

Fondazione Cavalieri-Ottolenghi



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

Progetto scientifico delle attività di ricerca per l'anno

2011

Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO)

Progetto scientifico delle attività di ricerca per l'anno 2011

<i>gruppo di ricerca</i>	<i>Responsabile</i>	<i>pagina</i>
Clinical Neurobiology	Antonio Bertolotto	3
Adult Neurogenesis	Luca Bonfanti, Paolo Peretto	7
Neuropeptides, Emotional and Feeding Behaviour	Carola Eva	12
Plasticity and Regeneration of the PNS	Stefano Geuna	15
Steroids and Nervous System	Giancarlo Panzica	17
Developmental Neurobiology and Regeneration	Ferdinando Rossi	20
Alzheimer's disease and Ataxia	Filippo Tempia	24
Brain Development and Disease	Alessandro Vercelli	26

Torino, 14 Novembre 2010

Progetto delle attività di ricerca per il 2011 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 (1-11-2010)

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)

Paola Valentino (borsista)

Letizia Granieri (borsista specializzanda)

Nicole D. Navone (borsista specializzanda)

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

2. Progetti di ricerca (2011)

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 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. Tali geni codificano per lo più per molecole ad attività anti-infiammatoria e per questo, il razionale di un loro coinvolgimento nella patogenesi della SM è forte. La ricerca è ora focalizzata sui 7 trascritti e sul loro ruolo nel modulare la risposta anti-infiammatoria. 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.

2.2. Un nuovo approccio alla patogenesi della SM

L'aspetto patogenetico della sclerosi multipla viene attualmente indagato seguendo una linea originale ed innovativa: partendo dal dato ben noto che la gravidanza svolge un ruolo protettivo, riducendo il numero di attacchi, è stato effettuato il primo studio che analizza il profilo di espressione genica nelle cellule mononucleate del sangue, prima, durante e dopo la gravidanza, in modo da comprendere in maniera più approfondita i meccanismi immuno-biologici che sono responsabili della spontanea remissione della malattia durante la gestazione. La comparazione dei profili di espressione tra pazienti SM e volontari sani, come anche tra donne gravide e non, ha quindi portato all'identificazione di una popolazione di geni importanti nel processo di adattamento immunologico materno, possibilmente responsabile anche dell'effetto protettivo della gravidanza nella SM. In particolare, i risultati dello studio hanno evidenziato chiaramente un'alterata espressione di geni nelle pazienti SM, prima della gravidanza; mentre durante la gravidanza la disregolazione di espressione veniva annullata, riportando alla normalità i livelli di trascritto. La normalizzazione in espressione era particolarmente evidente per 7 geni, ovvero CxCR4, TNFAIP3, SOCS2, NR4A2, FAM49B, POLR2J e STAG3L1. Tali geni codificano per lo più per molecole ad attività anti-infiammatoria coinvolte in diversi *pathways*, e per questo, il rationale per un loro coinvolgimento nella patogenesi della SM è forte. Le attività di ricerca sono ora focalizzate sui 7 trascritti identificati e sul loro ruolo nel modulare la risposta anti-infiammatoria nei pazienti con SM. In particolare vengono affrontati i seguenti spunti di ricerca: 1) studio dell'espressione dei 7 geni in diverse coorti di pazienti SM, pazienti affetti da altre patologie neurologiche (Parkinson, Alzheimer, Sclerosi laterale amiotrofica) e controlli sani; 2) studio dell'associazione tra stimolazione ormonale gravidanza specifica (prolattina, estrogeni e progesterone) o ad altri fattori immuno-modulatori e modulazione nell'espressione dei geni in analisi; 3) caratterizzazione delle differenti sottopopolazioni cellulari eventualmente coinvolte nella disregolata espressione dei 7 geni target; 4) studio dei livelli di citochine circolanti specifiche per i pattern

Th1/Th2/Th17, prima, durante e dopo la gravidanza; 5) studio del ruolo svolto dai microRNA (piccole molecole di RNA che regolano l'espressione di specifici geni tramite meccanismi post-trascrizionali) nel regolare l'espressione dei 7 geni target nei pazienti con SM; 6) studio dell'influenza del fattore nucleare NR4A2 sui processi infiammatori del sistema nervoso centrale (mediante l'analisi genica e proteica di tessuti cerebrali umani e murini e mediante lo studio di incidenza e gravità di EAE MOG(35-55)-indotta in topi NR4A2-deficienti); 7) studio dell'associazione genetica tra alleli del gene TNFAIP3 e autoimmunità. Lo scopo finale è quello di identificare specifici SNP (single nucleotide polymorphisms) associati alla sclerosi multipla.

Collaborazioni: Ludwig Kappos e Raija Lindberg (University of Basel, Basel); Raffaele Calogero (MBC, Torino), Roberto Furlan (DIBIT, Milan).

2.3. Messa a punto di nuove tecniche diagnostiche

Una terza linea di ricerca è volta alla 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

Collaborazioni: /

3. Prodotti delle attività di ricerca nel periodo aprile-novembre 2010

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

Gilli F. Role of differential expression of interferon receptor isoforms on the response of multiple sclerosis patients to therapy with interferon beta. *J Interferon Cytokine Res.* 2010 Oct;30(10):733-41.

Gilli F., Navone ND, Perga S., Malucchi S., Marnetto F., Caldano M., Pulizzi A., Bertolotto A. Evidence for dysregulation of anti-inflammatory response in multiple sclerosis. (under revision)

Gilli F., Navone ND., Valentino P., Perga S., Capobianco M., Malucchi S., Bertolotto A. Clinical response to glatiramer acetate correlates with the *ex vivo* GA-induced IFN γ and IL4 mRNA response in patients with multiple sclerosis. (submitted)

3.2. **Seminari e conferenze con affiliazione al NICO**

A. Bertolotto, F. Gilli, VII International Congress on Autoimmunity, Ljubljana, 5-9 Maggio 2010

F. Gilli, S. Perga, M. Caldano, XX Congresso AINI, Stresa 30 Settembre – 3 Ottobre 2010

A. Bertolotto, F. Gilli, S. Perga, P. Valentino, L. Granieri, ECTRIMS, Gothenburg, 13-16 Ottobre 2010

A. Bertolotto, Congresso SIN, Catania, 23-27 Ottobre 2010

3.3. **Altri prodotti riconducibili alle attività Istituzionali del NICO**

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, 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.

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)

1.2. Personale non strutturato

Federico Luzzati (postdoc)

Giovanna Ponti (postdoc)

Maria Armentano (dottoranda)

Paola Crociara (dottoranda)

Livio Oboti (dottorando)

Roberta Schellino (dottoranda)

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

2. Progetti di ricerca (2011)

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.

