venivano messi nei pozzetti e fatti correre tramite corsa elettroforetica. Il gel poi veniva trasferito su una membrana di nitrocellulosa e incubata con anticorpi primari e poi il secondario e alla fine veniva letto il risultato con lo strumento Chemidoc.

In questo tirocinio ho appreso anche le attività di manutenzione e conservazione degli strumenti ed attrezzature varie come ad esempio pulizia banconi e cappa, pipette, ecc ecc.

Nella Laurea Magistrale ho intrapreso un tirocinio di 1 anno presso i laboratori del Centro di Ricerca Pediatrica Romeo ed Enrica Invernizzi del Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche dell'Università degli Studi di Milano Ospedale Luigi Sacco con la tesi "Study of inflammatory and mitochondrial dysregulation in primary fibroblasts harbouring a mutation in the AG7 gene".

Lo scopo di questo progetto era quindi di fornire nuove informazioni sulla mutazione IFIH1 e capirne i meccanismi, testando inoltre un nuovo composto come possibile farmaco. Sono state usate linee cellulari di fibroblasti primari ottenute dal paziente pediatrico e da un controllo corrispondente per età e sesso. Sono state usate tecniche di estrazione RNA e Real-Time PCR per esaminare l'espressione genica, tecniche di estrazione delle proteine con RIPA e analisi mediante Western Blot e immunofluorescenza per valutare l'espressione delle proteine.

Le linee cellulari utilizzate per questo progetto erano fibroblasti ottenuti da un paziente pediatrico affetti da AGS con una mutazione nel gene IFIH1 (AGS7), insieme ai fibroblasti estratto da un individuo pediatrico sano utilizzato come controllo (CTR), infatti in questo tirocinio ho appreso le tecniche per trattare le colture cellulari in completa autonomia come ad esempio trasferire la biopsia in una piastra contenente il medium di coltura DMEM High Glucose per ottenere i fibroblasti, piastrare e cambiare terreno, congelarle utilizzando il DMSO e scongelarle dopo molto tempo.

Una tecnica usate per il progetto è l'estrazione dell'RNA e la sua quantificazione infatti dopo aver coltivato le cellule in una piastra da sei pozzetti, si rimuoveva il terreno, si effettuavano lavaggi col PBS, si aggiungeva il Trizol per lisare le cellule, si raschiava la piastra e si metteva tutto il contenuto nelle eppendorf che venivano successivamente incubate a temperatura ambiente, diluite con cloroformio e centrifugate. Si formavano tre fasi nel liquido dei campioni e delicatamente si toglieva la fase trasparente contenente RNA, a questo punto si aggiungevano ulteriori reagenti come glicogeno RNAsi-free, isopropanolo e poi si centrifugava il tutto, si eliminava il surnatante in eccesso e si aggiungeva l'etanolo per poi ricentrifugare e diluire con acqua RNAsi free.

A questo punto si misuravano le quantità ottenute tramite assorbanza ottenuta con lo spettrofotometro UV-Vis Multiskan.

Tra i vari esperimenti del progetto c'era la misurazione dell'espressione dei geni stimolati dall'interferone e della firma interferonica.

Per fare questo ci servivamo dei campioni di RNA precedentemente estratti e si trascrivevano in DNA mediante la tecnica della trascrizione inversa.

E' stato utilizzato il kit iScript<sup>TM</sup> Reverse Transcription Supermix Kit for RT-qPCR (BIORAD) seguendo le istruzioni del produttore. In particolare, un certo numero di microlitri di RNA trascritto inversamente è stato utilizzato in base ai calcoli ottenuti dalla quantificazione dell'RNA e poi sono stati utilizzati 4 µl di trascrittasi inversa (iScript<sup>TM</sup>) successivamente è stato portato al volume finale di 20 µl con acqua senza nucleasi per raggiungere la concentrazione finale desiderata ed è stata poi incubata in un termociclatore impostando vari cicli a seconda dell'occorrenza.

Per valutare l'espressione genica dopo aver ottenuto il DNA mediante trascrizione inversa, abbiamo analizzato i campioni mediante la tecnica Real-Time PCR. Ogni campione è stato analizzato in triplo. La miscela di reazione per tutti i primer è stata preparata aggiungendo 2 µl di campione di cDNA alla miscela, costituita da SsoAdvanced<sup>TM</sup> Universal SYBR<sup>®</sup> Green Supermix, Primer Forward (10 µM) e primer inverso (10 µM) del gene da analizzare, 2,4 µl di acqua priva di DNase e RNasi, servendosi del kit SsoAdvanced<sup>TM</sup> Universal SYBR<sup>®</sup> Green Supermix Kit (BIO-RAD).

Un'altra tecnica appresa in questo tirocinio è l'estrazione delle proteine mediante RIPA.

Le cellule venivano staccate utilizzando il tampone RIPA precedentemente congelato a cui è stata



aggiunta una miscela di inibitori delle proteasi. Successivamente le cellule venivano incubate per 20 minuti in ghiaccio e poi centrifugate a freddo. Il surnatante, che conteneva le proteine solubili, veniva raccolto senza aspirare il pellet che si è formato con le cellule e conservato a -80 °C.

