



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

Progetto delle attività di ricerca per l'anno 2015

Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO)

Riassunto delle attività 2014 pag. 3

Lista delle pubblicazioni degli afferenti al NICO pag. 4


Elenco dei seminari svolti al NICO nel 2014 pag. 7

Progetto delle attività di ricerca per l'anno 2015

| <i>Gruppo</i> | <i>Responsabile</i> | <i>Pagina</i> |
|--|------------------------------|----------------------|
| Neurobiologia clinica | Antonio Bertolotto | 10 |
| Neurogenesi adultas | Luca Bonfanti, Paolo Peretto | 20 |
| Neurobiologia della plasticità cerebrale | Annalisa Buffo | 29 |
| Neuropsicofarmacologia | Carola Eva | 42 |
| Plasticità e rigenerazione del SNP | Stefano Geuna | 48 |
| Neuroendocrinologia | Giancarlo Panzica | 52 |
| Elettrofisiologia e neurodegenerazione | Filippo Tempia | 58 |
| Sviluppo e patologia cerebrale | Alessandro Vercelli | 61 |

Elenco delle richieste di finanziamento presentate per il 2015 pag. 70

Torino, 30 novembre 2014



Alessandro Vercelli
Direttore Scientifico
Istituto di Neuroscienze
Fondazione Cavalieri-Ottolenghi

Riassunto delle attività 2014

Nell'anno 2014 l'attività scientifica dell'Istituto ha portato a una produzione di più di 50 articoli scientifici su riviste internazionali di impatto (con impact factor) per anno. Inoltre l'Istituto ha svolto una intensa attività di formazione nel Dottorato di Neuroscienze e altre scuole di dottorato dell'Università di Torino, formando almeno 15 dottorandi. Inoltre, ha ospitato al suo interno diversi studenti di dottorato e post-doc stranieri, nell'ambito dei programmi di scambio come lo Young Investigators Training Program della FENS (Federazione delle Società Europee di Neuroscienze). Partecipa inoltre alla organizzazione delle scuole di dottorato di Neuroscienze della NENS.

Ogni due anni il NICO, nella persona del prof. G. Panzica, organizza il congresso internazionale "Steroids and Nervous System" (circa 150 partecipanti): è in corso di preparazione il congresso del 2015. Inoltre membri del NICO (G. Panzica e A. Vercelli) hanno partecipato al comitato organizzativo locale del meeting europeo FENS di Milano 2014 (4000 partecipanti).

Oltre alla formazione post-graduate, il NICO accoglie ogni anno circa 30 tesisti per lo svolgimento di tesi di corsi di laurea di I e II livello della Scuola di Biotecnologie, di Medicina e Chirurgia, di Biologia, di Scienze Naturali e di Psicologia.

I ricercatori del NICO hanno un'intensa attività seminariale in altre sedi e di partecipazione a meeting scientifici internazionali e nazionali (vedasi descrizione dettagliata dei singoli gruppi).

Il NICO inoltre partecipa a diverse iniziative di formazione per gli studenti liceali, organizzando delle giornate di "Porte aperte", delle "Summer schools" in collaborazione con la Fondazione Agnelli e Agorà Scienza e le selezioni regionali delle Olimpiadi di Neuroscienze (nel 2014 la vincitrice, Anna Pan, ha poi vinto le selezioni nazionali e si è classificata sesta nella competizione mondiale a Washington DC).

Inoltre il NICO organizza all'interno del suo istituto incontri con le associazioni di pazienti e collabora con esse nella raccolta fondi (Associazioni Alzheimer, Coordinamento Para e Tetraplegici del Piemonte, Associazione Girotondo Onlus di Biella, SMArathon di Milano).

L'attività scientifica si svolge principalmente su tre grandi aree:

- a) ricerca di Neuroscienze di base, finalizzata alla comprensione dei meccanismi di sviluppo, maturazione e riparo del sistema nervoso. I gruppi di ricerca impegnati in questo settore si occupano soprattutto di sistema olfattivo, di ipotalamo, di cervelletto, di corteccia cerebrale e di midollo spinale. In particolare vengono studiati i meccanismi cellulari e molecolari di: neurogenesi, migrazione e specificazione cellulare, riorganizzazione dell'albero dendritico e crescita assonale, nonché fenomeni regressivi come morte cellulare (per apoptosi e autofagia). Inoltre, particolare attenzione è rivolta alle differenze strutturali a livello del sistema nervoso centrale tra i due sessi (dimorfismo sessuale), allo sviluppo di queste differenze, all'influenza dell'ambiente e dell'inquinamento, ed alle ricadute sulla medicina di genere.
- b) ricerca sui meccanismi molecolari alla base di alcune malattie neurodegenerative (SLA, SMA, Alzheimer, Parkinson, Huntington, Niemann-Pick, atassie cerebellari) e delle lesioni del sistema nervoso (epilessia, infarto cerebrale, traumi spinali, dolore neuropatico centrale da lesione del nervo periferico) e psichiatriche (ansietà, disturbi del comportamento alimentare).
- c) ricerca in campo più prettamente clinico nel campo della sclerosi multipla, grazie allo stretto rapporto col CRESM (Centro di riferimento per la sclerosi multipla).

Lista delle pubblicazioni degli afferenti al NICO

1. Beck-Broichsitter BE, Lamia A, Geuna S, Fregnan F, Smeets R, Becker ST, Sinis N (2014). Does pulsed magnetic field therapy influence nerve regeneration in the median nerve model of the rat? *Biomed Res Int* 2014:401760
2. Bertolotto A, Capobianco M, Amato MP, Capello E, Capra R, Centonze D, Di Ioia M, Gallo A, Grimaldi L, Imberti L, Lugaresi A, Mancinelli C, Marrosu MG, Moiola L, Montanari E, Romano S, Musu L, Paolicelli D, Patti F, Pozzilli C, Rossi S, Salvetti M, Tedeschi G, Tola MR, Troiano M, Zaffaroni M, Malucchi S; Italian Multiple Sclerosis Study group (2014). Guidelines on the clinical use for the detection of neutralizing antibodies (NAbs) to IFN beta in multiple sclerosis therapy: report from the Italian Multiple Sclerosis Study group. *Neurol Sci* 35(2):307-16
3. Boccazzi M, Rolando C, Abbracchio MP, Buffo A, Ceruti S (2014). Purines regulate adult brain subventricular zone cell functions: contribution of reactive astrocytes. *Glia* 62(3):428-39
4. Boda E, Buffo A (2014). Beyond cell replacement: unresolved roles of NG2-expressing progenitors. *Front Neurosci* 8:122
5. Boda E, Di Maria S, Rosa P, Taylor V, Abbracchio MP, Buffo A (2014). Early phenotypic asymmetry of sister oligodendrocyte progenitor cells after mitosis and its modulation by aging and extrinsic factors. *Glia* [Epub ahead of print]
6. Boido M, Piras A, Valsecchi V, Spigolon G, Mareschi K, Ferrero I, Vizzini A, Temi S, Mazzini L, Fagioli F, Vercelli A (2014). Human mesenchymal stromal cell transplantation modulates neuroinflammatory milieu in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cytotherapy* 16:1059-72
7. Bonfanti L (2014). Cellule staminali e malattie neurodegenerative: scienza ed etica. *Giornale dell'accademia di medicina di Torino*
8. Bonfanti L (2014). La nuova bioetica delle staminali: dalle cellule al paziente. *Bioetica Rivista interdisciplinare Torino*
9. Bonomi M, Cappa M, Cariboni A, Di Schiavi E, Fabbri A, Ferlin A, Foresta C, Ghizzoni L, Jannini E, Krausz C, Loche S, Lombardo F, Maggi M, R Maggi, Maghnie M, Mancini A, Merlo G, Panzica G, Radetti H, Russo G, Simoni M, Sinisi A A, Persani L (2014). Kallmann's syndrome and normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism: two largely overlapping manifestations of one rare disorder. *Journal of endocrinological investigation* 37:5.499-500
10. Bonzano S, Bovetti S, Fasolo A, Peretto P, De Marchis S (2014). Odour enrichment increases adult-born dopaminergic neurons in the mouse olfactory bulb. *Eur J Neurosci* [Epub ahead of print]
11. Capobianco M, di Sapio A, Malentacchi M, Malucchi S, Matta M, Sperli F, Bertolotto A (2014). No impact of current therapeutic strategies on disease reactivation after natalizumab discontinuation: a comparative analysis of different approaches during the first year of natalizumab discontinuation. *Eur J Neurol* [Epub ahead of print]
12. Capobianco M, Piccoli G, Neve Vigotti F, Scapoli P, Deagostini MC, Albera C, Roccatello D, Bertolotto A (2014). Interferon beta-related nephropathy and interstitial lung disease: a new association and a long-term warning. *Mult Scler* [Epub ahead of print]
13. Carvalho M, Costa LM, Pereira JE, Shirosaki Y, Hayakawa S, Santos JD, Geuna S, Fregnan F, Cabrita AM, Maurício AC, Varejão AS (2014). The role of hybrid chitosan membranes on scarring process following lumbar surgery: post-laminectomy experimental model. *Neurol Res* 25:1743132814Y0000000414
14. Cattaneo E, Bonfanti L (2014). Therapeutic potential of neural stem cells: greater in people's perception than in their brains? *Front Neurosci* 8:79
15. Cauda F, Geminiani C, Vercelli A (2014). Anatomical and functional Lateralization of the insular cortex in Insula: *Neuroanatomy, Functions and Clinical Disorders*, published by Ed Uddin L. Nova Science Publisher Pp 67-93

16. Cauda F, Geminiani C, Vercelli A (2014). Evolutionary appearance of Von Economo's Neurons in the mammalian cerebral cortex. *Front Hum Neurosci* 8:104
17. Crosio A, Valdatta L, Cherubino M, Izzo M, Pellegatta I, Pascal D, Geuna S, Tos P (2014). A simple and reliable method to perform biomechanical evaluation of postoperative nerve adhesions. *J Neurosci Methods* 233:73-7
18. De Luca A, Parmigiani E, Tosatto G, Martire S, Hoshino M, Buffo A, Leto K, Rossi F (2014). Exogenous Sonic Hedgehog Modulates the Pool of GABAergic Interneurons During Cerebellar Development. *Cerebellum* [Epub ahead of print]
19. Di Battista G, Bertolotto A, Gasperini C, Ghezzi A, Maimone D, Solaro C (2014). Multiple Sclerosis State of the Art (SMART): A Qualitative and Quantitative Analysis of Therapy's Adherence, Hospital Reliability's Perception, and Services Provided Quality. *Mult Scler Int* 2014:752318
20. Di Gregorio E, Borroni B, Giorgio E, Lacerenza D, Ferrero M, Lo Buono N, Ragusa N, Mancini C, Gaussen M, Calcia A, Mitro N, Hoxha E, Mura I, Coviello DA, Moon YA, Tesson C, Vaula G, Couarch P, Orsi L, Duregon E, Papotti MG, Deleuze JF, Imbert J, Costanzi C, Padovani A, Giunti P, Mailliet-Vioud M, Durr A, Brice A, Tempia F, Funaro A, Boccone L, Caruso D, Stevanin G, Brusco A (2014). ELOVL5 Mutations Cause Spinocerebellar Ataxia 38. *Am J Hum Genet* 95: 209-217
21. Di Sapia A, Bertolotto A, Melillo F, Sperli F, Malucchi S, Troni W (2014). A new neurophysiological approach to assess central motor conduction damage to proximal and distal muscles of lower limbs. *Clin Neurophysiol* 125(1):133-41
22. Farinetti A, Tomasi S, Foglio B, Ferraris A, Ponti G, Gotti S, Peretto P, Panzica GC. (2014) Testosterone and estradiol differentially affect cell proliferation in the subventricular zone of adult gonadectomized male and female rats. *Neuroscience*, in press.
23. Fontana R, Della Torre S, Meda C, Longo A, Eva C, Maggi A (2014). Estrogen replacement therapy regulation of energy metabolism in female mouse hypothalamus. *Endocrinology*, 155:2213-2221
24. Gamba P, Guglielmotto M, Testa G, Monteleone D, Zerbinati C, Gargiulo S, Biasi F, Iuliano L, Giaccone G, Mauro A, Poli G, Tamagno E, Leonarduzzi G (2014). Up- regulation of β -amyloidogenesis in neuron-like human cells by both 24- and 27-hydroxycholesterol: protective effect of N-acetyl-cysteine. *Aging Cell* 13:561-72
25. Gambarotta G, Ronchi G, Friard O, Galletta P, Perroteau I, Geuna S (2014). Identification and validation of suitable housekeeping genes for normalizing quantitative real-time PCR assays in injured peripheral nerves. *PLoS One* 9(8):e105601
26. Gnanapavan S, Hegen H, Khalil M, Hemmer B, Franciotta D, Hughes S, Hintzen R, Jeromin A, Havrdova E, Tumani H, Bertolotto A, Comabella M, Frederiksen J, Alvarez-Cermeño JC, Villar L, Galimberti D, Myhr KM, Dujmovic I, Fazekas F, Ionete C, Menge T, Kuhle J, Keir G, Deisenhammer F, Teunissen C, Giovannoni G (2014). Guidelines for uniform reporting of body fluid biomarker studies in neurologic disorders. *Neurology* 83(13):1210-1216
27. Gnavi S, di Blasio L, Tonda-Turo C, Mancardi A, Primo L, Ciardelli G, Gambarotta G, Geuna S, Perroteau I (2014). Gelatin-based hydrogel for vascular endothelial growth factor release in peripheral nerve tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* [Epub ahead of print]
28. Grande V, Manassero G, Vercelli A (2014). Neuroprotective and anti-inflammatory roles of the phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN) inhibition in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Plos One* in press
29. Grassi D, Lagunas-Garcia N, Calmarza-Font I, Diz-Chaves Y, Garcia-Segura LM, Panzica GC (2014). Chronic unpredictable mild stress and long-term ovariectomy affect arginine-vasopressin expression in the paraventricular nucleus of adult female mice. *Brain Res* 1588: 55-62
30. Guglielmotto M, Monteleone D, Piras A, Valsecchi V, Tropiano M, Ariano S, Fornaro M, Vercelli A, Puyal J, Arancio O, Tabaton M, Tamagno E (2014). A β 1-42 monomers or oligomers have different effects on autophagy and apoptosis. *Autophagy* 10:1827-43

31. Hegen H, Millonig A, Bertolotto A, Comabella M, Giovanonni G, Guger M, Hoelzl M, Khalil M, Killestein J, Lindberg R, Malucchi S, Mehling M, Montalban X, Polman CH, Rudzki D, Schautzer F, Sellebjerg F, Sørensen PS, Deisenhammer F (2014). Early detection of neutralizing antibodies to interferon-beta in multiple sclerosis patients: binding antibodies predict neutralizing antibody development. *Mult Scler* 20(5):577-87
32. Lippiello P, Hoxha E, Volpicelli F, De Luca G, Tempia F, Miniaci MC (2014). Noradrenergic Modulation of the Parallel Fiber-Purkinje Cell Synapse in Mouse Cerebellum. *Neuropharmacol* 89: 33-42
33. Longo A, Mele P, Bertocchi I, Oberto A, Bachmann A, Bartolomucci A, Palanza P, Sprengel R, Eva C (2014). Conditional inactivation of Neuropeptide Y-Y1 receptors unravels the role of Y1 and Y5 receptors co-expressing neurons in anxiety. *Biol Psych* 76,840–849
34. Luzzati F (2014). Combining multichannel confocal laser scanning microscopy with serial section reconstruction to analyze large tissue volumes at cellular resolution. *Neuromethods* 87: 83-103
35. Luzzati F, Nato G, Oboti L, Vigna E, Rolando C, Armentano M, Bonfanti L, Fasolo A, Peretto P (2014). Quiescent neuronal progenitors are activated in the juvenile guinea pig lateral striatum and give rise to transient neurons. *Development* 141:4065-4075
36. Marnetto F, Granieri L, Valentino P, Capobianco M, Pautasso M, Bertolotto A (2014). CD19 mRNA quantification improves rituximab treatment-to-target approach: A proof of concept study. *J Neuroimmunol* [Epub ahead of print]
37. Martone T, Giordano P, Dagna F, Carulli D, Albera R, Rossi F (2014). Nestin expression and reactive phenomena in the mouse cochlea after kanamycin ototoxicity. *Eur J Neurosci* 39(11):1729-41
38. Marvaldi L, Thongrong S, Kozłowska A, Irschick R, Pritz CO, Bäumer B, Ronchi G, Geuna S, Hausott B, Klimaschewski L (2014). Enhanced axon outgrowth and improved long-distance axon regeneration in sprouty2 deficient mice. *Dev Neurobiol* [Epub ahead of print]
39. Melcangi RC, Panzica GC (2014). Allopregnanolone: State of the art. *Progr Neurobiol* 113:1-5
40. Montarolo F, Raffaele C, Perga S, Martire S, Finardi A, Furlan R, Hintermann S, Bertolotto A (2014). Effects of isoxazolo-pyridinone 7e, a potent activator of the nurr1 signaling pathway, on experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *PLoS One* 9(9):e108791
41. Navone ND, Perga S, Martire S, Berchiolla P, Malucchi S, Bertolotto A (2014). Monocytes and CD4+ T cells contribution to the under-expression of NR4A2 and TNFAIP3 genes in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 272(1-2):99-102
42. Novajra G, Tonda-Turo C, Vitale-Brovarone C, Ciardelli G, Geuna S, Raimondo S (2014). Novel systems for tailored neurotrophic factor release based on hydrogel and resorbable glass hollow fibers. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 36:25-32
43. Oboti L, Peretto P (2014). How neurogenesis finds its place in a hardwired sensory system. *Front Neurosci* 8:102
44. Peretto P, Bonfanti L (2014). Major unsolved points in adult neurogenesis: doors open on a translational future? *Front Neurosci* 8:154
45. Peretto P, Paredes RG (2014). Social Cues, Adult Neurogenesis, and Reproductive Behavior in Neurobiology of Chemical Communication, published by Mucignat-Caretta C, editor Boca Raton (FL), CRC Press
46. Peretto P, Schellino R, De Marchis S, Fasolo P (2014). The interplay between reproductive social stimuli and adult olfactory bulb neurogenesis. *Neural Plasticity* 497657
47. Perino A, Beretta M, Kilic A, Carnevale D, Repetto IE, Braccini L, Longo D, Wetzker R, Liebig-Gonglach M, Aime S, Vercelli A, Lembo G, Pfeifer A, Hirsch E (2014). Combined inhibition of PI3Kbeta and PI3Kgamma reduces fat mass by enhancing a-MSH-dependent sympathetic drive. *Science Signaling* in press

48. Queiroga C, Vercelli A and Vieira H (2014). Carbon Monoxide and Central Nervous System: Challenges and Achievements. *British J Pharmacol* 10.1111/bph.12729
49. Riccio M, Pangrazi PP, Parodi PC, Vaienti L, Marchesini A, Neuendorf AD, Bottegoni C, Tos P, Geuna S (2014). The amnion muscle combined graft (AMCG) conduits: A new alternative in the repair of wide substance loss of peripheral nerves. *Microsurgery* 34(8):616-22
50. Rodriguez-Gomez A, Filice F, Gotti S, Panzica GC (2014). Perinatal exposure to genistein affects the normal development of anxiety and aggressive behaviors and nitric oxide system in CD1 male mice. *Physiol Behav* 133:107-114
51. Tomassy GS, Berger DR, Chen H-H, Kasthuri N, Hayworth KJ, Vercelli A, Seung SH, Lichtman J, Arlotta P (2014). Distinct profiles of myelin distribution along single axons of pyramidal neurons in the neocortex. *Science* 18: 319-324
52. Vazquez-Sanroman D, Leto K, Cerezo-Garcia M, Carbo-Gas M, Sanchis-Segura C, Carulli D, Rossi F, Miquel M (2014). The cerebellum on cocaine: plasticity and metaplasticity, *Addiction Biology in press*
53. Vercelli A, Boido M (2014) Spinal cord injury in *Neurobiology of Brain Disorders*, published by Michael J Zigmond, Joseph T Coyle, Lewis P Rowland. Elsevier New York in press
54. Ziv-Polat O, Shahar A, Levy I, Skaat H, Neuman S, Fregnan F, Geuna S, Grothe C, Haastert-Talini K, Margel S (2014). The role of neurotrophic factors conjugated to iron oxide nanoparticles in peripheral nerve regeneration: in vitro studies. *Biomed Res Int* 2014:267808

Elenco dei seminari svolti al NICO nel 2014

12 dicembre

[Geni, Madri e Genere: L'interazione "fatale" che modula comportamento e metabolismo - il modello dei topi KO condizionali per NPY1r](#)

Paola Palanza, Dipartimento di Biologia Evolutiva e Funzionale - Università di Parma

5 dicembre

[Resting state functional connectivity: una finestra sul funzionamento a riposo del cervello](#)

Franco Cauda, CCS fMRI, Koelliker Hospital e Dipartimento di Psicologia, Università di Torino

28 novembre

[Non canonical Drosha pathway regulates hippocampal neural stem cell differentiation](#)

Chiara Rolando, Embryology and Stem Cell Biology, Department of Biomedicine - University of Basel

3 novembre

[Enrich the environment to empower the brain: towards an endogenous pharmacotherapy](#)

Alessandro Sale, Istituto di Neuroscienze, CNR di Pisa

17 ottobre

[Leuko-vascular interaction as a new player in neuromodulation: insights from experimental epilepsy](#)

Paolo Fabene, Dipartimento di Scienze Neurologiche e del Movimento, Università di Verona

29 settembre

[Transcription Factor EB and the development of cardiovascular system](#)

Prof. Federico Bussolino, Istituto di Candiolo - IRCCS

19 settembre

[Musica e Memoria](#)

Alexander J. Graur, Ph.D - The New York Academy of Sciences

19 giugno

[Etica e Ricerca: questioni morali relative all'uso di materiale umano](#)

Maurizio Balistreri, Dipartimento di Filosofia e Scienze dell'Educazione, Università di Torino

12 giugno

[Nanotools for Neuroscience](#)

Carlo Ricciardi, Emiliano Descrovi, Fabrizio Pirri

DISAT – Politecnico di Torino; IIT@POLITO - Istituto Italiano di Tecnologia

30 maggio

[Pluripotent Stem Cells as a model of in vitro neurogenesis](#)

Federico Cremisi, Ricercatore della Classe di Scienze - Scuola Normale Superiore di Pisa

4 aprile

[Mechanisms of cortical plasticity: from the visual to the motor cortex](#)

Matteo Caleo, Istituto di Neuroscienze, CNR, Pisa

21 marzo

[Vaccinazione inversa nella terapia della Sclerosi Multipla](#)

Umberto Dianzani, Dipartimento di Scienze della Salute, Università del Piemonte Orientale
"Amedeo Avogadro"

14 febbraio

Peripheral and Central pathogenic processes in multiple sclerosis

Cinthia Farina, Institute of Experimental Neurology (INSpe)

Dibit2 - San Raffaele Scientific Institute, Milan

Nell'intenzione di allargare le collaborazioni scientifiche italiane, il NICO ed il Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomediche dell'Università di Milano hanno deciso di tenere seminari con scambi di ricercatori tra le due sedi. L'iniziativa è partita in Novembre, ed i primi seminari sono qui segnalati



19 dicembre

GluN2A-containing NMDA receptors as synaptic trait of levodopa-induced dyskinesias: from experimental models to patients

Fabrizio Gardoni, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari (DiSFeB), Università di Milano

25 novembre

How neurons adapt to sense glial response: the role of Interleukin-1 receptor type I

Barbara Viviani, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università di Milano

7 novembre

An Update on Neuroactive Steroids

Roberto Cosimo Melcangi, Neuroendocrinology Unit - Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences-Section of Biomedicine and Endocrinology; Center of Excellence on Neurodegenerative Diseases - University of Milan

Resoconto (anno 2014) e progetto delle attività di ricerca per il 2015 del gruppo **Neurobiologia clinica**, presso l'Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO)

Responsabile del gruppo: **Antonio Bertolotto**

1. Composizione del gruppo di ricerca (05-11-2014)

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

Federica Brescia (Tecnico di laboratorio)

Marzia Caldano (Specialista in Biochimica Clinica)

Daniela De Nicolò (Tecnico di laboratorio)

Daniela Gramolelli (Tecnico)

Letizia Granieri (Specialista in Patologia Clinica)

Fabiana Marnetto (Specialista in Biochimica Clinica)

Serena Martire (borsista)

Francesca Montarolo (Postdoc)

Simona Perga (Postdoc)

Michela Spadaro (Postdoc)

Paola Valentino (Specialista in Biochimica Clinica)

2. Progetti di ricerca

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-beta, 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 alcuni geni che sono espressi in modo anomalo nei linfomonociti di pazienti con SM, ma che sono corretti nella loro espressione durante la gravidanza.

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 ed alla valutazione del valore prognostico della positività agli anti-corpi anti-aquaporina 4 (AQP4). Per quanto riguarda la SM, nel 2013 è nato un progetto volto a studiare la presenza ed il ruolo degli anticorpi anti-KIR4.1 nel siero dei pazienti.

E' stata istituita infine, una Banca Biologica per i pazienti con SM che conserva il materiale biologico (CSF, cellule mononucleate del sangue periferico, sangue intero, plasma, 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 RMN; 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.

Nel corso del 2015 verrà portato a termine un progetto con il fine di identificare i non-responder all'IFNb valutando l'espressione genica di una serie (fino a 30) geni che hanno una delle seguenti caratteristiche i) essere selettivamente indotti dall'IFNb ii) essere stati identificati in almeno due studi di altri gruppi come in grado di discriminare fra responders e non-responder iii) essere stati identificati dal nostro gruppo di ricerca come markers di aggressività della malattia. Per questo progetto sono stati selezionati dalla banca biologica del gruppo di ricerca i campioni necessari, dei quali sono disponibili le cartelle cliniche nella Neurologia 2 - CRESM e uno specifico database con i dati raccolti. Inoltre è in fase di conclusione lo studio dell'espressione di 84 geni Interferon-correlati in pazienti trattati con IFNb, volto a verificare eventuali differenze nel pattern di attivazione genica da parte delle diverse formulazioni di IFNb.

Nell'ottica di razionalizzare la terapia con Rituximab, utilizzato per la malattia di Devic, per la SM e per molte altre malattie autoimmuni, si continuerà uno studio di paragone fra biologia molecolare e FACS per quantificare i linfociti B CD19+ nel sangue dei pazienti in trattamento. Il razionale dello studio si basa sulla ri-somministrazione di Rituximab al ricomparire dei linfociti B CD19+ nel sangue. Attualmente ogni mese i pazienti in trattamento eseguono un dosaggio con FACS dei CD19 e il Rituximab viene ri-somministrato quando i CD19 sono nuovamente presenti, tuttavia questa procedura non è sufficientemente sensibile perchè una quota di pazienti sviluppa attacchi immediatamente prima o in concomitanza con la ricomparsa dei CD19. Nel settembre 2014 è stato pubblicato il lavoro scientifico che riporta i dati preliminari di questo studio, che indicano che la PCR è più sensibile del FACS nel quantificare i linfociti B CD19+. Il progetto proseguirà con la validazione dei dati su una maggiore coorte di pazienti trattati.

Collaborazioni: Huub Schellekens (Utrecht, Olanda), Wim Jiskoot (Leiden, Olanda), Marisa Pautasso (Laboratorio Analisi, AOU S. Luigi Gonzaga)

2.2. Ruolo delle cellule T regolatorie nella gravidanza e nei pazienti affetti da SM in trattamento con Copaxone

Come noto, durante la gravidanza, le pazienti affette da sclerosi multipla vanno incontro ad un miglioramento della malattia, caratterizzato da una gestazione con un numero inferiore di attacchi di malattia. Questo fenomeno si pensa sia in parte dovuto all'aumento delle cellule T regolatorie (Treg), responsabili della soppressione della risposta delle cellule T auto-reattive. Ancora poco si sa sui veri meccanismi coinvolti nella patogenesi della malattia, ma è evidente che esistono delle disfunzioni a carico delle cellule del sistema immunitario. Il Copaxone è un farmaco di prima linea utilizzato nel trattamento della SM, che oltre a mimare l'MBP (myelin basic protein) ed indurre uno shift da cellule di tipo Th1 verso cellule di tipo Th2, potrebbe innalzare la percentuale di cellule Treg.

Le cellule del sistema immunitario di 56 persone (tra pazienti e donatori sani) saranno analizzate al citofluorimetro per la presenza di marcatori di superficie che individuano specifiche popolazioni cellulari. In questo primo anno sono stati raccolti e analizzati 23 campioni di pazienti in terapia con Copaxone a diverso tempo di trattamento, 12 pazienti prima dell'inizio di un trattamento e 10 donatori sani. Stiamo raccogliendo campioni di donne sane o affette da SM in gravidanza prossimamente inizieremo le analisi delle Treg in questa coorte di campioni. Questo progetto ha il fine ultimo di confrontare i benefici dati dalla gravidanza e dalla somministrazione del farmaco nei pazienti affetti da SM per cercare di approfondire la conoscenza della malattia.

