



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

**Progetto delle attività di ricerca per l'anno 2014**

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

## Progetto delle attività di ricerca per l'anno 2014

<i>Gruppo</i>	<i>Responsabile</i>	<i>Pagina</i>
Clinical Neurobiology	Antonio Bertolotto	3
Adult Neurogenesis	Luca Bonfanti, Paolo Peretto	12
Neuropeptides, Emotional and Feeding Behaviour	Carola Eva	21
Plasticity and Regeneration of the PNS	Stefano Geuna	26
Neuroendocrinologia	Giancarlo Panzica	31
Developmental Neurobiology and Regeneration	Ferdinando Rossi	35
Electrophysiology and Neurodegeneration	Filippo Tempia	45
Brain Development and Disease	Alessandro Vercelli	49

Torino, 22 novembre 2013



Ferdinando Rossi  
Direttore Scientifico  
Istituto di Neuroscienze  
Fondazione Cavalieri-Ottolenghi

Progetto delle attività di ricerca per il 2014 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 (1-11-2013)**

### **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 (Specialista in Biochimica Clinica)

Marzia Caldano (Specialista in Biochimica Clinica)

Paola Valentino (Specialista in Biochimica Clinica)

Francesca Montarolo (Postdoc)

Letizia Granieri (Specialista in Patologia Clinica)

Nicole D Navone (Specializzanda in Biochimica Clinica)

Serena Martire (borsista)

Michela Spadaro (Postdoc)

Claudia Carcione (Tecnico di laboratorio)

Federica Brescia (Tecnico di laboratorio)

Daniela Gramolelli (Tecnico)

## **2. Progetti di ricerca**

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

Il secondo filone è diretto allo studio della patogenesi della SM, con lo scopo di individuare nuovi possibili bersagli terapeutici. L'aspetto patogenetico è indagato seguendo una linea originale ed innovativa: partendo dal dato ben noto che la gravidanza svolge un ruolo protettivo, è stato condotto un primo studio sull'espressione genica prima, durante e dopo la gravidanza nella SM e in controlli normali. Questo studio ha permesso di identificare alcuni geni che sono espressi in modo anomalo nei linfomonociti di pazienti con SM, ma che sono corretti nella loro espressione durante la gravidanza. 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). Per quanto riguarda la SM, nel 2013 è nato un progetto volto a studiare la presenza ed il ruolo degli anticorpi anti-KIR4.1 nel siero dei pazienti.

E' stata istituita infine, una Banca Biologica per i pazienti con SM che conserva il materiale biologico (CSF, cellule mononucleate del sangue periferico, sangue intero, plasma, siero, RNA e DNA) e le informazioni cliniche di varie tipologie di pazienti SM.

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

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

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

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

Nel corso del 2013 verrà portato a termine uno studio per valutare il rischio di comparsa dei NABs anti-IFN $\beta$  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 $\beta$  valutando l'espressione genica di una serie (fino a 14) geni che hanno una delle seguenti caratteristiche i) essere selettivamente indotti dall'IFN $\beta$  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 $\beta$ ). 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 $\beta$ , 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 rationale dello studio si basa ri-somministrazione di Rituximab al ricomparire dei linfociti B CD19+ nel sangue. Attualmente ogni mese i pazienti in trattamento eseguono un dosaggio con FACS dei CD19 e il Rituximab viene ri-somministrato quando i CD19 sono nuovamente presenti, tuttavia questa procedura non è sufficientemente sensibile perchè una quota di pazienti sviluppa attacchi immediatamente prima o in concomitanza con la ricomparsa dei CD19. Nel progetto si vuole valutare se dosare il CD19 nel sangue con metodica PCR sia più sensibile del FACS: è in via di sottomissione un lavoro scientifico che riporta i dati preliminari di questo studio, che indicano che la PCR è più sensibile del FACS nel quantificare i linfociti B CD19+.

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

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

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

Le cellule del sistema immunitario di 56 persone (tra pazienti e donatori sani) saranno analizzate al citofluorimetro per la presenza di marcatori di superficie che individuano specifiche popolazioni cellulari. Questo progetto ha il fine ultimo di confrontare i benefici dati dalla gravidanza e dalla somministrazione del farmaco nei pazienti affetti da SM per cercare di approfondire la conoscenza della malattia.

## **2.3. Approccio alla patogenesi della SM**

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

Molteplici sono i meccanismi coinvolti nell'inibizione dell'inflammatione, compresa l'attivazione di specifici circuiti a retroazione negativa, ovvero i cosiddetti "negative feedback loops". Negli ultimi anni sono stati identificati diversi circuiti a retroazione negativa, il cui ruolo è quello di attenuare la risposta mediata da induttori o amplificatori dell'inflammatione. Tali circuiti includono la sintesi di proteine che inibiscono le vie di trasduzione (ad esempio le proteine SOCS), la sintesi di repressori e transrepressori trasduzionali (ad esempio Nurr1 e TNFAIP3) e la produzione di mediatori solubili o di superficie ad attività anti-infiammatoria (ad esempio IL-10 e TGFbeta). A questo proposito, degna di nota è la nostra recente osservazione di un coinvolgimento dei transrepressori trasduzionali Nurr1, TNFAIP3 e SOCS2 nella SM, malattia infiammatoria, autoimmune e demielinizzante del SNC. Si ritiene che l'inflammatione costituisca un aspetto chiave nella patofisiologia di questa condizione debilitante e degenerativa. Nel complesso, il processo infiammatorio caratteristico della SM sembrerebbe essere causato da una iper-attivazione di linfociti pro-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 linfoidi emieloidi. Poiché le cellule mieloidi (ovvero monociti, macrofagi e microglia) svolgono un ruolo essenziale sia nell'inflammatione cerebrale sia nella regolazione dei circuiti a retroazione negativa dell'inflammatione stessa, riteniamo possa essere importante approfondire il ruolo dei due trascritti nella SM. L'attuale linea di ricerca si propone quindi di esaminare come un'alterata espressione di Nurr1, TNFAIP3 e SOCS2 favorisca il processo patogenetico della SM e come influenzi la neurodegenerazione nella malattia.

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

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

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 saggi cellulari. Per l'analisi epigenetica, stiamo valutando il significato dell'espressione di microRNAs (miRNAs), correlata alla deregolata espressione di Nurr1, TNFAIP3 e SOCS2 osservata nei pazienti con SM.

Come quinto punto si utilizzeranno modelli murini nel modello murino di SM (modello EAE; encefalomielite autoimmune 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 cellula specifici. Il modello di EAE scelto potrebbe permettere la valutazione del coinvolgimento di questi geni sia negli stadi di infiammazione acuta che in quelli di infiammazione cronica sia a livello neuronale che immunologico.

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

Sempre nell'ambito della patogenesi della SM, il nostro gruppo partecipa ad uno studio multicentrico finanziato dalla FISM intitolato: "Analisi dell'infezione con virus di Epstein-Barr e della risposta immunitaria nel fluido cerebrospinale e nel sangue di pazienti con sclerosi multipla mediante tecniche altamente sensibili di PCR." La SM è una malattia complessa causata dall'interazione tra molteplici fattori genetici e ambientali. Tra questi ultimi, il virus di Epstein-Barr, un virus erpetico molto diffuso nella popolazione, viene oggi identificato come l'agente infettivo che mostra l'associazione più convincente con la malattia sulla base di dati epidemiologici e sierologici. Sebbene i meccanismi che potrebbero collegare l'infezione con il virus di Epstein-Barr al processo infiammatorio cerebrale della SM siano ancora sconosciuti, una ipotesi da verificare è se la presenza di questo virus nel SNC rappresenti il principale stimolo attivante della risposta immunitaria che causa la SM. Per comprendere meglio in che modo l'infezione con il virus di Epstein-Barr contribuisca alla SM è necessario caratterizzare lo stato dell'infezione virale nel liquor e nel sangue periferico dei pazienti con SM, capire se esistono differenze nei due distretti, e verificare l'esistenza di possibili correlazioni tra marcatori dell'infezione virale, della risposta immunitaria e dell'attività di malattia. In questo progetto, campioni di liquor e sangue periferico da pazienti con SM verranno analizzati utilizzando tecniche di biologia molecolare altamente specifiche e sensibili che permettono di studiare contemporaneamente numerosi marcatori associati all'infezione e alla risposta immunitaria.

Nel 2013 è stato presentato alla FISM un progetto di ricerca intitolato "Anticorpi anti-KIR4.1 nella Sclerosi Multipla: specificità, affinità, metodi di quantificazione, correlazione con l'andamento clinico e produzione di anticorpi umani ricombinanti." Sebbene sia ormai chiaro che la patogenesi della SM sia di tipo autoimmune, il target contro cui si scatena questa risposta immunitaria è ad oggi ancora ignoto, e l'identificazione dei possibili antigeni contro cui sono rivolti gli autoanticorpi prodotti dai pazienti con SM è da tempo uno dei principali obiettivi della ricerca scientifica. Nel Giugno 2012 su New England J Medicine è stato pubblicato uno studio nel quale si dimostra che circa il 50% dei pazienti con SM è positivo per anticorpi diretti contro il canale del potassio KIR4.1. Questo dato da una parte confermerebbe il ruolo degli autoanticorpi nella patogenesi della malattia, dall'altra potrebbe influenzare in modo significativo la cura dei pazienti, dalla diagnosi della malattia al valore prognostico, alla risposta ai trattamenti. Dato il notevole

impatto che questa scoperta potrebbe avere per i pazienti, è necessario che questi dati vengano al più presto confermati e validati.

L'obiettivo di questo progetto è la verifica della presenza degli anticorpi anti-KIR4.1 nel siero di pazienti con SM e CIS, di pazienti con altre patologie neurologiche e di individui sani. Se la presenza degli anticorpi verrà confermata, il progetto si propone di isolare dal sangue di pazienti positivi i cloni di cellule B che producono gli anticorpi anti KIR4.1, per poi produrre gli anticorpi umani ricombinanti anti-KIR4.1. Ulteriori obiettivi del progetto riguardano la messa a punto di un saggio ELISA quantitativo che consenta di identificare gli anticorpi anti-KIR4.1 ad alta affinità, al fine di distinguere meglio i sottogruppi di pazienti positivi e negativi. A questo punto, dopo un confronto fra 5 diverse metodiche per il dosaggio degli anticorpi anti-KIR4.1, la metodica considerata migliore per la loro quantificazione verrà validata seguendo la procedura indicata dall'FDA. La presenza degli anticorpi anti-KIR4.1 verrà correlata con le caratteristiche cliniche dei pazienti (CIS, diverse forme di SM, aggressività della malattia, risposta ai trattamenti). Infine, verrà effettuato uno studio longitudinale con un follow up di 5 anni su alcuni pazienti per identificare i fattori che potrebbero modulare o mascherare la presenza di questi anticorpi nel tempo.

I risultati ottenuti da questo progetto forniranno informazioni sulla presenza e sul ruolo degli anticorpi anti-KIR4.1 nella diagnosi e nella stratificazione dei pazienti con SM. L'approccio sperimentale molto rigoroso adottato da questo progetto darà una forte evidenza riguardo alla presenza o assenza di questi anticorpi e alla loro affinità, portando alla validazione della migliore metodica di quantificazione. Infine, la produzione di anticorpi umani ricombinanti anti-KIR4.1 rappresenta un importante strumento per futuri studi funzionali sia in vitro sia in vivo.

*Collaborazioni:* Raffaele Calogero (MBC, Torino), Roberto Furlan (DIBIT, Milano), Orla Connelly (Baylor College, Houston, TX), Paola Berchiolla (Università di Torino), Alessandra Oberto (NICO, Torino), Francesca Aloisi (Istituto Superiore di Sanità, Roma), Annalisa Buffo ed Enrica Boda (NICO), Gert Jan Wolbink (Jan van Breemen Research Institute, Reade, Amsterdam, The Netherlands) e Theo Rispens (Department of Immunopathology, Sanquin Research, The Netherlands).

#### ***2.4. Identificazione di biomarcatori per l'identificazione precoce del decorso clinico dei pazienti con sclerosi multipla***

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

*Collaborazioni:* Alessandra Albo (Able, Bioindustry Park Silvano Fumero, SpA, Colletterto Giacosa, TO)

#### ***2.5. Messa a punto di nuove tecniche diagnostiche***

Dal momento che il termine medico "Sclerosi Multipla" comprende diversi sottotipi o varianti cliniche della malattia, ai fini terapeutici sono anche utili nuove tecniche che consentano di discriminare correttamente le varie tipologie di pazienti. Con questa finalità, le attività di ricerca si sono focalizzate sui pazienti affetti da malattia di Devic o neuromielite ottica (NMO), una rara malattia neuro-oftalmologica. Fino a poco

tempo fa la NMO era considerata una grave forma di SM, ma recenti osservazioni hanno dimostrato che si tratta di una malattia distinta. Poiché SM e NMO prevedono trattamenti differenti è estremamente importante identificare nuovi test biologici in grado di differenziare le due malattie nelle loro fasi iniziali. A differenza della SM, nella NMO l'obiettivo della risposta autoimmune è stato identificato: in numerosi pazienti affetti da NMO è stato infatti riscontrato un elevato livello di anticorpi anti-aquaporina 4 (AQP4), un componente del piede del processo astrocitico nella barriera emato-encefalica. Alla luce di ciò, si è validato un test di immunofluorescenza su tessuto del SNC e su cellule transfettate e nel corso del 2013-2014 si verificherà quanto questo test sia in grado di identificare condizioni cliniche che precedono la diagnosi clinica di Malattia di Devic, condizioni denominate NMO-Spectrum Disorders.

Nel 2014 inizierà un progetto atto a chiarire la correlazione tra il livello degli anticorpi anti-AQP4 e i seguenti parametri: stadio della malattia, aggressività, trattamento con Rituximab (RTX) e il livello dei CD19. Titoleremo gli anticorpi anti-AQP4 utilizzando il kit commerciale che utilizziamo nell'attività di diagnostica e che abbiamo validato in un precedente lavoro (PlosOne 2012). Il nostro scopo è di valutare se esista una correlazione tra lo stadio di malattia e il titolo degli anticorpi per poter adattare la terapia durante il follow-up. Sarà interessante osservare l'eventuale correlazione tra il titolo anticorpale e la percentuale dei CD19 per valutare se i livelli di anti AQP4 potranno essere utilizzati come nuovo marker per monitorare la terapia con RTX.

*Collaborazioni:* 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).

