



Gruppo Embriologico Italiano (GEI) - LVII Convegno

Monteortone (Padova) - 5-8 giugno 2011



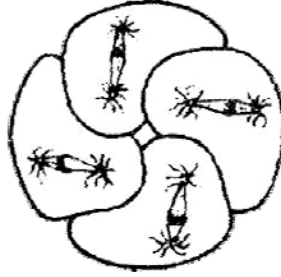
Con il patrocinio della città di Abano Terme,



Comune di Abano

dell'Università di Padova e del Dipartimento di Biologia





GRUPPO EMBRIOLOGICO ITALIANO

LVII CONVEGNO

Monteortone (PD) 5-8 giugno 2011

**PROGRAMMA
E
ABSTRACT BOOK**

Organizzatori:

Giovanna Zaniolo
Paolo Burighel
Lorenzo Colombo
Paola Belvedere
Loriano Ballarin
Lucia Manni
Francesca Cima

Gruppo Embriologico Italiano (GEI)

LVII Convegno

Monteortone (PD)

Hotel S. Marco

5-8 giugno 2011

Programma scientifico

Domenica 5 giugno

Arrivo

19.30 Aperitivo di benvenuto e cena

Lunedì 6 giugno

08.15-09.00 Registrazione

9.00 -09.45 Saluti di benvenuto e apertura del Convegno

9.45-10.00 **G. Barsacchi** (segretario GEI), *Università di Pisa*
150 anni di unità nazionale e biologia dello sviluppo in Italia

Sessione 1

10.00-10.45 **S. Piccolo**, *Università di Padova*
Regolazione del segnale TGF-beta durante lo sviluppo embrionale: da Spemann ai microRNAs

10.45-11.15 Coffee Break

11.15-11.30 **M. Cordenonsi**, S. Piccolo, *Università di Padova*.
The p53 tumor suppressor integrates TGFbeta and FGF signaling for mesoderm induction in vertebrate embryos

11.45-12.00 **L. Morsut**, E. Enzo, M. Aragona, S. M. Soligo, G. Bressan, S. Dupont, S. Piccolo, *Università di Padova*.
Ectoderm/Tif1g regola negativamente l'attività di Smad permettendo il corretto patterning dell'embrione mammifero

12.00-12.15 **B. Avallone**¹, A. D'Angelo², A. De Angelis², R. Tammaro², F. Brunella². ¹*Università di Napoli "Federico II"*. ²*TIGEM Napoli*.
The basal body protein Ofd1 is essential for dorso-ventral patterning and axoneme elongation in the embryonic cortex

12.15-12.30 S. Macri^{1,2}, M. Onorati^{1,2}, R. Sgarra³, G. Ros³, G. Manfioletti³, **R. Vignali**^{1,2}.
¹*Università di Pisa*. ²*Istituto Toscano Tumori, Firenze*. ³*Università di Trieste*.
Ruolo di XHMG2 nelle creste neurali di *Xenopus laevis*