2.3. Approccio alla patogenesi della SM

Un'inflammatione cronica si sviluppa a seguito di uno squilibrio tra risposte pro- e anti-inflammatorie. Ciò determina l'insorgenza e la progressione di malattie croniche, tra cui malattie autoimmuni e neurodegenerative. Al fine di comprendere la patogenesi di queste condizioni e di poter intervenire con terapie adeguate, è essenziale conoscere i fattori che attivano i processi infiammatori, così come gli approcci biologici in grado di mantenere questi processi sotto controllo. Molteplici sono i meccanismi coinvolti nell'inibizione dell'inflammatione, compresa l'attivazione di specifici circuiti a retroazione negativa, ovvero i cosiddetti “*negative feedback loops*”. Negli ultimi anni sono stati identificati diversi circuiti a retroazione negativa, il cui ruolo è quello di attenuare la risposta mediata da induttori o amplificatori dell'inflammatione. Tali circuiti includono la sintesi di proteine che inibiscono le vie di trasduzione (ad esempio le proteine SOCS), la sintesi di repressori e transrepressori trasduzionali (ad esempio Nurr1 e TNFAIP3) e la produzione di mediatori solubili o di superficie ad attività anti-inflammatoria (ad esempio IL-10 e TGFbeta). A questo proposito, degna di nota è la nostra recente osservazione di un coinvolgimento dei transrepressori trasduzionali Nurr1, TNFAIP3 e SOCS2 nella SM, malattia infiammatoria, autoimmune e demielinizzante del SNC. Si ritiene che l'inflammatione costituisca un aspetto chiave nella patofisiologia di questa condizione debilitante e degenerativa. Nel complesso, il processo infiammatorio caratteristico della SM sembrerebbe essere causato da una iper-attivazione di linfociti pro-inflammatori T helper (Th1 e Th17). Tuttavia, i nostri dati suggeriscono che la SM derivi da difettosi circuiti a retroazione negativa piuttosto che da una eccessiva reazione pro-inflammatoria, e il coinvolgimento di Nurr1, TNFAIP3 e SOCS2 sembrerebbe confermare questo concetto. In accordo con questa affermazione, nei nostri precedenti studi abbiamo osservato una riduzione nell'espressione di Nurr1, TNFAIP3 e SOCS2 in cellule mononucleate del sangue ottenute da pazienti affetti da SM.

Ulteriori dati ottenuti dal nostro gruppo dimostrano che Nurr1 e TNFAIP3 sono *down-regolati* nelle cellule linfoidi e mieloidi. Poiché le cellule mieloidi (ovvero monociti, macrofagi e microglia) svolgono un ruolo essenziale sia nell'inflammatione cerebrale sia nella regolazione dei circuiti a retroazione negativa dell'inflammatione stessa, riteniamo possa essere importante approfondire il ruolo dei due trascritti nella SM. L'attuale linea di ricerca si propone quindi di esaminare come un'alterata espressione di Nurr1, TNFAIP3 e SOCS2 favorisca il processo patogenetico della SM e come influenzi la neurodegenerazione nella malattia.

In primo luogo, lo studio si propone di indagare l'espressione di Nurr1, TNFAIP3 e SOCS2 in diverse coorti di pazienti con SM, ovvero pazienti con malattia attiva o stabile, e pazienti affetti da diverse tipologie di SM. Inoltre, lo studio si propone di analizzare l'espressione di Nurr1, TNFAIP3 e SOCS2 anche in pazienti affetti da altre malattie neurodegenerative (quali Parkinson, Sclerosi Laterale Amiotrofica ed Alzheimer) ed autoimmuni (quali tiroidite autoimmune, artrite reumatoide e diabete autoimmune).

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

Terzo, l'attuale ricerca si propone di indagare il ruolo di Nurr1, TNFAIP3 e SOCS2 nel sistema nervoso centrale tramite la valutazione dell'espressione dei tre geni e delle relative proteine in tessuti cerebrali autoptici ottenuti da individui affetti da SM.

Quarto, la ricerca del gruppo vorrebbe chiarire la/le causa/e di deregolazione dei geni Nurr1 e TNFAIP3 tramite una valutazione genetica ed epigenetica. Con questa finalità stiamo genotipizzando specifici SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) nei geni Nurr1 e TNFAIP3 per correlare poi eventuali aplotipi d'interesse con il livello di espressione dei due trascritti. Le varianti SNPs più interessanti saranno poi testate per la loro attività biologica con saggi cellulari. Per l'analisi epigenetica, stiamo valutando il significato dell'espressione di microRNAs (miRNAs), correlata alla deregolata espressione di Nurr1, TNFAIP3 e SOCS2 osservata nei pazienti con SM.

Come quinto punto si utilizzeranno modelli murini nel modello murino di SM (modello EAE; encefalomielite autoimmune sperimentale). Questo modello permetterà di valutare il coinvolgimento dei geni individuati dal nostro laboratorio come geni di interesse (TNFAIP3, NR4A2, SOCS2) nei meccanismi di insorgenza della SM. In particolare inducendo la malattia in ceppi murini geneticamente modificati, in cui l'espressione di questi geni sia alterata, si potrà valutare l'incidenza e la severità del fenomeno in relazione alla presenza o assenza del gene di interesse. A tale scopo, vorremmo utilizzare topi TNFAIP3, SOCS2 e NR4A2-deficienti in tutto l'organismo oppure in determinate sottopopolazioni cellulari di interesse per analizzare non solo gli effetti sistemici ma anche quelli cellula specifici. Il modello di EAE scelto potrebbe permettere la valutazione del coinvolgimento di questi geni sia negli stadi di infiammazione acuta che in quelli di infiammazione cronica a livello neuronale e immunologico.

Infine, un altro studio intrapreso di recente, mira ad approfondire il ruolo di tre geni, BACH2, PTGER4 e RGS1, identificati in uno studio mondiale GWAS (Genome-Wide Association Study) come associati geneticamente alla SM. Gli stessi geni sono stati identificati dal nostro laboratorio tramite un'analisi di *microrarray* come differenzialmente espressi nei pazienti rispetto alla popolazione sana. Dal momento che è noto dalla letteratura che questi geni svolgono un ruolo importante nella regolazione dell'infiammazione e del sistema immunitario, siamo interessati a delucidare il loro ruolo nella patologia.

Sempre nell'ambito della patogenesi della SM, nel 2014 si è concluso lo studio multicentrico finanziato dalla FISM intitolato: "Analisi dell'infezione con virus di Epstein-Barr e della risposta immunitaria nel fluido cerebrospinale e nel sangue di pazienti con sclerosi multipla mediante tecniche altamente sensibili di PCR.", a cui il nostro gruppo ha partecipato attivamente. La SM è una malattia complessa causata dall'interazione tra molteplici fattori genetici e ambientali. Tra questi ultimi, il virus di Epstein-Barr, un virus erpetico molto diffuso nella popolazione, viene oggi identificato come l'agente infettivo che mostra l'associazione più convincente con la malattia sulla base di dati epidemiologici e sierologici. Sebbene i meccanismi che potrebbero collegare l'infezione con il virus di Epstein-Barr al processo infiammatorio cerebrale della SM siano ancora sconosciuti, una ipotesi da verificare è se la presenza di questo virus nel SNC rappresenti il principale stimolo attivante della risposta immunitaria che causa la SM. Per comprendere meglio in che modo l'infezione con il virus di Epstein-Barr contribuisca alla SM è necessario caratterizzare lo stato dell'infezione virale nel liquor e nel sangue periferico dei pazienti con SM, capire se esistono

differenze nei due distretti, e verificare l'esistenza di possibili correlazioni tra marcatori dell'infezione virale, della risposta immunitaria e dell'attività di malattia. In questo progetto, campioni di liquor e sangue periferico da 35 pazienti con SM sono stati analizzati utilizzando tecniche di biologia molecolare altamente specifiche e sensibili che hanno permesso di studiare contemporaneamente il livello di espressione di 7 geni virali e 41 geni cellulari in entrambi i compartimenti (marcatori associati all'infezione e alla risposta immunitaria).

Risultati ottenuti:

- Messa a punto di una metodica di analisi dell'espressione genica avanzata, al fine di ottenere un quadro comprensivo dello stato di infezione con EBV e dell'attivazione di specifiche componenti del sistema immunitario nel liquor e nel sangue periferico di pazienti con SM.
- Rilevazione di differenze nei livelli di espressione genica cellulare e correlazione tra geni legati alla maturazione delle cellule B e alla risposta pro-infiammatoria nei pazienti in fase attiva e inattiva di malattia.
- Ad oggi, il numero limitato di pazienti analizzati e la bassa percentuale di campioni contenenti segnali rilevabili dell'infezione con EBV non permettono di stabilire un nesso tra latenza o riattivazione virale, qualità o forza della risposta immunitaria e attività o inattività di malattia.

Nel 2014 è stato presentato alla FISM un nuovo progetto multicentrico, che verrà condotto in una coorte più ampia di pazienti, al fine di verificare l'esistenza di tale nesso e identificare potenziali marcatori di diversi decorsi di malattia e con valore predittivo.

2.4. Analisi di biomarcatori per la SM

2.4.1 KIR4.1

Nel 2014 infine è stato avviato nel nostro laboratorio lo studio degli anticorpi anti-canale del potassio KIR4.1 presenti nel siero di pazienti con SM: nel mese di agosto 2014 una biologa del nostro gruppo ha visitato il laboratorio di neuroimmunologia del Prof. Hemmer a Monaco (dove sono stati identificati per la prima volta questi anticorpi), per imparare le metodiche per l'espressione e la purificazione del canale del potassio KIR4.1, e l'ELISA per la quantificazione degli anticorpi anti-KIR4.1 presenti nel siero di pazienti con SM. L'obiettivo di questo progetto è la validazione della metodica ELISA per la quantificazione degli anticorpi anti-KIR4.1 nel siero di pazienti con SM: il canale KIR4.1 verrà espresso in cellule HEK293, quindi purificato ed utilizzato per coartare le piastre ELISA. Per la messa a punto della metodica verranno analizzati sieri di pazienti con SM definita, pazienti con altre patologie neurologiche (infiammatorie e non), controlli sani. La presenza degli anticorpi anti-KIR4.1 verrà correlata con le caratteristiche cliniche dei pazienti (CIS, diverse forme di SM, aggressività della malattia, risposta ai trattamenti). Infine, verrà effettuato uno studio longitudinale con un follow up di 5 anni su alcuni pazienti per identificare i fattori che potrebbero modulare o mascherare la presenza di questi anticorpi nel tempo. Ulteriore obiettivo di questo progetto è lo studio degli effetti che gli autoanticorpi presenti nel siero dei pazienti potrebbero esercitare sulle cellule del sistema nervoso centrale.

La quantificazione di anticorpi anti-KIR4.1 nei pazienti con SM avrà un impatto enorme nel mondo della

SM, in quanto: a) permetterà di diagnosticare con maggiore sicurezza i casi anti-KIR4.1 positivi; b) la presenza di anticorpi anti-KIR4.1 può precedere di anni la comparsa clinica di SM, rappresentando quindi un marker di attività e presenza di malattia, sub e pre-clinica, con la possibilità di terapia preventiva; c) il ruolo degli anticorpi anti-KIR4.1 rappresenta un nuovo campo di indagine, rivolto alla definizione della patogenicità o meno degli anticorpi stessi.

I risultati di questo progetto si tradurranno in: 1. Disponibilità di un test diagnostico per la quantificazione

degli anticorpi anti-KIR4.1 a disposizione dei pazienti, che permetterà di studiare il ruolo diagnostico e

prognostico di questi autoanticorpi, con possibilità di terapia preventiva. 2. Definizione del ruolo patogenetico degli anticorpi anti-KIR4.1 nella SM, che aprirà un nuovo campo di indagine in ambito neuroimmunologico.

Nel 2014 sono state effettuate richieste di finanziamento per le varie componenti di questo progetto a: FISM, SIR (Scientific Independent Research), Compagnia di San Paolo di Torino, Ricerca Finalizzata (Sezione Giovani Ricercatori).

- *Collaborazioni:* Raffaele Calogero (MBC, Torino), Roberto Furlan (DIBIT, Milano), Orla Connelly (Baylor College, Houston, TX), Paola Berchialla (Università di Torino), Alessandra Oberto (NICO, Torino), Francesca Aloisi (Istituto Superiore di Sanità, Roma), Annalisa Buffo ed Enrica Boda (NICO), Rajneesh Srivastava e Bernard Hemmer (Monaco, Germania), Elena Ambrosini (Istituto Superiore di Sanità, Roma), Mauro Pessia (Università degli Studi di Perugia), Roberta Magliozzi (Istituto Superiore di Sanità, Roma), Prof Luisa Bernardinelli, Department of Brain and Behavioural Science, Pavia;

2.4.2 Identificazione di biomarcatori prognostici liquorali

Il presente progetto è volto allo studio delle differenze interindividuali fra pazienti che può portare all'identificazione precoce di marcatori biologici utili per la diagnosi, per la prognosi di malattia, oltre che alla scoperta di nuovi meccanismi patogenetici e target terapeutici. Attività preliminari svolte durante un progetto finanziato in precedenza dalla FISM sono state focalizzate sullo studio di una popolazione omogenea di donne affette da SM. Il proteoma di campioni di liquor prelevato alla puntura lombare da 24 pazienti non trattate è stato analizzato tramite elettroforesi bidimensionale (2-DE). Un'analisi cluster dei dati ha permesso di suddividere la popolazione in sottotipi tramite l'individuazione di un pannello di marcatori proteici in grado di separare i pazienti in base al decorso clinico della malattia. Fra i marcatori individuati, quelli che presentano un peso maggiore nella stratificazione dei pazienti sono due isoforme della proteina che lega la vitamina D (vitamin D Binding Protein = DBP) che sembrano differenziarsi per una modifica post-traduzionale. Tale modifica risulta avere un peso rilevante nella separazione dei pazienti sulla base del grado di aggressività della malattia. Studi preliminari suggeriscono che tale modifica potrebbero essere un differente stato di glicosilazione della proteina, noto essere associato alla capacità di attivare i macrofagi. E' interessante notare che nei pazienti le due isoforme di DBP hanno un andamento opposto ovvero all'aumentare di una si osserva il diminuire dell'altra.

E' in corso uno studio di validazione dei risultati tramite l'analisi 2-DE di un secondo gruppo indipendente di campioni di liquor selezionati in modo retrospettivo secondo prestabiliti criteri clinici attingendo ai database clinici e alla bio-banca del CRESM. In particolare sono stati scelti due gruppi di pazienti con sclerosi multipla, il primo caratterizzato da una forma altamente aggressiva della malattia, passati ad una terapia di seconda linea entro 5 anni dalla diagnosi, mentre il secondo gruppo include pazienti caratterizzati da una forma tranquilla di SM e rispondente alle terapie di prima linea. In questo gruppo sono stati inclusi anche alcuni casi di pazienti "benigni", che non presentano attività o progressione di malattia da 10 anni in assenza di terapie farmacologiche specifiche.

Infine sono stati inclusi nello studio anche due gruppi di controllo, costituiti da pazienti con altre patologie neurologiche infiammatorie e non rispettivamente.

Se validati, l'applicazione di questi risultati nella clinica, potrebbe avere grande rilevanza nel trattamento, prognosi e comprensione della sclerosi multipla in quanto costituirebbero uno strumento innovativo composto da due isoforme della proteina DBP utili per prevedere il decorso clinico della malattia al momento della diagnosi, al fine di indirizzare i pazienti verso il trattamento farmacologico più efficace. Inoltre, se questi dati fossero confermati in plasma/siero lo strumento diagnostico diventerebbe in grado di sostenere direttamente il clinico nella gestione quotidiana dei pazienti affetti da SM.

Contemporaneamente si stanno effettuando esperimenti per identificare il tipo di modifica post-traduzionale che differenzia le due isoforme con particolare attenzione alla glicosilazione.

L'approfondimento del pathway enzimatico che porta ad una diversa espressione delle due isoforme sopra descritte, potrebbe inoltre essere alla base di un meccanismo d'azione che, se chiarito, rappresenterebbe un nuovo bersaglio terapeutico.

Collaborazioni: Alessandra Giuliano-Albo, Davide Corpillo e Barbara Canepa (Able Bioscience, Bioindustry Park Silvano Fumero, SpA, Colleretto Giacosa, TO)

2.4.3 L-selectina o CD62L

Il Natalizumab (NAT), un anticorpo umanizzato contro l'integrina $\alpha 4$, è stato approvato nel 2006 per la il trattamento della MS nella forma RR. Un prolungato trattamento con il Natalizumab (in particolare per più di 18 mesi) è associato ad un più alto rischio di sviluppo della Leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML), una malattia dovuta alla riattivazione del virus JC a livello del sistema nervoso centrale. In più la presenza degli anticorpi anti-JCV nel siero, la durata del trattamento e una terapia immunosoppressiva precedente l'inizio della terapia con NAT, contribuiscono ad aumentare il rischio di sviluppo della PML associata al NAT. Quando tutti e tre questi fattori sono presenti, il rischio statistico di sviluppare la PML è 1:91. Recentemente il CD62L è stato studiato come potenziale biomarker per il rischio individuale di PML nei pazienti con SM. Questo progetto si prefigge di verificare se il CD62L può essere un buon biomarcatore di rischio di PML analizzando e valutando l'espressione della proteina sui linfociti T CD4 dei pazienti trattati con NAT. Sono già stati analizzati 100 pazienti trattati con NAT e confrontati con 52 pazienti trattati con trattamenti di prima linea, 20 nuovi pazienti e 20 donatori sani. Da questa prima analisi si evince che il NAT induce una diminuzione dell'espressione del CD62L già nel primo anno di trattamento e che questa diminuzione persiste negli anni successivi. Sono stati evidenziati dei pazienti in cui la percentuale di cellule positive era molto bassa e che dopo la sospensione del farmaco è ritornata ad avere livelli simili a quelli dei donatori sani. Stiamo valutando la stabilità di questa proteina analizzando ogni 4 mesi il sangue dei pazienti in trattamento con NAT. Se il CD62L sarà confermato come biomarker ci permetterà di ridurre il rischio che i pazienti incorrano in questa grave malattia disabilitante che è la PML.

2.5. 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 numerosi 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 è validato un test di immunofluorescenza su tessuto del SNC e su cellule transfettate (PlosOne 2012) . Nel corso del 2013-2014 abbiamo lavorato per verificare quanto questo test sia in grado di identificare condizioni cliniche che precedono la diagnosi clinica di Malattia di Devic, condizioni denominate NMO-Spectrum Disorders (NMOSD). I risultati ottenuti dimostrano che una buona percentuale di pazienti con NMOSD presenta gli anticorpi anti-AQP4, sottolineando l'importanza stessa dell'effettuare il test diagnostico al fine di intervenire il più precocemente possibile con una terapia adeguata.

Nel marzo 2014 è iniziato un progetto atto a chiarire la correlazione tra il livello degli anticorpi anti-AQP4 e i seguenti parametri: stadio della malattia, aggressività, trattamento con Rituximab

(RTX) e il livello dei CD19. Abbiamo titolato gli anticorpi anti-AQP4, utilizzando il kit commerciale che utilizziamo nell'attività di diagnostica e che abbiamo validato in un precedente lavoro (PlosOne 2012), su un totale di 322 campioni di siero provenienti da 7 pazienti affetti da NMO. Attualmente sono in corso le analisi statistiche al fine di valutare se esiste una correlazione tra lo stadio di malattia e il titolo degli anticorpi per poter adattare la terapia durante il follow-up. Sarà interessante osservare l'eventuale correlazione tra il titolo anticorpale e la percentuale dei CD19 per valutare se i livelli di anti AQP4 potranno essere utilizzati come nuovo marker per monitorare la terapia con RTX.

Collaborazioni: Euroimmun, Lübeck

2.6. 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. Da ottobre 2013 è iniziata la raccolta dei campioni. 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.

Collaborazioni: Charlotte Teunissen (University of Amsterdam, Olanda), Yana Motuzova (University of Minsk, Bielorussia).

3. Prodotti delle attività di ricerca anno 2014

3.1. Articoli pubblicati con affiliazione al NICO

Marnetto F, Granieri L, Valentino P, Capobianco M, Pautasso M, Bertolotto A. CD19 mRNA quantification improves rituximab treatment-to-target approach: A proof of concept study. *J Neuroimmunol.* 2014 Sep 20. pii: S0165-5728(14)00885-6. doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.09.008. [Epub ahead of print]

Montarolo F, Raffaele C, Perga S, Martire S, Finardi A, Furlan R, Hintermann S, Bertolotto A. Effects of isoxazolo-pyridinone 7e, a potent activator of the nurr1 signaling pathway, on experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *PLoS One.* 2014 Sep 29;9(9):e108791.

Navone ND, Perga S, Martire S, Berchiolla P, Malucchi S, Bertolotto A. Monocytes and CD4+ T cells contribution to the under-expression of NR4A2 and TNFAIP3 genes in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2014 Jul 15;272(1-2):99-102.

Capobianco M, Piccoli G, Neve Vigotti F, Scapoli P, Deagostini MC, Albera C, Roccatello D, Bertolotto A. Interferon beta-related nephropathy and interstitial lung disease: a new association and a long-term warning. *Mult Scler.* 2014 Jan 20. [Epub ahead of print]

Di Battista G, Bertolotto A, Gasperini C, Ghezzi A, Maimone D, Solaro C. Multiple Sclerosis State of the Art (SMART): A Qualitative and Quantitative Analysis of Therapy's Adherence, Hospital Reliability's Perception, and Services Provided Quality. *Mult Scler Int.* 2014;2014:752318.

Gnanapavan S, Hegen H, Khalil M, Hemmer B, Franciotta D, Hughes S, Hintzen R, Jeromin A, Havrdova E, Tumani H, Bertolotto A, Comabella M, Frederiksen J, Alvarez-Cermeño JC, Villar L, Galimberti D, Myhr KM, Dujmovic I, Fazekas F, Ionete C, Menge T, Kuhle J, Keir G, Deisenhammer F, Teunissen C, Giovannoni G. Guidelines for uniform reporting of body fluid biomarker studies in neurologic disorders. *Neurology*. 2014 Sep 23;83(13):1210-1216.

Capobianco M, di Sapia A, Malentacchi M, Malucchi S, Matta M, Sperli F, Bertolotto A. No impact of current therapeutic strategies on disease reactivation after natalizumab discontinuation: a comparative analysis of different approaches during the first year of natalizumab discontinuation. *Eur J Neurol*. 2014 Jul 3. doi: 10.1111/ene.12487. [Epub ahead of print]

Bertolotto A, Capobianco M, Amato MP, Capello E, Capra R, Centonze D, Di Ioia M, Gallo A, Grimaldi L, Imberti L, Lugaresi A, Mancinelli C, Marrosu MG, Moiola L, Montanari E, Romano S, Musu L, Paolicelli D, Patti F, Pozzilli C, Rossi S, Salvetti M, Tedeschi G, Tola MR, Troiano M, Zaffaroni M, Malucchi S; Italian Multiple Sclerosis Study group. Guidelines on the clinical use for the detection of neutralizing antibodies (NAbs) to IFN beta in multiple sclerosis therapy: report from the Italian Multiple Sclerosis Study group. *Neurol Sci*. 2014 Feb;35(2):307-16.

Hegen H, Millionig A, Bertolotto A, Comabella M, Giovannoni G, Guger M, Hoelzl M, Khalil M, Killestein J, Lindberg R, Malucchi S, Mehling M, Montalban X, Polman CH, Rudzki D, Schautzer F, Sellebjerg F, Sørensen PS, Deisenhammer F. Early detection of neutralizing antibodies to interferon-beta in multiple sclerosis patients: binding antibodies predict neutralizing antibody development. *Mult Scler*. 2014 Apr;20(5):577-87.

Di Sapia A, Bertolotto A, Melillo F, Sperli F, Malucchi S, Troni W. A new neurophysiological approach to assess central motor conduction damage to proximal and distal muscles of lower limbs. *Clin Neurophysiol*. 2014 Jan;125(1):133-41.

3.2. Seminari e conferenze con affiliazione al NICO

I componenti del gruppo hanno partecipato con relazioni e/o moderazioni ai principali convegni nazionali ed internazionali incentrati sulla Sclerosi Multipla

3.3. Altri prodotti riconducibili alle attività Istituzionali del NICO

3.3.1. Organizzazione di seminari, conferenze e workshops

Corso Biogen Idec “La gestione quotidiana del paziente con Sclerosi Multipla”, Orbassano (TO), 12-14 Giugno 2014.

Corso Biogen Idec “La gestione quotidiana del paziente con Sclerosi Multipla”, Orbassano (TO), 17-19 Novembre 2014

Nel 2014 Responsabilità scientifica de:

- Convegno “Si può modificare il sistema immunitario? E la gestione della sclerosi multipla?” 31 gennaio 2014
- “Risonanza magnetica e prognosi nel paziente con sclerosi multipla” 21 ottobre 2014

4. Finanziamenti per la ricerca

Contratto di ricerca con:

Novartis *Clinical effect of a Nurrl agonist on Relapsing-remitting EAE; scadenza 30-06-2014, importo complessivo 50.000 €*

Merck *"Prediction of clinical IFN β response and differences among IFN β preparations: a gene expression analysis"* 2012-2014 importo complessivo 100.000 €

TEVA Italia: *"T regulatory cells (Treg) in pregnancy and Copaxone treated Multiple Sclerosis (MS) patients"* 01/11/2013 – 31/10/2015. Finanziamento erogato: € 50.000

Progetto Fondazione Cosso, 2011 -2015: responsabile dott.ssa Martina Borghi *"Confrontarsi per vivere meglio: incontri di gruppo per le persone che hanno ricevuto la diagnosi di Sclerosi Multipla"* Durata 5 anni Importo complessivo 100.000 €

FISM; Code 2013/S/4; *Biomarcatori di diagnosi e prognosi nella Sclerosi Multipla: possibile ruolo delle isoforme della Vitamina D Binding Protein;* 14/01/2014 - 14/01/15. Finanziamento erogato: € 80.000

PROGETTI DI RICERCA GIOVANI RICERCATORI - RICERCA FINALIZZATA 2010 (Ministero Salute): Project Code: GR-2010-2315964 *"The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) as a peacekeeper in inflammation and immunity: a link between TNFAIP3 deregulation and Multiple Sclerosis"* finanziamento erogato: € 263.000, durata 3 anni, Responsabile del progetto Simona Perga

Resoconto (anno 2014) e progetto delle attività di ricerca per il 2015 del gruppo **Neurogenesi adulta**, presso l'Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO)

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

1. Composizione del gruppo di ricerca (1-11-2014)

1.1. Personale strutturato dell'Università di Torino

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

1.2. Personale non strutturato

Roberta Parolisi (dottoranda)
Sara Trova (dottoranda)
Giulia Nato (dottoranda)
Sara Bonzano (dottoranda)

Partecipano alle attività di ricerca del gruppo studenti di Lauree Triennali e Magistrali in Scienze Biologiche, Scienze Naturali e della Scuola Universitaria Interfacoltà per le Biotecnologie.

2. Progetti di ricerca (2014-2015)

L'attività del gruppo è focalizzata alla caratterizzazione morfologica, molecolare e funzionale delle nicchie staminali cerebrali, della neurogenesi adulta e di altri fenomeni di plasticità strutturale, in diverse specie di mammiferi, in risposta a stimoli ambientali e/o patologici.

Il lavoro di ricerca si sviluppa secondo due filoni principali:

- i) lo studio dei processi di regolazione attività-dipendente della neurogenesi nelle zone neurogeniche adulte, intese sia come nicchie staminali propriamente dette (zona sottoventricolare, SVZ; zona sottogranulare, SGZ), sia come progenitori sparsi nel parenchima del sistema nervoso centrale; l'obiettivo è conoscere meglio i diversi tipi cellulari che possono rappresentare fonti endogene di plasticità, rigenerazione, riparazione, e i meccanismi molecolari e cellulari che ne regolano proliferazione, migrazione, specificazione e differenziamento/integrazione;
- ii) l'analisi delle risposte che tali fonti endogene di progenitori sono in grado di generare in modelli sperimentali di malattie neurologiche, nonché l'identificazione dei meccanismi che li sottintendono, al fine di prospettare nuovi approcci terapeutici per stati patologici a tutt'oggi praticamente incurabili.