## **2.6. La Banca Biologica**

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

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 2013**

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

Quest'anno in corso di pubblicazione:

Giuliano Albo A., Perga S., Lis K., Minari N., Falvo S., Marnetto F, Caldano M., Reviglione F.R., Berchiolla P., Capobianco M., Malentacchi M., Corpillo D., Bertolotto A. Vitamin D binding protein isoforms and Apolipoprotein E in cerebro spinal fluid as early prognostic disease progression biomarkers in multiple sclerosis. Neurology (submitted)

Marnetto F., Granieri L., Valentino P, Capobianco M, Pautasso M, Bertolotto A: CD19 mRNA quantification improves treatment-to-target approach of Rituximab: a proof of concept study. Clinical Immunology (submitted)



Comi G, Battaglia M, Bertolotto A, Sette MD, Ghezzi A, Malferrari G, Salvetti M, Sormani M, Tesio L, Stolz E, Zaratin P, Mancardi G; CoSMo Collaborative Study Group. Observational case-control study of the prevalence of chronic cerebrospinal venous insufficiency in multiple sclerosis: results from the CoSMo study. *Mult Scler*. 2013 Oct;19(11):1508-17. doi: 10.1177/1352458513501231

Hegen H, Millionig A, Bertolotto A, Comabella M, Giovanonni G, Guger M, Hoelzl M, Khalil M, Killestein J, Lindberg R, Malucchi S, Mehling M, Montalban X, Polman C, Rudzki D, Schautzer F, Sellebjerg F, Sørensen P, Deisenhammer F. Early detection of neutralizing antibodies to interferon-beta in multiple sclerosis patients: binding antibodies predict neutralizing antibody development. *Mult Scler*. 2013 Sep 5

Borghi M, Cavallo M, Carletto S, Ostacoli L, Zuffranieri M, Picci RL, Scavelli F, Johnston H, Furlan PM, Bertolotto A, Malucchi S. Presence and significant determinants of cognitive impairment in a large sample of patients with multiple sclerosis. *PLoS One*. 2013 Jul 29;8(7):e69820. doi: 10.1371/journal.pone.0069820

Di Sapio A, Bertolotto A, Melillo F, Sperli F, Malucchi S, Troni W. A new neurophysiological approach to assess central motor conduction damage to proximal and distal muscles of lower limbs. *Clin Neurophysiol*. 2013 Jul 15. doi:pii: S1388-2457(13)00737-2. 10.1016/j.clinph.2013.06.018

Teunissen C, Menge T, Altintas A, Alvarez-Cermeño JC, Bertolotto A, Berven FS, Brundin L, Comabella M, Degen M, Deisenhammer F, Fazekas F, Franciotta D, Frederiksen JL, Galimberti D, Gnanapavan S, Hegen H, Hemmer B, Hintzen R, Hughes S, Jacobaeus E, Kroksveen AC, Kuhle J, Richert J, Tumani H, Villar LM, Drulovic J, Dujmovic I, Khalil M, Bartos A. Consensus definitions and application guidelines for control groups in cerebrospinal fluid biomarker studies in multiple sclerosis. *Mult Scler J* 2013 May 21. [Epub ahead of print]

Comi G, Battaglia MA, Bertolotto A, Del Sette M, Ghezzi A, Malferrari G, Salvetti M, Sormani MP, Tesio L, Stolz E, Mancardi G. Italian multicentre observational study of the prevalence of CCSVI in multiple sclerosis (CoSMo study): rationale, design, and methodology. *Neurol Sci*. 2013 Aug;34(8):1297-307. doi: 10.1007/s10072-012-1269-5

Ostacoli L, Carletto S, Borghi M, Cavallo M, Rocci E, Zuffranieri M, Malucchi S, Bertolotto A, Zennaro A, Furlan PM, Picci RL. Prevalence and significant determinants of post-traumatic stress disorder in a large sample of patients with multiple sclerosis. *J Clin Psychol Med Settings*. 2013 Jun;20(2):240-6. doi: 10.1007/s10880-012-9323-2

Ghezzi A, Annovazzi P, Cocco E, Coarelli G, Lugaresi A, Rovaris M, Patti F, Capello E, Rodegher ME, Moiola L, Malucchi S, Salemi G, De Rossi N, Provinciali L, Perini P, Bergamaschi R, Scarpini E, Lus G, Gallo A, Tola MR, Amato MP, Rottoli MR, Bianchi A, Comi G; MS Study Group-Italian Society of Neurology. Endovascular treatment of CCSVI in patients with multiple sclerosis: clinical outcome of 462 cases. *Neurol Sci*. 2013 Sep;34(9):1633-7. doi: 10.1007/s10072-013-1300-5

Annovazzi P, Tomassini V, Bodini B, Boffa L, Calabrese M, Cocco E, Cordioli C, De Luca G, Frisullo G, Gallo A, Malucchi S, Paolicelli D, Pesci I, Radaelli M, Ragonese P, Roccatagliata L, Tortorella C, Vercellino M, Zipoli V, Gasperini C, Rodegher M, Solaro C. A cross-sectional, multicentre study of the therapeutic management of multiple sclerosis relapses in Italy. *Neurol Sci*. 2013 Feb;34(2):197-203. doi: 10.1007/s10072-012-0981-5

### **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), 3-5 Giugno 2013 (3 partecipanti).

Corso Biogen Idec “La gestione quotidiana del paziente con Sclerosi Multipla”, Orbassano (TO), 11-13 Novembre 2013 (4 partecipanti).

Workshop “Using new technologies to study the genetics disease” 14 Giugno 2013, 50 partecipanti.

Nel 2013 Responsabilità scientifica de:

- Convegno “I percorsi diagnostico-terapeutici assistenziali nella gestione del paziente con SM nella Regione Piemonte” a cui è stata assegnata la Medaglia del Presidente della Repubblica (75 partecipanti)
- “Sclerosi Multipla: linee guida, aspetti organizzativi, legali e gestionali” 1 febbraio 2013 (55 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.

#### **4. Finanziamenti per la ricerca**

Contratto di ricerca con:

Novartis *Clinical effect of a Nurr1 agonist on EAE; 2012-2013, importo complessivo 50.000 €*

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

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

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

FISM; Code 2013/S/4; *Biomarcatori di diagnosi e prognosi nella Sclerosi Multipla: possibile ruolo delle isoforme della Vitamina D Binding Protein;* 01/11/2013 - 31/10/14. Finanziamento erogato: € 80.000

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

FISM; Code 2010/R/28; *Analysis of single-nucleotide polymorphisms in TNFAIP3 associated with multiple sclerosis;* 01/07/11 - 30/04/13. Finanziamento erogato: € 40.000

FISM; Code cod. 2011/R/2; *Analysis of Epstein-Barr virus infection and immune response in the cerebrospinal fluid and blood of patients with multiple sclerosis using highly sensitive PCR techniques* 01/04/2012 – 31/12/2013. Finanziamento erogato: € 16.000

Progetto delle attività di ricerca per il 2014 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 (1-11-2013)**

### **1.1. Personale strutturato dell'Università di Torino**

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

### **1.2. Personale non strutturato**

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

Partecipano alle attività del gruppo alcuni studenti tesisti del Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, e della Scuola Universitaria Interfacoltà per le Biotecnologie.

Responsabili del gruppo: L. Bonfanti, P. Peretto

## **2. Progetti di ricerca**

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.

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 dati fino ad ora ottenuti 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. Inoltre, tramite l'utilizzo di alcuni modelli transgenici (es. GLAST::CreERT2::YFP, Nestin::CreERT2::YFP) e di marcatori specifici associati ai progenitori delle regioni neurogeniche adulte (es. Nestin, GLAST, Tlx, SOX2, SOX9, BLBP, Mash1, Pax6) stiamo caratterizzando il profilo di espressione dei progenitori striatali. 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 (incluso 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*). Nel complesso i nostri 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. E' interessante notare che similmente ai neuroni generati in seguito a lesioni dello striato, queste cellule tendono ad inserirsi nei fasci di sostanza bianca della capsula interna. Per valutare se i neuroni neogenerati in questa regione sono implicati in un rimodellamento dei fasci della capsula interna analizzeremo la loro organizzazione a diverse età post-natali sia in animali normali, sia in animali in cui la neurogenesi sarà eliminata tramite trattamento con antimetaboliti. In parallelo, effettueremo analisi di microscopia elettronica per definire i rapporti che intercorrono tra i processi delle cellule neogenerate e le fibre nervose mielinizzate della capsula interna.

## **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 strato dei neuroni di Purkinje di conigli peripuberali e adulti, coinvolgendo cellule con sede/morfologia della glia di Bergmann-esplicitamente marcatori di proliferazione e la brain lipid binding protein (BLBP), suggerendo così che una popolazione di cellule derivanti dalla glia radiale si possa ancora dividere nel cervelletto maturo del coniglio.

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

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

Infine, il potenziale neurogenico dei progenitori parenchimali locali osservati nelle suddette condizioni sarà analizzato in vitro, utilizzando approcci ex vivo (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. 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) 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 espunti, 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).

2) 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 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 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)

### **2.5. Studio comparativo delle zone neurogeniche del delfino (*Tursiops Truncatus*)**

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, nonchè 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)

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.

## **2.6. Studio di progenitori neurali e neuroni immaturi nel sistema nervoso della pecora**

I neuroni persi in seguito a traumi/malattie neurodegenerative non sono sostituibili. Tuttavia, alcuni neuroni sono prodotti ex novo in due regioni dell'encefalo dei mammiferi (aree neurogeniche; fenomeno della neurogenesi adulta). Il mio gruppo da lungo tempo si dedica allo studio della neurogenesi adulta e della plasticità strutturale in diverse specie animali. Recentemente, abbiamo identificato fenomeni di neurogenesi anche nel parenchima cerebrale (si vedano ad esempio i lavori Ponti et al. 2006 Dev Biol, e Ponti et al. 2008 PLoS ONE, per quel che riguarda la genesi di glia e neuroni nel cervelletto del coniglio), che appaiono diversi da quanto osservato nel topo. Un altro aspetto di plasticità strutturale è rappresentato dai cosiddetti 'neuroni immaturi', che esprimono la proteina citoscheletrica Doublecortin (DCX) pur non essendo neogenerati (si veda Bonfanti e Nacher 2012 Prog Neurobiol). Tutte queste cellule potrebbero costituire fonti alternative di plasticità/riparazione, indipendenti dalle zone neurogeniche, per future prospettive terapeutiche. Tuttavia, l'eterogeneità che questi fenomeni assumono nei diversi mammiferi rende difficile prevedere cosa accade nell'uomo.

In questo progetto ci si propone di investigare la plasticità strutturale e/o la neurogenesi parenchimale nell'encefalo della pecora (mammifero con encefalo di grandi dimensioni, girencefalo, e con aspettativa di



vita lunga). Gli obiettivi principali del progetto sono: i) studiare le modificazioni postnatali dell'SVZ della pecora postnatale e adulta; ii) capire se progenitori locali in grado di generare glia/neuroni, e/o neuroni immaturi sono presenti nell'encefalo della pecora postnatale e adulta. L'obiettivo finale è quello di usare la pecora come modello animale caratterizzato da encefalo di grandi dimensioni e girencefalo per capire meglio la logica seguita da diversi tipi di plasticità strutturale nei mammiferi, in una prospettiva riparativa del sistema nervoso degli animali e dell'uomo.

Il progetto si articolerà nelle seguenti fasi:

i) Studio dell'organizzazione della zona sottoventricolare (SVZ) e delle sue eventuali modificazioni postnatali (a 1 giorno postnatale, 6 mesi e 3 anni). Verranno studiati i rapporti neuro-gliali, l'organizzazione dei neuroblasti e degli astrociti nelle diverse fasi di assemblaggio postnatale (si veda per una comparazione: Peretto et al., 2005, *J Comp Neurol*).

ii) Analisi della distribuzione di DCX in diverse aree prosencefaliche (striato, capsula esterna ed interna, corpo calloso, corteccia cerebrale); analisi delle diverse sottopopolazioni di cellule presenti nelle diverse aree cerebrali (neuroblasti isolati, neuroblasti aggregati, neuroni immaturi); analisi della proliferazione cellulare con marker endogeni di divisione cellulare (Ki67). Allestimento di colture primarie ed espianti dal tessuto cerebrale prosencefalico al fine di verificare la presenza di progenitori neurali.

iii) Studio dei rapporti tra SVZ e cellule DCX+ parenchimali.

#### *Materiali e metodi*

I) Analisi in vivo in microscopia confocale ed elettronica dell'attività neurogenica in varie regioni cerebrali di pecora postnatale e adulta (cervelli ottenuti perforando la testa di animali macellati in collaborazione con il gruppo di neurologia dell'Ist. Zooprofilattico del Piemonte – Unità Dr. Corona). Verranno analizzati 2 esemplari delle seguenti età: 1 giorno (neonatale), 6 mesi (peripuberale), 3 anni (adulto).

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 (DCX, GFAP, Vim, Map5+; Gpr17, Ki67) e della matrice extracellulare (tenascina-C, tenascina-R, ed altri marcatori da determinare; si veda Peretto et al., 2005 *J Comp Neurol*). Gli esperimenti saranno eseguiti prevalentemente nel prosencefalo e in altre aree cerebrali qualora venissero riscontrati fenomeni neurogenici. La proliferazione cellulare locale verrà rivelata con Ki67 in associazione con marcatori di precursori neuronali (BLBP). Le ricostruzioni di aggregati cellulari e dei sistemi DCX+ verranno effettuati con l'impiego del software NeuroLucida (MicroBrightField, Colchester, VT).

*Risultati attesi.* Ci si attende una caratterizzazione in vivo della genesi di glia e/o neuroni da progenitori neurali parenchimali in un mammifero non ancora studiato da questo punto di vista, dotato di un encefalo di maggiori dimensioni e girencefalo rispetto ai roditori, ed appartenente ad una specie più longeva (bypassando il problema che nel caso della plasticità strutturale, estremamente eterogenea nei mammiferi, i roditori da laboratorio costituiscono un modello piuttosto lontano dall'uomo). Risultato finale atteso: maggiore comprensione dei fenomeni neurogenici dei mammiferi, il che può costituire una base per configurare approcci terapeutici alternativi a quelli attuali, mediante attivazione endogena di progenitori sparsi nel parenchima cerebrale e/o di neuroni immaturi.

### **3. Prodotti delle attività di ricerca anno 2013**

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

Kreiner G, Bierhoff H, Armentano M, Rodriguez-Parkitna J, Sowodniok K, Naranjo JR, Bonfanti L, Liss B, Schütz G, Grummt I, Parlato R (2013) *A neuroprotective phase precedes striatal degeneration upon nucleolar stress*, CELL DEATH AND DIFFERENTIATION, pp. 1455-1464. Vol. 20

Crociara P, Parolisi R, Conte D, Fumagalli M, Bonfanti L (2013) *Cellular and molecular characterization of multipolar Map5-expressing cells: a subset of newly generated, stage-specific parenchymal cells in the mammalian central nervous system*, PLOS ONE, pp. e63258 - 1- e63258-18. Vol. 8

Ponti G, Obernier K, Guinto C, Jose L, Bonfanti L, Alvarez-Buylla A (2013) *Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice*, PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, pp. E1045-E1054. Vol. 110

Bonfanti L (2013) *The (real) neurogenic/gliogenic potential of the postnatal and adult brain parenchyma*, ISRN NEUROSCIENCE, pp. 1-14. Vol. 2013

S. Bovetti, S. Bonzano, D. Garzotto, S. G. Giannelli, A. Iannielli, M. Armentano, M. Studer, S. De Marchis (2013) COUP-TFI controls activity-dependent TH expression in adult dopaminergic olfactory bulb interneurons. DEVELOPMENT (in press)

### **3.1.1. Capitoli di libro**

Bonfanti L, Ponti G, Luzzati F, Crociara P, Parolisi R, Armentano M (2013) *Parenchymal Neuro-Glio-Genesis Versus Germinal Layer-Derived Neurogenesis: Two Faces of Central Nervous System Structural Plasticity*, Neural Stem Cells: New Perspectives, INTECH OPEN ACCESS PUBLISHER, Rijeka, pp. 241- 268

Peretto P, Paredes R (2013) *Social cues, adult neurogenesis and reproductive behavior*. Frontiers in Neuroscience Series (in press)

Luzzati F (2013) *Combining Multi-Channel Confocal Laser Scanning Microscopy with Serial Section Reconstruction to Analyze Large Tissue Volumes at Cellular Resolution*, Confocal and Multiphoton Laser-Scanning Microscopy of Neuronal Tissue-Applications and Quantitative Image Analysis, Springer (in press)

### **3.1.2. Editing di libri scientifici**

Bonfanti L (2013) *Neural stem cells: new perspectives* INTECH OPEN ACCESS PUBLISHER, Rijeka. pp. 420.