Il 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 se la risposta neurogenica coinvolge anche popolazioni di progenitori presenti nel parenchima dello striato. 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 CREB1Camkcre4CREM^{-/-} (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 preliminari su entrambe i modelli 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); Silvia De Marchis (Torino); Annalisa Buffo.

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'explorare 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 e Ferdinando Rossi

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. Studi in corso nel nostro laboratorio dimostrano che nelle femmine adulte l'esposizione a feromoni maschili modula l'integrazione di nuovi neuroni specificamente in questa regione. Sia la funzione nell'ambito del sistema vomero-nasale, sia la peculiare organizzazione morfologica dell'AOB rendono questa regione un modello ottimale per la comprensione dei processi di specificazione e di integrazione di nuovi elementi nervosi nel SNC maturo.

In questo studio ci proponiamo di: i) studiare il processo di integrazione delle cellule neogenerate nei circuiti bulbari delle femmine adulte tramite stimolazione sensoriale specifica (feromoni maschili); ii) determinare le strutture periferiche e centrali potenzialmente coinvolte nella regolazione della neurogenesi nell'AOB; iii) testare se le cellule neogenerate rivestono una funzione specifica in questa regione; iv) 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. 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. Lo studio permetterà di verificare gli effetti della stimolazione sensoriale periferica sull'integrazione di neuroblasti in circuiti preesistenti. Per comprendere se e quali strutture periferiche e centrali sono coinvolte nella regolazione della neurogenesi, utilizzeremo diversi modelli di lesione chimica e/o genetica della mucosa olfattiva (topi trattati con ZnSO₄), dell'organo vomero-nasale (mutanti *trpc2*^{-/-}) e della amigdala mediale (acido ibotenic). Questo nucleo è reciprocamente connesso con l'AOB. Le analisi prevedono valutazione quantitativa delle cellule neogenerate, analisi di espressione di c-fos e analisi comportamentali nelle diverse condizioni sperimentali. La funzione delle cellule neogenerate sarà valutata in un contesto di assenza di neurogenesi adulta (somministrazione cronica di un anti-mitotico (ARA-C) tramite inserzione intraventricolare di mini pompe osmotiche). Dopo l'eliminazione delle cellule neo-generate valuteremo la risposta a comportamenti specifici del sistema vomero-nasale (es. Effetto Bruce). Infine, 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 il ruolo della neurogenesi adulta nell'AOB 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 (University of Saarland); Claudio Giachino (Max Planck Institute of Immunobiology, Freiburg); Silvia De Marchis (Torino); Giancarlo Panzica

3. Prodotti delle attività di ricerca nel periodo aprile-novembre 2010

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

Bonfanti L., Mackay-Sim A. (2010) Exploring neurogenesis outside the niche: atypical locations of mammalian neural stem/progenitor cells. *Arch. It. Biol.* 148, 43-45.

- Ponti G., Crociara P., Armentano M., Bonfanti L. (2010) Adult neurogenesis without germinal layers: the 'atypical' cerebellum of rabbits. *Arch. It. Biol.* 148, 147-158.
- Martino G, Pluchino S, Bonfanti L, Schwartz M. Brain regeneration in physiological and pathological conditions: the therapeutic plasticity of neural stem cells. (submitted to *Physiol. Rev.*)
- Armentano M, Canalia N, Crociara P, Bonfanti L. Culturing conditions remarkably affect viability and organization of mouse subventricular zone in ex-vivo cultured forebrain slices. (submitted to *J. Neurosci. Meth.*)
- Luzzati F, De Marchis S, Parlato R, Gribaudo S, Schütz G, Fasolo A, Peretto P. SVZ and local parenchymal progenitors contribute to induced neurogenesis in the striatum of a mouse model of progressive neurodegeneration (submitted to *Stem Cells*)
- Oboti L, Schellino R, Giachino C, Chamero P, Pyrski M, Zufall F, Leinders-Zufall T, Fasolo A, Peretto P. Newborn interneurons in the accessory olfactory bulb mediate partner recognition in female mice (submitted to *Nat. Neurosci.*)

3.2. Seminari e conferenze con affiliazione al NICO

- L. Bonfanti - Cellule staminali, rigenerazione, neurogenesi adulta: stato dell'arte e analisi critica. *Dip. di Scienze Sperimentali Veterinarie*, Università di Padova (2010)
- L. Bonfanti - Cells, tissues, organs, and organisms: evolution of reparative processes in complex biological structures. *ESOF 2010 Scientific programme*, luglio 2010, Torino (con E. Arenas, G. Zupanc, F. Rossi)
- L. Bonfanti - Il sistema nervoso e le sue potenzialità di rinnovare i costituenti cellulari. Meeting: *Età, Abilità e Apprendimento*, Torino, 2010.
- L. Bonfanti - Evolutionary, anatomical and molecular constraints to therapeutically-aimed modulation of adult neurogenesis. VI SIF Symposium: *The pharmacological modulation of adult neural stem/progenitor cells*. Novara, 2010.

3.3. Altri prodotti riconducibili alle attività Istituzionali del NICO

- L. Bonfanti, P. Peretto (con F. Rossi, A. Bertolotto, A. Vercelli). Settimana del cervello, Marzo 2010. Tavola rotonda: *Le cellule staminali, buone pratiche e cattive applicazioni*. Circolo dei lettori, Torino.

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 (o dell'Ospedale San Luigi Gonzaga)

Carola Eva (PO)

Alessandra Oberto (RU)

1.2. Personale non strutturato

Paolo Mele (postdoc)

Ilaria Bertocchi (dottoranda)

Angela Longo (dottoranda)

Partecipano alle attività del gruppo alcuni studenti tesisti delle Facoltà di Medicina e Chirurgia, Corso di Laurea in Biotecnologie Mediche

2. Progetti di ricerca (2011)

Il Neuropeptide Y (NPY), attraverso l'interazione con il recettore Y1 (Y1R), gioca un importante ruolo nelle risposte endocrino-vegetative allo stress e nei disturbi neuropsichiatrici come la depressione e l'ansia. La stimolazione di Y1R nelle regioni limbiche induce potenti effetti ansiolitici e antistress. Inoltre, NPY stimola il comportamento alimentare e potrebbe rappresentare un mediatore potenzialmente importante dell'appetito emotivo". Tuttavia nonostante i potenti effetti oressizzanti ed ansiolitici, l'ablazione germinale di Y1R non modifica l'omeostasi energetica e il comportamento ansioso nei topi mutati. Il nostro progetto di ricerca ha l'obiettivo studiare il ruolo di il neuropeptide Y (NPY) e del suo recettore Y1 (Y1R) nelle risposte endocrino-vegetative allo stress e nella vulnerabilità ai disturbi neuropsichiatrici. A questo scopo abbiamo precedentemente generato due linee di topi knockout condizionali nelle quali è possibile ottenere la delezione postnatale di Y1R selettivamente specifiche regioni dell'encefalo. Utilizzando questi modelli murini abbiamo sviluppato due filoni di ricerca. 1) Il primo filone ha l'obiettivo di studiare se il comportamento materno e il genere possono modificare le funzioni neurocomportamentali, il comportamento alimentare e la neuroplasticità mediante il sistema NPY-Y1R. 2) Il secondo filone di ricerca è diretto a studiare lo specifico ruolo del recettore Y5R, che è coespresso con Y1R nelle regioni limbiche e nell'ipotalamo, nel mediare 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.

