



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

Progetto delle attività di ricerca per l'anno 2013

Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO)

Progetto delle attività di ricerca per l'anno 2013

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

Torino, 22 novembre 2012



Ferdinando Rossi
Direttore Scientifico
Istituto di Neuroscienze
Fondazione Cavalieri-Ottolenghi

Progetto delle attività di ricerca per il 2013 del gruppo **Clinical Neurobiology**, presso l'Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO)

Responsabile del gruppo: **Antonio Bertolotto**

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

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

Antonio Bertolotto (Direttore di Struttura Complessa Ospedaliera)

Arianna Sala (Dirigente Biologo di I livello)

1.2. Personale non strutturato

Simona Perga (postdoc)

Fabiana Marnetto (assegnista)

Marzia Caldano (borsista)

Paola Valentino (borsista)

Francesca Montarolo (borsista)

Letizia Granieri (borsista specializzanda)

Valeria Colaianni (borsista)

Nicole D Navone (borsista)

Simona Martire (borsista)

Claudia Carcione (tecnico borsista)

Daniela Gramolelli (tecnico borsista)

2. Progetti di ricerca (2013)

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. In questo stesso ambito, è anche in corso lo studio del ruolo svolto dai microRNA nel regolare l'espressione dei suddetti geni nei pazienti con SM.

La terza linea di ricerca è volta alla messa a punto di nuove tecniche diagnostiche. In particolare le attività sono rivolte alla diagnosi differenziale tra SM e malattia di Devic ed alla valutazione del valore prognostico della positività agli anti-corpi anti-aquaporina 4 (AQP4).

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

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

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

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

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

Nel corso del 2013 verrà portato a termine uno studio per valutare il rischio di comparsa dei NABs anti-IFN β utilizzando la casistica di oltre 10 anni del laboratorio di Neurobiologia Clinica.

Nel corso del 2013 verrà attuato un progetto con il fine di identificare i non-responder all'IFN β valutando l'espressione genica di una serie (fino a 14) geni che hanno una delle seguenti caratteristiche i) essere selettivamente indotti dall'IFN β 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 già presenti nella banca biologica del gruppo di ricerca i campioni necessari (di oltre 200 pazienti con almeno 4 punti di prelievo prima e durante la terapia con IFN β). Dei pazienti sono disponibili le cartelle cliniche nella Neurologia 2 - CRESM e verrà approntato uno specifico data-base.

Correlato allo studio precedente si attuerà uno studio dell'espressione genica di 84 geni Interferon correlati per verificare se formulazioni diverse di IFN β , attivano un pattern di geni identico o in parte diverso.

Nell'ottica di razionalizzare la terapia con Rituximab, utilizzato per la malattia di Devic, e per molte altre malattie autoimmuni, si continuerà uno studio di paragone fra biologia molecolare e FACS nell'identificare il CD19. Il razionale dello studio si basa ri-somministrazione di Rituximab al ricomparire dei linfociti 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 progetto si vuole valutare se dosare il CD19 nel sangue con metodica PCR è più sensibile del FACS.

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

2.2. Approccio alla patogenesi della SM

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

Molteplici sono i meccanismi coinvolti nell'inibizione dell'inflammatione, compresa l'attivazione di specifici

circuiti a retroazione negativa, ovvero i cosiddetti “negative feedback loops”. Negli ultimi anni sono stati identificati diversi circuiti a retroazione negativa, il cui ruolo è quello di attenuare la risposta mediata da induttori o amplificatori dell'infiammazione. Tali circuiti includono la sintesi di proteine che inibiscono le vie di trasduzione (ad esempio le proteine SOCS), la sintesi di repressori e transrepressori trasduzionali (ad esempio Nurr1 e TNFAIP3) e la produzione di mediatori solubili o di superficie ad attività anti-infiammatoria (ad esempio IL-10 e 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'infiammazione costituisca un aspetto chiave nella patofisiologia di questa condizione debilitante e degenerativa. Nel complesso, il processo infiammatorio caratteristico della SM sembrerebbe essere causato da una iper-attivazione di linfociti pro-infiammatori T helper (Th1 e Th17). Tuttavia, i nostri dati suggeriscono che la SM derivi da difettosi circuiti a retroazione negativa piuttosto che da una eccessiva reazione pro-infiammatoria, e il coinvolgimento di Nurr1, 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 ottenute da pazienti affetti da SM.

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

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 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 tests 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 acuta). Questo modello sperimentale permetterà di valutare il coinvolgimento dei geni individuati dal nostro laboratorio come geni di interesse (A20, 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 A20, 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 di cellule specifiche. 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 sia a livello neuronale che immunologico.

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

2.3. Messa a punto di nuove tecniche diagnostiche

Dal momento che il termine medico “Sclerosi Multipla” comprende diversi sottotipi o varianti cliniche della malattia, ai fini terapeutici sono anche utili nuove tecniche che consentano di discriminare correttamente le varie tipologie di pazienti. Con questa finalità, le attività di ricerca si sono focalizzate sui pazienti affetti da malattia di Devic o neuromielite ottica (NMO), una rara malattia neuro-oftalmologica. Fino a poco tempo fa la NMO era considerata una grave forma di SM, ma recenti osservazioni hanno dimostrato che si tratta di una malattia distinta. Poiché SM e NMO prevedono trattamenti differenti è estremamente importante identificare nuovi test biologici in grado di differenziare le due malattie nelle loro fasi iniziali. A differenza della SM, nella NMO l’obiettivo della risposta autoimmune è stato identificato: in alcuni pazienti affetti da NMO è stato infatti riscontrato un elevato livello di anticorpi anti-aquaporina 4 (AQP4), un componente del piede del processo astrocitico nella barriera emato-encefalica. Alla luce di ciò, si è validato un test di immunofluorescenza su tessuto del SNC e su cellule traasfettate e nel corso del 2013 si verificherà quanto questo test è in grado di identificare condizioni cliniche che precedono la diagnosi clinica di Malattia di Devic, condizioni denominate NMO-Spectrum Disorders.

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

2.4. La Banca Biologica

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

La Banca Biologica è una struttura integrata e centralizzata per la raccolta ed archiviazione di campioni biologici inclusi in studi clinici, in progetti di ricerca o per i quali la conservazione è un obbligo di legge. Questa struttura nasce in risposta alla esigenza di avere un sistema affidabile e valido per la conservazione di campioni biologici di varia natura, quali siero, plasma, urine, liquor, cellule e tessuti in condizioni di preservazione delle caratteristiche biomolecolari al fine di poterli analizzare in tempi successivi alla loro raccolta. La conservazione in questi sistemi criogenici da un lato assicura ottimali condizioni di stabilità per i campioni biologici, e d’altro rende di facile identificazione i campioni archiviati, attraverso sistemi di mappatura gestiti tramite data base, il tutto appositamente progettato per applicazioni specifiche.

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

3. Prodotti delle attività di ricerca anno 2012

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

Granieri L, Marnetto F, Valentino P, Frau J, Patanella AK, Nytrova P, Sola P, Capobianco M, Jarius S, Bertolotto A. Evaluation of a multiparametric immunofluorescence assay for standardization of neuromyelitis optica serology. PLoS One. 2012;7(6):e38896. Epub 2012 Jun 12. PubMed PMID: 22719979; PubMed Central PMCID: PMC3373605.

Gilli F, Navone ND, Valentino P, Granieri L, Perga S, Malucchi S, Bertolotto A. Classification of individuals based on ex-vivo glatiramer acetate-induced interferon- γ and interleukin-4 response. Mult Scler. 2012 Oct;18(10):1484-92. Epub 2012 May 4. PubMed PMID: 22562951.

Del Campo M, Mollenhauer B, Bertolotto A, Engelborghs S, Hampel H, Simonsen AH, Kapaki E, Kruse N, Le Bastard N, Lehmann S, Molinuevo JL, Parnetti L, Perret-Liaudet A, Sáez-Valero J, Saka E, Urbani A, Vanmechelen E, Verbeek M, Visser PJ, Teunissen C (2012) Recommendations to standardize preanalytical confounding factors in Alzheimer's and Parkinson's disease cerebrospinal fluid biomarkers: an update.

Biomark Med 6:419-30. doi: 10.2217/bmm.12.46. PubMed PMID: 22917144.

Laroni A, Giacomazzi CG, Grimaldi L, Gallo P, Sormani MP, Bertolotto A, McDermott JL, Gandoglia I, Martini I, Vitello G, Rinaldi F, Barzon L, Militello V, Pizzorno M, Bandini F, Capello E, Palù G, Uccelli A, Mancardi GL, Varnier OE (2012) Urinary JCV-DNA testing during natalizumab treatment may increase accuracy of PML risk stratification. *J Neuroimmune Pharmacol* 7:665-72. doi: 10.1007/s11481-012-9366-z. Epub 2012 May 16. PubMed PMID: 2258541

Sørensen PS, Bertolotto A, Edan G, Giovannoni G, Gold R, Havrdova E, Kappos L, Kieseier BC, Montalban X, Olsson T (2012) Risk stratification for progressive multifocal leukoencephalopathy in patients treated with natalizumab. *Mult Scler* 18:143-52. Review. PubMed PMID: 22312009.

Mancardi GL, Sormani MP, Di Gioia M, Vuolo L, Gualandi F, Amato MP, Capello E, Currò D, Uccelli A, Bertolotto A, Gasperini C, Lugaresi A, Merelli E, Meucci G, Motti L, Tola MR, Scarpini E, Repice AM, Massacesi L, Saccardi R; Italian BMT Study Group (2012) Autologous haematopoietic stem cell transplantation with an intermediate intensity conditioning regimen in multiple sclerosis: the Italian multi-centre experience. *Mult Scler* 18:835-42. Epub 2011 Nov 29. PubMed PMID: 22127896.

Capobianco M, Motuzova Y, Frau J, Cocco E, Mamusa E, Marrosu MG, Bertolotto A (2012) Natalizumab i aggressive multiple sclerosis after haematopoietic stem cell transplantation. *Neurol Sci* 33:863-7. Epub 2011 Nov 25. PubMed PMID: 22116203.

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

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), 21-23 Maggio 2012 (6 partecipanti).

Corso Biogen Idec “La gestione quotidiana del paziente con Sclerosi Multipla”, Orbassano (TO), 12-14 Novembre 2012 (4 partecipanti).

Convegno “Oltre il giardino” febbraio 2012, 60 partecipanti.

3.3.2. Attività di Diagnostica

Il laboratorio di Neurobiologia Clinica offre un servizio diagnostico e di consulenza, accessibile da strutture esterne (al momento 40 neurologie italiane), necessari alla formulazione di diagnosi di sclerosi multipla e altre patologie neurodegenerative quali malattia di Devic, morbo di Alzheimer, sindrome di Lambert-Eaton, sindrome Stiff Person, sindromi paraneoplastiche ed encefaliti virali. Tali esami diagnostici includono

l'esame cito-chimico del liquor, l'immunoisoelettrofocusing per la ricerca di bande oligoclonali e test per la ricerca di acidi nucleici (tramite metodica real time PCR) dei seguenti virus: JC virus, Epstein Bar virus, Herpes virus 1, 2, 6, citomegalovirus, Varicella Zoster e Enterovirus.

Il laboratorio fornisce inoltre un servizio di screening **diagnostico** per la ricerca di **anticorpi** contro il recettore del glutammato (anti-NMDA), contro l'acido glutammico decarbossilasi (anti-GAD), e anticorpi antineuronali **paraneoplastici** (quali anti-Yo, anti-Hu, anti-Ri, anti-Ma1, anti-Ma2, anti-Amphifisina, anti-SOX1 e anti-CRMP5), mediante l'utilizzo di metodiche immunoblotting e immunofluorescenza indiretta su sezioni di cervello, cervelletto e nervo periferico di scimmia o ratto. Sono inoltre misurati gli anticorpi anti-borrellia mediante metodica ELISA.

Il laboratorio di neurobiologia clinica è uno dei pochi laboratori in Italia che fornisce un servizio diagnostico applicando specifici test sierologici per la ricerca di anticorpi NMO-IgG e anti-AQP4. Tali anticorpi sono rilevati mediante l'utilizzo di tecniche di immunofluorescenza indiretta, avvalendosi di cellule HEK293 transfettate per AQP4 e varie sezioni di cervello di scimmia.

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

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

3.4. Finanziamenti per la ricerca

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

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

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

Progetto delle attività di ricerca per il 2013 del gruppo **Adult Neurogenesis**, presso l'Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO).

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

1. Composizione del gruppo di ricerca (1-11-2012)

1.1. Personale strutturato dell'Università di Torino

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

1.2. Personale non strutturato

Maria Armentano (assegnista)
Paola Crociara (dottoranda)
Roberta Parolisi (dottoranda)
Roberta Schellino (dottoranda)
Giulia Nato (dottoranda)
Sara Bonzano (dottoranda)

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

2. Progetti di ricerca (2012-2013)

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

Un secondo filone di ricerca è diretto a studiare i processi di regolazione attività-dipendente della neurogenesi nella matrice germinativa adulta che si estende dalla zona sottoventricolare al bulbo olfattivo (SVZ-OB). L'obiettivo finale è la definizione dei meccanismi cellulari e molecolari e del ruolo dell'attività funzionale nell'attivazione di progenitori neuronali endogeni e nell'integrazione dei neuroni neoformati nel sistema nervoso centrale dei mammiferi adulti.

