

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO**

Procedura di selezione per la chiamata a professore di II fascia da ricoprire ai sensi dell'art. 18, comma 1, della Legge n. 240/2010 per il settore concorsuale 05/F1 - Biologia Applicata, (settore scientifico-disciplinare BIO/13 - Biologia Applicata) presso il Dipartimento di Dipartimento di BIOTECNOLOGIE MEDICHE E MEDICINA TRASLAZIONALE, (avviso bando pubblicato sulla G.U. n. 68 del 27/08/2019) - Codice concorso 4230

[Daniele Bottai]  
**CURRICULUM VITAE**

**INFORMAZIONI PERSONALI (NON INSERIRE INDIRIZZO PRIVATO E TELEFONO FISSO O CELLULARE)**

COGNOME	BOTTAI
NOME	DANIELE
DATA DI NASCITA	[ 17/07/1964]

**A) ATTIVITÀ DIDATTICA, DI DIDATTICA INTEGRATIVA E DI SERVIZIO AGLI STUDENTI**

*Professore aggregato BIO/14 - FARMACOLOGIA*

1) **2008-2020** Titolare dell'insegnamento di Farmacologia del corso integrato di Medicina e Farmacologia, corso di Laurea in Infermieristica, sezione Garbagnate-Rho.

2) **2017-2020** Titolare dell'insegnamento di Farmacologia del corso integrato di Medicina e Farmacologia, corso di Laurea in Infermieristica, sezione Magenta.

3) **2010-2020** Titolare dell'insegnamento di Farmacologia nella Scuola di Specializzazione in Otorinolaringoiatria e Maxillo faciale.

4) **2010-2020** Titolare dell'insegnamento di Farmacologia nella Scuola di Specializzazione in Oftalmologia.

5) **2012-2013** Titolare dell'insegnamento di Farmacologia del corso interdisciplinare clinico per il corso di Laurea in Fisioterapia, sezione San Paolo.

6) **2011-2012** Titolare dell'insegnamento di Farmacologia del corso integrato di Primo soccorso, corso di Laurea in Fisioterapia, sezione Don Gnocchi.

7) **2007-2010** Titolare dell'insegnamento di Farmacologia del corso integrato di Medicina Generale e Specialistica, corso di Laurea in Fisioterapia, sezione Don Gnocchi.

8) **2007-2008** Docente dell'insegnamento di Farmacologia del corso integrato di Medicina e Farmacologia, corso di Laurea in Infermieristica, sezione Humanitas (Titolare del modulo "Farmacologia Generale" di 23 ore).

9) **2017-2019** Docente dell'insegnamento Neuroscienze Scuola di Specializzazione in Neuropsichiatria infantile.

10) *Attività didattica integrativa-seminariale*

**2006-2009** Docente dell'insegnamento di Farmacologia del corso integrato di Medicina e Farmacologia, corso di Laurea in Infermieristica, sezione San Paolo. **2006-2007, 2008-2009** Docente dell'insegnamento di Farmacologia del corso integrato di Medicina e Farmacologia, corso di Laurea in Infermieristica, sezione Humanitas.  
**2006-2007, 2008-2009** Docente dell'insegnamento di Farmacologia del corso integrato di Medicina e Farmacologia, corso di Laurea in Infermieristica, sezione Humanitas.  
**01-06-2013** Relatore al Corso di Aggiornamento Residenziale con ECM GOAL-GLAUCCOM

**11) Corsi elettivi**

**2006-2007, 2007-2008, 2008-2009, 2009-2010, 2010-2011, 2011-2012 e 2012-2013** (Proponente). Preparazione di cellule staminali neurali da topi adulti.

**2006-2007, 2007-2008, 2008-2009 e 2009-2010**

Cellule staminali: stato della ricerca, aspetti etici e prospettive terapeutiche.

**2006-2007, 2007-2008, 2008-2009 e 2009-2010**

Uso improprio di farmaci e pseudofarmaci.

**2007-2008 e 2008-2009**

Cellule staminali: applicazioni cliniche.

**12) Corsi effettuati prima dell'entrata in servizio come ricercatore presso l'Università degli Studi di Milano**

**1992-1993** Collaborazione all'attività didattica integrativa per il corso di Fisiologia Sperimentale e Neurobiologia, Dipartimento di Fisiologia e Biochimica dell'Università degli Studi di Pisa.

**2002** Docente al corso teorico pratico

Le ulcere cutanee: il problema sociale, la clinica, i trattamenti avanzati.

Azienda Ospedaliera S. Camillo-Forlanini, Roma, 29-30 Novembre, 2-3 Dicembre 2002.

**Marzo 2003** Docente al corso

Fisiologia delle cellule staminali neurali. Master di Bioetica, Università di Camerino.

**13-10-2004** Docente al corso

Stem Cells Day Agorà. DakoCytomation (Formazione Continua) Milano.

**02-05-2005** Docente al corso

Cellule staminali somatiche: modelli sperimentali e prospettive cliniche. Giornata di Studio, Brescia.

**13) Supervisione di studenti per la preparazione della tesi di laurea**

**2006** Università degli Studi di Milano. Tesi dal titolo "La progressione del tumore polmonare non a piccole cellule correla con l'espressione della Chinasi di Adesione Focale." Elaborato Finale di Roberta Urso. Relatore Prof. A. Gorio, correlatore Dott. Daniele Bottai.

**2006** Università degli Studi di Milano. Tesi dal titolo "Potenzialità terapeutiche delle cellule staminali nelle patologie perinatali." Elaborato Finale di Rita Chivilò. Relatore Professoressa A. M. Di Giulio, correlatore Dott. Daniele Bottai.

**2009** Università degli Studi di Milano. Tesi dal titolo "Studio Funzionale della Maturazione di Cellule Staminali Neurali" Elaborato Finale di Melissa Sorrosina. Relatore Dott. A. Formenti, correlatore Dott. Daniele Bottai.

**2010** Università degli Studi di Milano. Tesi dal titolo "Studio sulle cellule staminali e possibili implicazioni in riabilitazione" Elaborato Finale di Eleonora Ferrisi. Correlatore Dott. Daniele Bottai

**2011** Università degli Studi di Milano. Tesi dal titolo "Isolamento, coltura e caratterizzazione delle cellule di liquido amniotico da parti cesarei a termine, con valutazione del loro potenziale terapeutico nelle lesioni spinali" Elaborato Finale di Giuseppe Scesa.

Valutazione 110/110 e Lode Relatore Prof Giorgio Racagni, Correlatore Dott. Daniele Bottai.

**2012** Università degli Studi di Milano. Tesi dal titolo "Analisi molecolare dell'azione terapeutica indotta dal trapianto di cellule del liquido amniotico del terzo trimestre in un modello murino di lesione spinale" Elaborato Finale di Silvia Biggi. Valutazione 110/110. Relatore Dott. Daniele Bottai, Correlatore Prof. Alfredo Gorio.

**2014** Università degli Studi di Milano. Tesi dal titolo: "Caratterizzazione di cellule staminali neurali estratte da topi con ridotta attività motoria" Elaborato Finale di Fabrizio Estivi.

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico Relatore Dott. Laura MARABINI, correlatore Dott. **Daniele Bottai**. (17-10-2014).

**2015** Università degli Studi Milano. Tesi dal titolo: “**EFFETTI DELLA DEPRIVAZIONE MOTORIA SULLA NEUROGENESI**” Elaborato Finale di Annalisa Maggio. Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Mediche e Medicina Molecolare. Valutazione 108/110. Relatore Prof Diego M Fornasari, correlatore Dott. **Daniele Bottai**. (24-02-2015).

**2016** Università degli Studi Milano. Tesi dal titolo: “**EFFECTS OF MOTOR DEPRIVATION ON NEUROGENESIS**” Elaborato Finale di Jessica Pagano. Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Mediche e Medicina Molecolare. Valutazione 110/110 e Lode e menzione di merito. Relatore Prof Diego M Fornasari, correlatore Dott. **Daniele Bottai**. (05-10-2016).

**2017** Università degli Studi Milano. Tesi dal titolo: “**La neurogenesi nel modello Hindlimb Unloading: uno studio sulla limitazione di movimento**” Elaborato Finale di Gianmarco Spata. Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico. Relatore Dott. Laura MARABINI, correlatore Dott. **Daniele Bottai**.

**2018** Università degli Studi Pavia. Tesi dal titolo: “**Preparazione di cellule staminali pluripotenti indotte a partire da cellule ottenute dalle urine provenienti da pazienti affetti da Atrofia Muscolare Spinale e consanguinei sani**” Elaborato Finale di Federico Savino. Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata. Relatore Professoressa Silvia Garagna, correlatore Dott. **Daniele Bottai**. Valutazione 104/110 (23/02/2018).

#### **Scuole di dottorato**

Membro del collegio dei docenti del corso di Dottorato di ricerca in Fisiopatologia, Farmacologia, Clinica e Terapia delle Malattie Metaboliche, Università degli Studi di Milano (anni 2007-2012).

Membro del collegio dei docenti del corso di Dottorato di ricerca RICERCA BIOMEDICA INTEGRATA Università degli Studi di Milano (dal 2013 al 2017). Nell'ambito della scuola di dottorato RICERCA BIOMEDICA INTEGRATA ha svolto un incarico di insegnamento dal titolo: **Meccanismi ciclici di eventi oscillatori in biologia (R23-9) (Eventi oscillatori nelle cellule staminali)**.

Membro del collegio dei docenti del corso di Dottorato di ricerca MEDICINA MOLECOLARE E TRASLAZIONALE (2017-2018).

## **B) ATTIVITÀ DI RICERCA SCIENTIFICA**

### **1) PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE**

1) Adami R. and **Bottai D.** Spinal Muscular Atrophy Modeling and Treatment Advances by Induced Pluripotent Stem Cells Studies. Stem Cell Reviews and Reports. July 2019 DOI: 10.1007/s12015-019-09910-6 [Epub ahead of print] Review (IF 4.697).

2) **Bottai D.**, Adami R., Paroni R., Ghidoni R. Brain cancer-activated microglia: A potential role for sphingolipids. Curr Med Chem. 2019 May 6. doi: 10.2174/0929867326666190506120213. [Epub ahead of print] Review (IF 3.469)

3) **Bottai D.**, Adami R., Ghidoni R. Glycosphingolipids and Neural Stem Cells. J Neurochem. 2019 Mar;148(6):698-711. doi: 10.1111/jnc.14600 Review (IF 4.609)

4) **Bottai D.**, Spreafico M., Pistocchi A., Fazio G., Adami R., Grazioli P., Canu A., Bragato C., Rigamonti S., Parodi C., Cazzaniga G., Biondi A., Cotelli F., Selicorni A., Massa V. Modeling Cornelia de Lange Syndrome in vitro and in vivo reveals a role for cohesin complex in neuronal survival and differentiation. Hum Mol Genet. 2018 Sep 14. doi: 10.1093/hmg/ddy329. [Epub ahead of print] (IF 4.902).

5) Adami R., Pagano J., Colombo M., Platonova N., Recchia D, Chiaramonte R., Bottinelli R, Canepari M and **Bottai D.** Reduction of Movement in Neurological Diseases: Effects on Neural Stem Cells Characteristics Front. Neurosci., 23 May 2018 <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00336> (IF 3.877)

6) Marcatili M., Marsoner F., D'Agostino A., Karnavas T., **Bottai D.**, Scarone S., Conti L. (2016). Establishment of an induced pluripotent stem cell (iPSC) line from a patient with Clozapine-responder Schizophrenia. *STEM CELL RESEARCH*, vol. 17 (2016), 630-633, ISSN: 1873-5061, doi: 10.1016/j.scr.2016.11.009 (IF 3.892)

7) Marsoner F., Marcatili M., Karnavas T., **Bottai D.**, D'Agostino A., Scarone S., Conti L. (2016). Generation and characterization of an induced pluripotent stem cell (iPSC) line from a patient with clozapine-resistant Schizophrenia. *STEM CELL RESEARCH*, 17 (2016) 661–664 ISSN: 1873-5061, doi: 10.1016/j.scr.2016.11.005 (IF 3.892)

8) Adami R. and **Bottai D.** Movement impairment: Focus on the brain., *J Neurosci Res.* 2016 Jan 13. doi: 10.1002/jnr.23711. Vol 94:310-317 (IF 2.594)

9) Adami R., Scesa G. and **Bottai D.** Stem cell transplantation in neurological diseases: improving effectiveness in animal models *Front. Cell Dev. Biol.*, 13 May 2014 | doi: 10.3389/fcell.2014.00017. (IF 5.206 2018)

10) **Bottai D.**, Scesa S., Cigognini D., Adami R., Nicora E., Abrignani S., Di Giulio A.M. and Gorio A. Third trimester NG2-positive amniotic fluid cells are effective in improving repair in spinal cord injury. *Experimental Neurology* Volume 254, April 2014, Pages 121-133 doi: 10.1016/j.expneurol.2014.01.015. (IF 4.645).

11) **Bottai D.**, Adami R. Spinal muscular atrophy: new findings for an old pathology. *Brain Pathol.* 2013 Nov 10. 23(6) 613-622 doi: 10.1111/bpa.12071 (IF 4.739)

12) **Bottai D.**, Cigognini D., Nicora E., Moro M., Grimoldi M.G., Adami R., Abrignani S., Marconi A.M., Di Giulio A.M., Gorio A. (2012) Third trimester amniotic fluid cells with the capacity to develop neural phenotypes and with heterogeneity among sub-populations. *Restor Neurol Neurosci.* 2012;30(1):55-68. doi: 10.3233/RNN-2011-0620 (IF 3.349)

13) Marfia G., Madaschi L., Marra F., Menarini M., **Bottai D.**, Formenti A., Bellardita C., Di Giulio A.M., Carelli S., Gorio A. (2011) Adult Neural Precursors isolated from post mortem brain yield mostly neurons: An erythropoietin-dependent process. *Neurobiol Dis.* 2011 Jul; 43(1):86-98. Epub 2011 Feb 13 (IF 4.518).