Per raggiungere questi obiettivi vengono analizzati vari aspetti e utilizzati diversi approcci:

- a) cellulari, molecolari e di sviluppo (per comprendere come il sistema nervoso possa mantenere - o perdere - la plasticità strutturale nella vita postnatale/adulta, e i meccanismi chiave che sono alla base dell'insorgenza di malattie neurologiche e mentali);
- b) comparativi (per caratterizzare meglio le differenze e/o similitudini in termini di plasticità cerebrale nei diversi mammiferi al fine di comprendere a fondo la "logica evolutiva" che rende possibili i fenomeni di plasticità, neurogenesi e riparazione nel sistema nervoso di diverse specie di mammiferi, uomo incluso);
- c) di modellizzazione di patologia e/o lesione (per applicare le conoscenze di cui ai punti (a) e (b) in modelli animali in cui le anomalie caratteristiche delle più comuni malattie e/o lesioni neurologiche sono indotte sperimentalmente e/o geneticamente, e per identificare ed eventualmente modulare a scopo terapeutico il contributo di fonti endogene di plasticità strutturale e neurogenesi).

In sintesi il nostro gruppo di ricerca punta alla comprensione dei meccanismi di base che regolano e modulano l'attività di cellule staminali e progenitori neurali già presenti nel nostro cervello (fonti endogene) al fine di generare nuove cellule nervose e/o gliali a scopo riparativo. L'obiettivo è sfruttare tali capacità endogene nella prevenzione e/o terapia di malattie neurologiche e mentali.

2.1. Meccanismi cellulari/molecolari di regolazione della neurogenesi adulta in modelli murini e ruolo fisiologico (linea di ricerca 1, a)

Ruolo dell'interazione Semaforina7A-PlexinaC1 nella regolazione dei processi neurogenici nell'encefalo adulto

Gli obiettivi scientifici del presente progetto sono diretti a dimostrare il ruolo dell'interazione tra Sema7A e PlexinaC1 nella neurogenesi adulta ippocampale ed investigare le vie di segnale attivate a valle dell'interazione recettore-ligando, per definire i meccanismi molecolari alla base del controllo della proliferazione dei progenitori neuronali adulti. La Sema 7A è una proteina di membrana, originariamente identificata nelle cellule del sistema immunitario e successivamente descritta in diversi organi, incluso il cervello, dove è coinvolta in processi chiave per il corretto sviluppo dei circuiti nervosi, regolando la migrazione neuronale e la crescita neuritica (Jongbloets et al., *Semin Cell Dev Biol* 2013). Gli effetti della Semaforina 7A sono mediati da due recettori, plexina C1 (Tamagnone et al, *Cell* 1999) e integrina β 1 (Pasterkamp et al, *Nature* 2003). Entrambi questi recettori sono espressi nel sistema nervoso, tuttavia i dati ad oggi disponibili in questo sistema sono principalmente relativi all'interazione tra Sema7A/integrina, mentre gli effetti e i mediatori molecolari attivati a valle dell'interazione Sema7A/plexinaC1 sono ignoti.

Studi condotti negli ultimi anni in laboratorio su un modello knock out per la Sema7A (Sema7A KO, Pasterkamp et al., *Nature* 2003) hanno dimostrato il coinvolgimento di questa proteina nel controllo del fenomeno della risposta neurogenica indotta in seguito a stimolo feromonale in topi maschi (Schellino et al., in preparazione). Inoltre, l'analisi di topi mutanti in cui è deleta la funzione del recettore plexina C1 (plexinC1 KO, Pasterkamp et al., *Nature* 2003) ha rivelato un'alterazione nella neurogenesi adulta ippocampale (Schellino et al., in preparazione). In particolare, nei topi privi di plexina C1 si osserva un incremento del numero dei neuroni neo-generati, suggerendo il coinvolgimento di questo recettore nel controllo della proliferazione neuronale. Questi dati sono in linea con risultati ottenuti sul ruolo di plexina C1 nel controllo della proliferazione cellulare nel melanoma, un tumore della pelle molto aggressivo, derivato dai melanociti (Lazova et al., *Am J Dermatopathol* 2009 ;Chen et al., *Oncogene* 2012).

Gli obiettivi scientifici del progetto sono dunque diretti a dimostrare il ruolo dell'interazione tra Sema7A e PlexinaC1 nella neurogenesi adulta ippocampale e a caratterizzarne le vie di segnalazione intracellulare. A questo scopo saranno condotti esperimenti per manipolare l'espressione e il funzionamento di Sema7A e di plexina C1 selettivamente nella nicchia neurogenica dell'ippocampo in vivo e in vitro. Ci focalizzeremo inoltre sul ruolo di alcune citochine già note controllare sia la risposta immunitaria che la neurogenesi, quali IL-3 e IL-6 per valutare una possibile interazione del sistema Sema7A/plexinaC1 e citochine nel controllo della proliferazione dei progenitori neuronali adulti.

Collaborazioni: Jeroen Pasterkamp (Department of Neuroscience and Pharmacology University Medical Center (UMC) Utrecht; The Netherlands); Luca Tamagnone (Dip. Di Oncologia, Torino);

Paolo Giacobini (Inserm, Jean-Pierre Aubert Research Center, Unité 837, Lille, France); Annalisa Buffo (Nico. Torino).

Potenziali ricadute future:

I risultati che ci proponiamo di raggiungere rappresenteranno un significativo avanzamento rispetto alle attuali conoscenze sul ruolo dell'interazione Sema7A-plexina C1 nel cervello adulto con potenziali ricadute anche in ambito oncologico ed immunologico.

Caratterizzazione dell'espressione e ruolo di COUP-TFI nelle nicchie neurogeniche adulte

COUP-TFI è un recettore orfano appartenente alla superfamiglia dei recettori degli ormoni steroidei/tiroidei; è espresso nell'encefalo, sia durante lo sviluppo sia nell'adulto. La maggior parte di studi su questo fattore sinora condotti sono stati focalizzati sullo sviluppo encefalico embrionale, dove COUP-TFI è stato dimostrato avere un ruolo chiave in diverse fasi del processo neurogenico (dalla specificazione alla proliferazione e migrazione cellulare, sino al controllo della regionalizzazione della neocorteccia; Alfano et al., Cell Mol Life Sci 2013). COUP-TFI è ampiamente espresso anche nell'encefalo adulto, dove il suo ruolo è ancora largamente inesplorato. Recentemente, abbiamo dimostrato il ruolo di COUP nel controllo del mantenimento attività-dipendente del fenotipo delle cellule dopaminergiche del bulbo olfattivo di topo (Bovetti et al., Development 2013). Dati preliminari del laboratorio dimostrano inoltre l'espressione di COUP-TFI nelle nicchie neurogeniche adulte del giro dentato dell'ippocampo e dell'SVZ.

Il progetto ha come obiettivo di studiare il ruolo di COUP-TFI nella neurogenesi adulta utilizzando modelli murini wild-type (wt) e transgenici in vivo ed in vitro. Sarà condotta una dettagliata analisi morfologica/molecolare per identificare i tipi cellulari esprimenti COUP-TFI nelle nicchie neurogeniche. Esperimenti di "loss of function" saranno effettuati attraverso delezione selettiva di COUP-TFI nelle cellule staminali neurali adulte mediante approcci genetici (tecnologia Cre/loxP inducibile). L'effetto della delezione selettiva di COUP-TFI sarà valutato rispetto alle diverse fasi del processo neurogenico (specificazione, proliferazione, maturazione e attività cellulare) in vivo e in vitro su colture di cellule staminali neurali. Al fine di identificare possibili geni target dell'azione di COUP-TFI nei progenitori neuronali adulti saranno inoltre condotte analisi di mRNA Seq su progenitori neuronali separati tramite FACS, confrontando cellule derivate da animali wt con cellule in cui è stato selettivamente deletato COUP-TFI.

Collaborazioni: Michèle Studer (Inserm U1091, CNRS UMR7277, Univ. de Nice Sophia Antipolis, France); Salvatore Oliviero (Dbios e HUGEF, Torino)

Potenziali ricadute future: Negli ultimi anni diversi studi hanno dimostrato un coinvolgimento di COUP-TFI in differenti neuropatologie umane. In particolare, i pazienti aploinsufficienti per COUP-TFI presentano grossi difetti cognitivi, un apprendimento rallentato, delle eterotopie nella sostanza grigia e convulsioni febbrili. Se le nostre ipotesi di un ruolo di COUP-TFI sulle staminali/progenitori neurali saranno confermate, in particolare per quanto riguarda l'ippocampo - struttura coinvolta in processi di memoria e apprendimento- un potenziale sviluppo della ricerca sarà diretto ad investigare il possibile coinvolgimento di COUP-TFI in processi di declino cognitivo associati all'invecchiamento e/o processi neurodegenerativi

2) Ruolo funzionale dei neuroni neogenerati nel bulbo olfattivo accessorio

Studi precedenti effettuati nel nostro laboratorio hanno dimostrato la presenza di interneuroni neogenerati nel bulbo olfattivo accessorio (AOB) dei roditori adulti. Questo nucleo è parte integrante del sistema vomero-nasale ed è pertanto coinvolto nell'elaborazione di stimoli sensoriali che regolano il comportamento sociale e sessuale. Recentemente, abbiamo dimostrato che le cellule neogenerate nell'AOB giocano un ruolo chiave nella formazione della memoria olfattiva per "mating partner" nelle femmine adulte di topo, supportando: i) che la neurogenesi adulta in questa regione contribuisce a meccanismi indispensabili per la sopravvivenza della specie, ii) che l'AOB

rappresenta un modello ottimale per la comprensione dei processi di specificazione e di integrazione di nuovi elementi nervosi nel SNC maturo. Gli obiettivi che ci proponiamo di raggiungere nel corso del 2015 saranno:

- i) valutare il processo di integrazione delle cellule neogenerate nei circuiti bulbari delle femmine prepuberi e adulte in seguito a stimolazione sensoriale specifica con feromoni maschili di conspecifici (maschi fratelli e estranei);
- ii) valutare il coinvolgimento dei neuroni neogenerati in meccanismi di riconoscimento individuale tramite l'utilizzo di specifici paradigmi comportamentali (es. preferenza delle femmine per il maschio familiare);
- iii) analizzare la neurogenesi in alcuni modelli knock-out per una proteina G (Gy8) espressa specificamente in un subset di neuroni vomeronasali che evidenziano anomalie nel comportamento socio-sessuale in entrambe i sessi.

Il processo di integrazione degli interneuroni dell'A OB sarà studiato tramite analisi quantitative e morfologiche della neurogenesi, a diversi tempi di sopravvivenza dopo l'inoculazione di BrdU, e in seguito a diversi protocolli di esposizione delle femmine alla lettiera di maschi riproduttori (fratelli e estranei). Il coinvolgimento funzionale degli elementi neo-generati nei circuiti maturi, nelle diverse condizioni sperimentali sarà valutato tramite analisi comportamentali e in situ dell'espressione di c-fos.

Potenziati ricadute: in generale da questo studio ci aspettiamo di definire se la capacità di integrare nuove cellule nell'A OB possa essere una strategia che ricopre molteplici funzioni correlate al riconoscimento olfattivo e di contribuire alla comprensione di meccanismi di base che guidano la specificazione e l'integrazione di nuovi neuroni nel SNC dei mammiferi adulti.

Collaborazioni: Livio Oboti (Center for Neuroscience Research. Children's National Health System. Washington, D.C., USA); Claudio Giachino (Dept of Biomedicine University of Basel); Roberto Tirindelli (Università di Parma), Carla Mucignat (Università di Padova); Giancarlo Panzica (NICO, Torino).

3) *Interazione tra sistema GNRH e neurogenesi adulta*

Sebbene sia stato dimostrato che alcuni ormoni adeno-ipofisari (ad esempio, PRL, LH) e gonadici sono capaci di modulare direttamente la neurogenesi adulta in entrambe le nicchie neurogeniche (Larsen & Grattan, 2012, Brain, Behavior, and Immunity) non ci sono ancora dati disponibili su una possibile relazione diretta tra la neurogenesi adulta e il sistema dei neuroni a GnRH. Questi neuroni si trovano nella zona preottica dell'ipotalamo e controllano l'attività riproduttiva regolando la liberazione delle gonadotropine adenoipofisarie (Roa, 2013, International Journal of Endocrinology). Lo scopo del progetto è verificare se l'ottimizzazione della funzione riproduttiva passa attraverso l'esistenza di una possibile e diretta integrazione funzionale tra la neurogenesi adulta e il sistema GnRH. Il piano sperimentale prevede:

- a) analisi spazio-temporale dell'espressione dei recettori per il GnRH e degli ormoni gonadici nei differenti tipi cellulari che caratterizzano le nicchie neurogeniche adulte. Questo obiettivo sarà raggiunto mediante dissezione degli strati germinativi, marcatura con anticorpi specifici dei diversi tipi cellulari e analisi di cell sorting (MACS, FACS);
- b) analisi del processo di neurogenesi su un modello di topo knock out condizionale per il GnRH (*GnRH::Cre; Dicer^{loxP/loxP}*), recentemente sviluppato nel laboratorio del Dr Paolo Giacobini in Francia;
- c) analisi dell'attività funzionale del GnRH in topi con ridotta e/o aumentata neurogenesi adulta. A questo fine utilizzeremo modelli di ablazione della neurogenesi indotta tramite somministrazione di citosina- β -D-arabifuranoside (Ara-C), o per via genetica (NSE-DTA; Imayoshi I. et al., 2008, Nat Neuroscience). Per contro, gli effetti di aumento della neurogenesi sull'attività del sistema a GnRH saranno esaminati in modelli di arricchimento sociale e ambientale, e dopo la corsa, condizioni note per aumentare la produzione e l'integrazione di nuovi neuroni nell'encefalo maturo (Kemperman G 2011, Eur. J. Neurosci).

Potenziali ricadute future: La conoscenza dei fattori molecolari e/o dei meccanismi che regolano un possibile collegamento bidirezionale tra il sistema a GnRH e la neurogenesi adulta potrebbe avere interessanti ricadute traslazionali nel contesto dello sviluppo di potenziali terapie endogene per il trattamento di patologie riproduttive, e più in generale per comprendere l'eziologia di stati patologici caratterizzati da una ipofunzione del sistema a GnRH.

Collaborazioni: Dr Paolo Giacobini (Inserm, Jean-Pierre Aubert Research Center, Unité 837, Lille, France).

2.2. Studio comparativo su zone neurogeniche classiche e non in diversi mammiferi (cavia, delfino, pecora) (linea di ricerca 1, b)

Identificazione di progenitori parenchimali nello striato della cavia postnatale

Nel corso del 2014 abbiamo identificato e caratterizzato un nuovo sistema neurogenico nello striato e nella capsula esterna dell'encefalo della cavia (*Cavia porcellus*) (Luzzati et al., Development, 2014). I nostri dati indicano la presenza di progenitori neuronali quiescenti in grado di attivarsi nel corso della vita postnatale (fenomeno transiente limitato al primo mese di vita). L'origine di tali neuroni è stata identificata in cellule di tipo astrocitario. L'analisi del fenotipo dei neuroni neogenerati indica che questi appartengono a un tipo di neurone sconosciuto la cui esistenza è transiente. Similmente ai neuroni generati in seguito a lesioni dello striato, queste cellule tendono ad inserirsi nei fasci di sostanza bianca della capsula esterna. E' interessante notare che tale fenomeno non può essere annoverato tra gli esempi di neurogenesi adulta, che peraltro esiste nello striato del coniglio (Luzzati et al., 2006), mentre entrambi i fenomeni sono assenti nel topo e nella pecora (vedi oltre). Ciò dimostra come i fenomeni di plasticità strutturale, e di neurogenesi in particolare, risultino eterogenei nei mammiferi, e come tale conoscenza sia essenziale nel guidare la traslazione dei risultati della sperimentazione animale verso l'uomo. Nel corso di quest'anno verrà intrapreso uno studio comparativo in microscopia elettronica per confrontare a livello ultrastrutturale i fenomeni neurogenici striatali di cavia e coniglio. Effettueremo inoltre analisi di microscopia elettronica per definire i rapporti che intercorrono tra i processi delle cellule neogenerate e le fibre nervose mielinizzate.

*Caratterizzazione della neurogenesi periventricolare nei mammiferi marini (*Tursiops truncatus*, *Stenella coeruleoalba*)*

Negli ultimi anni le differenze riscontrate tra i mammiferi sono state ricondotte ai diversi tipi di vita degli animali e alle diverse nicchie ecologiche da essi occupate. La scelta di usare il delfino come modello non è soltanto legata alla particolare nicchia ecologica (mammifero marino) ma anche all'assenza di olfatto e di strutture olfattive nell'encefalo.

Nel corso del 2014 abbiamo iniziato a caratterizzare l'estensione e la citoarchitettura della zona neurogenica periventricolare del delfino neonato (*Tursiops truncatus*), arrivando a concludere che essa è estremamente ridotta rispetto alle notevoli dimensioni dell'encefalo (simile a quella del topo ma in un cervello con un volume 40 volte maggiore). L'obiettivo finale è una caratterizzazione morfologica e immunocitochimica dell'intera area periventricolare del neonato, del postnatale (3-6 mesi) e dell'adulto (fino a 20-50 anni).

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

Sono state realizzate le seguenti fasi:

- 1) Definizione di un atlante del delfino neonato (non esistente in letteratura)

- 2) Identificazione dell'eventuale presenza di strato sottoventricolare (SVZ) nelle diverse porzioni del ventricolo (con colorazioni istologiche su sezioni coronali) di *Tursiops truncatus* neonato
- 3) Eventuale presenza di addensamento di astrociti nell'SVZ e presenza di proliferazione cellulare nell'SVZ (Ki67)

Verranno realizzate quest'anno:

- 4) Identificazione dell'eventuale presenza di strato sottoventricolare (SVZ) nelle diverse porzioni del ventricolo di *Stenella coeruleoalba* postnatale
- 5) Identificazione dell'eventuale presenza di strato sottoventricolare (SVZ) nel delfino adulto

Sulla base dei primi risultati ottenuti si può confermare che il cervello di questi mammiferi marini si trova ad un avanzato stadio di sviluppo già alla nascita e si può ipotizzare che la neurogenesi è già in una fase terminale o quantomeno fortemente ridotta (un'osservazione che ben correla con l'assenza di bulbo olfattivo). L'obiettivo finale è quello di usare questo modello animale per dimostrare fino a che punto l'esistenza di neurogenesi adulta è legata alla presenza della funzione fisiologica (sostituzione di neuroni nel bulbo olfattivo).

Collaborazioni: Prof Bruno Cozzi, Università di Padova (Marine Mammals Tissue Bank)

Studio di progenitori neurali e neuroni immaturi nel sistema nervoso della pecora

Un altro aspetto di plasticità strutturale è rappresentato dai cosiddetti 'neuroni immaturi', che esprimono la proteina citoscheletrica Doublecortin (DCX) pur non essendo neogenerati (si veda Bonfanti e Nacher, 2012, Prog Neurobiol). Queste cellule con morfologia matura e aspetto molecolare immaturo non presentano sinapsi sulla membrana e sono considerate elementi *stand by* in attesa di integrazione. Mentre in topo/ratto i neuroni immaturi si trovano solo nella paleocorteccia, in altre specie (coniglio, pecora) sono presenti anche in quasi tutta la neocorteccia. Essi contribuiscono pertanto a quell'eterogeneità che i fenomeni plastici assumono nei diversi mammiferi, rendendo difficile prevedere cosa accade nell'uomo e sfuggibile la logica evolutiva che li governa.

In questo progetto viene investigata la plasticità strutturale nell'encefalo della pecora (mammifero con encefalo di grandi dimensioni, girencefalo, e con aspettativa di vita lunga) con l'uso di DCX. L'obiettivo principale era capire se progenitori locali in grado di generare glia/neuroni, e/o neuroni immaturi sono presenti nell'encefalo della pecora postnatale e adulta. L'obiettivo finale è quello di usare la pecora come modello animale caratterizzato da encefalo di grandi dimensioni e girencefalo per capire meglio la logica seguita da diversi tipi di plasticità strutturale nei mammiferi. In un secondo tempo, sarà possibile studiare il comportamento di tale plasticità in un modello naturale di patologia neurodegenerativa dei ruminanti (*scrapie*, patologia simile al Creutzfeldt-Jacob dell'uomo).

I risultati ottenuti nel 2014 hanno permesso di identificare numerosi cluster di neuroblasti DCX+ nella capsula esterna della pecora adulta. L'analisi con bromodesossi-uridina (BrdU) iniettata durante la gravidanza e negli animali adulti sta portando ad escludere che tali cellule siano neogenerate nell'adulto. Si prospetta quindi la possibilità (da indagare ulteriormente nel prossimo anno) che si tratti di neuroni (o meglio neuroblasti) "immaturi", ma non corticali, che potrebbero costituire una riserva "stand by" in attesa di essere integrati altrove.

Il risultato è anche di interesse comparativo, in quanto si presenta un quadro eterogeneo in diversi mammiferi e nella stessa regione: neurogenesi striatale adulta nel coniglio, neurogenesi postnatale e transiente nella cavia (striato e capsula esterna), cluster di neuroblasti "immaturi" ma non neogenerati nella pecora, assenza di tutti questi fenomeni nel topo (ma genesi di neuroni indotta da lesione - vedi progetto 2.1).

Collaborazioni: Dr. Cristiano Corona, Istituto Zooprofilattico Sperimentale Piemonte-Liguria; Dr. Frederic Levy, INRA, Nouzilly, Francia.

Potenziabili ricadute future: I neuroni immaturi potrebbero costituire fonti alternative di plasticità/riparazione, indipendenti dalle zone neurogeniche, per future prospettive terapeutiche.

2.3. Destino e funzione di progenitori neuronali parenchimali nel modello di neurodegenerazione dello striato indotto da acido chinolinico (linea di ricerca 2, c)

Lo scopo iniziale di questo studio era la definizione della natura, del sito di origine e della funzione di un processo di neurogenesi indotta sperimentalmente con inoculazione di acido chinolinico (modello di infiammazione locale e di Huntington) nello striato di topi adulti. Studi precedenti effettuati nel nostro laboratorio (Luzzati et al., 2011), hanno dimostrato che la degenerazione dei neuroni striatali induce migrazione di neuroblasti dall'SVZ verso le regioni lesionate e in parallelo attivazione di progenitori neuronali nel parenchima. Nel corso del 2014 abbiamo messo a punto il modello di lesione e caratterizzato la cronologia della risposta neurogenica, dimostrando che la neurogenesi striatale indotta origina da progenitori parenchimali di tipo astrocitario (Nato et al., under revision).

Nel corso di quest'anno il progetto si propone di analizzare il destino e l'eventuale ruolo funzionale dei neuroni neogenesi in seguito a lesione. E' stato ormai ben definito che la maggior parte dei neuroni prodotti in seguito a lesione sopravvive solo per poche settimane. Tuttavia durante la loro esistenza queste cellule acquisiscono morfologie complesse e molto eterogenee. Pertanto, per prima cosa effettueremo una analisi della morfologia e di questi neuroni attraverso ricostruzioni 3D e analisi ultrastrutturali in animali iniettati sia con BrdU sia con virus iniettati in diverse sottoregioni della SVZ o nel parenchima striatale. Per definire il ruolo funzionale dei nuovi neuroni striatali effettueremo esperimenti di ablazione utilizzando la linea murina Nestin-TK, in cui l'iniezione di ganciclovir porta alla ablazione dei progenitori neuronali proliferanti. Gli animali verranno poi sottoposti a diversi test comportamentali e/o protocolli di allenamento motorio utilizzati per l'analisi di lesioni unilaterali dello striato (spontaneous exploratory forelimb use, staircase test, single pellet reaching test). In parallelo, effettueremo analisi esplorative volte a definire eventuali alterazioni nell'anatomia dello striato, in particolare dal momento che i nuovi neuroni mostrano un forte tropismo per i fascicoli di sostanza bianca e che questi ultimi si rimodellano nel decorso post-lesione, effettueremo analisi approfondite dell'anatomia e dell'organizzazione di questi fasci.

Potenziali ricadute future: questi risultati potrebbero avere implicazioni determinanti per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici per malattie neurodegenerative o di origine vascolare (ictus) basati sulla sostituzione cellulare. *Collaborazioni:* Claudio Giachino (Dept of Biomedicine University of Basel); Annalisa Buffo (NICO, Torino) Gianvito Martino, Ospedale San Raffaele, Milano.

2. Prodotti delle attività di ricerca nel periodo Novembre 2013-Novembre 2014

2.1. Articoli pubblicati con affiliazione al NICO

Cattaneo E, Bonfanti L (2014) Therapeutic potential of neural stem cells: greater in people's perception than in their brains? *Front Neurosci* 8:79.

Peretto P, Bonfanti L (2014) Major unsolved points in adult neurogenesis: doors open on a translational future? *Front Neurosci* 8:154.

Luzzati F, Nato G, Oboti L, Vigna E, Rolando C, Armentano M, Bonfanti L, Fasolo A, Peretto P (2014)

Quiescent neuronal progenitors are activated in the juvenile guinea pig lateral striatum and give rise to transient neurons. *Development* 141:4065-4075.

Bonzano S, Bovetti S, Fasolo A, Peretto P, De Marchis S. (2014) Odour enrichment increases adult-born dopaminergic neurons in the mouse olfactory bulb. *Eur J Neurosci*. Sep 12. doi: 10.1111/ejn.12724.

Peretto P., Schellino R., De Marchis S., Fasolo P. (2014) The interplay between reproductive social stimuli and adult olfactory bulb neurogenesis. *Neural Plasticity* 497657.

Oboti L, Peretto P. (2014) How neurogenesis finds its place in a hardwired sensory system. *Front Neurosci*. 8:102.

Peretto P, Paredes RG. (2014) Social Cues, Adult Neurogenesis, and Reproductive Behavior. In: Mucignat-Caretta C, editor. *Neurobiology of Chemical Communication*. Boca Raton (FL), CRC Press (book chapter).

Luzzati F. (2014) Combining multichannel confocal laser scanning microscopy with serial section reconstruction to analyze large tissue volumes at cellular resolution. [Neuromethods](#). 87, 83-103 (book chapter).

Bonfanti L. (2014) Cellule staminali e malattie neurodegenerative: scienza ed etica. *GIORNALE dell'ACCADEMIA di MEDICINA di TORINO*

Bonfanti L. (2014) La nuova bioetica delle staminali: dalle cellule al paziente. *BIOETICA. Rivista interdisciplinare*. Torino.

Seminari e conferenze con affiliazione al NICO

Luca Bonfanti: *Staminali: cellule invisibili o troppo visibili?* TERAPIA CELLULARE NELLE MALATTIE NEURODEGENERATIVE E POST TRAUMATICHE DEL SNC: STATO DELL'ARTE, Ordine dei Medici, Torino, settembre 2014

Luca Bonfanti: *La sperimentazione con cellule staminali*. ETICA DELLA SPERIMENTAZIONE SUI VIVENTI, Torino, ottobre 2014.

Luca Bonfanti: *A comparative approach to neurogenesis*. San Raffaele PhD program "Cellular and animal models in neuroscience research". Milano, ottobre 2014.

Silvia De Marchis: *The olfactory bulb as a model to study neural plasticity in the adult brain*. La journée Scientifique des Neurosciences, Cadi Ayyad University, Marrakesh, Marocco, Maggio 2014

Paolo Peretto: *The interplay between pheromones adult neurogenesis and reproduction*. 75° Congresso dell'unione Zoologica Italiana, Bari – 22 – 25 Settembre 2014

Paolo Peretto: *Adult neurogenesis social stimuli and reproductive behaviour*. Cadi Ayyad University, Marrakesh, Marocco, Maggio 2014

2.2. Altri prodotti riconducibili alle attività Istituzionali del NICO (attività divulgative e di disseminazione della scienza):

Luca Bonfanti: Organizzazione della giornata nazionale sulle cellule staminali, UNISTEM DAY, Torino, marzo 2014

Luca Bonfanti: *Tutto e subito: è possibile? (traslazione e comunicazione della scienza)*; conferenza a UNISTEM DAY

Luca Bonfanti: *Staminali e metodo scientifico*. Conferenza alla SCIENTIFIC SUMMER ACADEMY della Fondazione Agnelli, Giugno 2014, Torino

Luca Bonfanti: *Genesi di neuroni e di controversie nel cervello umano*. Conferenza alla Scuola di Comunicazione della Scienza, La Morra, settembre 2014

Luca Bonfanti: *La necessità della Ricerca fondamentale*. Diretta radio ai CAFFE' SCIENTIFICI della Notte dei Ricercatori 2014

Luca Bonfanti: TRACKS: FACES IN THE RESEARCH. Video-intervista per la Notte dei ricercatori.

Luca Bonfanti: *La necessità della ricerca fondamentale*. Produzione ed esecuzione di una *graphic novel* e di un *video* nel contesto di HACKUNITO 2014 (con Alessandro Ciccarelli e Gabriele Ricchiardi).