2.1. Studio del ruolo del sistema NPY-Y1R negli effetti permanenti della cura materna sul comportamento, le funzioni ipotalamiche e i circuiti neuronali in topi con il knockout condizionali del recettore NPY-Y1R.

Un gran numero di studi ha dimostrato che influenze precoci dell'ambiente, come variazioni nella cura materna ricevuta, possono avere conseguenze di lunga durata sul comportamento, la risposta allo stress, la fisiologia e l'espressione genica della prole, attraverso meccanismi epigenetici. Figli adulti di mamme "high-LG-ABN", che leccano ("licking") e curano di più ("grooming") (LG) e che allattano a schiena inarcata (arched-back nursing, ABN) i cuccioli durante la prima settimana dopo il parto, mostrano ridotti livelli plasmatici di ACTH e di corticosterone in risposta a stress acuto, se paragonati a figli adulti di mamme "low-LG-ABN". Questi effetti sono in parte mediati da un aumento dei recettori ippocampali per i glucocorticoidi, da un'aumentata sensibilità al feedback negativo dei glucocorticoidi e da ridotti livelli di mRNA del CRH

nell'ipotalamo. Considerando il ruolo consolidato di NPY nel comportamento emozionale, la risposta allo stress e le funzioni ipotalamiche, è possibile speculare che la trasmissione NPY-Y1R possa rappresentare uno dei sistemi target alterati da influenze ambientali precoci. In questo contesto è interessante osservare che una cura materna povera o l'esposizione allo stress nelle prime fasi della vita riduce la neurogenesi adulta e l'espressione del brain-derived neurotrophic factor (BDNF) nell'ippocampo. Il BDNF induce l'espressione ippocampale di NPY che, a sua volta, stimola la neurogenesi adulta nel giro dentato. Lo scopo di questo studio è di scoprire il grado di coinvolgimento di NPY e del suo recettore Y1R nella modulazione della variazione interindividuale del comportamento emozionale e della resistenza allo stress, con particolare attenzione ad identificare la funzione del sistema NPY-Y1R negli effetti permanenti della cura materna sulle funzioni comportamentali ed ipotalamiche. Vogliamo anche identificare i circuiti di segnalazione neuronale, differenti e sovrapposti, che interagiscono con NPY nella regolazione di queste funzioni, incluso il CRF.

Utilizzeremo una linea di topi knockout condizionali (topi $Y1R^{fb/-}$) per ottenere l'ablazione di Y1R intorno alla pubertà nei neuroni eccitatori delle regioni limbiche. Risultati preliminari indicano che, a partire da P38, i topi $Y1R^{fb/-}$ mostrano una riduzione del peso corporeo ed un comportamento ansioso dimostrando, per la prima volta, che la trasmissione NPY-Y1R nelle regioni limbiche è essenziale sia per l'omeostasi energetica sia per il comportamento emozionale. In questi topi determineremo se l'ablazione del recettore NPY-Y1R nel topo può modulare la suscettibilità agli effetti comportamentali a lungo termine di una differente cura materna, che induce cambiamenti di lunga durata del comportamento, della fisiologia e dell'espressione genica della prole attraverso meccanismi epigenetici, con particolare riguardo al comportamento emozionale ed alimentare e al metabolismo. Studieremo inoltre se variazioni nella cura materna ricevuta possano anche modificare la funzione di altri segnali coinvolti nella regolazione dell'ansia e del comportamento alimentare, per rivelare se Y1R e CRH modulano queste funzioni attraverso vie comuni o differenti. In questa fase ci focalizzeremo inoltre sull'espressione del BDNF e sulla neurogenesi adulta nel giro dentato. Infine, nell'ultima fase della ricerca verificheremo se il genere può modificare le funzioni neurocomportamentali e la neuroplasticità attraverso il sistema NPY-Y1R.

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

2.2. Studio dell'interazione e del ruolo specifico dei recettori Y1R e Y5R negli effetti comportamentali di NPY

Il gene di Y1R è clusterizzato insieme al gene di Y5R sul cromosoma 8B2-C2 nel topo e sul cromosoma 4q31 nell'uomo; i due recettori sono trascritti in direzioni opposte grazie a un promotore comune. Studi di ibridazione in situ hanno dimostrato che Y1R è ampiamente espresso in molte regioni del prosencefalo, come la corteccia cerebrale, l'ippocampo, l'amigdala, il talamo e l'ipotalamo. L'espressione di Y5R è invece più ristretta, in particolare ad alcuni nuclei ipotalamici, il giro dentato e l'area CA3 dell'ippocampo, la corteccia cingolata e l'amigdala. È stato inoltre dimostrato che tutte le regioni che contengono neuroni positivi per Y5R esprimono anche Y1R, mentre molti neuroni positivi per Y1R non esprimono Y5R. Queste osservazioni hanno suggerito che anche Y5R, oltre Y1R, possa avere un ruolo negli effetti di NPY sul comportamento emozionale e alimentare. Tuttavia gli studi farmacologici hanno dato risultati contrastanti sul ruolo specifico di Y5R nelle regioni limbiche e nell'ipotalamo. Abbiamo recentemente generato una linea di topi ($Y1R^{Y5R/-}$) nei quali è possibile ottenere, grazie al controllo doxiciclina-dipendente della ricombinasi CRE, l'ablazione postnatale (intorno a P40) di Y1R selettivamente nei neuroni che co-esprimono Y5R dei nuclei encefalici coinvolti nella regolazione dell'eccitabilità neuronale (ippocampo), del comportamento emozionale (amigdala) e di quello alimentare (nuclei paraventricolare, soprachiasmatico, dorso mediale e arcuato). Lo scopo di questo studio è di determinare se il recettore Y1R è indispensabile per mediare gli effetti comportamentali e funzionali di NPY nel sistema limbico e nell'ipotalamo o se la sua delezione può essere compensata dal recettore Y5R coespresso negli stessi neuroni. In particolare, determineremo se l'ablazione del recettore NPY-Y1R nei neuroni che co-esprimono Y5R modifichi il fenotipo comportamentale e funzionale dei topi maschi $Y1R^{Y5R/-}$. In particolare, attraverso l'impiego di test comportamentali, analizzeremo il comportamento ansioso e le funzioni cognitive. Determineremo inoltre la curva di peso corporeo, l'assunzione di cibo e la rialimentazione dopo un periodo di digiuno di 30 ore, i livelli plasmatici di ormoni (leptina e insulina) e metaboliti (glicemia, colesterolo e trigliceridi) e misureremo il peso dei diversi

organi e del tessuto bianco adiposo (WAT). Infine effettueremo l'analisi istochimica dell'immunoreattività a NPY, alfa MSH e CRH nell'ipotalamo e nelle regioni limbiche.

