



**Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavallotti-
Ottolenghi (NICO)**

Progetto delle attività di ricerca per l'anno 2012

Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO)

Progetto delle attività di ricerca per l'anno 2012

<i>Gruppo</i>	<i>Responsabile</i>	<i>Pagina</i>
Clinical Neurobiology	Antonio Bertolotto	3
Adult Neurogenesis	Luca Bonfanti, Paolo Peretto	9
Neuropeptides, Emotional and Feeding Behaviour	Carola Eva	16
Plasticity and Regeneration of the PNS	Stefano Geuna	19
Steroids and Nervous System	Giancarlo Panzica	22
Developmental Neurobiology and Regeneration	Ferdinando Rossi	26
Alzheimer's disease and Ataxia	Filippo Tempia	32
Brain Development and Disease	Alessandro Vercelli	34

Torino, 26 novembre 2011

Ferdinando Rossi
Direttore Scientifico
Istituto di Neuroscienze
Fondazione Cavalieri-Ottolenghi

Progetto delle attività di ricerca per il 2012 del gruppo **Clinical Neurobiology**, presso l'Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO)

Responsabile del gruppo: **Antonio Bertolotto**

1. Composizione del gruppo di ricerca (1-11-2011)

1.1. Personale strutturato dell'Università di Torino (o dell'Ospedale San Luigi Gonzaga)

Antonio Bertolotto (Direttore di Struttura Complessa Ospedaliera)

Arianna Sala (Dirigente Biologo di I livello)

1.2. Personale non strutturato

Francesca Gilli (ricercatore Co.Co.Co)

Simona Perga (postdoc)

Fabiana Marnetto (assegnista)

Marzia Caldano (borsista)

Egidio Caricati (borsista)

Letizia Granieri (borsista specializzanda)

Nicole Navone (borsista specializzanda)

Paola Valentino (borsista)

Claudia Carcione (tecnico borsista)

Daniela Gramolelli (tecnico borsista)

Partecipano alle attività del gruppo alcuni studenti tesisti delle Facoltà di Scienze MFN e della Scuola per le Biotecnologie.

2. Progetti di ricerca (2012)

Il lavoro di ricerca si sviluppa lungo tre filoni principali. Il primo è dedicato all'identificazione precoce dei pazienti non responsivi alle diverse terapie oggi disponibili per la Sclerosi Multipla (SM) e Malattia di Devic. In particolare, l'attività è attualmente diretta a studiare la formazione di anticorpi anti-farmaci (in particolare anticorpi anti-interferone- β e anti-natalizumab) e ad individuare specifici marcatori molecolari per il monitoraggio di pazienti in terapia con interferone- β , glatiramer acetato, rituximab e natalizumab.

Il secondo filone è diretto allo studio della patogenesi della SM, con lo scopo di individuare nuovi possibili bersagli terapeutici. L'aspetto patogenetico è indagato seguendo una linea originale ed innovativa: partendo dal dato ben noto che la gravidanza svolge un ruolo protettivo, è stato condotto un primo studio sull'espressione genica prima, durante e dopo la gravidanza nella SM e in controlli normali. Questo studio ha permesso di identificare 7 geni che sono espressi in modo anomalo nei linfomonociti di pazienti con SM, ma che sono corretti nella loro espressione durante la gravidanza. In questo stesso ambito, è anche in corso lo studio del ruolo svolto dai microRNA nel regolare l'espressione dei suddetti geni nei pazienti con SM.

La terza linea di ricerca è volta alla messa a punto di nuove tecniche diagnostiche. In particolare le attività sono rivolte alla diagnosi differenziale tra SM e malattia di Devic. A differenza della SM, nella malattia di Devic l'antigene bersaglio è noto: in alcuni pazienti sono stati infatti riscontrati anticorpi anti-aquaporina 4 (AQP4). Si sta ora determinando quanto questo anticorpo sia specifico per la diagnosi di malattia di Devic, sviluppando anche nuove metodiche per la valutazione degli anticorpi anti-AQP4 da introdurre nella pratica clinica.

E' stata istituita infine, una Banca Biologica per i pazienti con SM che conserva il materiale biologico (CSF, globuli bianchi, siero, RNA e DNA) e le informazioni cliniche di varie tipologie di pazienti SM.

Il laboratorio di Neurobiologia Clinica offre anche un servizio diagnostico e di consulenza, accessibile da strutture esterne (al momento 40 neurologie italiane), necessari per formulare la diagnosi di SM (o altre patologie neurologiche) e monitorare l'andamento della malattia o la risposta alle terapie.

2.1. Identificazione precoce dei pazienti non responsivi alle diverse terapie disponibili per la Sclerosi Multipla e Malattia di Devic

Al momento, per discriminare i pazienti responder e non-responder alle diverse terapie sono utilizzabili diversi approcci: 1) la valutazione clinica; 2) la RM; e 3) le valutazioni biologiche e farmacogenomiche. Proprio quest'ultimo approccio è oggetto di studio e si basa su un concetto elementare: ogni farmaco per poter esplicare la sua azione terapeutica deve svolgere innanzitutto un'azione biologica che si manifesta in diverse e sequenziali modalità quali ad esempio, un adeguato assorbimento, il legame ad un recettore, l'attivazione di secondi messaggeri (mRNAs), attivazione/inibizione di geni, modificazioni di popolazioni cellulari. E' chiaro che la presenza di fattori in grado di bloccare uno o più dei suddetti passaggi, può determinare un'abolizione dell'attività biologica e quindi dell'efficacia clinica del farmaco. Tra i fattori che maggiormente influenzano l'attività biologica di un farmaco vi sono i livelli di assorbimento, la biotrasformazione ed escrezione della molecola, il *turnover* recettoriale e lo sviluppo di specifici anticorpi anti-farmaco. Il monitoraggio biologico dei pazienti in terapia, può quindi avvalersi di due strategie distinte, ovvero la stima diretta dei fattori inibenti l'attività biologica (ad esempio una quantificazione degli anticorpi anti-farmaco) o la valutazione degli effetti biologici indotti dal farmaco stesso. Quest'ultima strategia si basa sul concetto che un paziente è definibile come *responder* biologico quando si manifestano specifici effetti biologici (ad esempio l'incremento in espressione di geni direttamente indotti) dopo la somministrazione del farmaco.

Negli ultimi anni, gran parte dell'attività di ricerca è stata indirizzata alla precoce identificazione dei pazienti *non-responder* all'interferone-beta o al natalizumab, tramite la quantificazione di anticorpi neutralizzanti (NABs); questa attività, oltre ad essere un fonte di ricerca clinica applicata, è diventata un servizio fornito a tutte le neurologie italiane.

Per quanto riguarda la valutazione degli effetti biologici del farmaco si stanno sfruttando varie tecniche, compresa la moderna farmacogenomica. L'impiego di tecniche innovative nell'analisi molecolare si è rivelata particolarmente fruttuosa nell'ambito delle terapie per la SM (interferone- β , glatiramer acetato, natalizumab e rituximab), alla ricerca di profili di espressione genica che consentano la categorizzazione dei pazienti in sottogruppi prognostici distinti.

Collaborazioni: Huub Schellekens (Utrecht, Olanda), Wim Jiskoot (Leiden, Olanda).

2.2. Approccio alla patogenesi della SM

Un'inflammatione cronica si sviluppa a seguito di uno squilibrio tra risposte pro- e anti-infiammatorie. Ciò determina l'insorgenza e la progressione di malattie "croniche", tra cui malattie autoimmuni e neurodegenerative. Al fine di comprendere la patogenesi di queste condizioni e di poter intervenire con terapie adeguate, è essenziale conoscere i fattori che attivano i processi infiammatori, così come gli approcci biologici in grado di mantenere questi processi sotto controllo.

Molteplici sono i meccanismi coinvolti nell'inibizione dell'inflammatione, compresa l'attivazione di specifici circuiti a retroazione negativa, ovvero i cosiddetti "negative feedback loops". Negli ultimi anni sono stati identificati diversi circuiti a retroazione negativa, il cui ruolo è quello di attenuare la risposta mediata da induttori o amplificatori dell'inflammatione. Tali circuiti includono la sintesi di proteine che inibiscono le vie di trasduzione (ad esempio le proteine SOCS), la sintesi di repressori e transrepressori trasduzionali (ad esempio Nurr1 e TNFAIP3) e la produzione di mediatori solubili o di superficie ad attività anti-infiammatoria (ad esempio IL-10 e TGF β). A questo proposito, degna di nota è la nostra recente osservazione (confermata anche da altri gruppi) di un collegamento diretto tra i transrepressori trasduzionali Nurr1 e TNFAIP3 e la sclerosi multipla (SM), ovvero una malattia infiammatoria, autoimmune e demielinizzante del sistema nervoso centrale (SNC). Si ritiene che l'inflammatione costituisca un aspetto chiave nella patofisiologia di questa condizione debilitante e degenerativa. Nel complesso, il processo infiammatorio caratteristico della

SM sembrerebbe essere causato da una iper-attivazione di linfociti pro-infiammatori T helper (Th1 e Th17). Tuttavia, i nostri dati suggeriscono che la SM derivi da difettosi circuiti a retroazione negativa piuttosto che da una eccessiva reazione pro-infiammatoria, e il coinvolgimento di Nurr1 e TNFAIP3 sembrerebbe confermare questo concetto. In accordo con questa affermazione, nei nostri precedenti studi abbiamo osservato una marcata riduzione nell'espressione di Nurr1 e TNFAIP3 in cellule mononucleate ottenute da pazienti affetti da SM. Tali eventi potrebbero quindi contribuire ad una cronicizzazione dei processi infiammatori, derivanti da un iniziale stimolo aberrante.

Ulteriori dati ottenuti dal nostro gruppo dimostrano che Nurr1 e TNFAIP3 sono down-regolati sia nelle cellule linfoidi sia nelle cellule mieloidi, ma particolarmente nelle seconde. Poiché le cellule mieloidi (ovvero monociti, macrofagi e microglia) svolgono un ruolo essenziale sia nell'infiammazione cerebrale sia nella regolazione dei circuiti a retroazione negativa dell'infiammazione stessa, riteniamo possa essere importante approfondire il ruolo dei due trascritti nella SM. L'attuale linea di ricerca si propone quindi di esaminare come un'alterata espressione di Nurr1 e TNFAIP3 favorisca il processo patogenetico della SM e come influenzi la neurodegenerazione nella malattia.

In primo luogo, lo studio si propone di indagare l'espressione di Nurr1 e TNFAIP3 in diverse coorti di pazienti con SM, ovvero pazienti con malattia attiva o stabile, e pazienti affetti da diverse tipologie di SM. Inoltre, lo studio si propone di analizzare l'espressione di Nurr1 e TNFAIP3 anche in pazienti affetti da altre malattie neurodegenerative (quali Parkinson, Sclerosi Laterale Amiotrofica ed Alzheimer) ed autoimmuni (quali tiroidite autoimmune, artrite reumatoide e diabete autoimmune).

In secondo luogo, la ricerca è volta alla caratterizzazione di sottopopolazioni cellulari possibilmente coinvolte nella regolazione dell'espressione periferica di Nurr1 e TNFAIP3.

Terzo, l'attuale ricerca si propone di indagare il ruolo di Nurr1 e TNFAIP3 nel sistema nervoso centrale tramite la valutazione dell'espressione dei due geni e delle relative proteine in tessuti cerebrali ottenuti da individui affetti da SM.

Infine, la ricerca del gruppo vorrebbe chiarire la/le causa/e di deregolazione dei geni Nurr1 e TNFAIP3 tramite una valutazione genetica ed epigenetica. Con questa finalità stiamo genotipizzando specifici SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) nei geni Nurr1 e TNFAIP3 per correlare poi eventuali aplotipi d'interesse con il livello di espressione dei due trascritti. Le varianti SNPs più interessanti saranno poi testate per la loro attività biologica con test cellulari.

Per l'analisi epigenetica, stiamo valutando il significato dell'espressione di microRNAs (miRNAs) e di specifici patterns di metilazione del DNA, correlata alla deregolata espressione di Nurr1 e TNFAIP3 osservata nei pazienti con SM.

Un'ulteriore caratterizzazione del gene Nurr1 nella SM è ottenuta valutando l'incidenza e la severità dell'encefalite allergica sperimentale (EAE) (ovvero il modello murino di SM) in topi Nurr1-deficienti trattati con la MOG (35-55).

Collaborazioni: Raffaele Calogero (MBC, Torino), Roberto Furlan (DIBIT, Milano), Orla Connelly (Baylor College, Houston, TX), Pierre Chambon (IGBMC, Illkirch, Francia).

2.3. Messa a punto di nuove tecniche diagnostiche

Dal momento che il termine medico "Sclerosi Multipla" comprende diversi sottotipi o varianti cliniche della malattia, ai fini terapeutici sono anche utili nuove tecniche che consentano di discriminare correttamente le varie tipologie di pazienti. Con questa finalità, le attività di ricerca si sono focalizzate sui pazienti affetti da malattia di Devic o neuromielite ottica (NMO), una rara malattia neuro-oftalmologica. Fino a poco tempo fa la NMO era considerata una grave forma di SM, ma recenti osservazioni hanno dimostrato che si tratta di una malattia distinta. Poiché SM e NMO prevedono trattamenti differenti è estremamente importante identificare nuovi test biologici in grado di differenziare le due malattie nelle loro fasi iniziali. A differenza della SM, nella NMO l'obiettivo della risposta autoimmune è stato identificato: in alcuni pazienti affetti da NMO è stato infatti riscontrato un elevato livello di anticorpi anti-aquaporina 4 (AQP4), un componente del piede del processo astrocitico nella barriera emato-encefalica. Alla luce di ciò, si sta determinando quanto questo anticorpo sia specifico per la diagnosi di NMO, sviluppando anche

nuove metodiche per la valutazione degli anticorpi anti-AQP4 da introdurre nella pratica clinica (western blot e immunofluorescenza).

Collaborazioni: Klaus-Peter Wandinger (Euroimmun, Lübeck), Eva Meluzinova (Faculty Hospital Motol, Prague); Marisa Marrosu (Università di Cagliari, Cagliari), Anna Paola Batocchi (Università Cattolica del Sacro cuore, Roma), Patrizia Sola (Policlinico di Modena, Modena).

2.4. La Banca Biologica

Il gruppo è coinvolto in un progetto per l'istituzione di una Banca Biologica che conserva il materiale biologico (CSF, globuli bianchi, siero, RNA e DNA) e le informazioni cliniche di varie tipologie di pazienti affetti da sclerosi multipla.