13.00 Pranzo

Sessione 2

- 15.00-15.45 **T. Stach.** *Freie Universitaet Berlin*
Entering new dimension of evolutionary research
- 15.45-16.00 **M. Pestarino**, L. Moronti, G. Garbarino, S. Candiani. *Dipartimento di Biologia, Università di Genova.*
Studio neurochimico del sistema nervoso centrale di anfiosso durante lo sviluppo
- 16.00-16.15 **F. De Bernardi**, A. Dell'Anna, P. Pagliara¹, G. Scari, G. Zega, S. Piraino¹, R. Pennati. *Dipartimento di Biologia, Università di Milano.* ¹*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Ambientali, Università del Salento*
Modificazioni strutturali del sistema nervoso durante la metamorfosi di *Clava multicornis*
- 16.15-16.30 **R. Pennati**, R. De Sanctis, F. De Bernardi. *Dipartimento di Biologia, Università di Milano*
Localizzazione di specifici miRNA durante lo sviluppo del sistema nervoso di ascidia
- 16.30-16.45 S. Migliarini¹, G. Pacini¹, **B. Pelosi¹**, G. Lunardi², M. Pasqualetti¹. *Università di Pisa.* ²*Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova.*
Ruolo della serotonina nella regolazione dell'arborizzazione dei terminali assonici serotoninergici in specifici distretti del SNC
- 16.45-17.15 Coffee Break
- 17.15-17.30 **G. Pacini¹**, A. Marino¹, B. Pelosi¹, S. Migliarini¹, A. Ferrari², M. Pasqualetti¹. ¹*Università di Pisa, Pisa,* ²*ETH, Zurigo, CH.*
La linea di cellule staminali embrionali *Tph2-eGFP*: un modello per lo studio in vitro dello sviluppo e del funzionamento dei neuroni serotoninergici
- 17.30-17.45 **A. Cimini¹**, E. Di Giacomo¹, L. Cristiano¹, S. Moreno², F. Fanelli², M.P. Cerù¹. ¹*Università dell'Aquila.* ²*Università di Roma Tre.*
Neural stem cells in the lateral ventricles of adult mouse brain. Presence and role of PPAR γ in the neurogenic niche
- 17.45-18.00 **A.M. Tata¹**, C. Ugenti¹, A. Pisano¹, M.E. De Stefano¹, F. De Angelis¹, V. Magnaghi², C. Talora³, J. Wess⁴. ¹*Università di Roma "La Sapienza";* ²*Università di Milano;* ³*Università di Roma "La Sapienza";* ⁴*NIDDK, National Institutes of Health, Bethesda, USA.*
L'acetilcolina di derivazione assonale rappresenta un nuovo segnale in grado di dirigere la mielinizzazione nelle cellule di Schwann
- 18.15-19.30 Assemblea dei soci
- 20.00 Cena
- 21.15 Concerto corale

Martedì 7 giugno

Sessione 3

- 09.00-09.45 **M.D. Candia Carnevali.** *Università di Milano*
La rigenerazione negli echinodermi: modelli storici, nuove prospettive
- 09.45-10.00 **A. Biressi, T. Schorn, F. Bonasoro, M.D. Candia Carnevali.** *Università di Milano*
Sviluppo rigenerativo del braccio negli echinodermi ofiuroidi
- 10.00-10.15 **F. Gasparini, L. Manni, P. Burighel, F. Bortolin, G. Zaniolo.** *Università di Padova.*
Angiogenesis in the extracorporeal circulatory system of the colonial ascidian *B. schlosseri* and regenerative impact of injected human VEGF & EGF
- 10.15-10.30 S. Cannata¹, D. Seliktar², G. Cossu³, **C. Gargioli¹.** ¹*Università di Roma "Tor Vergata", Roma.* ²*Istituto Technion di Biotecnologia d'Israele, Haifa.* ³*Divisione di Medicina Rigenerativa, S. Raffaele, Milano*
PEG-idrogel per la ricostruzione di muscolo scheletrico
- 10.30-10.45 **F.A. Palermo¹, G. Mosconi¹, P. Cocci¹, M. Avella², O. Carnevali², C. Cecchini¹, C. Verdenelli¹, A. M. Polzonetti-Magni¹.** ¹*Università di Camerino.* ²*Università Politecnica delle Marche, Ancona.*
Sistema cannabinergico e risposte neuroendocrine nello sviluppo di larve di *Solea solea* trattate con probiotici
- 10.45-11.15 Coffee Break
- 11.15-11.30 **E. Giavini, F. Di Renzo, E. Menegola.** *Università di Milano.*
Effetti teratogeni additivi di miscele di fungicidi azolici
- 11.30-11.45 **P. Bonfanti², F. Rossi¹, A. Colombo², L. Assi², G. Bernardini¹, R. Gornati¹.** ¹*Università dell'Insubria, Varese;* ²*Università di Milano Bicocca, Milano.*
Valutazione di Sp17 in tessuti di *Xenopus* dopo trattamento con TCDD
- 11.45-12.00 **F. Albicini¹, F. P. Fanizzi², S. De Pascali², G. Bernocchi¹, G. Milanese¹, C. Fenoglio¹.** ¹*Università di Pavia;* ²*Università del Salento, Lecce.*
Nephrotoxic effects of a new platinum compound [Pt(O,O'-acac)(γ-acac)(DMS)] in neonatal rats.
- 12.00-12.15 **B. Baldan.** *Università di Padova*
Rigenerazione *in vitro* via embriogenesi somatica in *Arachis hypogaea* e *Jatropha curcas*
- 12.15-12.30 Zarivi, A. Bonfigli, S. Colafarina, A. M. Ragnelli, P. Aimola, G. Pacioni, **M. Miranda.** *Università dell'Aquila.*
Le laccasi nello sviluppo di *Tuber melanosporum*
- 13.00 Pranzo

Sessione 4.