Un'altra tecnica appresa è stata la quantifica delle proteine mediante il reagente Bradford

Dopo aver estratto e reso solubili le proteine, è necessario quantificarle e a tal fine è stato utilizzato il Reagente Bradford (Biorad) per determinare la concentrazione delle proteine, la misura si basava sull'assorbanza ottenuta grazie a concentrazioni standard e quelle dei campioni.

In questo tirocinio è stata affrontata ancora la tecnica western blot descritta sopra, con la differenza degli anticorpi primari e secondari utilizzati.

Una tecnica nuova imparata è stata la tecnica dell'immunofluorescenza.

Le cellule erano state coltivate su una piastra 48 in cui sono stati applicati dei vetrini rotondi di 12 mm di diametro.

Le cellule erano state fissate per 15 minuti a temperatura ambiente in una soluzione di paraformaldeide al 4% e sono state poi sottoposte al protocollo di permeabilizzazione per 10 minuti con 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA). Poi si incubavano le cellule con l'anticorpo primario appropriato diluito nella soluzione di permeabilizzazione, poi venivano lasciati i vetrini coprioggetto per 90 minuti a 37 °C o per tutta la notte a 4 °C.

Successivamente si aggiungeva l'anticorpo secondario diluito nella soluzione di permeabilizzazione per 90 minuti a temperatura ambiente.

Dopo vari lavaggi si montava utilizzando il reagente Fluorsave (Calbiochem, Merck Chemical, Darmstadt, Germania) e una volta fissati i vetri si osservavano le cellule al microscopio confocale.

Abbiamo valutato la vitalità delle cellule mediante il saggio MTT.

Si aggiungeva del terreno DMEM low glucose, poi si aggiungeva il MTT, si faceva riposare al buio la piastra per 2-3 ore. Finite le 2-3 ore si rimuoveva la soluzione e si aggiungeva la soluzione di eluzione, si agitava la piastra e poi si andava a misurare l'assorbanza al Multiskan.

Come ultima tecnica appresa era quella che dava inizio al tutto perché discriminava le cellule che volevamo ottenere dalla biopsia da tutte le altre, questa tecnica era la citometria a flusso FACS.

In ogni provetta era contenuta una sospensione cellulare, veniva aggiunto il Fc block diluito in una soluzione tampone FACS in rapporto 1:50, in ogni provetta, venivano incubate in ghiaccio per 20 minuti, poi centrifugate a freddo. Successivamente si rimuoveva il surnatante ottenuto, a questo punto si aggiungevano CD45, CD31, CD90, EpCAM e CD146 nella rispettiva provetta.

Le provette venivano incubate per almeno 30 minuti a temperatura ambiente, poi lavate, centrifugate e risospese in FACS freddo.

Venivano conservate le cellule al buio, con ghiaccio, a 4 °C in frigorifero fino al momento dell'analisi.

## ATTIVITÀ PROGETTUALE

Anno	Progetto
2019/2020	"Tecnica Western Blot applicata allo studio della traduzione ATG indipendente nella sclerosi laterale amiotrofica" presso i laboratori del Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari dell'Università degli Studi di Milano
2022/2023	"Study of inflammatory and mitochondrial dysregulation in primary fibroblasts harbouring a mutation in the AG7 gene" presso i laboratori del Centro di Ricerca Pediatrica Romeo ed Enrica Invernizzi del Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche dell'Università degli Studi di Milano Ospedale Luigi Sacco

## TITOLARITÀ DI BREVETTI

Brevetto
N.A.



## CONGRESSI, CONVEGNI E SEMINARI

Data	Titolo	Sede
19-20 SETTEMBRE 2022	I CONGRESSO NAZIONALE SULLE LEUCODISTROFIE IN ETÀ STUDIO PEDIATRICA: DALLA DIAGNOSI AL TRATTAMENTO	AULA MAGNA - UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO VIA FESTA DEL PERDONO 7 MILANO
N.A.	N.A.	

## PUBBLICAZIONI

Libri
[titolo, città, editore, anno...]
[titolo, città, editore, anno...]
[titolo, città, editore, anno...]

Articoli su riviste
[titolo articolo, rivista, città, editore, anno...]
[titolo articolo, rivista, città, editore, anno...]
[titolo articolo, rivista, città, editore, anno...]

Atti di convegni
Poster Abstract: "NEW INSIGHTS IN AICARDI-GOUTIÈRES SYNDROME: CHARACTERIZATION OF A AGS9 MUTATION" SINS 2023 TURIN

## ALTRE INFORMAZIONI

N.A.

Le dichiarazioni rese nel presente curriculum sono da ritenersi rilasciate ai sensi degli artt. 46 e 47 del DPR n. 445/2000.

Il presente curriculum, non contiene dati sensibili e dati giudiziari di cui all'art. 4, comma 1, lettere d) ed e) del D.Lgs. 30.6.2003 n. 196.

RICORDIAMO che i curricula **SARANNO RESI PUBBLICI sul sito di Ateneo** e pertanto si prega di non inserire dati sensibili e personali. Il presente modello è già pre-costruito per soddisfare la necessità di pubblicazione senza dati sensibili.

Si prega pertanto di **NON FIRMARE** il presente modello.



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Luogo e data: Paderno Dugnano, 03/05/2024