La Banca Biologica è una struttura integrata e centralizzata per la raccolta ed archiviazione di campioni biologici inclusi in studi clinici, in progetti di ricerca o per i quali la conservazione è un obbligo di legge. Questa struttura nasce in risposta alla esigenza di avere un sistema affidabile e valido per la conservazione di campioni biologici di varia natura, quali siero, plasma, urine, liquor, cellule e tessuti in condizioni di preservazione delle caratteristiche biomolecolari al fine di poterli analizzare in tempi successivi alla loro raccolta. La conservazione in questi sistemi criogenici da un lato assicura ottimali condizioni di stabilità per i campioni biologici, e d'altro rende di facile identificazione i campioni archiviati, attraverso sistemi di mappatura gestiti tramite data base, il tutto appositamente progettato per applicazioni specifiche. L'uso delle banche di campioni biologici è proliferato negli ultimi 20 anni di ricerca clinica ed epidemiologica, in virtù dello sviluppo sia di tecniche di laboratorio, sia di tecniche epidemiologiche e statistiche. Un aspetto applicativo di non trascurabile importanza delle banche biologiche è la possibilità di poter disporre di una collezione di campioni biologici caratterizzati dal punto di vista clinico e demografico, in modo da poterli utilizzare per studi di allestimento e validazione di procedure analitiche trasferibili alla gestione clinica di patologie infettive specialmente di origine virale

3. Prodotti delle attività di ricerca anno 2011

3.1. Articoli pubblicati o in corso di pubblicazione con affiliazione al NICO

Van Beers MM, Gilli F, Schellekens H, Randolph TW, Jiskoot W (2011). Immunogenicity of recombinant human interferon beta interacting with particles of glass, metal, and polystyrene. *J Pharm Sci* 2012 Jan;101:187-99. doi: 10.1002/jps.22744. Epub 2011 Sep 14

Van Beers MM, Sauerborn M, Gilli F, Brinks V, Schellekens H, Jiskoot W (2011). Oxidized and aggregated recombinant human interferon beta is immunogenic in human interferon beta transgenic mice. *Pharm Res* 28:2393-402

Gilli F, Navone ND, Perga S, Marnetto F, Caldano M, Capobianco M, Pulizzi A, Malucchi S, Bertolotto A (2011). Loss of braking signals during inflammation: a factor affecting the development and disease course of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 68:879-88

Malucchi S, Gilli F, Caldano M, Sala A, Capobianco M, di Sapio A, Granieri L, Bertolotto A (2011). One-year evaluation of factors affecting the biological activity of interferon beta in multiple sclerosis patients. *J Neurol* 258:895-903

Gilli F, Navone ND, Valentino P, Granieri L, Perga S, Malucchi S, Bertolotto A (2011). Prediction of Clinical Response to Glatiramer Acetate in Patients with Multiple Sclerosis. *Multiple Sclerosis* (under revision)

Granieri L, Marnetto F, Valentino P, Frau J, Patanella AK, Nytrova P, Sola P, Capobianco M, Jarius S, Bertolotto A (2011). Evaluation of a multiparametric immunofluorescence assay for anti-Aquaporin 4 antibodies: characterization of specific staining pattern and establishment of positivity criteria. *J Neuroimmun* (submitted)

3.2. Seminari e conferenze con affiliazione al NICO

- A. Bertolotto, *Biomolecular approaches on multiple sclerosis*. Merck Serono Symposium, September, 15 -16, 2011 Rome (Italy)
- F. Gilli, *Loss of braking signals in inflammation affects development and disease course of Multiple Sclerosis*. XXI Congresso Associazione Italiana Neuroimmunologia (AINI), Pollenzo, 22–25 Settembre 2011
- A. Bertolotto, *Downregulation of anti-inflammatory genes in Multiple Sclerosis is normalized during pregnancy*. ICS/ISICR Congress, Florence (Italy) October 9-12, 2011
- A. Bertolotto, *Expertise on multiple sclerosis*. Biogen Idec meeting. Nice (France), October 2011
- A. Bertolotto, *Immunomodulants and their mechanisms of actions in multiple sclerosis*. XLII Congresso Società Italiana di Neurologia SIN, Torino, 23-27 Ottobre 2011
- A. Bertolotto, *Stratify test for JCV supporting clinical patients' management*. XLII Congresso Società Italiana di Neurologia SIN, Torino, 23-27 Ottobre 2011
- A. Bertolotto, *Stratification risk in SM patients undergoing natalizumab treatment*. Meeting on clinical, therapeutical aspects on multiple sclerosis. November 11 2011, Genova (Italy)

3.3. Altri prodotti riconducibili alle attività Istituzionali del NICO

3.3.1. Organizzazione di seminari, conferenze e workshops

- Corso ANBI “La Real Time PCR: tecniche di base e applicazioni pratiche”, Orbassano (TO), 7 giugno 2011 (130 partecipanti)
- Corso AINI “La Real Time PCR: tecniche di base e applicazioni pratiche”, Orbassano (TO), 20-21 settembre 2011 (20 partecipanti)
- Organizzazione e comitato scientifico del XXI Congresso AINI (Associazione Italiana di Neuroimmunologia), Pollenzo (CN), 22–25 Settembre 2011
- Corso Biogen Dompè “La gestione quotidiana del paziente con Sclerosi Multipla”, Orbassano (TO), 26-28 Settembre 2011 (6 partecipanti)
- Corso Biogen Dompè “La gestione quotidiana del paziente con Sclerosi Multipla”, Orbassano (TO), 7-9 Novembre 2011 (3 partecipanti)
- Corso Merck Serono “European School for Multiple Sclerosis”, Orbassano (TO), 24-25 Novembre 2011 (10 partecipanti)

3.3.2. Attività di Diagnostica

Il laboratorio di Neurobiologia Clinica offre un servizio diagnostico e di consulenza, accessibile da strutture esterne (al momento 40 neurologie italiane), necessari alla formulazione di diagnosi di sclerosi multipla e altre patologie neurodegenerative quali malattia di Devic, morbo di Alzheimer, sindrome di Lambert-Eaton, sindrome Stiff Person, sindromi paraneoplastiche ed encefaliti virali. Tali esami diagnostici includono l'esame cito-chimico del liquor, l'immunoisoelettrofocusing per la ricerca di bande oligoclonali e test per la ricerca di acidi nucleici (tramite metodica real time PCR) dei seguenti virus: JC virus, Epstein Bar virus, Herpes virus 1, 2, 6, citomegalovirus, Varicella Zoster e Enterovirus. Il laboratorio fornisce inoltre un servizio di screening diagnostico per la ricerca di anticorpi contro il recettore del glutammato (anti-NMDA), contro l'acido glutammico decarbossilasi (anti-GAD), e anticorpi antineuronali paraneoplastici (quali anti-Yo, anti-Hu, anti-Ri, anti-Ma1, anti-Ma2, anti-Amphifisina, anti-SOX1 e anti-CRMP5), mediante l'utilizzo di metodiche immunoblotting e immunofluorescenza indiretta su sezioni di cervello, cervelletto e nervo periferico di scimmia o ratto. Sono inoltre misurati gli anticorpi anti-borrellia mediante metodica ELISA.

La recente identificazione di un anticorpo circolante altamente specifico, definito NMO-IgG, diretto contro l'acquaporina 4 (AQP4), il principale canale dell'acqua a livello del sistema nervoso centrale, permette di differenziare la neuromielite ottica (NMO o malattia di Devic) e le forme ad essa correlate (il

cosiddetto spettro della NMO) da altre malattie infiammatorie demielinizzanti quali la Sclerosi Multipla. Attualmente, il laboratorio di neurobiologia clinica è uno dei pochi laboratori in Italia che fornisce un servizio diagnostico applicando specifici test sierologici per la ricerca di anticorpi NMO-IgG e anti-AQP4. Tali anticorpi sono rilevati mediante l'utilizzo di tecniche di immunofluorescenza indiretta, avvalendosi di cellule HEK293 transfettate per AQP4 e varie sezioni di cervello di scimmia.

Per la diagnosi differenziale di Alzheimer e altre demenze, il laboratorio fornisce un servizio di dosaggio di proteine liquorali quali Tau, fosfo-Tau e β -amiloide, mediante l'utilizzo di metodiche ELISA.

Infine, il laboratorio di Neurobiologia Clinica fornisce numerosi servizi per il monitoraggio biologico dei pazienti con sclerosi multipla in terapia con i farmaci oggi disponibili. A questo proposito, il laboratorio gestisce un servizio per la titolazione sierologica degli anticorpi anti-interferone beta (utilizzando tre diverse metodiche di titolazione) e Natalizumab (Tysabri). Inoltre, il laboratorio offre un servizio per la valutazione dell'attività biologica dell'interferone-beta previa misurazione dell'espressione genica della proteina interferon-indotta MxA.

3.4. Finanziamenti per la ricerca

FISM; Code 2010/R/28; *Analysis of single-nucleotide polymorphisms in TNFAIP3 associated with multiple sclerosis*; 01/07/11 - 30/06/13. Finanziamento erogato: € 40.000

FISM; Code 2010/R/7; *The relation between neurodegeneration and inflammation in Multiple Sclerosis: NR4A2 puts a dampener on inflammation*; 01/07/11 - 30/06/13. Finanziamento erogato: € 30.000

Progetto delle attività di ricerca per il 2011 del gruppo **Adult Neurogenesis**, presso l'Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO)

Responsabili del gruppo: **Luca Bonfanti/Paolo Peretto**

1. Composizione del gruppo di ricerca (1-11-2010)

1.1. Personale strutturato dell'Università di Torino

Luca Bonfanti (PA)
Paolo Peretto (PA)
Silvia De Marchis (RU)
Federico Luzzati (RU)

1.2. Personale non strutturato

Maria Armentano (dottoranda)
Paola Crociara (dottoranda)
Roberta Parolisi (dottoranda)
Roberta Schellino (dottoranda)

Partecipano alle attività del gruppo alcuni studenti tesisti delle Facoltà di Scienze MFN e Medicina Veterinaria

2. Progetti di ricerca (2012)

L'attività del gruppo è focalizzata alla caratterizzazione morfologica e molecolare delle nicchie neurogeniche adulte in diverse specie di mammiferi. Il lavoro di ricerca si sviluppa secondo due filoni principali. Il primo è dedicato all'identificazione di elementi staminali e della loro progenie nel parenchima del sistema nervoso maturo, nonché alla definizione del loro ruolo funzionale in modelli animali fisiologici e patologici. A questo fine saranno utilizzati come modelli animali cavie, conigli e topi. Le ricerche sui modelli patologici saranno effettuate in seguito a neurodegenerazione acuta o progressiva, indotta sperimentalmente (coniglio, topo, cavia) o per via genetica (topi). Le principali regioni oggetto di studio saranno il cervelletto e il corpo striato.

Un secondo filone di ricerca è diretto a studiare i processi di neurogenesi nella matrice germinativa adulta che si estende dalla zona sottoventricolare al bulbo olfattivo (SVZ-OB). In particolare, saranno affrontate tematiche relative ai processi di specificazione e integrazione dei neuroni neoformati nel bulbo olfattivo accessorio. L'obiettivo finale è la definizione di meccanismi molecolari e di condizioni ambientali che facilitino l'attivazione di progenitori endogeni e l'integrazione di neuroni neoformati nel sistema nervoso centrale maturo.

2.1. Origine, natura e destino di progenitori neuronali parenchimali in modelli murini di neurodegenerazione dello striato

Scopo specifico di questo studio è la definizione del sito di origine e del ruolo funzionale del processo di neurogenesi indotta nello striato di topi adulti. Studi precedenti hanno dimostrato che la degenerazione dei neuroni striatali induce migrazione di neuroblasti dall'SVZ verso le regioni lesionate. Tuttavia, non è stato chiarito quale sia il contributo alla risposta neurogenica di popolazioni di progenitori presenti nel parenchima dello striato, che si attivano nel modello di degenerazione lenta e progressiva del topo CREB1Camkcre4CREM-/- (CBCM, Luzzati et al., 2011). Il progetto si propone di analizzare:

i) la natura dei progenitori neuronali attivati da eventi di neurodegenerazione striatale. Sebbene sia noto che i progenitori primari, sia nell'encefalo adulto sia embrionale, presentano un fenotipo gliale, queste

cellule danno origine a progenitori intermedi il cui profilo molecolare e potenzialità sono dipendenti dalla loro localizzazione;

ii) se i progenitori neuronali attivati nello striato del topo derivano dall'SVZ, oppure da popolazioni parenchimali quiescenti in grado di attivarsi in seguito a lesione. Dati in vitro e in vivo, ottenuti in condizioni fisiologiche e patologiche, supportano la presenza di progenitori nel parenchima, ma l'origine di queste cellule e il loro contributo nell'omeostasi dell'encefalo sono ancora sconosciuti;

iii) il destino dei neuroni neogenerati in seguito a lesione. Studi condotti sul ratto indicano che solo poche delle cellule neogenerate identificabili nello striato sono in grado di differenziarsi in neuroni di proiezione, mentre la maggior parte muore entro un mese.

Per questo studio analizzeremo due modelli murini di neurodegenerazione: il mutante CBCM, e il modello di lesione con Acido Quinolinico (QA). Entrambi sono modelli di Corea di Huntington, ma mentre la somministrazione di QA nello striato induce una degenerazione acuta dei neuroni piramidali, nei topi CBCM si ha una perdita progressiva di questi neuroni, mimando la progressione della malattia nell'uomo. I dati recentemente pubblicati sul modello CBCM (Luzzati et al., 2011) e quelli preliminari sui topi trattati con Acido Quinolinico indicano una forte risposta neurogenica alla degenerazione dello striato che coinvolge sia l'SVZ sia progenitori neuronali nel parenchima striatale.

La natura dei progenitori striatali sarà investigata tramite analisi del profilo di espressione di molecole che caratterizzano i progenitori neuronali delle regioni neurogeniche adulte (es. Nestin, GLAST, Tlx, SOX2, SOX9, BLBP, Mash1, Pax6). Nei topi QA, l'analisi sarà seguita da studi di mappatura genetica (analisi quantitativa/qualitativa della distribuzione dei diversi fenotipi neuronali) su diverse linee di topi transgenici (GLAST::CreERT2::YFP, Nestin::CreERT2::YFP) già utilizzati in studi sulla neurogenesi adulta. In entrambi i modelli sarà investigata l'origine dei progenitori striatali (migrazione dall'SVZ o attivazione di progenitori locali) mediante iniezioni stereotassiche di vettori virali reporter nell'SVZ e nel parenchima striatale a diversi tempi di sopravvivenza, prima e dopo l'induzione della neurodegenerazione. Il destino dei neuroni neogenerati indotti sarà stabilito tramite diversi marcatori di neuroni maturi ed immaturi (inclusendo quelli dei neuroni dello striato e dell'SVZ) in animali iniettati sia con BrdU sia con virus. Sfruttando l'elevata efficienza di marcatura cellulare prodotta dall'infezione virale, studieremo la morfologia e il fenotipo dei neuroni neogenerati tramite ricostruzioni 3D. Questi risultati contribuiranno all'acquisizione di conoscenze nell'ambito dello studio delle risposte neurogeniche dell'encefalo adulto a eventi patologici.

Collaborazioni: Rosanna Parlato, Gunther Shutz (DKFZ, Heidelberg); Annalisa Buffo (NICO, Torino).

2.2. Attività neurogenica spontanea e indotta da lesione, da progenitori parenchimali in cervelletto e striato di coniglio

In anni recenti, progenitori locali che ritengono alcune capacità proliferative (es. le cellule Ng2+) sono stati identificati nel parenchima del SNC dei roditori. Nonostante la loro attività proliferativa e alcuni aspetti di multipotenzialità in vitro, queste cellule non producono neurogenesi in vivo, e possono dare neuroni solo in particolari condizioni sperimentali/patologiche. Dati recenti del nostro gruppo nel coniglio hanno dimostrato differenze interspecifiche nei mammiferi, dal momento che nei lagomorfi giovani ed adulti cellule neogenerate indipendenti dall'SVZ o da altri strati germinativi sono presenti nel parenchima di alcune aree cerebrali e cerebellari considerate non neurogeniche nei roditori. Più in dettaglio, i risultati ottenuti hanno mostrato che nel cervelletto di coniglio la proliferazione cellulare persiste nell'intera corteccia cerebellare almeno fino a tre anni di età, dando origine a due distinte popolazioni cellulari: interneuroni GABAergici Pax2+, e cellule glia-like multipolari Sox2+/Olig2+. Dati preliminari indicano che la proliferazione cellulare è presente anche nello strato dei neuroni di Purkinje di conigli peripuberali e adulti, coinvolgendo cellule con sede/morfologia della glia di Bergmann che co-esprimono marcatori di proliferazione e la brain lipid binding protein (BLBP), suggerendo così che una popolazione di cellule derivanti dalla glia radiale si possa ancora dividere nel cervelletto maturo del coniglio.