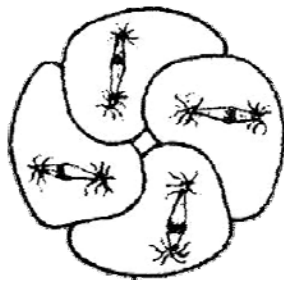
- 15.00-15.15 M. Tussellino, N. De Marco, S. Fusco, P. Netti, R. Talevi, **R. Carotenuto.** *Università degli Studi di Napoli "Federico II", Center for Advanced Biomaterials for Health Care @CRIB, Istituto Italiano di Tecnologia (NA).*
Effetti tossici dell'impiego di nanoparticelle durante l'embriogenesi di *Xenopus laevis*

- 15.15-15.30 B. Anna Tenuzzo, E. Carata, A. Serra, D. Manno, **L. Dini**. *Università del Salento, Lecce*.
Nanotossicità e sviluppo embrionale
- 15.30-15.45 R. Bacchetta¹, P. Mantecca², E. Moschini², N.Santo³, **U. Fascio³**, M. Camatini².
¹Università di Milano. ²Università di Milano-Bicocca. ³C.I.M.A. ³Centro Interdipartimentale Microscopia Avanzata, Università di Milano.
Approcci microscopici integrati nello studio del potenziale embriotossico di nanoparticelle di ZnO in *Xenopus laevis*
- 15.45-16.00 A. Bava, F. Cappellini, F. Rossi, G. Bernardini, **R. Gornati**. *Università dell'Insubria, Varese*.
Nanobiologia: enzimi veicolati da nanoparticelle per la cura dei tumori
- 16.00-16.15 G. Baj, A. Patrizio, **E. Tongiorgi**. *Università di Trieste*.
Analisi comparativa dello sviluppo dei neuroni di topo e di ratto in coltura: ruolo del fattore di trascrizione MeCP2
- 16.15-16.30 **M. Tussellino**, N. De Marco, C. Campanella, R. Carotenuto. *Università di Napoli "Federico II"*.
eif6 e gipc2, interattori di igfr, regolano lo sviluppo del rene in *Xenopus laevis*
- 16.30-17.00 Coffee Break
- 17.00-17.15 F. Rigon¹, S. Shimeld², F. Gasparini¹, F. Caicci¹, P. Burighel¹, G. Zaniolo¹, **L. Manni¹**. ¹Università di Padova. ²University of Oxford (U.K.)
Sviluppo delle cellule capellute in *Ciona intestinalis*.
- 17.15-17.30 M. Ori, E. Reisoli, **G. Marras**, I. Nardi. *Università di Pisa*.
Serotonin 2B receptor signaling is required for craniofacial and ocular morphogenesis in *Xenopus*
- 17.30-17.45 A. Messina¹, L. Lan², T. Incitti¹, E. Murenu¹, M. Bertacchi³, R. Vignali², M. Andreazzoli², G. Barsacchi², F. Cremisi^{2,3}, **S. Casarosa¹**. ¹Università di Trento; ²Università di Pisa; ³Scuola Normale Superiore, Pisa.
Turning stem cells into retina: possible strategies for the cure of retinal degeneration
- 17.45-18.00 **N. De Marco**, M. Tussellino, C. Campanella, R. Carotenuto. *Università di Napoli "Federico II"*.
In *Xenopus laevis*, il segnale igf/pi3k/akt che regola la determinazione dell'occhio è governato dall'interazione igfr/eif6/gipc2
- 18.00-18.15 **M. Giannaccini^{1,2}**, G. Giudetti², D. Biasci², S. Mariotti², M. Della Santina², A. Degl'Innocenti², G. Barsacchi², M. Andreazzoli². ¹Scuola Superiore di Studi Universitari e di Perfezionamento Sant'Anna, Pisa. ²Università di Pisa.
Evidenze di nuovi meccanismi molecolari controllati dal fattore di trascrizione Rx1 nello sviluppo retinico
- 18.15-18.30 D. Conte^{1,2}, **A. Ceccarelli¹**. ¹Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi – NICO, Torino ²IRCC, Torino
BTG, Rb e bZIP: un crocevia nella scelta del fato in *Dictyostelium discoideum*.
- 19.30 Cena sociale