Luca Bonfanti: *Neuroni, staminali, malattie: viaggio nella complessità*. LE FRONTIERE DELLE NEUROSCIENZE. Incontro organizzato dal liceo scientifico Leonardo Cocito presso Fondazione Ferrero, Alba 2014.

Federico Luzzati: *C'era una volta un neurone, storia di un groviglio chiamato cervello*. Conferenza nell'ambito della Notte dei Ricercatori 2014, Torino.

3. Fondi di ricerca ricevuti nel 2014

CRT Ricerca e Istruzione: 25.000 Euro (Coordin. Bonfanti)

Ricerca locale 2013: tot. 10.750 Euro (2700 Euro, Bonfanti; 3890 Euro, De Marchi; 2717 Euro, Peretto; 1451 Euro, Luzzati)

4. Fondi di ricerca ricevuti prima del 2014 ed ancora attivi

Peretto: PRIN 2010-2011 -MIUR (60.000 Euro)

Resoconto (anno 2014) e progetto delle attività di ricerca per il 2015 del gruppo **Neurobiologia della plasticità cerebrale**, presso l'Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO)

Responsabile del gruppo: Dott ssa **Annalisa Buffo**

Il gruppo, storicamente guidato da Ferdinando Rossi, è ora coordinato da Annalisa Buffo e diretto per le specifiche linee di ricerca da Annalisa Buffo, Daniela Carulli e Ketty Leto.

1. Composizione del gruppo di ricerca (01-11-2014)

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

Annalisa Buffo (RU)
Daniela Carulli (RU)
Ketty Leto (RTD)
Annarita De Luca (Tecnica di Laboratorio)
Tiziana Martone (Tecnica di Laboratorio)

1.2. Personale non strutturato

Enrica Boda (postdoc, borsista Fondazione Veronesi)
Elena Frola (postdoc, assegnista)
Valentina Cerrato (dottoranda)
Alessio Faralli (dottorando)
Elisa Fucà (dottoranda)
Elena Parmigiani (dottoranda)

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

2. Progetti di ricerca

Il lavoro di ricerca si sviluppa lungo tre filoni principali. Il primo è dedicato allo studio dei processi di plasticità, rigenerazione assonale e riparazione nel sistema nervoso centrale. In particolare, l'attività è attualmente diretta a capire i meccanismi molecolari (Intrinseci o estrinseci) che regolano i processi di plasticità e rigenerazione nel sistema nervoso, in condizioni normali o in seguito a una lesione. Il secondo filone è diretto a studiare i processi di specificazione fenotipica ed integrazione di nuovi neuroni nei circuiti nervosi. Questo ambito comprende sia studi fondamentali sui meccanismi che controllano la generazione dei diversi fenotipi cerebellari, sia esperimenti transazionali preclinici volti a sperimentare terapie di sostituzione cellulare in modelli murini di atassia spino-cerebellare e di Corea di Huntington. 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. Plasticità e rigenerazione assonale nel sistema nervoso centrale adulto

Una lesione del sistema nervoso centrale causa la morte dei neuroni o l'interruzione delle connessioni nervose, determinando gravi deficit sensoriali, motori o cognitivi. Le capacità rigenerative dei neuroni centrali sono molto limitate, e questo è in parte dovuto alla diminuzione di espressione di molecole che promuovono la crescita assonale durante lo sviluppo del sistema nervoso. Tuttavia, il sistema nervoso può in parte recuperare le funzioni compromesse grazie all'abilità dei neuroni di riorganizzare 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 non solo la diminuzione dell'espressione di fattori intrinseci neuronali che promuovono la crescita assonale, ma anche la produzione nell'ambiente extracellulare di molecole che inibiscono la crescita neuritica. In particolare, intorno alle sinapsi si formano aggregati di matrice extracellulare, le reti perineuronali, che stabilizzano (e quindi riducono) le capacità di rimodellamento strutturale. I processi plastici nel sistema nervoso centrale adulto, nonché il recupero funzionale dopo un danno, sono favoriti dall'interazione con l'ambiente esterno, sotto forma di stimoli sensoriali, motori, sociali e cognitivi (esperienza).

Obiettivo della nostra ricerca è capire quali sono i meccanismi alla base della plasticità neuronale in condizioni fisiologiche o dopo un danno, ed incrementare i processi plastici attraverso specifiche manipolazioni che rafforzino le proprietà intrinseche dei neuroni o portino ad una attenuazione dei meccanismi inibitori. Nello specifico, le attività afferenti a questa ricerca si articoleranno secondo cinque filoni principali.

2.1.a. Studio degli effetti della delezione di PTEN nei neuroni di Purkinje

Le capacità dei neuroni del SNC adulto di rigenerare il proprio assone in seguito ad un danno sono molto scarse. Le cellule di Purkinje del cervelletto ne sono un esempio paradigmatico, in quanto posseggono bassissime capacità rigenerative anche in presenza di un ambiente favorevole alla crescita assonale, come un trapianto di nervo periferico. Una delle cause della scarsa capacità rigenerativa dei neuroni centrali è la ridotta espressione di proteine che promuovono la crescita assonale. Tra i fattori intrinseci che regolano la rigenerazione assonale vi è la via di segnalazione PTEN/mTOR, che controlla la crescita cellulare. E' stato dimostrato che la fosfatasi PTEN blocca la rigenerazione assonale di neuroni adulti quali i neuroni del tratto corticospinale e le cellule ganglionari retiniche. Per testare se la delezione di PTEN promuove la rigenerazione assonale delle cellule di Purkinje utilizzeremo una linea di topi mutanti che non esprimono PTEN in tali neuroni.

Per esaminare le capacità rigenerative delle cellule di Purkinje dopo una lesione, eseguiremo delle assotomie nel cervelletto di topi di 2 mesi di età e analizzeremo la risposta dei neuroni di Purkinje alla lesione. Dal momento che mutazioni inattivanti il gene Pten sono associate alla comparsa di deficit tipici dello spettro autistico e che recentemente è stato scoperto che il cervelletto ha un ruolo nel controllo di funzioni cognitive e comportamenti sociali, studieremo se il nostro modello murino presenta tratti autistici, quali difetti nelle interazioni sociali, comportamenti ripetitivi e inflessibilità cognitiva.

2.1.b. Modificazioni molecolari e cellulari alla base del compenso vestibolare

E' noto che il sistema nervoso può recuperare in parte le funzioni compromesse da un danno grazie all'abilità dei neuroni di rimodellare le proprie connessioni (plasticità). La plasticità del SNC adulto è fortemente limitata da fattori presenti nell'ambiente extracellulare, come le reti perineuronali, aggregati di matrice extracellulare che circondano i terminali sinaptici, presenti intorno al soma e ai dendriti di numerosi tipi di neuroni, che stabilizzano i contatti sinaptici. Uno dei nostri obiettivi è quello di chiarire i meccanismi attività-dipendenti che regolano la plasticità compensatoria dopo un danno. A seguito di una labirintectomia unilaterale, i topi presentano severi deficit posturali che gradualmente migliorano fino al completo recupero a circa 1 mese dalla lesione. Durante la fase di recupero abbiamo osservato una forte diminuzione delle reti perineuronali e notevoli rimodellamenti assonali, con un ritorno del numero e dello spessore delle reti alla condizione di partenza in corrispondenza con il recupero comportamentale. Per capire il ruolo delle reti perineuronali nel compenso vestibolare, approfondiremo l'analisi del compenso vestibolare di topi mutanti che presentano reti perineuronali difettose (a causa della mancanza di una proteina fondamentale per la formazione delle reti, Bral2).

2.1.c. Ruolo di Reggie-1 nella plasticità assonale

Reggie-1 è una protein presente nei lipid rafts che promuove la rigenerazione assonale dei neuroni gangliari retinici dopo lesione del nervo ottico. Per chiarire se Reggie-1 svolge anche un ruolo importante nella plasticità assonale, abbiamo studiato gli effetti della sovraespressione di Reggie-1 (ottenuta mediante vettori virali) nei neuroni pre-cerebellari del ratto adulto, ed in particolare nei neuroni dell'oliva inferiore e della sostanza reticolare pontina. Abbiamo riscontrato che gli assoni di tali neuroni, che costituiscono le fibre rampicanti e le fibre muscoidi, presentano dei terminali presinaptici di maggiori dimensioni e un maggior numero di processi assonali, ad indicare un aumento delle capacità plastiche indotto da Reggie-1. Il nostro obiettivo è ora quello di studiare se le modificazioni strutturali dei terminali delle fibre rampicanti e delle fibre muscoidi portano ad alterazioni nella risposta delle cellule di Purkinje, che sono il target delle fibre rampicanti e delle fibre parallele (gli assoni dei granuli, che a loro volta ricevono input dalle fibre muscoidi).

2.1.d. Effetti della cura materna sulla plasticità cerebrale e la vulnerabilità alla psicopatologia

L'esposizione a stress nel periodo perinatale ha un impatto permanente sul sistema limbico cerebrale e causa un'augmentata vulnerabilità a disturbi psichici in età adulta. Abbiamo osservato che topi adottati da mamme con bassi livelli di cura materna hanno, in età adulta, un comportamento ansioso, un'augmentata risposta allo stress e reti perineuronali più spesse nel sistema limbico, in particolare nella corteccia prefrontale. Il neuropeptide Y (NPY) gioca un ruolo importante nel comportamento emotivo e nella risposta allo stress attraverso l'attivazione del recettore Y1R. Esponendo topi geneticamente modificati che non esprimono il recettore Y1 per il neuropeptide Y a diversi ambienti materni (con bassa o alta cura materna) è stato dimostrato dal gruppo della prof.ssa Carola Eva (Dipartimento di Neuroscienze di Torino) che i recettori Y1 nel sistema limbico sono fondamentali per la regolazione del comportamento ansioso modulato dai livelli di cura materna. Come nei topi esposti a bassi livelli di cura materna, anche nei topi knockout per il recettore Y1 abbiamo osservato che le reti perineuronali nella corteccia prefrontale sono più spesse. In questo progetto, svolto in collaborazione con la prof.ssa Carola Eva, il nostro obiettivo è ora capire in quale popolazione neuronale e in quali nuclei del sistema limbico, oltre alla corteccia prefrontale, sono presenti le modificazioni delle reti perineuronali. Esamineremo, inoltre, se la degradazione delle reti perineuronali determina una diminuzione del comportamento ansioso nei topi esposti a bassi livelli di cura materna o nei topi knockout per il recettore Y1.

2.1.e. Ruolo del cervelletto nella dipendenza da cocaina

In seguito ad un uso prolungato di cocaina sono state riportate delle alterazioni funzionali del cervelletto. Per capire meglio il ruolo del cervelletto nella dipendenza da droghe come la cocaina, abbiamo analizzato gli effetti della somministrazione cronica di cocaina sulla plasticità cellulare e molecolare del cervelletto del topo adulto. Abbiamo osservato una notevole riduzione del numero di spine dendritiche e dell'arborizzazione assonale delle cellule di Purkinje. In parallelo abbiamo riscontrato un aumento delle reti perineuronali attorno ai terminali di Purkinje nei nuclei profondi del cervelletto. Questo progetto, svolto in collaborazione con la prof.ssa Marta Miquel (Università di Castellon, Spagna), proseguirà con l'analisi degli effetti dell'ambiente arricchito sui topi a cui è stata somministrata la cocaina e con lo studio degli effetti dell'esposizione alla cocaina su topi con reti perineuronali ridotte (Bral2 KO).

Collaborazioni: Prof. Joost Verhaagen (Netherland Institute for Neuroscience, Amsterdam), Prof. Carola Eva (Dip. Neuroscienze, Università di Torino), Prof. Filippo Tempia e Dr Eriola Hoxha (Dip. Neuroscienze, Università di Torino), Prof. Roberto Albera e Dr Federico Dagna (Dip. Scienze Chirurgiche, Università di Torino) Prof. Toshi Oohashi (Okayama University, Japan), Prof. Marta Miquel (University of Castellon, Spain), Prof. Claudia Stuermer (University of Konstanz, Germany), Prof. Paul Lingor e Dr. Ian Koch (Department of Neurology University Medicine Göttingen, Germany)

2.2 Specificazione fenotipica e integrazione di nuovi neuroni nei circuiti nervosi

Relazioni di lignaggio tra interneuroni GABAergici e astrociti cerebellari

Attraverso i nostri esperimenti vogliamo indagare quali siano i siti e le modalità di produzione dei progenitori destinati a generare le diverse categorie di interneuroni inibitori del cervelletto. Questi progenitori derivano dalla zona ventricolare embrionale (VZ) e continuano a dividersi postnatalmente nella nascente sostanza bianca dei lobuli (PWM). Recenti evidenze in letteratura suggeriscono che tali precursori possano avere relazioni di lignaggio con i precursori deputati a generare gli astrociti cerebellari, anch'essi derivanti dalla VZ embrionale e anch'essi in divisione nella PWM postnatale. Abbiamo indagato questo punto attraverso diversi approcci in vivo e in vitro e abbiamo già raccolto una vasta coorte di dati a favore dell'esistenza di progenitori bipotenti nel cervelletto postnatale, in grado di generare sia interneuroni inibitori sia astrociti. Nei nostri esperimenti la complessa composizione dei colori espressi da cellule diverse ci ha permesso di definire vari cloni, identificandone alcuni composti da interneuroni inibitori e astrociti. Ci proponiamo di continuare lo studio sulle potenzialità di questi progenitori, sottolineandone le possibili differenze durante le diverse fasi di sviluppo cerebellare. In particolare indagheremo se tali progenitori primari nella VZ mostrino proprietà simili a quelle dei progenitori presenti nella PWM postnatale e se vi siano meccanismi comuni durante l'ontogenesi cerebellare a sostegno della produzione di appropriati numeri e tipi di interneuroni GABAergici e di astrociti.

Studio del ruolo del gene Sox-2 nello sviluppo e maturazione del cervelletto

Il principale obiettivo di questo progetto è analizzare le possibili funzioni del gene Sox-2 durante diversi stadi di sviluppo cerebellare embrionale e postnatale, sfruttando il modello offerto dalla linea di topi Sox2^{fl/fl}Wnt1Cre in cui l'espressione di tale gene è selettivamente silenziata nella coorte di cellule Wnt1-positive, a partire dal giorno embrionale (E) 8.5. Nei nostri cervelletti mutanti le cellule esprimenti Sox-2 sono del tutto assenti, mentre negli animali wild-type tali cellule sono distribuite sia negli epiteli germinali, sia nel parenchima cerebellare. Nei cervelletti maturi abbiamo verificato che l'espressione di Sox-2 è mantenuta esclusivamente dalla glia di Bergman nello strato delle Purkinje e dagli astrociti parenchimali dello strato granulare e della sostanza bianca. Ci proponiamo di esplorare ulteriormente le anomalie mostrate dai cervelletti mutanti attraverso valutazioni istologiche, morfologiche e comportamentali. Indagheremo se e come una parziale anomalia di localizzazione a carico di una frazione di cellule di BG possa essere associata a difetti di foliazione dei lobuli e ai sintomi atassici mostrati da questi mutanti. Inoltre indagheremo le dinamiche proliferative e i processi migratori dei progenitori in grado di generare i diversi tipi di astrociti parenchimali e le altre classi di cellule derivanti dalle VZ, come gli interneuroni inibitori.

Terapie di sostituzione cellulare in modelli murini di atassia cerebellare

Questa linea di ricerca intende testare l'efficacia di strategie di sostituzione cellulare nell'ambito di esperimenti traslazionali preclinici su modelli di degenerazione progressiva delle cellule di Purkinje (PCs) del cervelletto.

In precedenza abbiamo condotto esperimenti di trapianto su diversi modelli murini caratterizzati dalla degenerazione progressiva delle cellule di Purkinje (topi tambaleante, SCA2, ASM knockout) e abbiamo verificato la possibilità di sostituire le cellule danneggiate con nuovi neuroni sani, in grado di differenziarsi e integrarsi nella corteccia cerebellare dell'ospite, soprattutto nei casi in cui il trapianto viene effettuato in età embrionale o nella prima età postnatale.

La possibilità di ottenere un pieno recupero funzionale è tuttavia ostacolata dall'incapacità delle cellule trapiantate di ricostruire le corrette connessioni all'interno dei circuiti danneggiati. Intendiamo esplorare ulteriormente tali processi, associando agli effetti del trapianto cellulare quelli legati a specifici protocolli di training per il sostegno di funzioni motorie. Attraverso questi

esperimenti intendiamo incoraggiare e migliorare la ripresa funzionale attraverso una riabilitazione mirata, basata su protocolli specifici designati ad aumentare i livelli di riparazione anatomica.

Terapie di sostituzione cellulare in modelli murini di malattia di Huntington

Una prima parte di questo progetto intende analizzare la potenzialità delle cellule embrionali staminali umane (hES) H9 di sopravvivere, differenziarsi e integrarsi nello striato di ratti postnatali (P2-P3). Trapianti di cellule derivate dalle eminenze laterali ganglionari (LGE) a E15 di ratti β actinaGFP saranno usati come esperimenti di controllo per il trapianto di cellule H9 o di altri tipi cellulari candidati. In un altro set di esperimenti studieremo i meccanismi di integrazione e l'efficacia funzionale di linee cellulari provenienti da varie fonti, dopo trapianto in ratti wild-type e in modelli di HD. A tale scopo abbiamo precedentemente messo a punto il protocollo per ottenere il modello di HD in ratti adulti mediante iniezione unilaterale di acido chinolinico (QA). Indagheremo la sopravvivenza, la migrazione e la maturazione delle cellule trapiantate nei modelli di HD indotti da QA e confronteremo l'integrità e la connettività dei trapianti derivati da cellule staminali versus progenitori striatali primari in riceventi murini HD.

Infine, altri esperimenti saranno mirati ad utilizzare protocolli di training specifici per incoraggiare lo sviluppo di appropriate connessioni sinaptiche, per aumentare la crescita assonale e il recupero delle disfunzioni motorie e cognitive. Letteratura recente mostra come il comportamento e le esperienze effettuate dall'animale ricevente, sia attraverso gli stimoli presenti in condizioni di arricchimento ambientale, sia attraverso espliciti protocolli di training comportamentale possano influenzare la maturazione e l'integrazione dei trapianti striatali in particolare e aumentare la ripresa funzionale in vari casi di lesione. Pertanto, cercheremo di determinare se la ripresa funzionale associata ai trapianti di determinate linee cellulari possa essere ulteriormente rafforzata da procedure di training generalizzate (manipolazione, ruota, etc) e/o specifiche (uso forzato della zampa contralaterale alla lesione per compiti di raggiungimento/afferramento di pellet di cibo) e se i cambiamenti nel profilo funzionale possano essere associati a specifici miglioramenti nella sopravvivenza, differenziamento, maturazione e connettività delle cellule trapiantate.

Collaborazioni: Prof. Elena Cattaneo (Università di Milano); Prof. Silvia Nicolis (Università di Milano); Prof. Lorenzo Magrassi (Università di Pavia); Prof. Giacomo Consalez (Dibit, Milano); Prof. Austin Smith (Università di Cambridge); Prof. Garcia-Marques and Lopez-Mascaraque (Istituto Cajal, Madrid); Prof. Mikio Hoshino (National Institute of Neuroscience, Tokyo); Prof. Alain Chedotal (Università di Parigi); Prof. Steve Dunnett (Università di Cardiff).

2.3. Reazione del tessuto nervoso al danno

Nel corso degli ultimi anni ci siamo interessati ai meccanismi molecolari e cellulari che regolano la risposta al danno di cellule gliali e progenitori presenti nel tessuto nervoso. Per una più approfondita comprensione della fisiopatologia di questi elementi abbiamo allargato il nostro interesse allo studio dello sviluppo postnatale del sistema nervoso.

2.3.1. Progenitori degli oligodendrociti: equilibrio tra proliferazione e differenziamento, interazioni con i neuroni e patologie da alterazioni della mielina

I progenitori degli oligodendrociti (PO) sono una popolazione di progenitori presente anche nel tessuto nervoso adulto. Essi sono responsabili del turnover della mielina nel Sistema Nervoso Centrale (SNC) in condizioni fisiologiche e patologiche. La mielina è la guaina lipidica che ricopre gli assoni e ne incrementa la velocità di conduzione degli impulsi nervosi, proteggendoli al contempo da danni metabolici e ossidativi. Alterazioni a carico dei PO possono produrre anomalie mieliniche con conseguente malfunzionamento o danno del SNC. In diversi progetti paralleli

studiamo l'equilibrio tra amplificazione e differenziamento in queste cellule, le interazioni anatomiche e funzionali con i neuroni e il loro malfunzionamento in modelli di patologie della mielina.

DINAMICHE PROLIFERATIVE E DIFFERENZIALI DEI PROGENITORI DEGLI OLIGODENDROCITI In studi mirati alla comprensione delle dinamiche che permettono il mantenimento dei PO nel sistema nervoso adulto abbiamo scoperto che il destino dei PO è determinato al momento della nascita delle cellule e che questi precursori sfruttano meccanismi simili a quelli delle cellule staminali neurali dando luogo a divisioni asimmetriche che producono un nuovo progenitore e una cellula sorella indirizzata verso il differenziamento. Tuttavia, la diversità tra le due cellule figlie non dipende – come accade per le cellule staminali vere e proprie – da fattori presenti nella cellula madre ed ereditati solo da una cellula figlia, ma dalla capacità delle cellule neoprodotte di “silenziare” i caratteri ereditati dalla madre o “accendere” l'espressione di geni associati al differenziamento. Divisioni asimmetriche avvengono a carico solo di una quota di cellule ‘madri’. Altre, invece, si dividono simmetricamente autoreplicandosi o producendo due elementi indirizzati al differenziamento. L'esperienza dell'individuo, l'invecchiamento e le malattie neurologiche hanno un forte impatto su queste diverse proporzioni.

Tale eterogeneità tra cellule madri potrebbe essere spiegata dalla presenza nel tessuto nervoso di madri intrinsecamente diverse per proprietà o dalla risposta già durante la divisione cellulare stessa di elementi tutti equivalenti a segnali ambientali istruttivi. I nostri studi sono ora indirizzati a testare queste possibilità. Sappiamo che sottogruppi di cellule madri esprimono marcatori caratteristici come Hes5 e Sox2, o Mash1, fattori trascrizionali rispettivamente associati al mantenimento della staminalità o all'avvio di processi differenziali. In linee transgeniche appropriate valuteremo l'attività proliferativa e differenziale di questi sottogruppi in condizioni fisiologiche, dopo compiti motori specifici, durante l'invecchiamento e in condizioni di lesione mielinica. In esperimenti paralleli esamineremo il destino di cellule sorelle in animali NestinCreERT2 incrociati con una linea MADM nella quale nei quali progenitori degli oligodendrociti proliferanti verosimilmente appartenenti al sottogruppo Hes5-positivi ricombinano e producono cellule sorelle con colori diversi mantenendoli nel corso del differenziamento. Ci aspettiamo che le ‘madri’ Hes5-/Sox2- positive producano più frequentemente cellule che rimangono progenitore e che le cellule Mash1- positive procedano invece nel lignaggio. Per studiare i macchinari molecolari implicati nell'eterogeneità dei progenitori degli oligodendrociti procederemo anche a isolare i progenitori dal tessuto nervoso a diverse età (da P8 ai 18 mesi) con tecniche di MAC/FACS sorting per studiare in QRT-PCR i livelli d'espressione di geni implicati nei meccanismi di divisione asimmetrica/asimmetrica (Par3, componenti del pathway di Notch come Jagged, Aspm), invecchiamento (Phosphorylation of histone H2AX), eterogeneità di popolazione (Hes5, Mash1, Sox2). Nell'ambito di questa tematica abbiamo anche esaminato il destino di progenitori neurali overespressanti Jagged nel contesto di lesioni focali della mielina in collaborazione con V. Taylor e dimostrato che con molta più efficienza dei controlli essi producono cellule mielinizzanti.

Collaborazioni: MP Abbraccio, Università di Milano; P Rosa, CNR Milano; V Taylor, Department of Biomedicine, University of Basel; MP Postiglione, S. Hippenmeyer, IST, Innsbruck.

Sul fronte invece dei segnali estrinseci che potrebbero influenzare il destino dei progenitori degli oligodendrociti fin dalla nascita delle stesse cellule, abbiamo esaminato LA NATURA E IL RUOLO DEI CONTATTI GABAERGICI SUI PROGENITORI DEGLI OLIGODENDROCITI nel cervelletto murino postnatale e adulto. Infatti, in questo territorio i principali neuroni mielinizzati sono le cellule di Purkinje. La nostra analisi ci ha portato a caratterizzare la comparsa dei contatti sui progenitori e a dimostrare ex vivo in fettine organotipiche che i segnali GABAergici mediati dai recettori ionotropi o metabotropi non hanno lo stesso effetto: mentre l'attivazione dei segnali ionotropi blocca la proliferazione, l'attivazione dei metabotropi spinge le cellule a produrre mielina. Da notare che l'azione mediata dalle due famiglie di recettori è in realtà sinergica e volta a produrre

effetti maturativi. Gli stessi dati sono stati confermati in colture dissociate di progenitori degli oligodendrociti, a dimostrare che per quest'azione non sia necessaria una comunicazione di tipo sinaptico. Proseguiremo questi studi spostandoci su modelli in vivo. Stiamo infatti amplificando delle linee murine nelle quali specifiche subunità dei recettori GABAergici ($\alpha 1$, $\gamma 2$ per gli ionotropi e B1 per i metabotropi) saranno delete in maniera inducibile col fine di verificare cambiamenti di tipo proliferativo o differenziativo analoghi a quelli evidenziati in vitro e di caratterizzare il fenotipo delle cellule neoprodotte secondo le caratteristiche di asimmetria e simmetria sopra descritte. Prevediamo inoltre di verificare la presenza di contatti GABAergici su tessuto cerebrale umano e/o su colture di cellule umane. Infine, opereremo per modificare l'attività elettrica dei neuroni di Purkinje durante il periodo postnatale con i) protocolli di training cerebellare; ii) mutanti nei quali le Purkinje sono meno eccitabili; iii) manipolazioni ex vivo di tipo elettrofisiologico. L'obiettivo di questi esperimenti è verificare l'associazione tra alterazioni fenotipiche dei progenitori alla nascita e effetti differenziativi a lungo termine.

Osservazioni condotte in vitro su colture dissociate di progenitori degli oligodendrociti ci hanno anche convinti che a) l'azione dei segnali GABAergici abbia un chiaro effetto sul citoscheletro delle cellule più che sull'espressione genica; b) in colture dissociate i recettori GABAergici non sono aggregati in siti postsinaptici come avviene almeno per parte di essi in vivo. Rispetto alla linea a) esamineremo la cascata dei segnali a valle dell'attivazione dei recettori per individuare il meccanismo molecolare che ne media gli effetti citoscheletrici e morfologici. Sul fronte della linea b) riteniamo che quanto osservato dipenda dalla mancanza in vitro di segnali istruttivi, probabilmente prodotti dai neuroni. Studieremo quindi se l'esposizione a mezzo condizionato da neuroni o da astrociti promuove l'aggregazione dei recettori.

In parallelo, stiamo lavorando sulla possibilità che i PO esercitino funzioni neuromodulatorie e neurotrofiche sui neuroni. La presenza di contatti sinaptici pone queste cellule in una condizione privilegiata per monitorare l'attività neuronale e probabilmente rispondere a essa. Questa possibilità è ulteriormente sostenuta dall'espressione nei PO di una serie di canali ionici utili per il *buffering* del potassio e quindi per la modulazione dell'eccitabilità neuronale. Abbiamo registrato in MEA di colture ippocampali le variazioni dell'attività elettrica dopo esposizione acuta a PO trovando che i progenitori determinano una maturazione molto rapida della sincronizzazione neuronale. Poiché la sincronizzazione in queste colture avviene a seguito della maturazione dei segnali GABAergici, ipotizziamo che i PO stimolino questo processo. Si tratta ora di studiare i meccanismi cellulari (potenziamento dell'attività glutamatergica e/o GABAergica) che spiegano questa sincronizzazione e i mediatori molecolari da contatto o solubili prodotti dai progenitori che la determinano. Questa caratterizzazione rivelerà target molecolari e cellulari da manipolare in vivo. In parallelo allestiremo modelli in vivo in cui i PO verranno eliminati in maniera regolata. In questo modello esamineremo gli effetti dell'ablazione dei PO sulla circuiteria ippocampale e cerebellare e sulla sopravvivenza neuronale in un modello di sclerosi multipla progressiva (delezione in fase cronica). Possibili effetti neuroprotettivi dei PO saranno anche studiati in vitro in coculture di PO e neuroni corticali trattati con stimoli eccitotossici.