In questo studio, grazie ad approcci di microscopia confocale ed elettronica in vivo e in vitro, verrà proseguita la caratterizzazione dei processi neurogenici persistenti nel SNC di conigli giovani e adulti, focalizzando particolarmente sui progenitori locali identificati nello strato dei neuroni di Purkinje. Sarà investigata l'attività proliferativa di cellule con morfologia, profilo antigenico, e localizzazione topografica

della glia di Bergmann, al fine di capire: i) se questa neurogenesi cerebellare protratta 'atipica' possa costituire una terza fonte di genesi cellulare cerebellare nel coniglio adulto, ii) per produrre un modello di studio di un tipo cellulare astrocitario, di derivazione della glia radiale, che è ancora capace di proliferare in un parenchima maturo del SNC.

Un altro obiettivo del progetto, consiste nell'esplorare la neurogenesi derivante da progenitori locali come risposta a condizioni sperimentali di neurodegenerazione. L'attività neurogenica sarà investigata in seguito a neurodegenerazione acuta (indotta chimicamente) nel cervelletto (iniezione di acido quinolinico e propidio ioduro) e nello striato di coniglio (iniezione di acido quinolinico). Questi esperimenti permetteranno di comparare le capacità neurogeniche reattive di progenitori locali residenti in due diverse regioni del SNC (cervelletto e striato) e appartenenti a quattro diverse popolazioni cellulari che producono neurogenesi adulta spontanea in condizioni normali (precursori neuronali striatali, precursori neuronali e glia-like cerebellari, glia di Bergmann), con quella indotta nelle stesse regioni da condizioni di neurodegenerazione acuta.

Infine, il potenziale neurogenico dei progenitori parenchimali locali osservati nelle suddette condizioni sarà analizzato *in vitro*, utilizzando approcci *ex vivo* (espianiti di tessuto e colture organotipiche, attualmente disponibili nei laboratori di entrambe le Unità) come ulteriore strumento per capire se (e come) il loro comportamento possa essere modulato in presenza di specifici fattori solubili.

Nell'insieme, gli esperimenti pianificati negli studi 2.1 e 2.2 permetteranno di comparare le risposte neurogeniche prodotte in differenti specie animali e regioni del SNC studiando l'attività di progenitori parenchimali locali, in regioni neurogeniche spontanee e in aree considerate non neurogeniche.

Collaborazioni: Annalisa Buffo (NICO, Torino), Ferdinando Rossi (NICO, Torino), Simone Di Giovanni (Hertie Institut Tuebingen, Germany), Federico Calegari (Dresden, Germany)

2.3. Sviluppo di colture organotipiche per lo studio della nicchia staminale neurale

Nei mammiferi, il principale compartimento staminale neurale è la zona sottoventricolare (SVZ) dell'encefalo: una zona germinativa dove le interazioni cellulari contribuiscono a generare microambienti (nicchia) che controllano la scelta differenziativa e permettono la neurogenesi.

Il nostro laboratorio, dopo aver caratterizzato per anni la neurogenesi *in vivo*, sta cercando di mettere a punto un sistema *ex vivo* per lo studio simultaneo della nicchia staminale e del tessuto non neurogenico circostante: la coltura organotipica di prosencefalo (contenente: SVZ, striato, corpo calloso, corteccia). Diversi laboratori stanno cercando di mettere a punto sistemi simili, tuttavia con scarso successo: esistono pochi lavori in letteratura, in cui il problema risulta analizzato superficialmente.

Il nostro progetto ha come scopo lo studio dettagliato dei fenomeni che avvengono in una fetta di cervello coltivata, tenendo conto dell'evoluzione del processo di neurogenesi e al tempo stesso degli effetti causati dalla sofferenza dovuta alla preparazione e durante la successiva coltura, e, soprattutto, delle possibili relazioni tra questi fenomeni. La finalità è osservare direttamente le cellule nei due ambienti tissutali di nostro interesse: la nicchia "funzionale" e il tessuto non neurogenico, al fine di poterle manipolare sperimentalmente.

Le colture organotipiche vengono mantenute in incubatore a 37° per 1-2 giorni in seguito a prelievo effettuato alle varie età postnatali (P5-P21). L'SVZ coltivata in fette organotipiche, si è rivelata più dinamica del previsto e nello stesso tempo il tessuto non neurogenico va rapidamente incontro a sofferenza e degenerazione. Si è pertanto scelto di valutare: proliferazione (BrdU *in vivo* e *in vitro*; Ki67; PH3), diversi tipi di sofferenza e morte cellulare (cleaved caspasi 3), tridimensionalità del tessuto con analisi ultrastrutturali, reazione tissutale al danno (es. gliosi e attività microgliale). E' opportuno sottolineare come la letteratura che utilizza questo modello considera la fetta organotipica simile alla condizione *in vivo*, e tende a focalizzare in modo specifico su singoli aspetti (biologici e/o molecolari), senza tuttavia fornire quella visione d'insieme che noi ci siamo proposti di raggiungere nel nostro progetto.

I dati preliminari indicano un forte incremento della proliferazione e della morte cellulare, accompagnati da migrazione dei neuroblasti e disaggregazione dell'architettura della nicchia. Il tutto già presente a 1 DIV e più marcato a 2 DIV. I risultati sinora ottenuti suggeriscono che il modello *ex vivo* proposto in questo progetto sia attendibile sotto il profilo antigenico e dei rapporti cellulari fino a 48 ore. Pertanto l'utilizzo

delle fette organotipiche per questo tipo di studi deve essere ripensato rispetto all'uso superficiale finora descritto in letteratura, soprattutto per tempi di coltura lunghi.

Le nostre fette potrebbero essere utilizzate per diversi scopi:

- a) lo studio di fenomeni biologici che avvengono nei tempi di coltura considerati (es. proliferazione simmetrica/asimmetrica degli elementi staminali; studio della nicchia staminale)
- b) manipolazioni dei segnali neurogenici (aggiunta di fattori trofici, coculture con espianti e cellule isolate)
- c) come modello di lesione e di potenziale riparativo, e/o di interazione tra SVZ e tessuto non neurogenico
- d) per testare farmaci potenzialmente modulatori della neuro genesi
- e) analisi ex vivo di animali transgenici

Collaborazioni: Angela Gritti (Tiget, HSR, Milano)

2.4. Specificazione ed integrazione funzionale di neuroni nel bulbo olfattivo accessorio dei topi adulti

Studi precedenti effettuati nel nostro laboratorio hanno dimostrato presenza di interneuroni neo-generati nel bulbo olfattivo accessorio (AOB) dei roditori adulti. Questo nucleo è parte integrante del sistema vomero-nasale ed è pertanto coinvolto nella elaborazione di stimoli sensoriali che regolano il comportamento sociale e sessuale. Nel corso del 2011 (Oboti et al., 2011a, b) abbiamo dimostrato che le cellule neogenerate nell'AOB giocano un ruolo chiave nella formazione della memoria olfattiva per "mating partner" nelle femmine adulte di topo, supportando: i) che l'adult neurogenesis sia un fenomeno che in questa regione contribuisce a meccanismi indispensabili per la sopravvivenza di questa specie, ii) che l'AOB rappresenta un modello ottimale per la comprensione dei processi di specificazione e di integrazione di nuovi elementi nervosi nel SNC maturo.

Nel corso del 2012 ci proponiamo pertanto di ampliare gli studi riguardo al potenziale ruolo delle cellule neogenerate nel contesto del sistema dell'AOB, e più in generale del loro coinvolgimento nei meccanismi che regolano l'interazione sociale e le memorie olfattive. Gli obiettivi saranno: i) studiare il processo di integrazione delle cellule neogenerate nei circuiti bulbari delle femmine prepuberi e adulte in seguito a stimolazione sensoriale specifica con feromoni maschili di conspecifici (maschi fratelli e estranei) ; ii) investigare se esistono progenitori specifici per gli interneuroni dell'AOB.

Il processo di integrazione degli interneuroni dell'AOB sarà studiato tramite analisi quantitative e morfologiche della neurogenesi, a diversi tempi di sopravvivenza dopo l'inoculazione di BrdU, e in seguito a diversi protocolli di esposizione delle femmine alla lettiera di maschi riproduttori (fratelli e estranei). Il coinvolgimento funzionale degli elementi neo-generati nei circuiti maturi, nelle diverse condizioni sperimentali, sarà valutato tramite analisi comportamentali e in situ dell'espressione di c-fos. Inoculazioni stereotassiche (a diversi livelli antero-posteriori) di vettori virali (Ad:GFAP-Cre) che infettano i progenitori gliali dell'SVZ permetteranno di stabilire se gli interneuroni dell'AOB derivano da specifici progenitori neuronali. In generale da questo studio ci aspettiamo di definire se la capacità di integrare nuove cellule nell'AOB possa essere una strategia che ricopre molteplici funzioni correlate al riconoscimento olfattivo e di contribuire alla comprensione di meccanismi di base che guidano la specificazione e l'integrazione di nuovi neuroni nel SNC dei mammiferi adulti.

Collaborazioni: Frank Zufall, Livio Oboti (University of Saarland); Claudio Giachino (Max Planck Institute of Immunobiology, Freiburg); Giancarlo Panzica (NICO, Torino).

2.5. Studio comparativo delle zone neurogeniche e dei progenitori locali nel sistema nervoso centrale del delfino e della pecora

E' noto che i neuroni del SNC persi in seguito a vecchiaia, traumi/lesioni vascolari, malattie neurodegenerative non sono sostituibili. Da alcuni anni si sa che alcuni neuroni possono essere prodotti e rinnovati in due regioni ristrette dell'encefalo (aree neurogeniche; fenomeno della neuro genesi adulta). Finora, questo fenomeno non è stato utile al problema della riparazione del sistema nervoso, che al di fuori delle aree neurogeniche continua ad essere un tessuto 'perenne', dove peraltro si riscontra la maggior

parte delle lesioni di cui sopra (per review si veda Bonfanti & Ponti, 2008 *Vet J*). Uno dei motivi risiede nell'attuale impossibilità di poter dare una spiegazione soddisfacente del ruolo che tale fenomeno ha nell'evoluzione delle specie animali, nonché nell'incompleta visione della neurogenesi adulta all'interno dei Mammiferi. Un possibile approccio per dare indicazioni sul ruolo della neurogenesi adulta è quello comparativo. In particolare, negli ultimi anni sono state riscontrate sostanziali differenze anche tra i mammiferi, con un diverso sviluppo delle zone neurogeniche in relazione al tipo di vita dell'animale e alle diverse nicchie ecologiche occupate (Ponti et al., 2008 *PLoS ONE*; Johnson et al., 2010 *Genes Brain Behav*). In questo progetto si cercherà di caratterizzare l'estensione e la citoarchitettura delle zone neurogeniche di un mammifero marino (*Tursiops truncatus*).

L'obiettivo è una caratterizzazione morfologica e immunocitochimica dell'intera area periventricolare nell'encefalo di delfini neonati (pochi giorni di vita), giovani (da 2 a 12 mesi) e adulti (fino a 20-30 anni).

Date le dimensioni dei cervelli da analizzare (nell'adulto superiori a quello umano) e alla qualità del materiale disponibile (encefali prelevati ad alcuni giorni dalla morte del soggetto) si prevede un lungo periodo di settaggio delle condizioni di lavoro (protocolli di fissazione, test con anticorpi primari, ecc.).

Si procederà quindi per fasi successive:

- 1) Definizione della mappa del ventricolo laterale e sue eventuali estensioni
- 2) Identificazione dell'eventuale presenza di strato sottoventricolare (SVZ) nelle diverse porzioni del ventricolo (con colorazioni istologiche su sezioni coronali)
- 3) Eventuale presenza di addensamento di astrociti nell'SVZ (tubi gliali? astrocyte ribbon?)
- 4) Eventuale presenza di cellule radial glia-like tra gli astrociti dell'SVZ (Vimentina, nestina, ecc.)
- 5) Presenza di proliferazione cellulare nell'SVZ (Ki67)
- 6) Eventuale presenza di neuroblasti (DCX, PSA-NCAM, ecc.)

In una seconda fase:

- 7) Eventuale presenza di proliferazione cellulare nel parenchima cerebrale

Sulla base di questi risultati si ragionerà su alcune domande:

- Esiste un'SVZ nel delfino? Quanto è estesa? Com'è organizzata?
- E' del tipo osservato nel topo, o nel coniglio, o nell'uomo?
- Esiste una correlazione tra quanto osservato nell'SVZ del delfino e l'anatomia/evoluzione del suo cervello?
- Esiste una correlazione tra quanto osservato nell'SVZ del delfino e il tipo di vita di questo animale?

L'obiettivo finale è quello di usare modelli animali (mammiferi) per prospettare nuovi scenari terapeutici nella riparazione del sistema nervoso degli animali e dell'uomo.

Materiali e metodi. I) Analisi in vivo in microscopia confocale ed elettronica dell'attività neurogenica in varie regioni cerebrali periventricolari di *T. Truncatus*. Il materiale verrà fornito grazie ad una collaborazione con l'Università di Padova (Dip. di Scienze Sperimentali Veterinarie, SPERIVET, Prof. Bruno Cozzi e Dott.ssa Antonella Peruffo). Gli encefali provengono da una banca di tessuti stoccati in formalina presso il suddetto dipartimento; altri encefali potranno essere disponibili in base agli eventuali nuovi arrivi nel corso del quadriennio. II) Analisi morfologiche, immunocitochimiche, e ultrastrutturali verranno eseguite secondo i protocolli già pubblicati (Ponti et al., 2006; 2008). III) Analisi in vivo di progenitori gliali (Map5+; Gpr17) e della matrice extracellulare (tenascina-C, tenascina-R, ed altri marcatori da determinare; si veda Peretto et al., 2005 *J Comp Neurol*). La proliferazione cellulare locale verrà rivelata con Ki67 in associazione con marcatori di precursori neuronali (BLBP, DCX; Ponti et al., 2006; 2008).

Risultati attesi. a) Caratterizzazione in vivo della genesi di glia e/o neuroni in un mammifero marino. b) Determinazione del fenomeno neurogenico come filogeneticamente ristretto ai mammiferi terrestri o esteso ai cetacei. c) Potranno essere dedotte conclusioni sulla persistenza/espansione (o eventualmente assenza) di SVZ adulta nelle zone periventricolari di diversi mammiferi. Ciò potrà dare indicazioni sui fattori che possono favorire/sfavorire la persistenza di strati germinativi in diversi mammiferi.