2.1. Origine, natura e destino di progenitori neuronali parenchimali nel modello di neurodegenerazione dello striato indotto da acido quinolinico

Scopo specifico di questo studio è la definizione del sito di origine e del ruolo funzionale del processo di neurogenesi indotta nello striato di topi adulti. Studi precedenti 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 dello striato. Il progetto si propone di analizzare:

i) la natura dei progenitori neuronali attivati da eventi di neurodegenerazione striatale. Sebbene sia noto che i progenitori primari, sia nell'encefalo adulto sia embrionale, presentano un fenotipo gliale, la loro localizzazione condiziona sia la loro capacità di dare origine a neuroni che il fenotipo degli elementi neogenerati.

ii) l'origine dei progenitori neuronali attivati nel parenchima striatale. Dati in vitro e in vivo, ottenuti in condizioni fisiologiche e patologiche, supportano la presenza di progenitori nel parenchima, ma l'origine di queste cellule e il loro contributo nell'omeostasi dell'encefalo sono ancora sconosciuti. In particolare ci proponiamo di comprendere se questi progenitori neuronali derivino dall'SVZ, oppure da popolazioni parenchimali quiescenti in grado di attivarsi in seguito a lesione.

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

Per questo studio analizzeremo la neurogenesi indotta nello striato da lesione con Acido Quinolinico (QA), che rappresenta un modello di Corea di Huntington. Sebbene altri studi abbiano investigato questo modello nel ratto, dimostrando che la lesione da QA induce mobilitazione di neuroblasti dall'SVZ, nessuno di questi ha valutato la natura e la precisa localizzazione dei progenitori coinvolti in questa risposta, nonché la potenziale esistenza di elementi quiescenti nel parenchima stesso dello striato. I nostri dati preliminari sui topi trattati con QA indicano una forte risposta neurogenica alla degenerazione dello striato che coinvolge l'SVZ (in una prima fase) e (più tardivamente) progenitori neuronali siti nel parenchima striatale.

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

Collaborazioni: Claudio Giachino (Dept of Biomedicine University of Basel); Annalisa Buffo (NICO, Torino).

2.2. Identificazione di progenitori parenchimali nello striato della cavia postnatale

Nel corso del 2011 (Luzzati et al., 2011b) abbiamo definito l'esistenza di un sistema neurogenico nello striato latero ventrale della Cavia (*Cavia porcellus*). Attraverso analisi dell'espressione del marcatore di neuroni immaturi DCX e studi di birth-dating con BrdU a diversi stadi di sviluppo postnatale, abbiamo potuto dimostrare che nello striato laterale della cavia si osserva la comparsa di neuroni neogenerati a partire dalla seconda settimana di vita postnatale, con un picco intorno al diciottesimo giorno di vita, in corrispondenza dello svezzamento. L'analisi di marcatori endogeni di proliferazione e di animali trattati con BrdU a tempi brevi di sopravvivenza indica che i nuovi neuroni vengono generati nelle porzioni ventrali della capsula esterna, e da qui migrano verso le porzioni dorsali della capsula e verso lo striato laterale. Per comprendere se i progenitori neuronali che si attivano durante la seconda settimana di vita derivino da elementi quiescenti già presenti nella capsula esterna ventrale alla nascita, abbiamo iniettato in questa regione, in animali neonati, un lentivirus contenente il gene reporter GFP. Trenta giorni dopo l'iniezione, circa il 40% dei neuroblasti DCX+ risulta GFP positiva. Le cellule DCX-GFP possono essere marcate per BrdU se questa viene somministrata per cinque giorni consecutivi a partire da p18. Inoltre, la percentuale di cellule DCX-GFP che è anche BrdU non è differente da quella delle cellule DCX non derivanti da progenitori infettati dal virus. Nel complesso questi dati indicano la presenza di progenitori neuronali quiescenti in grado di attivarsi nel corso della vita postnatale nella capsula esterna ventrale della cavia. L'analisi del

fenotipo dei neuroni neogenerati indica però che questi appartengono ad un tipo di neurone inedito ma, in modo interessante, molto simile ai neuroni generati in seguito a lesioni dello striato. Questa osservazione, che verrà analizzata più approfonditamente in futuro, potrebbe indicare che le lesioni dello striato stimolano la genesi di una tipologia neuronale specifica, implicata in fenomeni di plasticità presenti anche in condizioni fisiologiche. In questo caso, lo striato ventrale della cavia potrebbe rappresentare un ottimo modello per la comprensione del ruolo di queste cellule nella circuiteria dello striato.

2.3. Attività neurogenica spontanea e indotta da lesione, da progenitori parenchimali nel SNC dei mammiferi

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

In questo studio, grazie ad approcci di microscopia confocale ed elettronica in vivo e in vitro, verrà proseguita la caratterizzazione dei processi neurogenici persistenti nel SNC di conigli giovani e adulti, focalizzando particolarmente sui progenitori locali identificati nello striato dei neuroni di Purkinje. Sarà investigata l'attività proliferativa di cellule con morfologia, profilo antigenico, e localizzazione topografica della glia di Bergmann, al fine di capire: i) se questa neurogenesi cerebellare protratta 'atipica' possa costituire una terza fonte di genesi cellulare cerebellare nel coniglio adulto, ii) per produrre un modello di studio di un tipo cellulare astrocitario, di derivazione della glia radiale, che è ancora capace di proliferare in un parenchima maturo del SNC.

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

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

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

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

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

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

Il nostro laboratorio, dopo aver caratterizzato per anni la neurogenesi *in vivo*, ha utilizzato un sistema *ex vivo* per lo studio simultaneo della nicchia staminale e del tessuto non neurogenico circostante: la coltura organotipica di prosencefalo (contenente: SVZ, striato, corpo calloso, corteccia). Recentemente sono stati pubblicati i frutti di questo studio che ha finalmente messo in luce alcuni limiti di tale tipo di coltura.

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

Lo studio parte dalla messa a punto della coltura all'età postnatale P5/P6 con la possibilità di proseguire poi le analisi alle varie età postnatali (P5-P21)

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

I nostri dati indicano un forte incremento della proliferazione e della morte cellulare, accompagnati da migrazione dei neuroblasti e disaggregazione dell'architettura della nicchia. Il tutto già presente a 1 DIV e più marcato a 2 DIV. I risultati sinora ottenuti suggeriscono che il modello *ex vivo* proposto in questo progetto sia attendibile sotto il profilo antigenico e dei rapporti cellulari solo fino a 48 ore. Pertanto l'utilizzo delle fette organotipiche per questo tipo di studi deve essere ripensato rispetto all'uso superficiale finora descritto in letteratura, soprattutto per tempi di coltura lunghi.

A questo scopo stiamo mettendo a punto alcune modifiche al suddetto metodo di coltura che ci permetteranno di utilizzare il modello per tempi di coltura più lunghi; sarà così possibile utilizzare la coltura organotipica di prosencefalo/SVZ per poter studiare una più ampia gamma di fenomeni apprezzabili anche dopo 48 ore. Dal momento che le colture dopo 2div mostrano una macroscopica degenerazione delle fibre del corpo calloso (cc), noi ipotizziamo, che riuscendo a mantenere integra la struttura del cc venga preservata la vitalità della fetta stessa. I nostri dati iniziali risultano promettenti e mostrano che l'utilizzo di una diversa concentrazione di siero permette un prolungamento dei tempi di coltura. In particolare, risultano maggiormente prodotti e "preservati" gli oligodendrociti e conseguentemente risulta accelerato il fenomeno di mielinizzazione *in vitro*; tutto ciò garantirebbe una migliore condizione di coltura e quindi il raggiungimento di 1-2 settimane.

Alla luce di queste nuove possibilità, le nostre fette potrebbero essere utilizzate per diversi scopi: a) lo studio di fenomeni biologici che avvengono nei tempi di coltura considerati (es. proliferazione simmetrica/asimmetrica degli elementi staminali; studio della nicchia staminale):

b) manipolazioni dei segnali neurogenici (aggiunta di fattori trofici, coculture con espianti e cellule isolate)

c) come modello di lesione e di potenziale riparativo, e/o di interazione tra SVZ e tessuto non neurogenico

d) per testare farmaci potenzialmente modulatori della neurogenesi

e) analisi *ex vivo* di animali transgenici (soprattutto se letali alla nascita)

Collaborazioni: Angela Gritti (Tiget, HSR, Milano)

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

Scopo del progetto è chiarire i meccanismi regolatori, i mediatori molecolari ed il ruolo funzionale degli interneuroni GABAergici neogenerati nel bulbo olfattivo principale (OB) e accessorio (AOB) adulto. Il progetto si articola secondo diverse linee di ricerca:

1) Analisi del ruolo del fattore di trascrizione COUP-TFI nella neurogenesi adulta e nell'acquisizione del fenotipo dopaminergico nel bulbo olfattivo di topo

Il progetto si propone di studiare il ruolo del fattore trascrizionale COUP-TFI come possibile mediatore molecolare nella regolazione della neurogenesi adulta e del differenziamento del fenotipo dopaminergico nel bulbo olfattivo (OB). I neuroni neogenerati nell'OB postnatale e adulto (interneuroni GABAergici) modulano l'attività dei neuroni di proiezione del bulbo svolgendo un ruolo fondamentale nel processamento dello stimolo olfattivo. I due principali tipi di interneuroni dell'OB (i granuli e le cellule periglomerulari, identificati in base alla loro integrazione nello strato granulare e glomerulare) possono a loro volta essere distinti in diversi sottotipi, in base all'espressione differenziale di specifici marcatori neurochimici. La produzione dei diversi interneuroni è regolata in modo spazio-tempo dipendente e l'espressione combinatoriale di vari fattori trascrizionali nei progenitori dell'SVZ gioca un ruolo importante nella specificazione dei diversi sottotipi (Bovetti et al., J Mol Hist, 2007). Dati preliminari mostrano espressione di COUP-TFI sia nei progenitori dell'SVZ, sia in una sottopopolazione di interneuroni differenziati nell'OB, suggerendo che COUP-TFI possa essere coinvolto in diversi aspetti regolatori della neurogenesi adulta. Nello strato glomerulare dell'OB, analisi di doppia IFL hanno rivelato l'espressione di COUP-TFI in circa l'80% dei neuroni periglomerulari dopaminergici (DA), esprimenti l'enzima tirosina idrossilasi (TH). L'espressione di TH in queste cellule è dipendente dall'attività sinaptica afferente e diminuisce in condizioni di deprivazione dello stimolo olfattivo (Baker et al., Brain Res, 1993). Abbiamo osservato come l'espressione di COUP-TFI sia regolata in modo simile alla TH in seguito a manipolazioni dell'input sensoriale, suggerendo un possibile ruolo di COUP-TFI nella regolazione dell'espressione della TH e nell'acquisizione del fenotipo DA. Inoltre, dati preliminari ottenuti sui topi ko condizionali (Emx1CreCOUP-TFIf/f) mostrano una riduzione nel numero di cellule positive per la TH nell'OB adulto. Questi topi presentano inoltre evidenti alterazioni nell'SVZ del ventricolo laterale, suggerendo un effetto diretto dell'assenza di COUP-TFI sul controllo del ciclo cellulare degli elementi staminali/progenitori adulti. Il progetto si propone di analizzare l'effetto della delezione di COUP-TFI nei due principali lineages cellulari che originano gli interneuroni dell'OB: Dlx5/6 e Emx1. Studieremo l'espressione di TH e la genesi, differenziamento, migrazione e/o sopravvivenza dei diversi tipi di interneuroni nei topi Emx1CreCOUP-TFIf/f e Dlx5/6CreCOUP-TFIf/fl. Inoltre, mediante l'incrocio della linea di topi NestinCreERT2 con i topi COUP-TFIf/f e l'utilizzo di tamoxifen secondo diverse tempistiche valuteremo l'effetto della delezione di COUP-TFI nei progenitori neuronali dell'SVZ in specifiche fasi dello sviluppo o nella vita adulta. Utilizzeremo iniezioni di BrdU associate a tecniche di IFL per la rivelazione multipla di diversi marcatori dei progenitori e dei neuroni differenziati accoppiate all'utilizzo della microscopia confocale. Gli studi in vivo saranno affiancati da esperimenti in vitro su colture cellulari derivanti da topi wt e ko in cui sarà testato l'effetto dell'assenza di COUP-TFI e l'effetto della trasfezione di vettori codificanti per COUP-TFI. Eseguiremo l'elettroporazione di vettori di espressione contenenti o solo il gene reporter (CMV-GFP, condizione di controllo) o l'intera sequenza codificante per COUP-TFI seguita dal gene reporter (CMV-COUP-TFI-IRES-GFP). Valuteremo se l'aumento di espressione di COUP-TFI aumenta i livelli di espressione basale della TH nelle cellule wt, e se l'espressione esogena di COUP-TFI determina un ripristino della popolazione DA (gain-of-function) in cellule/tessuti derivati da topi ko. Saranno inoltre valutati eventuali effetti sulla proliferazione e sul differenziamento morfologico delle cellule in coltura.

Collaborazioni: Michèle Studer (University of Nice Sophia-Antipolis (UNS), Nice, France); Serena Bovetti, (iit Genova, Italia); Vania Broccoli, (San Raffaele, Milano, Italia).

2) Ruolo della Semaforina7A e del suo recettore PlexinaC1 nella regolazione dei processi neurogenici nell'encefalo adulto.