Collaborazioni: M Sassoè Pognetto, Università di Torino, A Marcantoni, E Carbone, Università di Torino), Gianvito Martino, Università San Raffaele.

Ancora sulla linea di studio delle funzioni dei progenitori degli oligodendrociti stiamo per completare un'analisi dedicata alla chinasi Citron come REGOLATORE INTRINSECO DELLA DIVISIONE CELLULARE NEI PROGENITORI DEGLI OLIGODENDROCITI. La chinasi Citron è un regolatore essenziale della citochinesi ma non possiede un'espressione ubiquitaria. Nel sistema nervoso Citron è essenziale per l'esecuzione corretta delle divisioni dei progenitori di alcune popolazioni neuronali. La sua assenza determina la produzione di neuroni multinucleati che muoiono per apoptosi. Nessun difetto era noto a carico del lignaggio gliale. Studiando un ceppo murino KO per Citron, abbiamo scoperto che in assenza di Citron gli oligodendrociti e gli astrociti si riducono fortemente in numero e presentano divisioni difettose che conducono alla formazione di

una frazione di cellule multinucleate. La riduzione numerica è disomogenea tra le varie parti del tessuto nervoso. In particolare è particolarmente accentuata nella corteccia cerebrale mentre striato e talamo mantengono un numero maggiore di PO, a suggerire che diverse popolazioni di PO utilizzino diversi macchinari per la divisione. Tuttavia, indipendentemente dalla zona telencefalica esaminata, le proteine della mielina sono sempre assenti a indicare che questi progenitori non procedono nel differenziamento. Consolidiamo questo dato con analisi in microscopia elettronica. Al fine di discriminare componenti intrinseche ai PO e estrinseche tissutali responsabili di questo difetto maturativo abbiamo incrociato il ceppo Citron KO con topi P53KO in modo da bloccare i fenomeni apoptotici, eseguito trapianti isocronici di cellule KO o WT in animali WT e Citron KO, e esaminato il livello d'espressione di molecole inibitrici del differenziamento dei PO in topi Citron KO e WT. Nell'insieme questi esperimenti mostrano che fattori ambientali, oltre che intrinseci ai PO, contribuiscono ai difetti maturativi del lignaggio oligodendrogliale nei mutanti per la chinasi Citron. Abbiamo ora avviato esperimenti in vitro per chiarire definitivamente se i PO deleti per Citron possono differenziare fino a produrre proteine della mielina. I primi dati mostrano una capacità differenziativa simile a quella delle cellule wild type. La conferma di questo dato in esperimenti in corso indicherebbe che è l'ambiente 'mutato' a impedire primariamente la mielinizzazione nei territori nei quali sopravvivono un numero significativo di progenitori di oligodendrociti. Potremo testare se questo impedimento può essere superato in presenza di forti stimoli differenziativi trattando colture organotipiche o animali mutati con ormoni tiroidei, forti induttori del differenziamento degli oligodendrociti e della mielinizzazione. Sarà molto interessante utilizzare questo modello murino per identificare nuove molecole inibitrici della mielinizzazione.
Collaborazioni: F di Cunto, Università di Torino; L Bonfanti, Università di Torino

2.3.2. Astrociti parenchimali e neurogenici: funzione e trasduzione dei segnali mediati da NogoA-Nogo Receptor - modulazione da parte di cellule staminali mesenchimali

La linea di ricerca sul ruolo di NogoA e del suo recettore nella neurogenesi adulta e nella reattività astrogliale è al momento sospesa, nell'attesa di trovare finanziamenti che possano sostenere questi esperimenti. Per il momento siamo riusciti a eseguire esperimenti in collaborazione con Martin Schwab volti a studiare recettori non noti per la porzione delta20 di NogoA. In approcci in vitro, abbiamo verificato che il trattamento con eparinasi o con inibitori dei sindecani interferisce con l'azione promigratoria di NogoA sui neuroblasti. Molecole digerite dall'eparinasi (eparansolfatoproteoglicani) e alcuni sindecani potrebbero infatti interagire con NogoA e stimolare la migrazione. L'espressione di eparansolfatoproteoglicani nei neuroblasti rimane però da dimostrare.

I nostri studi sull'astroglia proseguono invece grazie alla collaborazione con Antonio Uccelli di Genova. Le cellule staminali adulte, come le cellule staminali mesenchimali (MSC) possono modulare, quando trapiantate in modelli animali di patologie neurologiche, la risposta immunitaria patologica nel sistema nervoso centrale (SNC) promuovendo neuroprotezione. Sebbene il loro preciso meccanismo di azione non sia stato ancora del tutto chiarito, l'effetto terapeutico è probabilmente dovuto alla capacità di rilasciare fattori protettivi in risposta a stimoli ambientali, piuttosto che a un mero differenziamento in senso neurale. In collaborazione con Antonio Uccelli ci proponiamo di capire se le MSC (o il loro secretoma) siano in grado di promuovere le azioni neurotrofiche e neuromodulatorie degli astrociti. Astrociti murini esposti a mezzo condizionato prodotto da cellule mesenchimali modificano l'espressione di citochine e fattori solubili associati a azioni protettive e riparative note nei modelli di sclerosi multipla. Proseguiremo questa fase di screening e verificheremo se gli astrociti condizionati dalle MSC sono i) in grado di proteggere neuroni esposti a stimoli nocivi in vitro; ii) stimolare nei neuroni rimodellamento di dendriti, assoni, sinapsi.

Collaborazioni: Martin E Schwab (ETH, Zurich), Antonio Uccelli (Università di Genova)

Altre attività in collaborazione:

Antonella Roetto Test comportamentali (memoria spaziale, ansia, performance e memoria motoria) su topi TFR2 KO. Studio del pattern di espressione di TFR2 nel SNC di topo e delle alterazioni tissutali in topi TFR2 KO.

Collaborazioni: G Biggio Università di Cagliari, C Eva Università di Torino, alterazioni del lignaggio oligodendrogliale in modelli di stress perinatale.

Federico Luzzati e Paolo Peretto (NICO, Università di Torino): potenzialità staminali e fenotipo del progenitore neurogenico nello striato di topo dopo lesione con acido quinolinico

5. Prodotti delle attività di ricerca anno 2014

5.1. Articoli pubblicati con affiliazione al NICO

De Luca A, Parmigiani E, Tosatto G, Martire S, Hoshino M, Buffo A, Leto K, Rossi F. (2014) Exogenous Sonic Hedgehog Modulates the Pool of GABAergic Interneurons During Cerebellar Development. *Cerebellum*. Sep 23. [Epub ahead of print]

Boda E, Di Maria S, Rosa P, Taylor V, Abbracchio MP, Buffo A. (2014) Early phenotypic asymmetry of sister oligodendrocyte progenitor cells after mitosis and its modulation by aging and extrinsic factors. *Glia*. 2014 Sep 12. doi: 10.1002/glia.22750.

Boda E, Buffo A. (2014) Beyond cell replacement: unresolved roles of NG2-expressing progenitors. *Front Neurosci*. 2014 May 23;8:122. doi: 10.3389/fnins.2014.00122. eCollection 2014.

Boccazzi M, Rolando C, Abbracchio MP, Buffo A*, Ceruti S*. (2014) Purines regulate adult brain subventricular zone cell functions: contribution of reactive astrocytes. *Glia*. 2014 Mar;62(3):428-39. *, co-last authors

Martone T, Giordano P, Dagna F, Carulli D, Albera R, Rossi F. (2014) Nestin expression and reactive phenomena in the mouse cochlea after kanamycin ototoxicity. *Eur J Neurosci*. 2014 Jun;39(11):1729-41.

Vazquez-Sanroman D, Leto K, Cerezo-Garcia M, Carbo-Gas M, Sanchis-Segura C, Carulli D, Rossi F, Miquel M (2014) The cerebellum on cocaine: plasticity and metaplasticity, *Addiction Biology* (in press).

5.2. Seminari e conferenze con affiliazione al NICO

A Buffo Roles of glial cells in physiology and pathology: implications for brain repair and regeneration

Meeting of Bioscience PhD Students Dresden, 23.-24 JUNE 2014 – LEIPZIG

A Buffo Ruoli omeostatici e riparativi della neurogenesi adulta LIV CONGRESSO NAZIONALE SNO Genova, 21-23 maggio 2014 Cellule staminali: quale futuro?

A Buffo Proprietà neuronali intrinseche, molecole regolatrici estrinseche ed interazione con l'ambiente esterno nei processi di riparazione dei circuiti nervosi centrali danneggiati CONGRESSO CONGIUNTO AINPeNC – AIRIC 5-7 Giugno 2014

A Buffo Ruoli omeostatici e riparativi della neurogenesi adulta TERAPIA CELLULARE NELLE MALATTIE NEURODEGENERATIVE E POST TRAUMATICHE DEL SNC Torino 26 settembre 2014

D Carulli Meccanismi alla base della plasticità compensatoria nel sistema nervoso centrale dopo un danno: “focus” sulle reti perineuronali CONGRESSO CONGIUNTO AINPeNC – AIRIC Verbania 5-7 Giugno 2014

K Leto Development and specification of cerebellar phenotypes Scuola di Dottorato “Neurodevelopment and neurodevelopmental disorder”, Torino, 22-26 Settembre 2014

1.2.1 Abstract presentati a congressi nazionali e internazionali:

9th FENS FORUM OF SCIENCE, MILAN JULY 5-9 2014

Cell replacement strategies in different models of Purkinje cell degeneration

Fucà Elisa, Ketty Leto, Ferdinando Rossi

Dynamics of self-renewal and differentiation of the oligodendrocyte progenitor pool in the CNS parenchyma

Buffo Annalisa, Di Maria Silvia, Rosa Patrizia, Abbracchio Maria Pia, Boda Enrica

Neurogenic and gliogenic progenitors in the developing cerebellum

Parmigiani Elena, Leto Ketty, Rolando Chiara, Figueres-Oñate Maria, Lòpez-Mascaraque Laura, Buffo Annalisa, Rossi Ferdinando

Origin and generation of different astroglial phenotypes in the cerebellum.

Cerrato Valentina, Parmigiani Elena, Ketty Leto, Jorge Garcia-Marques, Laura Lòpez-Mascaraque, Annalisa Buffo, Ferdinando Rossi

Altered AOB neurogenesis and pheromonal induced response in Semaphorin 7A knock out male mice.

Schellino R, Jongbloets B, Boda E, Cimino I, Buffo A, Fasolo A, Giacobini P, Pasterkamp J, Peretto P, De Marchis S.

Conditional deletion of PTEN affects Purkinje cell survival and response to injury

Carulli Daniela, Faralli Alessio, Cupolillo Dario, Rossi Ferdinando

Perineuronal net modifications and structural plasticity in the vestibular nuclei of adult mice during vestibular compensation

Faralli Alessio, Dagna Federico, Albera Roberto, Rossi Ferdinando, Carulli Daniela

Limbic Npy1r affects perineuronal net structure in the limbic system.

Mele Paolo, Longo Angela, Bertocchi Iliaria, Berbotto Serena, Carulli Daniela, Eva Carola

Basel Stem Cell Network Meeting, BASEL (SWITZERLAND), SEPTEMBER 9-10 2014

Generation of interneurons and astrocytes during cerebellar development.

Parmigiani Elena, Leto Ketty, Rolando Chiara, Fucà Elisa, Garcia-Marques Jorge, Figueres-Oñate María, Lòpez-Mascaraque Laura, Rossi Ferdinando and Buffo Annalisa

Boda E, Di Maria S, Rosa P, Taylor V, Abbracchio MP, Buffo A. *Early phenotypic diversity of sister oligodendrocyte progenitor cells after mitosis and its modulation by aging and extrinsic factors.* Basel Stem Cell Network Meeting, 9-10 September 2014, Basel, Switzerland.

Beattie R, Boda E, Buffo A, Rolando C, Taylor V. *Jagged1 as a pivotal regulator of neural stem cell differentiation towards an oligodendrocytic lineage in cells originating from the neurogenic forebrain niche*. Basel Stem Cell Network Meeting, 9-10 September 2014, Basel, Switzerland.

Frola E, Boda E, Pregno G, Sassoè M, Buffo A. *GABAergic synapses on oligodendrocyte precursors: characterization and role of synaptic components in the postnatal cerebellum*. Basel Stem Cell Network Meeting, 9-10 September 2014, Basel, Switzerland.

NENS Course on Neural Development and Neurodevelopmental Disorders, Turin, 22-26 September 2014

Early phenotypic asymmetry of sister oligodendrocyte progenitor cells after mitosis and its modulation by aging and extrinsic factors. Boda E, Di Maria S, Rosa P, Taylor V, Abbracchio MP, Buffo A.

Amplification and differentiation of Bergmann Glia during cerebellar foliation. Cerrato Valentina, Parmigiani Elena, Buffo Annalisa, Rossi Ferdinando

Cell replacement strategies in different models of Purkinje cell degeneration Fucà Elisa, Ketty Leto, Rossi Ferdinando

Conditional deletion of PTEN affects Purkinje cell survival and response to injury Carulli Daniela, Faralli Alessio, Cupolillo Dario, Rossi Ferdinando

Perineuronal net modifications and structural plasticity in the vestibular nuclei of adult mice during vestibular compensation Faralli Alessio, Dagna Federico, Albera Roberto, Rossi Ferdinando, Carulli Daniela

European Iron Club Meeting, Verona, 11-14 September 2014

TFR2 KO mice show brain iron overload with microglia alterations and anxious behavior. Pellegrino RM, Montarolo F, Boda E, Palmieri A, Mezzanotte MR, Boero M, Saglio G, Buffo A, Roetto A.

XVIII Congresso Nazionale della Società Italiana di NeuroPsicoFarmacologia (SINPF), Turin 3-6 June 2014

Comportamento ansioso nei topi TFR2 KO: nuovo collegamento tra sovraccarico cerebrale di ferro e ansia nelle malattie neurodegenerative? Pellegrino RM, Boda E, Boero M, Montarolo F, Saglio G, Buffo A, Roetto A.

Il gene Npy1r influenza la struttura delle reti perineurali nel Sistema limbico Mele Paolo, Longo Angela, Berbotto Serena, Bertocchi Ilaria, Rossi Ferdinando, Carulli Daniela, Eva Carola

Society for Neuroscience (SfN) Meeting, Washington (USA), 15-19 November 2014

Early phenotypic diversity of sister oligodendrocyte progenitor cells after mitosis and its modulation by aging and extrinsic factors. Boda E, Di Maria S, Rosa P, Taylor V, Abbracchio MP, Buffo A.

Cocaine-induced metaplasticity in the cerebellum: effects on the cerebellar Perineuronal nets Carbo-Gas María, Vazquez-Sanroman Dolores, Leto Ketty, Sanchis-Segura Carla, Carulli Daniela, Rossi Ferdinando, Miquel Marta

I° NEUROSTEMCELLREPAIR CONSORTIUM MEETING - APRIL, 26th – 28th 2014

Setting up of the hd model to optimize grafted cells integration and functional recovery

Elisa Fucà, Ketty Leto, Annalisa Buffo, Daniela Carulli, Silvia De Marchis, Barbara Motta, Elena Cattaneo and Ferdinando Rossi

5.3. Altri prodotti riconducibili alle attività Istituzionali del NICO (specificare):

A Buffo: partecipazione in qualità di esperto all'iniziativa di terza missione Scienza Attiva per il tema Cellule Staminali aa 2013-2014

A Buffo: 'Decifrare i dialoghi tra staminali: il come e il perché della ricerca base', LE FRONTIERE DELLE NEUROSCIENZE ASPETTI SCIENTIFICI ED ETICI, Alba, 26 marzo 2014

A Buffo, E Boda, E Parmigiani, V Cerrato: attività di laboratorio e laboratori per l'orientamento e la divulgazione della cultura scientifica nelle scuole superiori; partecipazione alla Scientifica Summer Academy (Agorà Scienza e Fondazione Agnelli) giugno 2014

A Buffo, COORDINAMENTO PARA-TETRAPLEGICI DEL PIEMONTE - STAMINALI: UN INGANNO O UNA SPERANZA Torino, aprile 2014 NEUROGENESI ADULTA: RUOLI FISIologici, RIPARATIVI E MECCANISMI DI REGOLAZIONE PLASTICA

A Buffo, Staminali nelle patologie neurodegenerative Come affrontare la patologia neurodegenerativa Val della Torre 3-4 Ottobre 2014

E Boda, Now.new, la ricerca si racconta (iniziativa organizzata da Agoràscienza, Università degli Studi di Torino e Circolo dei Lettori di Torino), 17 Maggio 2014, Circolo dei Lettori, Torino.

D. Carulli, E. Boda, E. Parmigiani stand NICO alla Notte dei ricercatori 2014

A. Buffo, D. Carulli e K. Leto hanno organizzato il Simposio in onore del prof Ferdinando Rossi: 'A passionate journey through the cerebellar mysteries', svoltosi durante il 9th FENS FORUM OF SCIENCE, MILAN JULY 5-9 2014. Il Simposio ha commemorato Ferdinando Rossi con la partecipazione di Marian Joel, presidente FENS, e presentazioni scientifiche da parte di Karl Schilling, Giacomo Consalez, Alain Chedotal, Chris de Zeeuw.

A. Buffo ha organizzato con Silvia De Marchis e maurizion Giustetto il Corso internazionale di Dottorato sponsorizzato dal NENS/IBRO su 'neurodevelopment and neurodevelopmental disorders', Torino, 22-26 Settembre 2014.

Tutto il gruppo ha partecipato all'organizzazione e alla gestione delle giornate 'Porte Aperte' del NICO.

6. Fondi di ricerca ricevuti nel 2014

E Boda Postdoctoral fellowship granted by the Fondazione Umberto Veronesi: "Rejuvenating the brain: targeting neural stem/progenitor cell division mode to improve cognitive functions and repair abilities of the aging CNS" (27.000 euro)

A. Buffo, D. Carulli e K. Leto hanno ottenuto il finanziamento locale UNITO-ex 60% per l'anno 2014.

A. Buffo, Fondazione CRT progetto presentato congiuntamente a Luca Bonfani e Paolo Peretto (25.000 euro). Titolo: ‘Fonti endogene di cellule staminali/progenitori neurali per la riparazione del sistema nervoso’

D. Carulli Fondazione CRT progetto presentato congiuntamente a Carola Eva (26.000 euro) ‘Meccanismi complessi che sottendono gli effetti permanenti dell’ambiente perinatale sulla plasticità neurale e la vulnerabilità a psicopatologie’

7. Fondi di ricerca ricevuti prima del 2014 ed ancora attivi

PRIN2010, “Effect of substances of abuse, psychoactive drugs, stress and maternal care on brain development and vulnerability to psychopathology” Italian Ministry of University and Research, N. 20107MSMA4. (A Buffo), 83.000 EURO

Firb2011 “Generazione mirata di neuroni cerebellari e striatali come strategia preventiva per malattie del SNC” n. RBFR10A01S (K Leto), 25.000 EURO

Neurostem cell repair to F Rossi (ora gestito da Alessandro Vercelli)

SUBMITTED GRANTS

E Boda, richiesta di borsa di studio a SIF (Società Italiana di Farmacologia), travel grant (6 mesi) alla Fondazione Veronesi; sottomissione della richiesta SIR (Scientific Independence of Young Researchers; Italian Ministry of the University); Cariplo Ricerca Biomedica promossa da Giovani Ricercatori, Fondazione Cariplo.

A Buffo, Bando Ateneo Addressing H2020 2014 (presentato congiuntamente a Paola Rocca e Alessandro Vercelli); Cariplo Ricerca Biomedica, Fondazione Cariplo (presentato con Stefania Ceruti); Fondazione CRT Ricerca e Istruzione (seconda tornata); ELA Foundation; Ricerca Finalizzata, Ministero della salute (presentato congiuntamente a Marnetto Fabiana); FISM 2014; Alzheimers’ Association; Compagnia di San Paolo, Progetto libero (presentato congiuntamente a Antonio Bertolotto); Telethon (presentato con Laura Gasparini).

D Carulli, Bando Ateneo Addressing H2020 2014 (presentato congiuntamente a Carola Eva), Fondazione CRT: Contributo del cervelletto ai disordini dello spettro autistico: analisi del ruolo di PTEN, Simons Foundation Autism Research Initiative Pilot Award, Human Frontiers Science Program, NARSAD/The Brain & Behavior Research Foundation, Simons Foundation Autism Research Initiative Explorer Award

K Leto, Fondazione CRT, National Ataxia Foundation, Robertson Stem Cell Investigator Award, Ataxia UK

Resoconto (anno 2014) e progetto delle attività di ricerca per il 2015 del gruppo **Neuropsicofarmacologia**, presso l'Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO)

Responsabile del gruppo: **Carola Eva**

1. Composizione del gruppo di ricerca (1-11-2014)

1.1. Personale strutturato dell'Università di Torino

Carola Eva (PO)
Alessandra Oberto (RU)

1.2. Personale non strutturato

Paolo Mele (postdoc)
Angela Longo (postdoc)

2. Progetti di ricerca (2014)

Regolazione peptidergica del comportamento emozionale e alimentare

L'ansia riflette uno stato cognitivo e comportamentale che viene attivato in risposta a un potenziale pericolo. Due sono le componenti che si possono identificare nell'ansia: il tratto e lo stato. Il tratto d'ansia si riferisce alla predisposizione individuale al comportamento ansioso, mentre lo stato d'ansia si riferisce alla risposta emozionale generata da una paura. Tradizionalmente, la ricerca nell'uomo e nell'animale si è focalizzata ad individuare i deficit neuronali in individui con un disturbo d'ansia, inclusi il disturbo di panico, il disturbo da stress posttraumatico, il disturbo d'ansia generalizzata, il disturbo ossessivo compulsivo e le fobie. Più recentemente, studi specifici hanno cercato di individuare le componenti chiave che possono spiegare perché, dopo esposizione a traumi o ad altri fattori di rischio, alcuni individui sono resilienti e altri sono suscettibili a sviluppare un disturbo d'ansia o dell'umore.

Studi farmacologici e condotti su animali geneticamente modificati dimostrano che il Neuropeptide Y (NPY) agisce come un agente ansiolitico endogeno, attraverso l'attivazione dei recettori Y1R e Y5R. Inoltre NPY e i suoi recettori sono altamente espressi nelle regioni cerebrali implicate nell'ansia. Mediante l'inattivazione di Y1R nei neuroni glutammatergici del proencefalo abbiamo generato dei topi mutanti (topi Npy1r^{rfb}) che mostrano un comportamento ansioso, ridotto peso corporeo, una ridotta quantità di grasso corporeo, livelli plasmatici più bassi di leptina e più alti di corticosterone (Bertocchi et al., PNAS 2011). I topi Npy1r^{rfb} mostrano inoltre una maggiore suscettibilità all'obesità e al diabete di tipo 2 se trattati con una dieta grassa (Palanza et al., unpublished results).

Usando un approccio simile, ma diretto ad un differente circuito neuronale, abbiamo più recentemente osservato che la delezione di Y1R in neuroni che coesprimono Y5R genera dei topi (Npy1r^{Y5R-/-}) con un fenotipo simile a quello dei topi Npy1r^{rfb} ma anche con significative differenze. Sebbene si osservi un fenotipo ansioso in entrambi i modelli, l'aumento dell'attività dell'asse e la diminuzione del peso corporeo non sono presenti nei topi Npy1r^{Y5R-/-}. Inoltre il fenotipo dei topi Npy1r^{rfb} si osserva solo negli animali allevati da mamme che mostrano elevata cura materna verso i cuccioli adottati e solo nei maschi, mentre quello dei topi Npy1r^{Y5R-/-} è indipendente dal sesso e dalle cure materne ricevute (Longo et al., Biol. Psych., 2014; Dumont and Quirion, *Commentary*, Biol. Psych., 2014).

Questi risultati suggeriscono che NPY, agendo su sottotipi recettoriali con una diversa espressione a livello cellulare, attivi circuiti neuronali distinti per la regolazione dei comportamenti associati all'ansia e dell'omeostasi energetica.

Lo studio delle differenze tra i circuiti del sistema limbico coinvolti nel controllo dell'ansia e della risposta allo stress (anche metabolico) e della resilienza a psicopatologie e a patologie metaboliche che determinano i fenotipi differenti dei topi $Npy1r^{Y5R/-}$ e $Npy1r^{rfb}$, è l'oggetto dei filoni di ricerca che stiamo attualmente conducendo nel nostro laboratorio.

L'obiettivo a lungo termine è 1) identificare i sistemi neurotrasmettitoriali e geni chiave coinvolti nella resilienza/suscettibilità a patologie psichiatriche (ansia e depressione); 2) determinare l'influenza dell'ambiente perinatale sullo sviluppo e plasticità di questi circuiti.

2.1. Ruolo dei recettori ipocampali Y1R negli effetti permanenti dell'ambiente perinatale sulla plasticità sinaptica e la vulnerabilità a psicopatologie: dalle molecole della matrice alle proprietà fisiche del tessuto nervoso al comportamento.

La formazione di una forma specializzata di matrice extracellulare intorno ai neuroni, denominata "rete perineuronale (PNN)", e la mielinizzazione contribuiscono alla chiusura del "periodo critico" per la plasticità neurale che dipende dall'esperienza vissuta. L'inibizione di molecole associate alla mielina e dei loro meccanismi di segnalazione, o la rimozione enzimatica delle PNN, ripristinano la plasticità neurale tipica del primo periodo di vita postnatale, aumentando, ad esempio, la capacità di recupero da un insulto al sistema nervoso centrale. L'esposizione a uno stress durante la vita precoce altera l'architettura dei circuiti nel sistema limbico cerebrale, aumentando la suscettibilità a psicopatologie.

Gli alti livelli di ansia che si osservano in animali esposti ad esperienze avverse nel periodo postnatale sono correlati a modificazioni dello sviluppo e della struttura della mielina. Anche le PNN giocano un ruolo chiave nella regolazione delle capacità cognitive e cambiamenti nell'espressione e nella composizione delle PNN sono state associate a disturbi del sistema nervoso centrale (SNC). Studi recenti suggeriscono che i proteoglicani condroitin solfati extracellulari, molto espressi nelle PNN, giocano un ruolo fondamentale nella regolazione della concentrazione di cloro intracellulare nei neuroni e, di conseguenza, della direzione delle risposte inibitorie/eccitatorie mediate dal GABA. A sua volta, la trasmissione GABAergica svolge un'importante funzione nel mantenimento delle PNN. L'osservazione che la fluoxetina, farmaco ansiolitico ed antidepressivo, riduce l'intensità delle PNN intorno ai neuroni GABAergici nel sistema limbico, suggerisce che le PNN possano rappresentare un nuovo target per il trattamento delle psicopatologie.

Recentemente abbiamo dimostrato che topi adulti allevati da mamme con bassi livelli di cura materna (LMC) mostrano un comportamento ansioso e un'iperattività dell'asse ipotalamo-ipofisurrene (HPA) che sono associati alla diminuita espressione di Y1R nel sistema limbico (Bertocchi et al., 2011). Lo stesso fenotipo è stato osservato nei topi $Npy1r^{rfb}$ dove Y1R è stato rimosso in età giovanile selettivamente nei neuroni eccitatori del sistema limbico, ma si manifesta solo in topi che sono stati allevati da mamme con alti livelli di cura materna (HMC), indicando che la neurotrasmissione mediata da Y1R nel sistema limbico è un bersaglio chiave degli effetti permanenti della cura materna sul comportamento emozionale (Bertocchi et al., PNAS, 2011). Particolarmente interessanti sono i dati ottenuti lo scorso anno nel nostro laboratorio che dimostrano che sia i topi nativi allevati da mamme LMC sia i topi $Npy1r^{rfb}$ presentano un aumento dello spessore delle PNN nella corteccia prefrontale. La caratterizzazione dei neuroni della corteccia prefrontale avvolti dalle PNN ha dimostrato che sono prevalentemente neuroni GABAergici parvalbumina positivi innervati da neuroni glutammatergici e NPY-immunoreattivi. Il numero delle reti e il numero dei neuroni parvalbumina positivi (GABAergici) circondati da PNN non è al contrario modificato né dalla delezione di Y1R né dal ceppo della mamma adottiva.

Considerando il ruolo che PNN svolge nella regolazione della plasticità neurale e della stabilità strutturale e che l'alterata funzione e plasticità della corteccia prefrontale è una caratteristica patologica di diversi disturbi neuropsichiatrici ipotizziamo che:

i) un riarrangiamento delle PNNs (in termini di spessore, composizione molecolare, pattern di solfatazione) e della mielina nelle regioni limbiche sia coinvolto nella programmazione, indotta dalla cura materna, del fenotipo ansioso in età adulta;

ii) la trasmissione mediata da Y1R nel sistema limbico svolga un'importante funzione nella modulazione di PNN indotta dall'ambiente materno.