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

3. Prodotti delle attività di ricerca nel periodo aprile-novembre 2010

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

Varesio L, Emionite, L, Puppo M, Astigiano S, Lavieri R, Resaz R, Pezzolo A, Bosco MC, Oberto A, Eva C, Chou JY, Barbieri O, Eva A. (2010) Treatment of newborn G6pc^{-/-} mice with bone marrow-derived myelomonocytes induces liver repair. *Journal of Hepatology* (in revision).

Bertocchi I, Oberto A, Longo A, Mele P, Sabetta M, Bartolomucci A, Palanza P, Sprengel R and Eva C. (2010) A regulatory role of limbic neuropeptide Y Y1 receptor on body weight and anxiety: modulation by maternal care in a conditional knockout mouse. (submitted)

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 (1-11-2010)

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

Stefano Geuna (PA)
Michele Fornaro (RU)

1.2. Personale non strutturato

Stefania Raimondo (postdoc)
Giulia Ronchi (dottoranda)
Luisa Muratori (borsista)
Loradana Grasso (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 (2011)

Il lavoro di ricerca si sviluppa lungo quattro filoni principali. Il primo è dedicato allo studio di strategie innovative di ingegneria tissutale volte alla ricostruzione e rigenerazione dei nervi periferici in seguito a lesione traumatica.

Il secondo filone è volto allo studio delle modificazioni che si realizzano a livello dei gangli delle radici dorsali in seguito a lesione assonale, con particolare attenzione alla neurogenesi ed al significato che questa può avere nell'insorgenza delle sindromi da dolore neuropatico.

La terza linea di ricerca è volta allo studio del sistema nervoso centrale, in particolare il midollo spinale, al fine di valutare le potenzialità di approcci terapeutici innovativi per promuovere il recupero funzionale in seguito a lesioni contusive.

La quarta linea di ricerca, infine, è di ordine prettamente metodologico ed è volta allo studio ed alla validazione di metodiche stereologiche per la valutazione morfo-quantitativa del sistema nervoso.

2.1. Ingegneria tissutale dei nervi periferici

Il principale filone di ricerca del gruppo per il 2011, in linea con quanto avvenuto negli anni passati, sarà rivolto allo studio della ingegneria tissutale per la riparazione e rigenerazione dei nervi periferici. In particolare si stanno studiando tre differenti tipi di approccio: il trapianto tissutale e cellulare (in particolare le cellule staminali mesenchimali); l'utilizzazione di scaffolds biomimetici; ed infine la terapia genica mediante vettori virali adeno-associati (per far esprimere a livello della sede di lesione neurale fattori gliotrofici e neurotrofici). Per il 2011, in particolare, si prevede di completare e sottomettere per la pubblicazione i risultati di tre progetti di ricerca sull'ingegneria tissutale dei nervi che sono già ad uno stadio avanzato di realizzazione: i) studio degli scaffolds di poli-copro-lactone; ii) studio del trapianto di cellule staminali derivate dal cordone ombelicale; iii) studio degli innesti nervosi basati sull'impiego di tessuto adiposo.

Collaborazioni: Bruno Battiston, Pierluigi Tos (CTO, Torino), Isabelle Perroteau (DBAU, Torino), Gianluca Ciardelli (Politecnico di Torino); Mauro Giacca (ICGEB, Trieste), Claudia Grotte (ZSN, Hannover University), Ana Colette Mauricio (ICBAS, Porto University)

2.2. Plasticità dei neuroni sensitivi dei gangli delle radici dorsali

Questo progetto è volto in particolare ad analizzare le modificazioni morfometriche (mediante metodi stereologici) che si realizzano a carico di numero e dimensioni dei neuroni dei gangli delle radici dorsali in

seguito a lesione assonale. I risultati delle ricerche condotte fino ad ora hanno dimostrato la presenza non solo di variazioni a carico delle dimensioni del soma ma anche di un significativo aumento nel numero di neuroni nei tre mesi successivi alla lesione e sono stati recentemente sottomessi per la pubblicazione. Per il 2011 s'intende proseguire lo studio con particolare attenzione all'indagine delle alterazioni che si realizzano a distanza di molti mesi dall'assotomia al fine di definire se la neurogenesi che si è osservata sia solo un fenomeno transitorio o se invece si determini una alterazione del numero dei neuroni sensitivi che si mantiene nel tempo e che potrebbe essere alla base del dolore neuropatico che si osserva in seguito a schiacciamento dei nervi periferici.

Collaborazioni: Kristofz Czaja (Washington State University, Pulman, USA)

2.3. Rigenerazione e recupero funzionale in seguito a lesioni del midollo spinale

Sebbene il gruppo di ricerca si occupi principalmente di sistema nervoso periferico, da alcuni anni il gruppo collabora anche a progetti internazionali volti allo studio di approcci terapeutici innovativi per promuovere il recupero funzionale in seguito a lesioni contusive del midollo spinale basati sull'impiego combinato di farmaci, trapianto di cellule staminali, utilizzazione di scaffolds biomimetici e terapia fisica. Tali studi continueranno anche nel 2011, anno nel quale, in particolare, si prevede di poter giungere al completamento ed alla pubblicazione dei risultati dello studio pre-clinico sull'azione terapeutica degli inibitori delle fosfodiesterasi ad alte dosi nelle 24 immediatamente successive alla lesione.

Collaborazioni: Artur S. Varejao (UTAD, Vila Real University, Portugal), Guido Koopmans (Spinal Cord Therapeutics, Dusseldorf, Germany)

2.4. Indagine stereologica in neuroscienze

Quest'ultimo filone di ricerca, di ordine prettamente metodologico, ha visto quest'anno la pubblicazione di uno studio multicentrico di validazione delle metodiche stereologiche per lo studio delle fibre nervose mieliniche e si svilupperà nel 2011 estendendo il campo di interesse anche ad altri distretti, in particolare il midollo spinale, i muscoli scheletrici ed il cervelletto.

Collaborazioni: Christopher Von Bartheld (University of Nevada, Reno, USA), Suleyman Kaplan (Samsun University, Turkey)

3. Prodotti delle attività di ricerca nel periodo ottobre 2009-novembre 2010

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

Chintawar S, Hourez R, Ravella A, Gall D, Orduz D, Rai M, Bishop DP, Geuna S, Schiffmann SN, Pandolfo M (2009). Grafting neural precursor cells promotes functional recovery in an SCA1 mouse model. *J Neurosci* 29:13126-35.