3. Prodotti delle attività di ricerca anno 2011

3.1. Articoli pubblicati o in corso di pubblicazione con affiliazione al NICO

- Bonfanti L (2011). From Hydra regeneration to human brain structural plasticity: a long trip through narrowing roads. *Scientific World Journal* 11:1270-1299
- Armentano M, Canalia N, Crociara P, Bonfanti L (2011). Culturing conditions remarkably affect viability and organization of mouse subventricular zone in ex vivo cultured forebrain slices. *J Neurosci Methods* 197:65-81
- Bonfanti L, Peretto P (2011). Adult neurogenesis in mammals – A theme with many variations. *Eur J Neurosci* 34:930-950
- Bonfanti L, Rossi F, Zupanc GK (2011). Towards a comparative understanding of adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 34:845-846
- Martino G, Pluchino S, Bonfanti L, Schwartz M (2011). Brain regeneration in physiological and pathological conditions: the therapeutic plasticity of neural stem cells. *Physiol Rev* 91:1281-1304
- Luzzati F, De Marchis S, Parlato R, Gribaudo S, Schütz G, Fasolo A, Peretto P (2011). New striatal neurons in a mouse model of progressive striatal degeneration are generated in both the subventricular zone and the striatal parenchyma. *PlosOne* 6:e25088
- Paina S, Garzotto D, De Marchis S, Marino M, Moiana A, Conti L, Cattaneo E, Perera M, Corte G, Calautti G, and Merlo G (2011). Wnt5a is a transcriptional target of Dlx homeogenes and promotes differentiation of interneuron progenitors in vitro and in vivo. *The Journal of Neuroscience* 31:2675-2687
- Fregnan F, Petrov V, Garzotto D, De Marchis S, Offenhäuser N, Grosso E, Chiorino G, Perroteau I, Gambarotta G (2011). Eps8 involvement in neuregulin1-ErbB4 mediated migration in the neuronal progenitor cell line ST14A. *Exp Cell Res* 317:757-769
- Oboti L, Schellino R, Giachino C, Chamero P, Pyrski M, Leinders-Zufall T, Zufall F, Fasolo A, Peretto P (2011). Newborn interneurons in the accessory olfactory bulb promote mate recognition in female mice. *Front Neurosci* 5:113
- Luzzati F, Fasolo A, Peretto P (2011). Combining confocal laser scanning microscopy with serial section reconstruction in the study of adult neurogenesis. *Front Neurosci* 5:70
- Oboti L, Peretto P, De Marchis S, Fasolo A (2011). From chemical neuroanatomy to an understanding of the olfactory system. *Eur J Histochem* 55:e35
- Ponti G, Luzzati F, Peretto P, Bonfanti L (2011). Neurogenesis in the adult rabbit: from olfactory system to cerebellum. In: *Neurogenesis in the Adult Brain* (Alvarez-Buylla A, Seki T. Eds.) Springer (in press)
- Bonfanti L, Crociara P (2011). Neurogenesis outside the central nervous system. In: *Stem cells and Cancer Stem Cells Vol II* (Hayat MA, Ed.) Springer (in press)
- Bovetti S, Gribaudo S, Puche AC, De Marchis S, Fasolo A (2011). From progenitors to integrated neurons: Role of neurotransmitters in adult olfactory bulb. *J Chem Neuroanat* (in press)

3.2. Seminari e conferenze con affiliazione al NICO

- L. Bonfanti, Corsi residenziali di neuro immunologia. 11° corso: *Malattie neurodegenerative e psichiatriche. Immunity, neurogenesis and memory*. 16-19 marzo 2011, Bergamo
- L. Bonfanti, Invited professor alla NorthEastern University, Boston. Corso-workshop: *Stem Cells, theme and variations*; maggio-giugno 2011
- L. Bonfanti, *Morphofunctional Plasticity of the brain*. Satellite Symposium 10th Colloquium of the French Society for Neuroscience, 07/09/2011, Bordeaux, France
- L. Bonfanti: *Legittimo impedimento, perchè è difficile riparare il sistema nervoso* Padova, Seminario al Dip. di Scienze Sperimentali Veterinarie, 2011
- S. De Marchis, *Developmental mechanisms regulating neural diversity: intrinsic and extrinsic factors on the generation of cortical inhibitory interneuron subtypes*. ISIS, Euro Mediterranean Master in Neuroscience and Biotechnology-October 16-19, 2011. Alexandria University - Université Senghor d'Alexandrie

S. De Marchis, *Adult neurogenesis in the olfactory bulb: from progenitors to integrated interneurons*. ISIS, Euro Mediterranean Master in Neuroscience and Biotechnology-October 16-19, 2011. Alexandria University - Université Senghor d'Alexandrie

3.3. Altri prodotti riconducibili alle attività Istituzionali del NICO

3.3.1. Attività editoriali

- L. Bonfanti, Guest Editor, European Journal of Neuroscience Special Issue: Towards a Comparative Understanding of Adult Neurogenesis
- L. Bonfanti, Guest Editor, Archives Italiennes de Biologie Special issue: Exploring Neurogenesis outside the Niche
- S. De Marchis, Host Editor, Frontiers in Neurogenesis, Research Topics: Cellular Imaging and Emerging technology for Adult Neurogenesis Research

3.3.2. Attività di promozione e divulgazione

- L. Bonfanti, Giornata per le scuole superiori: *Il lungo e affascinante viaggio della ricerca sulle cellule staminali*, con le Università di Torino, Milano, Firenze e Roma; organizzazione a Torino, aula magna di Palazzo Nuovo
- L. Bonfanti, Coordinamento stand del NICO alla "La notte dei Ricercatori", 2011: *Salva i nostri cervelli per salvare il tuo*.
- L. Bonfanti, Aperitivo con la scienza di base; conferenza ai Caffè Scientifici della "La notte dei Ricercatori", 2011
- L. Bonfanti, *Staminali: ora chiedete tutto*. Articolo su TuttoScienze, La Stampa, Torino (17/09/2011)
- L. Bonfanti, Seminario di Formazione per insegnanti nel progetto Scienza attiva, Museo di storia naturale, Torino, 9/11/2011.

3.4. Finanziamenti per la ricerca

Progetto delle attività di ricerca per il 2011 del gruppo **Neuropeptides, Emotional and Feeding Behaviour**, presso l'Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO)

Responsabile del gruppo: **Carola Eva**

1. Composizione del gruppo di ricerca (1-11-2010)

1.1. Personale strutturato dell'Università di Torino

Carola Eva (PO)

Alessandra Oberto (RU)

1.2. Personale non strutturato

Paolo Mele (postdoc)

Angela Longo (dottoranda)

2. Progetti di ricerca (2012)

2.1. Regolazione peptidergica del comportamento emozionale ed alimentare

Il Neuropeptide Y (NPY) gioca un importante ruolo nello stress, nell'ansia, nell'obesità e nell'omeostasi energetica attraverso l'attivazione del recettore NPY-Y1 (Y1R) nel cervello. Tuttavia il knockout germinale del gene *Npy1r* non modifica il comportamento ansioso o il peso corporeo dei topi. Per definire il ruolo del recettore Y1R sul comportamento emozionale e l'omeostasi energetica abbiamo generato due linee di topi knockout condizionali nelle quali è possibile ottenere l'ablazione postnatale di Y1R selettivamente in specifiche regioni dell'encefalo. Utilizzando questi modelli murini stiamo sviluppando due filoni di ricerca. Il primo filone ha l'obiettivo di studiare il ruolo del sistema *Npy-Y1R* negli effetti permanenti della cura materna sul comportamento ansioso, l'asse dello stress e il metabolismo energetico. Il secondo filone di ricerca è diretto a studiare l'importanza della co-espressione dei recettori Y1R nelle regioni limbiche e nell'ipotalamo per gli effetti di NPY sul comportamento emozionale ed alimentare. L'obiettivo a lungo termine è identificare nuovi target per la diagnosi e la terapia di patologie psichiatriche come la depressione, l'ansia e i disturbi dell'alimentazione.

2.2. Ruolo del sistema *Npy-Y1R* negli effetti permanenti della cura materna sul comportamento ansioso, l'asse dello stress e il metabolismo energetico

In questa ricerca abbiamo utilizzato topi nei quali l'inattivazione del gene *Npy1r* è ristretta ai neuroni eccitatori del proencefalo, a partire dall'età giovanile (topi *Npy1r* rfb). I topi *Npy1r* rfb mostrano un aumento dell'ansia e una diminuzione del peso corporeo, del tessuto adiposo e dei livelli serici di leptina. I nostri risultati suggeriscono inoltre che gli effetti della delezione del recettore Y1R sul peso e sull'ansia sono conseguenti ad una iperattività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, come evidenziato dall'aumento dei livelli serici di corticosterone e dall'aumento delle fibre immunoreattive al NPY e dei corpi cellulari immunoreattivi al CRH nel nucleo paraventricolare dell'ipotalamo nei topi *Npy1r* rfb.

Un aspetto particolarmente importante emerso da questa ricerca, attraverso esperimenti di adozione incrociata, è che il fenotipo dei topi ko è evidente solo se gli animali sono allevati da mamme del ceppo FVB/J, che mostrano alti livelli di cura materna, ma non se sono allevati da mamme del ceppo C57BL/6J, che curano poco i loro cuccioli. I topi controllo allevati da mamme C57BL/6J hanno livelli di espressione del recettore Y1R limbico significativamente inferiori a quelli dei topi controllo allevati da mamme FVB/J e mostrano, per tutta la durata della vita, un fenotipo (comportamento ansioso, basso peso corporeo e attivazione dell'asse HPA) paragonabile a quello dei topi *Npy1r* rfb. Questi risultati dimostrano che il

recettore Y1R nella regione limbica è un bersaglio chiave degli effetti permanenti che la cura materna esercita sulla programmazione del comportamento ansioso e sulla regolazione dell'omeostasi energetica.

Nel prossimo anno abbiamo intenzione di studiare i meccanismi molecolari coinvolti negli effetti della cura materna sul recettore limbico Y1 ed in particolare:

1. Effetti epigenetici indotti dalla cura materna sull'espressione del recettore Y1R. Numerosi studi dimostrano che la cura materna induce modificazioni epigenetiche di geni coinvolti nella regolazione dello stress. Nel prossimo anno studieremo se l'aumento dell'espressione del recettore Y1R nelle regioni limbiche indotto da alti livelli di cura materna coinvolgano modificazioni epigenetiche del gene *Npy1r*, quali l'acetilazione degli istoni o la metilazione di specifiche sequenze del DNA
2. Gli effetti della cura materna sul recettore Y1R sembrano essere legati al genere. Infatti, non abbiamo osservato nelle femmine alterazioni del fenotipo indotte dalla cura materna o dalla delezione condizionale. Abbiamo quindi iniziato una serie di esperimenti (ovariectomia, mascolinizzazione) per verificare se la presenza di ormoni sessuali femminili o differenze dimorfiche sessuali siano responsabili di questa differente risposta nei due generi
3. Effetti della somministrazione di una dieta ad elevato contenuto calorico sul comportamento dei topi mutanti o dei topi controllo allevati da mamme
4. Caratterizzazione di circuiti neuronali e dei segnali coinvolti attraverso i quali il recettore limbico Y1R regola l'asse HPA e il bilancio energetico. Questo studio sarà eseguito utilizzando un protocollo che, attraverso l'impiego di un microscopio a dissezione a laser ed esperimenti di RT-PCR, ci permetterà di analizzare l'espressione genica di NPY, CRH e BDNF in specifici nuclei dell'encefalo.

2.3. Importanza della co-espressione dei recettori Y1R nelle regioni limbiche e nell'ipotalamo per gli effetti di NPY sul comportamento emozionale ed alimentare.

Utilizzando una linea di topi condizionali (Y1RY5R^{-/-}) abbiamo studiato l'effetto dell'ablazione postnatale del recettore nei neuroni che co-esprimono Y5R sull'eccitabilità neuronale, il comportamento emozionale, il comportamento alimentare e la memoria e l'asse HPA. I nostri risultati dimostrano che la co-espressione di Y1R e Y5R ha un ruolo fondamentale sul comportamento emozionale (ma non sulle altre funzioni) in quanto i topi (Y1RY5R^{-/-}) mutati mostrano un comportamento significativamente più ansioso sia nel test dell'EPM che in quello dell'OF. È interessante osservare che gli effetti del NPY mediati dai neuroni co-esprimenti Y1R e Y5R non sono influenzati né dalla cura materna né dal genere in quanto il fenotipo ansioso degli animali mutanti è stato osservato sia nei topi allevati da mamme con bassi livelli di cura materna sia nelle femmine. Questo suggerisce il coinvolgimento di circuiti neuronali diversi nella regolazione del comportamento emozionale da parte del sistema NPY-Y1R (Longo et al., in preparazione).

Durante il prossimo anno valuteremo se l'ablazione di Y1R nei neuroni co-esprimenti Y5R modifica la risposta degli animali a condizione di stress cronico (isolamento sociale verso stabulazione in gruppo) o di stress acuto (restrain stress).

Collaborazioni: Rolf Sprengel (Max Planck Institute, Heidelberg); Paola Palanza (Università di Parma); Giovanni Biggio (Università di Cagliari)

3. Prodotti delle attività di ricerca anno 2011

3.1. Articoli pubblicati o in corso di pubblicazione con affiliazione al NICO

Bertocchi I, Oberto A, Longo A, Mele P, Sabetta M, Bartolomucci A, Palanza P, Sprengel R, Eva C. (2011). Regulatory functions of limbic Y1 receptors in body weight and anxiety uncovered by conditional knockout and maternal care. *Proc Natl Acad Sci US A* [Epub ahead of print]

Resaz R, Emionite L, Vanni C, Astigiano S, Puppo M, Lavieri R, Segalerba D, Pezzolo A, Bosco MC, Oberto A, Eva C, Chou JY, Varesio L, Barbieri O, Eva A (2011). Treatment of newborn G6pc(-/-) mice with bone marrow-derived myelomonocytes induces liver repair. *J Hepatol* 55:1263-71

Martini M, Sica M, Gotti S, Eva C, Panzica GC (2011). Effects of estrous cycle and sex on the expression of neuropeptide Y1 receptor in discrete hypothalamic and limbic nuclei of transgenic mice. *Peptides* 32:1330-4

3.2. Seminari e conferenze con affiliazione al NICO

C. Eva, Simposio: *The obese species. Clinical and preclinical understanding of eating and energy balance disorders*. Erice, 21-26 Ottobre 2011

Note

La rivista PNAS ha inserito l'articolo di Bertocchi et al. tra quelli segnalati dall'Editore (Article highlights november 14-18: Maternal care might influence brain chemistry) e lo ha inoltre selezionato per essere divulgato ai media. Numerosi giornali e siti italiani e stranieri hanno ripreso la notizia. In Italia un comunicato ANSA Biotec-Scienza & Tecnica (Così le coccole della mamma aiutano a controllare ansia e peso, 16 novembre 2011) è stato riportato da numerosi quotidiani e riviste di divulgazione scientifica tra cui il Corriere della Sera, la Stampa e il Messaggero. Stiamo preparando una rassegna stampa per raccogliere tutti gli articoli che hanno segnalato la ricerca che consegneremo alla Fondazione Ottolenghi entro la fine dell'anno

Progetto delle attività di ricerca per il 2011 del gruppo **Plasticity and Regeneration of the PNS**, presso l'Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO)

Responsabile del gruppo: **Stefano Geuna**

1. Composizione del gruppo di ricerca (1-11-2011)

1.1. Personale strutturato dell'Università di Torino

Stefano Geuna (PA)
Michele Fornaro (RU)
Isabelle Perroteau (PO, in anno sabbatico presso il NICO)

1.2. Personale non strutturato

Alessia Giovannelli (postdoc)
Stefania Raimondo (postDoc)
Giulia Ronchi (dottoranda)
Loradana Grasso (borsista)
Luisa Muratori (borsista)
Simone Bompasso (tecnico di laboratorio borsista)

Partecipano alle attività del gruppo studenti tirocinanti e tesisti delle Facoltà di Medicina e Chirurgia "San Luigi" e Scienze MFN.

2. Progetti di ricerca (2012)

In linea con i finanziamenti recentemente ricevuti dalla Commissione Europea e dalla Regione Piemonte nel corso del 2011, il lavoro del nostro gruppo di ricerca per l'anno 2012 si rivolgerà principalmente allo studio di strategie innovative di ingegneria tissutale volte alla ricostruzione e rigenerazione dei nervi periferici in seguito a lesione traumatica.

2.1. Biohybrid templates for peripheral nerve regeneration (FP7 Collaborative Project THEME:HEALTH.2011.1.4-2; Acronym: BIOHYBRID)

Nell'ambito di tale progetto, di durata quadriennale e che vede una ricca partnership di 6 paesi europei, si intendono studiare vari approcci innovativi per la realizzazione di scaffolds biomimetici per la riparazione delle lesioni dei nervi periferici con perdita di sostanza. Le ricerche verranno condotte valutando in modo comparativo numerosi materiali ed approcci terapeutici sia in vitro (per testare i differenti biomateriali in presenza di differenti tipi di cellule), sia in vivo in differenti modelli animali. In particolare si studieranno tre differenti tipi di approccio: il trapianto tissutale e cellulare (in particolare cellule di Schwann e/o cellule staminali mesenchimali); l'utilizzazione di scaffolds a base di chitosano ed infine la terapia genica mediante vettori virali adeno-associati per far esprimere a livello della sede di lesione neurale fattori che possano promuovere la rigenerazione neurale. Particolare attenzione verrà rivolta allo studio delle neurotrofine, del sistema gliotrofico NRG1/ErbB, delle citochine infiammatorie, e dei neuro-ormoni.