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

Luca Bonfanti. Lettura plenaria: *Vent'anni di studi sulla neurogenesi adulta: a che punto siamo?* nel simposio: I primi 10 anni della Laurea Magistrale in Neurobiologia all'Università di Pavia (2003 - 2013), Pavia, Maggio 2013

Luca Bonfanti. *Parenchymal neuro-glio-genesis: a problem of heterogeneity*. Seminario presso CNR, Sezione di Farmacologia cellulare e molecolare, Milano, Febbraio 2013

Luca Bonfanti. *Ruolo potenziale delle cellule staminali cerebrali nelle malattie neurodegenerative*. Convegno: Invecchiamento di successo: un approccio multidisciplinare. Fondazione Ferrero, Alba, Novembre 2013

Luca Bonfanti. *La ricerca sulla riparazione del sistema nervoso: panorama attuale e prospettive*. XVI Giornata Nazionale Trauma Cranico, Torino, Novembre 2013

Luca Bonfanti. *I limiti strutturali della plasticità del sistema nervoso*. Seminario alla Fondazione Molo, Torino, 2013

Sara Bonzano, Serena Bovetti, Aldo Fasolo, Silvia De Marchis *Role of olfactory enrichment on dopaminergic interneuron population in the adult mouse olfactory bulb*. Gordon Research Conferences – Inhibition in the CNS - LesDiablerets – June, 15-16, 2013

Roberta Schellino, Bart Jongbloets, Enrica Boda, Annalisa Buffo, Aldo Fasolo, Paolo Peretto, Jeroen Pasterkamp, Silvia De Marchis. *Ruolo di Semaforina7A e PlexinaC1 nel controllo della neurogenesi adulta nel bulbo olfattivo di topo*. 59° Convegno G.E.I. (Gruppo Embriologico Italiano) Varese 9-12 Giugno 2013

Sara Bonzano, Serena Bovetti, Donatella Garzotto, Serena Giannelli, Maria Armentano, Michèle Studer, Silvia De Marchis. *Coup-TFI Expression And Role In Olfactory Bulb Dopaminergic Cells*. XV National Congress of the Italian Society of Neuroscience (SINS) – Roma 3-5 ottobre 2013

Roberta Schellino, Bart C. Jongbloets, Enrica Boda, Annalisa Buffo, Aldo Fasolo, Paolo Peretto, R. Jeroen Pasterkamp, Silvia De Marchis *A role for Semaphorin7A and plexinC1 in the regulation of adult neurogenesis in the mouse accessory olfactory bulb*” EMBO workshop *Semaphorin function and mechanism of action* – Cernay-la-Ville- 29-31 October 2013

Peretto P. *The AOB of mice as a model to investigate the function of adult neurogenesis in rodents*. Seminario svolto presso il Dipartimento neuroscienze, via Volturno 39, Università degli Studi di Parma

Organizzazione Simposio per il XV SINS – Roma 3-5 ottobre 2013 *Beyond cell replacement: functional plasticity and homeostatic activities of adult stem and progenitor cells* – Chairs: Annalisa Buffo e Silvia De Marchis

Peretto P. *Adult newborn neurons promote mate recognition in female mice*. Seminario svolto presso il Jean-Pierre Aubert Research Center, Development and Plasticity of the Postnatal Brain and UDSL, School of Medicine, Place de Verdun, F-59045, Lille Cedex, France

Peretto P. Oboti L, Fasolo A. *Adult neurogenesis as a physiological mechanism to recognize mate pheromones in mice*. Invited speaker at the symposia of XV National Congress of the Italian Society for Neuroscience, Roma 3-5- October 2013

Luzzati F. *Attivazione di progenitori neuronali locali nello striato della cavia durante lo sviluppo postnatale*. 59° Convegno G.E.I. (Gruppo Embriologico Italiano), Varese, 9-12 Giugno 2013

Luzzati F, Armentano M, Bonfanti L, Fasolo A, Peretto P. *Transient neurons in the post-natal guinea pig striatum are generated from local quiescent progenitors*. XV National Congress of the Italian Society for Neuroscience, Roma 3-5- October 2013

### **3.3. Altri prodotti riconducibili alle attività istituzionali del NICO**

#### **3.3.1. Attività divulgativa e di promozione del NICO**

Luca Bonfanti. *Le cellule staminali tra scienza e fantascienza*. Conferenza e dialogo con Piero Bianucci, Fondazione Ferrero, Alba, Febbraio 2013

Luca Bonfanti. Organizzazione nella sede di Torino della IV edizione dell'evento nazionale per le scuole secondarie: Il lungo e affascinante viaggio della ricerca sulle cellule staminali. Marzo 2013  
Conferenza: *La rigenerazione delle staminali cerebrali: un problema di calcolo*

Luca Bonfanti. Incontro con gli studenti del liceo Cocito di Alba (con Enrica Boda)

Luca Bonfanti. *Sport e nuovi neuroni: come l'attività fisica può scolpire il nostro cervello*. Conferenza alla Settimana del cervello 2013, Torino, Il Circolo dei lettori

Luca Bonfanti. *Così il cervello si rigenera*. Articolo sul Sole 24 ore, 28 aprile 2013

Luca Bonfanti. *Le cellule staminali*. Seminario di formazione per insegnanti, nell'ambito del Progetto Scienza Attiva 2013

Luca Bonfanti. Partecipazione all'evento per le scuole secondarie: DALLA "SCIMMIA" ALMATURANDO"INFORMATIZZATO":EVOLUZIONE E PROGRESSI, organizzato da Fondazione Un passo insieme, Valdellatorre, ottobre 2013

Luca Bonfanti. *Plasticità neuronale*, Conferenza nel convegno:LA COMPLESSITÀ DELLA TECNOLOGIA: INNOVAZIONE, TECNOLOGIA E SALUTE. Fondazione Un passo insieme, Valdellatorre, ottobre 2013

Luca Bonfanti. *Uno scienziato sul caso Stamina*. Conferenza nel Convegno: L'etica della spending review, Torino, 21 Dicembre 2013

Federico Luzzati. *Rigenerazione nervosa tra sogni e dura realtà*, Scientific Summer Accademy curata da Agorà Scienza, Torino, Giugno 2013

Federico Luzzati. Coordinamento dello stand NICO alla Notte dei ricercatori 2013

Progetto delle attività di ricerca per il 2014 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 (1-11-2013)**

### **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**

### **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 attraverso l'attivazione del recettore Y1R.

Abbiamo generato due linee di topi knockout condizionali (denominati  $Npy1r^{rfb}$  e  $Npy1r^{Y5R/-}$ ) nei quali è possibile ottenere l'ablazione di Y1R in età giovanile (40-50 giorni dopo la nascita) selettivamente nelle regioni limbiche, ma in nuclei encefalici e neuroni differenti.

I topi  $Y1R^{rfb}$ , nei quali l'ablazione del Y1R viene indotta selettivamente nei neuroni glutammatergici (neuroni positivi per la  $\alpha$ -CamKII) della corteccia, delle regioni CA1 e CA3 dell'ippocampo e dello strato granulare del giro dentato (GR), mostrano un comportamento ansioso, associato all'attivazione basale dell'asse HPA e a una diminuzione del peso corporeo. I topi  $Y1R^{rfb}$  mostrano inoltre una maggiore suscettibilità all'obesità e al diabete di tipo 2 se trattati con una dieta grassa. Il fenotipo dei topi  $Y1R^{rfb}$  dipende dalla cura materna ricevuta e dal sesso, in quanto si osserva solo animali allevati da mamme con alti livelli di cura materna solo nei maschi.

I topi  $Npy1r^{Y5R/-}$  nei quali l'ablazione del Y1R è indotta in età giovanile in neuroni coesprimenti il recettore Y5R, il fenotipo osservato non è influenzato dalla cura materna ricevuta né dal sesso degli animali ed è caratterizzato da un comportamento molto ansioso, ma senza alterazioni del peso corporeo né dell'attività dell'asse HPA, anche dopo stress acuto.

L'insieme dei risultati ottenuti finora con i topi  $Npy1r^{Y5R/-}$  e  $Npy1r^{rfb}$ , fornisce forti evidenze sperimentali il supporto del concetto che la trasmissione NPY-Y1R, agendo su sistemi neurotrasmettitoriali diversi della regione limbica, possa giocare differenti ruoli fisiologici nella regolazione dell'ansia e la risposta allo stress.

Se questi risultati vengono considerati nel contesto degli studi condotti sull'uomo, che dimostrano una relazione diretta tra NPY e le variazioni inter-individuali nella resilienza, i nostri dati suggeriscono una potenziale strategia per nuovi trattamenti farmacologici dei diversi disturbi d'ansia e correlati allo stress.

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

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

### **2.1.1 Ruolo dei recettori Y1R espressi nei neuroni glutammatergici dell'ippocampo e della corteccia nella regolazione dell'ansia, della risposta allo stress e la resilienza a patologie neuropsichiatriche e metaboliche**

#### **a. Ruolo dei recettori ippocampali Y1R negli effetti permanenti della cura materna sul comportamento ansioso, l'asse dello stress e la plasticità neuronale**

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. Abbiamo dimostrato che Y1R nelle regioni CA1 e CA3 dell'ippocampo e nella corteccia prefrontale è un bersaglio chiave attraverso il quale l'ambiente perinatale modifica in modo permanente la risposta allo stress e l'attività l'asse HPA. Infatti, una bassa espressione di Y1R in queste regioni encefaliche, indotta da bassi livelli di cure materne o dalla delezione condizionale del gene *Npy1r*, determina un comportamento ansioso in diversi test comportamentali, un aumento dell'attività dell'asse HPA, come evidenziato da un'aumentata espressione nel nucleo del recettore per i glucocorticoidi (GR) nella CA1 e del suo mRNA, un aumento dell'espressione del CRH (peptide e mRNA) nel nucleo paraventricolare dell'ipotalamo e nell'amigdala centrale ed un aumento dei livelli serici di glucocorticoidi. Inoltre, in collaborazione con l'università di Cagliari, abbiamo dimostrato che delezione del Y1R nelle cellule glutammatergiche dell'encefalo di topi giovani *Npy1r<sup>ffb</sup>* riduce l'espressione delle subunità alfa1 e delta del recettore GABAA e che anche questa alterazione funzionale è inversamente correlata alla cura materna ricevuta.

Numerosi studi dimostrano che le cure materne aumentano in modo permanente la plasticità neuronale, in particolare nella corteccia e nell'ippocampo. Al fine di determinare il ruolo di *Npy1r* nell'ippocampo negli effetti dell'ambiente perinatale sulla plasticità sinaptica, abbiamo analizzato, in collaborazione con la Dott.ssa Carulli, la densità e l'intensità delle reti perineurali (PNN) nelle regioni limbiche (ippocampo e corteccia prefrontale). I topi *Npy1<sup>2lox</sup>* allevati da mamme che esprimono alti livelli di cura materna (alti livelli di arch-back nursing, HABN) mostrano un aumento dell'intensità delle PNN nella corteccia prefrontale rispetto ai topi controllo *Npy1<sup>2lox</sup>* allevati da mamme LABN o ai topi mutati. Il numero delle reti e il numero dei neuroni parvalbumina positivi (GABAergici) circondati da PNN non è al contrario modificato né dalla delezione di *Npy1r* né dal ceppo della mamma adottiva.

Questi risultati suggeriscono che la diminuita espressione di Y1R nella CA1 dell'ippocampo, indotta da bassi livelli di cure materne o dalla delezione condizionale del gene *Npy1r*, determini una riduzione dell'inibizione tonica (extrasinaptica) operata dal GABA nella CA1 e della plasticità neuronale nella corteccia prefrontale, dove proiettano i neuroni glutammatergici della CA1 che controllano l'attività dell'asse HPA, e che queste alterazioni possano sottendere il fenotipo comportamentale e funzionale osservato nei topi mutanti *Npy1r<sup>ffb</sup>* o nei topi controllo *Npy1r<sup>2lox</sup>* allevati da mamme LABN.

I prossimi obiettivi di questo filone di ricerca sono:

- a) estendere gli studi condotti sulla plasticità sinaptica determinando i) l'identità dei neuroni della corteccia prefrontale attorno ai quali abbiamo osservato l'aumento dell'intensità delle PNN (glutammato, somatostatina, NPY, Y1R, CB1); ii) le connessioni sinaptiche di questi neuroni con terminazioni glutammatergiche o GABAergiche iii) la densità di spine sinaptiche;
- b) estendere gli studi sugli effetti di cura materna e ablazione di Y1R sulla funzione dei recettori GABAA mediante analisi elettrofisiologiche delle correnti operate dal GABA e LTP;
- c) verificare se l'ambiente materno influenza in maniera permanente il comportamento e la plasticità neuronale attraverso modificazioni epigenetiche di *Npy1r*. Abbiamo estratto il DNA genomico dall'ippocampo di topi allevati da mamme HABN e LABN che invieremo nei prossimi mesi ai laboratori della Società Epionics di Berlino per la misurazione dei livelli di metilazione del gene *Npy1r*;
- d) Verificare se il comportamento ansioso indotto dall'ambiente materno attraverso Y1R nel sistema limbico influenza anche il sistema vegetativo (livelli serici di noradrenalina), la vulnerabilità allo stress acuto (restraint) e la tossicodipendenza (assunzione di etanolo) nell'età adulta;
- e) identificare trattamenti farmacologici e non farmacologici che possono contrastare l'effetto delle cure materne sull'espressione di *Npy1r* nel sistema limbico sulla plasticità sinaptica e sul comportamento emozionale.

*Collaborazioni:* con la Dott.ssa Carulli (NICO); con le Università di Milano, Cagliari Parma e con laboratori di Losanna e Heidelberg

### ***b. Ruolo del sistema Npy-Y1R negli effetti permanenti della cura materna sul metabolismo energetico***

I risultati ottenuti in collaborazione con l'Università di Parma dimostrano che i topi  $Npy1r^{rfb}$  rappresentano un importante e innovativo modello animale per lo studio della suscettibilità all'obesità e al diabete di tipo 2.

In particolare, abbiamo dimostrato che, rispetto ai fratelli di controllo, i topi  $Npy1r^{rfb}$  nutriti con una dieta grassa mostrano un rapido incremento del peso corporeo che persiste durante tutto il periodo di esposizione alla dieta. Rispetto ai controlli, i topi  $Npy1r^{rfb}$  consumano la stessa quantità complessiva di cibo, ma assumono più calorie durante la prima settimana di esposizione a dieta grassa e hanno una latenza più lunga prima di ridurre la quantità di cibo grasso assunto. Il fenotipo metabolico dei topi  $Npy1r^{rfb}$  è inoltre caratterizzato da tachicardia, da una maggiore quantità di tessuto adiposo bianco e da una minore tolleranza al glucosio come dimostrato dai livelli più alti di glicemia nei primi 30 minuti dopo il test rispetto i topi  $Npy1r^{2lox}$ .

Questi risultati suggeriscono che la delezione condizionale del  $Npy1r$  nel sistema limbico induca una disregolazione del rapporto appetito/sazietà e un'incapacità di processare calorie che in parte è simile a quanto descritto dall'ipotesi del "thrifty phenotype" (fenotipo risparmiatore). Quest'aumento di peso è ulteriormente incrementato se gli animali vengono esposti ad uno stress sociale cronico prima del trattamento con dieta grassa, suggerendo che la suscettibilità all'obesità dei topi  $Npy1r^{rfb}$  è potenziata dall'esposizione a uno stress emozionale.

I prossimi obiettivi di questo filone di ricerca sono:

- 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 la presenza di ormoni sessuali femminili, differenze dimorfiche sessuali o differenze di regolazione epigenetica siano responsabili di questa differente risposta nei due generi. Risultati preliminari indicano che né l'ovariectomia né la mascolinizzazione (ottenuta con trattamento a P3 con estradiolo) modificano il peso corporeo delle topine  $Npy1r^{rfb}$  rispetto alle sorelle di controllo. Valuteremo quindi anche gli effetti di un'esposizione a una dieta grassa sul peso corporeo e i parametri dell'omeostasi glicemica in femmine  $Npy1r^{rfb}$  e  $Npy1r^{2lox}$  ovariectomizzate.