Nel prossimo anno, in collaborazione con la Dott.ssa Daniela Carulli e la Dott.ssa Annalisa Buffo, del NICO, e con tre laboratori internazionali esperti in glicobiologia (Jessica Kwok, Università di Cambridge, Cambridge, UK), fisica della materia soffice (Ralf Richter, CIC biomaGUNE, San Sebastian, Spagna) e neurofisiologia (Stefano Vicini, George Town University, Washington DC, USA) analizzeremo se:

1) la cura materna modifica le proprietà chimico-fisiche di PNN e lo sviluppo della mielina e se queste modificazioni alterano i circuiti neuronali generando ansia nella vita adulta.

2) la modulazione farmacologica delle PNN (trattamento con condroitinasi e fluoxetina) e l'esposizione ad un ambiente arricchito riduca l'ansia dei topi.

L'esperienza del nostro gruppo di ricerca, insieme a quelli della Dott.ssa Carulli e della Dott.ssa Buffo fornirà la piattaforma unificante i diversi laboratori che collaboreranno alla ricerca e gli esperimenti condotti a al NICO durante il primo anno di ricerca forniranno la base sperimentale essenziale per una successiva analisi dei cambiamenti delle proprietà chimico-fisiche di PNN/mielina e delle conseguenze sulla trasmissione elettrica neuronale da parte degli altri collaboratori.

I ricercatori di UK e Spagna condurranno esperimenti sui cervelli dei topi allevati in diverse condizioni di ambiente materno e analizzati per ansia e stress a Torino. Lo studio del ruolo dei network neuronali nel controllo dell'ansia da parte dei ricercatori USA dipenderà dall'identificazione di specifiche popolazioni neuronali (che presentano modificazioni di PNN/mielina) condotta a Torino.

La correlazione tra interazioni molecolari, proprietà della matrice/mielina e comportamento permetterà una comprensione dei meccanismi complessi che sottendono gli effetti permanenti dell'ambiente perinatale sulla plasticità e la vulnerabilità a psicopatologie . Questa ricerca interdisciplinare potrà inoltre fornire un'eccellente base per l'identificazione di approcci innovativi per il trattamento dei disturbi d'ansia e da stress.

2.1.2. Ruolo Y1R coespresso con Y5R nelle regioni limbiche nell'inflessibilità comportamentale e nel comportamento ansioso

Il Y1R e il Y5R per NPY condividono azioni simili nella regolazione dell'ansia. I geni *Npy1r* e *Npy5r* sono localizzati sullo stesso cromosoma nell'uomo e nei roditori e condividono lo stesso promotore che ne dirige la trascrizione con orientamento opposto. Nei roditori, Y1R e Y5R sono colocalizzati in diverse regioni del proencefalo, inclusa l'amigdala basolaterale (BLA) e l'ippocampo. Studi farmacologici indicano che NPY induce effetti ansiolitici attraverso l'attivazione del Y5R e del Y1R nella BLA. E' quindi possibile che l'espressione coordinata di questi recettori nella BLA possa giocare un ruolo nella regolazione dell'ansia e della memoria spaziale. Per analizzare lo specifico contributo dei Y1Rs coespressi con Y5R sulle funzioni fisiologiche del NPY abbiamo generato una linea di topi ko condizionali, denominati $Npy1r^{Y5R^{-/-}}$, in cui il gene *Npy1r* è inattivato selettivamente nei neuroni che co-esprimono il recettore Y5 degli animali adulti. I topi $Npy1r^{Y5R^{-/-}}$ di entrambi i sessi hanno diminuiti livelli di Y1R mRNA e di proteina nella corteccia cerebrale, nella CA1, CA3 e DG dell'ippocampo, nella BLA e nella regione ipotalamica VMH e mostrano un fenotipo fortemente ansioso nei test dell'elevated plus maze (epm) e dell'open field (OF) ma , a differenza dei topi $Npy1r^{rfb}$ non mostrano alterazioni dell'attività dell'asse HPA , né in condizioni basali, né dopo esposizione per 30 minuti ad un stress acuto (restraint stress) (Longo et al., 2014,) o, come abbiamo dimostrato nell'ultimo anno, dopo esposizione a uno stress psicosociale cronico (Longo et al., in preparazione). Inoltre, il fenotipo dei topi $Npy1r^{Y5R^{-/-}}$ è indipendente dal genere e dalle cure materne ricevute. Queste differenze nel fenotipo dei topi $Npy1r^{rfb}$ e $Npy1r^{Y5R^{-/-}}$ possono essere spiegate dal diverso pattern di inattivazione regionale e cellulare del gene. Entrambe le linee di animali mostrano una significativa riduzione del mRNA e della proteina Y1R nell'ippocampo. Al contrario solo i topi $Npy1r^{Y5R^{-/-}}$, ma non quelli

$Npy1r^{rfb}$, mostrano una diminuzione significativa delle recettore Y1R nella BLA. I nostri risultati dimostrano anche che, nella BLA, il $\approx 50\%$ delle cellule GABA-IR co-esprimono Y1R e Y5R, mentre solo una piccola popolazione di neuroni positivi per la α -CamKII ($\approx 25\%$) co-localizza con entrambi i sottotipi recettoriali per NPY, suggerendo che l'inattivazione condizionale del gene *Npy1r* nei topi $Npy1r^{Y5R/-}$ potrebbe determinarsi prevalentemente nei neuroni GABAergici della BLA.

Nell'ultimo anno abbiamo dimostrato che i topi $Npy1r^{Y5R/-}$ mostrano, rispetto ai topi controllo, un ridotta capacità di riapprendere comportamenti acquisiti (reversal learning) in due test di apprendimento spaziale (Morris Water Maze e T maze test) -dato consistente con l'alto profilo ansioso di questi animali- ed un comportamento stereotipato (twirling), considerato un modello animale di compulsività. Abbiamo inoltre osservato che i topi $Npy1r^{Y5R/-}$ presentano un aumento dello spessore delle PNN intorno alle cellule GABAergiche della regione CA1 dell'ippocampo.

Un deficit della capacità di adattare il proprio comportamento in risposta a cambiamenti ambientali (flessibilità cognitiva) è presente in numerosi disturbi psichiatrici, fra i quali il disturbo ossessivo compulsivo, il disturbo di panico e l'autismo e coinvolge connessioni tra corteccia prefrontale, striato e regioni limbiche. Le PNN avvolgono contatti sinaptici fondamentali per l'apprendimento. L'indebolimento della rigidità strutturale delle PNN promuove la plasticità neuronale e la flessibilità cognitiva, accelerando in modo specifico i cambiamenti di strategia richiesti per riapprendere comportamenti acquisiti.

Riteniamo quindi che i topi $Npy1r^{Y5R/-}$ sono un interessante modello per lo studio del ruolo delle PNN nell'inflessibilità cognitiva, aprendo nuove prospettive per lo sviluppo di modulatori della neuroplasticità con potenziali terapeutici per disturbi psichiatrici (OCD, disturbo di panico, autismo)

Nello sviluppo di questo filone di ricerca vogliamo caratterizzare ulteriormente il fenotipo dei topi $Npy1r^{Y5R/-}$ utilizzando test cognitivi e di interazione sociale per l'analisi di comportamenti di tipo autistico. In collaborazione con la Dott.ssa Carulli analizzeremo inoltre altri markers di plasticità sinaptica (spine dendritiche), il fenotipo cellulare dei neuroni avvolti dalle PNN (somatostatina+, NPY+, parvalbumina +, Y1R+ e CB1+) nell'ippocampo (CA1, DG) e nella BLA e le connessioni sinaptiche di questi neuroni con terminazioni glutammatergiche o GABAergiche. Valuteremo se la distruzione delle PNN indotta dal trattamento con condroitinasi o con farmaci ad impronta serotoninergica (SSRI) è in grado di ridurre il comportamento ansioso, l'inflessibilità cognitiva e i comportamenti stereotipati nei topi $Npy1r^{Y5R/-}$. Infine poiché studi riportati in letteratura suggeriscono un ruolo delle cellule granulari del DG nell'inflessibilità comportamentale, in collaborazione con la Dott.ssa Buffo, studieremo la neurogenesi dei granuli nei topi controllo e nei topi $Npy1r^{Y5R/-}$.

Ruolo del sistema Npy-Y1R negli effetti permanenti della cura materna sul metabolismo energetico

La sindrome metabolica (MetS) è un insieme di disturbi metabolici che includono obesità viscerale, alti livelli plasmatici di glucosio a digiuno, ipertensione, dislipidemia, e fegato grasso, che affliggono da un quarto a un quinto della popolazione Mediterranea. L'incidenza della

MetS è in continuo aumento probabilmente in quanto risultato della combinazione di uno stile di vita sedentario e di diete ad alto contenuto calorico. Non sono ad oggi disponibili appropriati interventi terapeutici mirati a prevenire o ad arrestare la MetS a causa della mancanza di comprensione dei meccanismi che sottendono questo complesso disordine. Il fatto che nelle donne l'incidenza della MetS aumenti significativamente dopo la menopausa suggerisce il potenziale coinvolgimento degli ormoni steroidei. Ciò non è sorprendente in quanto la stretta associazione tra funzione riproduttiva e stato nutrizionale è una caratteristica molto ben conservata filogeneticamente nel genere femminile e quindi la cessazione delle funzioni riproduttive potrebbe causare deficienze nell'omeostasi energetica. Attualmente, il legame tra fertilità e omeostasi

energetica nei mammiferi femmine è oggetto di intenso studio; tuttavia, manca ancora un panorama completo degli organi e delle vie biochimiche coinvolte.

I risultati ottenuti in collaborazione con la Prof.ssa Palanza, Università di Parma dimostrano che i topi $Npy1r^{r/b}$ rappresentano un importante e innovativo modello animale per lo studio della MetS. In particolare, abbiamo dimostrato che, rispetto ai fratelli di controllo, i topi $Npy1r^{r/b}$ nutriti con una dieta grassa mostrano un rapido incremento del peso corporeo che persiste durante tutto il periodo di esposizione alla dieta. Rispetto ai controlli, i topi $Npy1r^{r/b}$ consumano la stessa quantità complessiva di cibo, ma assumono più calorie durante la prima settimana di esposizione a dieta grassa e hanno una latenza più lunga prima di ridurre la quantità di cibo grasso assunto. Il fenotipo metabolico dei topi $Npy1r^{r/b}$ è inoltre caratterizzato da tachicardia, da una maggiore quantità di tessuto adiposo bianco e da una minore tolleranza al glucosio come dimostrato dai livelli più alti di glicemia nei primi 30 minuti dopo il test di carico di glucosio rispetto i topi $Npy1r^{2lox}$. Quest'aumento di peso è ulteriormente incrementato se gli animali vengono esposti ad uno stress sociale cronico prima del trattamento con dieta grassa, suggerendo che la suscettibilità all'obesità in età adulta è potenziata dall'esposizione a uno stress emozionale. Inoltre, poiché la delezione condizionale di Y1R nel sistema limbico induce una disregolazione del rapporto appetito/sazietà e un'incapacità di processare calorie in topi $Npy1r^{r/b}$ maschi, ma non nelle femmine, questo modello murino è particolarmente adatto per lo studio della differente vulnerabilità a questa sindrome dei due sessi.

Studi recenti condotti nel laboratorio della Prof.ssa A. Maggi (Università di Milano) dimostrano, che durante l'età fertile, il fegato è il target principale dell'azione degli estrogeni. In quest'organo, i recettori per gli estrogeni $ER\alpha$ e $ER\beta$, espressi a livelli molto bassi, regolano la fertilità in risposta a assunzione di proteine e regolano la sintesi di lipidi e colesterolo, in relazione allo stato riproduttivo. Poiché il fegato è l'organo più importante nel controllo dell'omeostasi energetica, è possibile ipotizzare che l'attività del recettore $ER\alpha$ influenzi anche la sintesi e la secrezione delle molecole segnale necessarie a coordinare la risposta ormonale tra fegato, tessuto adiposo, muscoli e cervello.

Poiché l'ovariectomia o l'età non modificano l'espressione degli $ER\alpha$ nel fegato, la nostra ipotesi è che, dopo la cessazione delle funzioni ovariche, i recettori $ER\alpha$ mantengano la capacità di rispondere a stimoli nutrizionali e questo evento, in assenza dell'appropriato segnale estrogenico, causi un effetto sproporzionato sull'omeostasi energetica con conseguenze patologiche.

In collaborazione con la prof. A. Maggi e il Prof. E. Nisoli dell'Università di Milano e con la Prof.ssa Palanza dell'Università di Parma, abbiamo iniziato una nuova linea di ricerca per determinare 1) il ruolo degli ormoni ovarici e dei recettori epatici ERs nell'aumentata incidenza della MetS nelle donne dopo la menopausa; 2.) il ruolo dei recettori Y1R nelle regioni limbiche in questo fenomeno e i potenziali meccanismi coinvolti; 3) gli effetti positivi e negativi di specifici regimi alimentari in topine con cessazione delle funzioni ovariche. In particolare valuteremo l'effetto degli estrogeni sull'espressione di molecole in grado di regolare lo stato metabolico di altri organi che rispondono ai recettori ERs, come il NPY, potente agente orezzizzante sintetizzato nel nucleo arcuato dell'ipotalamo la cui espressione è regolata dagli estrogeni e dal IGF1 sintetizzati dal fegato in risposta all'attività dei recettori $ER\alpha$. Questa collaborazione ci permetterà di sfruttare i più appropriati agenti farmacologici e i modelli genetici sviluppati dai tre laboratori per verificare gli effetti di specifici fattori epatici sulla trasmissione NPY-Y1R mediata in presenza di una cessata funzione ovarica o esposizione a specifici regimi dietetici.

Collaborazioni

Nazionali

NICO: Dott.ssa A. Buffo, Dott.ssa D. Carulli; Prof. GC Panzica.

Università di Cagliari: Prof.ssa M. Serra

CNR: Prof. G. Biggio.

Università di Milano: Prof.ssa A. Maggi; Prof. E. Nisoli; Prof.ssa MP Abbracchio; Prof. G. Racagni

Università di Parma: Prof.ssa P. Palanza

Internazionali

Università di Cambridge, Cambridge, UK: Jessica Kwok

CIC biomaGUNE, San Sebastian, Spagna: Ralf Richter

George Town University, Washington DC, USA: Stefano Vicini

Max Planck Institute, Heidelberg: Rolf Sprengel

University of Minnesota, Minneapolis: Prof. A. Bartolomucci

Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne: Prof. E. Grouzman

Rosalind Franklin University, Chicago: Prof. J. Urban

Kings College London: Dr. Gavin Bewick

Finanziamenti:

Prin 2012; euro (172.857): “Infanzia, adolescenza e psicopatologia: effetto delle cure materne, psicofarmaci e sostanze d'abuso sullo sviluppo del cervello”.

Fondazione Cariplo 2014 (euro 100.000): “A novel hypothesis on the development of metabolic syndrome in women”.

Fondazione CRT 2014 (euro 26.000): “Meccanismi complessi che sottendono gli effetti permanenti dell'ambiente perinatale sulla plasticità neurale e la vulnerabilità a psicopatologie”.

Prodotti delle attività di ricerca anno 2014

Articoli pubblicati o in corso di pubblicazione con affiliazione al NICO

Longo A., Mele P., Bertocchi I., Oberto A., Bachmann A., Bartolomucci A., Palanza P., Sprengel R., and Eva C. Conditional inactivation of Neuropeptide Y-Y1 receptors unravels the role of Y1 and Y5 receptors co-expressing neurons in anxiety. *Biol. Psych*:**76**,840–849.

Fontana R., Della Torre S., Meda C., Longo A., Eva C., Maggi A. Estrogen replacement therapy regulation of energy metabolism in female mouse hypothalamus. *Endocrinology*, **155**:2213-2221.

Mele P., Zammaretti F., Panzica G.C., Oberto A. and Eva C. Gender-related Y1R gene transcription modulation of leptin treatment in obese (*ob/ob*) or lean Y1R/LacZ transgenic mice., *Peptides*, under revision.

Resoconto (anno 2014) e progetto delle attività di ricerca per il 2015 del gruppo **Plasticità e rigenerazione del SNP**, presso l'Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO)

Responsabile del gruppo: **Stefano Geuna**

1. Composizione del gruppo di ricerca (1-11-2014)

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

Stefano Geuna (PA)
Stefania Raimondo (RU)

1.2 Personale non strutturato

Giulia Ronchi (PosDoc)
Sara Gnani (PostDoc)
Loradana Grasso (PostDoc)
Luisa Muratori (Dottoranda)

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

Nel 2014, il nucleo principale delle nostre attività si è svolto nell'ambito di due progetti di ricerca pluriennali (finanziati dalla Comunità Europea e dalla regione Piemonte, Poli di Innovazione) finalizzati allo studio di strategie di ingegneria tissutale per la ricostruzione dei nervi periferici.

In tali progetti sono stati indagati vari aspetti di base per la realizzazione di scaffolds biomimetici per la riparazione delle lesioni dei nervi periferici con perdita di sostanza. Le ricerche, che sono state condotte in stretta collaborazione con la ricca partnership internazionale del progetto e sono consistite nella valutazione di un nuovo tipo di approccio bio-ingegneristico rappresentato dalla somministrazione locale di fattori neurotrofici coniugati a nanoparticelle di ferro (cfr. pubblicazione #1).

Nel corso del 2014 inoltre, in aggiunta alle attività previste nell'ambito dei due progetti sovramenzionati, sono stati completati e pubblicati altri 8 studi relativi ad altrettanti progetti di ricerca.

Il primo studio, ha permesso di identificare nuovi geni housekeeping per l'analisi biomolecolare della rigenerazione neurale (cfr. pubblicazione # 2).

Le pubblicazioni #3 e #4 si riferiscono ai risultati della collaborazione con i colleghi clinici (di Torino ed Ancona) e sono volte al miglioramento della terapia chirurgica dopo lesioni del nervi.

La pubblicazione #5 ha presentato i risultati di un'altra collaborazione con colleghi clinici tedeschi circa l'utilizzazione della terapia elettromagnetica per migliorare la rigenerazione neurale.

La pubblicazione #6 si riferisce ad una collaborazione con i colleghi neuroanatomici di Innsbruck ed è relativa allo studio del ruolo del fattore Sprouty2 nello sviluppo e nella rigenerazione del sistema nervoso.

La pubblicazione #7 riporta i risultati di una collaborazione con colleghi veterinari portoghesi circa l'utilizzazione di membrane protettive di chitosano dopo chirurgia spinale.

Infine le pubblicazioni #8 e #9 si riferiscono ai risultati della collaborazione con gli ingegneri del Politecnico di Torino e sono volte allo sviluppo di biomateriali innovativi per promuovere la rigenerazione assonale.

Collaborazioni principali: Claudia Grothe (Hannover Medical School); Artur Varejao (University of Vila real, Portugal), Lars Klimaschewski (University of Innsbruck), Michele Riccio (Università di Ancona), Pieruigi Tos (Ospedale CTO di Torino), Gianluca Ciardelli (Politecnico di Torino).

2 Progetti di ricerca (2015)

Il lavoro del nostro gruppo di ricerca per l'anno 2015 continuerà sulla linea de principali progetto portati avanti negli ultimi anni e finalizzati allo studio di strategie innovative di ingegneria tissutale volte alla ricostruzione e rigenerazione dei nervi in seguito a lesione. Inoltre, grazie all'interazione con gli altri ricercatori del NICO, il focus si sta via via estendendo anche allo studio delle alterazioni a carico del sistema nervoso centrale come descritto al punto 2.2.

2.1 Studio della rigenerazione nervosa in seguito a lesione e sulle strategie per renderla più efficace.

Tale linea di ricerca, svolta nell'ambito del progetto consortile BIOHYBRID finanziato dalla Comunità Europea, si focalizza soprattutto sullo studio in vitro dell'efficacia di nano particelle per il rilascio locale di molecole (fattori neurotrofici e gliotrofici, citochine infiammatorie, e neuro-ormoni). Inoltre, il nostro gruppo si occupa di studi in vivo per la valutazione morfologica e stereologica della rigenerazione dei nervi periferici in seguito a riparazione secondo differenti tipi di approccio: il trapianto tissutale e cellulare (in particolare cellule di Schwann e/o cellule staminali mesenchimali); l'utilizzazione di scaffolds a base di chitosano ed infine la terapia genica per far esprimere a livello della sede di lesione neurale fattori che possano promuovere la rigenerazione neurale.

Inoltre, in collaborazione con ricercatori del Politecnico di Torino, stiamo continuando l'attività di ricerca volta a realizzare un dispositivo biomedicale innovativo in forma di membrana bioartificiale bi-strato e bi-componente per la rigenerazione neuronale.

Infine, in collaborazione con ricercatori dell'Università di Porto, si sta portando avanti uno studio volto ad indagare le potenzialità del trapianto di cellule staminali per promuovere la rigenerazione dei nervi. Il progetto prevede in particolare di comparare l'effetto di cellule staminali di varia origine, in particolare cellule staminali mesenchimali (sia di ratto sia umane) derivate dal midollo osseo, dal tessuto adiposo e dal cordone ombelicale.

Collaborazioni: Claudia Grothe (ZSN, Hannover University, Germany). Xavier Navarro (Universitat Autònoma de Barcelona, Spain). Lars Dahlin (Lund University, Sweden). Antonio Salgado (Minho University, Portugal). Shimon Rockhind (Tel Aviv University, Israel). Ana Colette Mauricio (ICBAS, Porto University, Portugal). Gianluca Ciardelli, Chiara Vitale Brovarone (Politecnico di Torino). Bruno Battiston, Pierluigi Tos (CTO, Torino).

2.3 Studio delle alterazioni a carico del sistema nervoso centrale in seguito a lesioni dei nervi.

Tale linea di ricerca, si basa sull'interazione con gli altri gruppi di ricerca del NICO e si propone di analizzare le alterazioni a carico del sistema nervoso centrale in seguito a lesioni dei nervi periferici. Tale studio è interessante sia da un punto di vista clinico, in quanto dai meccanismi di adattamento del sistema nervoso centrale dipende in larga misura il recupero funzionale in seguito a lesioni periferiche, sia da un punto di vista della ricerca neuro-scientifica di base. Infatti, l'adattamento del sistema nervoso centrale alle lesioni periferico ci potrebbe permettere di chiarire molti aspetti del funzionamento del sistema nervoso centrale medesimo che, in prospettiva, potranno aiutarci ad identificare terapie innovative anche per la malattie che lo colpiscono.

Collaborazioni: Alessandro Vercelli, Luca Bonfanti, Paolo Peretto, Silvia De Marchis (NICO, Torino).

Resoconto delle attività di ricerca svolte nel corso del 2014 presso l'Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO)

3 Prodotti delle attività di ricerca nel 2014

3.1 Articoli pubblicati con affiliazione al NICO

1. Ziv-Polat O, Shahar A, Levy I, Skaat H, Neuman S, Fregnan F, Geuna S, Grothe C, Haastert-Talini K, Margel S. The role of neurotrophic factors conjugated to iron oxide nanoparticles in peripheral nerve regeneration: in vitro studies. *Biomed Res Int.* 2014;2014:267808. doi: 10.1155/2014/267808.
2. Gambarotta G, Ronchi G, Friard O, Galletta P, Perroteau I, Geuna S. Identification and validation of suitable housekeeping genes for normalizing quantitative real-time PCR assays in injured peripheral nerves. *PLoS One.* 2014 Aug 21;9(8):e105601. doi:
3. Riccio M, Pangrazi PP, Parodi PC, Vaianti L, Marchesini A, Neuendorf AD, Bottegoni C, Tos P, Geuna S. The amnion muscle combined graft (AMCG) conduits: A new alternative in the repair of wide substance loss of peripheral nerves. *Microsurgery.* 2014 Nov;34(8):616-22.
4. Crosio A, Valdatta L, Cherubino M, Izzo M, Pellegatta I, Pascal D, Geuna S, Tos P. A simple and reliable method to perform biomechanical evaluation of postoperative nerve adhesions. *J Neurosci Methods.* 2014 Aug 15;233:73-7.
5. Beck-Broichsitter BE, Lamia A, Geuna S, Fregnan F, Smeets R, Becker ST, Sinis N. Does pulsed magnetic field therapy influence nerve regeneration in the median nerve model of the rat? *Biomed Res Int.* 2014;2014:401760.
6. Marvaldi L, Thongrong S, Kozłowska A, Irschick R, Pritz CO, Bäumer B, Ronchi G, Geuna S, Hausott B, Klimaschewski L. Enhanced axon outgrowth and improved long-distance axon regeneration in sprouty2 deficient mice. *Dev Neurobiol.* 2014 Aug 8. doi: 10.1002/dneu.22224.
7. Carvalho M, Costa LM, Pereira JE, Shirotsaki Y, Hayakawa S, Santos JD, Geuna S, Fregnan F, Cabrita AM, Maurício AC, Varejão AS. The role of hybrid chitosan membranes on scarring process following lumbar surgery: post-laminectomy experimental model. *Neurol Res.* 2014 Jun 25:1743132814Y0000000414.
8. Gnani S, di Blasio L, Tonda-Turo C, Mancardi A, Primo L, Ciardelli G, Gambarotta G, Geuna S, Perroteau I. Gelatin-based hydrogel for vascular endothelial growth factor release in peripheral nerve tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med.* 2014 Jun 19. doi: 10.1002/term.1936.
9. Novajra G, Tonda-Turo C, Vitale-Brovarone C, Ciardelli G, Geuna S, Raimondo S. Novel systems for tailored neurotrophic factor release based on hydrogel and resorbable glass hollow fibers. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014 Mar 1;36:25-32.

3.2 Seminari e conferenze con affiliazione al NICO

Changes in the expression neuregulin 1 isoforms and erbb receptors related to nerve crush injury as well as end-to-end neurorrhaphy, 5TH VIENNA SYMPOSIUM ON SURGERY OF PERIPHERAL NERVES. VIENNA (Austria) 21-23 March, 2014.

Stereological estimation of peripheral nerve fibers. 3RD SCIENTIFIC WRITING & STEREOLOGY INTERNATIONAL WORKSHOP, Samsun (Turkey) 8-12 April, 2014.

3.3 Altri prodotti riconducibili alle attività Istituzionali del NICO

Nessuno

4 Fondi di ricerca ricevuti nel 2014

2.1. NEUROLINK – Fondo Programmi di Ateneo (Università di Torino) (2014-2016).
Progetto di durata biennale: Finanziamento erogato: Euro 39.396,00.

5 Fondi di ricerca ricevuti prima del 2012 ed ancora attivi

3.1. BIOHYBRID – *FP7 Collaborative Project [THEME:HEALTH.2011.1.4-2: Tools, technologies and devices for application in regenerative medicine] (2011-2015).*

Progetto di durata quadriennale. Finanziamento erogato: Euro 508.400,00.

Resoconto (anno 2014) e progetto delle attività di ricerca per il 2015 del gruppo **Neuroendocrinologia**, presso l'Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO)

Responsabile del gruppo: **Giancarlo Panzica**

1. Composizione del gruppo di ricerca (1-11-2014)

1.1 Personale strutturato dell'Università di Torino

Giancarlo Panzica (PO)

Stefano Gotti (RU)

Giovanna Ponti (RTD)

1.2. Personale non strutturato

Alice Farinetti (postdoc)

Marilena Marraudino (dottoranda)

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

2. Progetti di ricerca

Il nostro gruppo studia le interazioni tra steroidi e circuiti nervosi ed in particolare i meccanismi neuroendocrini che sono alla base del differenziamento di circuiti cerebrali e dei comportamenti.

Le nostre linee di ricerca sono qui di seguito elencate con i risultati ottenuti nel corso del 2014, in parte presentati a congressi o già pubblicati:

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

Durante il 2014 è stata portata a termine la valutazione del profilo ansioso e depressivo in topi CD1, di entrambi i sessi, esposti a stress cronico imprevedibile (stimoli stressogeni presentati in maniera casuale all'animale sperimentale), confermando l'effetto sessualmente dimorfico dell'esposizione alla condizione di stress per un periodo di tempo medio-lungo. La batteria di test comportamentali ha rivelato una risposta ansiolitica nelle femmine e ansiogena nei maschi alla condizione stressogena applicata (*Foglio et al., manoscritto in revisione*).