Collaborazioni: Mauro Giacca (ICGEB, Trieste), Claudia Grothe (ZSN, Hannover University), Ana Colette Mauricio (ICBAS, Porto University); Xavier Navarro (Universitat Autònoma de Barcelona, Spain); Lars Dahlin (Lund University, Sweden); Antonio Salgado (Minho University); Shimons Rockhind (Tel Aviv University).

2.2. Biomimetic constructs for nerve regeneration (Programma Operativo Regionale “Competitività Regionale e Occupazione” – Azione “Aiuti ai Soggetti Aggregati ai Poli di Innovazione” (Polo BioPmed e Polo Nuovi Materiali; Acronimo: BICONERVE)

Nell’ambito di questo progetto, di durata triennale e svolto in collaborazione con il Politecnico di Torino ed l’Ospedale CTO di Torino, si intende sviluppare un dispositivo biomedicale innovativo in forma di membrana bioartificiale bi-strato e bi-componente per la rigenerazione neuronale in seguito a lesioni ai nervi periferici, e con applicazione nella chirurgia spinale, nella chirurgia plastica ricostruttiva a livello cutaneo e nella chirurgia della parete addominale per risolvere, in quest’ultimo caso, il problema del “nerve entrapment”. La presenza di due strati a diversa composizione permetterà di adeguare le caratteristiche chimico-fisiche e meccaniche, e la risposta biologica del dispositivo al tipo di interfaccia. In particolare, uno strato della membrana sarà macroporoso e a base del polimero naturale chitosano, che ha note caratteristiche di biocompatibilità, attività antimicrobica e biodegradabilità; l’altro strato sarà microporoso e a base di un polimero sintetico biocompatibile e degradabile, che verrà selezionato nel corso del progetto. Quest’ultimo strato della membrana avrà la funzione principale di conferire stabilità meccanica all’intero dispositivo. La porosità differenziata garantirà la regolazione del flusso in ingresso dei nutrienti e in uscita dei cataboliti nel sito di rigenerazione.

Collaborazioni: Gianluca Ciardelli (Politecnico di Torino); Bruno Battiston e Pierluigi Tos (CTO, Torino)

2.3. Altre linee di ricerca

Sebbene la gran parte delle attività del gruppo di ricerca verranno indirizzate sui due progetti sovra menzionati, nondimeno si manterrà vivo un altro filone di ricerca i cui risultati negli ultimi anni sono stati molto promettenti, ovvero lo studio delle modificazioni che si realizzano a livello dei gangli delle radici dorsali (ed anche nei neuroni del sistema nervoso centrale) in seguito a lesione assonale periferica, con particolare attenzione alla neurogenesi ed al significato che questa può avere nell’insorgenza delle sindromi da dolore neuropatico.

Collaborazioni: Kristofz Czaja (Washington State University, Pulman, USA); Luca Bonfanti (NICO, Università di Torino)

3. Prodotti delle attività di ricerca anno 2011

3.1. Articoli pubblicati o in corso di pubblicazione con affiliazione al NICO

Raimondo S, Fornaro M, Tos P, Battiston B, Giacobini-Robecchi MG, Geuna S (2011). Perspectives in regeneration and tissue engineering of peripheral nerves. *Ann Anat* 193:334-340

Tonda-Turo C, Audisio C, Gnavi S, Chiono V, Gentile P, Raimondo S, Geuna S, Perroteau I, Ciardelli G (2011). Porous Poly(ϵ -caprolactone) Nerve Guide Filled with Porous Gelatin Matrix for Nerve Tissue Engineering. *Adv Eng Mat* 13:B151–B164

Kaplan S, Pişkin A, Ayyildiz M, Aktaş A, Köksal B, Ulkay MB, Türkmen AP, Bakan F, Geuna S (2011). The effect of melatonin and platelet gel on sciatic nerve repair: an electrophysiological and stereological study. *Microsurgery* 31:306-313

Sinis N, Manoli T, Schiefer JL, Werdin F, Jaminet P, Kraus A, Fornaro M, Raimondo S, Geuna S, Schaller HE (2011). Application of 2 different hemostatic procedures during microsurgical median nerve reconstruction in the rat does not hinder axonal regeneration. *Neurosurgery* 68:1399-1403

Lanza C, Raimondo S, Vergani L, Catena N, Sénès F, Tos P, Geuna S (2011). Expression of antioxidant molecules after peripheral nerve injury and regeneration. *J Neurosci Research* (in press)

Fornaro M, Ronchi G, Muratori L, Raimondo S, Geuna S, Robecchi-Giacobini MG (2011). Generation of new neurons in dorsal root ganglia in adult rats after peripheral nerve crush injury. *J Comp Neurol* (under revision)

Costa LM, Pereira JE, Filipe VM, Magalhães LG, Couto PA, Raimondo S, Geuna S, Maurício, Nikulina E, Filbin MT, Varejão AS (2011). Rolipram promotes functional recovery after contusive thoracic spinal cord injury in rats. *Exp Neurology* (submitted)

Geuna S, Raimondo S, Fornaro M, Robecchi MG (2011). Morpho-quantitative stereological analysis of peripheral and optic nerve fibers. *Neuroquantology* (submitted)

3.2. Seminari e conferenze con affiliazione al NICO

S. Geuna, oral presentation , 34° Congresso della Società Italiana di Istochimica, San Benedetto del Tronto, Giugno 2011

S. Geuna, invited presentation, Pre-Congress of the World Society of reconstructive Microsurgery, Bucharest, June 2011

S. Geuna, oral presentation, 65° Congresso della Società Italiana di Anatomia e Istologia, Verona, Settembre 2011

3.3. Altri prodotti riconducibili alle attività Istituzionali del NICO

3.4. Finanziamenti per la ricerca

BIOHYBRID – FP7 Collaborative Project [THEME:HEALTH.2011.1.4-2: Tools, technologies and devices for application in regenerative medicine]. Progetto di durata quadriennale. Finanziamento erogato: € 508.400

BICONERVE – Programma Operativo Regionale “Competitività Regionale e Occupazione” – Azione “Aiuti ai Soggetti Aggregati ai Poli di Innovazione” (Polo BioPmed e Polo Nuovi Materiali). Progetto di durata triennale: Finanziamento erogato: € 170.742

Progetto delle attività di ricerca per il 2012 del gruppo **Steroids and Nervous System**, presso l'Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO)

Responsabile del gruppo: **Giancarlo Panzica**

1. Composizione del gruppo di ricerca (1-11-2011)

1.1. Personale strutturato dell'Università di Torino

Giancarlo Panzica (PO)
Stefano Gotti (RU)
Vittorio Monasterolo (Tecnico di laboratorio)

1.2. Personale non strutturato

Giovanna Ponti (postdoc)
Alice Farinetti (dottoranda)
Benedetta Foglio (dottoranda)
Desirèe Miceli (dottoranda)
Alicia Rodriguez (dottoranda)

Partecipano alle attività del gruppo alcuni studenti tesisti delle Facoltà di Scienze MFN.

2. Progetti di ricerca (2012)

Il lavoro di ricerca del nostro gruppo ha come scopo principale lo studio delle interazioni tra steroidi e circuiti nervosi ed in particolare i meccanismi neuroendocrini che sono alla base del differenziamento di circuiti cerebrali e comportamenti. Per il prossimo anno seguiremo quindi quattro filoni principali. Il primo è dedicato allo studio delle basi neuroendocrine dei disordini affettivi ed in particolare alla regolazione dei circuiti a vasopressina sessualmente dimorfici dei roditori. La seconda linea di ricerca è diretta a comprendere il ruolo degli androgeni e degli estrogeni nello sviluppo e nel differenziamento dei circuiti nervosi, utilizzando alcuni modelli murini mutanti sperimentali o spontanei. Il terzo filone di ricerca si inserisce in una delle linee principali della ricerca del NICO e cioè i meccanismi di controllo della neurogenesi. Vista la grande esperienza del nostro gruppo nel campo degli steroidi sessuali, intendiamo studiare il ruolo a breve termine ed a lungo termine di androgeni ed estrogeni sulla neurogenesi. L'ultimo filone di ricerca è lo studio degli effetti cerebrali di alcuni interferenti endocrini che hanno effetti obesogeni.

Queste linee di ricerca coprono in gran parte ambiti di ricerca di base, ma possono essere anche utili per applicazioni terapeutiche nel campo della rigenerazione nervosa, della sicurezza alimentare e nella prevenzione di patologie come la depressione, il comportamento sessuale, o l'obesità.

2.1. Disordini affettivi e medicina di genere: ruolo della vasopressina e dei neurosteroidi

Topi CD1 di entrambi i sessi saranno esposti a stress imprevedibile per 8 settimane, al termine di questa esperienza gli animali saranno testati per la depressione utilizzando lo swimming immobility test e l'elevated plus maze test. Al termine di queste esperienze gli animali saranno in parte sacrificati per analisi gascromatografiche del contenuto di neurosteroidi, in parte sacrificati per il dosaggio della vasopressina con il metodo ELISA ed in parte sacrificati e fissati per evidenziare per via immunostochimica la distribuzione delle cellule e delle fibre contenenti vasopressina o NO-sintasi, che saranno poi analizzate con metodi computerizzati semiautomatici. I risultati saranno analizzati statisticamente per evidenziare le differenze sessuali nella risposta allo stress e le relazioni tra variazioni nell'espressione della vasopressina ed il contenuto in neurosteroidi. A questo studio si affiancherà anche lo studio degli effetti dell'esposizione

ai fitoestrogeni (in particolare la genisteina) sui comportamenti ansiosi. Alcuni dati preliminari ci fanno infatti ritenere che ci possano essere differenze di genere all'esposizione precoce a questi composti, in particolare con alterazione dei comportamenti ansiosi.

Collaborazioni: Roberto Melcangi e Marco Riva (Università di Milano).

2.2. Ruolo degli androgeni e degli estrogeni nel differenziamento dei circuiti cerebrali

Il modello per questo progetto è costituito dal sistema sessualmente dimorfico a vasopressina localizzato nella regione limbica (nucleo della stria terminale e setto laterale) ed il sistema a NOS ipotalamico (nucleo preottico mediale, nucleo ventromediale, nucleo paraventricolare). Si intende studiare il ruolo degli estrogeni e degli androgeni sullo sviluppo di questi sistemi. Si utilizzeranno a questo scopo animali modificati geneticamente per il gene dell'aromatasi, del recettore per gli estrogeni (alfa) e del recettore per gli androgeni. In alcuni casi gli animali saranno successivamente trattati con estrogeni o androgeni al fine di compensare i deficit genetici.

Collaborazioni: Julie Bakker (University of Liege, Belgium), Paloma Collado e Antonio Guillamon (UNED, Madrid, Spain), Cheryl Frye (Albany, NY, USA).

2.3. Steroidi sessuali e neurogenesi

La regione sottoventricolare (SVZ) è sede di intensa neurogenesi nei roditori. Non è chiaro se gli steroidi sessuali abbiano oppure no un ruolo nel regolare questa neurogenesi. Intendiamo studiare l'effetto della castrazione e della terapia di rimpiazzo con testosterone, estradiolo o estradiolo più diidrotestosterone, sul numero di cellule che entrano in divisione. Nel primo anno di questa ricerca abbiamo evidenziato come l'aromatizzazione del testosterone in estradiolo sia molto probabilmente il processo chiave per stimolare la moltiplicazione cellulare nella SVZ. Nel secondo anno studieremo l'espressione dei recettori per androgeni ed estrogeni nella SVZ per evidenziare se eventuali differenze regionali nella neurogenesi indotta dagli steroidi siano basate su una diversa distribuzione dei loro recettori. Abbiamo inoltre intenzione di testare gli effetti di alcuni distruttori endocrini di origine naturale (genisteina) su questo sistema.

Collaborazioni: Paolo Peretto (NICO, Torino), Luis Miguel Garcia-Segura (Cajal Institute, Madrid, Spain).

2.4. Distruttori endocrini e regolazione di circuiti cerebrali correlati al comportamento alimentare

I distruttori endocrini hanno, tra i loro bersagli, anche i circuiti cerebrali che sono alla base del controllo di alcuni comportamenti come il comportamento riproduttivo. Negli ultimi anni, si è evidenziato come questi composti possano anche interferire con il comportamento alimentare, inducendo, in genere, obesità. Non è però noto se questo effetto sia solamente periferico (sugli adipociti) oppure anche a livello del sistema nervoso centrale. Il nostro progetto intende studiare gli effetti di un composto denominato tributiltina (TBT), inquinante delle acque, perché rilasciato dalle vernici protettive delle imbarcazioni, che si accumula, nella scala alimentare, soprattutto nelle carni dei pesci. In un nostro primo studio abbiamo dimostrato che la somministrazione acuta di TBT determina un aumento dell'attività neuronale a livello del nucleo arcuato, una delle stazioni chiave per il controllo dell'assunzione di cibo. Intendiamo studiare gli effetti di questo composto sull'asse leptina-NPY e sull'espressione del recettore Y1 per NPY (utilizzando un ceppo murino transgenico). A questo studio si affiancherà anche lo studio degli effetti del bisfenolo A sugli stessi circuiti.

Collaborazioni: Carola Eva (NICO, Torino), Julie Chowen (Madrid, Spain), Gregor Majdic (Lubiana, Slovenia)

3. Prodotti delle attività di ricerca anno 2011

3.1. Articoli pubblicati o in corso di pubblicazione con affiliazione al NICO

- Panzica GC, Bo E, Martini M, Miceli D, Mura E, Gotti S (2011). Neuropeptides and enzymes are targets for the action of endocrine disrupting chemicals in the vertebrate brain. *J Tox Envir Health Part B* 14:449-472
- Melcangi RC, Panzica GC, Garcia-Segura LM (2011). Neuroactive steroids: focus on the human brain. *Neuroscience* 191:1-5
- Gotti S, Caricati E, Panzica GC (2011). Alterations of brain circuits in Down syndrome murine models. *J Chem Neuroanatomy* 42:317-326
- Bo E, Viglietti-Panzica C, Panzica GC (2011). Acute exposure to tributyltin induces c-fos activation in the hypothalamic arcuate nucleus of adult male mice. *Neurotoxicology* 32:277-280
- Genestine M, Caricati E, Fico A, Richelme S, Hassani H, Sunyach C, Lamballe F, Panzica GC, Pettmann B, Helmbacher F, Raoul C, Maina F, Dono R (2011). Enhanced neuronal Met signalling levels in ALS mice delay disease onset. *Cell Death and Disease* 2: e130
- Martini M, Sica M, Gotti S, Eva C, Panzica GC (2011). Effects of estrous cycle and sex on the expression of neuropeptide Y Y1 receptor in hypothalamus and limbic system of transgenic mice. *Peptides* 32:1330-1334
- Martini M, Pradotto M, Panzica GC (2011). Synergic effects of estradiol and progesterone on regulation of the hypothalamic neuronal nitric oxide synthase expression in ovariectomized mice. *Brain Res* 1404:1-9
- Frye C, Bo E, Calamandrei G, Calzà L, Dessì-Fulgheri F, Fernández M, Fusani L, Kah O, Kajta M, Le Page Y, Patisaul HB, Venerosi A, Wojtowicz AK, Panzica GC (2012). Endocrine disruptors: a review of sources, effects, and mechanisms of action on behavior and neuroendocrine systems. *J Neuroendocrinol* (in press)
- Panzica GC, Balthazart J, Frye CM, Garcia-Segura LM, Herbison AE, Mensah-Nyagan AG, McCarthy MM, Melcangi RC (2012). Milestones on steroids and the nervous system: Ten years of basic and translational research. *J Neuroendocrinol* (in press)