### ***2.1.2. Ruolo Y1R coespresso con Y5R nelle regioni limbiche nel comportamento ansioso***

Il Y1R e il Y5R per NPY condividono azioni simili nella regolazione dell'ansia. I geni  $Npy1r$  e  $Npy5r$  sono localizzati sullo stesso cromosoma nell'uomo e nei roditori e condividono lo stesso promotore che ne dirige la trascrizione con orientamento opposto. Nei roditori, Y1R e Y5R sono colocalizzati in diverse regioni del proencefalo, inclusa l'amigdala basolaterale (BLA) e l'ippocampo. Studi farmacologici indicano che il NPY induce effetti ansiolitici attraverso l'attivazione del Y5R e del Y1R nella BLA. E' quindi possibile che l'espressione coordinata di questi recettori in questo nucleo cerebrale possa giocare un ruolo nella regolazione dell'ansia e della memoria spaziale. Per analizzare lo specifico contributo dei Y1Rs coespressi con Y5R sulle funzioni fisiologiche del NPY abbiamo generato una linea di topi ko condizionali, denominati  $Npy1r^{Y5-/-}$ , in cui il gene  $Npy1r$  è inattivato selettivamente nei neuroni che co-esprimono il recettore Y5 degli animali adulti. I topi  $Npy1r^{Y5-/-}$  di entrambi i sessi hanno diminuiti livelli di Y1R mRNA e di proteina nella corteccia cerebrale, nella CA1, CA3 e DG dell'ippocampo, nella BLA e nella regione ipotalamica VMH e mostrano un fenotipo fortemente ansioso nei test dell'epm e dell'OF senza alterazioni dell'attività dell'asse HPA, né in condizioni basali, né dopo esposizione per 30 minuti ad un stress acuto (restraint stress). Inoltre i topi  $Npy1r^{Y5R-/-}$  di entrambi i sessi mostrano, nel test del Morris Water Maze (MWM) un aumento delle funzioni di memoria spaziale che sembra essere correlato ad una minore flessibilità comportamentale, dato consistente con l'alto profilo ansioso di questi animali.

I topi  $Npy1r^{rfb}$  e  $Npy1r^{Y5R-/-}$  hanno alcune somiglianze e differenze. Entrambi questi animali mutati hanno un comportamento ansioso nell'epm e nell'OF; tuttavia solo i topi  $Npy1r^{rfb}$  mostrano un aumento dell'attività HPA. Inoltre i topi  $Npy1r^{rfb}$  hanno una diminuito peso corporeo rispetto ai loro fratelli di controllo, mentre

nessun cambiamento è stato osservato nei topi  $Npy1r^{Y5R/-}$ . È importante osservare che la delezione del Y1R nelle cellule glutammatergiche dell'encefalo di topi giovani induce alterazioni funzionali e comportamentali che sono sesso specifiche e inversamente correlate alla cura materna. Al contrario, il fenotipo dei topi  $Npy1r^{Y5R/-}$  è indipendente dal genere e dalle cure materne ricevute. Queste differenze possono essere spiegate dal diverso pattern di inattivazione regionale e cellulare del gene. Entrambe le linee di animali mostrano una significativa riduzione del mRNA e della proteina *Npy1r* nell'ippocampo. Al contrario solo i topi  $Npy1r^{Y5R/-}$ , ma non quelli  $Npy1r^{Y5R/-}$ , mostrano una diminuzione significativa del recettore Y1R nella BLA. I nostri risultati dimostrano anche che, nella BLA, il  $\approx 50\%$  delle cellule GABA-IR co-esprimono Y1R e Y5R, mentre solo una piccola popolazione di neuroni positivi per la  $\alpha$ -CamKII ( $\approx 25\%$ ) co-localizza con entrambi i sottotipi recettoriali per NPY, suggerendo che l'inattivazione condizionale del gene *Npy1r* nei topi  $Npy1r^{Y5R/-}$  potrebbe determinarsi prevalentemente nei neuroni GABAergici della BLA. Questo risultato suggerisce che anche a livello cellulare la perdita dei recettori Y1R è diversa tra i topi  $Npy1r^{Y5R/-}$  e  $Npy1r^{Y5R/-}$ , determinando un diverso fenotipo nelle due linee di animali. La nostra analisi dimostra che topi  $Npy1r^{Y5R/-}$  mostrano un forte fenotipo ansioso non associato a un aumento dell'attività dell'asse HPA, indipendente dal genere e dalla cura materna che potrebbe essere meccanicisticamente legato all'inattivazione di Y1R negli interneuroni GABAergici della BLA. Inoltre i Y1Rs co-espressi con Y5Rs sono coinvolti nelle funzioni di memoria spaziale e nella flessibilità comportamentale in entrambi i sessi.

Nello sviluppo di questo filone di ricerca vogliamo confrontare le modificazioni morfologiche neurochimiche e funzionali indotte nei topi  $Npy1r^{Y5R/-}$  dall'ablazione di *Npy1r* in neuroni Y5R positivi con quelle osservate nei topi  $Npy1r^{Y5R/-}$  per identificare i differenti circuiti neuronali e i sistemi neurotrasmettitoriali che determinano le differenze fenotipiche tra le due linee di animali mutati. In particolare, i prossimi obiettivi sono:

- a) Analizzare alterazioni nella plasticità sinaptica (PNN, spine dendritiche) nei neuroni glutammato, somatostatina, NPY, Y1R, CB1) della CA1, DG, corteccia prefrontale e BLA e le connessioni sinaptiche di questi neuroni con terminazioni glutammatergiche o GABAergiche.
- b) Verificare se il comportamento ansioso indotto dall'ambiente materno attraverso Y1R nel sistema limbico influenza il sistema vegetativo (livelli serici di noradrenalina), vulnerabilità all'etanolo nell'età adulta;
- c) Confrontare l'effetto del trattamento con farmaci serotoninergici (SSRI), particolarmente attivi nella BLA, e con benzodiazepine sul comportamento ansioso dei topi  $Npy1r^{Y5R/-}$ ;
- d) Infine poiché studi riportati in letteratura suggeriscono un ruolo delle cellule granulari del DG nell'inflessibilità comportamentale, in collaborazione con la Dott.ssa Buffo, studieremo la neurogenesi dei granuli nei topi controllo e nei topi  $Npy1r^{Y5R/-}$ .

*Collaborazioni:*

Nazionali: NICO: Dott.ssa A. Buffo, Dott.ssa D. Carulli; Prof. GC Panzica; Università di Cagliari: Prof.ssa M. Serra; Prof. G. Biggio; Università di Milano: Prof.ssa A. Maggi; Prof.ssa MP Abbraccio; Prof. G. Racagni; Università di Parma: Prof.ssa P. Palanza

Internazionali: Max Planck Institute, Heidelberg: Rolf Sprengel; University of Minnesota, Minneapolis: Prof. A. Bartolomucci; Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne: Prof. E. Grouzman; Rosalind Franklin University, Chicago: Prof. J. Urban

### **3. Prodotti delle attività di ricerca anno 2013**

#### **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 Neuropeptide Y-Y1 receptors unravels the role of Y1 and Y5 receptors co-expressing neurons in anxiety. *Biol. Psych.*, under revision

Fontana R., Della Torre S., Meda C., Longo A., Eva C., Maggi A. The first kiss for a young post-menopausal estrogen replacement therapy. *Endocrinology*, under revision



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

#### ***4. Finanziamenti per la ricerca***

Prin 2012

Fondazione Cariplo: progetto revisionato e risottomesso nel 2013

Progetto delle attività di ricerca per il 2014 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 (1-11-2013)**

#### **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 (PosDoc)  
Luisa Muratori (Dottoranda)  
Loradana Grasso (Dottoranda)  
Sara Gnani (Dottoranda)

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

### **2. Progetti di ricerca**

#### **2.1. Resoconto attività di ricerca svolta nell'anno 2013**

Nel 2013, le attività del gruppo Plasticity and Regeneration of the PNS si sono sviluppate principalmente nell'ambito di due progetti di ricerca pluriennali e volti allo studio di strategie innovative di ingegneria tissutale per la ricostruzione e rigenerazione dei nervi periferici in seguito a lesione traumatica.

Nell'ambito del progetto Biohybrid templates for peripheral nerve regeneration (FP7 Collaborative Project THEME:HEALTH.2011.1.4-2; Acronym: BIOHYBRID), sono stati indagati vari aspetti di base per la realizzazione di scaffolds biomimetici per la riparazione delle lesioni dei nervi periferici con perdita di sostanza. Le ricerche, che sono state condotte in stretta collaborazione con la ricca partnership internazionale del progetto e sono consistite nella valutazione comparativa di numerosi biomateriali in presenza di differenti tipi di cellule. Tali ricerche, in particolare gli studi in vivo, hanno portato alla pubblicazione di un paper in *Biomaterials*, la più importante rivista internazionale del settore dei biomateriali (cfr. pubblicazione # 1).

Per quanto riguarda il secondo principale progetto, intitolato 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), si sono portate avanti le analisi in vitro sulla biocompatibilità e biomimetici dei materiali per lo sviluppo di un dispositivo biomedicale innovativo in forma di membrana bioartificiale bi-strato e bi-componente per la rigenerazione assonale in seguito a lesioni ai nervi periferici. Particolarmente innovativa è la presenza di due strati di diversa composizione che permette di ottimizzare le caratteristiche chimico-fisiche e meccaniche, nonché la risposta biologica, del dispositivo e di adattarle al tipo di interfaccia tissutale. Inoltre, sono stati condotti i primi esperimenti pilota in vivo al fine di mettere a punto la metodologia di indagine ottimale per la conduzione dei test in vivo previsti nel corso dell'ultimo anno del progetto (2014).

Nel corso del 2013 inoltre, in aggiunta alle attività previste nell'ambito dei due progetti sovramenzionati, sono state completati e pubblicati ..... studi relativi ad altrettanti progetti di ricerca.

Il primo studio, ha permesso di dimostrare l'efficacia della terapia genica mediante VEGF nel prevenire l'atrofia muscolare da denervazione nel ratto (cfr. pubblicazione # 2).

Il secondo studio ha permesso di dimostrare che l'overespressione di ErbB2 in un modello transgenico promuove la rigenerazione dei nervi periferici in seguito a lesione traumatica (cfr. pubblicazione # 3).

Il terzo studio ha permesso di dimostrare il ruolo dell'ormone ghrelina sul sistema neuromuscolare ed in particolare nella prevenzione dell'atrofia muscolare (cfr. pubblicazione # 4).

Il quarto studio ha permesso di dimostrare l'efficacia del Rolipram (un inibitore della fosfodiesterasi) nel prevenire il danno a carico del midollo spinale in seguito a lesione contusiva nel ratto (cfr. pubblicazione # 5).

Il quinto studio ha permesso di dimostrare il ruolo della netrina nella rigenerazione posttraumatica dei nervi periferici (cfr. pubblicazione # 6).

Il sesto studio ha permesso di dimostrare che l'utilizzazione di tessuto adiposo autologo come filler di tubuli venosi non rappresenta un metodo efficace per migliorare la rigenerazione assonale in seguito a ricostruzione del nervo periferico (cfr. pubblicazione # 7).

*Collaborazioni principali:* Andrea Graziani (Università del Piemonte Orientale, Novara); Igor Papalia (Università di Messina); Claudia Grothe (Hannover medical School); Ana Colette Mauricio (Porto University); Mauro Giacca (ICGEB, Trieste); Patrick Jamimet (University of Tübingen, Germany); Artur Varejao (University of Vila real, Portugal).

## **2.2. Progetti di ricerca per l'anno 2014**

Il lavoro del nostro gruppo di ricerca per l'anno 2014 si rivolgerà principalmente dello studio di strategie innovative di ingegneria tissutale volte alla ricostruzione e rigenerazione dei nervi periferici in seguito a lesione traumatica. Infatti, la maggior parte dei fondi a disposizione originano da due finanziamenti ricevuti dalla Commissione Europea e dalla Regione Piemonte nel corso del 2011, e dedicati allo studio della riparazione dei nervi. A questi due progetti principali si aggiungono altri progetti in via di completamento che vengono descritti al punto 2.3.

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

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

*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 terzo anno di tale progetto, 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 intendono completare i tests in vitro di biocompatibilità avviati nel corso del primo anno e condurre gli esperimenti in vivo per testare i prototipi di guida nervosa realizzati dai colleghi del Politecnico di Torino.

*Collaborazioni:* Gianluca Ciardelli, Chiara Vitale Brovarone (Politecnico di Torino); Bruno Battiston, Pierluigi Tos (CTO, Torino)

### **2.3. Altre linee di ricerca**

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

#### **2.3.1. Studio dell'utilizzazione di cellule staminali per promuovere la rigenerazione dei nervi periferici**

Tale progetto si propone di completare uno studio portato avanti negli ultimi anni e volto ad 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)

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

Tale progetto si propone di completare uno studio portato avanti negli ultimi anni e volto ad indagare , gli effetti di diversi protocolli di esercizio fisico nel promuovere il recupero funzionale neuromotorio in seguito a lesioni traumatiche dei nervi periferici in modelli murini.

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

#### **2.3.3. Studio dei meccanismi molecolari della rigenerazione nervosa periferica mediante modelli murini geneticamente modificati**

Tale progetto si propone di completare uno studio portato avanti negli ultimi anni e volto ad 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 Sprouty 2.

*Collaborazioni:* Lars Klimaschewski (Division of Neuroanatomy, Innsbruck Medical University, Austria).

#### **2.3.4. Studio dell'impiego di vettori virali adenoassociati per promuovere la rigenerazione nervosa periferica**

Tale progetto si propone di completare uno studio portato avanti negli ultimi anni e volto a 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. Il progetto si focalizza sul fattore ecto-ErbB4 e sul ruolo che esso gioca nel promuovere la migrazione delle cellule di Schwann.

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

#### **2.3.5. Studio dei cambiamenti a carico del muscolo scheletrico in seguito a denervazione**

Tale progetto si propone di completare uno studio portato avanti negli ultimi anni e volto a studiare i cambiamenti che si verificano nel muscolo scheletrico in seguito a denervazione utilizzando differenti approcci sperimentali: analisi proteomica, analisi biomolecolare, microscopia ottica ed elettronica e stereologia.

*Collaborazioni:* Isabelle Perroteau, Giovanna Gambarotta (Università di Torino), Cecilia Gelfi, Valerio Magnaghi (Università di Milano)

#### **2.3.6. Studio della neurogenesi nei gangli spinali in seguito a lesione nervosa periferica.**

Tale progetto si propone di completare uno studio portato avanti negli ultimi anni e volto a studiare le variazioni nel numero di neuroni nei gangli spinali cervicali in seguito a lesione dei rami terminali del plesso brachiale.

### **3. Prodotti delle attività di ricerca anno 2013**

#### **3.1. Articoli pubblicati con affiliazione al NICO**

Haastert-Talini K, Geuna S, Dahlin LB, Meyer C, Stenberg L, Freier T, Heimann C, Barwig C, Pinto LF, Raimondo S, Gambarotta G, Samy SR, Sousa N, Salgado AJ, Ratzka A, Wrobel S, Grothe C. Chitosan tubes of varying degrees of acetylation for bridging peripheral nerve defects. *Biomaterials* 2013 Dec;34(38):9886-904.

Moimas S, Novati F, Ronchi G, Zacchigna S, Fregnan F, Zentilin L, Papa G, Giacca M, Geuna S, Perroteau I, Arnež ZM, Raimondo S. Effect of vascular endothelial growth factor gene therapy on post-traumatic peripheral nerve regeneration and denervation-related muscle atrophy. *Gene Ther* 2013 Oct;20(10):1014-21.

Ronchi G, Gambarotta G, Di Scipio F, Salamone P, Sprio AE, Cavallo F, Perroteau I, Berta GN, Geuna S. ErbB2 receptor over-expression improves post-traumatic peripheral nerve regeneration in adult mice. *PLoS One* 2013;8(2):e56282.

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* 2013 Feb 1;123(2):611-22.