14) **Bottai D.**, Cigognini D., Madaschi L., Adami R., Nicora E., Menarini M., Di Giulio A. M., Gorio A. (2010). Embryonic Stem Cells Promote Motor Recovery and Affect Inflammatory Cell Infiltration in Spinal Cord Injured Mice. *Experimental Neurology* 223; 452-463 doi: 10.1016/j.expneurol.2010.01.010 (IF 4.436).

15) **Bottai D.**, Madaschi L., Di Giulio A. M. and Gorio A.. (2008) Viability-Dependent Promoting Action of Adult Neural Precursors in Spinal Cord Injury. *Molecular Medicine*, 14(9-10); 634-644. doi: 10.2119/2008-00077.Bottai. (IF 3.411)

16) Givogri M. I., **Bottai D.**, Zhu H. L., Fasano S., Lamorte G., Brambilla R., Vescovi A., Wrabetz L., Bongarzone E.. (2008) Multipotential Neural Precursors Transplanted into the Metachromatic Leukodystrophy Brain Fail to Generate Oligodendrocytes but Contribute to Limit Brain Dysfunction. *Developmental Neuroscience*, 30(5); 340-357. doi: 10.1159/000150127. (IF 2.817).

17) Henry G. R. P., Heise A., **Bottai D.**, Formenti A., Gorio A., Di Giulio A. M., and Koning C. E.. (2008) Acrylate end-capped poly(ester-carbonate) and poly(ether-ester)s for polymer-on-multielectrode array devices: synthesis, photocuring and biocompatibility. *Biomacromolecules*, 9(3); 867-878. doi: 10.1021/bm701191e (IF 4.146).

18) Gelain F., **Bottai D.**, Vescovi A. L., Zhang S.. (2006) Designer self-assembling Peptide nanofiber scaffolds for adult mouse neural stem cell 3-dimensional cultures. **PLoS ONE**. 1: e119. DOI: 10.1371/journal.pone.0000119 (IF 4.351)

19) **Bottai D.**, Fiocco R., Gelain F., Defilippis L., Galli R, Gritti A: and Vescovi L. A.. (2003) Neural Stem Cells In The Adult Nervous System. **Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research**, 12; 655-670. DOI: 10.1089/15258160360732687 (IF 1.800)

20) **Bottai D.**, Guzowski J.F., Schwarz M.K., Kang S.H., Xiao B., Lanahan A., Worley P.F. and Seeburg P.H.. (2002) Synaptic Activity-Induced Conversion of Intronic to Exonic Sequence in Homer 1 Immediate Early Gene Expression. **The Journal of Neuroscience**, 22(1); 167-175. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-01-00167.2002> (IF 8.045)

21) Dunn, R. J., **Bottai, D.** and Maler, L.. (1999) Molecular Biology of the Apterontotus NMDA Receptor NR1. **The Journal of Experimental Biology**, 202; 1319-1326. (IF 2.354)

22) **Bottai D.**, Maler L., Dunn R. J.. (1998). Alternative RNA Splicing of the NMDA Receptor NR1 mRNA in the Neurons of the Teleost Electrosensory System. **The Journal of Neuroscience**, 18(14); 5191-5202. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-14-05191.1998> (IF 8.403)

23) **Bottai D.**, Dunn R.J., Ellis W. and Maler L.. (1997) N-Methyl-D-Aspartate Receptor 1 mRNA Distribution in the Central Nervous System of the Weakly Electric Fish *Apterontotus leptorhynchus*. **Journal of Comparative Neurology**, 389; 65-80. (IF 3.758)

24) Garcia-Gil M., **Bottai D.**, Romano A., Fineschi L., Bini L., Pallini L. and Brunelli M.. (1995) Repetitive Treatment with Serotonin Modifies Protein Synthesis and Protein Phosphorylation in the Central Nervous System of *Hirudo medicinalis*. **Electrophoresis**, 16; 1251-1254. (IF= 2.730)

25) **Bottai D.**, Garcia-Gil M., Zaccardi M. L., Fineschi L., and Brunelli M.. (1994) Interleukin-1 and Interleukin-6 Modify Protein Phosphorylation in the Central Nervous System of *Hirudo medicinalis*. **Brain Research**, 641; 155-159. (IF 2.869)

26) Garcia-Gil M., **Bottai D.**, Zaccardi M. L., Cannizzaro M. and Brunelli M.. (1993) Effect of Serotonin on Protein Phosphorylation in the Central Nervous System of the Leech *Hirudo medicinalis*. **Comparative Biochemistry Physiology**, 104C(1); 125-131. (IF 0.784)

27) Garcia-Gil M., **Bottai D.**, Canizzaro M. and Brunelli M.. (1991) Effects of Phorbol Ester on Protein Phosphorylation in the Central Nervous System of the Leech *Hirudo medicinalis*: a Two Dimensional Electrophoretical Analysis. **Comparative Biochemistry Physiology**, 99B(4); 859-864. (IF 0.832)

28) Garcia-Gil M., Cipollini G., Cattani M., **Bottai D.**, and Brunelli M.. (1991) Protein Kinase C Activity in the Central Nervous System of *Hirudo medicinalis*. **Comparative Biochemistry Physiology**, 99B(1); 65-70. (IF 0.832)

#### 1A) CAPITOLI LIBRI

29) D. Ferrari, Vescovi A. L. and **Bottai D.** The stem cells as a potential treatment for neurodegeneration. **Methods Mol. Biol.** 2007; 399; 199-213. doi: 10.1007/978-1-59745-504-6\_14.

30) Gorio A., Marfia G., **Bottai D.**, Di Giulio A. M.. Spinal Cord Injuries. In Larry R. Squire, Editor-in-Chief, **Encyclopedia of Neuroscience**, Academic Press, Oxford, 2008, 281-286.

#### 1C) TRADUZIONE TESTI

## Abstracts

1. *Reduction Of Movement In Neurological Diseases: Effects On Neurogenesis*. **D. Bottai** Oral Presentation PCS 4<sup>th</sup> Global Cell Science and Stem Cell Conference-2019 (CSSC-2019) Co-Chairman section: Exploring New Strategies for Research and Therapeutic Innovation 22-23 June, 2019 Place: Prague, Czech Republic.
2. *Lithium as a positive modulator of defective WNT pathway in Cornelia de Lange Syndrome models*. C. Parodi, P. Grazioli, **D. Bottai**, E. Di Fede, T. Vaccari, C.C.G. Gervasini, V. Massa. 4. Congresso DiSS tenutosi a Milano 09/11/2018.
3. *Cornelia de Lange Syndrome: different models and strategies to study the disease* 6. P. Grazioli, **D. Bottai**, G. Fazio, A. Pistocchi, T. Vaccari, V. Massa. convegno Rare Diseases Summer School a Kartause Ittingen 11-13/07/2018.
4. *Cornelia de Lange Syndrome: different models and strategies to study the disease*. Grazioli P., **Bottai D.**, Fazio G., Pistocchi A., Vaccari T., Massa V. 6<sup>th</sup> Rare Diseases Summer School 10-14 September 2018 Istituto superiore della Sanità Rome. Italy (DOI: 10.13140/RG.2.2.20690.61129).
5. *Reduction of movement alters neural stem cells characteristics*. **Bottai D.**, Pagano J., Colombo M., Platonova N., Recchia D., Chiaramonte R., Bottinelli R., Canepari M., Adami R. Stem Cell Dynamics Throughout Life From Development to the Adult. Basel 29-31 August 2018.
6. *Motor deprivation in healthy animal models a Galilean approach for movement limiting neurological diseases*. Adami R., Deborah D., J Pagano J., Colombo M., Platonova N., Chiaramonte R., Bottinelli R., Canepari M. and **Bottai D.** Adult neurogenesis Abcam meeting, Dresden, 2-4 May 2018.
7. *Motor deprivation in healthy animal model: a Galilean approach for movement limiting neurological diseases*. **D. Bottai**, R. Adami, D. Recchia, J. Pagano, M. Colombo, N. Platonova, R. Chiaramonte, R. Bottinelli and M. Canepari ·Department of Health Science, University of Milan, Via A. di Rudinì 8, 20142 Milano, Italy, 2 Department of Molecular Medicine, University of Pavia, Via C. Forlanini 6, 27100 Pavia, Italy. 68<sup>th</sup> Congress of the Italian Physiological Society, Pavia, September 6-8 2017.
8. *Effects of motor deprivation on neurogenesis and muscle-derived neurotropic factors* Canepari Monica, Adami Raffaella, Recchia Deborah, Bottinelli Roberto, **Bottai Daniele**. J Muscle Res Cell Motil S01.P8-224 DOI 10.1007/s10974-016-9457-1. 45<sup>th</sup> European Muscle Conference 2017 Montpellier, Francia. (IF: 2.102)
9. *Motor deprivation in healthy animal models a Galilean approach for movement limiting neurological diseases*. **D. Bottai**, R. Adami, D. Recchia, J. Pagano, M. Colombo, N. Platonova, R. Chiaramonte, R. Bottinelli and M. Canepari · Department of Health Science, University of Milan, Via A. di Rudinì 8, 20142 Milano, Italy, Department of Molecular Medicine, University of Pavia, Via C. Forlanini 6, 27100 Pavia, Italy. 29-30 June; 1 July 2017 21<sup>st</sup> SMA Researcher Meeting Orlando, Florida, USA
10. *Lack of movement in neurological diseases: effects on neurogenesis and muscle-nerve interaction*. **D. Bottai**, R. Adami, J. Pagano, M. Colombo, N. Platonova, R. Chiaramonte, R. Ghidoni, R. Bottinelli and M. Canepari. 19<sup>th</sup> SMA Researcher Meeting June 16-18 2016, ANAHEIM, CA, US.
11. *EFFECTS OF MOTOR DEPRIVATION ON NEUROGENESIS*. Adami R., Maggio A., Agoni V., Colombo M., Platonova N., Chiaramonte R., Ghidoni R., Bottinelli R., Canepari M. and **D. Bottai**. Gordon Conference Neurotrophic Factors From Basic Biology to Therapeutic Insights May 31 - June 5, 2015 Salve Regina University Newport, RI; US.
12. *Third trimester NG2+ amniotic fluid cells respond to inflammation and are effective in SCI by means of HGF production amniotic fluid ameliorate the functional recovery in a mouse model of spinal cord injury*. **D. Bottai**, G. Scesa, R. Adami, A.M. Di Giulio and A. Gorio. 9<sup>o</sup> FENS forum of Neuroscience. Milan July 5-9 2014
13. *NG2-positive cells from amniotic fluid ameliorate the functional recovery in a mouse model of spinal cord injury*. Scesa G., Adami R., DiGiulio A.M., A. Gorio and **Bottai D.** XV Congress of the Italian Society for Neuroscience (SINS) Rome 3-5 October 2013.
14. *Third trimester amniotic fluid cells improve motor recovery in a mouse model of Spinal Cord Injury*. Scesa G., Biggi S., Adami R., DiGiulio A.M., **Bottai D.** and A. Gorio. Stem cells

in cancer and regenerative medicine. EMBL, Heidelberg, Germany, 29-08-2012/  
01-09-2012.