Kaplan S, Geuna S, Ronchi G, Ulkay MB, von Bartheld CS (2010). Calibration of the stereological estimation of the number of myelinated axons in the rat sciatic nerve: a multicenter study. *J Neurosci Methods* 187:90-9.

Raimondo S, Fornaro M, Tos P, Battiston B, Geuna S (2010) Repair and regeneration after peripheral nerve injury. *Ann Anat* (in revision)

Fornaro M, Ronchi G, Muratori L, Raimondo S, Geuna S, Robecchi-Giacobini MG (2010). Generation of new neurons in dorsal root ganglia in adult rats after peripheral nerve crush injury. *J Comp Neurol* (submitted)

Lanza C, Raimondo S, Vergani L, Catena N, Sénès F, Tos P, Geuna S (2010). Expression of antioxidant molecules after peripheral nerve injury and regeneration. *J Neurosci Methods* (submitted).

3.2. Seminari e conferenze con affiliazione al NICO

M. Fornaro, Conference "The Farmacological modulation of adult neural stem/progenitor cells" Novara, 2 Ottobre 2010.

S. Geuna, International Neuroscience Institute, Hannover, 21 Ottobre 2010.

Progetto delle attività di ricerca per il 2011 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 (1-11-2010)

1.1. Personale strutturato dell'Università di Torino

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

1.2. Personale non strutturato

Elisabetta Bo	(dottoranda)
Egidio Caricati	(dottorando)
Desirèe Miceli	(dottoranda)
Alice Farinetti	(dottoranda)
Alicia Rodriguez	(dottoranda)
Benedetta Foglio	(dottoranda)

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

2. Progetti di ricerca (2011)

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

Ratti Wistar e topi CD1 di entrambi i sessi saranno esposti a stress imprevedibile per 3 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 immunocitochimica la distribuzione delle cellule e delle fibre contenenti vasopressina, 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.

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 si studieranno gli effetti della somministrazione acuta degli steroidi sessuali sul numero di cellule che si dividono. Inoltre 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.

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 tributina (TBT), inquinante delle acque perché rilasciato dalle vernici protettive delle imbarcazioni, che si accumula, nella scala alimentare, soprattutto nelle carni dei pesci. 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 nel periodo aprile-novembre 2010

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

Martini M., Miceli D., Viglietti-Panzica C., Fissore E., Palanza P., Panzica G.C. (2010) Effects of perinatal administration of bisphenol A on the neural nitric oxide synthase expressing system in the hypothalamus and limbic system of CD1 mice. *J. Neuroendocrinol*, 22, 1004-1012.

Grassi D., Amorim M.A., Garcia-Segura L.M., Panzica G.C. (2010) Estrogen receptor alpha is involved in the estrogenic regulation of arginine vasopressin immunoreactivity in the supraoptic and paraventricular nuclei of ovariectomized rats. *Neurosci Lett* 474: 135-139.

Gotti S., Martini M., Viglietti-Panzica, Miceli D., Panzica G.C. Effects of estrous cycle and xenoestrogens exposition on mice nitric oxide producing system. *It. J. Anat. Embryol.*, 115: 103-108.

Panzica G.C., Bo E., Martini M., Miceli D. Mura E., Gotti S. Neuropeptides and enzymes are targets for the action of endocrine disrupting chemicals in the vertebrate brain. *J. Tox. Envir. Health Crit. Rev.*, *in press*

Allieri F., Spigolon G., Viglietti-Panzica C., Melcangi R.C., Collado P., Guillamon A., Panzica G.C. Congenital androgen-receptor deficiency alters the limbic vasopressin system in Tfm rats. *Submitted*

3.2. *Seminari e conferenze con affiliazione al NICO*

G.C. Panzica - Intern. Symp. Disturbances of Cerebral Function Induced by Food and Water Contaminants.
Valencia (Spain)

G.C. Panzica - FENS forum, Amsterdam (Holland)

D. Miceli - 7th Intern. Congr. Neuroendocrinology, Rouen (France)

A. Farinetti - 7th Intern. Congr. Neuroendocrinology, Rouen (France)

G.C. Panzica - Symposium Neuroend. Effects of Endocrine Disruptors, Rouen (France)

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 (1-11-2010)

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

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)
Ermira Pajai (dottoranda)
Chiara Rolando (dottoranda)

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

2. Progetti di ricerca (2011)

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 e rigenerazione assonale nel sistema nervoso. 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 al sistema nervoso centrale, come un trauma o un'ischemia, causa la morte dei neuroni o l'interruzione delle connessioni nervose, determinando quindi deficit sensoriali, motori o cognitivi. Anche se le capacità dei neuroni centrali di rigenerare il proprio assone sono scarse, il sistema nervoso può in parte recuperare le funzioni compromesse da un danno grazie all'abilità dei neuroni di rimodellare le proprie 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, come GAP-43 (growth-associated protein-43), e la produzione nell'ambiente extracellulare di molecole che inibiscono la crescita neuritica. In particolare, si

assiste ad un progressivo accumulo di elementi della matrice extracellulare attorno alle sinapsi che contattano il corpo cellulare ed i dendriti dei neuroni, a formare le cosiddette reti perineuronali.

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

Un fattore in grado di aumentare le capacità plastiche dei neuroni adulti è l'esposizione ad un ambiente ricco di stimoli. Non è ancora chiaro, tuttavia, come gli stimoli esterni influenzino i meccanismi cellulari/molecolari che regolano la crescita neuritica, né esistono evidenze dirette che la stimolazione esterna promuova la plasticità strutturale attraverso la modulazione dell'attività di meccanismi regolatori. Per chiarire questi aspetti, studieremo gli effetti dell'arricchimento ambientale sul rimodellamento sinaptico e sulla modulazione delle reti perineuronali nel cervelletto di topo adulto, ed in particolare nei nuclei profondi del cervelletto, che sono il "target" delle cellule di Purkinje. Gli stessi esperimenti verranno condotti su una linea di topi transgenici che presenta un incremento delle capacità plastiche delle cellule di Purkinje grazie alla sovraespressione di GAP-43.

In parallelo, nei topi transgenici appena descritti esamineremo i meccanismi cellulari attraverso cui GAP-43 potenzia la plasticità delle cellule di Purkinje, con particolare attenzione ai cambiamenti di distribuzione ed espressione di determinanti intrinseci neuronali, quali i fattori del citoscheletro.

Un altro obiettivo della nostra ricerca sarà quello di chiarire i meccanismi attività-dipendenti che regolano la plasticità compensatoria dopo un danno. A tal fine esamineremo i processi di denervazione e re-innervazione e l'espressione delle molecole della matrice in due modelli sperimentali: i) nei nuclei profondi cerebellari parzialmente deafferentati in seguito alla rimozione selettiva delle cellule di Purkinje; ii) nei nuclei vestibolari dopo denervazione unilaterale e durante il processo di compensazione vestibolare.