Costa LM, Pereira JE, Filipe VM, Magalhães LG, Couto PA, Gonzalo-Orden JM, Raimondo S, Geuna S, Maurício AC, Nikulina E, Filbin MT, Varejão AS. Rolipram promotes functional recovery after contusive thoracic spinal cord injury in rats. *Behav Brain Res* 2013 Apr 15;243:66-73.

Jaminet P, Köhler D, Schäufele M, Rahmanian-Schwarz A, Lotter O, Fornaro M, Ronchi G, Geuna S, Rosenberger P, Schaller HE. Evaluating the role of Netrin-1 during the early phase of peripheral nerve regeneration using the mouse median nerve model. *Restor Neurol Neurosci* 2013;31(3):337-45

Papalia I, Raimondo S, Ronchi G, Magaudo L, Giacobini-Robecchi MG, Geuna S. Repairing nerve gaps by vein conduits filled with lipoaspirate-derived entire adipose tissue hinders nerve regeneration. *Ann Anat* 2013 May;195(3):225-30.

Geuna S, Gnani S, Perroteau I, Tos P, Battiston B. Tissue engineering and peripheral nerve reconstruction: an overview. *Int Rev Neurobiol* 2013;108:35-57.

Gnani S, Barwig C, Freier T, Haastert-Talini K, Grothe C, Geuna S. The use of chitosan-based scaffolds to enhance regeneration in the nervous system. *Int Rev Neurobiol* 2013;109:1-62.

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

S. Geuna, Riparo di lesione nervosa tramite condotti venosi riempiti con tessuto adiposo, Congresso della Società Italiana di Chirurgia Plastica e Ricostruttiva, Bari, September 25-27, 2013

S. Geuna, Pre-clinical testing of chitosan tubes of varying degrees of acetylation for bridging peripheral nerve defects, TERMIS AP, Shanghai, October 23-26, 2013.

#### **3.3. Altri prodotti riconducibili alle attività Istituzionali del NICO (specificare)**

Invited editor of two thematic issues of the *International Review of Neurobiology* (Vol. 108 and Vol. 109) on "Tissue Engineering of the Peripheral Nerves".

#### **4. Finanziamenti per la ricerca**

##### **4.1. Finanziamenti per la ricerca ricevuti nel 2013**

UNITO ex-60% – *Studio sperimentale sull'utilizzazione di tubuli bio-ingegnerizzati per la ricostruzione di lesioni traumatiche severe a carico dei nervi periferici*

Progetto di durata biennale. Finanziamento erogato: Euro 3.300,00.

UNITO ex-60% – *Effetti della des-acyl-ghrelina sulla rigenerazione di un nervo periferico.*

Progetto di durata biennale. Finanziamento erogato: Euro 3.600,00.

##### **4.2. Finanziamenti per la ricerca ricevuti prima del 2012 ed ancora attivi**

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

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

BICONERVE – *Programma Operativo Regionale “Competitività Regionale e Occupazione” – Azione “Aiuti ai Soggetti Aggregati ai Poli di Innovazione” (Polo BioPmed e Polo Nuovi Materiali) (2011-2014).*

Progetto di durata triennale: Finanziamento erogato: Euro 170.742,00.

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

Responsabile del gruppo: **Giancarlo Panzica**

## **1. Composizione del gruppo di ricerca (1-11-2013)**

### **1.1 Personale strutturato dell'Università di Torino**

Giancarlo Panzica (PO)

Stefano Gotti (RU)

Vittorio Monasterolo (Tecnico di laboratorio)

### **1.2. Personale non strutturato**

Giovanna Ponti (postdoc)

Alice Farinetti (dottoranda)

Benedetta Foglio (dottoranda)

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

## **2. Progetti di ricerca**

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

Anche 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 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, in particolare quelli 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**

Nell'anno in corso sono stati analizzati i dati riguardanti la valutazione del profilo ansioso e depressivo in topi CD1, di entrambi i sessi, esposti a stress cronico imprevedibile. La performance ottenuta dagli animali in test come l'elevated plus maze test, l'open field e il forced swimming test hanno rivelato un effetto sessualmente dimorfico all'esposizione allo stress: in particolare l'effetto è ansiolitico nelle femmine e ansiogenico nei maschi.

Sono in fase di completamento le analisi biochimiche sulle eventuali variazioni di neurosteroidi presenti nei tessuti prelevati. Per quanto riguarda l'analisi immunocitochimica del sistema vasopressinergico viene confermata nel setto laterale la presenza di un dimorfismo sessuale; inoltre gli animali stressati presentano maggiore immunoreattività per la AVP (Foglio & Panzica, 2013, poster presentato al 45° meeting BBS, Munich).

A questo esperimento è stato affiancato un secondo in cui ratti maschi sono stati trattati con Finasteride (un inibitore della 5-alfa-reduttasi, l'enzima che converte il testosterone in diidrotestosterone) con esposizioni a breve, medio e lungo termine. Gli animali sono poi stati sottoposti a test comportamentali volti a valutare il profilo ansioso/depressivo e sacrificati. I tessuti sono stati prelevati per le analisi del

contenuto in neurosteroidi. I dati preliminari relativi all'analisi comportamentale hanno messo in evidenza un effetto ansiolitico del trattamento con finasteride a breve termine.

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

## **2.2. Ruolo degli androgeni e degli estrogeni nel differenziamento di circuiti cerebrali vasopressinergici e nitrergici**

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 nNOS ipotalamico (nucleo preottico mediale, nucleo ventromediale, nucleo paraventricolare). Si intende studiare il ruolo degli estrogeni e degli androgeni sullo sviluppo di questi sistemi. Si utilizzano a questo scopo animali modificati geneticamente per il gene dell'aromatasi, del recettore per gli estrogeni (alfa) e del recettore per gli androgeni. In una prima fase del progetto abbiamo dimostrato, in ratti Tfm (ratti che hanno il recettore degli androgeni mutato e non funzionante), alterazioni nella distribuzione del sistema a nNOS in diversi nuclei (preottico mediale, della stria terminale, ventromediale) con una scomparsa del dimorfismo sessuale (*Martini et al., 2008, Hormones and Behavior*). Recentemente, abbiamo dimostrato lo stesso effetto (scomparsa del dimorfismo) anche sul sistema sessualmente dimorfico a vasopressina sempre in ratti Tfm (*Allieri et al., 2013, Neuroscience*). Questi risultati indicano che gli androgeni (oltre agli estrogeni) giocano un ruolo fondamentale per il differenziamento sessuale dei circuiti ad AVP e nNOS. In un sistema in vitro (utilizzando le cellule SH-SY5Y) abbiamo inoltre dimostrato che il testosterone e l'estradiolo regolano l'espressione della vasopressina tramite i recettori alfa e beta degli estrogeni (*Grassi et al., 2013, Endocrinology*).

I ratti Tfm sono anche caratterizzati da una diminuita attivazione dell'enzima aromatasi. E' quindi possibile che gli effetti della mutazione siano dovuti ad una insufficiente produzione locale di estradiolo durante il periodo critico. Per questo motivo intendiamo studiare gli effetti della somministrazione precoce di estrogeni su topi KO per l'aromatasi e su topi tfm. Attraverso questi esperimenti potremo anche valutare quale sia il momento maggiormente importante (prenatale, perinatale o peripuberale) per il differenziamento di questi circuiti.

*Collaborazioni:* Julie Bakker (University of Liege, Belgium), Paloma Collado e Antonio Guillamon (UNED, Madrid, Spain), Luis Miguel Garcia-Segura (CSIC, Madrid, Spain), Cheryl Frye (Fairbanks, AK, USA).

## **2.3. Steroidi sessuali e neurogenesi**

In precedenti esperimenti, abbiamo evidenziato come il testosterone stimoli la neurogenesi nella SVZ di ratti maschi e come questo sia dovuto alla sua aromatizzazione in estradiolo (*Farinetti et al., 2011, poster presentato al meeting Steroids and Nervous System, Torino*). Nella fasi successive di questo progetto analizzeremo quello che avviene nelle femmine, per dimostrare se questo fenomeno di regolazione da parte degli estrogeni sia sessualmente dimorfico.

Inoltre, dal momento che l'analisi dell'espressione del recettore alfa degli estrogeni non ha dato risultati significativi nel SVZ (mancanza del recettore a questo livello) (*Ponti et al., 2013, poster al meeting Steroids and Nervous System, Torino*), intendiamo approfondire questo dato per capire se l'effetto degli estrogeni sia dovuto ad una interazione locale con la SVZ (magari attraverso un recettore di membrana, del tipo GPER-1), oppure da un'azione a distanza attraverso collegamenti sinaptici da neuroni sensibili agli estrogeni posti in altre regioni (setto laterale? tronco?). Si studieranno inoltre le eventuali variazioni della neurogenesi della SVZ in topi esposti a trattamenti perinatali con distruttori endocrini come la genisteina, la TBT ed il BPA.

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

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

I distruttori endocrini hanno, tra i loro bersagli, anche i circuiti cerebrali che sono alla base del controllo di alcuni comportamenti come quello riproduttivo e quello alimentare (*Panzica et al., 2011, J.Toxicology Environmental Health*).



I nostri studi si concentreranno su tre distruttori endocrini, la genisteina (il più abbondante fitoestrogeno naturale), il bisfenolo A (BPA) e la tributiltina (TBT), un antifungino largamente utilizzato nelle vernici protettive ed in una molteplicità di altri prodotti.

Per quanto riguarda la genisteina, si faranno trattamenti prenatali o postnatali per vedere se alcuni comportamenti (ansia, depressione, comportamento sessuale) siano alterati dall'esposizione a tale composto. In conseguenza delle alterazioni osservate studieremo alcuni dei relativi circuiti di controllo per valutare se anch'essi abbiano subito modificazioni permanenti.

Il BPA è un componente importante delle plastiche (incluse quelle utilizzate per l'alimentazione) ed è ubiquitario nell'ambiente. In precedenti studi abbiamo dimostrato una compromissione del sistema a nNOS in animali trattati in periodo prenatale con BPA (*Martini et al., 2010, J. Neuroendocrinology*). Abbiamo intenzione di studiare, nello stesso modello murino di esposizione prenatale, gli effetti sul sistema a kisspeptina, peptide che regola l'attività dei neuroni a GnRH, e quindi regola l'intero asse della riproduzione.

La TBT è anche conosciuta come un agente obesogeno, in quanto può agire sul differenziamento degli adipociti tramite il recettore PPar-gamma. In studi precedenti abbiamo dimostrato che la TBT agisce in tempi brevi anche sui circuiti nervosi, in particolare sul nucleo arcuato ipotalamico (*Bo et al., 2011, Neurotoxicology*). Durante lo sviluppo futuro del progetto si intende valutare 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 quello degli effetti del bisfenolo A sugli stessi circuiti.

*Collaborazioni:* Carola Eva (NICO, Torino), Paola Palanza (Parma), Isabelle Franceschini, Tours, France).

### **3. Prodotti delle attività di ricerca anno 2013**

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

Allieri F, Spigolon G, Melcangi RC, Collado P, Guillamón A, **Gotti S, Panzica GC.** (2013)

Androgen receptor deficiency alters the arginine-vasopressin sexually dimorphic system in Tfm rats. *Neuroscience*. Aug 30;253C:67-77.

Grassi D, Lagunas N, Amorin M, Pinos H, **Panzica GC**, Garcia-Segura LM, Collado P. (2013) Estrogenic regulation of NADPH-diaphorase in the supraoptic and paraventricular nuclei under acute osmotic stress. *Neuroscience*. May 22;248C:127-135.

Grassi D, Bellini MJ, Acaz-Fonseca E, **Panzica G**, Garcia-Segura LM. (2013) Estradiol and testosterone regulate arginine-vasopressin expression in SH-SY5Y human female neuroblastoma cells through estrogen receptors- $\alpha$  and - $\beta$ . *Endocrinology*. Jun;154(6):2092-100.

Grassi D, Lagunas N, Amorim M, Pinos H, **Panzica G**, Garcia-Segura LM, Collado P. (2013) Role of oestrogen receptors on the modulation of NADPH-diaphorase-positive cell number in supraoptic and paraventricular nuclei of ovariectomised female rats. *J Neuroendocrinol*. Mar;25(3):244-50.

Melcangi RC, **Panzica GC.** (2013) Neuroactive steroids and the nervous system: further observations on an incomplete tricky puzzle. *J Neuroendocrinol*. 25: 957-963.

#### **3.1.1. In Press**

Melcangi RC, **Panzica GC.** (2013) Allopregnanolone: State of the art. *Prog Neurobiol*. Oct 10. doi:pii: S0301-0082(13)00098-1. 10.1016/j.pneurobio.2013.09.005.

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

Relatore invitato per INFINITAMENTE - Festival di Scienza ed Arte, Verona, 11-17 marzo 2013.

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

Relatore invitato per Corso di Aggiornamento in Endocrinologia Clinica, Mantova, 5-6 Aprile 2013.  
Titolo: Distruttori endocrini: effetti sul differenziamento cerebrale e comportamentale.

Relatore invitato per 1° meeting NICE, Dalla ricerca di base alla clinica, Milano 16 novembre 2013  
Titolo: Neuroni Kiss e distruttori endocrini.

Relatore invitato per meeting Evoluzione e Cervello, Torino, 22 novembre 2013.  
Titolo: La neuroendocrinologia degli anni 70-80: dal metodo di Golgi all'immunoistochimica.

Seminari presso il Molecular Biology Center (Torino) e Istituto Axologico di Piancavallo (Piancavallo, Verbania).

### **3.2.1. Partecipazioni con presentazione posters o comunicazioni ai seguenti congressi**

15° Congresso Nazionale SINS - Società Italiana di Neuroscienze, Roma, 3-5 ottobre 2013

7th International Meeting Steroids and Nervous System, Torino-Orbassano (TO), Italy, 16-20 February 2013

6a Riunione del Gruppo italiano Scienze Neuroendocrine, Torino, 21 Febbraio 2013

### **3.3. Organizzazione conferenze con affiliazione al NICO**

#### **- Main Organizer**

Allopregnanolone: State of the art. Satellite Symposium, Torino, 16 February, 2013

7th International Meeting Steroids and Nervous System, Torino-Orbassano (TO), Italy, 16-20 February 2013

6a Riunione del Gruppo italiano Scienze Neuroendocrine, Torino, 21 Febbraio 2013

#### **- Member of the Scientific Committee**

15° Congresso Nazionale SINS - Società Italiana di Neuroscienze, Roma, 3-5 ottobre 2013

### **3.4. Altri prodotti riconducibili alle attività Istituzionali del NICO**

#### **3.4.1. Attività editoriali**

Steroids and the nervous system (a cura di R.C. Melcangi e **G.C. Panzica**), *Special Issue*, Journal of Neuroendocrinology, vol. 25, 2013, pp. 957-1238 - ISSN 0953-8194.

Allopregnanolone: State of the art (a cura di Melcangi R.C., Panzica G.C.) *special issue*, Progr. Neurobiol, *in press*

### **4. Finanziamenti per la ricerca**

Progetti Finanziamento Locale - Università di Torino: € 4.000

Ricerca Autofinanziata dal Dipartimento: € 9.000

Progetto delle attività di ricerca per il 2014 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 (01-11-2013)**

### **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)  
Tiziana Martone (Tecnica di Laboratorio)

### **1.2. Personale non strutturato**

Enrica Boda (postdoc)  
Valentina Cerrato (dottoranda)  
Alessio Faralli (dottorando)  
Elisa Fucà (dottoranda)  
Elena Parmigiani (dottoranda)  
Marta Ferrero (Borsista)

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

## **2. Progetti di ricerca**

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

### **2.1. Meccanismi intrinseci ed estrinseci alla base dei processi di plasticità e rigenerazione nel sistema nervoso centrale adulto**

Una lesione del sistema nervoso centrale causa la morte dei neuroni o l'interruzione delle connessioni nervose, determinando gravi deficit sensoriali, motori o cognitivi. 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 quindi

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

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

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 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 il ruolo di specifici fattori intrinseci nelle capacità plastiche e rigenerative dei neuroni adulti, studieremo gli effetti della sovraespressione di Reggie-1, una molecola che promuove la rigenerazione assonale dei neuroni retinici dopo lesione, nel cervelletto di ratto adulto. In particolare indagheremo se Reggie-1 promuove la plasticità dei neuroni adulti sia in condizioni fisiologiche che dopo un danno.