La semaforina7a (Sema7a) appartiene alla più vasta famiglia di proteine AGP, le semaforine, e mediante l'interazione con i suoi recettori, PlexinaC1 e $\alpha1\beta1$ -integrina, regola diversi processi cellulari (es. riorganizzazione citoscheletrica, guida assonale, interazione cellula-cellula, adesione e migrazione) nel cervello in sviluppo (Pasterkamp et al., 2003; Messina et al., 2011). L'espressione complementare di Sema7a e del recettore PlexinaC1 nel sistema SVZ-OB durante lo sviluppo e nell'adulto (Pasterkamp et al., 2007), e l'espressione di $\beta1$ -integrina, l'altro recettore di Sema7a, nei neuroblasti migranti (Belvindrah et al., 2007), supportano un possibile ruolo della Sema7a nella regolazione dei processi neurogenici nel bulbo olfattivo adulto. Il progetto si propone di analizzare il ruolo della Sema7a nella regolazione della neurogenesi adulta, grazie all'utilizzo di modelli murini Sema7a knock-out e PlexinaC1 knock-out (Pasterkamp 2003). In parallelo, saranno utilizzati approcci in vitro su espianti, colture primarie e neurosfere ottenute dall'SVZ.

Collaborazioni: Jeroen Pasterkamp (Department of Neuroscience and Pharmacology University Medical Center (UMC) Utrecht; The Netherlands); Paolo Giacobini (Inserm, Jean-Pierre Aubert Research Center, Unité 837, Lille, France)

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

Nel corso del 2013 ci proponiamo pertanto di ampliare gli studi riguardo al potenziale ruolo delle cellule neogenerate nel contesto del sistema dell'AOB, e più in generale del loro coinvolgimento nei meccanismi che regolano l'interazione sociale e le memorie olfattive nel topo. Gli obiettivi saranno: i) studiare il processo di integrazione delle cellule neogenerate nei circuiti bulbari delle femmine prepuberi e adulte in seguito a stimolazione sensoriale specifica con feromoni maschili di conspecifici (maschi fratelli e estranei); ii) investigare se esistono progenitori specifici per gli interneuroni dell'AOB; iii) 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) applicati a modelli di delezione della neurogenesi come il topo NSE-DT (Imayoshi et al., 2008); iv) 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'AOB sarà studiato tramite analisi quantitative e morfologiche della neurogenesi, a diversi tempi di sopravvivenza dopo l'inoculazione di BrdU, e in seguito a diversi protocolli di esposizione delle femmine alla lettiera di maschi riproduttori (fratelli e estranei). Il coinvolgimento funzionale degli elementi neo-generati nei circuiti maturi, nelle diverse condizioni sperimentali (modelli naïve e di delezione della neurogenesi), sarà valutato tramite analisi comportamentali e in situ dell'espressione di c-fos. Inoculazioni stereotassiche (a diversi livelli antero-posteriori) di vettori virali (Ad:GFAP-Cre) che infettano i progenitori gliali dell'SVZ permetteranno di stabilire se gli interneuroni dell'AOB derivano da specifici progenitori neuronali. In generale da questo studio ci aspettiamo di definire se la capacità di integrare nuove cellule nell'AOB possa essere una strategia che ricopre molteplici funzioni correlate al riconoscimento olfattivo e di contribuire alla comprensione di meccanismi di base che guidano la specificazione e l'integrazione di nuovi neuroni nel SNC dei mammiferi adulti.

Collaborazioni: Frank Zufall, Livio Oboti (University of Saarland); Claudio Giachino (Dept of Biomedicine University of Basel); Roberto Tirindelli (Università di Parma), Carla Mucignat (Università di Padova); (Giancarlo Panzica (NICO, Torino).

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

E' noto che i neuroni del SNC persi in seguito a vecchiaia, traumi/lesioni vascolari, malattie neurodegenerative non sono sostituibili. Da alcuni anni si sa che alcuni neuroni possono essere prodotti e rinnovati in due regioni ristrette dell'encefalo (aree neurogeniche; fenomeno della neuro genesi adulta). Finora, questo fenomeno non è stato utile al problema della riparazione del sistema nervoso, che al di fuori delle aree neurogeniche continua ad essere un tessuto 'perenne', dove peraltro si riscontra la maggior parte delle lesioni di cui sopra (per review si veda Bonfanti & Ponti, 2008 *Vet J*). Uno dei motivi risiede nell'attuale impossibilità di poter dare una spiegazione soddisfacente del ruolo che tale fenomeno ha nell'evoluzione delle specie animali, nonché nell'incompleta visione della neurogenesi adulta all'interno dei Mammiferi. Un possibile approccio per dare indicazioni sul ruolo della neurogenesi adulta è quello comparativo. In particolare, negli ultimi anni sono state riscontrate sostanziali differenze anche tra i mammiferi, con un diverso sviluppo delle zone neurogeniche in relazione al tipo di vita dell'animale e alle diverse nicchie ecologiche occupate (Ponti et al., 2008 *PLoS ONE*; Johnson et al., 2010 *Genes Brain Behav*). In questo progetto si cercherà di caratterizzare l'estensione e la citoarchitettura delle zone neurogeniche di un mammifero marino (*Tursiops truncatus*).

L'obiettivo è una caratterizzazione morfologica e immunocitochimica dell'intera area periventricolare nell'encefalo di delfini neonati (pochi giorni di vita), giovani (da 2 a 12 mesi) e adulti (fino a 20-30 anni). Date le dimensioni dei cervelli da analizzare (nell'adulto superiori a quello umano) e alla qualità del materiale disponibile (encefali prelevati ad alcuni giorni dalla morte del soggetto) si prevede un lungo periodo di settaggio delle condizioni di lavoro (protocolli di fissazione, test con anticorpi primari, ecc.).

Si procederà quindi per fasi successive:

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

In una seconda fase:

- 7) Eventuale presenza di proliferazione cellulare nel parenchima cerebrale

Sulla base di questi risultati si ragionerà su alcune domande:

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

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

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

Risultati attesi. a) Caratterizzazione in vivo della genesi di glia e/o neuroni in un mammifero marino. b) Determinazione del fenomeno neurogenico come filogeneticamente ristretto ai mammiferi terrestri o esteso ai cetacei. c) Potranno essere dedotte conclusioni sulla persistenza/espansione (o eventualmente

assenza) di SVZ adulta nelle zone periventricolari di diversi mammiferi. Ciò potrà dare indicazioni sui fattori che possono favorire/sfavorire la persistenza di strati germinativi in diversi mammiferi.

3. Prodotti delle attività di ricerca anno 2012

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

Bonfanti L, Peretto P. The missing chain. *Front Neurosci.* 2012; 6: 5.

Bini F, Frati A, Garcia-Gil M, Battistini C, Granado M, Martinesi M, Mainardi M, Vannini E, Luzzati F, Caleo M, Peretto P, Gomez-Muñoz A, Meacci E. New signalling pathway involved in the anti-proliferative action of vitamin D₃ and its analogues in human neuroblastoma cells. A role for ceramide kinase. *Neuropharmacology.* 2012; 63: 524-37.

Gribaudo S, Bovetti S, Friard O, Denorme M, Oboti L, Fasolo A, De Marchis S. Transitory and activity-dependent expression of neurogranin in olfactory bulb tufted cells during mouse postnatal development. *J Comp Neurol.* 2012 ; 520: 3055-69.

De Marchis S, Puche AC. Cellular imaging and emerging technologies for adult neurogenesis research. *Front Neurosci.* 2012 ; 6: 41.

Bonfanti L, Nacher J. New scenarios for neuronal structural plasticity in non-neurogenic brain parenchyma: the case of cortical layer II immature neurons. *Prog Neurobiol.* 2012 ; 98: 1-15.

Santambrogio S, Ricca A, Maderna C, Ieraci A, Aureli M, Sonnino S, Kulik W, Aimar P, Bonfanti L, Martino S, Gritti A. The galactocerebrosidase enzyme contributes to maintain a functional neurogenic niche during early post-natal CNS development. *Hum Mol Genet.* 2012 ; 21: 4732-50.

Crociara P, Parolisi R, Conte D, Fumagalli M, Bonfanti L. Cellular and molecular characterization of multipolar Map5-expressing cells: a subset of newly generated, stage-specific parenchymal cells in the mammalian central nervous system (submitted).

Ponti G, Obernier K, Guinto C, Jose L, Bonfanti L, Alvarez-Buylla A. The cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice (submitted).

Bonfanti L, Peretto P. New research perspectives in mammalian parenchymal neurogenesis (book chapter) in: *Neurogenesis Research: New Developments* NOVA PUBLISHERS, Gerry J. Clark and Walcot T. Anderson Editors (2012)

Bonfanti L, Crociara P. Neurogenesis outside the central nervous system. (book chapter) In: *Tumors of the Central Nervous System, Vol 9* SPRINGER, Hayat MA Editor (2012 – in press)

3.2. Seminari e conferenze con affiliazione al NICO

Luca Bonfanti I limiti strutturali della plasticità cerebrale – Ai confini dell’Uomo nella ricerca del suo benessere. Evoluzione delle tecnologie mediche e diagnostiche in neuroscienze. San Maurizio Canavese (TO) 23 Feb 2012

Luca Bonfanti Cellule giovani in un cervello adulto: variazioni sul tema. Seminario nel corso di neurogenesi e neuromorfologia comparata, laurea magistrale di neurobiologia. Pavia, 8 feb 2012

3.3. Altri prodotti riconducibili alle attività Istituzionali del NICO

3.3.1. Attività editoriali

Neural Stem Cells: new perspectives, Monographic Book - INTECH, L. Bonfanti Editor (in preparation)

Cellular Imaging and Emerging Technologies for Adult Neurogenesis Frontiers Research Topic Ebook - Frontiers Media SA -ISBN: 978-2-88919-029-4, S. De Marchis and A. Puche Host Editors

3.3.2. Attività di promozione e divulgazione

L. Bonfanti:

- Organizzazione a Torino della Giornata nazionale per le scuole superiori: *Il lungo e affascinante viaggio della ricerca sulle cellule staminali*, con 20 Atenei italiani; aula magna di Palazzo Nuovo.
- Realizzazione del cortometraggio "Il calcolo" sulla comunicazione della scienza (nell'ambito della Giornata nazionale sulle Cellule Staminali).
- "Perché è difficile riparare il sistema nervoso". Conferenza ai Caffè Scientifici della notte dei Ricercatori 2012.
- Pizza col Prof (sezione Neuroscienze) notte dei Ricercatori 2012.
- Seminario di Formazione per insegnanti nel progetto Scienza attiva, Museo di storia naturale, Torino, novembre 2012.
- "Le staminali e gli sguardi sul futuro". Articolo di Luca Bonfanti in TuttoScienze, La Stampa.

P.Peretto:

- "Le cellule staminali adulte e la plasticità nel cervello". Conferenza nell'ambito della Giornata nazionale: *Il lungo e affascinante viaggio della ricerca sulle cellule staminali*, presso Università della Valle d'Aosta.

Federico Luzzati:

- Coordinamento stand del NICO a *La notte dei Ricercatori, 2012: "Salva i nostri cervelli per salvare il tuo"*.

L Bonfanti e A Buffo

"Vedere quello che non si vede". Conferenza al liceo scientifico sperimentale Cocito di Alba e successiva visita degli studenti al NICO

L Bonfanti e F Rossi

"Così lontano così vicino: la ricerca sulle malattie neurodegenerative". Conferenza nell'ambito della giornata mondiale per l'Alzheimer. Asti 21 settembre 2012

Luca Bonfanti e Annarita De Luca

Organizzazione del torneo di pallavolo "Volley Brain" a scopo di beneficenza

3.4. Finanziamenti per la ricerca

PRIN 2010: Analisi integrata dei processi molecolari e cellulari responsabili dell'elaborazione di segnali sensoriali in condizioni normali e patologiche (Peretto Paolo responsabile Unità)

Progetto Università di Torino (ex-60%) "Valutazione delle dinamiche di popolazione in cellule staminali adulte (L Bonfanti) € 2875"

L Bonfanti partecipa anche a progetti Telethon (F. Tempia) e EU FP7 (S Geuna)

Progetto delle attività di ricerca per il 2013 del gruppo **Neuropeptides, Emotional and Feeding Behaviour**, presso l'Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO)

Responsabile del gruppo: **Carola Eva**

1. Composizione del gruppo di ricerca (1-11-2012)

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

Carola Eva (PO)

Alessandra Oberto (RU)

1.2. Personale non strutturato

Paolo Mele (postdoc)

Angela Longo (postdoc)

2. Progetti di ricerca (2012)

2.1. Regolazione peptidergica del comportamento emozionale ed alimentare

Il neuropeptide Y (NPY) è un peptide abbondantemente espresso nel SNC coinvolto nella regolazione di diverse funzioni fisiologiche quali l'ansia, la risposta allo stress e il bilancio energetico. Le azioni di NPY sono mediate principalmente dai recettori Y1, Y2 e Y5, dei quali il recettore Y2 è principalmente localizzato nei terminali presinaptici.

A seguito del suo riconoscimento come mediatore dell'iperfagia indotta da NPY, Y1R è stato oggetto di studio nell'ambito della ricerca sull'obesità.

Oltre al suo ruolo cruciale nel comportamento alimentare e nella regolazione dell'omeostasi energetica, diversi studi suggeriscono che Y1R giochi un ruolo importante nella risposta allo stress e nelle malattie psichiatriche. Iniezioni intraventricolari di NPY nei roditori riducono comportamenti ansiosi e legati allo stress, un effetto che è mediato dai recettori Y1R espressi nell'amigdala, nell'ippocampo e nel locus coeruleus. Nell'uomo, un'aploinsufficienza di NPY è correlata con caratteristiche risposte encefaliche a stimoli emozionali e stressogeni e con uno stato d'ansia. NPY esercita l'effetto ansiolitico interagendo con l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) e i corticosteroidi. E' stato dimostrato un antagonismo funzionale tra NPY e l'ormone che stimola il rilascio della corticotropina (CRH) lungo i circuiti che regolano lo stress, suggerendo che NPY potrebbe contrastare il rilascio del CRH indotto dallo stress.