15. *Phenotypical characterization of third trimester human amniotic fluid cells: a new reservoir of stem cells?* **Bottai D.**, Cigognini D., Nicora E., Ripamonti E., Adami R., Abrignani S., Moro M., Rebullà P., Menarini M., Di Giulio A.M. and Gorio A.. 34° Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia. Rimini, Palacongressi 14-17 Ottobre 2009.
16. *Third trimester human amniotic fluid cells with potential for therapy in neurodegenerative disorders.* Cigognini D., Nicora E., Ripamonti E., Adami R., Menarini M., Di Giulio A.M., **Bottai D.** and Gorio A.. 34° Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia. Rimini, Palacongressi 14-17 Ottobre 2009.
17. *Death resistant neural progenitors yield mostly neurons: an erythropoietin-dependent process.* Marra F., Marfia G., Madaschi L., Merli D., Menarini M., **Bottai D.**, Carelli S., Di Giulio A. M., Gorio A.. - 2009. (Intervento presentato al 34° Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia. Rimini, Palacongressi 14-17 Ottobre 2009.
18. *Third trimester human amniotic fluid cells from caesarean births; a new tool for therapy in neurodegenerative disorders.* Nicora E., Cigognini D., Ripamonti E., Adami R., Menarini M., Di Giulio A.M., **Bottai D.** and Gorio A.. XIII Congresso Nazionale della Società Italiana di Neuroscienze (SINS) 2-5 Ottobre 2009 Milano.
19. *Third trimester human amniotic fluid cells isolation and phenotypical characterization.* **Bottai D.**, Cigognini D., Nicora E., Ripamonti E., Adami R., Abrignani S., Moro M., Rebullà P., Menarini M., Di Giulio A.M. and Gorio A.. XIII Congresso Nazionale della Società Italiana di Neuroscienze (SINS) 2-5 Ottobre 2009 Milano,
20. *Phenotypical characterization of third trimester human amniotic fluid cells with potential for therapy in neurodegenerative disorders.* Cigognini D., Nicora E., Ripamonti E., Di Giulio A.M., **Bottai D.**, Gorio A. IV Meeting on the Molecular Mechanisms of Neurodegeneration, May 8-10, 2009, Milano, Italy.
21. *Spinal cord injury: a comparison of neural stem cell and embryonic stem cell treatments.* **Bottai D.**, Madaschi L., Cigognini D., Adami R., Nicora E., Di Giulio A. M., and Gorio A.. 26<sup>th</sup> Annual Neurotrauma Society Symposium, 27-30 Luglio 2008, Orlando, FL, USA. Pubblicato in Journal of Neurotrauma, 25; 7 July, 2008 (IF: 3.528, 2008).
22. *A new class of adult neural stem cells migrate to the injured spinal cord and differentiate into cholinergic neurons.* Marfia G., **Bottai D.**, Madaschi L., Nicora E., Di Giulio A. M. and Gorio A.. 6° Fens Forum of European Neuroscience, Ginevra, Svizzera 12-16 Luglio, 2008.
23. *Isolation and characterization of a new class of adult neural precursors.* Marra F., Marfia G., **Bottai D.**, Madaschi L., Carelli S., Cigognini D., Di Giulio A. M. and Gorio A. 6° Fens Forum of European Neuroscience, Ginevra, Svizzera 12-16 Luglio, 2008.
24. *Effect of different therapeutic approaches on the extracellular matrix in rodent models of spinal cord injury.* S. De Biasi, L. Vitellaro Zuccarello, L. Fontana, E. Bosisio, L. Madaschi, S. F. Mazzetti, **D. Bottai**, A. Gorio. 27° Convegno dell' Italian Society for the Study of Connective Tissues (SISC). Bologna, Novembre 2007. Pubblicato in **Connective Tissue Research**, 48:338-363, 2007 (IF: 1.113)
25. *Spinal cord injury and neural precursors. Homing, fate and recovery of function.* **Bottai D.**, Madaschi L., Di Giulio A. M. and Gorio A.. Società Italiana di Farmacologia 33° Congresso Nazionale, Cagliari, 6-9 Giugno 2007.
26. *Early and late posts mortem neural stem cells grow and differentiate in vitro. A novel source for cellular therapy.* Madaschi L., Marfia G., Cigognini D., **Bottai D.**, Di Giulio A. M. and Gorio A.. Società Italiana di Farmacologia 33° Congresso Nazionale, Cagliari, 6-9 Giugno 2007.
27. *Neural stem cells: facts and misfacts.* **Bottai D.**. 12<sup>th</sup> Biennial meeting of the International Society for Neurochemistry and European Society for Neurochemistry, Innsbruck, Austria, 21-26 Agosto 2005. Pubblicato in **Journal of Neurochemistry**, 94; 72 (2005) (IF: 4.604, 2005).
28. *Neural stem cells and their therapeutic potential in the spinal cord injury.* **Bottai D.**, Madaschi L., Di Stefano A.B., Marrari T., Di Giulio A.M., Gorio A. and Vescovi A.L. Società Italiana di Farmacologia 32° Congresso Nazionale, Napoli, 1-4 Giugno 2005.
29. *Transplantation of neural stem cells in the spinal cord after traumatic injury promote recovery of the function.* L. Madaschi L., Di Stefano A.B., Marrari T., Gritti A, Gervasi

- N.M., Vescovi A.L., **Bottai D.**, Di Giulio A.M., and Gorio A.. First International Porto Pirgos Conference on Advances in Neuroscience, Pargheria (VV), 22-25 Settembre 2004.
30. *Integration of transplanted neural progenitors in the brain of arylsulfatase A deficient mice.* Bongarzone, E; Galbiati, F; Bottai, D, Gritti, A; Vescovi, A; Givogri, Ml. 35th Annual Meeting of the Transactions-of-the-American-Society-for-Neurochemistry Location: New York, NY Date: AUG 14-18, 2004 Sponsor(s): Transact Amer Soc Neurochem. **Journal of Neurochemistry** 90 s1; 47-47, AUG 2004. (IF: 4.824, 2004).
31. *Spinal cord injury and neural stem cells transplantation.* **Bottai D.**, Madaschi L., Gelain F., Di Stefano A.B., Gorio A. and Vescovi A.L. 5<sup>th</sup> International Symposium on Experimental Spinal Cord Repair and Regeneration, Brescia, 27-29 Marzo 2004.
32. *Synaptic activity-induced conversion of intronic to exonic sequences.* Seeburg, P.H., **Bottai, D.**, Guzowski, J.F., Schwarz, M.K., Worley, P.F. Joint Meeting of the International Society for Neurochemistry- Asian Pacific Society for Neurochemistry. Location: WANCHAI, PEOPLES R CHINA Date: AUG 03-08, 2003. Pubblicato in **Journal of Neurochemistry**, 87 s1; 38-38 (2003) (IF: 4.825, 2003).
33. *Neural stem cells plasticity and therapeutic potential.* **Bottai D.** 14<sup>th</sup> Meeting of European Society for Neurochemistry. "Advances in Molecular Mechanisms of Neurological Disorders." Varsavia, Polonia 1-3 Giugno 2003. Pubblicato in **Journal of Neurochemistry**, 85; s2 (2003) (IF: 4.825, 2003).
34. *Knockout mice carrying a deletion of the mental retardation gene Gdi1 show impaired associative memory and altered social behavior.* Toniolo, D; D'Adamo, P; Welzl, H, Lipp, P. Chapman, C. Tiveron, **D. Bottai**, F. Valtorta. European-Society-of-Human-Genetics European Human Genetics Conference in Conjunction With European Meeting on Psychosocial Aspects of Genetics. Strasbourg, France, May 25-28, 2002. European Soc Human Genet. European. **Journal of Human Genetics**, 10 S1; 71-72, May 2002. (IF=3.136, 2002)
35. *Structure and expression of the Homer 1 gene.* **Bottai D.**, Schwarz M.K., Kang S., Xiao B., Worley P. and Seeburg P.H.. 30<sup>th</sup> Neuroscience Annual Meeting. New Orleans, La, USA, 4-9 Novembre 2000.
36. *NMDA receptors -1 splice variants : differential cellular expression in the central nervous system of the electric fish Apteronotus leptorhynchus.* **Bottai D.**, Ellis B., Maler L. and Dunn R.J.. 26<sup>th</sup> Society for Neuroscience Annual Meeting, Washington D.C., USA, 16-21 Novembre 1996.
37. *Crude extracts of Caulerpa taxifolia increase protein phosphorylation in the leech central nervous system.* Garcia Gil M, Romano A., Bottai D., Della Pietà F., Brunelli M. (1996).. Publicacions Universitat Barcelona (Spain) pp 349-353. In: Ribera M.A., Ballesteros E., Bouderesque C.F., Gomez A., and Gravez V.. Second International Workshop on Caulerpa taxifolia. p. 349-353, Barcelona:Universitat de Barcelona, ISBN: 8447513823
38. *Repetitive treatment with serotonin modifies protein synthesis and protein phosphorylation in the central nervous system of Hirudo medicinalis.* Garcia-Gil M., **Bottai D.**, Romano A., Fineschi L., Bini L., Pallini L. and Brunelli M., 2D Electrophoresis: from protein maps to genome, Siena, Settembre 1994.
39. *Repetitive treatment with serotonin induces changes in protein synthesis and protein phosphorylation in the CNS of the leech Hirudo medicinalis.* **Bottai D.**, Garcia-Gil M. and M. Brunelli. 24<sup>th</sup> Society of Neuroscience Annual Meeting, Miami, Florida, USA, 13-19 Novembre 1994.
40. *Apprendimento non associativo a lungo termine nel sistema nervoso di invertebrati.* M. L. Zaccardi, **D. Bottai** e L. Fineschi. IV Convegno Nazionale dei Giovani Cultori delle Neuroscienze, Pisa, 16-18 Dicembre 1993.
41. *Effect of repetitive treatments with serotonin on protein phosphorylation in the central nervous system of the leech C.N.S.* Garcia-Gil M., **Bottai D.**, Zaccardi M.L. and M. Brunelli. XLV Congresso Nazionale della Società Italiana di Fisiologia, Pavia, 8-10 Settembre 1993.
42. *Modulation of protein synthesis and protein phosphorylation induced by 5-hydroxytrptamine in the central nervous system of the leech Hirudo medicinalis.* **Bottai D.**, Zaccardi M.L., Garcia-Gil M. and M. Brunelli. 14<sup>th</sup> Meeting of International Society of Neurochemistry, Montpellier, Francia. Agosto 1993. Pubblicato in **Journal of Neurochemistry**, 61; Suppl. S94 (1993) (IF: 4.906, 1999).
43. *Serotonin induces changes in protein phosphorylation and protein synthesis in the C.N.S. of Hirudo medicinalis.* Garcia-Gil M., Zaccardi M.L., **Bottai D.** and Brunelli M. V Congresso

Società Italiana di Neuroscienze, Modena, 1-4 Dicembre 1992. Pubblicato in **Neuroscience Letters**, Suppl. 43; S51 (1992) (IF: **2.085**, 1999).

44. *Effect of IL-1 and IL-6 on protein phosphorylation in leech central nervous system.* Zaccardi M.L., **Bottai D.**, Garcia Gil M. and Brunelli M. XLIV Congresso Nazionale della Società Italiana di Fisiologia, Roma, 23-26 Settembre 1992.
45. *Effect of serotonin on protein phosphorylation and protein synthesis in the central nervous system of Hirudo medicinalis.* **Bottai D.**, Garcia-Gil M., Zaccardi M.L., Puopolo M., Cannizzaro M. and Brunelli M. European neuroscience meeting, Dublino, Irlanda, 16-21 Agosto 1992. Pubblicato in **Neurochemistry International**, 21; Suppl. B21 (1992) (IF: **2.175**, 1999)
46. *Effect of serotonin on protein synthesis in the central nervous system of Hirudo medicinalis.* Garcia-Gil M., Zaccardi M.L., **Bottai D.**, Cannizzaro M. and Brunelli M. XLIII Congresso Nazionale della Società Italiana di Fisiologia, Sorrento (Na), 23-26 Settembre 1991.
47. *Effect of serotonin on protein phosphorylation in different regions of the central nervous system of Hirudo medicinalis.* Garcia-Gil M., Zaccardi M.L., **Bottai D.**, Cannizzaro M. and Brunelli M. International Conference on protein modification in signal transduction and aging. Marciana Marina (Li), 15-19 Settembre 1991.
48. *Effect of phorbol ester and serotonin on protein phosphorylation in the C.N.S. of Hirudo medicinalis.* Garcia-Gil M., D. **Bottai D.**, Cannizzaro M., Zaccardi M.L., Cipollini G., Cattani M. and Brunelli M.. 4<sup>th</sup> Meeting of the Italian Society of Neuroscience, Palermo, 4-7 Dicembre 1990. Pubblicato in **Neuroscience Letters**, Suppl. 39; S99 (1990) (IF: **2.085**, 1999).
49. *Analisi delle proteine fosforilate nel sistema nervoso centrale di Hirudo medicinalis mediante elettroforesi bidimensionale.* Garcia-Gil M., D. **Bottai D.**, Cannizzaro M., Cipollini G., Cattani M. and Brunelli M.. XLII Congresso Nazionale della Società Italiana di Fisiologia; Perugia, 18-20 Settembre 1990.
50. *Protein C activity in the central nervous system of Hirudo medicinalis.* Garcia-Gil M., Cipollini G., Cattani M., **Bottai D.**, Cannizzaro M. and Brunelli M. 13<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Neuroscience Association, Stoccolma, Svezia, 8-12 Settembre 1990.

2) INDICARE OGNI ELEMENTO UTILE AD INDIVIDUARE LA CAPACITÀ DI ATTRARRE FINANZIAMENTI COMPETITIVI IN QUALITÀ DI RESPONSABILE DI PROGETTO;

#### **FINANZIAMENTI OTTENUTI.**

1. **Functional Genomic of non Human Embryonic Stem Cells**; finanziato dalla Comunità Economica Europea, VI Programma Quadro. (**500000 € per 3 anni**) (in collaborazione con il Prof. A. L. Vescovi (PI)).
2. **Studio del recupero funzionale indotto dal trapianto di cellule staminali neurali in modelli animali acuti di contusioni del midollo spinale**; finanziato dalla Fondazione Cariplo. (**300000 € per 2 anni**) (in collaborazione con il Prof. A. L. Vescovi (PI)).
3. **Cellule staminali neurali: un nuovo approccio cellulare per l'atrofia muscolare spinale**; finanziato dalle Fondazioni Onlus Asamsi e Famiglie SMA Italia. (**150000 € per 3 anni**) (in collaborazione con il Prof. A. L. Vescovi (PI)).
4. **Pluripotency associated genes to de-differentiate neural cells into pluripotent cells PLURIGENES**; finanziato dalla Comunità Economica Europea, VI Programma Quadro (**300000 € per 2 anni**) (in collaborazione con il Prof. A. L. Vescovi (PI)).
5. F.I.R.S.T. 2006 (**2.200 €**)
6. F.I.R.S.T. 2007 (**7.157 €**) (in condivisione con il Prof. A. Gorio)
7. P.U.R. 2008 (**6.934 €**) (in condivisione con il Prof. A. Gorio)
8. P.U.R. 2009 (**11.000 €**) (in condivisione con il Prof. A. Gorio)
9. Donazione della Fondazione Onlus Asamsi, 2007 (**5.000 €**)
10. Donazione della Fondazione Onlus Vertical, 2012 (**7.000 €**)
11. Donazione della Fondazione Onlus Asamsi, 2012 (**15.000 €**), 2013 (**15.000 €**), 2014 (**10.000 €**).
12. Donazione della Fondazione Onlus Vertical, 2015 (**20.000 €**)
13. Donazione della Fondazione Onlus Girotondo, 2016 (**7.000 €**)
14. Donazione della Fondazione Onlus Asamsi, 2016 (**10.000 €**)
15. Donazione della Fondazione Onlus Vertical, 2018-21 (**50.000 €**)

16. **Vincitore bando per il Piano di Sostegno alla Ricerca - Linea 2 2018** Reduction of movement in neurological diseases: effects on neural stem cells characteristics (7.000€)
17. **Vincitore bando per assegno di tipo A anno 2018 Profilo lipidico infiammatorio ematico in relazione ad imaging lipidico per Risonanza Magnetica Cardiaca nel post infarto: identificazione di nuovi criteri prognostici.** Proposto da Daniele Bottai, Stefano Carugo, Davide Chiumello, Lorenzo Rosso, Paola Signorelli.