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 floxati) determina un aumento delle capacità rigenerative o plastiche di tali neuroni.

*Collaborazioni:* James Fawcett (Centre for Brain Repair, Cambridge); Leszek Kaczmarek (Nencki Institute, Varsavia), Joost Verhaagen (Neuroscience Institute of Neuroscience, Amsterdam), Roberto Albera (Università di Torino), Toshi Oohashi (Università di Okayama, Giappone).

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

Le attività afferenti a questa linea di ricerca si sono articolate secondo due principali direttive sperimentali.

1). Una parte degli esperimenti è stata finalizzata all'analisi dei processi di sviluppo e specificazione delle diverse categorie di interneuroni GABAergici del cervelletto e allo studio delle relazioni di lignaggio esistenti tra tali interneuroni e gli altri fenotipi derivanti dalla zona ventricolare embrionale (VN) e dalla sostanza bianca postnatale (PWM). 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. Abbiamo caratterizzato ulteriormente tali progenitori comuni attraverso analisi clonali *in vitro* e *in vivo* ai diversi stadi di sviluppo cerebellare. Tali analisi sono state condotte attraverso l'espressione combinata di sei proteine fluorescenti codificate da plasmidi, elettroporati *in utero*, la cui espressione è regolata dal promotore di GFAP (Garcia-Marques and Lopez-Mascaraque, 2012). Per mezzo di una trasposasi espressa transitoriamente, i geni corrispondenti sono inseriti nel DNA ed ereditati dalle cellule figlie. L'espressione stocastica delle proteine reporter genera nelle cellule diverse combinazioni di colori, ognuna delle quali consente di identificare la discendenza di un singolo progenitore. I risultati finora ottenuti confermano la presenza di progenitori bipotenti nella sostanza bianca postnatale del cervelletto, in grado di generare interneuroni inibitori e astrociti parenchimali. Esperimenti successivi indagheranno il potenziale di sviluppo dei cloni, al fine di comprendere i meccanismi sottostanti alla scelta fenotipica neuronale e gliale.

Attraverso una serie parallela di esperimenti abbiamo ampliato lo studio dei meccanismi cellulari/molecolari che regolano il numero e il fenotipo degli interneuroni inibitori del cervelletto. In particolare, abbiamo analizzato il ruolo svolto da Sonic Hedgehog (Shh) sulla proliferazione e maturazione dei progenitori di tali interneuroni, attraverso la somministrazione di tale sostanza su colture organotipiche

*in vitro* derivate dalla sostanza bianca di cervelletti a diverse età di sviluppo embrionale e postnatale. Abbiamo riscontrato un effetto significativo di Shh sulla proliferazione dei progenitori presenti in sostanza bianca e un'influenza specifica di tale sostanza sul differenziamento degli interneuroni inibitori. Abbiamo inoltre verificato la presenza degli elementi essenziali del pathway di Shh (Ptch e Gli1) nella sostanza bianca del cervelletto postnatale, rilevando tramite ibridazione *in situ* e immunofluorescenza la presenza di cellule positive per Pax-2 (marker specifico degli interneuroni inibitori) e tali recettori.

2). Una linea parallela di questo settore di ricerca è dedicata all'analisi dell'efficacia di strategie di sostituzione cellulare nell'ambito di esperimenti traslazionali preclinici su modelli di neuro-degenerazione cerebellare. In particolare, abbiamo indagato la possibilità di sostituzione attraverso trapianto eterotopico/eterocronico delle cellule di Purkinje, i neuroni di proiezione maggiormente compromessi in diversi modelli di atassia spino-cerebellare. Esperimenti condotti su diversi modelli murini caratterizzati dalla degenerazione progressiva delle cellule di Purkinje (topi *tambaleante*, SCA2, ASM knockout) hanno dimostrato la possibilità di sostituire le cellule danneggiate con nuovi neuroni in grado di differenziarsi e integrarsi nella corteccia cerebellare dell'ospite. La possibilità di ottenere un pieno recupero funzionale è tuttavia ostacolata dall'incapacità delle cellule trapiantate di ricostruire le corrette connessioni all'interno dei circuiti danneggiati.

Parallelamente abbiamo studiato il potenziale differenziativo di due diverse linee di cellule staminali umane in seguito a trapianto eterotopico/eterocronico in cervelletti di ratto di età embrionale o postnatale. In particolare, abbiamo verificato che cellule pluripotenti indotte (derivate da fibroblasti umani nel laboratorio di E. Cattaneo) pur integrandosi in diverse regioni dei cervelletti ospiti non si differenziano in nessuna categoria cellulare tipica del cervelletto. Al contrario, cellule staminali neuroepiteliali (prodotte nel laboratorio di A. Smith a partire da tessuto neuroepiteliale delle regioni più caudali dell'encefalo), si differenziano sia *in vitro* sia *in vivo* in una tipologia stabile di neuroni, simili per caratteristiche morfologiche e neurochimiche ai granuli del cervelletto.

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

### **2.3. Reazione del tessuto nervoso al danno**

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

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

I progenitori degli oligodendrociti (PO) sono una popolazione di progenitori presente anche nel tessuto nervoso adulto. Essi sono responsabili del turnover della mielina nel Sistema Nervoso Centrale (SNC) in condizioni fisiologiche e patologiche. La mielina è la guaina lipidica che ricopre gli assoni e ne incrementa la velocità di conduzione degli impulsi nervosi, proteggendoli al contempo da danni metabolici e ossidativi. Alterazioni a carico dei PO possono produrre anomalie mieliniche con conseguente malfunzionamento o danno del SNC. In diversi progetti paralleli studiamo l'equilibrio tra amplificazione e differenziamento in queste cellule, le interazioni anatomiche e funzionali con i neuroni e il loro malfunzionamento in modelli di patologie mieliniche.

**DINAMICHE PROLIFERATIVE E DIFFERENZATIVE DEI PROGENITORI DEGLI OLIGODENDROCITI** Il mantenimento di una corretta proporzione tra proliferazione e maturazione è indispensabile durante il processo di mielinizzazione dopo la nascita, per sostenere il turnover della mielina nel cervello adulto e durante l'invecchiamento e per far fronte alla perdita di mielina causata da danni traumatici, ischemici e infiammatori. Nel tentativo di capire se questi progenitori si mantengano grazie a divisioni di tipo asimmetrico (analoghe a quelle delle cellule staminali che si autorinnovano generando simultaneamente cellule figlie che mantengono un fenotipo staminale e cellule figlie che differenziano) o siano invece

semplicemente biologicamente inestinguibili in quanto prodotti in gran numero dopo la nascita, abbiamo esaminato la segregazione alla mitosi e dopo la citochinesi di una serie di marcatori tipici dello stadio di progenitore o dell'avvio di processi differenziativi. Nessuno tra i marcatori di progenitore espressi dalle cellule madre e selezionati nella nostra analisi è segregato asimmetricamente nelle cellule figlie. Al contrario, marcatori differenziativi appaiono asimmetricamente espressi già in telofase. La proporzione di divisioni simmetriche e asimmetriche rispetto all'espressione dei marcatori differenziativi esaminati varia in condizioni sperimentali differenti (invecchiamento, lesione, arricchimento ambientale) a indicare che l'espressione di questi determinanti è regolata da fenomeni ambientali. In contrasto, i marcatori di progenitore non modificano la propria distribuzione. Quest'evidenza mostra che l'espressione di marcatori proliferativi non è direttamente controllata da segnali estrinseci e suggerisce che le divisioni dei PO non sfruttino meccanismi di divisioni asimmetriche e producano cellule con potenzialità analoghe, la cui maturazione è regolata dall'ambiente. L'analisi d'espressione condotta su cellule isolate direttamente dal tessuto nervoso ha però dimostrato che i PO esprimono molti dei macchinari necessari nelle cellule staminali per la segregazione asimmetrica di determinanti di destino cellulare. Questo dato lascia aperta la possibilità che altri marcatori, e in particolare, alcuni *fate determinants* siano segregati asimmetricamente durante la divisione dei PO. Per verificare quest'ipotesi nel prossimo futuro esamineremo le figure mitotiche di PO per localizzare alcuni componenti del macchinario di segregazione identificati dall'analisi di espressione genica. Inoltre, studi funzionali di overespressione e spegnimento di queste molecole riveleranno se esse agiscano sulla distribuzione dei marcatori da noi esaminati e influenzino la proliferazione e il differenziamento dei PO. Infine, come approccio ulteriore per chiarire se un meccanismo di autoregenerazione basato su divisioni asimmetriche sia necessario per il mantenimento dei PO durante la vita adulta e l'invecchiamento, forniremo a Laura Sacerdote e Roberta Sirovich una serie di misure (numero di PO, frequenza proliferativa, tempi di differenziamento..) utili a verificare le nostre ipotesi con specifici algoritmi.

L'espressione di marcatori di stadio immaturo e di differenziamento in doppietti di PO composti da cellule sorelle suggerisce anche l'esistenza di generazioni diverse di progenitori che, essendo andati incontro a numeri diversi di divisioni successive, posseggono ritmi proliferativi e differenziativi distinti. Dati preliminari indicano che il segnale canonico di Notch si spegne progressivamente nei PO proliferanti durante la maturazione del tessuto nervoso e nell'invecchiamento. L'attività di Notch potrebbe quindi distinguere tra i PO quelli derivati da pochi cicli proliferativi (più "giovani") da altri prodotti attraverso numerosi cicli di divisione (più "maturi"). Esperimenti in linee Hes5CreErt2 chiariranno se le nostre interpretazioni sono corrette.

*Collaborazioni:* MP Abbracchio, Università di Milano; P Rosa, CNR Milano; Laura Sacerdote e Roberta Sirovich, Università di Torino; Paolo Malatesta, Università di Genova; V Taylor, Department of Biomedicine University of Basel

**REGOLATORI INTRINSECI DELLA DIVISIONE CELLULARE NEI PROGENITORI DEGLI OLIGODENDROCITI: RUOLO DELLA CHINASI CITRON** Sul fronte della fisiopatologia dei PO studiamo il ruolo della delezione della chinasi Citron su proliferazione, sopravvivenza e differenziamento dei PO. La chinasi Citron è un regolatore essenziale della citochinesi ma non possiede un'espressione ubiquitaria. Nel sistema nervoso Citron è essenziale per l'esecuzione corretta delle divisioni dei progenitori di alcune popolazioni neuronali. La sua assenza determina la produzione di neuroni multinucleati che muoiono per apoptosi. Nessun difetto era noto a carico del lignaggio gliale. Studiando un ceppo murino KO per Citron, abbiamo scoperto che in assenza di Citron gli oligodendrociti e gli astrociti si riducono fortemente in numero e presentano divisioni difettose che conducono alla formazione di una frazione di cellule multinucleate. La riduzione numerica è disomogenea tra le varie parti del tessuto nervoso. In particolare è particolarmente accentuata nella corteccia cerebrale mentre striato e talamo mantengono un numero maggiore di PO, a suggerire che diverse popolazioni di PO utilizzino diversi macchinari per la divisione. Tuttavia, indipendentemente dalla zona telencefalica esaminata, le proteine della mielina sono sempre assenti a indicare che questi progenitori non procedono nel differenziamento. Al fine di discriminare componenti intrinseche ai PO e estrinseche tissutali responsabili di questo difetto maturativo abbiamo incrociato il ceppo Citron KO con topi P53KO in modo da bloccare i fenomeni apoptotici, eseguito trapianti isocronici di cellule KO o WT in

animali WT e Citron KO, e esaminato il livello d'espressione di molecole inibitrici del differenziamento dei PO in topi Citron KO e WT. Nell'insieme questi esperimenti mostrano che fattori ambientali, oltre che intrinseci ai PO, contribuiscono ai difetti maturativi del lignaggio oligodendrogliale nei mutanti per la chinasi Citron. Nel prossimo anno chiariremo definitivamente con esperimenti in vitro se i PO deleti per Citron possono differenziare fino a produrre proteine della mielina, confermeremo con indagini in microscopia elettronica se in vivo la mielina è del tutto assente nei Citron KO e verificheremo se i PO della corteccia cerebrale risultano maggiormente colpiti dalla perdita di Citron a causa della precoce deplezione di progenitori delle zone ventricolari e sottoventricolari dorsali.

*Collaborazioni:* F di Cunto, Università di Torino; L Bonfanti, Università di Torino

**NATURA E FUNZIONI DELLE INTERAZIONI TRA NEURONI E PROGENITORI DEGLI OLIGODENDROCITI** Sul fronte delle funzioni dei PO e della loro comunicazione con i neuroni, stiamo esaminando i contatti GABAergici presenti su queste cellule durante lo sviluppo postnatale in condizioni fisiologiche nel cervelletto murino. I PO isolati dal tessuto esprimono gli RNA messaggeri per molte tra le subunità dei recettori GABAergici, di tipo A e B. L'espressione di questi messaggeri è mantenuta anche in colture dissociate di PO e subisce una parziale regolazione durante il differenziamento delle cellule e nel corso della maturazione del tessuto nervoso dopo la nascita. Dal punto di vista dell'espressione proteica, studi di immunofluorescenza ad alta risoluzione indicano la presenza di contatti con una composizione nelle porzioni pre e postsinaptiche simile a quella delle sinapsi GABAergiche neuronali. Il numero di questi contatti sulle cellule PO si modifica nel corso delle prime settimane dopo la nascita, a suggerire un ruolo nello sviluppo dei PO. Infine, studi farmacologici in colture organotipiche in vitro indicano che mentre la segnalazione GABAA regola la proliferazione dei PO, i recettori GABAB mediano segnali differenziativi. Ulteriori esperimenti confermeranno e integreranno questi dati: studi farmacologici saranno ripetuti su colture dissociate di PO per distinguere le azioni dirette su PO da quelle mediate da altre componenti cellulari tissutali; allestiremo un modello in vitro che permetta di caratterizzare in maniera più approfondita i contatti tra neuroni e PO; analizzeremo diverse linee murine nelle quali specifiche subunità dei recettori GABAergici (GABAA alpha1, gamma2 e GABAB B1) saranno deletate nei PO in maniera inducibile. Quest'ultimo approccio ci permetterà di capire qual è l'effetto della riduzione dei segnali GABAergici sull'attività dei PO. Prevediamo inoltre di verificare la presenza di contatti GABAergici su tessuto cerebrale umano e/o su colture di cellule umane.

In parallelo, stiamo lavorando sulla possibilità che i PO esercitino funzioni neuromodulatorie e neurotrofiche sui neuroni. La presenza di contatti sinaptici pone queste cellule in una condizione privilegiata per monitorare l'attività neuronale e probabilmente rispondere a essa. Questa possibilità è ulteriormente sostenuta dall'espressione nei PO di una serie di canali ionici utili per il *buffering* del potassio e quindi per la modulazione dell'eccitabilità neuronale. In MEA di colture ippocampali registreremo le variazioni dell'attività elettrica dopo esposizione acuta a PO e le modificazioni a lungo termine della funzionalità della circuiteria dovute a interazioni perduranti tra neuroni e PO. In parallelo, allestiremo modelli in vivo in cui i PO verranno eliminati in maniera regolata. In questo modello esamineremo gli effetti dell'ablazione dei PO sulla circuiteria ippocampale e cerebellare e sulla sopravvivenza neuronale in un modello di sclerosi multipla progressiva (delezione in fase cronica). Possibili effetti neuroprotettivi dei PO saranno anche studiati in vitro in coculture di PO e neuroni corticali trattati con stimoli eccitotossici.