Per capire, infine, il ruolo delle reti perineuronali nel controllo della plasticità fisiologica o compensatoria studieremo una linea di topi mutanti che presenta reti perineuronali difettose, cui si accompagnano modificazioni plastiche tipiche del periodo critico.

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

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

Principale obiettivo di questa linea di ricerca è lo studio dei meccanismi che regolano la specificazione e il differenziamento dei diversi fenotipi neuronali e gliali del cervelletto murino. Tale modello sperimentale è costituito da un numero limitato di elementi cellulari, che si sviluppano lungo una precisa sequenza spazio-temporale e si organizzano secondo un'architettura ben definita. Attraverso metodiche complementari (trapianti eterotopici/eterocronici di progenitori cerebellari, studi di birthdating e di lignaggio, elettroporazioni *in utero* e *in vivo*, colture cerebellari organotipiche e dissociate, etc) ci si propone di analizzare, da un lato, i fattori intrinseci caratterizzanti le diverse popolazioni di progenitori e, dall'altro, i segnali ambientali in grado di influenzare lo sviluppo embrionale e postnatale dei fenotipi cerebellari. Un'attenzione particolare è rivolta ai meccanismi di formazione degli interneuroni GABAergici che, a partire da un insieme di precursori multipotenti, vengono specificati nella sostanza bianca del cervelletto postnatale da una serie di segnali ambientali istruttivi non ancora identificati. Comprendere la natura di tali segnali in grado di stabilire i fenotipi e il numero di interneuroni prodotti alle diverse età rappresenta l'obiettivo specifico di tale filone di esperimenti. Parallelamente, ci si propone di indagare i processi che regolano la formazione dei fenotipi cerebellari derivanti dalla zona ventricolare (VZ) embrionale: interneuroni inibitori, cellule di Purkinje, neuroni GABAergici dei nuclei profondi e astrociti. Attraverso l'analisi dei fattori di trascrizione e dei geni proneurali espressi a tempi diversi in domini spazialmente segregati della VZ si intendono chiarire le relazioni di lignaggio esistenti tra i vari fenotipi e i ruoli svolti, nella specificazione degli stessi, da ciascun candidato genetico considerato.

Un'altra parte fondamentale di questa linea di ricerca utilizza le conoscenze sui meccanismi ontogenetici di sviluppo del cervelletto per pianificare e sperimentare terapie di sostituzione cellulare in modelli murini di atassia spino cerebellare di tipo 2 (SCA2). Questi esperimenti si basano sullo studio del potenziale di sviluppo di popolazioni cellulari selezionate (cellule di Purkinje in particolare) una volta esposte a segnali ambientali inusuali attraverso il trapianto in cervelletti riceventi adulti o in via di sviluppo. Mediante

L'analisi dei meccanismi di integrazione e specificazione dei progenitori trapiantati è possibile identificare il contributo relativo delle proprietà cellulari intrinseche e dei segnali ambientali estrinseci in grado di regolare l'efficacia e l'esito di questi trapianti. Tali conoscenze rappresentano il prerequisito necessario per la messa a punto di strategie preventive di sostituzione cellulare in modelli SCA2, caratterizzati da una degenerazione selettiva delle cellule di Purkinje. Attraverso il trapianto di cellule di Purkinje embrionali nel cervelletto di topi mutanti SCA2 durante l'età embrionale o subito dopo la nascita ci si propone di valutare se l'inserimento di neuroni sani prima dell'inizio dei processi degenerativi possa avere un effetto benefico sull'esordio e sulla progressione della malattia, migliorando le prestazioni motorie dei topi mutanti.

Collaborazioni: Giacomo Consalez (Dibit, Milano); Alain Chedotal (Institut de la Vision, Paris); Lorenzo Magrassi (Università di Pavia)

2.3. Reazione del tessuto nervoso al danno

Quando il sistema nervoso adulto è danneggiato, mentre i neuroni e gli oligodendrociti vanno incontro a degenerazione, i precursori degli oligodendrociti (PO), gli astrociti e i progenitori germinativi reagiscono con tentativi di limitazione e riparazione della lesione che rimangono però incompleti sotto il profilo anatomico e funzionale. Noi vogliamo comprendere i meccanismi molecolari e cellulari di tale reazione per modificarli in modo da potenziare le capacità auto-riparative del tessuto nervoso.

I PO durante lo sviluppo embrionale producono nuovi oligodendrociti mielinizzanti ma nel tessuto nervoso adulto questa capacità è molto ridotta e la mielina perduta non è ripristinata, con gravi danni per la funzionalità neuronale. I nostri studi hanno individuato nel recettore di membrana GPR17 una molecola espressa dai PO in fasi post-acute dopo lesione, durante il rimodellamento tissutale. La manipolazione dell'attività del recettore potrebbe potenziare le limitate capacità dei PO di differenziarsi e produrre nuova mielina. Per chiarire quest'aspetto, nell'anno a venire studieremo in vitro e in vivo l'effetto di agonisti e antagonisti selettivi di GPR17 su differenziamento, proliferazione e sopravvivenza dei PO. Gli esperimenti saranno condotti dapprima su colture organotipiche di fettine cerebellari e corticali in condizioni native e demielinizzanti. L'analisi verrà condotta con metodiche di Real Time PCR quantitativa per identificare modificazioni dell'espressione genica e con tecniche morfometriche, per seguire il destino dei tipi cellulari di nostro interesse. I composti capaci di promuovere il differenziamento dei PO saranno poi testati in vivo su topi adulti con lesioni focali demielinizzanti (ottenute con la tossina lisolecitina) in modo da valutarne la capacità di accelerare e potenziare la ricostituzione della mielina.

Gli astrociti reagendo alle lesioni subiscono fenomeni di dedifferenziamento e riacquistano tratti fenotipici e proprietà tipiche dei progenitori. Nel tentativo di limitare l'espansione del danno, essi producono, però, anche molecole che bloccano la rigenerazione assonale, la migrazione e l'integrazione di elementi neogenerati. Dati preliminari ottenuti in vitro indicano che i nucleotidi extracellulari, segnali precoci di danno cellulare, sono tra i primi attivatori del dedifferenziamento degli astrociti. Nel corso del prossimo anno esamineremo questo fenomeno in vivo, valutando come la manipolazione farmacologica di questi segnali modifichi la risposta astrogliale in situ dopo lesione traumatica corticale e condizioni la sopravvivenza neuronale e il rimodellamento assonale. Esamineremo anche il ruolo che componenti della matrice extracellulare (condroitinsolfato proteoglicani ed eparansolfatoproteoglicani) hanno nella regolazione dell'astrogliosi e, in particolare, nell'acquisizione o nel mantenimento dei tratti di progenitore. In questo caso, la matrice extracellulare verrà digerita in vivo da specifici trattamenti enzimatici prima o dopo la lesione traumatica, ed il potenziale di progenitore degli astrociti verrà valutato ex vivo con specifici *assay*. Sulla base dei risultati ottenuti, disegneremo esperimenti in vivo per valutare l'effetto di questi trattamenti sulla riparazione tissutale (come sopra).