3.2. Seminari e conferenze con affiliazione al NICO

- G.C. Panzica, lettura magistrale, 65° Congresso Nazionale Società Italiana di Anatomia e Istologia (Padova), 28-09-2011
- G.C. Panzica, invited lecture – Workshop: *The obese species* (Erice), 24-10-2011
- G.C. Panzica, invited lecture, *SiNAPSA – Slovenian Neuroscience Meeting* (Lubiana), Regional FENS meeting, 25-09-2011
- G.C. Panzica, seminario su invito, Siena (26 maggio), Madrid (Spagna, 22 giugno), Tours (Francia, 16 settembre)
- E. Bo, comunicazione orale, *6th Steroid and Nervous System* (Torino), 22-02-2011

3.3. Altri prodotti riconducibili alle attività Istituzionali del NICO

3.3.1. Attività editoriali

- G.C. Panzica, guest editor, Neuroactive steroids: Focus on human brain, *Special Issue, Neuroscience*, vol. 191, 2011, pp. 1-158 – ISSN.0306-4522 (con RC Melcangi e LM Garcia-Segura)
- G.C. Panzica, guest editor, Recent advances in peptides and neurotransmitters, *Special Issue, J Chem Neuroanatomy*, vol. 42, 2011, pp. 221-340 – ISSN.0891-0618 (con L D'Este)
- G.C. Panzica, S Gotti, guest editors, 6th International Meeting Steroids and Nervous System. Abstract book *Trab.Inst.Cajal*, Vol. LXXXIII, 2011, pp. 1-239. (a cura di GC Panzica e S Gotti)

3.4. Finanziamenti per la ricerca

Progetto San Paolo 2009 – *Gender and affective disorders: role of vasopressin and neuroactive steroids* (G.C. Panzica). Finanziamento erogato: € 160.000

Progetto delle attività di ricerca per il 2011 del gruppo **Developmental Neurobiology and Regeneration**, presso l'Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO)

Responsabile del gruppo: **Ferdinando Rossi**

1. Composizione del gruppo di ricerca (1-11-2011)

1.1. Personale strutturato dell'Università di Torino

Ferdinando Rossi (PO)
Annalisa Buffo (RU)
Daniela Carulli (RU)
Annarita De Luca (Tecnica di Laboratorio)

1.2. Personale non strutturato

Enrica Boda (postdoc)
Ketty Leto (postdoc)
Simona Foscarin (dottoranda)
Vivien Labat-Gest (dottorando)
Gianluca Menichetti (dottorando)
Elena Parmigiani (dottoranda)
Ermira Pajai (dottoranda)
Chiara Rolando (dottoranda)

Partecipano alle attività del gruppo alcuni studenti tesisti delle Facoltà di Psicologia, Medicina e Chirurgia, Scienze MFN, Biotecnologie.

2. Progetti di ricerca (2012)

Il lavoro di ricerca si sviluppa lungo tre filoni principali. Il primo è dedicato allo studio dei processi di plasticità riparazione e rigenerazione nel sistema nervoso centrale. In particolare, l'attività è attualmente diretta ad evidenziare l'influenza degli stimoli esterni e dell'esperienza sui meccanismi molecolari che regolano i processi di crescita, plasticità e rigenerazione nel sistema nervoso, in condizioni normali o in seguito a una lesione. Il secondo filone è diretto a studiare i processi di specificazione fenotipica ed integrazione di nuovi neuroni nei circuiti nervosi. Questo ambito comprende sia studi fondamentali sui meccanismi che controllano la generazione dei diversi tipi di interneuroni inibitori nel cervelletto, sia esperimenti transazionali preclinici volti a sperimentare terapie di sostituzione cellulare in modelli murini di atassia spino-cerebellare. La terza linea di ricerca è volta a studiare la reazione del tessuto nervoso al danno con il fine specifico di identificare l'attivazione di cascate di segnalazione e programmi genici implicati in fenomeni reattivi o compensatori. Obiettivo a lungo termine è sperimentare procedure che possano incrementare le potenzialità neurogeniche del tessuto nervoso lesionato.

2.1. Ruolo dell'esperienza nel controllo dei processi di crescita, plasticità e rigenerazione nel sistema nervoso centrale

Una lesione del sistema nervoso centrale causa la morte dei neuroni o l'interruzione delle connessioni nervose, determinando gravi deficit sensoriali, motori o cognitivi. Anche se le capacità rigenerative dei neuroni centrali sono limitate, il sistema nervoso può in parte recuperare le funzioni compromesse grazie all'abilità dei neuroni di riorganizzare le connessioni (plasticità). Le proprietà plastiche dei circuiti nervosi, però, diminuiscono con l'età. Tra i fattori che limitano la plasticità nell'età adulta vi è la diminuzione dell'espressione di fattori intrinseci neuronali che promuovono la crescita assonale e la produzione

nell'ambiente extracellulare di molecole che inibiscono la crescita neuritica. In particolare, intorno alle sinapsi si formano aggregati di matrice extracellulare, le reti perineuronali, che stabilizzano e riducono le capacità di rimodellamento strutturale. I processi plastici nel sistema nervoso centrale adulto, nonché il recupero funzionale dopo un danno, sono favoriti dall'interazione con l'ambiente esterno, sotto forma di stimoli sensoriali, motori, sociali e cognitivi (esperienza). E' stato recentemente dimostrato, inoltre, che la plasticità neuronale e l'espressione/distribuzione delle reti perineuronali dipende dall'equilibrio tra l'attività elettrica eccitatoria e quella inibitoria, le quali sono a loro volta determinate dagli stimoli esterni.

Obiettivo della nostra ricerca è capire quali sono i meccanismi alla base della plasticità neuronale in condizioni fisiologiche o dopo un danno, ed incrementare i processi plastici attraverso specifiche manipolazioni che rafforzino le proprietà intrinseche dei neuroni o portino ad una attenuazione dei meccanismi inibitori.

Per chiarire i meccanismi attività-dipendenti che regolano la plasticità compensatoria dopo un danno studieremo i processi di denervazione e re-innervazione, in parallelo con alterazioni nell'equilibrio tra attività elettrica eccitatoria ed inibitoria e cambiamenti dell'espressione delle molecole della matrice extracellulare, nei nuclei cerebellari denervati e nei nuclei vestibolari dopo denervazione unilaterale e durante il processo di compensazione vestibolare. Questi cambiamenti verranno messi in relazione al comportamento dei topi lesionati sia durante la manifestazione dei deficit vestibolari che durante il compenso vestibolare. Per capire il ruolo delle reti perineuronali o quello di specifici fattori intrinseci nel controllo della plasticità, studieremo il compenso vestibolare in linee di topi mutanti che presentano reti perineuronali difettose o capacità plastiche neuronali potenziate. Uno dei nostri modelli di studio è, infatti, rappresentato da una linea di topi transgenici che sovraesprime la proteina associata alla crescita GAP-43 specificatamente nelle cellule di Purkinje del cervelletto. Studieremo, pertanto, le capacità plastiche delle cellule di Purkinje transgeniche dopo denervazione dei nuclei vestibolari ed il grado di recupero funzionale dei topi transgenici.

Negli stessi topi esamineremo i meccanismi molecolari/cellulari attraverso cui GAP-43 potenzia la plasticità delle cellule di Purkinje dopo assotomia, con particolare attenzione ai cambiamenti di distribuzione ed espressione di determinanti intrinseci neuronali, quali i fattori del citoscheletro. In questo modello sperimentale abbiamo osservato che la sovraespressione di GAP-43 determina una maggiore organizzazione dei microtubuli negli assoni di Purkinje lesionati. Il nostro scopo è ora quello di capire se questo cambiamento del citoscheletro può contribuire al potenziamento delle capacità plastiche delle cellule di Purkinje transgeniche. A tal fine manipoleremo l'organizzazione dei microtubuli (per mezzo di taxolo, che aumenta il grado di stabilizzazione dei microtubuli, o di nocodazolo, che agisce in maniera opposta) nel cervelletto di topi transgenici e wild-type sia *in vivo* che *in vitro*, e valuteremo i cambiamenti plastici dei neuroni di Purkinje assotomizzati.

Collaborazioni: Martin E. Schwab (ETH, Zurich), James Fawcett (Centre for Brain Repair, Cambridge); Leszek Kaczmarek (Nencki Institute, Warsaw), Roberto Albera (Università di Torino).

2.2. Meccanismi di specificazione fenotipica ed integrazione nel sistema nervosa centrale

Il piano di questa linea di ricerca prevede la prosecuzione delle attività sperimentali volte allo studio dei processi di specificazione degli interneuroni cerebellari GABAergici e delle relazioni di lignaggio esistenti tra i diversi fenotipi derivanti dalla zona ventricolare cerebellare (VN) embrionale. Nell'ambito dello studio dei meccanismi cellulari/molecolari che regolano il numero e il fenotipo degli interneuroni inibitori ci proponiamo di analizzare l'espressione di potenziali molecole segnalatrici responsabili della specificazione degli interneuroni e dei loro recettori nella sostanza bianca del cervelletto postnatale (prospective white matter, PWM) a diverse età di sviluppo. Le analisi iniziali saranno concentrate su molecole di guida come netrin-1, reelin e su fattori di crescita come bFGF, FGF8 e Shh, in grado di stimolare la proliferazione delle cellule della PWM. In parallelo proseguiranno i test funzionali condotti *in vitro* attraverso l'applicazione di diverse sostanze (da sole o in combinazione) su colture dissociate o organotipiche, preparate da cervelletti embrionali e postnatali, al fine di valutare l'effetto sulla proliferazione e sul differenziamento degli interneuroni cerebellari. Inoltre, nelle preparazioni organotipiche sarà possibile indagare le interazioni molecolari tra i fattori applicati e altre sostanze presenti nell'ambiente locale della PWM. Nel complesso,

questo approccio favorirà l'identificazione delle cascate molecolari sottostanti alla specificazione delle diverse classi di interneuroni.

Lo studio delle relazioni di lignaggio esistenti tra interneuroni inibitori e astrociti proseguirà con il completamento della caratterizzazione dei topi GLAST::CreERT2:YFP. Il potenziale di sviluppo delle cellule positive per il reporter sarà valutato dopo selezione delle cellule con FACS, sia mediante trapianto eterocronico/eterotopico, sia in colture su feeder layers definiti. Saranno esaminate le proprietà morfologiche e neurochimiche delle cellule indotte nella PWM a età diverse di sviluppo al fine di identificare progenitori dalle caratteristiche ibride, in grado di generare interneuroni e astrociti. Parallelamente, proseguiremo esperimenti recentemente intrapresi di analisi clonale nello sviluppo cerebellare mediante applicazione di vettori di espressione o di vettori virali sia *in utero* che *in vivo*. Questi esperimenti ci permetteranno di definire la composizione dei cloni di cellule cerebellari e, quindi, le relazioni di lignaggio fra i diversi fenotipi neuronali e gliali.

In una linea parallela, continueremo lo studio della VN al fine di identificare i processi coinvolti nella specificazione dei diversi fenotipi GABAergici. Trapianti eterocronici di cellule della VN selezionate da diverse linee di topi transgenici saranno utilizzati per stabilire le loro potenzialità di sviluppo, mentre l'ablazione/sovraespressione di precisi fattori di trascrizione o geni proneurali saranno eseguite per identificare i meccanismi cellulari intrinseci responsabili dell'induzione di specifici fenotipi. Un'attenzione privilegiata verrà conferita allo studio dei meccanismi sottostanti la produzione di cellule di Purkinje, i neuroni di proiezione principalmente colpiti nell'ataxia spinocerebellare di tipo 2 (SCA2). Una parte delle attività di ricerca sarà dedicata allo studio di tale patologia neurodegenerativa attraverso la messa a punto e l'applicazione di strategie di sostituzione cellulare preventive in modelli SCA2 murini prima dell'insorgenza della malattia. In particolare, trapianteremo popolazioni pure di cellule di Purkinje nel IV ventricolo di embrioni *in utero* o nel cervelletto postnatale *in vivo*, quando l'integrazione anatomica e funzionale degli elementi trapiantati è massima. Indagheremo le proprietà a lungo termine dei neuroni trapiantati (da 30 a 180 giorni dal trapianto) e la loro abilità di contrastare gli effetti della mutazione SCA2.

Collaborazioni: Giacomo Consalez (Dibit, Milano); Alain Chedotal (Institut de la Vision, Paris); Lorenzo Magrassi (Università di Pavia), Luca Bonfanti, Paolo Peretto, Silvia de Marchis (NICO)

2.3. Reazione del tessuto nervoso al danno

Nell'ultimo anno abbiamo caratterizzato l'espressione del recettore P2 GPR17 negli oligodendrociti della corteccia cerebrale di topi in età postnatale e adulta e in seguito a lesioni traumatiche acute (lesione da taglio), demielinizzanti (iniezione della tossina lisolecitina nella sostanza bianca sottocorticale) e croniche (amilodiosi cerebrale, topi mutanti APPPS1). GPR17 è nuovo marcatore di eterogeneità oligodendrogliale nel parenchima intatto e identifica solo una frazione di cellule generata ex novo da elementi proliferanti. Le cellule oligodendrogliali che esprimono alti livelli del recettore sono completamente post-mitotiche e assumono progressivamente le caratteristiche antigeniche e morfologiche degli oligodendrociti pre-mielinizzanti. Benché non coinvolto nell'induzione della reattività dei progenitori oligodendrogliali dopo lesione, il recettore viene sovra espresso da cellule oligodendrogliali durante la risposta post-acuta a lesioni traumatiche, demielinizzanti e in caso di amiloidosi cerebrale cronica. Proseguiremo questi studi cercando di capire se l'eterogeneità nell'espressione di GPR17 tra gli oligodendrociti neogenerati sia dovuta alla diversa capacità di popolazioni embriologicamente distinte di esprimere il recettore, o se, invece, possa essere attribuita a fenomeni di segregazione asimmetrica del macchinario per la sintesi di GPR17 durante la mitosi. Per verificare la prima possibilità coltiveremo in vitro espianti di tessuto nervoso embrionale e adulto noti come siti di oligodendroglione (telencefalo dorsale, ventrale, rostrale, zona sottoventricolare perinatale) e esamineremo se tutti questi territori o solo alcuni sono in grado di generare oligodendrociti GPR17-positivi. In parallelo, a verifica della seconda possibilità, eseguiremo studi di lineaggio in vivo e in vitro in doppietti di progenitori oligodendrogliali marcati in modo permanente durante la mitosi e derivanti da una stessa cellula madre. In queste cellule seguiremo l'espressione di marcatori di maturazione (incluso GPR17) e di proliferazione e studieremo la presenza dei macchinari classici di divisione asimmetrica (segnali di Notch/Numb).

In una seconda linea di ricerca studiamo i segnali che regolano la produzione di nuovi neuroni nella zona germinativa della zona sottoventricolare del cervello murino adulto e la loro migrazione verso le zone di destinazione. La modulazione di questi segnali potrebbe essere utile per il ripopolamento di aree colpite da neurodegenerazione. Abbiamo recentemente scoperto che la proteina NOGOA e il suo recettore NgR1 (già noti inibitori della rigenerazione assonale) sono coinvolti in questi fenomeni. Esperimenti in corso mostrano che NOGOA promuove la migrazione dei neuroblasti e interagisce con il recettore NgR1 presente sugli astrociti germinativi (AG). Il trattamento con antagonisti per NgR1 provoca l'attivazione degli AG e aumenta la produzione di neuroblasti. Inoltre, i diversi effetti di attivazione degli AG e di promozione della migrazione dei neuroblasti sono esercitati da domini distinti della molecola NOGOA. Il lavoro previsto per il prossimo anno è finalizzato a caratterizzare le cascate molecolari che mediano l'interazione fra NOGOA e i suoi recettori in questo sistema. La nostra ipotesi di lavoro è che NOGOA agisca come modulatore negativo dell'attività delle cellule staminali adulte e partecipi ad un meccanismo a feedback negativo tra neuroblasti e cellule staminali diretto a regolare i ritmi di produzione di nuovi neuroblasti e a dirigerne la migrazione.