**FINANZIAMENTI RICHIESTI.**

1. **Prin 2006, Responsabile Scientifico dell'Unità di Ricerca.** Valutazione Delle Capacità Riparative Delle Cellule Staminali Neurali Di Roditori In Modelli Sperimentali Di Lesioni Spinali. (Not funded).
2. **TELETHON 2007, Proponente.** Skin Derived Adult Neural Human Stem Cells: An In Vitro Model For Sma Preclinical Studies. (Not funded).
3. **Fondazione Cariplo 2010, Responsabile Scientifico dell'Unità di Ricerca.** Early Molecular Mechanisms of Neurodegeneration in The Mammalian Retina. (Not funded)
4. **Fondazione Cariplo 2011, Componente Unità di Ricerca.** Molecular Mechanisms Of Neurodegeneration Associated With Early Functional Expression Of Clic1 Protein In The Mammalian Retina. (Not funded).
5. **Telethon exploratory project 2014, Proponente.** Impaired Neurogenesis in the Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. (Not funded).
6. **Wings for Life Spinal Cord Research Foundation 2015 LOI, Proponente.** Physical Inactivity And Neurogenesis. (Not admitted for full project preparation).
7. **AFM- Telethon 2015, Proponente.** Adult Spinal Cord Neural Stem Cells: a New Tool For The Understanding of Amyotrophic Lateral Sclerosis Mechanisms. (Not funded).
8. **Frick foundation 2015, Responsabile Scientifico dell'Unità di Ricerca.** Adult Spinal Cord Neural Stem Cells: a New Tool For The Understanding of Amyotrophic Lateral Sclerosis Mechanisms. (Not funded).
9. **Prin 2015, Responsabile Scientifico dell'Unità di Ricerca.** Effect Of Motor Deprivation On Neurogenesis And Muscle-Nerve Interaction. (Not funded).
10. **Bando regionale 2015 FRRB, Componente Unità di Ricerca.** PreMeT - PRECision Medicine In the Approach to Rare Intracranial Tumors: Personalized Diagnosis and development of Targeted Therapies. (Not funded).
11. **Conquer Paralysis Now (CPN) Challenge 2016, Proponente.** Neurogenesis Alteration In Spinal Cord Injury And Other Motor-Restraint Neurological Diseases. (Not funded).
12. **Human Frontier Science Program Grant Application LOI 2016, Proponente.** Effect Of Motor Deprivation On Neurogenesis And Muscle-Nerve Interaction. (Not admitted for full project preparation).
13. **AFM- Telethon 2016, Proponente.** Adult Spinal Cord Neural Stem Cells: a New Tool For The Understanding of Amyotrophic Lateral Sclerosis Mechanisms. (Not funded).
14. **Fondazione Cariplo Giovani 2016, Componente Unità di ricerca.** Personalized Medicine In the Approach to Rare Intracranial Tumors: Personalized Diagnosis and Development of Targeted Therapies. (Not funded).
15. **Fondazione Cariplo 2016, Componente Unità.** How The Visual System Reacts To Aging: Determinants Of Vulnerability And Resilience In Stress Models. (Not funded).
16. **Wings for Life Spinal Cord Research Foundation 2016 LOI, Proponente.** Effect Of Motor DepRivation On Neurogenesis And Muscle-Nerve IntEraction. (Not funded).
17. **CURESMA 2016, Proponente.** Effect Of Motor Deprivation On Neurogenesis And Muscle-Nerve Interaction. (Not funded).
18. **Prin 2018, Componente Scientifico dell'Unità di Ricerca.** Reciprocal Interactions Between Glioblastoma Stem Cells And Tumor-Associated Microglia: Clic1 Protein As A Common Pharmacological Target (Not funded).
19. **Bando per il Piano di Sostegno alla Ricerca - Linea 2 2017 Proponente** Suspension of hind limb alters neural stem cells key characteristics (Bottai Mazzanti). (Not funded)
20. **Bando per il Piano di Sostegno alla Ricerca - Linea 2 Proponente** Reduction of movement in neurological diseases: effects on neural stem cells characteristics (Bottai Mazzanti). (Funded)
21. **CURESMA 2018 Proponente** Sensory Neurons Impairment In Spinal Muscular Atrophy (Not funded).

22. **Bando Straordinario per Progetti Interdipartimentali (Bando SEED) (capo unità, Proponente Dott.ssa Serena Mazzucchelli) Lights and Shadows of ANticanCER DELivery in the bRain** (codice identificativo 1150) Under review.

3) ORGANIZZAZIONE, DIREZIONE E COORDINAMENTO DI CENTRI O GRUPPI DI RICERCA NAZIONALI E INTERNAZIONALI O PARTECIPAZIONE AGLI STESSI E ALTRE ATTIVITÀ QUALI LA DIREZIONE O LA PARTECIPAZIONE A COMITATI EDITORIALI DI RIVISTE SCIENTIFICHE;

Responsabile scientifico (deputy del Prof Angelo Luigi Vescovi Università Vita-Salute San Raffaele) per il finanziamento **Functional Genomics in Engineered ES cells** nell'ambito del programma quadro FP6.

Responsabile scientifico per l'associazione Onlus Asamsi dall'anno 2011 a oggi.

Revisore nell'ambito di: MS RESEARCH AUSTRALIA 2015 GRANT ROUND.

Ruolo di Revisore nell'ambito di: Futuro in Ricerca 2013, Piano di finanziamento per favorire il ricambio generazionale, Progetti di ricerca fondamentale proposti da giovani ricercatori.

Associated Editor: **Frontiers in Cell and Developmental Biology** dal 2014.

Review Editor: **Frontiers in Molecular Neuroscience** dal 2012.

Review Editor: **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry** dal 2018.

Associated Editor: **Frontiers in Genetic** dal 2015.

Associated Editor: **Frontiers in Oncology** dal 2015 al 2018.

Associated Editor: **Restorative Neurology and Neuroscience** dal 2012 al 2018.

Lead Guest Editor per una edizione speciale della rivista **Neural Plasticity** (2016-2017).

Revisore scientifico per la rivista **The Lancet; Journal of Neurochemistry; Frontiers in Molecular Neuroscience; Restorative Neurology and Neuroscience; Molecular Medicine; Journal of Neuroscience Research; The Journal of Ophthalmology; The Journal Expert Opinion On Biological Therapy; Stem Cell Research & Therapy; Stem Cells and Development; Journal of Neurochemistry, PlosONE.**

4) CONSEGUIMENTO DELLA TITOLARITÀ DI BREVETTI NEI SETTORI IN CUI È RILEVANTE;

*Nessuna*

5) CONSEGUIMENTO DI PREMI E RICONOSCIMENTI NAZIONALI E INTERNAZIONALI PER ATTIVITÀ DI RICERCA;

**11/1990-10/1994** Borsa di studio del Ministero della Pubblica Istruzione nell'ambito del corso di Dottorato di Ricerca in Neuroscienze di Base.

**1/1995-7/1997** Borsa di studio del Medical Research Council (MRC) offerta dal Prof. R. J. Dunn.

**9/1997-6/1998** Borsa di studio della "Max Planck Society" offerta dal Professor P. H. Seeburg.

**7/1998-6/2000** Borsa di studio della Comunità Economica Europea: Marie Curie Research Training Grants (Training and Mobility of Researchers) Grant N° ERBFMBICT983072.

**7/2000-3/2001** Borsa di studio della "Max Planck Society" offerta dal Professor P. H. Seeburg.

**4/2001-4/2002** Assegno del Consiglio Nazionale delle Ricerche, supervisore Dott.<sup>ssa</sup> Daniela Toniolo.

**5/2002-2/2004** Contratto coordinato continuativo presso lo Stem Cell Research Institute, DIBIT, Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor (supervisore Prof. Angelo Luigi Vescovi).

**3/2004-12/2005** Contratto della Comunità Economica Europea nell'ambito del VI network nel progetto **Functional Genomic of non Human Embryonic Stem Cells**, supervisore Prof. Angelo Luigi Vescovi.

6) PARTECIPAZIONE IN QUALITÀ DI RELATORE A CONGRESSI E CONVEGNI DI INTERESSE INTERNAZIONALE E NAZIONALE.

1. **PCS 4<sup>th</sup> Global Cell Science and Stem Cell Conference-2019 (CSSC-2019) Co-Chairman section:** Exploring New Strategies for Research and Therapeutic Innovation 22 -23 June, 2019 Place: Prague, Czech Republic (**Presentazione orale**).

2. **SIMPOSIO INTERNAZIONALE TERAPIE CELLULARI E MALATTIE NEURODEGENERATIVE** Il futuro terapeutico passa anche da qui. Bologna, 27 Aprile 2019 - HOTEL SAVOIA Regency (**Presentazione orale**).

3. **Stem Cell Dynamics Throughout Life From Development to the Adult.** Basel 29-31 August 2018 (**Poster**).

4. **XVII Convegno Nazionale Asamsi BOLOGNA** 17 Novembre 2018 (**Presentazione orale**)

5. **Adult neurogenesis Abcam meeting, Dresden, 2-4 May 2018 (Poster).**

6. XIV Convegno Nazionale Asamsi BOLOGNA 4 Novembre 2017 (**Presentazione orale**).
7. 68<sup>th</sup> Congress of the Italian Physiological Society, Pavia, September 6-8 2017 (**Poster**).
8. X Convegno Nazionale Asamsi BOLOGNA 29-31 Ottobre 2016 (**Presentazione orale**).
9. 19<sup>th</sup> SMA Researcher Meeting June 16-18-2016, Anaheim, CA, US (**Poster**).
10. 2015 Gordon Conference Neurotrophic Factors From Basic Biology to Therapeutic Insights May 31 - June 5, 2015 Salve Regina University, Newport, RI; US (**Poster**).
11. IX Convegno Nazionale Asamsi BOLOGNA 31 Ottobre- 1 Novembre 2015 (**Presentazione orale**).
12. VIII Convegno Nazionale Asamsi BOLOGNA 21-22 Settembre 2014 (**Presentazione orale**).
13. 9° FENS forum of Neuroscience. Milan July 5-9 2014 (**Poster**)
14. XV Congress of the Italian Society for Neuroscience (SINS) Rome 3-5 October 2013 (**Poster**).
15. 16<sup>th</sup> Annual SMA Conference. 13-15 Giugno 2013 Anaheim, California, USA (**Poster**).
16. VIII Convegno Nazionale Congiunto Famiglie SMA ed Asamsi Firenze 29 Settembre 2012 (**Presentazione orale**).
17. Stem cells in cancer and regenerative medicine. EMBL, Heidelberg, Germany, 29-08-2012/ 01-09-2012 (**Poster**).
18. VII Convegno Nazionale Congiunto Famiglie SMA ed Asamsi Roma 2-4 Settembre 2011 (**Presentazione orale**).
19. 8° IBRO World Congress of Neuroscience, Firenze 14-18 Luglio 2011 (**Poster**).
20. VI Congresso congiunto Asamsi e Famiglie SMA, Pisa, 11-12 Settembre 2009 (**Presentazione orale**).
21. 34° Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia. Rimini, Palacongressi 14-17 Ottobre 2009 (**Poster**).
22. XIII Congresso Nazionale della Società Italiana di Neuroscienze (SINS) 2-5 Ottobre 2009 Milano (**Poster**).
23. V Congresso congiunto Asamsi e Famiglie SMA, Pisa, 6-7 Settembre 2008 (**Presentazione orale**).
24. 26<sup>th</sup> Annual Neurotrauma Society Symposium, 27-30 Luglio 2008 Orlando, FL, USA. (**Poster**).
25. Società Italiana di Farmacologia 33° Congresso Nazionale, Cagliari, 6-9 Giugno 2007 (**Poster**).
26. Congresso Congiunto Asamsi e Famiglie SMA, Imola, 9-10 Settembre 2006 (**Presentazione orale**).
27. Cellule staminali somatiche: modelli sperimentali e prospettive cliniche Brescia 2 Maggio 2005 (**Presentazione orale**).
28. Stem Cells Day Agorà, DakoCytomation (Formazione continua) Milano, 13 Ottobre 2004. (**Presentazione orale**).
29. Congresso Internazionale Il Diabete e le Malattie Neurologiche Invalidanti, Orvieto, 3-6 Maggio 2004 (**Presentazione orale**).
30. 5<sup>th</sup> International Symposium on Experimental Spinal Cord Repair and Regeneration, Brescia 27-29 Marzo 2004 (**Presentazione orale**).
31. Spring School of the University of Cambridge Centre for Brain Repair, Cambridge, Regno Unito, 22-23 Marzo 2004 (**Presentazione orale**).
32. Master di Bioetica Università di Camerino. Marzo 2003. (**Presentazione orale**).

#### Partecipazione a congressi e corsi

1. *Alliance for neuroscience* 3 Ottobre 2018.
2. 9° FENS forum of Neuroscience. Milan July 5-9 2014
3. XV Congress of the Italian Society for Neuroscience (SINS) Rome 3-5 October 2013.
4. 8° IBRO World Congress of Neuroscience, Firenze 14-18 Luglio 2011.
5. 34° Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia. Rimini, Palacongressi 14-17 Ottobre 2009.
6. XIII Congresso Nazionale della Società Italiana di Neuroscienze (SINS) 2-5 Ottobre 2009 Milano.
7. Società Italiana di Farmacologia 33° Congresso Nazionale, Cagliari, 6-9 Giugno 2007.
8. Nuovi aspetti del signalling in Neuroendocrinologia Milano 1 Dicembre 2006
9. Corso teorico pratico: The OSU Spinal Cord Injury Research Training Program, Ohio University, US 16-7-2006/05-8-2006.