*Collaborazioni:* M Sassoè Pognetto, Università di Torino, E Carbone, Università di Torino), Gianvito Martino (Università San Raffaele)

**EFFETTI BIOLOGICI DELLA OVERESPRESSIONE DI LAMIN B1 NELLA LEUCODISTROFIA AUTOSOMICA DOMINANTE** Stiamo indagando i meccanismi che inducono demielinizzazione nella Leucodistrofia Autosomica Dominante (ADLD), una patologia neurodegenerativa associata a overespressione della proteina nucleare LAMINB1. Abbiamo scoperto che i livelli di LAMINB1 sono molto più elevati nei PO proliferanti rispetto a oligodendrociti premielinizzanti e completamente differenziati. Inoltre, mentre i neuroni adulti mantengono alti livelli d'espressione di LAMINB1, gli astrociti hanno livelli di LAMINB1 molto bassi, inferiori anche a quelli degli oligodendrociti differenziati. Alti livelli d'espressione di LAMINB1 potrebbero quindi alterare in particolare il funzionamento di astrociti e oligodendrociti maturi. Per capire

quali siano gli effetti morfologici e trascrittomici di elevati livelli di LAMINB1 nel lignaggio oligodendrogliale perseguiremo due approcci: i) trasferiremo PO e oligodendrociti maturi murini in vitro e ne valuteremo l'attività proliferativa, la morfologia e l'espressione di proteine della mielina; ii) eseguiremo su PO e oligodendrociti maturi un'analisi 4C per identificare quali sequenze genomiche interagiscano con il promotore di LAMINB1; quest'analisi permetterà di identificare regioni genomiche potenzialmente deregolate dall'overespressione di LAMINB1 nel tessuto patologico nei pazienti di ADLD. Prevediamo anche di terminare il clonaggio di un costrutto (sistema Transposasi PiggyBAC) per l'overespressione di LMNB1 capace di integrarsi nel genoma di cellule proliferanti come i PO mediante elettroporazione in utero o postnatale.

*Collaborazioni:* A Brusco, Università di Torino, L Gasparini, IIT Genova

**EFFETTI DELLE SOSTANZE D ABUSO, STRESS E CURE PARENTALI SU MIELINIZZAZIONE E FUNZIONI METABOLICHE ASTROCITARIE E VULNERABILITA' ALLA PSICOPATOLOGIA** In questo progetto che è in fase iniziale studieremo come condizioni perinatali sfavorevoli note per determinare fenotipi vulnerabili all'insorgenza di condizioni psicopatologiche o di disturbi del comportamento influenzino il funzionamento e il fenotipo gliale. Inoltre, studieremo se il recupero da condizioni psicopatologiche ottenuto con trattamenti farmacologici o arricchimento ambientale reverte i cambiamenti gliali riscontrati. L'oggetto della nostra analisi saranno i PO, la mielina e gli astrociti. Mentre è ben noto che la suscettibilità a fenotipi psicopatologici è codificata nelle funzioni neuronali (plasticità sinaptica e equilibrio tra segnali eccitatori e inibitori in parte attraverso modificazioni epigenetiche, dati recenti indicano che anche le cellule gliali i) sono intimamente coinvolte nelle funzioni cerebrali attraverso la loro capacità di rispondere all'attività neuronale e di modularla; ii) sono influenzate da fattori noti per regolare il rischio individuale di sviluppo di fenotipi psicopatologici; iii) possono subire modificazioni morfologiche e funzionali permanenti in associazione con patologie psichiatriche o con la vulnerabilità o la resistenza individuale all'insorgenza di disfunzioni cerebrali. Valuteremo quindi l'espressione di geni coinvolti del funzionamento e nella maturazione di PO, oligodendrociti e astrociti sui messaggeri estratti da diverse regioni cerebrali (corteccia prefrontale, ippocampo, ipotalamo e ipofisi) di cuccioli e adulti esposti a somministrazione di etanolo durante lo sviluppo uterino e successivamente sottoposti a separazione materna. Quest'analisi ha l'obiettivo di svelare aspetti nuovi del coinvolgimento delle cellule gliali nella definizione della suscettibilità individuale all'insorgenza di disturbi psicopatologici. Le alterazioni gliali riscontrate costituiranno nuovi potenziali bersagli per la terapia. I campioni da analizzare sono stati forniti dal gruppo di ricerca di G Biggio, Università di Cagliari. La stessa analisi verrà condotta su campioni forniti dal gruppo di ricerca di C Eva (vedere sezione dedicata).

*Collaborazioni:* G Biggio Università di Cagliari, C Eva Università di Torino

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

Abbiamo di recente dimostrato che NogoA e il suo recettore NgR1, noti inibitori della plasticità assonale e sinaptica nel sistema nervoso centrale, regolano la neurogenesi della zona sottoventricolare secondo un meccanismo di feedback negativo operato dalla molecola NogoA presente sui neuroni neogenerati sul recettore NgR1 espresso dagli astrociti germinativi. Proseguiremo questo studio ponendoci 4 domande: i) quali sono i meccanismi di trasduzione intracellulare di NgR1 nelle staminali della zona sottoventricolare? Dati preliminari ottenuti in vitro e in vivo indicano che l'azione di NgR1 e del pathway di PTEN sono sinergiche e che l'antagonizzazione di NgR1 promuove l'inattivazione di Pten, a suggerire che le due vie siano direttamente interconnesse. Non è chiaro se la chinasi ROCK sia la protagonista di questa interazione poiché non vediamo effetti dovuti all'inibizione farmacologica di ROCK in esperimenti in vitro. Inoltre, il coinvolgimento di altri potenziali interattori (PI3K, AKT, mTor1, mTor2, GSK3) rimane da esaminare; ii) l'azione di stimolazione della migrazione dei neuroblasti operata da NogoA nella RMS è mediata da un effetto cell autonomous o è dovuta all'espressione di un recettore non noto da parte dei neuroblasti? Risponderemo a queste domande studiando in vivo gli effetti della delezione di NogoA in neuroblasti isolati e verificando se solo i neuroblasti deletati rallentano la propria migrazione o invece si comportano come quelli esprimenti NogoA. Questo tipo di delezione verrà ottenuta in animali GLASTCreErt2YFPNogoAfloxed



o iniettando nella zona sottoventricolare piccole quantità di vettori virali LCMVCre o AdenoGFAPCre capaci di bersagliare le cellule staminali. In approcci paralleli in vitro, verificheremo anche se trattamenti con eparinasi o inibitori dei sindecani interferiscono con l'azione promigratoria di NogoA. Molecole digerite dall'eparinasi e alcuni sindecani potrebbero infatti interagire con NogoA e stimolare la migrazione; **iii**) NogoA/NgR1 regolano anche la neurogenesi ippocampale? L'azione di questo meccanismo di segnalazione è influenzata dall'attività elettrica? Dati preliminari indicano che NgR1 è espresso da astrociti ippocampali inclusi elementi radiali dello strato sottogranulare bona fide stem cells. NogoA è invece espresso dai neuroni dello strato dei granuli. Deletando NogoA come descritto precedentemente verificheremo se la sua assenza altera la maturazione dei neuroni dei granuli e induce modificazioni nel ritmo proliferativo dei progenitori ippocampali. Prevediamo anche di sviluppare costrutti virali per il silenziamento di Ngr1 ; **iv**) qual è il ruolo di NgR1 nell'astrogliosi? Gli astrociti reattivi sovraesprimono NgR1. Dati preliminari in vitro suggeriscono che il recettore partecipi nel processo di polarizzazione e proliferazione che determina la formazione della cicatrice gliale. Confermeremo questi dati in altri esperimenti e analizzeremo anche il cambiamento delle attività neurotrofiche/neurosupportive delle astrociti in presenza di agenti stimolanti o inibenti NgR1.

Le cellule staminali adulte, come le cellule staminali mesenchimali (MSC) possono modulare, quando trapiantate in modelli animali di patologie neurologiche, la risposta immunitaria patologica nel sistema nervoso centrale (SNC) promuovendo neuroprotezione e neurogenesi. Sebbene il loro preciso meccanismo di azione non sia stato ancora del tutto chiarito, l'effetto terapeutico è probabilmente dovuto alla capacità di rilasciare molecole terapeutiche in risposta a stimoli ambientali, piuttosto che a un mero differenziamento in senso neurale. In collaborazione con Antonio Uccelli ci proponiamo di capire se le MSC (o il loro secretoma) siano in grado di promuovere la proliferazione e indurre il differenziamento delle cellule staminali neurali e di studiare gli effetti delle MSC e del loro secretoma (proteine solubili, trasferimento cellula-cellula tramite micro/nanovesicole) sui "pathway" molecolari che controllano il differenziamento e le azioni neurotrofiche e neuromodulatorie degli astrociti.

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

*Altre attività in collaborazione:*

Silvia De Marchis (NICO, Università di Torino): Analisi dell'espressione di PlexinC1, Sema7A e IntegrinB1 in popolazioni isolate di neuroblasti PSA-NCAM+ e cellule staminali GLAST+ di SVZ e SGZ

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

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

### **3. Prodotti delle attività di ricerca anno 2013**

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

Brilli E, Reitano E, Conti L, Conforti P, Gulino R, Consalez G, Cesana E, Smith A, Rossi F, Cattaneo E (2013) Neural stem cells engrafted in the adult brain fuse with endogenous neurons. *Stem Cell Dev* 22:538-547

Magrassi L, Leto K, Rossi F (2013) The lifespan of neurons is uncoupled from organismal lifespan. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 110: 4374-4379

Faralli A, Bigoni M, Mauro A, Rossi F, Carulli D (2013) Non-invasive strategies to promote functional recovery after stroke. *Neural Plast* 2013: 854597

Taylor J, Kittappa R, Leto K, Gates M, Borel M, Paulsen O, Spitzer S, Karadottir RT, Rossi F, Falk A, Smith A (2013) Stem cells expanded from the human embryonic hindbrain stably retain regional specification and high neurogenic potency. *J Neurosci* 33: 12407-12422

Buffo A, Rossi F (2013) Origin, lineage and function of cerebellar glia. *Prog Neurobiol* 109: 42-63.  
Carulli D, Foscarin S, Faralli A, Pajaj E, Rossi F (2013) Modulation of semaphorin3A in perineuronal nets during structural plasticity in the adult cerebellum. *Mol Cell Neurosci* 57: 10-22

Fratangeli A, Parmigiani E, Fumagalli M, Lecca D, Benfante R, Passafaro M, Buffo A, Abbracchio MP, Rosa P. (2013) The regulated expression, intracellular trafficking, and membrane recycling of the P2Y-like receptor GPR17 in Oli-neu oligodendroglial cells. *J Biol Chem* 288: 5241-56

Montarolo F, Parolisi R, Hoxha E, Boda E, Tempia F (2013) Early enriched environment exposure protects spatial memory and accelerates amyloid plaque formation in APP(Swe)/PS1(L166P) mice. *PLoS One*. 2013 8:e69381

Vo T, Carulli D, Ehlert EM, Kwok JC, Dick G, Mecollari V, Moloney EB, Neufeld G, de Winter F, Fawcett JW, Verhaagen J (2013) The Chemorepulsive Axon Guidance Protein Semaphorin 3A is a Constituent of Perineuronal Nets in the Adult Rodent Brain. *Mol Cell Neurosci* 56: 186-200

Leto K, Rossi F (2013) Neural Transplantation: evidence from the rodent cerebellum. In RA Meyers (Ed) *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, Wiley Blackwell, Oxford (in press)

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

F. Rossi, Phenotypic specification and differentiation in cerebellar development; National Institute of Neuroscience (NCNP) a Kodaira, Tokyo, 22 Aprile 2013

F. Rossi, Research on Ageing at the University of Turin, Italian-Japanese Colloquium on Ageing Society, Istituto Italiano di Cultura, Tokyo, 23 Aprile 2013.

F. Rossi, Neural Stem Cell Therapies, Symposium "Brain Research: Broadening the Understanding", Al-Quds University, East Jerusalem, 2 Giugno 2013.

F. Rossi, Science in Torino between two wars - the school of Giuseppe Levi. Symposium "Dare to Know, Startup! A Tribute to Rita Levi Montalcini", The Peres Center for Peace, Jaffa, 3 June 2013

F. Rossi, Maturazione Normale e Patologica del Sistema Nervoso: Sviluppo e Plasticità. Fondazione Ferrero, Alba, 17 Giugno 2013.

F. Rossi, Neurogenesis and gliogenesis in the cerebellum, Gordon Conference on Cerebellum, Colby-Sawyer College, New London, NH, 15 Agosto 2013.

F. Rossi, Neural stem cells, Hydra IX 2013: European Summer School on Stem Cells & Regenerative Medicine, Hydra, 8 Settembre, 2013.

F. Rossi, Meccanismi evolutivi e adattamento neurale, Convegno, "Evoluzione e Cervello. Incontro dedicato ai 70 anni di Aldo Fasolo. Torino, 22 Novembre 2013.

A Buffo e Silvia De Marchis - Proposta e organizzazione del Simposio 'Beyond cell replacement: functional plasticity and homeostatic activities of adult stem and progenitor cells', XV congresso SINS, 3-5 ottobre Roma

A Buffo – 'Plasticity of the germinal niche: roles of Nogo-A and Nogo Receptor 1 in the homeostatic regulation of adult neurogenesis', XV congresso SINS, 3-5 ottobre Roma

A Buffo, Nicchie staminali nel sistema nervoso centrale adulto: fisiopatologia della neurogenesi ippocampale e potenzialità riparative della glia reattiva, X Corso di Neuroscienze Città di Catania, 3-6 Aprile 2013

E. Boda, "Dynamics of self-renewal and differentiation of the oligodendrocyte progenitor pool in the CNS parenchyma" Istituto di Neuroscienze CNR, Milano, 28 Novembre 2013

**3.2.1. Abstract presentati a congressi nazionali e internazionali:**

Boda E, Piretta S, Bianchi F, Di Cunto F, Buffo A. Intrinsic mechanisms regulating oligodendrocyte progenitor cell division: the role of Citron-kinase. XI European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, Berlin, 3-6 July 2013

Rolando C, Parolisi R, Boda E, Rossi F, Taylor V, Buffo A Distinct roles of Nogo-A and Nogo receptor 1 in the homeostatic regulation of adult Neural Stem Cell function. XI European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, Berlin, 3-6 July 2013

Frola E, Boda E, Pregno G, Barrile R, Serra G, Sassoè M, Buffo A. GABAergic synapses on oligodendrocyte precursors: characterization and role of synaptic components in the postnatal cerebellum. ESF-FENS The Brain Conferences, The Neurobiology of Synapses and their Dysfunction, 13-17 October 2013, Stresa, Italy

Ferrero M, Giorgio E, Boda E, Di Gregorio E, Vaula G, Mandich P, Gahl W, Pinto Vairo F, Boespflug-Tanguy O, Cortelli P, Brussino A, Buffo A, Brusco A. Lamin B1 dysregulation in Autosomal Dominant Leukodystrophy (ADLD): genetics and biological mechanisms Congress of the Italian Society of Neuroscience (SINS) 2013, Rome, October 2013

Boda E, Di Maria S, Rosa P, Abbracchio MP, Buffo A Dynamics of self-renewal and differentiation of the oligodendrocyte progenitor pool in the CNS parenchyma Congress of the Italian Society of Neuroscience (SINS) 2013, Rome, October 2013

Pregno G, Boda E, Frola E, Barrile R, Serra G, Sassoè M, Buffo A. GABAergic synapses on oligodendrocyte precursors: characterization and role of synaptic components in the postnatal cerebellum. Congress of the Italian Society of Neuroscience (SINS) 2013, Rome, October 2013

Boda E, Frola E, Pregno G, Barrile R, Serra G, Sassoè M, Buffo A. GABAergic synapses on oligodendrocyte precursors: characterization and role of synaptic components in the postnatal cerebellum. National Congress of the Italian Society of Pharmacology (SIF), Turin, October 2013