Inoltre, sono stati analizzati gli effetti dell'esposizione allo stress sul sistema vasopressinergico: il sistema vasopressina è sessualmente dimorfico e il peptide vasopressina svolge diversi ruoli fisiologici (termoregolazione, pressione sanguigna), oltre a modulare il comportamento sociale, la memoria, la risposta allo stress, ansia e depressione. L'immunoreattività per la vasopressina (AVP) è stata analizzata in quei nuclei cerebrali noti per essere sessualmente dimorfici: setto laterale, nucleo dell'abenula laterale, amigdala mediale e nucleo paraventricolare, nucleo chiave per la risposta fisiologica allo stress. I dati indicano che l'esposizione prolungata allo stress induce un aumento delle strutture immunoreattive alla vasopressina in quelle aree coinvolte nella risposta alle componenti emozionali degli stimoli stressogeni applicati, rivelando un maggior profilo ansioso dei maschi stressati. L'analisi dell'immunoreattività nel nucleo paraventricolare oltre a confermare la presenza di dimorfismo sessuale, indica una significativa diminuzione dell'immunoreattività nei maschi stressati rispetto a quanto osservato nei maschi non stressati e una perdita del dimorfismo nella regione magnocellulare laterale e parvocellulare mediale del nucleo.

Nel prossimo anno le valutazioni quantitative saranno estese anche ad altre regioni che contengono fibre o cellule a vasopressina, in particolare il nucleo della stria terminale (BST).

Sono state completate le analisi biochimiche sulle variazioni di neurosteroidi in tessuti prelevati da topi CD1 di entrambi i sessi esposti alla condizione di stress cronico imprevedibile.

Sebbene l'analisi condotta abbia evidenziato diverse differenze di genere nei livelli dei neurosteroidi nel plasma e nelle aree cerebrali analizzate (corteccia cerebrale, ippocampo,

cervelletto), queste sono risultate statisticamente significative solo nel plasma e nella corteccia cerebrale nel caso del progesterone e testosterone.

È stata completata l'analisi del contenuto in neurosteroidi in tessuti prelevati da ratti maschi nel corso di un esperimento condotto al fine di valutare l'effetto a breve, medio e lungo termine della somministrazione di Finasteride, un inibitore della 5-alfa-reduttasi, enzima che converte il testosterone in diidrotestosterone.

Questo progetto svolto in collaborazione con il Prof. Roberto Melcangi (Università di Milano) proseguirà con la valutazione in parallelo dei dati relativi all'analisi biochimica e quelli relativi all'analisi comportamentale focalizzandosi sull'effetto del trattamento con finasteride a breve termine.

Collaborazioni: Roberto Melcangi e Donatella Caruso (Università di Milano).

Un altro modello di depressione che abbiamo studiato, è costituito da femmine di topo adulte ed ovariectomizzate (modello di deprivazione di ormoni ovarici come in menopausa). E' infatti noto che durante la menopausa sono frequenti i fenomeni depressivi legati allo stress. In questa ricerca abbiamo studiato gli effetti dello stress cronico imprevedibile in femmine di topo ovariectomizzate da lungo tempo. I risultati di questa ricerca indicano una differenziazione funzionale ed una diversa capacità di rispondere agli stimoli (ovariectomia, stress o la combinazione dei due fattori) del sistema a vasopressina del nucleo paraventricolare, confermandone il ruolo chiave. Il lavoro è attualmente in press su Brain Research.

Collaborazione: Università di Friburgo (Daniela Grassi) e Istituto Cajal, Madrid (L.M. Garcia-Segura)

2.2. Invecchiamento e Sistema Vasopressinergico nella Sindrome di Down

Abbiamo approfondito i cambiamenti a cui va incontro il sistema vasopressinergico durante l'invecchiamento nel nucleo paraventricolare ipotalamico (PVN) di un modello murino per lo studio della Sindrome di Down.

Riguardo all'invecchiamento, i dati presenti in letteratura sono molto contrastanti: alcuni studi non hanno messo in evidenza perdite di neuroni sia nei roditori che nell'uomo; altre ricerche, al contrario, hanno documentato una diminuzione nel numero di neuroni ad AVP, accompagnato ad un'aumento delle dimensioni cellulari.

Nelle malattie neurodegenerative come l'Alzheimer e la sindrome di Down, a parte un severo deficit del sistema colinergico, non sono state evidenziate particolari modificazioni a carico dei neuroni ad AVP nel PVN.

Il topo Ts65Dn è il modello murino più utilizzato per lo studio della sindrome di Down. Questo topo mostra dei gravi deficit nell'apprendimento e numerose alterazioni dei circuiti neuronali. In questo studio abbiamo analizzato i cambiamenti nella immunoreattività per l'AVP nel PVN di femmine Ts65Dn all'età di 18 mesi. I risultati ottenuti mostrano una significativa diminuzione del numero di cellule immunopositive per l'AVP e un aumento delle dimensioni cellulari se comparate ai controlli della stessa età (Panzica et al., sottomesso).

2.3. Steroidi sessuali e neurogenesi

Dopo aver evidenziato come il testosterone stimoli la neurogenesi nella SVZ di ratti maschi, e come questo sia dovuto alla sua aromatizzazione in estradiolo, abbiamo studiato quale sottopopolazione di precursori neuronali erano coinvolti in questa regolazione. I risultati ottenuti indicano che vengono coinvolte le cellule che esprimono PHH3, un marcatore di proliferazione e Mash1, marcatore delle cellule C della SVZ. Successivamente sono state analizzate le femmine di ratto e si è dimostrato che la regolazione endocrina della proliferazione cellulare, da parte del testosterone e dell'estradiolo, è sessualmente dimorfica: nelle femmine, infatti non troviamo gli stessi effetti di *up-regulation* che avevamo dimostrato precedentemente nei maschi (Farinetti et al., 2014, sottomesso, in seconda revisione).

La fase successiva dell'esperimento prevede di stabilire se gli effetti degli ormoni sessuali, sulla proliferazione nella SVZ del ratto adulto, sono diretti (studiando la possibile espressione di recettori per gli estrogeni nella SVZ) o indiretti (studiando una possibile azione a distanza attraverso collegamenti sinaptici da neuroni sensibili agli estrogeni posti in altre aree cerebrali, come, ad esempio, il sistema di neuroni e di fibre a serotonina nei nuclei del rafe).

Inoltre abbiamo studiato gli effetti di alcuni distruttori endocrini (genisteina, la TBT ed il BPA) sulla proliferazione cellulare nella SVZ e abbiamo ottenuto interessanti risultati preliminari sull'effetto estrogenico del BPA sulla proliferazione delle cellule che esprimono PHH3 a livello della SVZ in topi maschi adulti. E' nostra intenzione approfondire lo studio di questo effetto utilizzando altri marcatori di proliferazione e analizzare anche cosa succede alle femmine in modo da valutare se anche in questo caso sia possibile evidenziare un effetto dimorfico.

Collaborazioni: Paolo Peretto (NICO, Torino).

2.4. Interazioni riproduzione-controllo del metabolismo

Il sistema di neuroni a GnRH dipende fortemente dagli estrogeni, pur non esprimendo recettori per questi ormoni, per la propria regolazione. Il sistema di neuroni a kisspeptina presente a livello ipotalamico, è direttamente influenzato dagli estrogeni e regola, per via transinaptica, il sistema a GnRH. La riproduzione è un fenomeno fortemente dipendente sia dal corretto funzionamento del sistema a GnRH, sia dalla sufficiente disponibilità di materiale energetico. Il metabolismo è anch'esso regolato da circuiti neuroendocrini ipotalamici, che hanno prevalentemente sede nel sistema nucleo arcuato-nucleo paraventricolare. E' interessante notare come nel nucleo arcuato siano contemporaneamente presenti neuroni che stimolano l'assunzione di cibo (NPY), che deprimono lo stesso fenomeno (POMC) e che regolano il sistema a GnRH (neuroni a kisspeptina). Gli elementi parvocellulare del PVN producono, tra gli altri, il CRF (che regola l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene) ed il TRH (che regola l'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide). Studi condotti nel nostro ed in altri laboratori, hanno messo in evidenza come il PVN rappresenti uno dei principali target ipotalamici del sistema a kisspeptina.

Per comprendere le ipotetiche relazioni tra sistema a kisspeptina e sistemi di regolazione del metabolismo, abbiamo analizzato come prima cosa la distribuzione delle fibre a kisspeptina nel PVN di topi femmine adulte CD1, in due fasi del ciclo estrale, estro e diestro, e la sua innervazione durante lo sviluppo postnatale (da PND12 a PND90). I nostri risultati indicano la presenza di una differenza significativa tra la porzione mediale rispetto alla porzione laterale del PVN, con profondo effetto del ciclo estrale sull'immunoreattività. In particolare, la reattività della kisspeptina risulta maggiore nella parte mediale del PVN nella fase di estro. Anche durante lo sviluppo postnatale si è analizzata una differenza significativa dell'immunoreattività alle diverse età, mostrando un incremento a PND18 stabilizzatosi fino a PND30, dopo di che si assiste a un significativo decremento. I dati, quindi, dimostrano un'innervazione della kisspeptina eterogenea nel PVN con cambiamenti durante il ciclo estrale e durante lo sviluppo postnatale. Questi dati verranno presentati in forma preliminare durante il prossimo congresso del GISN.

Nel 2015, abbiamo intenzione di approfondire questo argomento che fa parte della azione COST-EU BM 1105. In particolare, vogliamo studiare le relazioni tra sistema a kisspeptina del PVN e sistemi parvocellulari, localizzati nella porzione mediale del nucleo, che sono coinvolti nel controllo del metabolismo e nei meccanismi di *food intake*, come il TRH (*thyrotrophin releasing hormone*), coinvolto nell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide, e il CRH (*corticotropin-releasing hormone*), implicato nell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene.

Collaborazioni: Isabelle Franceschini-Matthieu Keller, Tours, France), Manuel Tena-Sempere (Cordoba).

2.5. Distruttori endocrini e regolazione di circuiti cerebrali correlati al comportamento ansioso e all'aggressività

I distruttori endocrini sono un gruppo eterogeneo di sostanze chimiche in grado di interferire con il

sistema endocrino; molti distruttori endocrini sono agonisti o antagonisti di estrogeni e androgeni in quanto sono in grado di legarsi ai loro recettori. Di conseguenza anche i circuiti cerebrali possono diventare un potenziale bersaglio della loro azione.

La genisteina è un fitoestrogeno, particolarmente abbondante nella soia, classificato come distruttore endocrino in quanto è in grado di legarsi ai recettori per gli estrogeni esercitando un'attività sia estrogenica che anti-estrogenica. La genisteina è molto diffusa nella dieta umana, anche durante la gravidanza. Gli embrioni e i feti sono di conseguenza generalmente esposti alla genisteina durante il loro sviluppo e subito dopo la nascita. In questo studio abbiamo riprodotto questo tipo di esposizione in un modello murino: abbiamo somministrato giornalmente genisteina a delle femmine di topo durante le fasi tardive della gravidanza e nei primi giorni di allattamento. Questa somministrazione ha determinato poi nei figli maschi dei cambiamenti significativi nei comportamenti aggressivi e nell'ansia.

Dopo aver sacrificato gli animali abbiamo analizzato i circuiti cerebrali coinvolti in questi comportamenti e abbiamo trovato delle variazioni statisticamente significative nel numero di cellule positive alla ossido nitrico sintetasi nell'amigdala. Questi dati indicano che l'esposizione precoce ai fitoestrogeni può indurre degli effetti a lungo termine nella differenziazione delle strutture cerebrali e nei comportamenti (Rodriguez-Gomez et al., 2014). Nelle fasi successive di questo progetto è nostra intenzione andare ad analizzare altri sistemi neuronali, primo fra tutti il sistema vasopressinergico.

3. Prodotti delle attività di ricerca anno 2014

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

Melcangi RC, **Panzica GC** (2014) Allopregnanolone: State of the art. *Progr. Neurobiol.*, 113:1-5.

Rodriguez-Gomez A, Filice F, **Gotti S, Panzica GC** (2014) Perinatal exposure to genistein affects the normal development of anxiety and aggressive behaviors and nitric oxide system in CD1 male mice. *Physiol. Behav.* 133:107-114

Bonomi M, Cappa M, Cariboni A, Di Schiavi E, Fabbri A, Ferlin A, Foresta C, Ghizzoni L, Jannini E, Krausz C, Loche S, Lombardo F, Maggi M, R Maggi, Maghnie M, Mancini A, Merlo G, **Panzica G**, Radetti H, Russo G, Simoni M, Sinisi A A, Persani L (2014) Kallmann's syndrome and normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism: two largely overlapping manifestations of one rare disorder. *Journal of endocrinological investigation* 37: 5. 499-500

Grassi D, Lagunas-Garcia N, Calmarza-Font I, Diz-Chaves Y, Garcia-Segura LM, **Panzica GC** (2014) Chronic unpredictable mild stress and long-term ovariectomy affect arginine-vasopressin expression in the paraventricular nucleus of adult female mice. *Brain Res.*, 1588, 55-62.

Farinetti A, Tomasi S, Foglio B, Ferraris A, **Ponti G, Gotti S, Peretto P, Panzica GC**. Testosterone and estradiol differentially affect cell proliferation in the subventricular zone of adult gonadectomized male and female rats. *Neuroscience* in press.

3.1.1. Submitted

Mele P, Zammaretti F, Longo A, **Panzica GC**, Oberto A, Eva C. Sex-dependent regulation of hypothalamic neuropeptide Y- Y1 receptor gene expression in leptin treated obese (*ob/ob*) or lean mice. *Submitted*

Panzica GC, Farinetti A, Marraudino M, Foglio B, Gotti S. Modification of the paraventricular

vasopressinergic systems in aged Ts65Dn mouse model for Down syndrome. *Submitted*

Foglio B, Filice F, **Farinetti A, Gotti S, Panzica GC**. Sexually dimorphic effects of unpredictable chronic mild stress (ucms) in a murine model of anxiety and depression disorder. *Submitted*

3.2. Seminari e conferenze con affiliazione al NICO

GC Panzica - DISTRUTTORI ENDOCRINI: Effetti sul differenziamento cerebrale e comportamentale - Seminario presso Fondazione Mauceri, 10 Gennaio 2014, Pavia.

GC Panzica - Distruttori endocrini e circuiti ipotalamici che controllano il metabolismo energetico. - 4° Incontri Italiani Ipotalamo Ipofisari, 6-8 Febbraio 2014 Milano

GC Panzica - Il sistema nervoso centrale come bersaglio per gli interferenti endocrini. 50° Congresso dell'Associazione Italiana di Neuropatologia e Neurobiologia Clinica, 5-7 Giugno 2014, Verbania

GC Panzica - Sexually dimorphic effects of endocrine disruptors on brain and behavior. 8th International Conference on Hormones Brain and Behavior, 24-27 Giugno 2014, Liege (Belgium).

GC Panzica - Hypothalamus, energy metabolism and endocrine disruptors - Obesity/Diabetes/Metabolic Syndrome and the Role of Endocrine Disruptors, May 16-18, 2014, Parma, Italy

3.2.1. Partecipazioni con presentazione posters o comunicazioni ai seguenti congressi

- 4° Incontri Italiani Ipotalamo Ipofisari, 6-8 Febbraio 2014 Milano
- COST Action BM1105 Meeting: Novel insights into hypogonadotropic hypogonadism: Berlino, 5-8 Marzo 2014
- Obesity/Diabetes/Metabolic Syndrome and the Role of Endocrine Disruptors, May 16-18, 2014, Parma, Italy
- 50° Congresso dell'Associazione Italiana di Neuropatologia e Neurobiologia Clinica, 5-7 Giugno 2014, Verbania
- 8th International Conference on Hormones Brain and Behavior, 24-27 Giugno 2014, Liege (Belgium)
- 9th FENS Forum of Neuroscience, 5-9 Luglio 2014, Milano
- XXIV Convegno Nazionale GISN, Bologna, 28-29 Novembre 2014

3.3. Organizzazione conferenze con affiliazione al NICO

- Main Organizer

8th International Meeting Steroids and Nervous System, Torino-Orbassano (TO), Italy, 14-18 February 2015

- Member of the Scientific Committee

9th FENS Forum of Neuroscience – Milano (Italy)

8th International Conference on Hormones Brain and Behavior, Liege (Belgium)

3.4. Altri prodotti riconducibili alle attività Istituzionali del NICO

Dal 2014 membro del EU EDC Task Force della Endocrine Society (USA), composta da: R. Thomas Zoeller, PhD, e Jean-Pierre Bourguignon, MD PhD (chairs), Barbara Demeneix, PhD, DSC; Richard Ivell, PhD; Josef Koehrlé, PhD; Adriana Maggi, PhD; GianCarlo Panzica, PhD; and Remy Slama, PhD (da Belgium, France, Germany, Italy, and the United Kingdom). La task force ha il compito di raccordarsi con gli organi rappresentativi della EU per stabilire normative comuni tra

USA e EU nel campo dei distruttori endocrini. L'expertise del Prof. Panzica è richiesto per quanto riguarda le interazioni EDC-sistema nervoso.

3.4.1. Attività editoriali

Allopregnanolone: State of the Art (Melcangi RC, **Panzica GC** eds) Progress in neurobiology 113: pp 1-136, Elsevier - ISSN: 0301-0082.

4. Finanziamenti per la ricerca

Progetti Speciali di Ateneo - Università di Torino: € 10.000

Ricerca Autofinanziata dal Dipartimento: € 17.000

Progetti Finanziamento Locale ancora attivi- Università di Torino: € 5.000

Azione COST-EU

Resoconto (anno 2014) e progetto delle attività di ricerca per il 2015 del gruppo **Elettrofisiologia e Neurodegenerazione**, presso l'Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO)

Responsabile del gruppo: **Prof. Filippo Tempia**

1. Composizione del gruppo di ricerca

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

1.2. Personale non strutturato
Eriola Hoxha (postdoc)

Partecipano alle attività del gruppo alcuni studenti tesisti dei Corsi di Laurea in Biotecnologie, in Biologia e della Scuola MD/PhD.

Progetti di ricerca (2015)

1. Meccanismi responsabili della degenerazione delle cellule di Purkinje in un modello murino knock-in di atassia SCA28

Le atassie spinocerebellari (SCA) includono circa 40 diversi sottotipi di patologie del sistema nervoso centrale e colpiscono 1 su 30.000 soggetti. Sono attualmente incurabili. Nel 2010 il gene mutato nei pazienti con SCA28 è stato identificato come *AFG3L2* (Di Bella et al., 2010). Il gene *AFG3L2* codifica per una proteina che forma un complesso esamerico noto come proteasi *m*-AAA, assemblandosi con un'altra proteina: la paraplegina, coinvolta nella paraplegia spastica ereditaria. Nel 2009 il laboratorio del Prof. Giorgio Casari dell'Istituto Scientifico San Raffaele di Milano ha pubblicato che un topo con la delezione di un allele di *Afg3l2* presenta aploinsufficienza in relazione ad una serie di sintomi e segni motori riconducibili alla SCA28. Questo ha portato alla proposta di utilizzare questo modello per lo studio dei meccanismi cellulari e molecolari della SCA28. Dato che i pazienti con SCA28 non hanno la delezione di un allele bensì una sua mutazione di cui non è attualmente noto l'effetto (loss of function o negative-dominant o una somma dei due meccanismi), il laboratorio del prof. Alfredo Brusco, del Dipartimento di Scienze Mediche dell'Università di Torino, ha generato un nuovo modello murino, più vicino alla situazione dei pazienti, in cui è stata introdotta una delle mutazioni che causano la SCA28: si tratta di topi knock-in per la mutazione (SCA28-KI). La nostra ricerca utilizza entrambi i modelli knock-out e knock-in.

Al momento non esiste nessuna terapia per le SCA, compresa la SCA28. Al fine di progettare una terapia efficace è indispensabile aumentare le attuali conoscenze sui meccanismi patogenetici. Nei pazienti è stata individuata atrofia cerebellare, ma non è disponibile nessun reperto autoptico per sapere quali siano i tipi cellulari che degenerano né per ipotizzarne il meccanismo di morte cellulare. Per risolvere questo problema la ricerca sulle SCA sta percorrendo due strade, complementari tra di loro: lo studio di cellule derivate da prelievi dai pazienti (linfoblasti e fibroblasti) e lo studio di modelli animali. Lo studio delle sole cellule dei pazienti può dare delle informazioni generiche sull'attivazione di meccanismi che portano a danno cellulare, ma bisogna tenere presente che le sole cellule che risentono della mutazione sono dei particolari sottotipi di neuroni, completamente diversi rispetto alle cellule prelevabili dai pazienti. Al contrario, nei modelli animali è possibile studiare direttamente il danno delle cellule nervose delle stesse strutture encefaliche alterate nei pazienti - nel caso delle atassie il cervelletto.

Il fine della nostra ricerca sui due modelli di SCA28 è di capire quali siano i tipi di neuroni cerebellari implicati e quali siano i meccanismi e le vie di trasduzione del segnale che portano al danno o alla morte cellulare. Una volta individuato il meccanismo molecolare che danneggia i

neuroni cerebellari nei modelli SCA28, diventa possibile l'ideazione di una terapia mirata a fermare o far regredire il danno neurologico. Fine ultimo della nostra ricerca è di fornire la prima terapia applicabile ai pazienti con SCA28, con la speranza che sia generalizzabile agli altri tipi di SCA e di atassia.

2. Meccanismi responsabili della degenerazione delle cellule di Purkinje nella atassia SCA38, recentemente identificata.

Il nostro laboratorio ha collaborato alla scoperta del gene responsabile di una nuova forma di atassia spino-cerebellare, che abbiamo denominato SCA38 (Di Gregorio et al., 2014). Il gene *ELOVL5*, mutato nei pazienti con SCA38, codifica per un'elongasi, un enzima che costituisce una tappa importante della sintesi di acidi grassi poli-insaturi a catena lunga. Il principale prodotto della elongasi *ELOVL5* è l'acido docosaesaenoico (DHA). Dato che si tratta di una patologia di recentissima scoperta, non è ancora noto se la mutazione di *ELOVL5* abbia un meccanismo di perdita di funzione (*loss of function*) o se la proteina mutata sia tossica per i neuroni (*toxic gain of function*). La proteina *ELOVL5* mutata potrebbe accumularsi nel reticolo endoplasmatico o nell'apparato di Golgi ed attivare delle risposte cellulari che portano a danno o a morte cellulare. Queste possibilità verranno valutate allo stesso tempo nelle cellule derivate dai pazienti (linfoblasti e fibroblasti) e nei neuroni di un modello animale. I nostri primi dati hanno mostrato che *ELOVL5* è espresso nel cervelletto umano e di topo nelle cellule di Purkinje e in cellule della sostanza bianca (Di Gregorio et al., 2014). Nulla si sa sulle funzioni di *ELOVL5* in queste cellule. Studi precedenti su *ELOVL5* si sono focalizzati sugli aspetti metabolici, indagati principalmente in cellule epatiche. Al fine di approfondire i meccanismi metabolici regolati dal gene *ELOVL5*, il laboratorio del Dr. Young-Ah Moon e del Dr. Jay Horton della University of Texas Southwestern Medical Center (Dallas, TX, USA) ha generato un topo con una delezione del gene *Elovl5*. Questi ricercatori hanno studiato le alterazioni epatiche e metaboliche di tale topo knock-out per *Elovl5* (*Elovl5*^{-/-}), ma non ne hanno verificato un eventuale fenotipo neurologico né hanno analizzato il sistema nervoso. I Dr. Moon e Horton hanno dato la loro disponibilità a fornirci il topo *Elovl5*^{-/-} per permetterci studiarlo in relazione alla SCA38.

3. Deficit elettrofisiologici cerebellari in un modello murino di SCA27

In collaborazione con la prof.ssa Fernanda Laezza della University of Texas Medical Branch at Galveston (USA) stiamo studiando i meccanismi della atassia SCA27 nei topi knock-out per il gene mutato: *FGF14*. Il focus di questa ricerca riguarda le alterazioni sinaptiche nel cervelletto. I primi risultati mostrano un deficit della sinapsi tra granuli cerebellari e cellule di Purkinje, che potrebbe spiegare almeno in parte i deficit motori. I nostri dati mostrano che si tratta di un problema nel rilascio del neurotrasmettitore, aprendo una nuova strada nello studio delle funzioni fisiologiche della proteina Fgf14.

4. Il topo *Fgf14* knock-out come nuovo modello di malattie psichiatriche

Recenti risultati indicano che i topi knock-out per *Fgf14* presentano delle alterazioni motivazionali, emotive e cognitive. In collaborazione con la prof.ssa Fernanda Laezza della University of Texas Medical Branch at Galveston (USA) stiamo studiando i meccanismi delle alterazioni motivazionali ed emotive in relazione ai deficit funzionali e molecolari del Nucleus Accumbens, il principale centro nervoso che regola queste funzioni. Allo stesso tempo stiamo studiando le alterazioni cognitive in relazione ai deficit funzionali e molecolari dell'ippocampo, una struttura cerebrale fondamentale per funzioni cognitive come la memoria e l'orientamento spaziale.

5. Alterazioni dell'eccitabilità di membrana delle cellule granulari del giro dentato in un modello murino del 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). Sempre in collaborazione con la prof.ssa Fernanda Laezza della University of Texas Medical Branch at Galveston (USA) stiamo completando uno studio sulla generazione dei potenziali d'azione dei neuroni granulari del giro dentato dell'ippocampo nei topi Tg2576, modello del morbo di Alzheimer. Abbiamo classificato tali neuroni in due categorie, che corrispondono a due diversi livelli di differenziamento. Ciascuna categoria presenta delle alterazioni specifiche dei potenziali d'azione. Inoltre, la somministrazione di rosiglitazone, un farmaco che aumenta la funzione dei recettori dell'insulina, normalizza la maggioranza dei parametri alterati.

6. Deficit cognitivi e sinaptici in un modello murino di sindrome metabolica (topo *AtENPPI*)

Esiste una correlazione molto forte tra la sindrome metabolica, il diabete mellito di tipo II e il morbo di Alzheimer. I topi *AtENPPI* hanno una sovraespressione del gene *ENPPI* selettivamente nel tessuto adiposo. Tale transgene provoca un'aumentata immissione in circolo di acidi grassi con conseguente steatosi epatica e insulino-resistenza periferica. I topi *AtENPPI* sono quindi un modello di sindrome metabolica indotta da fattori periferici, esterni al sistema nervoso centrale. In collaborazione con il prof. Nicola Abate della University of Texas Medical Branch at Galveston (USA) stiamo scoprendo che nel cervello di questo modello animale vi sono diversi deficit funzionali e molecolari in linea con l'insorgenza di uno stato di deterioramento cognitivo e demenza. In collaborazione con il prof. Giulio Tagliatela, sempre della University of Texas Medical Branch at Galveston (USA), stiamo studiando gli effetti di questa sindrome metabolica sui danni neuronali prodotti dalla beta amiloide, la principale molecola che scatena il morbo di Alzheimer.

7. Meccanismi di propagazione del danno neuronale in modelli animali di morbo di Alzheimer

Un problema non ancora risolto nel morbo di Alzheimer è il meccanismo della propagazione della patologia da zone di tessuto affetto dalle lesioni neuronali ad aree ancora intatte. Per affrontare questa tematica abbiamo sviluppato una tecnica di trapianto di tessuto cerebrale embrionale nell'ippocampo di topi modello del morbo di Alzheimer. Tutte le cellule derivate dal trapianto sono identificabili in quanto provenienti da embrioni che esprimono la green fluorescent protein (GFP) in tutte le cellule. Ci proponiamo di studiare la trasmissione della patologia al tessuto trapiantato, in cui misureremo la quantità di placche amiloidi e le lesioni neuronali come le distrofie neuritiche e la perdita di spine dendritiche.

Collaborazioni:

- Prof. Fernanda Laezza, Dept. of Pharmacology and Toxicology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX (USA).
- Prof. Giulio Tagliatela, Dept. of Neuroscience, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX (USA).
- Prof. Nicola Abate, Dept. of Internal Medicine and Endocrinology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX (USA).
- Dr. Alfredo Brusco, Dept. di Genetics, Biology and Biochemistry, University di Turin (Italy).
- Prof. Giorgio Casari, Vita-Salute San Raffaele University, Milan (Italy).
- Prof. Jay Horton e Prof. Young-Ah Moon, UT Southwestern University Medical Center, Dallas, TX, USA.