10. Fungene scientific meeting, Lione, 28-30 Novembre 2005 (presenza come deputy del Prof. A.L. Vescovi).
11. 32° Congresso Nazionale Società Italiana di Farmacologia Napoli, 1-4 Giugno 2005.
12. 1ª Riunione Annuale del Consorzio Europeo Fungene (contratto di riferimento LSHG-CT-2003-50394), Berlino, Germania, 10-12 Marzo 2005 (presenza come deputy del Prof. A.L. Vescovi).
13. 1ª Riunione del Consorzio Europeo EVIGENORET, Parigi, Francia, 3-4 Marzo 2005 (Presenza come sostituto del Prof. A.L. Vescovi).
14. Stem Cells Day Agorà, DakoCytomation (Formazione continua) Milano, 8 Marzo 2005.
15. 32° Congresso Nazionale Società Italiana di Microbiologia, Milano 26-29 Settembre 2004.
16. 15th Biennial Meeting of international Society for Developmental Neuroscience, Edinburgo, Regno Unito, 4-7 Agosto 2004.
17. La SMA: Ricerca, Riabilitazione e Vita Quotidiana. Incontro per le Famiglie e gli Operatori Sanitari. Roma, 3-4 Luglio 2004.
18. Giornata Monotematica ITINAD "Le tecniche di Neuroimaging nella diagnosi precoce della Malattia di Alzheimer" Milano 14 Giugno 2003.
19. First Annual European Seminar Series; Application for Real Time PCR Analysis, Milano 8 Maggio 2003.
20. Corso di formazione sulle radiazioni ionizzanti Milano 24 Ottobre 2002.
21. The First Joint Symposium of the National and International Neurotrauma Societies. Tampa, Florida, USA, 27 Ottobre- 2 Novembre 2002. (Relazione su invito in sostituzione del Prof. A.L. Vescovi).
22. 12th International Conference of the International Society of Differentiation. Lione, France, 14-17 Settembre 2002.
23. International Conference on protein modification in signal transduction and aging, Marciana Marina, 15-19 Settembre 1991.

#### Tecniche acquisite

- a) Preparazione di iPS da pazienti con patologie genetiche (SMA) e controlli sani
- b) Microchirurgia necessaria per l'estrazione del sistema nervoso centrale della sanguisuga *Hirudo medicinalis* e di varie zone del sistema nervoso del topo e del ratto.
- c) Colture cellulari, preparazione e manipolazione di cellule staminali neurali adulte umane e murine e di cellule staminali embrionali murine, del midollo osseo murine e del liquido amniotico umane.
- d) Preparazione di genoteche di cDNA, tecniche di clonaggio e sequenziamento del DNA. PCR, RT-PCR, PCR da singole colonie. Costruzione di minigeni per la successiva preparazione di animali transgenici. Northern, Southern e Western blot. Manipolazione di BACs. Preparazione di topi transgenici e KO.
- e) Manipolazione di RNA. Purificazione di RNA da differenti tessuti, saggio della protezione dalle RNasi (RNase protection assay), ibridazione *in situ*. Modificazione biochimica dell'RNA tramite dialdeidi (glyoxal).
- f) Preparazione e purificazione di proteine di fusione. Preparazione, purificazione e analisi di anticorpi.
- g) Elettroforesi mono e bidimensionale, analisi quantitativa dei risultati, western blots.
- h) Induzione chirurgica di lesione midollare contusiva. Analisi comportamentale di animali con lesione midollare per mezzo della scala BBB (ratto) e della scala BMS (topo), grid walking, CatWalk.
- i) Perfusione animali e preparazione di fettine tramite criostato. Colorazione mediante anticorpi degli epitopi di interesse sulle sopraccitate fettine. Analisi al microscopio a fluorescenza e confocale.
- j) Organizzazione, strutturazione di un nuovo laboratorio, organizzazione di uno stabulario convenzionale.

#### Progetti

- Progetti in atto:
1. Studio delle caratteristiche proliferative e differenziative delle cellule staminali neurali murine di topi sospesi come modello di microgravità (in collaborazione con il **Professor**

**Roberto Bottinelli e la Professoressa Monica Canepari**) (finanziato dalle Fondazioni Vertical ed Asamsi).

2. Ruolo delle coesine nella sindrome di Cornelia de Lange (in collaborazione con la **Dott.ssa Valentina Massa**).
3. Preparazione di cellule staminali pluripotenti (iPs) da pazienti affetti da Atrofia Muscolare Spinale (Finanziato dalla Fondazione Asamsi).

Progetti passati

- 1) Studio dell'efficacia terapeutica delle cellule Staminali del Liquido Amniotico da parti cesarei a termine in modelli murini di lesione spinale.
- 2) Studio della fisiologia delle cellule Staminali del Liquido Amniotico da parti cesarei a termine: capacità differenziative e induzione differenziativa neurale.
- 3) Studio delle capacità differenziative delle cellule neurali umane con bassi livelli di espressione del gene Survival motor neuron come modello in vitro dell'atrofia muscolare spinale (in collaborazione con il **Professor Angelo Luigi Vescovi**).
- 4) Ruolo delle cellule staminali nella terapia del glaucoma (in collaborazione con il Professor **Luca Mario Rossetti**).

### **C) ATTIVITÀ GESTIONALI, ORGANIZZATIVE E DI SERVIZIO**

Vicepresidente (presidente supplente) nella commissione C di laurea di Infermieristica presso l'Università degli Studi di Milano dal 2014.

Membro del comitato **Piattaforma Imaging (2015-)** (delegato Prof. S. Centanni)  
Membro del **Comitato Scientifico Risorse Elettroniche**, Università degli Studi di Milano (2008-2012 e 2016).

Membro del **Comitato Scientifico Risorse Elettroniche**, Università degli Studi di Milano (2008-2012 e 2016).

Membro della **Commissione stabulari**, Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria (2009-2012).

Membro **Giunta del Dipartimento (2014-2017)**  
Vicedelegato (Prof. M. Samaia ) **Servizi dipartimentali (2014-2016)**.

### **D) ATTIVITÀ CLINICO ASSISTENZIALI**

*Nessuna*

### **Sinopsi dell'Attività Scientifica Svolta**

**Nell'Ottobre 1987** ho iniziato a lavorare nel laboratorio del **Professor Marcello Brunelli** (sotto la supervisione della dottoressa Mercedes Garcia-Gil) nel Dipartimento di Fisiologia e Biochimica dell'Università degli Studi di Pisa allo scopo di preparare la mia tesi di laurea. Tra il 1987 ed il 1990 ho studiato il pattern proteico in differenti regioni del sistema nervoso centrale (SNC) della sanguisuga *Hirudo medicinalis* per mezzo di elettroforesi bidimensionale con l'intento di correlarne le eventuali differenze con le proprietà funzionali delle varie regioni del SNC stesso in tale invertebrato.

Il SNC della sanguisuga, che è risultato essere un buon modello per lo studio della sinaptogenesi, sviluppo, rigenerazione e dei meccanismi che sottendono a comportamenti complessi, è formato da 21 gangli segmentali, uno cefalico ed uno caudale. Con i miei studi ho stabilito che ci sono delle notevoli differenze nella distribuzione delle proteine tra il ganglio cefalico e quelli segmentali, molto probabilmente correlate con la diversa funzione delle due strutture nervose. Ho inoltre caratterizzato la distribuzione delle proteine citoplasmatiche e di membrana e le modificazioni indotte nella loro fosforilazione tramite estere di forbolo, un attivatore della proteina chinasi C (PKC). Questi dati hanno costituito

l'ossatura della mia tesi di laurea in Scienze Biologiche (discussa il 19/7/1990) e sono stati successivamente pubblicati in **Comp. Biochem. Physiol. B** 99, 4, 859-864 (Garcia-Gil M., **Bottai D.**, Canizzaro M. and Brunelli M. (1991). Effects of Phorbol Ester on Protein Phosphorylation in the Central Nervous System of the Leech *Hirudo medicinalis*: A Two Dimensional Electrophoretical Analysis).

**Nel Novembre 1990**, ho iniziato il corso di dottorato in Neuroscienze di Base sotto la supervisione del Professor **Brunelli** ed in collaborazione con la dottoressa Garcia-Gil. Lo scopo di questo progetto era studiare come neurotrasmettitori endogeni, in particolare la serotonina (5HT), modificassero il pattern di fosforilazione e di sintesi proteica del sistema nervoso centrale della sanguisuga *Hirudo medicinalis*. Era stato infatti appurato che la 5HT, in questo modello animale, è in grado di mimare i fenomeni di apprendimento a breve termine, che cioè vengono conservati per pochi secondi o minuti. Inoltre era stato osservato che iniezioni di agenti bloccanti la 5HT (come la metisergide) erano in grado di prevenire la disabitudine comportamentale (una forma elementare di apprendimento). La 5HT sembrerebbe in grado di agire tramite l'incremento dei livelli intracellulari del cAMP. Usando bloccanti della adenilato ciclasi si può avere infatti una riduzione della latenza del nuoto (fuga da uno stimolo nocivo) dopo stimolazione nocicettiva o dopo applicazioni di 5HT. Sulla base di questi dati sono stati in seguito svolti studi biochimici nel SNC della sanguisuga e sono state caratterizzate alcune proteine chinasi come la PKA, la Ca<sup>2+</sup>/Calmodulina chinasi e la PKC; di queste ne sono stati anche studiati i substrati proteici endogeni mediante elettroforesi bidimensionale.

**Riassumendo nel corso dei miei studi dottorali ho:**

- 1) analizzato le fosfoproteine del SNC della sanguisuga *Hirudo medicinalis* sia in condizioni basali che dopo incubazioni dei gangli con 5HT. Inoltre, per determinare quale proteina chinasi venisse attivata per mezzo dei trattamenti con 5HT, ho condotto delle incubazioni dei gangli con attivatori delle PKA e PKC;
- 2) studiato, nei gangli segmentali, cefalici e caudali, le proteine di nuova sintesi dopo trattamenti sia prolungati che ripetitivi con 5HT. Infatti, in altri modelli, la 5HT è in grado di mimare i fenomeni di apprendimento a lungo termine che, contrariamente a quelli a breve termine, si protraggono per ore o giorni;
- 3) condotto delle stimolazioni ripetitive dei gangli con 5HT in presenza di inibitori della fosforilazione proteica, allo scopo di verificare se la fosforilazione proteica fosse importante per dare inizio ai fenomeni di sintesi proteica.

In breve ho trovato che trattamenti ripetitivi con 5HT inducevano modificazioni della sintesi proteica, mentre trattamenti con inibitori della fosforilazione proteica causavano la riduzione della sintesi delle proteine indotte dalla stimolazione della 5HT. I dati relativi alla mia tesi di dottorato sono stati pubblicati in **Comp. Biochem. Physiol. C**, 104, 1, 125-131 (Garcia-Gil M., **Bottai D.**, Zaccardi M.L., Cannizzaro M. and Brunelli M. (1993). Effect of Serotonin on Protein Phosphorylation in the Central Nervous System of the Leech *Hirudo medicinalis*.), ed in **Electrophoresis** 16, 1251-1254 (Garcia-Gil M., **Bottai D.**, Romano A., Fineschi L., Bini L., Pallini L. and Brunelli M, (1995) Repetitive Treatment with Serotonin Modifies Protein Synthesis and Protein Phosphorylation in the Central Nervous System of *Hirudo medicinalis*.)

Durante questo periodo di ricerca ho inoltre testato quale fosse l'effetto di trattamenti dei gangli con citochine, che in genere agiscono tramite tirosine chinasi, ed ho trovato che l'interleuchine umane 1 e 6 erano in grado di modificare i livelli di fosforilazione proteica nel SNC della sanguisuga in maniera analoga alla serotonina, indicando una possibile interazione tra differenti vie fosforilative. Questi dati sono stati pubblicati in **Brain Research** 641, 155-159 (**Bottai D.**, Garcia-Gil M., Zaccardi M.L., Fineschi L., M. and Brunelli M. (1994). Interleukin-1 and Interleukin-6 Modify Protein Phosphorylation in the Central Nervous System *Hirudo medicinalis*.)

Ho quindi trascorso il mio ultimo anno di dottorato (**1993-1994**) nel laboratorio del Professor **Pierre Drapeau** alla **McGill University** in Montreal, Quebec, Canada, dove ho cercato di caratterizzare, con tecniche di biologia molecolare, l'actina neuronale della sanguisuga, che potrebbe essere coinvolta nei fenomeni di apprendimento in quanto è risultata essere importante durante gli eventi di rimodellamento sinaptico. Da una library di cDNA ottenuta da embrioni di sanguisuga, ho isolato 4 cloni. Essi sono stati parzialmente sequenziati ed ho inoltre effettuato ibridazioni in situ e Northern blots allo scopo di determinarne la loro localizzazione nei diversi tessuti. Uno di questi cloni di actina poteva essere di origine

neurale, ma a causa di fenomeni di cross ibridazione e della scarsa omologia interspecifica non mi è stato possibile stabilire se esso fosse realmente di natura nervosa.