In un terzo gruppo di esperimenti 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 risultare utile per il ripopolamento di aree colpite da neurodegenerazione. Abbiamo scoperto che la proteina NOGOA e il suo recettore NgR (già noti inibitori della rigenerazione assonale) sono coinvolti in questi fenomeni. NOGOA promuove la migrazione dei neuroblasti e interagisce con il recettore NgR presente sugli astrociti germinativi (AG). Il trattamento con antagonisti per NgR provoca modificazioni negli AG e induce proliferazione nei neuroblasti. Nel corso del prossimo anno studieremo i cambiamenti fenotipici e funzionali indotti nell'AG dalla manipolazione di

NgR e cercheremo di identificare i segnali molecolari che influenzano la proliferazione dei neuroblasti. Per l'analisi dei cambiamenti astrogliali stimoleremo e inibiremo farmacologicamente NgR in vitro e in vivo, analizzeremo in microscopia ottica ed elettronica (con il Prof. Luca Bonfanti) la morfologia e il fenotipo delle cellule e ne studieremo con tecniche di ibridazione in situ e Real Time PCR l'espressione di mitogeni e fattori trofici (Shh, EGF, bFGF), potenzialmente responsabili della promozione della proliferazione dei neuroblasti.

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

3. Prodotti delle attività di ricerca nel periodo aprile-novembre 2010

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

- Boda E, Buffo A (2010) Glial cells in non-germinal territories: insights into their stem/progenitor properties in the intact and injured nervous tissue. *Arch Ital Biol* 148:119-136.
- Carletti B, Piemonte F, Rossi F (2010) Neuroprotection: the emerging concept of restorative neural stem cell biology for the treatment of neurodegenerative diseases. *Curr Neuropharmacol* (in press).
- Ceruti S, Viganò F, Boda E, Ferrario S, Magni G, Rosa P, Buffo A, Abbracchio MP (2010) Expression of the new P2Y-like receptor GPR17 during oligodendrocyte precursor cell maturation regulates sensitivity to ATP-induced death. *Glia* (in press)
- Bartolini A, Vigliani M-C, Magrassi L, Vercelli A, Rossi F (2010) G-CSF administration to adult mice stimulates the proliferation of microglia, but does not modify the outcome of ischemic injury. *Neurobiol Dis* (in revision)
- Foscarin S, Ponchione D, Pajaj E, Leto K, Gawlak M, Wilczynski GM, Rossi F, Carulli D (2010) Experience-dependent plasticity and modulation of growth regulatory molecules at central synapses. *J Neurosci* (submitted)
- Boda E, Viganò F, Rosa P, Labat-gest V, Goetz M., Dimou L, Abbracchio MP, Buffo A (2010) The GPR17 receptor is a marker for heterogeneity of polydendrocytes and participates in acute trauma anche chronic damage. *Glia* (submitted)

3.2. Seminari e conferenze con affiliazione al NICO

- A. Buffo, XLVI Congress of the Italian Association of Neuropathology (AINP) and XXXVI Congress of Italian Association of Aging Research (AIRIC), Squillace, Catanzaro, 25 Maggio 2010
- F. Rossi, Meeting UNISTEM, Università di Milano, Milano, 9 Giugno 2010
- F. Rossi, Workshop AXREGEN, NICO, Orbassano, 28 Giugno 2010
- F. Rossi, Cells, tissues, organs, and organisms: evolution of reparative processes in complex biological structures. *ESOF 2010* Scientific programme, Torino, 6 Luglio 2010
- F. Rossi, Select Biosciences Cell Therapy Summit, Edinburgh, 25 Agosto 2010
- F. Rossi, Meeting of the School on Regenerative Medicine, Karolinska Institute, Stoccolma, 5 Settembre 2010

3.3. Altri prodotti riconducibili alle attività Istituzionali del NICO

- F. Rossi (con L. Bonfanti, P. Peretto, A. Bertolotto, A. Vercelli). Settimana del cervello, Marzo 2010. Tavola rotonda: *Le cellule staminali, buone pratiche e cattive applicazioni*. Circolo dei lettori, Torino.

Progetto delle attività di ricerca per il 2011 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 (1-11-2010)

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 (2011)

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). Attualmente 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 presenta un'amiloidosi precoce e massiva, mentre il secondo, oltre all'amiloidosi cerebrale, presenta anche grovigli neurofibrillari. Inoltre, per evidenziare che gli effetti acuti della beta-amioide, intendiamo utilizzare dei modelli in vitro, che consistono nell'applicazione, su fettine di tessuto nervoso, di differenti forme di aggregati di peptide beta-amiloide, da monomeri a oligomeri, protofibrille e fibrille.

Le linee di ricerca perseguono due obiettivi. Il primo è l'identificazione, in modelli in vitro e in vivo di morbo di Alzheimer, delle alterazioni di eccitabilità di membrana dei neuroni soggetti a degenerazione nei pazienti. Intendiamo registrare, con la tecnica del patch-clamp in fettina, i potenziali d'azione spontanei ed evocati di singoli neuroni corticali. I meccanismi ionici verranno successivamente indagati registrando le correnti ioniche candidate.

Nei pazienti con AD, l'attività cognitiva e motoria ha un effetto protettivo sulle funzioni cognitive. I nostri esperimenti sono focalizzati sull'attività neuronale, di cui studieremo gli effetti sugli aggregati di beta-amiloide nei compartimenti intra- ed extra-cellulare. L'attività neuronale verrà incrementata mediante arricchimento ambientale e verrà ridotta con infusione cronica di un bloccante dei potenziali d'azione.

Una futura linea di ricerca sul morbo di Alzheimer riguarderà infine i meccanismi di trasmissione della patologia dal tessuto nervoso affetto a tessuto sano trapiantato in corteccia cerebrale di topi modello della malattia.

Collaborazioni: Frank M. LaFerla, Dr. Salvatore Oddo (Univ. of California, Irvine); Antonio Migheli e Daniele Imperiale (A.S.L. Torino 2); Ferdinando Di Cunto (MBC, Torin); Enzo Wanke, (Università di Milano-Bicocca).

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, a cui abbiamo partecipato 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.

Il nostro laboratorio sta iniziando lo studio di un nuovo modello animale di SCA28, recentemente prodotto dal Dott. A. Brusco. Su questo modello studieremo le alterazioni strutturali e funzionali, comprendenti i potenziali d'azione e la trasmissione sinaptica nei circuiti cerebellari, al fine di definire i meccanismi alla base della sintomatologia atassica.