Collaborazioni: Maria Pia Abbracchio (Università di Milano); Magdalena Götz (LMU, Munich); Martin E Schwab (ETH, Zurich), Antonio Bertolotto (NICO).

3. Prodotti delle attività di ricerca anno 2011

3.1. Articoli pubblicati o in corso di pubblicazione con affiliazione al NICO

- Boda E, Viganò F, Rosa P, Marta Fumagalli M, Labat-Gest V, Filippo Tempia, Abbracchio MP, Dimou L, Buffo A (2011). The GPR17 receptor in NG2 expressing cells: Focus on in vivo cell maturation and participation in acute trauma and chronic damage *Glia* DOI: 10.1002/glia.21237
- Bonfanti L, Rossi F, Zupanc GK (2011). Towards a comparative understanding of adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 34:845-846
- Carletti B, Piemonte F, Rossi F (2011). Neuroprotection: the emerging concept of restorative neural stem cell biology for the treatment of neurodegenerative diseases. *Curr Neuropharmacol* 9:313-317
- Carulli D, Foscari S, Rossi F (2011). Activity-dependent plasticity and gene expression modifications in the adult CNS. *Front Mol Neurosci* 4, doi:10.3389/fnmol.2011.00050
- Ceruti S, Viganò F, Boda E, Ferrario S, Magni G, Boccazzi M, Rosa P, Buffo A, Abbracchio MP (2011). Expression of the new P2Y-like receptor GPR17 during oligodendrocyte precursor cell maturation regulates sensitivity to ATP-induced death. *Glia* 59:363-78
- Foscari S, Ponchione D, Pajaj E, Leto K, Gawlak M, Wilczynski GM, Rossi F, Carulli D (2011). Experience-dependent plasticity and modulation of growth regulatory molecules at central synapses. *PLoS ONE* 6:e16666. doi:10.1371/journal.pone.0016666
- Leto K, Bartolini A, Di Gregorio A, Imperiale D, De Luca A, Parmigiani E, Filipkowski RK, Kaczmarek L, Rossi F (2011). Modulation of cell-cycle dynamics is required to regulate the number of cerebellar GABAergic interneurons and their rhythm of maturation. *Development* 138:3463-3472
- Foscari S, Rossi F, Carulli D (2011). Influence of the environment on adult CNS plasticity and repair. *Cell Tissue Res* (in press)
- Leto K, Rossi F (2011). Specification and differentiation of cerebellar GABAergic neurons. *The Cerebellum* (in press)
- Rolando C, Boda E, Buffo A (2011). Immune system modulation of parenchymal and germinal neural progenitor cells in physiological and pathological conditions in: *Neural Stem Cells and Therapy Sun T Ed In Tech* (in press)
- Rossi F (2011). Evolutionary mechanisms and neural adaptation: Selective versus constructive strategies in the development and plasticity of the nervous system. In: *The Theory of Evolution and its Impact* (Fasolo A, Ed), Springer, New York (in press)

Sotelo C, Rossi F (2011). Purkinje cell migration and differentiation. In: *Handbook of Cerebellum and Cerebellar Disorders* (Manto M, Gruol D, Schmamann J, Koibuchi N, Rossi F, eds), Springer, New York (in press)

Corno D, Pala M, Cominelli M, Cipelletti B, Leto K, Croci L, Barili V, Brandalise F, Di Gregorio A, Sergi L, Politi L, Bulfone A, Rossi P, Rossi F, Consalez GG, Poliani L, Galli R (2011). Molecular profiling of postnatal hindbrain-derived neural stem cells and cancer stem cells identifies novel molecular targets in medulloblastoma. *Cancer Disc* (under revision)

Florio M, Leto K, Muzio L, Tinterri A, Badaloni A, Croci L, Zordan P, Barili V, Albieri I, Guillemot F, Rossi F, Consalez GG (2011). Neurog2 regulates progenitor cell cycle progression and Purkinje cell dendritogenesis in cerebellar development. *Development* (under revision)

Brilli E, Reitano E, Conti L, Conforti P, Gulino R, Consalez G, Smith A, Rossi F, Cattaneo E (2011). Neural stem cells engrafted in the adult brain fuse with endogenous neurons. *J Clin Invest* (submitted)

Leto K, Rolando C, Rossi F (2011). The genesis of cerebellar GABAergic neurons: fate potential and specification mechanisms, *Front Neuroanat* (submitted)

Ronga L, Bazzanella C, Iannetti GD, Rossi F (2011). Linguistic synaesthesia and neurophysiological multisensory interactions. *Pragmatics and Cognition* (under revision)

Vo T, Carulli D, Ehlert EME, Dick G, Mecollari V, Moloney EB, Neufeld G, de Winter F, Kwok JCF, Fawcett JW, Verhaagen J (2011). The Chemorepulsive Axon Guidance Protein Semaphorin 3A is a Constituent of Perineuronal Nets in the Adult Rodent Brain. *J Neurosci* (submitted)

3.2. Seminari e conferenze con affiliazione al NICO

E. Boda, IV Convegno Monotematico della SIF, "Immunità e infiammazione nelle malattie del cervello. Nuovi bersagli farmacologici per terapie innovative", 2011, Milan

A. Buffo, 8° Corso di Aggiornamento in Neuroscienze Città di Catania su "Invecchiamento cerebrale e demenza", 2011

A. Buffo, Satellite Symposium on "Rapid isolation of neural cell populations: advanced technologies in neuroscience", 41th annual meeting of the Society for Neuroscience, 13-11-2011 Washington, DC

F. Rossi, public lecture, "Il Mercoledì dell'Accademia", Circolo dei Lettori, 26-01-2011, Turin

F. Rossi, lecture, Convegno su "La Medicina dal Passato al Futuro", Istituto Lombardo Accademia di Scienze e Lettere, 09-06-2011, Milano

F. Rossi, Symposium on "Building of cerebellar circuits: from neuronal specification to synapse formation". The IBRO World Congress of Neuroscience, 17-07-2011, Florence

F. Rossi, Symposium on "Cerebellar Development", IV International Congress of the Society for Research on the Cerebellum, 19-09-2011, Tokyo

F. Rossi, keynote lecture, XXII Aini Congress, 22-09-2011, Pollenzo (CN)

3.3. Altri prodotti riconducibili alle attività Istituzionali del NICO

3.3.1. Attività editoriali

F. Rossi, Section editor (Cerebellar Development), The Springer HAndbook of Cerebellum and Cerebellar Disorders

F. Rossi, in qualità di Associate Editor di European Journal of Neuroscience ha curato lo Special Issue Towards a Comparative Understandings of Adult Neurogenesis

3.3.2. Attività di promozione e divulgazione

Conferenze al pubblico per la Brain Awareness Week 2011, marzo 2011

Manifestazione per il pubblico Unistem, con el Università di Torino, Milano, Firenze e Roma

Attività di divulgazione scientifica "La notte dei Ricercatori, 2011

Visite al NICO di studenti liceali nell'ambito di Scienzattiva, iniziativa promossa da Fondazione Agnelli e Università degli studi di Torino, luglio 2011

3.4. Finanziamenti per la ricerca

Progetto Prin 2009TBCZJB *Neurogenesi e differenziamento neuronale: geni regolatori, segnali molecolari e meccanismi dipendenti dall'esperienza*, approvato con D.M. n.404/Ric. del 14 luglio 2011 (F. Rossi).
Finanziamento erogato: € 85.000

Progetto Firb RBF10A01S *Generazione mirata di neuroni cerebellari e striatali come strategia preventiva per malattie del SNC*, approvato con D.M. n.556/Ric. del 21 settembre 2011 (K. Leto). Finanziamento erogato: € 246.100

Progetto delle attività di ricerca per il 2012 del gruppo **Alzheimer's disease and Ataxia**, presso l'Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO)

Responsabile del gruppo: **Filippo Tempia**

1. Composizione del gruppo di ricerca (1-11-2011)

1.1. Personale strutturato dell'Università di Torino (o dell'Ospedale San Luigi Gonzaga)
Filippo Tempia (PO)

1.2. Personale non strutturato
Eriola Hoxha (dottoranda)
Francesca Montarolo (dottoranda)
Mohcene Sadallah (dottorando)

Partecipano alle attività del gruppo alcuni studenti tesisti dei Corsi di Laurea in Biotecnologie.

2. Progetti di ricerca (2012)

2.1. Morbo di Alzheimer

Nel morbo di Alzheimer (AD: Alzheimer's disease) il cervello perde gradualmente le proprie funzioni, iniziando dalla capacità di depositare e recuperare nuove memorie. L'AD è una patologia neurodegenerativa caratterizzata da due tipi di lesioni: aggregati extracellulari di beta-amiloide (comprendenti le placche amiloidi) e aggregati intracellulari di proteina tau iperfosforilata (grovigli neurofibrillari). Si ritiene che l'aggregazione di beta-amiloide sia l'evento primario, da cui originano processi che portano alla morte cellulare. Tuttavia, l'alterazione più strettamente correlata con la gravità dei sintomi è la drammatica perdita di contatti sinaptici. Alcuni dati recenti indicano che anche l'eccitabilità di membrana è alterata nell'AD.

Il nostro laboratorio studia le alterazioni di attività neuronale presenti nei modelli animali di AD e le conseguenze dell'alterata attività nervosa sulla progressione della patologia. I modelli animali a nostra disposizione sono due ceppi di topi transgenici che esprimono rispettivamente 2 o 3 geni umani mutati, responsabili di AD familiare. Il primo di questi (Radde et al., 2006) presenta un'amiloidosi precoce e massiva, mentre il secondo (Oddo et al., 2003), oltre all'amiloidosi cerebrale, presenta anche grovigli neurofibrillari.

Nel 2011 abbiamo identificato delle alterazioni elettrofisiologiche nelle cellule di Purkinje del cervelletto, attribuibili alla diffusione di peptide beta-amiloide extracellulare. Nel prossimo anno, se saremo finanziati, passeremo allo studio delle alterazioni elettrofisiologiche dei neuroni piramidali e degli interneuroni di corteccia cerebrale. Lo studio sul ruolo dell'attività neuronale, iniziato nel 2011, è in fase conclusiva. Nel 2012 verranno ultimate le analisi e il manoscritto verrà sottomesso per la pubblicazione.

Vari studi recenti indicano un importante ruolo dell'insulina e della patologia diabetica nel morbo di Alzheimer. Nel 2012 verranno studiati gli effetti di diverse forme di insulina sintetica sulla progressione della patologia amiloide nei topi modello di AD. La somministrazione per alcuni mesi di una dieta iperlipidica provoca alterazioni della curva da carico di glucosio e una disregolazione della cascata di segnalazione dell'insulina. A livello del sistema nervoso centrale è stato descritto un aggravamento delle placche amiloidi e dei grovigli neurofibrillari. Il nostro studio ha il fine di valutare i benefici della terapia insulinica in topi AD con intolleranza al glucosio in seguito a somministrazione di dieta iperlipidica, e in topi AD mantenuti con una dieta standard.

Un ultimo filone di ricerca, che si svilupperà nel 2012, riguarda esperimenti pilota sul possibile utilizzo di ultrasuoni focalizzati ad alta frequenza per ridurre la patologia amiloide nei topi AD.

Collaborazioni: Frank M La Ferla, S. Oddo (University of California, Irvine, USA), I. Rainero (Neurologia, Università di Torino), G. Guiot (Dip. di Neuroscienze, Università di Torino), G. Durando (Istituto Nazionale di Ricerca Metrologica)

2.2. Atassie

La ricerca sulle atassie riguarda i meccanismi di una forma ereditaria di atassia spino-cerebellare denominata SCA28 e di nuovi modelli di atassia. Una recente ricerca, svolta in collaborazione con il Dott. Alfredo Brusco del laboratorio di genetica dell'Università di Torino e con il Dott. Franco Taroni dell'Istituto Neurologico Besta di Milano, ha portato alla scoperta che la SCA28 è causata da mutazioni del gene *AFG3L2* (Di Bella et al., 2010, *Nature Genetics* 42: 313-331). Il nostro laboratorio, in collaborazione con il Dott. Alfredo Brusco, ha inoltre studiato il pattern di espressione del gene *Afg3l2* e dei suoi due paraloghi *Afg3l1* and *Spg7* nell'encefalo di topi normali. I risultati mostrano che *Afg3l2* è espresso a livelli elevati nel cervelletto, ma non in modo selettivo, indicando la necessità di un modello animale dettagliato di SCA28. Nel 2011 sono nati i primi topi knock-in modello della SCA28, generati presso il laboratorio di genetica del Dott. Brusco. I primi animali sono stati sottoposti a test motori, che non hanno ancora evidenziato alterazioni. Questo risultato, finora, è in accordo con l'esordio relativamente tardivo (oltre il quarto mese di età del topo) dei sintomi nel topo emizigote, che presenta aploinsufficienza per *Afg3l2*. Oltre a topi SCA28 knock-in eterozigoti, stiamo iniziando a generare anche omozigoti, in cui ci aspettiamo un fenotipo molto più grave. Non appena sapremo l'età di esordio dei sintomi, studieremo le alterazioni morfologiche ed elettrofisiologiche del cervelletto dei topi knock-in SCA28.

Gli studi sul modello di atassia causata dalla delezione del gene *Ebf2* hanno evidenziato dei deficit funzionali delle cellule di Purkinje presenti nel cervelletto adulto. Le sinapsi glutamatergiche che proiettano a queste cellule risultano invece intatte. Nel 2012 la ricerca proseguirà con lo studio delle sinapsi GABAergiche, che nei primi esperimenti hanno già mostrato evidenti alterazioni.

Collaborazioni: A. Brusco (Dip. di Genetica, Biologia e Biochimica, Università di Torino), G. Consalez (Università Vita-Salute San Raffaele, Milano)

3. Prodotti delle attività di ricerca anno 2011

3.1. Articoli pubblicati o in corso di pubblicazione con affiliazione al NICO

Bianchi FT, Camera P, Ala U, Imperiale D, Migheli A, Boda E, Tempia F, Berto G, Bosio Y, Oddo S, Laferla FM, Taraglio S, Dotti CG, Di Cunto F (2011). The Collagen Chaperone HSP47 Is a New Interactor of APP that Affects the Levels of Extracellular Beta-Amyloid Peptides. *PLoS One* 6:e22370

Boda E*, Hoxha E*, Pini A, Montarolo F, Tempia F. (2011). Brain expression of Kv3 subunits during development, adulthood, aging and in a murine model of Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* DOI: 10.1007/s12031-011-9648-6

Boda E, Viganò F, Rosa P, Fumagalli M, Labat-gest V, Tempia F, Abbracchio MP, Dimou L, Buffo A. (2011). The GPR17 receptor in NG2 expressing cells: focus on *in vivo* cell maturation and participation in acute trauma and chronic damage. *Glia* 59:1958-1973 doi: 10.1002/glia.21237

Hoxha E*, Tonini R*, Montarolo F, Croci L, Consalez GG, Tempia F. Ataxic gait and cerebellar Purkinje cell firing impairment in *Ebf2*-null mice. *Mol Cell Neurosci* (under revision)

Hoxha E, Boda E, Montarolo F, Parolisi R, Tempia F. Excitability and synaptic alterations in the cerebellum of APPPS1 mice. *PLoS One* (under revision)

3.2. Seminari e conferenze con affiliazione al NICO

3.3. Altri prodotti riconducibili alle attività Istituzionali del NICO

3.4. Finanziamenti per la ricerca

Progetto delle attività di ricerca per il 2012 del gruppo **Brain Development and Disease**, presso l'Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO)

Responsabile del gruppo: **Alessandro Vercelli**

1. Composizione del gruppo di ricerca (1-11-2011)

1.1. Personale strutturato dell'Università di Torino

Adriano Ceccarelli (PA)
Elena Tamagno (RU)
Alessandro Vercelli (PA)

1.2. Personale non strutturato

Marina Boido (postdoc)
Michela Guglielmotto (postdoc)
Valeria Valsecchi (postdoc)
Daniele Conte (dottorando)
Valentina Grande (dottoranda)
Debora Monteleone (dottoranda)
Antonio Piras (dottorando)
Simone Tomasi (dottorando)

1.3. Ospiti stranieri

Si prevede l'arrivo di un postdoc e un dottorando brasiliani nel 2012.