**Nel Gennaio 1995**, dopo il completamento del corso di dottorato, ho iniziato un progetto di **postdottorato** nel laboratorio del **Professor Robert J. Dunn, McGill University, Montreal, Canada**, con il quale stavo già collaborando per portare a termine il mio progetto di clonaggio dell'actina neuronale di sanguisuga *Hirudo medicinalis*. Nei due anni e mezzo successivi, cioè fino al Luglio 1997, mi sono occupato di studiare le basi molecolari della plasticità neurale in un vertebrato inferiore, il pesce elettrico *Apteronotus leptorhynchus*. Lo scopo specifico del mio progetto era quello di determinare il ruolo funzionale dei recettori NMDA nei processi sensoriali di questo pesce che usa un campo elettromagnetico per analizzare l'ambiente che lo circonda e per comunicare con i propri simili. Era stato scelto questo modello in quanto i circuiti nervosi dell'*Apteronotus leptorhynchus* deputati all'analisi delle informazioni sensoriali (elettromagnetiche) sono ben caratterizzati. Era già stato appurato dal **Professor Leonard Maler dell'Università di Ottawa** (con il quale collaboravo per questo progetto) che i recettori NMDA (NR) sono coinvolti in tutti gli ingressi eccitatori dell'Electrical Lateral Line Lobe (ELL). L'ELL è la prima stazione sensoriale dove giungono le informazioni provenienti dai recettori, ed è divisa in 4 porzioni che ricevono segnali dagli elettrorecettori e fungono da filtri spazio temporali. Le funzioni sensoriali di tale regione paiono correlate con le caratteristiche elettrofisiologiche dei recettori NMDA. I recettori NMDA sono una sottoclasse dei recettori ionotropici al glutammato che sono dei canali ligando associati. Essi possono essere divisi in due sottoclassi la 1 (NR1) e la 2 (NR2) (A, B, C e D.), ciascuna delle quali comprende numerose varianti di splicing. Ciascun recettore è formato dalla associazione di almeno una subunità 1 ed una o più subunità 2. Nel sistema nervoso di mammifero i recettori NR1 sono ampiamente distribuiti, mentre quelli di tipo 2 sono espressi in maniera più localizzata.

**La mia ipotesi era che la differente composizione in subunità NR1 e NR2 (A, B, C, e D) del recettore NMDA fosse fondamentale nei processi sensoriali.**

In questo primo postdottorato sono riuscito a clonare il recettore NR1 del pesce elettrico *Apteronotus leptorhynchus*, ne ho caratterizzato le differenti varianti di splicing e ne ho fatto una accurata caratterizzazione della distribuzione sia con tecniche di ibridazione in situ, Northern blot, e RNase protection.

Tra i risultati ottenuti che a mio parere sono più interessanti, vorrei citare la elevata concentrazione di mRNA per recettore NR1 nell'ELL, con particolare localizzazione in neuroni piramidali; un differenziale trasporto di tale messaggero tra dendrite apicale e basilare nei sopraccitati neuroni; una elevata omologia della sequenza nucleotidica dell'NR1 del pesce elettrico e di mammiferi, omologia che è presente anche nelle forme di splicing fatta eccezione per due esoni della zona carbossi-terminale che non sono presenti in mammiferi e la mancanza di un esone che invece si ritrova negli alti vertebrati.

**I risultati di tale lavoro sono stati sintetizzati in tre pubblicazioni:**

**Bottai D., Dunn R.J., Ellis W. and Maler L. (1997).** N-Methyl-D-Aspartate Receptor 1 mRNA Distribution in the Central Nervous System of the Weakly Electric Fish *Apteronotus leptorhynchus*. **The Journal of Comparative Neurology** 389, 65-80;

**Bottai D., Maler L., Dunn R. J. (1998).** Alternative RNA Splicing of the NMDA Receptor NR1 mRNA in the Neurons of the Teleost Electrosensory System. **The Journal of Neuroscience** 18 (14) 5191-5202;

e

**Dunn, R. J., Bottai, D. and Maler, L. (1999).** Molecular Biology of the *Apteronotus* NMDA Receptor NR1 Subunit. **The Journal of Experimental Biology** 202, 1319-1326.

Terminato questo primo post-dottorato nel **Settembre del 1997**, mi sono trasferito in Europa, ad Heidelberg, nel laboratorio del **Professor Peter H. Seeburg (Max Planck Institute)**. Dal Settembre 1997 fino al Marzo 2001 ho studiato, sempre utilizzando tecniche di biologia molecolare, i meccanismi che stanno alla base dei fenomeni di regolazione di trascrizione alternativa in un gene che codifica per proteine chiamate Homer. Nel ratto sono stati clonati tre geni Homer, ma analoghi geni sono stati individuati in topo, drosofila ed uomo; nel ratto essi trascrivono per un totale di almeno 12 messaggeri, e sono tradotti in proteine di circa 350 amminoacidi (aa), Homer 1b/c (H1b/c), Homer 2a/b (H2a/b), e Homer 3 (H3) prodotte costitutivamente e localizzate in svariati tessuti tra cui quello nervoso. Queste proteine sono costituite da due domini principali, nella regione ammino terminale è presente un dominio EVH responsabile del legame di regioni ricche di proline che, ad

esempio, sono presenti nei recettori metabotropici al glutammato (1a, 5a e b), recettori per l'inositolo trifosfato (IP3R), recettori per la ryanodina RyR ed in una nuova famiglia di proteine denominate Shank che fanno parte del complesso NMDAR-PSD95 (PSD: post-synaptic density). La regione carbossi-terminale contiene dei domini coiled-coil responsabili per fenomeni di multimerizzazione di queste proteine Homer. Tramite questi due domini le proteine Homer sono in grado di accoppiare fisicamente i mGluR (1a, 5a e 5b la cui attivazione determina la produzione di inositolo trifosfato) con recettori responsabili del rilascio di calcio da scorte intracellulari come gli IP3R. Questo accoppiamento rende più efficace l'attivazione del mGluR (inoltre l'interazione con le proteine Shank indica che c'è anche un accoppiamento tra recettori NMDA e mGluR (1a, 5a, 5b)).

Esistono comunque due varianti di trascrizione del gene Homer 1 (la cui produzione è indotta da attività neurale) Homer 1a (H1a) ed Ania 3 che non sono dotate di regione coiled-coil e quindi essendo incapaci di dar luogo a multimeri non consentono il sopracitato accoppiamento. H1a e Ania 3 sono dei geni precoci immediati, i quali, anziché essere dei fattori di trascrizione come la maggior parte dei geni precoci immediati, agiscono direttamente alla sinapsi. L'alternativo uso di queste varianti di trascrizione sembra che sia importante in quanto può ridurre l'appaiamento tra recettori metabotropici al glutammato (mGlu-R1/5) sulla membrana plasmatica e recettori per l'inositolo trifosfato (IP3-R) sulla membrana del reticolo endoplasmatico. Quando le proteine H1a ed Ania 3 vengono prodotte esse competono con le proteine H1b/c, H2a/b, H3 per il legame con IP3-R e mGlu-R1a/5 ma non sono in grado di formare dimeri con gli altri componenti della famiglia tramite la regione carbossi-terminale in quanto ne sono prive (esse hanno quindi il ruolo di dominanti negativi). Ciò porta ad un disaccoppiamento (ed eventuale allontanamento) tra IP3-R e mGlu-R1a/5a e b e può risultare in un minore effetto dell'incremento dell'IP3 sul suo recettore (IP3-R) dovuto alla attivazione mGlu-R1a/5 a e b con conseguente riduzione del rilascio del calcio dal reticolo endoplasmatico.

Il meccanismo molecolare responsabile della produzione di H1a ed Ania 3 non è noto. Sono comunque ipotizzabili alcune vie e cioè:

l' uso alternativo di siti di poliadenilazione;

l' uso alternativo del sito accettore o donatore di splicing;

l' uso alternativo di siti di terminazione della trascrizione;

l' uso alternativo di promotori, appaiato ad una alternativa terminazione della trascrizione.

In questo secondo postdottorato mi sono proposto di studiare il meccanismo responsabile dell'uso alternativo di varianti di trascrizione del gene Homer 1. La complessa espressione del gene è unica tra i geni precoci immediati (IEG).

Per prima cosa ho focalizzato la mia attenzione sulla organizzazione del gene determinando che contrariamente agli altri IEG che sono di dimensioni inferiori alle 5 Kbasi , Homer 1 copre oltre le 100 Kbasi sul genoma murino. Le forme H1 b/c sono codificate dagli esoni 1-10 mentre le IEG sono codificate dagli esoni 1-5 e regioni dell'introne 5. Tramite RNase-protection ho stabilito che, previa attivazione del gene indotta dall'attività neuronale, le forme IEG aumentavano di circa 10 volte mentre le forme costitutive rimanevano invariate. Inoltre tramite fish (fluorescent *in situ* hybridization) ho mostrato che i nuovi trascritti primari sono prodotti in neuroni entro pochi minuti dall'induzione dell'attacco epilettico, come tutti gli IEG del resto, e che gli esoni specifici per Homer 1b/c sono esclusi dai trascritti primari indotti dall'attività. L'attività neuronale aumenta repentinamente i livelli di trascrizione, promuove una terminazione prematura dei trascritti nell'introne 5 trasformando regioni che in condizioni costitutive sono introniche in esoni. Sulla base della struttura esonica-intronica del gene Homer 1 (**Bottai D., Guzowski JF., Schwarz MK., Kang SH., Xiao B., Lanahan A., Worley PF. and Seeburg PH. Synaptic Activity-Induced Conversion of Intronic to Exonic Sequence in Homer 1 Immediate Early Gene Expression. (2002). The Journal of Neuroscience. 22(1) 167-175**) il meccanismo che pare più probabile è un uso alternativo dei segnali di poliadenilazione.

Un simile meccanismo è stato descritto per la regolazione della produzione delle due forme di immunoglobuline M (IgM), quella legata a membrana e quella secreta. In questa modificazione post-trascrizionale il Cleavage Stimulating Factor (CstF) gioca un ruolo fondamentale. L'aumento della concentrazione del fattore CstF64 è sufficiente a determinare lo spostamento della produzione della IgM dalla forma legata a membrana a quella secreta. Questo fenomeno può essere spiegato con la presenza di due siti di poliadenilazione, con differente attività per il trimero CstF. Il meccanismo coinvolto nella

produzione di queste due molecole molto probabilmente si differenzia da quello delle IgM e potrebbe coinvolgere fenomeni fosforilativi che potrebbero rendere un fattore analogo al CstF 64 (o una proteina ad esso analoga) più affine per il sito di poliadenilazione a minore affinità determinando il taglio e la poliadenilazione in siti localizzati a monte (5') rispetto al sito comunemente usato per la produzione di H1b/c.

Allo scopo di delineare ulteriormente il ruolo fisiologico del gene Homer 1 in collaborazione con il dottor Martin Schwarz ho prodotto due topi KO, un KO completo nel quale abbiamo eliminato completamente il gene ed un secondo nel quale abbiamo eliminato le varianti di trascrizione brevi (H1a ed Ania 3) per consentire solo la produzione della forma costitutiva lunga H1c. Questo progetto è stato preso in mano dal dottor Martin Schwarz al momento in cui ho lasciato il laboratorio del Prof. Peter Seeburg.

**Nell'Aprile 2001**, mi sono trasferito in Italia nell'Istituto di Genetica Molecolare del CNR di Pavia dove, sotto la supervisione della Dott.ssa Daniela Toniolo, ho iniziato un progetto nel quale ho studiato il ruolo del GDI (GDP-dissociating inhibitor) nel ritardo mentale. Nel 1997 questo gene era stato trovato mutato in alcuni maschi affetti da un ritardo mentale non sindromico. Allo scopo di meglio caratterizzare il ruolo di tale gene nei fenomeni di apprendimento è stato preparato un topo KO per il gene GDI ed esso è stato studiato da un punto di vista comportamentale e biochimico. In particolare io mi sono occupato dell'analisi biochimica sia tramite un'approccio elettroforetico bidimensionale che per mezzo di un'analisi in sinaptosomi funzionali di ippocampo. È stato così dimostrato che il topo mancante del gene per il GDI presenta un deficit nell'uptake del glutammato a livello dell'ippocampo.

**Nel Maggio 2002** ho iniziato ad interessarmi di cellule staminali neurali interagendo con il **Professor Vescovi** (condirettore dello Stem Cell Research Institute) presso il DIBIT, Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor. Tra il Giugno 2002 ed il Dicembre del 2005 sono stato coinvolto in quattro linee di ricerca:

- 1) Analisi genomica funzionale delle cellule staminali embrionali non umane (murine).
- 2) Studio del ruolo di neurotrasmettitori ed ormoni nei fenomeni di proliferazione e differenziamento delle cellule staminali neurali murine.
- 3) Cellule staminali neurali: un nuovo approccio cellulare per l'atrofia muscolare spinale.
- 4) Studio del recupero funzionale indotto dal trapianto di cellule staminali neurali in modelli animali acuti di contusioni del midollo spinale.

**Analisi genomica funzionale delle cellule staminali embrionali non umane (murine).**

L'obiettivo principale di questo progetto, che ha avuto inizio nel marzo 2004, è stato lo studio dell'espressione di geni implicati nella specificazione neurale e nel differenziamento del mesencefalo ventrale e del telencefalo.

Dati recenti ottenuti dal gruppo Vescovi indicano che cellule staminali provenienti da varie regioni del sistema nervoso centrale (SNC) del topo hanno caratteristiche di proliferazione e di differenziamento differente.

In particolare le cellule staminali (NSC) provenienti dalla regione RE1 intermedia tra il bulbo olfattivo e la zona sotto ventricolare (SVZ) producono, quando indotte a differenziarsi, una percentuale di oligodendrociti superiore rispetto alle NSC provenienti dal bulbo olfattivo o dal SVZ. Inoltre le NSC del bulbo olfattivo proliferano con una velocità decisamente inferiore rispetto a quella delle NSC provenienti dal RE1 o dal SVZ. Queste diversità sia differenziative che proliferative possono essere un buon punto di partenza per una analisi genomico funzionale ovvero per stabilire, in base alla diversa espressione di geni tra le NSC delle varie regioni, quali di questi geni abbiano un ruolo nella maggiore capacità di produrre oligodendrociti oppure siano importanti per una più alta velocità di proliferazione.