La trasmissione NPY-Y1R ha inoltre un ruolo importante nelle risposte neurobiologiche all'etanolo. I topi knockout per Y1R consumano maggiori quantità di etanolo e sono meno sensibili ai suoi effetti sedativi rispetto ai topi controllo, dimostrando che la diminuzione di assunzione di etanolo indotta da NPY è mediata da Y1R.

Abbiamo generato due linee di topi knockout condizionali nelle quali è possibile ottenere l'ablazione postnatale di Y1R selettivamente specifiche regioni dell'encefalo. Utilizzando questi modelli murini stiamo sviluppando tre filoni di ricerca. Il primo filone ha l'obiettivo di studiare il ruolo del sistema Npy-Y1R negli effetti permanenti della cura materna sul comportamento ansioso, l'asse dello stress e l'assunzione di etanolo. Il secondo filone di ricerca è diretto a studiare il ruolo del sistema Npy-Y1R negli effetti permanenti della cura materna sulla suscettibilità all'obesità e al diabete di tipo 2. Il terzo filone di ricerca ha l'obiettivo di studiare il ruolo dell'interazione tra i recettori Y1R e Y5R nelle regioni limbiche e nell'ipotalamo sul comportamento emozionale e alimentare e sulla memoria spaziale. L'obiettivo a lungo termine è identificare nuovi target per la diagnosi e la terapia di patologie psichiatriche come la depressione, l'ansia e i disturbi dell'alimentazione.

2.1.1 Ruolo del sistema Npy-Y1R negli effetti permanenti della cura materna sul comportamento ansioso, l'asse dello stress e l'assunzione di etanolo

E' ben noto in letteratura che le esperienze perinatali hanno effetti duraturi e profondi sulle funzioni cerebrali e rappresentano un fattore di rischio per lo sviluppo di psicopatologie nell'età adulta. Per esempio, livelli bassi di cura materna (ossia basse frequenze di allattamento a schiena inarcata, LABN) sono correlati a una riduzione dell'espressione dei recettori dei glucocorticoidi nell'ippocampo, ad una ridotta sensibilità del feedback negativo, ad un aumento di espressione dell'ormone che stimola il rilascio di corticotropina nell'ipotalamo e ad un aumento delle risposte dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) allo stress nell'età adulta.

Utilizzando come modello una linea di topi knockout condizionali in cui il gene *Npy1r* è inattivato selettivamente nei neuroni eccitatori del telencefalo a partire dall'età giovanile (topi *Npy1rrfb*), abbiamo recentemente dimostrato che recettori Y1R nel sistema limbico sono un bersaglio chiave della programmazione materna del comportamento ansioso e dell'attività dell'asse HPA. I topi di controllo (*Npy1r2lox*) allevati da mamme LABN, mostrano una bassa espressione recettore *Npy1R* nella CA1 dell'ippocampo, un comportamento ansioso, attivazione dell'asse HPA e una diminuzione del peso corporeo rispetto ai topi controllo allevati da mamme che mostrano alti livelli di cura materna (HABN). Questo stesso fenotipo si osserva in topi *Npy1rrfb* allevati da mamme HABN, suggerendo che gli effetti permanenti della cura materna sulla suscettibilità allo stress sono mediati dal Y1R ipotalamico.

Nello scorso anno abbiamo dimostrato che una bassa espressione di Y1R nell'ippocampo, indotta da bassi livelli di cure materne o dalla delezione condizionale del gene *Npy1r* è anche associata un aumento dell'espressione nucleare del recettore per i glucocorticoidi nella CA1 e da un aumento dell'espressione del CRH (peptide e mRNA) nel nucleo paraventricolare dell'ipotalamo, dimostrando che la regolazione dell'asse a livello ippocampale è mediata dalla trasmissione *Npy-Y1R*.

Numerosi studi dimostrano che le esperienze perinatali inducono alterazioni permanenti della plasticità sinaptica in particolare nella corteccia e nell'ippocampo. Attraverso l'impiego di un microscopio a dissezione a laser ed esperimenti di RT-PCR abbiamo analizzato l'espressione del mRNA per il BDNF nell'ippocampo di topi *Npy1r2lox* e dei loro fratelli mutanti *Npy1rrfb* esposti a diversi livelli di cure materne. In accordo con i dati della letteratura, abbiamo dimostrato che bassi livelli di cure materne riducono l'espressione del mRNA per il BDNF nella CA1 dei topi controllo (*Npy1r2lox*). Tuttavia, queste alterazioni non sembrano essere mediate da Y1R, in quanto non si osservano nei topi *Npy1rrfb*. Risultati preliminari, ottenuti in collaborazione con la Dott.ssa Carulli (gruppo Prof. Rossi) suggeriscono che la trasmissione ippocampale *NPY-Y1R* sia determinante nella modulazione della plasticità neuronale nella corteccia prefrontale, che rappresenta la stazione intermedia attraverso la quale la trasmissione glutammatergica ippocampale regola l'attività dell'assa HPA. Abbiamo infatti osservato che in questa regione encefalica si osserva una drammatica diminuzione delle reti perineurali (PNN) nei topi controllo *Npy1r2lox* allevati da mamme HABN rispetto ai topi controlli allevati da mamme LABN o ai topi condizionali mutanti.

I prossimi obiettivi di questo filone di ricerca sono:

- a) Verificare se l'ambiente materno influenza in maniera permanente il comportamento e la plasticità neuronale attraverso modificazioni epigenetiche di *Npy1r*. Analizzeremo se le modificazioni epigenetiche indotte dall'ambiente materno (per es. la metilazione del DNA) portano a cambiamenti dell'espressione genica di Y1R e di fattori di trascrizione sensibili ai cambiamenti dell'espressione di *Npy1r* nel sistema limbico. Esamineremo inoltre se queste modificazioni permanenti possono essere trasmesse attraverso le generazioni.
- b) Identificare le vie di segnalazione che interagiscono con *NPY-Y1R* nella regolazione di queste funzioni, inclusi i sistemi GABAergici e glutammatergici, le reti perineuronali (PNN) e il CRH.
- c) Verificare se il comportamento ansioso indotto dall'ambiente materno attraverso Y1R nel sistema limbico influenza anche la vulnerabilità allo stress e la tossicodipendenza (assunzione di etanolo) nell'età adulta.
- d) Identificare trattamenti farmacologici e non farmacologici che possono contrastare l'effetto delle cure materne sull'espressione di *Npy1r* nel sistema limbico (e probabilmente sulle PNN) e di conseguenza sul comportamento emozionale e sulla vulnerabilità alla psicopatologia nell'adulto.

Gli esperimenti saranno eseguiti in collaborazione con la Dott.ssa Carulli, con le università di Milano, Cagliari, Parma e con laboratori di Losanna e Heidelberg.

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

In collaborazione con l'Università di Parma, abbiamo analizzato la crescita del peso corporeo e il comportamento alimentare dei topi Npy1rrfb in risposta a una dieta normale o ad alto contenuto di grassi. Dopo la nascita, (PND1), i topi Npy1rrfb e i loro fratelli di controllo (Npy1r2lox) sono stati dati in affidamento a mamme adottive del ceppo CD1 per rimuovere l'inibizione dell'inattivazione genica indotta da doxiciclina (Dox). Durante lo sviluppo postnatale, tra PND45 e PND90, i topi maschi Npy1rrfb, ma non le femmine, mostrano un rallentamento della crescita del peso corporeo rispetto ai controlli Npy1r2lox. Il recettore limbico Npy1r sembra essere coinvolto in questo effetto in quanto l'inattivazione condizionale, mediata da Cre, del gene Npy1r nel gene nell'ippocampo è indotta nella stessa finestra temporale. Questa riduzione di peso corporeo tuttavia scompare quando gli animali sono stabulati singolarmente e sottoposti ad una batteria di test comportamentali. Quando, successivamente, i topi sono stati esposti a una dieta ricca di grassi (5.2 kcal/gr rispetto a 3,9 kcal della dieta standard) per tre settimane, abbiamo osservato che, a partire dal secondo giorno, i topi ko condizionali Npy1r rfb mostrano un rapido incremento del peso corporeo che persiste durante tutto il periodo di esposizione alla dieta. Rispetto ai controlli topi Npy1r rfb consumano la stessa quantità complessiva di cibo, ma assumono più calorie durante la prima settimana di esposizione a dieta grassa, una latenza più lunga prima di ridurre la quantità di cibo grasso assunto e, dopo il sacrificio, una maggiore quantità di tessuto adiposo bianco perigonadico e un più alto livello di glicemia plasmatica. Questi risultati suggeriscono che la delezione condizionale del Npy1r nel sistema limbico induce una disregolazione del rapporto appetit/sazietà ed un'incapacità di processare calorie che in parte è simile a quanto descritto dall'ipotesi del "thrifty phenotype" (fenotipo risparmiatore).

Questi risultati confermano che il recettore Y1R limbico svolge un ruolo chiave nel controllo del peso corporeo e del bilancio energetico.

Studi eseguiti su gemelli identici che erano nell'utero materno durante periodi di carestia, e studi su modelli animali hanno dimostrato che l'ambiente perinatale, incluso il nutrimento nelle prime fasi della vita, gioca un ruolo importante nella suscettibilità a malattie metaboliche in età adulta anche se il meccanismo che la determina rimane oscuro.

I topi Npy1r rfb rappresentano quindi un importante e innovativo modello animale per lo studio della suscettibilità all'obesità e al diabete di tipo 2.

I prossimi obiettivi di questo filone di ricerca sono:

- a) Stabilire il ruolo del recettore limbico Y1R nella regolazione del bilancio energetico, nella comparsa di obesità ed alterazione dei principali parametri metabolici (risposta a carico di glucosio e resistenza all'insulina), in risposta a fattori ambientali quali l'ambiente materno, la dieta e lo stress (acuto e cronico).
- b) Identificare i segnali neurochimici che interagiscono con NPY nella regolazione di queste funzioni, inclusa la trasmissione GABAergica e glutammatergica e i peptidi ipotalamici.
- c) Verificare se l'ambiente perinatale (cura materna, nutrizione, composizione del latte) modifica in modo permanente l'omeostasi energetica nell'adulto attraverso la regolazione epigenetica dell'espressione di Npy1r nelle regioni limbiche e se queste alterazioni sono trasmesse alle generazioni F2.
- d) verificare se la presenza di ormoni sessuali femminili, differenze dimorfiche sessuali o differenze di regolazione epigenetica siano responsabili di questa differente risposta nei due generi

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

Abbiamo generato una linea di topi ko condizionali in cui il gene Npy1r è inattivato selettivamente nei neuroni che co-esprimono il recettore Y5, ed in particolare nell'ippocampo (CA1, CA3 e DG), nell'amigdala basolaterale e nucleo ventromediale dell'ipotalamo.

I nostri risultati dimostrano che i topi Npy1rY5-/- mostrano un fenotipo diverso dai topi Npy1rrfb.

- a) Entrambe le linee di animali con la delezione condizionale di Npy1r nelle regioni limbiche mostrano un comportamento ansioso sia nel test dell'EPM che in quello dell'OF ma i topi Npy1rY5-/- non presentano alterazioni dell'asse HPA, dei recettori ippocampali dei glucocorticoidi, e dei livelli di espressione del CRH nell'amigdala e nell'ipotalamo.

- b) I topi Npy1rY5^{-/-} mostrano un aumento della memoria spaziale nel test di Morris.
- c) I topi Npy1rY5^{-/-} maschi non presentano alterazioni del peso corporeo, mentre nelle femmine si osserva un aumento di peso dopo la pubertà (effetto probabilmente legato al ko ipotalamico)
- d) Il fenotipo dei topi Npy1rY5^{-/-} non è influenzato dal genere.
- e) La delezione condizionale di Npy1r nell'ippocampo è associata a un drammatico aumento del mRNA di Npy5r (di Npy2r), suggerendo che Npy1r svolga un ruolo determinante nella regolazione di queste funzioni, ruolo che non può essere compensato dal recettore Y5.
- f) Il fenotipo dei topi Npy1rY5^{-/-} non è influenzato dalla cura materna (risultati preliminari).

Questo suggerisce il coinvolgimento di circuiti neuronali diversi nella regolazione del comportamento emozionale da parte del sistema NPY-Y1R. In accordo con questa ipotesi, abbiamo dimostrato che, nell'amigdala basolaterale, la delezione di Npy1r nei topi Npy1rY5^{-/-} si determina, almeno in parte, in neuroni GABAergici, suggerendo che il recettore Y1R potrebbe regolare funzioni limbiche diverse attraverso la modulazione di neuroni eccitatori e inibitori. E' interessante osservare che questi circuiti neuronali sembrano essere modulati in modo diverso dall'ambiente materno.

Per dimostrare questa ipotesi nel prossimo anno vorremmo analizzare le alterazioni della trasmissione glutammatergica e GABAergica (GAD, GLUT, GABA) nell'ippocampo e nell'amigdala basolaterale dei topi Npy1rY5^{-/-} esposti a livelli diversi di cura materna.

Collaborazioni: Rolf Sprengel (Max Planck Institute, Heidelberg); Eric Grouzmann (Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Switzerland); Prof. Paola Palanza (Università di Parma; Giovanni Biggio (Università di Cagliari); Adriana Maggi (Università di Milano); Andrea Riva (Università di Milano).

3. Prodotti delle attività di ricerca anno 2012

3.1. 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 Y1 receptors reveals the role of Y1R and Y5R co-expressing neurons in anxiety, memory and gender-dependent regulation of body weight growth, submitted.

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., submitted.