Schellino R, Jongbloets B, Boda E, Buffo A, Fasolo A, Peretto P, Pasterkamp J, De Marchis S. Ruolo di Semaforina7A e PlexinaC1 nel controllo della neurogenesi adulta nel bulbo olfattivo di topo. Convegno del Gruppo Embriologico Italiano, Varese, June 2013

Schellino R, Jongbloets B, Boda E, Buffo A, Fasolo A, Peretto P, Pasterkamp J, De Marchis S. A role for Semaphorin7A and plexinC1 in the regulation of adult neurogenesis in the mouse accessory olfactory bulb. EMBO Workshop, Semaphorin function and mechanisms of action, 29-31 October 2013, Cernay-la-Ville, France

Pellegrino RM, Boda E, Boero M, Montarolo F, Volpengo A, Saglio G, Buffo A, Roetto A. Analysis of iron metabolism in TFR2-targeted animal brain. International Biolron Society Meeting, University College London, April 14 – 18, 2013

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

A Buffo: partecipazione in qualità di esperto all'iniziativa di terza missione Scienza Attiva per il tema Cellule Staminali aa 2012-2013

A Buffo: 'Incontri ravvicinati di tipo staminale', seminario per la giornata Nazionale sulle Cellule Staminali, UNISTEM, Torino, 15 marzo 2013

E Boda: 'The biology of neural stem cells: what's going on in our labs', conferenza al liceo scientifico sperimentale Cocito di Alba

A Buffo, E Boda e E Parmigiani: attività di laboratorio e laboratori per l'orientamento e la divulgazione della cultura scientifica nelle scuole superiori; partecipazione alla Scientifica Summer Academy (Agorà Scienza e Fondazione Agnelli) 17-21 giugno 2013

#### **3.3.2. Attività di promozione e divulgazione**

Annalisa Buffo ha ospitato Androniki Voulgari-Kokota del laboratorio di Antonio Uccelli, Department of Neuroscience, Ophthalmology and Genetics, University of Genoa, per apprendere tecniche di colture di astrociti primari, colture di staminali neurali e assay funzionali su queste cellule

## **4. Finanziamenti per la ricerca**

### **4.1. Fondi di ricerca ricevuti nel 2013**

Progetto Europeo: "European Stem Cell Consortium for Neural Cell Replacement, Reprogramming and Functional Brain Repair (Neurostemcellrepair)" ( F. Rossi) € 405.000

Progetto Università di Torino (ex-60%) "Strategie di sostituzione cellulare in modelli murini di degenerazione delle cellule di Purkinje" (K. Leto) € 2.609,18

### **4.2. Fondi di ricerca ricevuti prima del 2013 ed ancora attivi**

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) 32.970 EUR

E Boda, Borsa Post-dottorato per gli Studi in Neurobiologia, Fondazione Giuseppe Levi, Accademia Nazionale dei Lincei, Progetto: "Oligodendrocyte progenitor self-renewal and differentiation: insights into symmetric and asymmetric divisions and possible implications in dysmyelination following peri-natal hypoxia", € 20.000

Progetto delle attività di ricerca per il 2014 del gruppo **Electrophysiology and Neurodegeneration**, presso l'Istituto di Neuroscienze della Fondazione Cavalieri-Ottolenghi (NICO)

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

## **1. Composizione del gruppo di ricerca**

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

1.2. Personale non strutturato  
Eriola Hoxha (postdoc)

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

## **2. Progetti di ricerca**

### **lines of research:**

- alterations of intrinsic and synaptic properties of central neurons in murine models of Alzheimer's disease, with a specific line of research on Kv3 potassium channels
- role of neuronal activity on the progression of the pathological lesions in murine models of Alzheimer's disease
- mechanisms of spread of pathological lesions in Alzheimer's disease models, by means of transplantation
- role of novel genes that our preliminary results show to be involved in autism.

### **2.1. Atassie**

#### **2.1.1. Atassia spino-cerebellare tipo 28 (SCA28)**

La ricerca sulle atassie riguarda i meccanismi di una forma ereditaria di atassia spino-cerebellare denominata SCA28 e di nuovi modelli di atassia. Negli ultimi anni, una 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). Inoltre il nostro laboratorio, in collaborazione con il Dott. Alfredo Brusco, ha studiato il pattern di espressione del gene Afg3l2 e dei suoi due paraloghi Afg3l1 and Spg7 nell'encefalo di topi normali. I risultati hanno mostrato 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 2013 abbiamo iniziato lo studio di questo modello animale di SCA28. Sono stati eseguiti test motori al fine di rilevare l'insorgenza dei sintomi, 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 ha fornito i tessuti per la coltura di mouse embryonic fibroblasts (MEFs). Nel 2014 abbiamo in programma di determinare le cause della ridotta vitalità dei topi SCA28-KI omozigoti. 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.

#### **2.1.2. A nuova atassia spino-cerebellare non ancora classificata**

Il laboratorio del Dott. Alfredo Brusco nel corso di questo anno ha identificato il gene responsabile per una nuova forma di SCA. Il nostro gruppo di ricerca ha studiato il pattern di espressione del gene e della

proteina nel topo. In collaborazione con il Prof. Mauro Papotti abbiamo inoltre studiato l'espressione a livello proteico in campioni autoptici di soggetti sani.

### **2.1.3. Topi knock-out per Ebf2**

Gli studi sul modello di atassia causata dalla delezione del gene Ebf2 hanno evidenziato una diminuzione della risposta dei recettori GABA-A postsinaptici delle cellule di Purkinje. Questa alterazione era accompagnata da un aumento del rilascio multivescicolare. Questi risultati richiedono un approfondimento con l'obiettivo di identificare i meccanismi responsabili di queste alterazioni.

### **2.1.4. Atassia spino-cerebellare tipo 27 (SCA27)**

In collaborazione con la prof.ssa Fernanda Laezza della University of Texas Medical Branch at Galveston (USA) intendiamo iniziare uno studio sui meccanismi della atassia nei topi knock-out, modello della SCA27. Il focus di questa ricerca riguarda le alterazioni sinaptiche nel cervelletto. Ci aspettiamo un difetto nel rilascio di neurotrasmettitore. Una volta individuato e caratterizzato il tipo di alterazione, cercheremo di progettare una terapia farmacologica.

## **2.2. 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 tre ceppi di topi transgenici che esprimono rispettivamente 2 o 3 geni umani mutati, responsabili di AD familiare. Il primo di questi (Hsiao et al., 1996) esprime il gene della proteina precursore dell'amiloide (amyloid precursor protein, APP) con la doppia mutazione Swedish. Il secondo (Radde et al., 2006) esprime i transgeni della APP e della presenilina 1 (PSEN1) e presenta un'amiloidosi precoce e massiva. Il terzo (Oddo et al., 2003), oltre all'amiloidosi cerebrale, presenta anche grovigli neurofibrillari dovuti all'espressione di un terzo transgene, codificante la proteina tau (MAPT) mutata.

Nel 2012 abbiamo pubblicato che le cellule di Purkinje del cervelletto presentano delle alterazioni funzionali, attribuibili alla diffusione di peptide beta-amiloide extracellulare. In collaborazione con la prof.ssa Fernanda Laezza della University of Texas Medical Branch at Galveston (USA) abbiamo registrato i neuroni granulari del giro dentato dell'ippocampo dei topi APP, trovando delle profonde alterazioni dell'eccitabilità di membrana. Inoltre, in collaborazione con il prof. Giulio Tagliatela della University of Texas Medical Branch at Galveston (USA) abbiamo osservato che i pazienti con morbo di Alzheimer hanno un'alterata espressione di un tipo di canale del potassio essenziale per il funzionamento dei neuroni a scarica rapida di potenziali d'azione.

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. Questa linea di ricerca proseguirà con una collaborazione con il Prof. Nicola Abate e il Prof. Giulio Tagliatela della University of Texas Medical Branch at Galveston (USA), con cui studieremo le alterazioni sinaptiche a livello dell'ippocampo in un modello murino di sindrome metabolica.

Gli esperimenti sul ruolo della proteina HSP47 nel morbo di Alzheimer, in collaborazione con il Prof. Ferdinando Di Cunto, si sono conclusi nel 2013. Abbiamo effettuato un trial di un farmaco che agisce su HSP47 con esito negativo sia sulla memoria spaziale sia sul numero di placche amiloidi.

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

*Collaborazioni:*

Fernanda Laezza, Dept. of Pharmacology and Toxicology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX (USA)

Giulio Tagliatela, Dept. of Neuroscience, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX (USA).

Alfredo Brusco, Dept. di Genetics, Biology and Biochemistry, University di Turin (Italy)

Gian Giacomo Consalez, Vita-Salute San Raffaele University, Milan (Italy)

Frank M. LaFerla, Dr. Salvatore Oddo, Dept. of Neurobiology and Behavior, Univ. of California, Irvine, USA

Innocenzo Rainero, Dept. of Neuroscience, University of Turin (Italy)

Ferdinando Di Cunto, Molecular Biotechnology Center, University di Turin (Italy)

Giorgio Casari, Vita-Salute San Raffaele University, Milan (Italy)

### **3. Prodotti delle attività di ricerca nel periodo novembre 2012- novembre 2013**

#### **3.1. Articoli pubblicati con affiliazione al NICO**

Hoxha E, Tonini R, Montarolo F, Croci L, Consalez GG, Tempia F (2013) Motor dysfunction and cerebellar Purkinje cell firing impairment in Ebf2 null mice. Mol Cell Neurosci 52: 51-61. (doi:10.1016/j.mcn.2012.09.002)

Di Gregorio E, Bianchi FT, Schiavi A, Chiotto AM, Rolando M, Verdun di Cantogno L, Grosso E, Cavalieri S, Calcia A, Lacerenza D, Zuffardi O, Retta SF, Stevanin G, Marelli C, Durr A, Forlani S, Chelly J, Montarolo F, Tempia F, Beggs HE, Reed R, Squadrone S, Abete MC, Brussino A, Ventura N, Di Cunto F, Brusco A. (2013) A de novo X;8 translocation creates a PTK2-THOC2 gene fusion with THOC2 expression knockdown in a patient with psychomotor retardation and congenital cerebellar hypoplasia. J Med Genet. 50: 543-551. (doi:10.1136/jmedgenet-2013-101542)

Montarolo F, Parolisi R, Hoxha E, Boda E, Tempia F (2013) Early enriched environment exposure protects spatial memory and accelerates amyloid plaque formation in APP<sup>Swe</sup>/PS1<sup>L166P</sup> mice. PLoS ONE 8(7): e69381. (doi:10.1371/journal.pone.0069381)

Sadallah M, Tempia F (2013) Spreading of amyloidosis to unaffected areas of the hippocampus studied in vivo by nervous tissue transplantation. 43<sup>rd</sup> annual meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, CA, USA, November 9-13, 2013. Abstract

#### **3.1.1. Manoscritti in preparazione non ancora sottomessi**

Hoxha E, Croci L, Consalez G, **Tempia F**. Enhancement of GABAergic synapses onto cerebellar Purkinje cells in Ebf2 null mice (manuscript in preparation)

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

Sadallah M, Labat-Gest V, **Tempia F**. Propagation of amyloid pathology to transplanted healthy embryonal brain tissue from a transgenic model of Alzheimer's disease (manuscript in preparation)

Sadallah M, Labat-Gest V, **Tempia F.** Role of JNK2 in the propagation of amyloid pathology to transplanted healthy embryonal brain tissue in a transgenic model of Alzheimer's disease (manuscript in preparation)

#### **4. Finanziamenti per la ricerca**

##### **4.1. Finanziamenti per la ricerca ricevuti nel 2013**

PRIN "Atassie ereditarie, uno studio integrato: dall'approccio genomico ai meccanismi patogenetici mediante modelli animali e cellulari" (coordinatore: Prof. Giorgio Casari)

Ricerca locale Università di Torino 2013

##### **4.2. Fondi di ricerca ricevuti prima del 2013 ed ancora attivi**

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

-Ricerca locale Università di Torino 2012



Progetto delle attività di ricerca per il 2013 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 (1-11-2013)**

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

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

### **1.2. Personale non strutturato**

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

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

## **2. Progetti di ricerca**

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, malattia di Parkinson, epilessia e Alzheimer)**

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

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

### **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 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 $\beta$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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 $\beta$  (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 $\beta$  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 $\beta$ 1-42 in forma monomerica od oligomerica**

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

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

Sebbene ormai tutti concordino sul ruolo cruciale esercitato dall'A $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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), N. Galeotti (Università di Firenze) e G. Cavaletti (Università Milano Bicocca).

### **2.9 Lesioni del midollo spinale**

La nostra ricerca è rivolta a studiare diversi aspetti della fisiopatologia del trauma spinale in modelli murini: utilizziamo infatti diversi modelli di lesione (compressione, contusione ed emisezione), che ci permettono di studiare la neuroinfiammazione, la formazione della cisti gliale, la degenerazione assonale.

Come approccio terapeutico usiamo cellule staminali mesenchimali e precursori neurali, capaci di fornire alle cellule dell'ospite sostanze trofiche e immunomodulatorie. Intendiamo ricorrere anche alla stimolazione cerebrale (rTMS e tDCS), per migliorare la ricrescita degli assoni corticospinali, supportare le prestazioni motorie e promuovere la plasticità neurale.

Infine, abbiamo recentemente intrapreso con il gruppo del Dott. Terreno una collaborazione allo scopo di marcare le cellule mesenchimali con agenti di contrasto a base di gadolinio, in modo da riuscire a identificare le cellule trapiantate nel midollo spinale e seguire la loro migrazione nel parenchima mediante MRI.

*Collaborazioni:* D. Garbossa (A.O. Città della Salute e della Scienza, Molinette, Torino), K. Sacco e R. Ricci (Dip. Psicologia, Torino), E. Terreno (Molecular Biotechnology Center, Torino)

## **3. Prodotti delle attività di ricerca anno 2013**

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

Innocenti GM, Vercelli A, Caminiti R. The Diameter of Cortical Axons Depends Both on the Area of Origin and Target. *Cereb Cortex*. 2013 Mar 25. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23529006

Cauda F, Vercelli A. How many clusters in the insular cortex? *Cereb Cortex*. 2013 Nov;23(11):2779-80

Cauda F, Torta DM, Sacco K, D'Agata F, Geda E, Duca S, Geminiani G, Vercelli A. Functional anatomy of cortical areas characterized by Von Economo neurons. *Brain Struct Funct.* 2013 Jan;218(1):1-20

Vercelli A., Boido M. "Spinal cord injury", capitolo nel libro "Neurobiology of Brain Disorders", pubblicato da Michael J. Zigmond, Joseph T. Coyle, Lewis P. Rowland. Elsevier New York

### **3.1.1. In press**

Valsecchi V., Boido M., Piras A, Spigolon G., Vercelli A. Motor and molecular analysis to detect the early symptoms in a mouse amyotrophic lateral sclerosis model. *Health*, Vol.5, No.10A3, 2013.

d'Errico P., Boido M., Piras A., Valsecchi V., De Amicis E., Locatelli D., Capra S., Vagni F., Vercelli A., Battaglia G. Selective vulnerability of spinal and cortical motor neuron subpopulations in delta7 SMA mice. *Plos One*

Cauda F, Geminiani C, Vercelli A. Anatomical and functional Lateralization of the insular cortex. In *Insula: Neuroanatomy, Functions and Clinical Disorders*, Ed. Uddin L., Nova Science Publisher.

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

A. Vercelli, Staminali cosa sono e cosa servono? Torino, Politecnico, 9 giugno 2013

A. Vercelli, , Sviluppo normale e patologico della corteccia cerebrale, Fondazione Ferrero, Alba (CN), 17 giugno 2013

A. Vercelli: Partecipazione al simposio "I am not my body, I am my mind" nell'ambito di "2013: year of the Italian Culture in the US", Ambasciata Italiana a Washington, 13 dicembre 2013

### **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

SMArathon