In particolare ci siamo proposti di confrontare il profilo di espressione genica tra RE1 ed SVZ a differenti punti temporali del differenziamento cioè cellule indifferenziate, cresciute in presenza di fattori proliferativi quali l'FGF2 e l'EGF, cellule alle fasi iniziali del differenziamento (progenitori coltivati in presenza del solo FGF2 e di fattori di adesione) e cellule completamente differenziate ovvero cresciute per due giorni in presenza di FGF2 e fattori di adesione ed in seguito in presenza sempre di fattori di adesione e di siero ma senza fattori mitogeni. Un analogo approccio è stato applicato per la comparazione tra le cellule staminali neurali ottenute da SVZ o da bulbo olfattivo ma in questo caso ci siamo focalizzati sullo studio dei geni coinvolti nella proliferazione cellulare facendo confronti a bassi ed alti passaggi.

Abbiamo effettuato i sopracitati esperimenti utilizzando microchips della Affymetrix in collaborazione con altri componenti del consorzio Fungenes. (Il progetto è terminato a Marzo del 2007 ed è passato in mano alla dottoressa Natasa Zarovni quando sono entrato in servizio come ricercatore all'Università degli studi di Milano nel Gennaio 2006).

**Studio del ruolo di neurotrasmettitori ed ormoni nei fenomeni di proliferazione e differenziamento delle cellule staminali neurali murine.**

L'interesse del ruolo dei neurotrasmettitori in fenomeni differenti da quelli convenzionali di comunicazione tra cellule nervose adulte nasce dalla constatazione che numerosi neurotrasmettitori, quali le monoammine, appaiono nell'embrione prima che i neuroni si siano differenziati, per esempio la serotonina può agire da morfogeno.

Nell'ambito dello studio del ruolo di neurotrasmettitori ed ormoni nella proliferazione e nel differenziamento delle cellule staminali neurali da feti umani abbiamo deciso di utilizzare colture di cellule staminali neurali murine provenienti dalla zona sottoventricolare. Il progetto è articolato nelle seguenti fasi:

L'espansione del numero di cellule.

L'analisi tramite PCR, immunocitochimica e wester blot della presenza dei recettori dei vari neurotrasmettitori di interesse.

Lo studio *in vitro* del ruolo di questi neurotrasmettitori sulla proliferazione e sul differenziamento cellulare.

Da analisi condotte *in vivo* nel topo è stato appurato che trasmettitori come Gaba ed ATP possono modificare la proliferazione di varie aree del SNC come la zona ventricolare e quella sub ventricolare. Ho quindi cercato di condurre esperimenti usando NSC murine (come primo approccio) allo scopo di stabilire l'effetto di questi neurotrasmettitori su queste cellule.

Sia l'analisi dell'incorporazione di timidina che lo studio delle curve di crescita (tra cellule non trattate e cellule trattate con Gaba e ATP) hanno permesso di stabilire che questi neurotrasmettitori inducono un cambio dei livelli proliferativi delle NSC murine. I passaggi successivi della ricerca sono stati indirizzati sia all'analisi dei meccanismi responsabili di questi cambiamenti, ovvero un cambio della velocità del ciclo cellulare, una ridotta apoptosi, un'alterazione nella simmetria di divisione, che all'estensione dell'analisi alle cellule umane. Questi risultati sono stati sintetizzati in due tesi di Laurea (presentate da Federica Alciato e Vincenzo Catanzariti).

**Cellule staminali neurali: un nuovo approccio cellulare per l'atrofia muscolare spinale.**

L'atrofia muscolare spinale infantile (SMA) è una malattia genetica autosomica caratterizzata dalla eccessiva degenerazione di motoneuroni del midollo allungato e del midollo spinale risultante in un progressivo indebolimento e perdita dei muscoli volontari.

La SMA può essere classificata sulla base del decorso clinico in tre tipi: la I (malattia di Werdnig-Hoffmann), la II (la forma intermedia) e la III (malattia di Kugelberg-Welander). La forma I è considerata a tutti gli effetti la più acuta e devastante ed è caratterizzata da un inizio precoce, da una ipotonia dei muscoli volontari e generalmente progredisce in una fatale crisi respiratoria. La SMA di tipo II è meno grave della I e la III è invece considerata come una forma giovanile. Oltre all'interessamento dei motoneuroni del midollo allungato e del midollo spinale nella forma I pare ci sia un coinvolgimento dei gangli delle radici dorsali nelle colonne di Clarke e nel nucleo talamico laterale specialmente in soggetti che sopravvivono per periodi relativamente lunghi.

Il progetto ha due obiettivi principali, in primis la messa a punto delle condizioni necessarie all'apertura della barriera ematoencefalica allo scopo di permettere l'ingresso delle cellule staminali nel SNC via iniezione endovenosa. In una fase parallela abbiamo provato a contrastare, in modelli murini di SMA, l'evolversi della malattia con trattamenti con cellule staminali neurali adulte.

**Ricerca di nuove fonti di cellule staminali. Studio del recupero funzionale indotto dal trapianto di cellule staminali in modelli animali acuti e cronici di lesioni del midollo spinale.**

I danni post-traumatici del midollo spinale (SCI) sono annoverati tra le patologie neurologiche più devastanti, poiché si traducono spesso in una perdita parziale o completa del controllo motorio e sensoriale. L'incapacità di rigenerare tipica delle cellule nervose danneggiate ha spinto quindi i ricercatori ad individuare terapie cellulari sostitutive atte a ripristinare la funzione neurologica. Tra queste terapie vi è sicuramente il trapianto di tessuto cerebrale fetale il quale, oltre a comportare problemi etici e morali, non permette di controllare molti parametri funzionali cellulari che sono critici per l'effettivo

attecchimento del trapianto e per l'ottenimento dell'effetto terapeutico. La recente scoperta che il SNC di mammifero, sia fetale che adulto, contiene cellule staminali multipotenti - le quali benché espandibili come elementi indifferenziati, possono essere poi indotte a differenziare in neuroni, oligodendrociti ed astrociti - ha permesso di ipotizzare una nuova strategia di trapianto alternativa all'uso di tessuto cerebrale fetale.

Lo scopo di questo progetto era di individuare fonti diverse di cellule staminali che possano avere una efficacia terapeutica nella ricostruzione tissutale del parenchima midollare lesionato.

Il progetto può essere suddiviso in varie fasi:

- Ricerca di varie fonti di cellule staminali da vari tessuti;
- Caratterizzazione delle cellule staminali da vari tessuti;
- Eventuale neuralizzazione allo scopo di renderle più idonee al trapianto in modelli di lesione spinale;

- Valutazione della loro efficacia in modelli murini di lesioni spinali sia acuti che cronici.

**I risultati di queste linee di ricerca sono stati sintetizzati in quattro pubblicazioni:**

**Bottai D., Fiocco R., Gelain F., Defilippis L., Galli R, Gritti A: and Vescovi L. A.. (2003) Neural Stem Cells In The Adult Nervous System. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*, 12; 655-670.**

Gelain F., **Bottai D.**, Vescovi A. L., Zhang S.. (2006) Designer self-assembling Peptide nanofiber scaffolds for adult mouse neural stem cell 3-dimensional cultures. *PLoS ONE*. 1: e119.

D. Ferrari, Vescovi A. L. and **Bottai D.** The stem cells as a potential treatment for neurodegeneration. *Methods Mol Biol*. 2007; 399; 199-213.

e

Givogri M. I., **Bottai D.**, Zhu H. L., Fasano S., Lamorte G., Brambilla R., Vescovi A., Wrabetz L., Bongarzone E.. (2008) Multipotential Neural Precursors Transplanted into the Metachromatic Leukodystrophy Brain Fail to Generate Oligodendrocytes but Contribute to Limit Brain Dysfunction. *Developmental Neuroscience*, 30(5); 340-357.

**Dal Gennaio 2006 mi sono trasferito nel Laboratorio dei Professori Gorio/Di Giulio:**

I progetti di cui mi sono occupato sono stati:

La caratterizzazione di cellule staminali da varie regioni del sistema nervoso (zona sottoventricolare, bulbo olfattivo, estensione rostrale 1, ippocampo, midollo spinale), ottenute sia espianando le corrispondenti zone dopo il sacrificio dell'animale, che a vari tempi dopo la morte del medesimo allo scopo (in quest'ultimo caso) di mimare i tempi che intercorrono, nel caso d'individui umani, tra la morte e i vari espianti. A tal proposito possiamo affermare che siamo stati in grado di ottenere colture di cellule staminali neurali dalla SVZ anche a 16 ore dopo il decesso.

Inoltre abbiamo cercato di produrre cellule staminali neurali da tessuto epiteliale (sia pelle che colon), inizialmente murino ma con il proposito di passare successivamente all'uomo, e di liquido amniotico umano.

Trapianti in modelli di lesione acuta utilizzando NSC-GFP da SVZ.

I trapianti sono stati effettuati sia per via intramidollare che tramite iniezione endovenosa. Per questo progetto sono state utilizzate cellule staminali provenienti da topi transgenici (green fluorescent protein, GFP) oppure cellule wild type opportunamente modificate (GFP). Come controlli sono stati utilizzati sia iniezioni di PBS, che iniezioni di fibroblasti murini primari o NSC uccise da calore.

L'efficacia del trapianto è stata analizzata mediante:

- Lo studio del recupero motorio e funzionale.
- L'analisi dell'integrazione delle cellule trapiantate.
- L'analisi anatomopatologica, istochimica ed in microscopia elettronica.

In definitiva in questo studio abbiamo appurato che le NSC-GFP sono in grado di indurre un recupero morfofunzionale nell'animale trapiantato che è significativamente superiore rispetto ai vari controlli. Inoltre queste cellule paiono non avere un ruolo sostitutivo ma farmacologico, nel senso che non sostituiscono cellule uccise dal danno, bensì producono fattori trofici che possono contribuire ad una riduzione degli effetti (infiammatori) dovuti al danno secondario che si verifica dopo la lesione. Questi risultati sono stati riassunti nel manoscritto:

**D. Bottai**, Laura Madaschi, Anna Maria Di Giulio and Alfredo Gorio. Viability-Dependent Promoting Action of Adult Neural Precursors in Spinal Cord Injury (2008). **Molecular Medicine**, Sep-Oct; 14(9-10):634-44.

In un progetto analogo abbiamo utilizzato cellule staminali embrionali di topo e dopo averle caratterizzate le abbiamo iniettate in modelli murini di lesioni spinali acute ottenendo anche in questo caso un significativo recupero motorio rispetto agli appropriati controlli. I risultati di questo progetto sono stati sintetizzati nel lavoro:

**Bottai D.**, Cigognini D., Madaschi L., Adami R., Nicora E., Menarini M., Di Giulio A. M., Gorio A. (2010). Embryonic Stem Cells Promote Motor Recovery and Affect Inflammatory Cell Infiltration in Spinal Cord Injured Mice. **Experimental Neurology** 223; 452-463.

Complessivamente l'attività di ricerca svoltasi nel laboratorio di Farmacologia dell'Università di Milano (Ospedale San Paolo) può essere sintetizzata nei seguenti punti:

1. Isolamento e caratterizzazione di cellule staminali neurali murine da varie regioni del sistema nervoso centrale.
2. Isolamento e caratterizzazione di cellule staminali neurali da zona sottoventricolare di cadaveri (murine ed umane).
3. Isolamento e caratterizzazione di cellule staminali umane da cordone ombelicale e da liquido amniotico.
4. Neuralizzazione delle cellule del liquido amniotico umano.
5. Utilizzo delle linee cellulari isolate in modelli murini di lesione spinale (contusione ed emisezione), in presenza o meno di supporti (scaffolds) per consentire una disposizione tridimensionale delle cellule trapiantate.

In collaborazione con il Dottor Formenti (Università di Milano) abbiamo effettuato dei test di compatibilità di alcuni biomateriali con le cellule staminali neurali sia per quel che concerne i cambiamenti sia attività proliferativa che differenziativa. Questi risultati ottenuti nel contesto di un progetto Europeo Mateo FlashPoM, sono stati riassunti nel lavoro

Henry G.R.P., Heise A., **Bottai D.**, Formenti A., Gorio A., Di Giulio A.M., and Koning C.E.

Acrylate end-capped poly(ester-carbonate) and poly(ether-ester)s for polymer-on-multielectrode array devices: synthesis, photocuring and biocompatibility (2008).

**Biomacromolecules**, 9(3); 867-878.

Successivamente mi sono occupato di caratterizzare sia con approcci immunoistochimici che di citofluorimetria a flusso le cellule del fluido amniotico ottenuto da parti a termine.

Il liquido amniotico contiene una popolazione cellulare eterogenea, formata da cellule derivate dal feto e dagli annessi fetali. Una classificazione risalente al 1983, ma ancora ampiamente accettata, divide queste cellule in tipo amniotico, derivate dal corion e dall'amnios, tipo fibroblastico, appartenenti al connettivo ed al derma del feto, ed in tipo epitelioidi, desquamate dalla pelle e dal tratto urinario e digestivo del feto. Questa classificazione si basa solo su caratteristiche morfologiche, di crescita e biochimiche, in quanto non esistono marcatori certi per ciascuno di questi tipi cellulari, per cui sarebbe opportuno analizzarle utilizzando un pannello di marcatori sufficientemente ampio per poterle caratterizzare in maniera completa.

Il primo obiettivo del nostro studio è stato la messa a punto di un metodo per isolare e separare da campioni di liquido amniotico ciascuno di questi tipi cellulari (AFCs), per poi successivamente, studiarne le caratteristiche morfologiche, di crescita e immunofenotipiche e la multipotenzialità. Sono state isolate e studiate numerose colture da varie pazienti, #1.1, #3.5, #3.6, #6.2, #7.5, #7.30, #8.10, #9.1 ed altri. Il loro studio ha portato a stabilire che possono essere distinte in due grosse categorie, una mesenchimale-endoteliale ed una mesenchimale-muscolo-neurale.