Partecipano alle attività del gruppo alcuni studenti tesisti delle Facoltà di Medicina e Chirurgia, e Biotecnologie.

2. Progetti di ricerca (2012)

Il gruppo di ricerca studia lo sviluppo del sistema nervoso centrale dalla vita embrionale all'invecchiamento, e i meccanismi neurobiologici comuni allo sviluppo normale e alla neurodegenerazione. Ci occupiamo di corteccia cerebrale, retina e midollo spinale, e dell'organizzazione strutturale della corteccia visiva. Inoltre, poiché molti meccanismi molecolari possono essere studiati a diversi livelli, li studiamo sia in modelli in colture cellulari e in vivo, dagli organismi più semplici (*Dictyostelium*) ai roditori, fino all'uomo. Studiamo i meccanismi molecolari che portano alla neurogenesi e alla morte neuronale, che osserviamo nello sviluppo e in modelli sperimentali di ischemia transitoria o permanente, nel glaucoma acuto o cronico, epilessia e malattia di Alzheimer. Inoltre, studiamo il ruolo immunomodulatorio, neuroprotettivo e di stimolazione alla crescita assonale della terapia cellulare nella atrofia muscolare spinale, nella sclerosi laterale amiotrofica e nel trauma spinale. Studiamo quindi i substrati anatomici e molecolari dello sviluppo neurale e della fisiologia, che vengono alterati nella patologia.

2.1. Organizzazione modulare e sviluppo della corteccia cerebrale

Intendiamo studiare i moduli strutturali e funzionali della corteccia cerebrale e i loro circuiti, come substrato delle attività cerebrali ed entità che vengono alterate in diverse patologie congenite e degenerative. La ricerca dei blocchi elementari di costruzione della corteccia cerebrale ha evidenziato tre strutture perpendicolari alla superficie corticale: a) colonne di neuroni con risposte elettrofisiologiche costanti in senso radiale; b) minicolonne di corpi cellulari allineati tra loro; c) fasci di dendriti apicali dei neuroni piramidali che hanno i corpi cellulari in diverse lamine. I fasci dendritici consistono di neuroni che

proiettano con i loro assoni a bersagli specifici (cioè a specifiche aree del sistema nervoso). Pertanto analizzeremo la distribuzione dei neuroni piramidali che proiettano a bersagli diversi (corpo calloso, corteccia cerebrale, collicolo superiore, midollo spinale) mediante marcatori immunoistochimici specifici, l'organizzazione tridimensionale dei loro dendriti apicali e la relazione tra gli assoni che entrano nella corteccia cerebrale e i moduli corticali, nonché il rapporto degli interneuroni inibitori con i fasci di dendriti apicali.

Collaborazioni: Giorgio Innocenti (Karolinska Institutet, Stockholm), Paola Arlotta (Harvard, Boston, MA)

2.2. Connettività dell'insula umana: studio mediante fMRI e metaanalisi della letteratura.

Mediante lo studio del resting state in risonanza magnetica funzionale studiamo la connettività funzionale dell'insula umana. Abbiamo messo in evidenza due aree distinte dell'insula: una anteriore, connessa con altre aree coinvolte in aspetti emozionali e una intermedio/posteriore connessa con altre aree coinvolte nella integrazione sensorimotoria. Abbiamo perciò condotto una meta-analisi della letteratura usando il BrainMap repository mettendo in luce la presenza di sottoreti di connettività nell'insula e la presenza di aree/fulcro (hubs). A prosecuzione di questi studi abbiamo studiato la connettività delle aree corticali che contengono i neuroni di Von Economo.

Collaborazioni: Franco Cauda e Giuliano Geminiani (Dipartimento di Psicologia, Torino); Sergio Duca (Ospedale Koelliker, Torino).

2.3. Meccanismi di morte neuronale nelle malattie neurodegenerative (infarto cerebrale, epilessia e Alzheimer)

Studiamo i meccanismi della morte neuronale nello sviluppo e nella patologia. Abbiamo studiato l'eccitossicità, l'autofagia e lo stress ossidativo indotti in diversi modelli di patologie dell'uomo. In particolare, abbiamo studiato il ruolo di una MAP-chinasi (JNK) nella morte neuronale e usando inibitori specifici abbiamo ottenuto una prevenzione sostanziale della morte neuronale in modelli di ischemia cerebrale, malattia di Alzheimer ed epilessia. Dopo aver pubblicato i nostri lavori sugli effetti del blocco di JNK sulla morte neuronale nell'ippocampo nella fase acuta della epilessia, studieremo gli effetti nella fase cronica. Studieremo nuovi farmaci che intervengono a monte della via di JNK sulla MAP chinasi chinasi MKK7, per agire con maggiore specificità sull'attivazione di JNK dovuta alla patologia, risparmiando l'attivazione che si verifica nei processi fisiologici. Stiamo inoltre studiando il ruolo del preconditionamento mediante brevi insulti ischemici e trattamento con monossido di carbonio per stimolare i meccanismi di resistenza cellulare all'ipossia. I risultati sinora ottenuti mostrano una riduzione della morte neuronale e una riduzione dell'attivazione dei meccanismi apoptotici e autofagici. Abbiamo inoltre sperimentato un nuovo trombolitico, in associazione all'inibitore del complemento C1, come alternativa al tPA, dimostrando una ridotta tendenza all'emorragia e una riduzione simile dell'area di infarto cerebrale.

Collaborazioni: Tiziana Borsello (Negri, Milano); Thomas Herdegen (Institute of Pharmacology, Kiel, DE), Victor Gurewich (Harvard, Boston, MA), Helena Viera (Oeira, Portugal), Rémy Sadoul (Institut de Neuroscience, Grenoble).

2.4. Malattie del motoneurone (SLA e SMA)

In molte patologie neurodegenerative, la malattia non è cellulo-autonoma, cioè la patogenesi coinvolge altre cellule oltre ai neuroni. Perciò, studiamo la neuro infiammazione nell'infarto, nella sclerosi laterale amiotrofica e nella atrofia muscolare spinale, e come prevenirla per ritardare la comparsa e lo sviluppo della patologia. Le cellule staminali sono un campo di ricerca correlato allo sviluppo normale, alla patologia e al cancro, emergente nell'ultima decade. Studiamo l'integrazione delle cellule staminali neurali e dei progenitori neurali trapiantati nella corteccia cerebrale o nel midollo spinale. Inoltre, usiamo cellule staminali neurali o mesenchimali per trattare malattie neurodegenerative, per somministrare sostanze trofiche e immunomodulatorie ai neuroni dell'ospite. In particolare, studieremo il ruolo delle cellule staminali mesenchimali sull'attivazione della microglia e dell'astroglia, sia in vitro che in vivo. Cercheremo

di isolare i fattori che vengono rilasciati nell'ambiente circostante, probabilmente all'interno di microvescicole, dalle cellule staminali mesenchimali, in modo da poter utilizzare le micro vescicole, e non le cellule, come farmaco.

Studieremo inoltre l'espressione di microRNA muscolo specifici nelle patologie del motoneurone, in qualità di agenti patogeni o neuro protettori per il motoneurone. Nell'ambito della SMA, un nostro progetto verrà finanziato come ricerca sanitaria finalizzata del Ministero della Sanità (capofila G. Battaglia).

Collaborazioni: L. Mazzini (Clinica Neurologica, Novara), F. Fagioli (Osp. Regina Margherita, Torino), G. Camussi (MBC, Torino), Giorgio Battaglia (Besta, Milano), Elia Di Schiavi (igb, CNR, Napoli).

2.4. Ruolo dei geni neuro-specifici Retinoblastoma (Rb) e BTG nel controllo del differenziamento e del mantenimento della staminalità

Le interazioni fra i prodotti di questi geni sono note nella regolazione della proliferazione in molti tessuti mentre essi hanno ruoli indipendenti come regolatori del differenziamento neuronale. Abbiamo recentemente messo in evidenza che lo stesso tipo di interazioni finora osservate nel controllo della proliferazione sono anche presenti, nel modello unicellulare aploide *D. Discoideum*, per il controllo della differenziazione. I nostri dati suggeriscono che essi potrebbero anche controllare il mantenimento dello stato di staminalità. Sulla base delle osservazioni svolte finora studieremo il ruolo di queste interazioni anche su modelli neuronali. Inoltre studieremo le possibili interazioni fra prodotti dei geni SMN (di cui *D. discoideum* possiede gli ortologhi) e funzioni di controllo proliferativo e differenziativo di Rb e BTG, cercando di costruire un modello che spieghi le basi molecolari della neuro-specificità degli effetti delle mutazioni dei geni SMN.

3. Prodotti delle attività di ricerca nel periodo gennaio-novembre 2011

3.1. Articoli pubblicati o in corso di pubblicazione con affiliazione al NICO

- La Vieira H, Alves PM, Vercelli A (2011). Modulation of neuronal stem cell differentiation by hypoxia and reactive oxygen species. *Prog Neurobiol* 93:444-455
- Bartolini A, Vigliani MC, Magrassi L, Vercelli A, Rossi F (2011). G-CSF administration to adult mice stimulates the proliferation of microglia but does not modify the outcome of ischemic injury. *Neurobiol Dis* 41:640-649
- Tomasi S, Sarmientos P, Giorda G, Gurewich V, A (2011). Mutant Prourokinase with Adjunctive C1-Inhibitor Is an Effective and Safer Alternative to tPA in Rat Stroke. *PLoS One* 6:07
- Piras A, Gianetto D, Conte D, Bosone A, Vercelli A (2011). Activation of Autophagy in a Rat Model of Retinal Ischemia following High Intraocular Pressure. *PLoS One* 6:07
- Buschini E, Piras A, Nuzzi R, Vercelli A (2011). Age related macular degeneration and drusen: Neuroinflammation in the retina. *Prog Neurobiol* 95:14-25
- Morello N, Bianchi FT, Marmioli P, Tonoli E, Menendez VR, Silengo L, Cavaletti G, Vercelli A, Altruda F, Tolosano E (2011). A role for hemopexin in oligodendrocyte differentiation and myelin formation. *PLoS One* 6:05
- Cauda F, D'Agata F, Sacco K, Duca S, Geminiani G, Vercelli A (2011). Functional connectivity of the insula in the resting brain. *Neuroimage* 55:8-23
- Boido M, Garbossa D, Vercelli A (2011). Early graft of neural precursors in spinal cord compression reduces glial cyst and improves function. *J Neurosurg Spine* 15:97-106
- Gamba P, Leonarduzzi G, Tamagno E, Guglielmotto M, Testa G, Sottero B, Gargiulo S, Biasi F, Mauro A, Viña J, Poli G (2011). Interaction between 24-hydroxycholesterol, oxidative stress, and amyloid- β in amplifying neuronal damage in Alzheimer's disease: three partners in crime. *Aging Cell* 10:403-17
- Tamagno E, Guglielmotto M, Monteleone D, Tabaton M. Amyloid- β Production: Major Link Between Oxidative Stress and BACE1. *Neurotox Res* 2011 Oct 15. [Epub ahead of print] PubMed PMID:22002808
- Guglielmotto M, Monteleone D, Giliberto L, Fornaro M, Borghi R, Tamagno E, Tabaton M. Amyloid- β 42

Activates the Expression of BACE1 Through the JNK Pathway. *J Alzheimers Dis* 2011 Sep 6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21897006

Mastrocola R, Guglielmotto M, Medana C, Catalano MG, Cutrupi S, Borghi R, Tamagno E, Boccuzzi G, Aragno M (2011). Dysregulation of SREBP2 induces BACE1 expression. *Neurobiol Dis* 44:116-24

Novo E, Busletta C, Bonzo LV, Povero D, Paternostro C, Mareschi K, Ferrero I, David E, Bertolani C, Caligiuri A, Cannito S, Tamagno E, Compagnone A, Colombatto S, Marra F, Fagioli F, Pinzani M, Parola M (2011). Intracellular reactive oxygen species are required for directional migration of resident and bone marrow-derived hepatic pro-fibrogenic cells. *J Hepatol* 54:964-74

Garbossa D, Boido M, Fontanella M, Fronda C, Ducati A, Vercelli A (2011). Recent therapeutic strategies for spinal cord injury treatment: possible role of stem cells. *Neurosurg Rev* (in press)

Boido M, Buschini E, Piras A, Spigolon G, Valsecchi V, Mazzini L, Vercelli A (2011). Advantages and pitfalls in experimental models of ALS, in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *InTech Ed* (in press)

Cauda F, Torta D, Sacco K, D'Agata F, Geda E, Duca S, Geminiani G, Vercelli A. Functional Anatomy of Cortical Areas Characterized by Von Economo Neurons Brain Structure and Function. *Brain Struct Funct* (under revision)

Queiroga C, Tomasi S, Vercelli A, Vieira H. Preconditioning triggered by carbon monoxide provides neuronal protection following perinatal hypoxia-ischemia. *J Neurochem* (under revision)

Zhao Y, Spigolon G, Herdegen T, Vercelli A. The role of D-JNK11 on the mitochondrial translocation of JNK isoforms following kainic acid-induced status epilepticus. *Mol Cell Neurosci* (submitted)

Manassero G, Repetto IE, Cobianchi S, Valsecchi V, Bonny C, Rossi F and Vercelli A (2011). Role of JNK isoforms in the development of neuropathic pain following sciatic nerve transection in the mouse. *Molecular Pain* (submitted)

Tomasi S, Caminiti R, Innocenti GM (2011). Areal differences in diameter and length of corticofugal projections. *Cerebral Cortex* (submitted)

Boido M, Garbossa D, Fontanella M, Ducati A, Vercelli A (2011). Mesenchymal stem cell transplantation reduces glial cyst and improves functional outcome following spinal cord compression. *World Neurosurgery* (submitted)

Sprio AE, Di Scipio F, Ceppi P, Salamone P, Di Carlo F, Scagliotti GV, Papotti M, Ceccarelli A, Berta GN (2011). Differentiation-inducing factor 1 enhances 5-fluorouracil action on oral cancer cells inhibiting E2F1 and Thymidylate Synthase mRNAs accumulation. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* (submitted)

3.2. Seminari e conferenze con affiliazione al NICO

A. Ceccarelli, Conte D, BTG, Rb e bZIP: *Un crocevia nella scelta del fato* in "Dictyostelium discoideum". G.E.I. 2011, Monteortone (PD) 5-8 giugno 2011

A. Vercelli, *Buona prassi nell'uso delle cellule staminali*, Convegno IPASVI, Verbania 4 Giugno 2011

A. Vercelli, *Development, plasticity and organisation in modules of cortical pyramidal neurons*, Losanna, Ecole Polytechnique Fédérale, 6 Luglio 2011

A. Vercelli, *Stem cells in spinal cord injury repair*, Brescia 2011

3.3. Altri prodotti riconducibili alle attività Istituzionali del NICO

3.4. Finanziamenti per la ricerca

Ricerca Finalizzata 2009 - Motor neuron death in Spinal Muscular Atrophy (SMA): new animal models and innovative therapeutic strategies. Finanziamento erogato: € 105.000