8. Prodotti delle attività di ricerca nel periodo novembre 2013- novembre 2014

8.1. Articoli pubblicati con affiliazione al NICO

1. Di Gregorio E, Borroni B, Giorgio E, Lacerenza D, Ferrero M, Lo Buono N, Ragusa N, Mancini C, Gaussen M, Calcia A, Mitro N, Hoxha E, Mura I, Coviello DA, Moon YA, Tesson C, Vaula G, Couarch P, Orsi L, Duregon E, Papotti MG, Deleuze JF, Imbert J, Costanzi C, Padovani A, Giunti P, Maillat-Vioud M, Durr A, Brice A, **Tempia F**, Funaro A, Boccone L, Caruso D, Stevanin G, Brusco A. (2014) ELOVL5 Mutations Cause Spinocerebellar Ataxia 38. *Am J Hum Genet* 95: 209-217. pii: S0002-9297(14)00310-3. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.07.001.
2. Lippiello P, Hoxha E, Volpicelli F, De Luca G, **Tempia F***, Miniaci MC. Noradrenergic Modulation of the Parallel Fiber-Purkinje Cell Synapse in Mouse Cerebellum. *Neuropharmacol* 89: 33-42. Published online Sept 9, 2014; DOI: 10.1016/j.neuropharm.2014.08.016. (*corresponding author).
3. **Tempia F**, Negro G, Alshammari MA, Alshammari TK, Laezza F (2014) Parallel fiber to Purkinje cell synaptic impairment in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 27. 44rd annual meeting of the Society for Neuroscience, Washington DC, USA. Abstract
4. Tagliatela G, Zhang W, Tuvendorj D, Tumurbaatar B, **Tempia F**, Laezza F, Abate N (2014) Altered membrane lipids, reduced field current and increased vulnerability to A β oligomers in CNS synapses from transgenic mice with peripheral insulin resistance. 44rd annual meeting of the Society for Neuroscience, Washington DC, USA. Abstract.

Manoscritti in preparazione e sottomessi:

1. **Filippo Tempia**, Giulia Negro, Alshammari A Musaad, Alshammari Tahani K, and Fernanda Laezza. Parallel fiber to Purkinje cell synaptic impairment in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 27. *Front. Cell Neurosci. Special Issue: "Ion Channels: from Physiology to Channelopathies"*. (in preparation).
2. Hanaa S. Sallam, Batbayar Tumurbaatar, Wen-Ru Zhang, Demidmaa Tuvendorj, **Filippo Tempia**, Fernanda Laezza, Giulio Tagliatela, Nicola Abate. Peripheral adipose tissue insulin resistance alters lipid composition and function of hippocampal synapses. *J Neurochem* (Accepted upon revision).
3. Nenov MN, **Tempia F**, Denner L, Dineley K, Laezza F. Impaired firing properties of dentate granule neurons in an Alzheimer's disease animal model are rescued by PPAR γ agonism. (submitted).
4. Sadallah M, Labat-Gest V, **Tempia F**. Propagation of amyloid pathology to transplanted healthy embryonal brain tissue from a transgenic model of Alzheimer's disease (manuscript in preparation).
5. Hoxha E, Croci L, Consalez G, **Tempia F**. Enhancement of GABAergic synapses onto cerebellar Purkinje cells in *Ebf2* null mice (manuscript in preparation).
6. 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. (manuscript in preparation).

9. Fondi di ricerca ricevuti nel 2014

- Telethon: "Translating molecular pathology into a therapeutic strategy in SCA38, a newly identified form of spinocerebellar ataxia" (3 years).

10. Fondi di ricerca ricevuti prima del 2014 ed ancora attivi

- Telethon: "Spinocerebellar ataxia type 28: cellular and animal models to unravel the pathogenesis and to identify potential therapeutic targets"
- PRIN "Atassie ereditarie, uno studio integrato: dall'approccio genomico ai meccanismi patogenetici mediante modelli animali e cellulari" (coordinatore: Prof. Giorgio Casari)
- Ricerca locale Università di Torino 2012
- Ricerca locale Università di Torino 2013

Resoconto (anno 2014) e progetto delle attività di ricerca per il 2015 del gruppo **Sviluppo e patologia cerebrale**, presso l'Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO)

Responsabile del gruppo: **Alessandro Vercelli**

1. Composizione del gruppo di ricerca (1-11-2014)

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

Marina Boido (RTD)
Elena Tamagno (RC)
Alessandro Vercelli (PA)

1.2. Personale non strutturato

Michela Guglielmotto (assegnista)
Giusi Manassero (postdoc)
Valeria Valsecchi (postdoc)
Debora Monteleone (dottoranda)
Matilde Ghibaudi (dottoranda)
Ivan Repetto (dottorando)
Marta Tropiano (dottoranda)

Partecipano alle attività del gruppo alcuni studenti tesisti dei corsi di laurea in Medicina e Chirurgia, Farmacia e Biotecnologie.

1. Progetti di ricerca (2014)

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, dai roditori fino all'uomo. Studiamo i meccanismi molecolari che portano alla neurogenesi e alla morte neuronale, che osserviamo nello sviluppo e in modelli sperimentali di ischemia transitoria o permanente, nel glaucoma acuto o cronico, epilessia e malattia di Alzheimer. Inoltre, studiamo il ruolo immunomodulatorio, neuroprotettivo e di stimolazione alla crescita assonale della terapia cellulare nella atrofia muscolare spinale, nella sclerosi laterale amiotrofica e nel trauma spinale. Studiamo quindi i substrati anatomici e molecolari dello sviluppo neurale e della fisiologia, che vengono alterati nella patologia.

1.1. 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'analisi dei loro fattori di trascrizione, 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. Recentemente inoltre abbiamo studiato, insieme al gruppo di Arlotta, la distribuzione della mielina attorno agli assoni dei diversi tipi di neuroni piramidali, osservando come spesso i neuroni sopragranulari abbiano un tratto iniziale dell'assone privo di mielina più lungo di quelli infragranulari. Inoltre, abbiamo osservato che l'assone dei neuroni piramidali ha lunghi tratti amielinici in corteccia. Intendiamo ora studiare la relazione tra assone/oligodendrociti nei diversi tipi cellulari, in collaborazione anche con il gruppo della prof.ssa Buffo.

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

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

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

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

1.3. Meccanismi di morte neuronale nelle malattie neurodegenerative (infarto cerebrale, malattia di Parkinson, 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.

Recentemente abbiamo ottenuto interessanti risultati sul ruolo di JNK in un modello di Parkinson. La somministrazione del precursore della dopamina, la L-DOPA, blocca rigidità, tremore e bradicinesia nella fase iniziale della malattia. Tuttavia, l'azione di L-DOPA diminuisce con il tempo, imponendo così una escalation nel dosaggio, che alla fine si traduce nella comparsa di movimenti involontari anomali e discinesia, che si verifica anche dopo il trapianto di neuroni dopaminergici embrionali. Vi sono evidenze sempre più consistenti che indicano che questi sintomi sono causati dalla trasmissione anomala che si verifica in una vasta popolazione di neuroni striatali spinosi medi. Utilizzando un modello murino di PD, abbiamo recentemente scoperto che la questi sintomi sono associati ad un forte aumento dell'espressione e della fosforilazione del fattore di trascrizione c-Jun. Allo stato attuale, tuttavia, non si sa nulla circa la possibile implicazione di c-Jun nella discinesia. Studieremo quindi i meccanismi coinvolti nell'aumento di L-DOPA indotto da c-

Jun e esamineremo il coinvolgimento della chinasi c-Jun N-terminale (JNK) nella fosforilazione di c-Jun indotta da L-DOPA, un cambiamento che migliora la efficienza trascrizionale di c-Jun. Esamineremo anche l'impatto dell'aumento della segnalazione JNK/c-Jun sull'espressione genica. Avendo già a disposizione nel nostro laboratorio delle molecole che interagiscono sulla via di segnalazione di JNK, è possibile prevedere che questi studi possano indicare nuovi bersagli terapeutici per trattare le discinesie.

Collaborazioni: Tiziana Borsello (Negri, Milano); Gilberto Fisone (Karolinska Institutet, Stoccolma, Svezia) Thomas Herdegen (Institute of Pharmacology, Kiel, DE), Victor Gurewich (Harvard, Boston, MA), Helena Viera (Oeira, Portugal).

1.4 Malattie del motoneurone (SLA e SMA)

SLA (sclerosi laterale amiotrofica) e SMA (atrofia muscolare spinale) sono due malattie del motoneurone, con differente eziologia, ma numerose caratteristiche fisiopatologiche comuni. Siamo interessati a differenti aspetti che vanno dalla neuroinfiammazione alla morte neuronale, utilizzando un approccio sia istologico che molecolare.

Per quanto riguarda la SLA, stiamo studiando Nurr1, un recettore nucleare orfano implicato in meccanismi di neuroprotezione e immunomodulazione. Il trapianto di cellule staminali mesenchimali sembra up-regolare l'espressione di Nurr1, suggerendo che la sua attivazione possa promuovere la sopravvivenza dei motoneuroni. Stiamo valutando se Nurr1 possa modulare la neuroinfiammazione e rallentare il decorso della patologia. Inoltre, in collaborazione con il gruppo del Prof. Ferri, stiamo valutando la presenza di peptidi VGF (coinvolti nella regolazione dell'omeostasi energetica e nel metabolismo) nel plasma, nel midollo spinale, nella corteccia motoria e nel tronco encefalico dei topi SOD, studiandone l'espressione mediante ELISA a diversi stadi della patologia.

Invece per ciò che concerne la SMA, stiamo valutando diversi possibili approcci terapeutici sulla base di alcuni meccanismi molecolari che appaiono coinvolti. Abbiamo osservato come la degenerazione dei motoneuroni sia associata al fenomeno dell'autofagia, un importante processo fisiologico per eliminare organuli danneggiati/invecchiati e proteine anomale. L'impiego di agenti inibenti o promuoventi l'autofagia ci ha permesso di comprendere la sua implicazione nella progressione della malattia, e di trovare un nuovo possibile target terapeutico.

Inoltre stiamo studiando le anomalie a carico delle giunzioni neuromuscolari, data la loro immaturità in caso di SMA. Il sistema agrina/neurotripsina è fondamentale nella formazione delle giunzioni neuromuscolari e ne abbiamo analizzato il suo eventuale coinvolgimento nella patogenesi della SMA. Il modello murino che studiamo ha un ridotta quantità di agrina, segno quindi di un'alterazione nel sistema: una terapia di rimpiazzo dell'agrina mancante ha permesso di migliorare le performance motorie degli animali trattati, di ridurre l'atrofia e di sostenere la maturazione delle giunzioni neuromuscolari. Stiamo studiando il coinvolgimento del miRNA206 (un miRNA specifico dei muscoli scheletrici) nella SMA: come già dimostrato nella SLA, il miRNA206 e le molecole da esso regolate sono altamente espresse in caso di malattia, in un estremo tentativo compensatorio. Dopo preliminari esperimenti in vitro, stiamo ora ricorrendo all'uso della terapia genica, in modo da manipolare in vivo l'espressione del miRNA206.

Recentemente, abbiamo iniziato una collaborazione con il Prof. Chiò, la dott.ssa Valentini, la dott.ssa Fagioli e la dott.ssa Casalone per studiare l'interazione tra i geni delle due malattie (SLA e SMA) nell'uomo e nei modelli sperimentali.

Collaborazioni: C. Casalone (Istituto Zooprofilattico, Torino); A. Chiò (Clinica Neurologica, Torino); C. Valentini (Neuroradiologia, Ospedale Molinette, Torino); L. Mazzini (Clinica Neurologica, Novara), F. Fagioli (Osp. Regina Margherita, Torino), Giorgio Battaglia (Besta, Milano), Elia Di Schiavi (IGB, CNR, Napoli), GL. Ferri (Università di Cagliari), R. Fariello (Neurotune e Pharmafox, Lugano).

1.5 Trapianto di progenitori striatali in un modello sperimentale di malattia di Huntington

La malattia di Huntington è caratterizzata dalla lesione dello striato, i cui neuroni degenerando determinano la morte neuronale secondaria nella sostanza nera, con cui lo striato è fortemente interconnesso.

In collaborazione con il gruppo della Prof.ssa Cattaneo, stiamo studiando la possibilità di utilizzare progenitori striatali ventrali umani derivati da cellule staminali embrionali, al fine di rimpiazzare i neuroni persi, in un modello sperimentale di ratto affetto da malattia di Huntington.

Stiamo studiando la loro sopravvivenza ed integrazione nei circuiti neurali dell'ospite; valuteremo inoltre la loro capacità di modulare la neuroinfiammazione mediante rilascio di fattori trofici e molecole immunomodulatorie; infine studieremo la funzionalità motoria degli animali, per correlare il miglioramento motorio al differenziamento delle cellule staminali e alla loro integrazione nei circuiti neurali.

Collaborazioni: E. Cattaneo (UNIMI), A. Buffo, K. Leto (NICO)

1.6. Studio del ruolo di Uch-L1 nella demenza vascolare collegata all'Alzheimer

Sebbene l'AD venga classificato come una demenza neurodegenerativa, esistono evidenze di tipo epidemiologico e patologico che lo associano a rischi e patologie di carattere vascolare.

Infatti, i maggiori fattori di rischio correlati allo sviluppo di AD, quali stress ossidativo, ipossia, iperglicemia e ipercolesterolemia sono di fatto fattori di rischio correlabili alla demenza di tipo vascolare.

Recentemente noi abbiamo osservato che l'A β 1-42 è in grado di inibire l'attività dell'enzima "ubiquitin C-terminal hydrolase L1" (Uch-L1), attraverso l'attivazione della via di segnale dipendente da NF- κ B, e che questa inibizione è associata ad una iper-regolazione di BACE1 indotta in parte da un'aumentata trascrizione ed in parte da una interferenza sulla sua degradazione attraverso i lisosomi (lavoro sottomesso).

Uch-L1 è un enzima abbondantemente espresso a livello neuronale, che sembra avere un ruolo critico nella rimozione di proteine accumulate, ossidate o mal ripiegate, sia in condizioni fisiologiche che patologiche. L'inibizione di questo enzima esita in una aggregazione delle proteine ubiquitinate ed in un aumento della morte neuronale. Il suo calo di attività è stato osservato sia nel danno ischemico che nell'AD ma il ruolo di questo calo nella loro patogenesi rimane da chiarire.

Molto recentemente attività di questo enzima è stata riscontrata sia in cellule endoteliali umane che in cellule muscolari lisce vascolari, ed è stato suggerito che questo enzima possa, almeno parzialmente, attenuare il rimodellamento dei vasi attraverso l'inibizione di NF- κ B. Ancora è stato osservato che il rilascio di prostaglandine biologicamente attive che sono massivamente prodotte nel tessuto di ratti sottoposti ad ischemia cerebrale selettivamente bloccano l'attività di questo enzima.

Noi ci prefiggiamo di dimostrare che l'inibizione di Uch-L1 da parte di citochine infiammatorie (prodotte in corso di ipossia o danno vascolare) o da parte dei peptide A β (nell'AD) possa giocare un ruolo cruciale nell'aumentare la morte neuronale. Inoltre, noi supponiamo che l'iper-regolazione di BACE1 mediata dall'inibizione di Uch-L1 possa rappresentare un meccanismo importante di accumulo di A β nel danno ipossico e vascolare.

Collaborazioni: Prof Massimo Tabaton, Università di Genova; Prof. Ottavio Arancio, Columbia University, New York.

1.7. Ruolo delle forme solubili di A β sulla nucleazione della proteina Tau.

Numerosi dati in letteratura indicano che l'accumulo e l'aggregazione di A β nel cervello rappresenti il principale e precoce evento che induce disfunzione neuronale e degenerazione, solo in tempi più tardivi si avrebbe il danno mediato dalla proteina Tau. Rimane da chiarire in che modo A β alteri ed induca aggregazione di Tau, ma tre ipotetici meccanismi vengono suggeriti.

Alcuni Autori sostengono che A β attivi le chinasi che fosforilano tau alterando la sua capacità di legarsi alla tubulina; altri invece ritengono che A β alteri la degradazione di tau da parte del proteasoma altri ancora infine ritengono che A β abbia un effetto di nucleazione su tau. La nostra

ipotesi è che alcune forme di A β inducano aggregazione di tau attraverso un effetto di nucleazione e senza l'intervento delle chinasi, ma che questo avvenga solo con particolari tipi di peptidi A β o miscele di questi.

Verranno utilizzati topi C57bl/6 iper-esprimenti Tau umana che verranno trattati con peptidi A β in forma monomerica od oligomerica a concentrazioni parafisiologiche, che quindi non sono tossici per le cellule ma possono innescare effetti segnale o attraverso il loro legame con specifici recettori di superficie o entrando nelle cellule.

Collaborazioni: Prof Massimo Tabaton, Università di Genova; Prof. Ottavio Arancio, Columbia University, New York.

1.8. Meccanismi molecolari correlati al dolore neuropatico

Ci siamo in passato occupati del ruolo di JNK nel dolore neuropatico a livello dei gangli della radice dorsale. Insieme al prof. Geuna, intendiamo studiare il ruolo di JNK nel dolore neuropatico anche nei centri superiori, a partire dal midollo spinale, per finire nel tronco encefalico, nel talamo, nella corteccia del cingolo e nell'amigdala.

Inoltre ci stiamo occupando del dolore neuropatico in un modello sperimentale di malattia di Niemann-Pick (i topi ASM-ko), in cui sembra che il deficit della sfingomielinasi acida blocchi il rilascio delle microvescicole che contengono interleuchina 1.

Collaborazioni: M. Papa (Università di Napoli), N. Galeotti (Università di Firenze) e G. Cavaletti (Università Milano Bicocca); F. Borghi (Reparto di Chirurgia Generale, Ospedale di Cuneo).

1.9 Lesioni del midollo spinale

Ci prefiggiamo di comprendere la fisiopatologia del trauma spinale in modelli murini, ricorrendo a diverse tipologie di lesione (compressione, contusione ed emisezione), per studiare la neuroinfiammazione, la formazione della cisti/cicatrice gliale, la degenerazione assonale.

Tra gli approcci terapeutici, stiamo utilizzando cellule staminali adulte (mesenchimali) ed embrionali (precursori neurali), al fine di sviluppare strategie rigenerative di supporto e di cell replacement. Utilizziamo tali cellule anche in combinazione con l'esercizio fisico, al fine di stimolare ulteriormente il recupero funzionale. Stiamo collaborando con il gruppo del Dott. Terreno, marcando le cellule mesenchimali con agenti di contrasto a base di gadolinio, per identificare le cellule trapiantate nel midollo spinale e seguire la loro migrazione nel parenchima mediante MRI. Esperimenti in vitro evidenziano come le cellule siano in grado di internalizzare abbondantemente il gadolinio, senza andare incontro ad apoptosi. Inoltre esperimenti preliminari in vivo ci hanno permesso di osservare un segnale dato dalle cellule marcate iniettate nel parenchima midollare. Recentemente abbiamo intrapreso una collaborazione anche con il gruppo del Prof. Ciardelli, allo scopo di migliorare la sopravvivenza e l'integrazione delle cellule staminali trapiantate: utilizzeremo dei biomateriali (idrogeli) nei quali le cellule possono essere incapsulate. Tali dispositivi saranno inoltre fondamentali per la formazione di un "ponte-guida" per le fibre attraverso il sito di lesione, in grado di ripristinare i collegamenti persi e sostenere la ripresa funzionale.

Infine, per cercare di comprendere i meccanismi molecolari che risiedono alla base dell'incapacità delle fibre nervose danneggiate di rigenerarsi, stiamo valutando l'alterata espressione a livello nervoso di una particolare classe di molecole, i miRNA, piccoli RNA non codificanti che regolano in modo negativo l'espressione genica a livello post-trascrizionale. Incrementi o riduzioni della loro espressione in seguito ad un trauma spinale possono indurre effetti protettivi o nocivi, in termini di rigenerazione assonale, morte cellulare e infiammazione a seconda dei meccanismi molecolari su cui agiscono. Sulla base dell'espressione dei miRNA e della regolazione dei loro bersagli specifici, potremo individuare nuovi ed efficaci target terapeutici per promuovere il recupero della funzionalità persa.

Collaborazioni: D. Garbossa (Neurochirurgia A.O. U. Città della Salute e della Scienza, Molinette, Torino), E. Terreno (Molecular Biotechnology Center, Torino), G. Ciardelli e C. Tonda Turo (POLITO)

1.10 Micro, meso- e macroconnettoma del cervello schizofrenico

L'ipotesi generale di questo progetto consiste nell'idea che le anomalie della mielina siano candidati plausibili per influenzare l'espressione della malattia nella schizofrenia. Una inadeguata mielinizzazione o funzione della mielina, sia a causa di uno sviluppo o di un mantenimento anormale, o a causa della morte o disfunzione degli oligodendrociti, contribuiscono a disturbi di connettività anatomica e funzionale che sono associati con la schizofrenia. In definitiva, questi deficit danneggiano o alterano flusso del segnale e causare almeno alcuni dei sintomi della schizofrenia. A questo scopo, con il gruppo della prof.ssa Buffo studieremo la associazione causale/concausativa tra anomalie della sostanza bianca, alterazioni delle macro, meso e microconnettoma, i sintomi e le funzioni nei pazienti con schizofrenia. Effettueremo voxel-based morphometry, trattografia, resting state e fMRI dei pazienti affetti da schizofrenia dopo la caratterizzazione sintomatica e funzionale. Utilizzeremo inoltre un modello murino sperimentale unico di disturbo della mielinizzazione, il ko NOGOA, per indagare l'aspetto di correlati comportamentali che sono la caratteristica della schizofrenia. Gli animali saranno studiati istologicamente e risonanza magnetica, l'esecuzione di una macro (MRI e caratterizzazione istomorfologica di tratti mielinici), meso (analisi dello sviluppo oligodendrogliale, assonale e la morfologia dendritica nelle sezioni post-mortem e in vivo mediante microscopia a 2 fotoni) e micro (microscopia elettronica e confocale della distribuzione sinaptica e dimensione assonale) connettoma. Il modello permette di progettare e testare una strategia terapeutica che potrebbe curare gli aspetti morfofunzionali e, eventualmente, i correlati funzionali del disturbo mielina. Il progetto prevede una stretta relazione tra clinica e la scienza di base, per la terapia cognitiva e farmaci di schizofrenia.

Collaborazioni: A. Buffo (NICO); P. Rocca (Clinica Psichiatrica, Torino); C. Valentini (Neuroradiologia, Ospedale Molinette, Torino).

1.11 Smart Prevention and Assessment of Dementia (SPADe)

Stiamo collaborando con una rete di cliniche della memoria europee allo scopo di proporre progetti nell'ambito del programma Horizon 2020. L'obiettivo del progetto è di ridurre il rischio di progressione della demenza e di fornire alle persone anziane, affette da deterioramento cognitivo lieve o demenza di grado lieve, un intervento personalizzato sostenibile e conveniente basato sulla terapia fisica e cognitiva a casa progettato per migliorare funzione cognitiva, indipendenza e benessere. La nostra parte del lavoro (oltre al probabile coordinamento del progetto) consisterà nella valutazione degli effetti dell'intervento sullo stress ossidativo e sui marcatori di neuroinfiammazione nei pazienti. L'intervento si compone di protocolli di esercizio fisico sulla base dell'esperienza acquisita presso la e con la Terapia dell'apprendimento del prof. Kawashima (Tohoku University) e verrà gestito attraverso una piattaforma tecnologica. La piattaforma consentirà di monitorare, valutare, stimolare, e fornire un feedback personalizzato, contribuendo così a ridurre l'impatto negativo dei disturbi mentali in comorbidità.

Collaborazioni: I. Rainero (Clinica Neurologica, Torino); E. Hogervoerst (Loughborough University, GB); Kawashima (Tohoku University, Sendai, Giappone); M. Drobicks (Austrian Institute of Technology, Austria).

2. Prodotti delle attività di ricerca nel periodo gennaio-novembre 2013

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

Gamba P, Guglielmotto M, Testa G, Monteleone D, Zerbinati C, Gargiulo S, Biasi F, Iuliano L, Giaccone G, Mauro A, Poli G, Tamagno E, Leonarduzzi G. Up-regulation of β -amyloidogenesis in neuron-like human cells by both 24- and 27-hydroxycholesterol: protective effect of N-acetylcysteine. *Aging Cell*. 2014, 13:561-72.

Guglielmotto M, Monteleone D, Piras A, Valsecchi V, Tropiano M, Ariano S, Fornaro M, Vercelli A, Puyal J, Arancio O, Tabaton M, Tamagno E. (2014) A β 1-42 monomers or oligomers have different effects on autophagy and apoptosis. *Autophagy*. 10:1827-43.

Boido M, Piras A, Valsecchi V, Spigolon G, Mareschi K, Ferrero I, Vizzini A, Temi S, Mazzini L, Fagioli F, Vercelli A. (2014) Human mesenchymal stromal cell transplantation modulates neuroinflammatory milieu in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cytotherapy*. 16:1059-72.

C. Queiroga, A. Vercelli and H. Vieira (2014) Carbon Monoxide and Central Nervous System: Challenges and Achievements. *British J Pharmacol*. doi: 10.1111/bph.12729.

Tomassy GS, Berger DR, Chen H-H, Kasthuri N, Hayworth KJ, Vercelli A, Seung SH, Lichtman J, Arlotta P (2014) Distinct profiles of myelin distribution along single axons of pyramidal neurons in the neocortex. *Science*, 18: 319-324.

Vercelli A., Boido M. (2014) "Spinal cord injury", chapter in the book "Neurobiology of Brain Disorders", published by Michael J. Zigmond, Joseph T. Coyle, Lewis P. Rowland. Elsevier New York. In press

Cauda F, Geminiani C, Vercelli A. (2014) Anatomical and functional Lateralization of the insular cortex. In "Insula: Neuroanatomy, Functions and Clinical Disorders", Ed. Uddin L., Nova Science Publisher. Pp 67-93.

Cauda F, Geminiani C, Vercelli A. (2014) Evolutionary appearance of Von Economo's Neurons in the mammalian cerebral cortex. *Front. Hum. Neurosci*. 8:104.

In press

A. Perino, M. Beretta, A. Kilic, D. Carnevale, I. E. Repetto, L. Braccini, D. Longo, R. Wetzker, M. Liebig-Gonglach, S. Aime, A. Vercelli, G. Lembo, A. Pfeifer, E. Hirsch Combined inhibition of PI3Kbeta and PI3Kgamma reduces fat mass by enhancing α -MSH-dependent sympathetic drive. *Science Signaling* in press.

V. Grande, G. Manassero, A. Vercelli Neuroprotective and anti-inflammatory roles of the phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN) inhibition in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *PlosOne* in press.

2.2. Seminari e conferenze con affiliazione al NICO

A.Vercelli

23 aprile 2014, Verona; Staminali: cosa sono e cosa servono

10 ottobre 2014 Milano, Dipartimento di Bioscienze, Morfometria nel sistema nervoso centrale

27 ottobre 2014 Milano, Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, Center of Excellence on Neurodegenerative Diseases, Development of cortical pyramidal neurons in the control and pathological brain

30 ottobre 2014 Ferrara, “Immunomodulation and neuroprotection by stem cell administration”

27 novembre 2014 Venezia, NanotechItaly 2014, “Microvesicles/exosomes, biological nanosized systems for the pathogenesis and therapy of neurodegenerative diseases”

12 dicembre 2014 Sendai, Colloquium organizzato dall’Ambasciata d’Italia in Giappone

M. Boido

18 Novembre 2014, Milano “Immunomodulation and neuroprotection by stem cell transplantation”, DiSFeB meets NICO

2.3. Altri prodotti riconducibili alle attività Istituzionali del NICO

18 maggio 2014, Torino, Rassegna Nownew (in collaborazione con il Circolo dei lettori): “La bellezza delle Neuroscienze”

20 maggio 2014, Torino, Medicina senza bandiere: Le bufale in medicina (con il giornalista Fabio Turone)

11 novembre 2014 Cherasco, Moderazione a tavola rotonda in occasione dell’incontro delle UVA piemontesi e VDA

2.4. Finanziamenti per la ricerca

A. Vercelli

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

Associazione SMArathon

Associazione GIROTONDO Onlus, Biella

Coordinamento Piemontese Para- e Tetraplegici

M. Boido

Progetto speciale nell’ambito della ricerca locale (ex-60%) “Unraveling the role of miRNA206 in the cross-talk between motor neurons and muscle”. Finanziamento erogato: € 6.700

Fondazione CRT - Utilizzo di scaffold biomimetici e di cellule staminali per sostenere la rigenerazione del midollo spinale lesionato. Finanziamento erogato: € 30.000

Elenco delle richieste di finanziamento presentate per il 2015

| FONDI STRUTTURALI MIUR | TRIENNALE |
|---------------------------------|--|
| BERTOLOTTO | Biogen Biogen 2 SIR FISM FISM FISM FISM FISM Regione Piemonte FISM SIR |
| | |
| BUFFO | Cariplo CRT CRT ELA FISM Compagnia Sanità Cariplo CRT Simons CRT Ataxia CRT Compagnia |
| | |
| PERETTO EVA/CARULLI GEUNA | DEMARCHIS Progetto Technonerve Progetto Artnerve Progetto Bionerve Ricerca Finalizzata |
| | |
| PANZICA | Compagnia Ateneo CRT CRT Compagnia Ateneo Compagnia Ateneo Nutrition e Santè CRT Horizon 2020 Compagnia Ateneo Finalizzata Compagnia Sanità Finalizzata Compagnia Sanità SIR CRT |
| | |
| VERCELLI | (Buffo e Rocca) Boido Boido Boido Tamagno |