Questi studi si sono concretizzati nel lavoro:

**Bottai D.**, Cigognini D., Nicora E., Moro M., Grimoldi M.G., Adami R., Abrignani S., Marconi A.M., Di Giulio A.M., Gorio A. Third trimester amniotic fluid cells with the capacity to develop neural phenotypes and with heterogeneity among sub-populations. **Restor Neurol Neurosci.** @pub 2011 Nov 21 Volume 30, 1 / 2012:69-80

Una osservazione successiva molto interessante è stata che solo le linee esprimenti marcatori muscolo-neurali inducevano un significativo recupero morfo-funzionale qualora trapiantati in modelli murini di lesione spinale determinando una preservazione della mielina e una migliore angiogenesi. Questi risultati ci hanno spinto a verificare quale fosse il ruolo delle cellule trapiantate nella ricostruzione dei vasi a livello della lesione.

Alcune di queste colture inducevano quindi un miglioramento morfofunzionale nell'animale trapiantato. Ci siamo chiesti quindi se tale effetto fosse dovuto a fenomeni di sostituzione delle cellule danneggiate da parte delle cellule trapiantate. A livello del midollo spinale, in prossimità della lesione il numero di cellule del liquido amniotico (AFCs) poche cellule sono rilevabili. La domanda successiva è stata se quelle poche cellule presenti fossero in grado di produrre citochine antiinfiammatorie e neuroprotettrici in grado di permettere l'eventuale preservazione del tessuto nervoso dal danno secondario. Purtroppo anche in questo caso la risposta è stata negativa e cioè i livelli di trascritti di numerose di queste citochine non cambiava tra i campioni trattati ed i controlli. Ci siamo quindi chiesti se in realtà le cellule trapiantate potessero espletare un effetto neuroprotettivo agendo da un'altra sede. In altri lavori è stato infatti dimostrato che le cellule umane mesenchimali (quindi simili per origine alle nostre) si localizzassero prevalentemente nel polmone previa somministrazione sistemica. Anche nel nostro caso le AFCs si localizzano prevalentemente in tale organo. La produzione di citochine antiinfiammatorie o neuro protettrici è comunque esigua in questo tessuto. In realtà abbiamo notato che a livello del midollo c'era un grosso incremento a 2 e 7 giorni dei livelli di HIF e a 7 giorni dei livelli di VEGF che potrebbero spiegare la maggiore formazione di vasi e la maggiore preservazione della mielina in prossimità della lesione. In questo periodo stiamo valutando quali possano essere i fattori in grado di attivare la via dell'HIF.

Ulteriori studi ci hanno però permesso di stabilire che in realtà le cellule trapiantate che avevano un ruolo terapeutico erano maggiormente localizzate a livello del polmone da dove erano in grado di produrre in particolare una citochina l'HGF la quale veniva rilasciata a livello ematico e raggiungeva il sito della lesione dove il suo recettore attivato era in grado di rispondere.

Questo lavoro è stato riassunto nel manoscritto:

**Bottai D., S., Scesa, Cigognini D., Adami R., Nicora E., Abrignani S., Di Giulio A.M. and Gorio A.** Third trimester NG2-positive amniotic fluid cells are effective in improving repair in spinal cord injury. **Experimental Neurology** Volume 254, April 2014, Pages 121-133 (IF= 4.645).

**Nel 2014 ho iniziato a lavorare in maniera completamente indipendente** e ho iniziato a sviluppare un nuovo progetto nel quale mi propongo di studiare gli effetti dell'inattività motoria sulla neurogenesi iniziando a collaborare con il Professore Roberto Bottinelli e la Professoressa Monica Canepari (Dipartimento di Medicina Molecolare dell'Università degli Studi di Pavia) per un progetto volto a determinare quali sono gli effetti della microgravità sulla neurogenesi. Utilizzando dei topi posti in sospensione per due settimane abbiamo saggiato le capacità proliferative e differenziative (successivamente anche quelle elettrofisiologiche) delle cellule staminali neurali della zona sottoventricolare e del midollo spinale.

Numerose patologie a carattere neurologico determinano una incapacità di movimento, ne sono esempi la lesione midollare (SCI), l'atrofia muscolare spinale (SMA), la sclerosi laterale amiotrofica (ALS). In queste malattie il danno meccanico (SCI) o quello genetico (SMA) causano la morte dei neuroni in particolare dei motoneuroni che sono responsabili della trasmissione dei segnali motori dalle aree motorie superiori ai muscoli determinando conseguenze fisiopatologiche.

È noto che l'attività fisica riduce il rischio di sviluppare svariate patologie, oltre quelle cardiovascolari anche quelle associate ad una compromissione della capacità cognitiva e della funzione cerebrale, attraverso dei cambiamenti che avvengono a livello molecolare, cellulare e di circuiti neurali.

Studi epidemiologici che hanno esaminato la relazione tra l'esercizio fisico e la diagnosi di Alzheimer (AD), hanno indicato che l'incidenza di AD aumenta negli individui che praticano attività fisica meno di tre volte a settimana rispetto a quelli che si allenano con maggiore frequenza. Si ritiene inoltre che la semplice attività fisica sia determinante per indurre un miglioramento dell'attività cognitiva legata ad una aumentata neurogenesi.

L'azione sinergica di fattori estrinseci ed intrinseci presenti nel microambiente dove risiedono le NSC (detto nicchia) ne controlla il destino ed è capace di regolare l'equilibrio fra cellule progenitrici indifferenziate e produzione di nuove cellule differenziate; il destino delle NSCs è determinato da fattori di regolazione del differenziamento positivi come leukemia inhibitory factor e negativi come il recettore per Notch ma altri fattori come il

Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), prodotto dal muscolo durante l'attività fisica, hanno un ruolo sicuramente importante.

La dimostrazione che gli stimoli biochimici provenienti dal microambiente giocano un ruolo primario nel destino delle NSCs, deriva da esperimenti di trapianto svolti nell'ultimo decennio del secolo scorso. Infatti le stesse NSCs trapiantate sia nella via rostrale migratoria (RMS) che nell'ippocampo diventano, grazie ai diversi stimoli che ricevono, rispettivamente interneuroni e neuroni granulari.

Di grande rilevanza sono numerosi lavori degli ultimi anni che hanno dimostrato quanto sia importante l'impatto che l'attività fisica volontaria ha sulla neurogenesi; essa infatti è in grado di produrre un notevole aumento dei livelli proliferativi delle cellule progenitrici, inoltre, recentemente, è stato anche dimostrato che l'attività fisica è in grado di ripristinare completamente una neurogenesi artificialmente alterata in modelli murini.

Sulla base di questi dati potremmo pensare che l'incapacità o la severa riduzione dell'attività motoria che si verifica in condizioni patologiche come quelle citate precedentemente, ma anche in situazione di allettamento o nella condizione a cui è soggetto l'astronauta, che permane per lunghi periodi di tempo in condizione di microgravità, potrebbe avere un ruolo negativo sulle capacità cognitive legate alla neurogenesi ed inoltre potrebbe contribuire ad aggravare la situazione patologica che la determina. Ci siamo quindi chiesti come cambi la neurogenesi in condizioni di severa limitazione di movimento.

Questa ricerca si propone di studiare i processi di neurogenesi in animali sottoposti ad una limitazione della loro capacità di movimento, individuando le possibili differenze tra essi e soggetti liberi di condurre una normale attività motoria, questo ci permetterà di capire se la forzata inattività fisica aggravi la patologia primaria che la determina.

Ci prefiggiamo di utilizzare un modello murino di deprivazione o severa limitazione di movimento, hindlimb-unloading (HU) che simula sia la microgravità che la mancanza di movimento che si verifica nelle persone affette da patologie che limitano la motilità, allo scopo di isolare da essi cellule staminali neurali (da varie regioni del Sistema Nervoso Centrale (SNC)) e di confrontare le loro caratteristiche con quelle isolate da animali di controllo ovvero liberi nella loro attività motoria.

un primo lavoro di revisione della letteratura è stato già pubblicato e ci ha permesso di capire su quali aspetti del progetto dovremmo focalizzarci:

Adami R. and **Bottai D.** Movement impairment: Focus on the brain., *J Neurosci Res.* 2016 Jan 13. doi: 10.1002/jnr.23711. Vol 94:310-317.

Partendo dall'osservazione delle notevoli differenze nelle capacità proliferative e differenziative tra animali HU e CTR riteniamo che sarebbe opportuno caratterizzare le proprietà di membrana delle cellule ovvero effettuare una analisi elettrofisiologica in collaborazione con il Prof. Michele Mazzanti (Fisiologia, Dipartimento di Bioscienze). Inoltre in precedenti lavori è stato dimostrato che fosfolipidi e sfingolipidi si modificano durante le fasi differenziative delle NSCs, per tale motivo abbiamo attivato una collaborazione con la Dott.ssa Paola Signorelli (Biochimica, DiSS) con la quale intendiamo analizzare le differenze in composizione dei lipidi strutturali e di segnale e come queste si modifichino durante l'induzione al differenziamento.

In questo progetto siamo stati in grado di isolare e iniziare la caratterizzazione delle NSCs da zona sottoventricolare in animali di 6 mesi di età (abbiamo anche isolato cellule da altre regioni neurogeniche come quelle provenienti dal midollo spinale ed ippocampo).

Lo studio delle proprietà proliferative ha indicato una ridotta capacità di dividersi delle NSCs ottenute da topi sospesi. Inoltre dalle prime analisi sulle capacità di differenziare risulta evidente che le NSCs ottenute da topi sospesi producono significativamente molti meno neuroni rispetto alle cellule ottenute da topi normali (con una riduzione di 12 volte delle cellule differenziate in neuroni  $p < 0.012$ ). Inoltre, la morfologia dei loro astrociti è molto più fibrillare rispetto a quella citoplasmatica dei CTR. L'analisi citofluorimetrica, condotta in collaborazione con la Patologia Generale del DiSS (Prof. Raffaella Chiaramonte) ha indicato che gli HU presentano una tendenziale diminuzione delle cellule in fase G2/M (G2/M-Hu= 68% G2/M CTR), un aumento delle cellule in fase G0/G1 e un tendenziale aumento della percentuale di cellule in apoptosi. Abbiamo inoltre dimostrato (MTT) che l'attività metabolica delle cellule ottenute da topi HU è inferiore del circa il 35% (a due giorni dopo il piastramento) rispetto a quello delle cellule da topi CTR ( $p < 0.01$ ). Questo progetto si è concretizzato con il lavoro:

Adami R., Pagano J., Colombo M., Platonova N., Recchia D, Chiaramonte R., Bottinelli R, Canepari M and **Bottai D.** Reduction of Movement in Neurological Diseases: Effects on Neural Stem Cells Characteristics Front. Neurosci., 23 May 2018 <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00336>.

Nel 2016 in collaborazione con il Dott. D'Agostino ho iniziato a lavorare sulle cellule pluripotenti indotte iP. Questa collaborazione si è concretizzata in due lavori

M. Marcatili, F. Marsoner, A. D'Agostino, T. Karnavas, **D. Bottai**, S. Scarone, L. Conti (2016). Establishment of an induced pluripotent stem cell (iPSC) line from a patient with Clozapine-responder Schizophrenia. STEM CELL RESEARCH, vol. 17, p. 630-633, ISSN: 1873-5061, doi: 10.1016/j.scr.2016.11.009

e

F. Marsoner, M. Marcatili, T. Karnavas, **D. Bottai**, A. D'Agostino, S. Scarone, L. Conti (2016). Generation and characterization of an induced pluripotent stem cell (iPSC) line from a patient with clozapine-resistant Schizophrenia. STEM CELL RESEARCH, ISSN: 1873-5061, doi: 10.1016/j.scr.2016.11.005

Le conoscenze acquisite con questa collaborazione mi hanno permesso di iniziare a sviluppare un progetto che prevede la produzione di iP da pazienti affetti da atrofia muscolare spinale (SMA). Tali pazienti hanno un decadimento motorio dovuto al fatto che i loro motoneuroni degenerano in quanto in questa patologia il gene Survival motor neuron non è funzionante. Ovviamente non è possibile studiare la patologia dei motoneuroni umani, e benché siano disponibili modelli animali, lo studio su cellule umane può dare maggiore impulso alla comprensione della patologia e ad eventuali approcci terapeutici efficaci (anche negli adulti visto che adesso sono disponibili due trattamenti per pazienti SMA di età inferiore ai 6 mesi). Dato che i pazienti affetti da SMA sono molto delicati ho deciso di non utilizzare fibroblasti ottenuti da biopsie cutanee ma di produrre le iP da cellule ottenute da urine di pazienti e consanguinei sani.

Abbiamo recentemente prodotto cellule da urine e le abbiamo indotte ad iP. Stiamo attualmente caratterizzandole. Questi studi si sono concretizzati nel lavoro: Adami R. and **Bottai D.** Spinal Muscular Atrophy Modeling and Treatment Advances by Induced Pluripotent Stem Cells Studies. Stem Cell Reviews and Reports. July 2019 DOI: 10.1007/s12015-019-09910-6.

Dal 2015 ho iniziato una collaborazione con la Dott.ssa Valentina Massa per lo studio della sindrome di Cornelia de Lange. Il progetto si propone di capire il ruolo di una istone deacetilasi HDAC8 sulla sindrome stessa effettuando esperimenti di inibizione della attività di questa proteina e silenziandone l'espressione con siRNA. Questo lavoro si è concretizzato con la pubblicazione di un manoscritto:

**Bottai D.**, Spreafico M., Pistocchi A., Fazio G., Adami R., Grazioli P., Canu A., Bragato C., Rigamonti S., Parodi C., Cazzaniga G., Biondi A., Cotelli F., Selicorni A., Massa V. Modeling Cornelia de Lange Syndrome in vitro and in vivo reveals a role for cohesin complex in neuronal survival and differentiation. Hum Mol Genet. 2019 Jan 1;28(1):64-73 doi: 10.1093/hmg/ddy329.

Data

22/09/2019

Luogo

Milano