Oltre alle ricerche sulla SCA28, il nostro laboratorio studia un nuovo modello di atassia, causata dalla delezione del gene Ebf2, che codifica per un fattore di trascrizione. Topi knock-out per Ebf2 presentano una morfologia cerebellare alterata e andatura atassica (Crocì et al., 2006, Development 133, 2719-2729). Il nostro laboratorio sta conducendo uno studio su questi topi, consistente in registrazioni dei potenziali d'azione e della trasmissione sinaptica delle cellule di Purkinje della corteccia cerebellare, col fine di scoprire le basi fisiologiche dei sintomi cerebellari.

Collaborazioni: Alfredo Brusco (Università di Torino); Giacomo Consalez (HSR, Milano).

3. Prodotti delle attività di ricerca nel periodo aprile-novembre 2010

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

Boda E, Pini A, Hoxha E, Montarolo F, Tempia F. Brain expression of Kv3 genes in development, adulthood, aging and in a murine model of Alzheimer's disease. (submitted).

Bianchi FT, Camera P, Ala U, Imperiale D, Migheli A, Boda E, Tempia F, Dotti C, Di Cunto F. The collagen folder Hsp47 is coexpressed with APP-770 and modulates the levels of A-beta peptides (under revision).

Hoxha E, Boda E, Montarolo F, Parolisi R, Tempia F. GABAergic and glutamatergic synaptic function onto cerebellar Purkinje cells in APPPS1 mice (submitted).

Boda E, Hoxha E, Montarolo F, Tempia F. Expression pattern of the potassium channel beta subunit MiRP2 in the developing, adult and aging mouse brain. (in preparation).

Boda E., Viganò F., Rosa P., Labat-gest V., Tempia F., Goetz M., Abbracchio M.P., Dimou L., Buffo A The GPR17 receptor is a marker for heterogeneity of polydendrocytes and participates in acute trauma and chronic damage (in preparation).

Montarolo F, Hoxha E, Parolisi R, Tempia F. Effects of neuronal activity on the intra- and extra-cellular accumulation of beta amyloid in APPPS1 mice. (in preparation).

Progetto delle attività di ricerca per il 2011 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 (1-11-2010)

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

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

1.2. Personale non strutturato

Valeria Valsecchi (postdoc)
Michela Guglielmotto (postdoc)
Marina Boido (dottoranda, post-doc dall'1/1/11)
Daniele Conte (dottorando)
Simone Tomasi (dottorando)
Antonio Piras (dottorando)
Giada Spigolon (dottoranda, all'estero nel 2011)
Giusi Manassero (dottoranda, scadenza 31/12/10)
Valentina Grande (dottoranda) attualmente al Mario Negri di Milano (collaborazione)

1.3. Ospiti stranieri

Hossein Salehi e Ali Niapour (Iran, dicembre 2010-maggio 2011)

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

2. Progetti di ricerca (2011)

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 neuro genesi 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. 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), Victor Gurewich (Harvard, Boston, MA), Helena Viera (Oeira, Portugal), Rémy Sadoul (Institut de Neurosciences, Grenoble).

2.3. 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.

Collaborazioni: Laura Mazzini (Clinica Neurologica, Novara), Franca Fagioli (Torino), Giovanni Camussi (MBC, Torino), Giorgio Battaglia (Besta, Milano).

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 orologi) 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 aprile-novembre 2010

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

- Bartolini A, Vigliani M-C, Magrassi L, Vercelli A, Rossi F (2010) G-CSF administration to adult mice stimulates the proliferation of microglia, but does not modify the outcome of ischemic injury. *Neurobiol Dis* (in revision)
- Boido M., Garbossa D., Vercelli A. (2010) Early graft of neural precursors in spinal cord compression reduces glial cyst and improves function. *Journal of Neurosurgery: Spine* (in press)
- Cauda F., D'Agata F., Sacco K., Duca S., Geminiani G., Vercelli A. (2010) Functional connectivity of the insula in the resting brain. *Human Brain Mapping* (in revision)
- Gamba P., Leonarduzzi G., Tamagno E., Guglielmotto M., Testa G., Sottero B., Gargiulo S., Biasi F., Mauro A., Vina J., Poli G., Interaction between 24-hydroxycholesterol, oxidative stress and amyloid- β in amplifying neuronal damage in Alzheimer's disease: three partners in crime. *Aging Cell* revised.
- Garbossa D., Boido M., Fontanella M., Fronda C., Ducati A., Vercelli A. (2010) Recent therapeutic strategies for spinal cord injury treatment: possible role of stem cells. *Neurosurg Rev* (submitted)
- Guglielmotto M., Aragno M., Tamagno E., Vercellinatto I., Visentin S., Medana C., Catalano M.G., Smith M.A., Perry G., Danni O., Boccuzzi G., Tabaton M. (2010) AGEs/RAGE complex upregulates BACE1 via NF- κ B pathway activation. PMID 20638753
- Guglielmotto M., Giliberto L., Tamagno E., Tabaton M. (2010) Oxidative stress mediates the pathogenic effect of different Alzheimer's disease risk factors. *Frontiers Aging Neurosci.* 2, 1-8.
- Mazzini L., Fagioli F., Vercelli A (2010) Stem cells and neuroinflammation. *Exp Opin Biol Ther* (submitted).
- Morello N., Bianchi F.T., Marmiroli P., Tonoli E., Rodriguez Menendez V., Silengo L., Cavaletti G., Vercelli A., Altruda F., Tolosano E. (2010) A role for Hemopexin in Oligodendrocyte differentiation and myelin formation. *Neurobiol Dis* (submitted)
- Piras A., Gianetto D., Bosone A., Vercelli A. (2010) Activation of autophagy in a model of retinal ischemia following high intraocular pressure. *Neurobiol Dis* (in revision)
- Strasser K., Bloomfield G., MacWilliams A., Ceccarelli A., MacWilliams H.K., and Tsang A., (2010) The *Dictyostelium* retinoblastoma-like gene *rb1A* is a major regulator of S-phase, mitotic and developmental gene expression *Cell Cycle* (Submitted)
- Tomasi S., Sarmientos P., Giorda G., Gurewich V., Vercelli A. (2010) Mutant prourokinase with adjunctive C1-inhibitor induces brain salvage with better neurofunction improvement and less ICH than tPA in rat stroke. *J. Exp. Stroke Transl Med* (submitted)
- Vieira H.L.A., Alves P.M., Vercelli A. (2010) Modulation of neuronal stem cell differentiation by hypoxia and reactive oxygen species. *Progr Neurobiol* (in 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. *Eur. J. Neurosci.* (submitted)

3.2. Seminari e conferenze con affiliazione al NICO

- A. Vercelli, Cellule staminali e patologie del midollo spinale, Ospedale Milano, 13 Luglio 2010
- A. Vercelli, Development, plasticity and organisation in modules of cortical pyramidal neurons, Harvard Medical School, Boston, 5 Novembre 2010