Progetto delle attività di ricerca per il 2013 del gruppo **Plasticity and Regeneration of the PNS**, presso l'Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO)

Responsabile del gruppo: **Stefano Geuna**

1. Composizione del gruppo di ricerca (1-11-2012)

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

Stefano Geuna (PA)
Michele Fornaro (RU)
Stefania Raimondo (RU)

1.2. Personale non strutturato

Giulia Ronchi (Dottoranda)
Luisa Muratori (Dottoranda)
Loradana Grasso (Dottoranda)
Sara Gnani (Dottoranda)
Simone Bompasso (Tecnico di Laboratorio)

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

2. Progetti di ricerca (2013)

In linea con i finanziamenti recentemente ricevuti dalla Commissione Europea e dalla Regione Piemonte nel corso del 2011, il lavoro del nostro gruppo di ricerca per l'anno 2013 si rivolgerà principalmente allo studio di strategie innovative di ingegneria tissutale volte alla ricostruzione e rigenerazione dei nervi periferici in seguito a lesione traumatica.

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

Nel secondo anno di tale progetto, il nostro gruppo di ricerca si occuperà di studiare in vitro l'efficacia di nano particelle per il rilascio locale di molecole (fattori neurotrofici e gliotrofici, citochine infiammatorie, e neuro-ormoni). Inoltre, il nostro gruppo si occuperà della valutazione morfologica e stereologica della rigenerazione dei nervi periferici in seguito a riparazione secondo tre differenti tipi di approccio: il trapianto tissutale e cellulare (in particolare cellule di Schwann e/o cellule staminali mesenchimali); l'utilizzazione di scaffolds a base di chitosano ed infine la terapia genica mediante vettori virali adeno-associati per far esprimere a livello della sede di lesione neurale fattori che possano promuovere la rigenerazione neurale. *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).

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

Nel secondo anno di tale progetto, svolto in collaborazione con il Politecnico di Torino ed l'Ospedale CTO di Torino e volto a sviluppare un dispositivo biomedicale innovativo in forma di membrana bioartificiale bi-strato e bi-componente per la rigenerazione neuronale in seguito a lesioni ai nervi periferici, si intende in primo luogo completare i tests in vitro di biocompatibilità avviati nel corso del primo anno. Inoltre, nella

seconda parte del 2013, verranno pianificati ed iniziati i primi esperimenti in vivo per testare i prototipi di guida nervosa realizzati dai colleghi del Politecnico.

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

2.3 Altre linee di ricerca

Sebbene la gran parte delle attività del gruppo di ricerca verranno indirizzate sui due progetti sovra menzionati, nondimeno si porteranno avanti altri progetti nell'ambito di collaborazioni a livello nazionale ed internazionale.

2.3.1. Studio delle modificazioni muscolari scheletriche in seguito a denervazione

Tale progetto si propone di correlare le modificazioni morfologiche che si osservano nel muscolo scheletrico in seguito a denervazione (atrofia muscolare) e di correlarle alle modificazioni che si rilevano mediante l'analisi proteomica. In prospettiva, s'intendono utilizzare le informazioni ottenute per identificare possibili strategie terapeutiche per prevenire l'atrofia da denervazione.

Collaborazioni: Cecilia Gelfi (Università di Milano)

2.3.2. Studio dell'utilizzazione di cellule staminali per promuovere la rigenerazione dei nervi periferici

Tale progetto si propone di indagare le potenzialità del trapianto di cellule staminali per promuovere la rigenerazione dei nervi periferici. 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: Ana Colette Mauricio (ICBAS, Porto University, Portugal)

2.3.3. Studio degli effetti dell'esercizio fisico sul recupero funzionale inseguito a lesione dei nervi periferici

Tale progetto si propone di indagare, in modelli murini, gli effetti di diversi protocolli di esercizio fisico nel promuovere il recupero funzionale neuromotorio in seguito a lesioni traumatiche dei nervi periferici.

Collaborazioni: Paulo Armada da Silva (CIPER, Technical University of Lisbon, Portugal)

2.3.4. Studio dei meccanismi molecolari della rigenerazione nervosa periferica mediante modelli murini geneticamente modificati

Tale progetto si propone di indagare differenti tipi di linee murine transgeniche e knock-out, il ruolo di differenti molecole e pathway di signalling cellulare nel complesso processo di rigenerazione nervosa periferica. Il focus è attualmente rivolto principalmente su: i) ErbB2; ii) Sprouty 2; iii) Sortilin; iv) Netrin; v) Ghrelin.

Collaborazioni: Christian Bjerggaard Vægter (Department of Medical Biochemistry, Aarhus University, Denmark), Lars Klimaschewski (Division of Neuroanatomy, Innsbruck Medical University, Austria), Patrick Jamimet (KHPRV, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, Germany), Andrea Graziani (IRCAD, Università del Piemonte Orientale, Novara), Federica Cavallo (MBC, Torino).

2.3.5. Studio dell'impiego di vettori virali adenoassociati per promuovere la rigenerazione nervosa periferica inseguito a riparazione microchirurgica mediante tubulizzazione biologica

Tale progetto si propone di realizzare strategie innovative per migliorare l'outcome in seguito a lesioni nervose periferiche, mettendo insieme due differenti approcci dell'ingegneria tissutale: la tubulizzazione biologica e la terapia genica. In particolare si intende indagare la possibilità di ricostruire difetti nervosi mediante innesti di muscolo-in-vena potenziati geneticamente mediante vettori virali adenoassociati.

Collaborazioni: Mauro Giacca (ICGEB, Trieste), Pierluigi Tos (CTO, Torino)

3. Prodotti delle attività di ricerca anno 2012

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

Lanza C, Raimondo S, Vergani L, Catena N, Sénès F, Tos P, Geuna S. Expression of antioxidant molecules after peripheral nerve injury and regeneration. *J. Neurosci. Res.* 2012 Apr;90(4):842-8.

Audisio C, Mantovani C, Raimondo S, Geuna S, Perroteau I, Terenghi G. Neuregulin1 administration increases axonal elongation in dissociated primary sensory neuron cultures. *Exp. Cell. Res.* 2012 Mar 10;318(5):570-7.

Mantovani C, Raimondo S, Haneef MS, Geuna S, Terenghi G, Shawcross SG, Wiberg M. Morphological, molecular and functional differences of adult bone marrow- and adipose-derived stem cells isolated from rats of different ages. *Exp. Cell. Res.* 2012 Oct 1;318(16):2034-48.

Muratori L, Ronchi G, Raimondo S, Giacobini-Robecchi MG, Fornaro M, Geuna S. Can regenerated nerve fibers return to normal size? A long-term post-traumatic study of the rat median nerve crush injury model. *Microsurgery* 2012 Jul;32(5):383-7.

Papalia I, Raimondo S, Ronchi G, Magaouda L, Giacobini-Robecchi MG, Geuna S. Repairing Nerve Gaps by Vein Conduits Filled with Lipoaspirate-Derived Entire Adipose Tissue Hinders Nerve Regeneration. *Ann. Anat.* 2012, in press.

Porporato P, Filigheddu N, Reano S, Ferrara M, Angelino E, Gnocchi V, Prodam F, Ronchi G, Fagoonee S, Fornaro M, Chianale F, Baldanzi G, Surico N, Sinigaglia F, Perroteau I, Smith R, Sun Y, Geuna S, Graziani A. Acylated and unacylated ghrelin impair skeletal muscle atrophy in mice. *J. Clin. Invest.* 2012, in press.

3.2. Seminari e conferenze con affiliazione al NICO

S. Geuna, New concepts in peripheral nerve's tissue engineering, Keynote Lecture, 3rd TERMIS World Congress 2012 "Tissue Engineering and Regenerative Medicine", Vienna, Austria, September 5 - 8, 2012.

S. Geuna, Biohybrid templates for enhancing peripheral nerve repair and regeneration, CEITEC International Conference – Cell Interaction with Surfaces, Brno, Czech Republic, October 22-23, 2012 .

3.3. Finanziamenti per la ricerca

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

Progetto delle attività di ricerca per il 2013 del gruppo **Neuroendocrinologia**, presso l'Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO)

Responsabile del gruppo: **Giancarlo Panzica**

1. Composizione del gruppo di ricerca (1-11-2012)

1.1. Personale strutturato dell'Università di Torino

Giancarlo Panzica (PO)

Stefano Gotti (RU)

Vittorio Monasterolo (Tecnico di laboratorio)

1.2. Personale non strutturato

Giovanna Ponti (postdoc)

Alice Farinetti (dottoranda)

Alicia Rodriguez (dottoranda)

Benedetta Foglio (dottoranda)

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

2. Progetti di ricerca (2013)

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

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

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

Nel corso del 2012 Topi CD1 di entrambi i sessi sono stati esposti a stress imprevedibile per 8 settimane, al termine di questa esperienza gli animali sono stati testati per la depressione utilizzando lo swimming immobility test e l'elevated plus maze test. Al termine di queste esperienze gli animali sono in parte sacrificati per analisi gascromatografiche del contenuto di neurosteroidi, in parte sacrificati per il dosaggio della vasopressina con il metodo ELISA ed in parte sacrificati e fissati per evidenziare per via immunostochimica la distribuzione delle cellule e delle fibre contenenti vasopressina o NO-sintasi, che saranno poi analizzate con metodi computerizzati semiautomatici. Nel corso del secondo anno analizzeremo i risultati ottenuti per evidenziare le differenze sessuali nella risposta allo stress e le relazioni tra variazioni nell'espressione della vasopressina ed il contenuto in neurosteroidi. A questo studio si affiancherà anche lo studio degli effetti dell'esposizione ai fitoestrogeni (in particolare la genisteina) sui

comportamenti ansiosi. Alcuni dati preliminari ci fanno infatti ritenere che ci possano essere differenze di genere all'esposizione precoce a questi composti, in particolare con alterazione dei comportamenti ansiosi.
Collaborazioni: Roberto Melcangi e Marco Riva (Università di Milano).

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

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

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

2.3. Steroidi sessuali e neurogenesi

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

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

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

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

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

3. Prodotti delle attività di ricerca anno 2012

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

Panzica G.C., Balthazart J., Frye C.M., Garcia-Segura L.M., Herbison A.E., Mensah-Nyagan A.G., McCarthy M.M., Melcangi R.C. (2012) Milestones on steroids and the nervous system: Ten years of basic and translational research. *J. Neuroendocrinol.*, 24:1-15.

Frye C., Bo E., Calamandrei G., Calzà L., Dessì-Fulgheri F., Fernández M., Fusani L., Kah O., Kajta M., Le Page Y., Patisaul H.B., Venerosi A., Wojtowicz A.K., Panzica G.C. (2012) Endocrine disruptors: a review of sources, effects, and mechanisms of action on behavior and neuroendocrine systems. *J. Neuroendocrinol.*, 24:144-159.

Razzoli M., Bo E., Pascucci T., Pavone F., D'Amato F.R., Cero C, Sanghez V., Dadomo H., Palanza, P. Parmigiani S., Ceresini G., Puglisi-Allegra S., Porta M., Panzica G.C., Moles A., Possenti R., Bartolomucci A. Implication of the VGF-derived peptide TLQP-21 in stress-based models relevant to human psychopathology. *Behav. Brain Res.*, 229:333-339.

Grassi D., Lagunas N., Amorim M., Pinos H., Panzica G.C., Garcia-Segura L.M., Collado P. (2012) Role of oestrogen receptors on the modulation of NADPH-diaphorase-positive cell number in supraoptic and paraventricular nuclei of ovariectomised female rats. *J. Neuroendocrinol*, *in press*

3.2. Seminari e conferenze con affiliazione al NICO

Relatore invitato per la Settimana del Cervello Torino, 13-16 marzo 2012.

Titolo: Ambiente e cervello: come nascono le differenze tra i sessi.

Relatore invitato per il simposio: Role of hormones and endocrine disruptors in modulating nervous function: physiological and pathological relevance. Catania, Congresso Nazionale SINS, 19-22 aprile, 2012.

Titolo: Environment And Brain Sexual Differentiation: What Role For Endocrine Disrupters?

Relatore invitato alla UZI Spring school: Development of the nervous system: A comparative and behavioral approach. Venezia, 11-13 Maggio, 2012.

Titolo: Environment and brain sexual differentiation: gonadal hormones and endocrine disrupters

Invited speaker al 8^a Biannual Gordon Research Conference su Environmental Endocrine Disruptors, Mount Snow, Vermont, USA, 3-8 giugno 2012.

Titolo: Endocrine disruption of hypothalamic circuits controlling energy balance.

Lettura magistrale al 73° Convegno Nazionale UZI, Firenze, 24-27 Settembre, 2012.

Titolo: Effects on neuroendocrine disruption in higher vertebrates: neural circuits controlling reproductive and feeding behavior.

Seminari presso Università Politecnica di Ancona, Università del Gusto di Pollenzo, Université de Strasbourg (Francia).

3.3. Altri prodotti riconducibili alle attività Istituzionali del NICO

3.3.1. Attività editoriali

Steroids and the nervous system (a cura di G.C. Panzica e R.C. Melcangi), *Special Issue*, Journal of Neuroendocrinology, vol. 24, 2012, pp. 1-248 - ISSN 0953-8194.

3.4. Finanziamenti per la ricerca

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

Progetto delle attività di ricerca per il 2013 del gruppo **Developmental Neurobiology and Regeneration**, presso l'Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO)

Responsabile del gruppo: **Ferdinando Rossi**

1. Composizione del gruppo di ricerca (1-11-2012)

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

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

1.2. Personale non strutturato

Enrica Boda (postdoc)
Alessio Faralli (dottorando)
Elisa Fucà (dottoranda)
Vivien Labat-Gest (dottorando)
Elena Parmigiani (dottoranda)
Ermira Pajai (dottoranda)

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

2. Progetti di ricerca (2013)

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

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

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

sinapsi si formano aggregati di matrice extracellulare, le reti perineuronali, che stabilizzano e riducono le capacità di rimodellamento strutturale. I processi plastici nel sistema nervoso centrale adulto, nonché il recupero funzionale dopo un danno, sono favoriti dall'interazione con l'ambiente esterno, sotto forma di stimoli sensoriali, motori, sociali e cognitivi (esperienza).

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

Per chiarire i meccanismi attività-dipendenti che regolano la plasticità compensatoria dopo un danno studieremo i processi di denervazione e re-innervazione, in parallelo con i cambiamenti dell'espressione delle molecole della matrice extracellulare, nei nuclei cerebellari denervati e nei nuclei vestibolari dopo denervazione unilaterale e durante il processo di compensazione vestibolare. Questi cambiamenti verranno messi in relazione al comportamento dei topi lesionati sia durante la manifestazione dei deficit vestibolari che durante il compenso vestibolare. In particolare, per capire i meccanismi molecolari attraverso cui le reti perineuronali diminuiscono le capacità plastiche dei neuroni, esamineremo linee di topi mutanti che presentano reti perineuronali difettose. Inoltre, studieremo il pattern di espressione della semaforina3A, fattore repulsivo nei confronti della crescita assonale, recentemente identificato come componente delle reti.

Per chiarire, invece, il ruolo di specifici fattori intrinseci nel controllo della plasticità, studieremo il compenso vestibolare in linee di topi mutanti che presentano capacità plastiche neuronali potenziate. Uno dei nostri modelli di studio è, infatti, rappresentato da una linea di topi transgenici che sovraesprime la proteina associata alla crescita GAP-43 specificatamente nelle cellule di Purkinje del cervelletto. Studieremo, pertanto, le capacità plastiche delle cellule di Purkinje transgeniche dopo denervazione dei nuclei vestibolari ed il grado di recupero funzionale dei topi transgenici.

Negli stessi topi esamineremo i meccanismi molecolari/cellulari attraverso cui GAP-43 potenzia la plasticità delle cellule di Purkinje dopo assotomia, con particolare attenzione ai cambiamenti di distribuzione ed espressione di determinanti intrinseci neuronali, quali i fattori del citoscheletro. In questo modello sperimentale abbiamo osservato che la sovraespressione di GAP-43 determina una maggiore organizzazione dell'actina e dei microtubuli negli assoni di Purkinje lesionati. Per capire se questi cambiamenti del citoscheletro possono contribuire al potenziamento delle capacità plastiche delle cellule di Purkinje transgeniche, abbiamo manipolato l'organizzazione dei microtubuli (per mezzo di taxolo, che aumenta il grado di stabilizzazione dei microtubuli) nel cervelletto di topi wild-type *in vitro*, e abbiamo osservato che le capacità plastiche degli assoni di Purkinje aumentano. Il nostro scopo è ora quello di verificare se la disorganizzazione dei microtubuli (tramite nocodazolo) nelle cellule di Purkinje sovraesprimenti GAP-43 porta ad una diminuzione delle capacità plastiche di tali neuroni. Esamineremo, inoltre, se l'organizzazione dei microtubuli influenza il pattern di crescita assonale delle cellule di Purkinje durante lo sviluppo. Verificheremo, infine, se alterazioni del grado di polimerizzazione dell'actina influenzano la plasticità dei neuroni di Purkinje dopo lesione.

Recentemente è stato dimostrato che la fosfatasi PTEN è un fattore determinante nell'inibire la rigenerazione assonale dei neuroni centrali adulti. Per capire il ruolo di PTEN nella rigenerazione delle cellule di Purkinje, studieremo se la delezione di tale molecola (mediante l'utilizzo di topi pten floxed) determina un aumento delle capacità rigenerative di tali neuroni.

Collaborazioni: James Fawcett (Centre for Brain Repair, Cambridge); Leszek Kaczmarek (Nencki Institute, Warsaw), Joost Verhaagen (Neuroscience Institute of Neuroscience, Amsterdam), Roberto Albera (Università di Torino), Ferdinando Di Cunto (università di Torino), Marco Sassoè-Pognetto (Università di Torino).

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

Questa linea di ricerca intende studiare i processi di specificazione fenotipica e integrazione di nuovi neuroni nei circuiti nervosi, sia durante l'ontogenesi del cervelletto murino, sia in seguito a trapianto eterotopico/eterocronico in diversi modelli di neurodegenerazione cerebellare.

Una parte degli esperimenti sono volti ad analizzare i processi di sviluppo e di specificazione delle diverse categorie di interneuroni GABAergici e le relazioni di lignaggio esistenti tra tali interneuroni e gli altri fenotipi derivanti dalla zona ventricolare embrionale (VN) e dalla sostanza bianca postnatale (PWM) del cervelletto. In particolare, i risultati ottenuti attraverso la caratterizzazione di topi GLAST::CreERT2:YFP e tramite esperimenti di applicazione *in utero* e *in vivo* di vettori lentivirali con tropismo specifico per la popolazione astrocitaria hanno evidenziato che gli interneuroni GABAergici cerebellari derivano da progenitori Glast-positivi bipotenti, in grado di generare anche le diverse categorie di astrociti ad eccezione della glia di Bergmann. Si prevede di proseguire la caratterizzazione di tali progenitori comuni mediante analisi clonali *in vitro* e *in vivo* ai diversi stadi di sviluppo cerebellare. Il potenziale di sviluppo dei cloni verrà analizzato mediante trapianto eterocronico/eterotopico, analisi time-lapse e saggi in colture su feeder layers definiti, al fine di comprendere i meccanismi sottostanti alla scelta fenotipica neuronale e gliale. Si prevede inoltre di analizzare nello specifico i processi in grado di guidare le scelte fenotipiche all'interno di ciascun lignaggio. Nell'ambito dello studio dei meccanismi cellulari/molecolari che regolano il numero e il fenotipo degli interneuroni inibitori continueremo l'analisi di molecole segnalatrici (e dei loro recettori) che possono influenzare la proliferazione e il differenziamento dei progenitori presenti nella PWM. Effettueremo a tale scopo test funzionali condotti *in vitro* attraverso l'applicazione di diverse sostanze (Shh, FGF8, bFGF, ormone tiroideo, Notch, Wnt..) su colture organotipiche preparate da cervelletti embrionali e postnatali, ed opereremo la sovraespressione delle stesse sostanze mediante elettroporazione o applicazione di vettori virali. Altri esperimenti andranno invece ad analizzare il ruolo di meccanismi epigenetici (modificazioni degli istoni, espressione e attività dei miRNA, recettori nucleari e co-regolatori) associati alla specificazione e al differenziamento delle cellule nella PWM, al fine di identificare le cascate molecolari alla base della produzione delle diverse classi di interneuroni, evidenziando il ruolo reciproco e le relazioni esistenti tra meccanismi cellulari intrinseci e l'influenza di segnali estrinseci.

Una linea parallela di questo settore di ricerca intende valutare l'efficacia di strategie di sostituzione cellulare nell'ambito di esperimenti traslazionali preclinici su modelli di neuro-degenerazione cerebellare. In particolare continueremo l'analisi dei meccanismi responsabili del corretto sviluppo e integrazione delle cellule di Purkinje (PCs), i neuroni di proiezione maggiormente compromessi in diversi modelli di atassia spino-cerebellare. Allo stato attuale la nostra analisi istologica e comportamentale sul modello murino di atassia-spinocerebellare di tipo 2 (SCA2) ha evidenziato le difficoltà di utilizzo di tale modello a causa dei tempi necessari per l'insorgenza del fenotipo atassico (oltre i 12 mesi negli animali omozigoti). Pertanto continueremo lo studio dei meccanismi di sostituzione cellulare sul modello murino tambaleante, in cui la sintomatologia atassica dovuta alla degenerazione selettiva delle PCs ha un'insorgenza precoce (entro il terzo mese di vita dell'animale). Da un lato i nostri esperimenti si concentrano sulla messa a punto di protocolli specifici per il differenziamento di cellule staminali embrionali murine indirizzate verso il destino di cellule di Purkinje. Dall'altro lato, trapianteremo popolazioni pure di cellule di Purkinje nel IV° ventricolo di embrioni *in utero* o nel cervelletto postnatale *in vivo*, quando l'integrazione anatomica e funzionale degli elementi trapiantati è massima. Indagheremo le proprietà a lungo termine dei neuroni trapiantati e la loro abilità di contrastare l'esordio e i sintomi della malattia.

Collaborazioni: Giacomo Consalez (Dibit, Milano); Elena Cattaneo (Università di Milano); Lorenzo Magrassi (Università di Pavia); Austin Smith (Università di Cambridge)

2.4. 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.

La dimostrazione che il recettore P2 è espresso dai progenitori degli oligodendrociti (PO) dall'uscita dal ciclo cellulare fino a uno stadio pre-mielinizzante ci ha permesso di escludere il coinvolgimento del recettore nella risposta dei PO ai segnali di danno e ci ha invece fornito uno strumento per studiare la modalità di divisione di questi progenitori nel parenchima adulto. Ci siamo chiesti se la loro proliferazione preveda meccanismi di divisione asimmetrica auto-rigenerativa, tali da produrre un nuovo progenitore insieme a una cellula che differenzia, o se la popolazione di progenitori presente nel tessuto si esaurisca progressivamente procedendo verso la maturazione dopo un numero variabile di cicli di divisione cellulare. La segregazione asimmetrica del marcatore di differenziamento GPR17 subito dopo la mitosi in una

frazione significativa di cellule sorelle ha inizialmente suggerito divisioni auto-rigenerative. Questi dati sono stati corroborati dall'osservazione che altri marcatori di stadi immaturi/di progenitore (PDGFrA, Sox2) o di differenziamento (Nkx2.2) segregano asimmetricamente nella progenie di una stessa cellula madre. Tuttavia, l'analisi di cicli proliferativi successivi ha escluso che la cellula con caratteristiche di progenitore generata insieme a un elemento differenziante rientri nel ciclo mitotico cellule e ha invece rivelato che la ri-proliferazione coinvolge sempre doppietti di cellule sorelle. Questi dati suggeriscono un modello in cui le divisioni cellulari producano due cellule identiche capaci di proliferare o di differenziarsi. Nelle cellule uscite dal ciclo mitotico, però, il processo differenziativo sembra poter avvenire in maniera asincrona. Ulteriori indagini sono in corso per validare completamente questi dati e capire se segnali estrinseci come quelli presenti nel tessuto danneggiato o l'alterazione dei macchinari molecolari che classicamente presiedono all'esecuzione di divisioni asimmetriche nelle cellule staminali agiscano sull'equilibrio tra proliferazione e differenziamento immediatamente dopo la mitosi.

Sul fronte della fisiopatologia dei PO e degli oligodendrociti sono in corso altri studi, per ora in fase iniziale: -stiamo esaminando il ruolo della delezione della chinasi CITRON su proliferazione, sopravvivenza e differenziamento dei PO; -stiamo esaminando i contatti GABAergici e Glutamatergici presenti su queste cellule in condizioni fisiologiche, patologiche e in condizioni di arricchimento ambientale con l'obiettivo di capire se e come meccanismi attività-dipendenti modulino il comportamento di queste cellule; - stiamo indagando i meccanismi che inducono demielinizzazione nelle patologie dovute a sovraespressione della proteina nucleare lamina come la Leucodistrofia Autosomica dominante.

Tra gli altri componenti cellulari capaci di dare, insieme agli OP, una risposta citogenica al danno vi sono gli astrociti. Abbiamo di recente dimostrato che NogoA e il suo recettore NgR1, noti inibitori della plasticità assonale e sinaptica nel sistema nervoso centrale, regolano la neuro genesi della zona sottoventricolare secondo un meccanismo di feedback negativo operato dalla molecola NogoA presente sui neuroni neogenesi sul recettore NgR1 espresso dagli astrociti germinativi. Intendiamo proseguire questo studio esaminando i meccanismi di trasduzione intracellulare di NgR1. Ipotizziamo, infatti, che NgR1 antagonizzi l'azione di segnali mitogenici attraverso la modulazione del pathway di PTEN-mTOR. Sono inoltre in corso esperimenti volti a chiarire se e come i segnali mediati da NogoA/NgR1 regolino anche la neurogenesip ippocampale e se l'azione di questo meccanismo di segnalazione sia influenzata dall'attività elettrica.

Infine, in uno studio parallelo ci siamo chiesti quale sia l'effetto di segnali precoci di danno quali quelli costituiti dai nucleotidi extracellulari (NE) sugli astrociti parenchimali e germinativi. I NE sono potenti attivatori dell'astrogliosi parenchimale, dell'attività (proliferazione e differenziamento) degli astrociti germinativi e dei progenitori della zona neurogenica sottoventricolare. Inoltre, l'esposizione ai NE induce negli astrociti parenchimali l'espressione di fattori solubili che limitano l'attività degli astrociti germinativi pur potenziandone la responsività ai mitogeni.

Collaborazioni: Maria Pia Abbracchio (Università di Milano); Ptrizia rosa (CNR, Milano); Magdalena Götz (LMU, Munich); Martin E Schwab (ETH, Zurich), Marco Sassoè (Università di Torino), Ferdinando di Cunto (Università di Torino), Alfredo Brusco (Università di Torino).

3. Prodotti delle attività di ricerca anno 2012

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

Behrendt G., Baer K., Buffo A., Curtis M.A., Faull R.L., Rees M.I., Götz M., Dimou L. (2012) Dynamic changes in myelin aberrations and oligodendrocyte generation in chronic amyloidosis in mice and men. *Glia* DOI: 10.1002/glia.22432.

Carulli D, Foscari S, Rossi F (2011). Activity-dependent plasticity and gene expression modifications in the adult CNS. *Front. Mol. Neurosci.* 4:50. doi: 10.3389/fnmol.2011.00050.

Corno D, Pala M, Cominelli M, Cipelletti B, Leto K, Croci L, Barili V, Brandalise F, Di Gregorio A, Sergi L, Politi L, Bulfone A, Rossi P, Rossi F, Consalez GG, Poliani L, Galli R (2012). Molecular profiling of postnatal

hindbrain-derived neural stem cells and cancer stem cells identifies novel molecular targets in medulloblastoma. *Cancer Disc* 2:554-568.

Florio M, Leto K, Muzio L, Tinterri A, Badaloni A, Croci L, Zordan P, Barili V, Albieri I, Guillemot F, Rossi F, Consalez GG (2012). Neurog2 regulates progenitor cell cycle progression and Purkinje cell dendritogenesis in cerebellar development. *Development* 139:2308-2320.

Foscarin S, Rossi F, Carulli D (2012) Influence of the environment on adult CNS plasticity and repair. *Cell Tissue Res* 349:161-168.

Leto K, Rolando C, Rossi F. (2012). The genesis of cerebellar GABAergic neurons: fate potential and specification mechanisms. *Front Neuroanat.* 6:6.

Leto K, Rossi F. (2012). Specification and differentiation of cerebellar GABAergic neurons. *Cerebellum* 11:434-435.

Manassero G, Repetto IE, Cobianchi S, Valsecchi V, Bonny C, Rossi F, Vercelli A (2012) Role of JNK isoforms in the development of neuropathic pain following sciatic nerve transection in the mouse. *Mol Pain* 8:39.

Ronga I, Bazzanella C, Rossi F, Iannetti G (2012) Linguistic synaesthesia, perceptual synaesthesia and the interaction between multiple sensory modalities. *Pragmatics and Cognition* 20:135-167.

Rossi F (2012) Evolutionary mechanisms and neural adaptation: Selective versus constructive strategies in the development and plasticity of the nervous system. In: *The Theory of Evolution and its Impact* (Fasolo A, Ed), Springer, New York, pp. 159-174

Sotelo C, Rossi F (2012) Purkinje cell migration and differentiation. In: *Handbook of Cerebellum and Cerebellar Disorders* (Manto M, Gruol D, Schmamann J, Koibuchi N, Rossi F, eds), Springer, New York, pp. 147-178.

Brilli E, Reitano E, Conti L, Conforti P, Gulino R, Consalez G, Cesana E, Smith A, Rossi F, Cattaneo E (2012) Neural stem cells engrafted in the adult brain fuse with endogenous neurons. *Stem Cell Dev* (in press).

Rolando C, Parolisi R, Boda E, Schwab ME, Rossi F, Buffo A (2012) Distinct roles of Nogo-A and Nogo receptor 1 in the homeostatic regulation of adult Neural Stem Cell function and neuroblast migration. *J Neurosci* (in press)

3.2. Seminari e conferenze con affiliazione al NICO

Boda E The GPR17 receptor in oligodendroglial cells: focus on cell heterogeneity, maturation and participation in CNS damage. Advanced School on New Approaches in Glial Cell Research, International Society for Neurochemistry, Barcelona, July 2012

Buffo A, "Nogo-A/Nogo receptor functions in the homeostasis of the adult SVZ9° Corso di Aggiornamento in Neuroscienze Città di Catania su "Invecchiamento cerebrale e demenza" invited seminar University of Zurich, Zurich, Switzerland, 2012, Invited Seminar (Host: Prof. Martin E. Schwab) Zurigo, 19 gennaio 2012

Buffo A, 'Fisiopatologia della neurogenesi ippocampale e della mielinizzazione', Corso di Aggiornamento in Neuroscienze Città di Catania su "Invecchiamento cerebrale e demenza Catania, 17 febbraio 2012

Buffo A, "Basi biologiche della neuroriparazione: il ruolo degli astrociti" Congresso della Società Italiana di Neurologia, Workshop su "Basi Biologiche della Neuroriparazione", Rimini, 8 ottobre 2012.

Leto K, Summer School on Neural Stem Cells in Development and Disease, Levico Terme (Trento), 4-8 settembre 2012.

Parmigiani E, "Cell lineage and differentiation", Nanosymposium, Annual meeting of the Society for Neuroscience, 14-10-2011 New Orleans.

Rolando C Distinct roles of Nogo-A and Nogo receptor 1 in the homeostatic regulation of adult Neural Stem Cell function and neuroblast migration. Advanced School on New Approaches in Glial Cell Research, International Society for Neurochemistry, Barcelona, July 2012

Rolando C, Distinct roles of Nogo-A and Nogo receptor 1 in the homeostatic regulation of adult Neural Stem Cell function and neuroblast migration. ABCD (Associazione di Biologia Cellulare e del Differenziamento) meeting "Stem Cells, Development and Regenerative Medicine", Turin, 4-6 May 2012

Rossi F, 8th Congress on Stem Cell Biology & Technology, Royan Institute, Teheran, Settembre 2012.

Rossi F, Age-dependent Neural Plasticity and Repair, 2012 International PhD Intensive School; Ageing Society: Issues, Theories and Practices for an Active Ageing. Università di Torino, Settembre 2012.

Rossi F, Is neural plasticity Darwinian?, BSB lab, Università di Torino, Febbraio 2012.

Rossi F, Regulation of intrinsic neuronal properties for neuritic growth, plasticity and regeneration, European Laboratory for non-Linear Spectroscopy, Università di Firenze, Aprile 2012.

Rossi F, Specification and development of cerebellar GABAergic neurons, The Netherlands Institute for Neuroscience, Amsterdam, Giugno 2012.

Rossi F, Structural plasticity and regulation of growth in the cerebellum. Sensory-motor plasticity and learning: from bench to bedside. Symposium in Honor of José Maria Delgado-Garcia, Venezia, Aprile 2012.

3.3. Altri prodotti riconducibili alle attività Istituzionali del NICO

3.3.1. Attività editoriali

Rossi F. Handbook of The Cerebellum and Cerebellar Disorders, Springer, New York, Heidelberg. Editor in Chief per la sezione Cerebellar Development

3.3.2. Attività di promozione e divulgazione

Diversi componenti del gruppo hanno partecipato, a vario titolo, all'organizzazione e alla realizzazione di eventi e attività di divulgazione scientifica quali:

- La notte dei Ricercatori, Torino 2012
- La notte dei Ricercatori, Cuneo 2012
- UNISTEM, 2012

Enrica Boda, Chiara Rolando e Annalisa Buffo hanno animato il laboratorio di neuroscienze per la Summer Academy (Fondazione Agnelli e Università degli studi di Torino), 14-17 luglio 2012.

Annalisa Buffo e Luca Bonfanti hanno svolto seminari divulgativi presso il liceo Cocito di Alba.

Annalisa Buffo e alcuni giovani ricercatori hanno ospitato i ragazzi del liceo Cocito di Alba e dell'Istituto Natta di Rivoli presso il NICO e animato diversi laboratori per l'orientamento e la divulgazione della cultura scientifica.

Ferdinando Rossi ha partecipato a due eventi promozionali, organizzati dall'Associazione Alzheimer Asti Onlus nei mesi di Maggio e Settembre 2012.

Annalisa Buffo ha ospitato due studenti stranieri che hanno scelto il laboratorio per apprendere tecniche di colture di astrociti primari e assay funzionali su queste cellule:

- Bahareh Abd Nikfarjam, dottoranda in Immunologia presso l'Università Tarbiat Modares, Facoltà di Medicina, Tehran, Iran (soggiorno di nove mesi);

- Jelena katic, tesista dell'università di Belgrado e vincitrice di una borsa NENS per soggiorni di addestramento (soggiorno di un mese).

3.4. Finanziamenti per la ricerca

Donazione della Prof. Giovanna Bergui per uno studio sugli effetti dell'ipossia perinatale sullo sviluppo della corteccia cerebrale (F Rossi): € 15.000.

Fondazione Piera, Pietro e Giovanni Ferrero, "La stimolazione ambientale come strumento per potenziare le capacità plastiche, riparative e compensatorie del sistema nervoso centrale" (F Rossi) € 5.000.

Progetto Prin 20107MSMA4 "Infanzia, adolescenza e psicopatologia: effetto delle cure materne, psicofarmaci e sostanze d'abuso sullo sviluppo del cervello", approvato con D.M. n.719 del 23 ottobre 2012 (D Carulli con C Eva). € 120.000.

Progetto Università di Torino (ex-60%) "Definizione del ruolo di link protein 1 nei processi di demielinizzazione e rimielinizzazione nella sclerosi multipla" (D Carulli). € 3300.

Progetto Università di Torino (ex-60%) "Terapie preventive di sostituzione cellulare per l'atassia spinocerebellare di tipo 2 (SCA2)" (F. Rossi) € 3550.

Progetto Università di Torino (ex-60%) "Un progenitore comune per astrociti e interneuroni GABAergici nella sostanza bianca del cervelletto postnatale" (K. Leto) € 4150.

Progetto Università di Torino (ex-60%) (A. Buffo) € 3700.

Futuro in Ricerca (FIRB 2010), "Target generation of cerebellar and striatal neurons as preventive strategy for CNS disorders" (K Leto) € 298.000

(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 EUR

ELA Foundation, "Lamin B1 dysregulation in Autosomal Dominant Leukodystrophy (ADLD): cellular and animal models to understand pathogenesis and move towards therapy" (A Buffo) 32970 EUR

Progetto delle attività di ricerca per il 2013 del gruppo **Electrophysiology and Neurodegeneration**, presso l'Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO)

Responsabile del gruppo: **Filippo Tempia**

1. Composizione del gruppo di ricerca (1-11-2012)

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)

Mohcene Sadallah (dottorando)

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

2. Progetti di ricerca (2013)

2.1. Morbo di Alzheimer

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

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

Nel 2012 abbiamo pubblicato che le cellule di Purkinje del cervelletto presentano delle alterazioni funzionali, attribuibili alla diffusione di peptide beta-amiloide extracellulare. Se e quando il progetto sarà finanziato, passeremo allo studio delle alterazioni elettrofisiologiche dei neuroni piramidali e degli interneuroni di corteccia cerebrale. Dati preliminari ottenuti in collaborazione con il prof. Giulio Taglialetela della University of Texas Medical Branch at Galveston (USA) dimostrano che i pazienti con morbo di Alzheimer hanno un'alterata espressione di un tipo di canale del potassio che i nostri risultati avevano dimostrato essere coinvolto nella patologia.

Vari studi recenti indicano un importante ruolo dell'insulina e della patologia diabetica nel morbo di Alzheimer. Nel 2012 abbiamo ottenuto dei risultati molto interessanti sugli effetti di una dieta ricca di grassi sui deficit di memoria e sulle deposizioni di beta-amiloide in cervelli di topi modello del morbo di Alzheimer. In questo modello abbiamo anche somministrato diverse forme di insulina sintetica, che ha modificato la gravità dei sintomi. Data l'importanza di questi primi risultati, nel 2013 approfondiremo questa ricerca per individuare i meccanismi responsabili degli effetti della dieta ricca di grassi.

Un nuovo filone di ricerca è stato iniziato in collaborazione con la prof.ssa Fernanda Laezza della University of Texas Medical Branch at Galveston (USA) sugli effetti del farmaco antidiabetico rosiglitazone sull'eccitabilità e sulle correnti sinaptiche nei granuli del giro dentato dell'ippocampo. I risultati indicano significative alterazioni in topi modello del morbo di Alzheimer, revertite dal trattamento farmacologico.

Un'altra linea di ricerca riguarda il ruolo della protein HSP47 nel morbo di Alzheimer. Uno studio precedente è stato recentemente pubblicato. I nuovi esperimenti consistono nello screening di farmaci che agiscono su HSP47 per attenuare la patologia amiloide in topi modello del morbo di Alzheimer. Questa linea di ricerca è diretta dal Prof. Ferdinando Di Cunto; il nostro laboratorio contribuisce con gli esperimenti sul modello murino.

Collaborazioni:

Prof. Giulio Tagliatela, University of Texas Medical Branch at Galveston (USA); Prof.ssa Fernanda Laezza, University of Texas Medical Branch at Galveston (USA); Prof. Frank M. LaFerla, Dr. Salvatore Oddo, Dept. of Neurobiology and Behavior, Univ. of California, Irvine, USA; Prof. Innocenzo Rainero, Dipartimento di Neuroscienze, Sezione di Neurologia, Università di Torino; Prof. Ferdinando Di Cunto, Dipartimento di Genetica, Biologia e Biochimica, Università di Torino.

2.2. Atassie

La ricerca sulle atassie riguarda i meccanismi di una forma ereditaria di atassia spino-cerebellare denominata SCA28 e di nuovi modelli di atassia. Una recente ricerca, svolta in collaborazione con il Dott. Alfredo Brusco del laboratorio di genetica dell'Università di Torino e con il Dott. Franco Taroni dell'Istituto Neurologico Besta di Milano, ha portato alla scoperta che la SCA28 è causata da mutazioni del gene *AFG3L2* (Di Bella et al., 2010, *Nature Genetics* 42: 313-331). Il nostro laboratorio, in collaborazione con il Dott. Alfredo Brusco, ha inoltre studiato il pattern di espressione del gene *Afg3l2* e dei suoi due paraloghi *Afg3l1* and *Spg7* nell'encefalo di topi normali. I risultati mostrano che *Afg3l2* è espresso a livelli elevati nel cervelletto, ma non in modo selettivo, indicando la necessità di un modello animale dettagliato di SCA28.

Nel 2012, i primi topi knock-in modello di questa atassia (SCA28-KI), generati presso il laboratorio di genetica del Dott. Brusco, sono stati sottoposti ai primi cicli di backcrossing in modo da ottenere un genotipo congenico sul ceppo C57BL6. Per il 2013 abbiamo programmato i primi studi approfonditi di questo modello animale di SCA28. Questi studi comprendono una estesa batteria di test motori, un'analisi istologica e immunoistochimica del cervelletto dei topi SCA28-KI eterozigoti e degli embrioni omozigoti, in quanto questi ultimi hanno una vitalità ridotta. Il nostro laboratorio inoltre fornirà i tessuti per la cultura di mouse embryonic fibroblasts (MEFs). Inoltre svilupperemo dei modelli di degenerazione in vitro con cui saggiare la suscettibilità dei neuroni cerebellari alla eccitotossicità. Infine registreremo con la tecnica del patch-clamp l'attività elettrica dei principali tipi neuronali del cervelletto, allo scopo di rilevare segni precoci di deficit delle funzioni cellulari.

Gli studi sul modello di atassia causata dalla delezione del gene *Ebf2* hanno evidenziato dei deficit funzionali delle cellule di Purkinje presenti nel cervelletto adulto, che sono stati pubblicati nel 2012. Nello stesso anno sono iniziati gli esperimenti sulle sinapsi GABAergiche, che proseguiranno nel 2013. Nel 2013 verranno inoltre estesi gli studi comportamentali sui topi, *Ebf2* per rilevare eventuali deficit della sfera cognitiva o emotiva.

Collaborazioni: Dott. Alfredo Brusco, Dip. di genetica, biologia e biochimica, Università di Torino; Prof. Giacomo Consalez, Università Vita-Salute San Raffaele, Milano.

3. Prodotti delle attività di ricerca anno 2012

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

Boda E*, Hoxha E*, Pini A, Montarolo F, **Tempia F** (2012) Brain expression of Kv3 subunits during development, adulthood, aging and in a murine model of Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 46: 606-615 (doi: 10.1007/s12031-011-9648-6).

Hoxha E, Boda E, Montarolo F, Parolisi R, **Tempia F** (2012) Excitability and synaptic alterations in the cerebellum of APP/PS1 mice. PLoS ONE 7(4): e34726 (13 pages) (doi:10.1371/journal.pone.0034726).

Hoxha E, Tonini R, Montarolo F, Croci L, Consalez GG, **Tempia F** (2012) Motor dysfunction and cerebellar Purkinje cell firing impairment in *Ebf2* null mice. Mol Cell Neurosci (in press) (10.1016/j.mcn.2012.09.002).

Montarolo F, Parolisi R, Hoxha E, Boda E, Tempia F. Early enriched environment exposure protects spatial memory and accelerates amyloid plaque formation in APP^{Swe}/PS1^{L166P} mice. (submitted).

3.2. Finanziamenti per la ricerca

National Ataxia Foundation (USA), call 2011

Pilot study of the first knock-in animal model of SCA28, harboring the M666R mutation

Duration: 1 year (2012)

Telethon Italy Foundation – call 2012

Spinocerebellar ataxia type 28: cellular and animal models to unravel the pathogenesis and to identify potential therapeutic targets

Duration: 3 years (October 2012- September 2015)

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

Responsabile del gruppo: **Alessandro Vercelli**

1. Composizione del gruppo di ricerca (1-11-2012)

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

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

1.2. Personale non strutturato

Michela Guglielmotto (postdoc)
Giusi Manassero (postdoc)
Valeria Valsecchi (postdoc)
Valentina Grande (dottoranda)
Debora Monteleone (dottoranda)
Antonio Piras (dottorando)
Elena De Amicis (borsista)
Ivan Repetto (borsista)
Marta Tropiano (borsista)

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

2. Progetti di ricerca (2013)

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.

2.1. Organizzazione modulare e sviluppo della corteccia cerebrale

Intendiamo studiare i moduli strutturali e funzionali della corteccia cerebrale e i loro circuiti, come substrato delle attività cerebrali ed entità che vengono alterate in diverse patologie congenite e degenerative. La ricerca dei blocchi elementari di costruzione della corteccia cerebrale ha evidenziato tre strutture perpendicolari alla superficie corticale: a) colonne di neuroni con risposte elettrofisiologiche costanti in senso radiale; b) minicolonne di corpi cellulari allineati tra loro; c) fasci di dendriti apicali dei neuroni piramidali che hanno i corpi cellulari in diverse lamine. I fasci dendritici consistono di neuroni che proiettano con i loro assoni a bersagli specifici (cioè a specifiche aree del sistema nervoso). Pertanto analizzeremo la distribuzione dei neuroni piramidali che proiettano a bersagli diversi (corpo calloso, corteccia cerebrale, collicolo superiore, midollo spinale) mediante marcatori immunoistochimici specifici,

l'organizzazione tridimensionale dei loro dendriti apicali e la relazione tra gli assoni che entrano nella corteccia cerebrale e i moduli corticali, nonché il rapporto degli interneuroni inibitori con i fasci di dendriti apicali.

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

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

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

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

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

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

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

2.4. Malattie del motoneurone (SLA e SMA)

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

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

Più recentemente abbiamo intrapreso una collaborazione con una biotec svizzera (la Neurotune) per valutare l'utilità terapeutica nella SMA di molecole che agiscono sulla placca neuromuscolare.

Infine valuteremo 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.

Collaborazioni: L. Mazzini (Clinica Neurologica, Novara), F. Fagioli (Osp. Regina Margherita, Torino), G. Camussi (MBC, Torino), Giorgio Battaglia (Besta, Milano), Elia Di Schiavi (IGB, CNR, Napoli), GL. Ferri (Università di Cagliari), R. Fariello (Neurotune, Lugano).

2.5. Trapianto di progenitori striatali in un modello sperimentale di malattia di Huntington

Lo striato fa parte dei circuiti neurali che svolgono un ruolo fondamentale nel comportamento motorio e nei meccanismi di ricompensa. Nel caso di malattia di Huntington l'organizzazione anatomica è completamente distrutta, poiché i neuroni di proiezione degenerano massicciamente, determinando la morte neuronale secondaria nella sostanza nera, con cui lo striato è fortemente interconnesso.

Lo scopo del progetto è quello di studiare il potenziale espresso dai progenitori striatali ventrali umani derivati da cellule staminali embrionali, nel rimpiazzare i neuroni di proiezione perduti in un modello sperimentale di ratto affetto da malattia di Huntington.

Studieremo la loro integrazione nei circuiti neurali dell'ospite, utilizzando l'analisi geometrica di distribuzione e tecniche di tracing neuronale; parteciperemo ad esperimenti di elettrofisiologia; valuteremo la capacità delle cellule di supportare la sopravvivenza neuronale e 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).

2.6. 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: L. Giliberto (The Litwin-Zucker Research Center for the Study of Alzheimer's Disease, The Feinstein Institute for Medical Research, North Shore, NY, USA)

2.7. Studio dei differenti meccanismi di tossicità mediati dall'A β 1-42 in forma monomerica od oligomerica

L'accumulo di β amiloide (A β) rappresenta il cruciale evento patogenetico responsabile della disfunzione sinaptica e della morte neuronale tipiche della malattia.

L'A β si forma attraverso due tagli endoproteolitici successivi operati dalla β -secretasi (BACE1) e dalla γ -secretasi sulla proteina precursore della β amiloide (A β PP).

Sebbene ormai tutti concordino sul ruolo cruciale esercitato dall'A β nella patogenesi della malattia rimane controverso stabilire se siano più dannose, nelle fasi precoci, le forme fibrillari rispetto a quelle non fibrillari, e fra queste ultime le forme monomeriche rispetto alle oligomeriche.

Con questo progetto ci prefiggiamo quindi di confermare la maggiore tossicità operata dagli oligomeri rispetto alle forme monomeriche e di capire attraverso quali meccanismi questo avvenga.

I meccanismi molecolari associati all'induzione di morte cellulare indotti dalla A β rimangono in gran parte sconosciuti e risulta quindi di primaria importanza caratterizzarli al fine di chiarire alcuni punti ancora oscuri della patogenesi della malattia, primo fra tutti la scarsa correlazione fra entità di placche senili (costituite quindi da A β completamente fibrillare) ed i sintomi conclamati della malattia.

Collaborazioni: M. Tabaton (Università di Genova)

2.8. 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. 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) e G. Cavaletti (Università Milano Bicocca).

3. Prodotti delle attività di ricerca nel periodo gennaio-novembre 2012

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

Gunetti M, Tomasi S, Giammò A, Boido M, Rustichelli D, Mareschi K, Errichiello E, Parola M, Ferrero I, Fagioli F, Vercelli A, Carone R. (2012) Myogenic potential of whole bone marrow mesenchymal stem cells in vitro and in vivo for usage in urinary incontinence. *PLoS One*. 7(9):e45538.

Boido M, Garbossa D, Fontanella M, Ducati A, Vercelli A. (2012) Mesenchymal stem cell transplantation reduces glial cyst and improves functional outcome following spinal cord compression. *World Neurosurg*. 2012 pii: S1878-8750(12)00908-4. doi: 10.1016/j.wneu.2012.08.014.

Queiroga CS, Tomasi S, Widerøe M, Alves PM, Vercelli A, Vieira HL. (2012) Preconditioning Triggered by Carbon Monoxide (CO) Provides Neuronal Protection Following Perinatal Hypoxia-Ischemia. *PLoS One*. 7(8):e42632.

Cauda F, Vercelli A. (2012) How many clusters in the insular cortex? *Cereb Cortex*. 2012 Sep 30. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22892421.

Guglielmotto M, Monteleone D, Boido M, Piras A, Giliberto L, Borghi R, Vercelli A, Fornaro M, Tabaton M, Tamagno E. (2012) A β 1-42-mediated down-regulation of Uch-L1 is dependent on NF- κ B activation and impaired BACE1 lysosomal degradation. *Aging Cell*. 11:834-844.

Manassero G, Repetto IE, Cobianchi S, Valsecchi V, Bonny C, Rossi F, Vercelli A. (2012) Role of JNK isoforms in the development of neuropathic pain following sciatic nerve transection in the mouse. *Mol Pain*. 2012 8:39. PubMed PMID: 22616849; PubMed Central PMCID: PMC3436729.

Cauda F, Costa T, Torta DM, Sacco K, D'Agata F, Duca S, Geminiani G, Fox PT, Vercelli A. (2012) Meta-analytic clustering of the insular cortex: characterizing the meta-analytic connectivity of the insula when involved in active tasks. *Neuroimage*. 62:343-55.

Garbossa D, Boido M, Fontanella M, Fronda C, Ducati A, Vercelli A. (2012) Recent therapeutic strategies for spinal cord injury treatment: possible role of stem cells. *Neurosurg Rev*. 35:293-311.

Cauda F, Torta DM, Sacco K, D'Agata F, Geda E, Duca S, Geminiani G, Vercelli A. (2012) Functional anatomy of cortical areas characterized by Von Economo neurons. *Brain Struct Funct*. Jan 29. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22286950.

Zhao Y, Spigolon G, Bonny C, Culman J, Vercelli A, Herdegen T. (2012) The JNK inhibitor D-JNKI-1 blocks apoptotic JNK signaling in brain mitochondria. *Mol Cell Neurosci*. 49:300-10.

Boido M., Buschini E., Piras A., Spigolon G., Valsecchi V., Mazzini L., Vercelli A. 2012 "Advantages and pitfalls in experimental models of ALS", capitolo del libro InTech "Amyotrophic Lateral Sclerosis", edito da Martin H. Maurer, ISBN 978-953-307-806-9.

In press

Mazzini L., Vercelli A., Ferrero I., Boido M., Cantello R., Fagioli F. "Transplantation of mesenchymal stem cells in ALS", capitolo del libro "Functional Neural Transplantation III. Primary and Stem Cell Transplantation for Brain Repair, in Progress in Brain Research

Vercelli A., Boido M., Jhaveri S. NADPH diaphorase expression in superior colliculus of developing, aging and visually deafferented rats. *Italian Journal of Anatomy and Embryology*.

Tamagno E, Guglielmotto M, Monteleone D, Vercelli A, Tabaton M. Transcriptional and post-transcriptional regulation of BACE1. in press *IUBMB life*

3.2. Seminari e conferenze con affiliazione al NICO

A Vercelli, L'ambiente Interagisce con i geni e li modifica permanentemente nello sviluppo del cervello, *Infinitamente*, Verona, marzo 2012

A. Vercelli, Trapianti di cellule staminali in modelli murini di traumi del midollo spinale, riunione FAIP presso Ministero Salute, Roma, aprile 2012

M. Boido e A Vercelli, Il movimento e l'atrofia muscolare spinale, *Soroptimist Biella* 17 aprile 2012

A Vercelli, Ruolo di JNK nella morte neuronale da eccitotossicità e sua inibizione: cittadini pacifici diventano killer, Università Cattolica, Roma, 17 maggio 2012

A. Vercelli: Of mice and man: MSC in ALS. Lost in translation? Università di Cagliari, 22 giugno 2012

3.3. Altri prodotti riconducibili alle attività Istituzionali del NICO

3.4. Finanziamenti per la ricerca

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

Progetto Cassa di Risparmio di Cuneo – 2012-2013. Il dolore neuropatico postoperatorio: studio sperimentale e clinico.