Mercoledì 8 giugno

Sessione 5

- 09.00-09.15 **M. Sugni**¹, S. Mercurio¹, D. Fernandes², C. Porte², P. Tremolada, M.D. Candia Carnevali¹. ¹Università di Milano. ²Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona, Spain.
Biologia riproduttiva ed ormoni steroidei nel comune riccio di mare *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)
- 09.15-09.30 **A. Mancia**^{1,2}, L. Abelli¹, D. A. Newton², W. E. McFee³, D. D. Spyropoulos², J. E. Baatz². ¹Università di Ferrara. ²University of South Carolina, Charleston, USA. ³National Ocean Service, NOAA, Charleston, USA.
Generation of induced pluripotent stem cells from cryopreserved lung tissue of the pygmy sperm whale (*Kogia breviceps*)
- 09.30-09.45 **G. Longo**, V. Mazzei, M. Trovato, F. Sinatra. Università di Catania
Nuove acquisizioni sull'organizzazione dello spermatozoo degli isopodi oniscidei (Crustacea)
- 09-45-10.00 **A. Giannetto**¹, J. M.O. Fernandes², A. Mauceri¹, S. Fasulo¹. ¹Università di Messina. ²University of Nordland, Bodø, Norway.
Sviluppo gonadico e profili di espressione di miRNA in *Gadus morhua*
- 10.00-10.15 **P. Blasi**, M. Andreassi, L. Barberini, A. Schoubben, P. Alberti, M. Ricci, C. Anselmi, C. Cirotto, C. Rossi, L. Andreassi. Università di Perugia e Università di Siena.
La vascolarizzazione di derma umano operata dal corioallantoide di pollo
- 10.15-10.30 **F. Geraci**, G. Turturici, R. Tinnirello, G. Sconzo. Università di Palermo.
Metalloproteasi nella biologia dei mesoangioblasti di topo
- 10.30-11.0 Coffee break
- 11.00-11.15 G. Gioacchini¹, G. Russo¹, L. Dalla Valle², F. Benato², M. Piacentini³, R. Nardacci⁴, G. M. Fimia⁴, F. Ciccocanti⁴, **O. Carnevali**¹. ¹Università Politecnica delle Marche, Ancona. ²Università di Padova. ³Università di Roma Tor Vergata. ⁴Istituto Nazionale Malattie Infettive IRCCS 'L. Spallanzani', Roma.
Autofagia e apoptosi nella gametogenesi di *Danio rerio*: ruolo dei probiotici.
- 11.15-11.30 **R. Chiarelli**, M. Agnello, G. Morici, M.C. Roccheri. Università di Palermo.
L'embrione di riccio di mare come modello di studio dell'autofagia indotta da stress
- 11.30-11.45 **L. Dalla Valle**¹, F. Benato¹, T. Skobo¹, G. Gioacchini², M. Piacentini^{3,4}, G.M.Fimia⁴, O. Carnevali². ¹Università di Padova. ²Università Politecnica delle Marche. ³Università di Roma "Tor Vergata". ⁴Istituto Nazionale per le Malattie Infettive "Lazzaro Spallanzani, Roma.
Occurrence of two zebrafish paralogous *Ambra1* (activating molecule in beclin 1-regulated autophagy) transcripts and knockdown effects on development in *Danio rerio* embryos
- 11.45-12.00 **L. Ballarin**, F. Schiavon, N. Franchi. Università di Padova.
Recognition and clearance of apoptotic cells during the colonial blastogenetic cycle in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*
- 12.00-12.30 Riflessioni finali e conclusione
- 12.45 Pranzo



RIASSUNTI

Nephrotoxic effects of a new platinum compound [Pt(O,O'-acac)(γ-acac)(DMS)] in neonatal rats

FEDERICA ALBICINI¹, FRANCESCO PAOLO FANIZZI², SANDRA DE PASCALI², GRAZIELLA BERNOCCHI¹, GLORIA MILANESI¹, CARLA FENOGLIO¹

¹Dipartimento di Biologia Animale, Università di Pavia;

²Dipartimento di Scienze Biologiche e Ambientali, Università del Salento, Lecce

Exposure or treatment with therapeutic agents may induce a variety of abnormalities in developing structures. Cisplatin is the most common therapy drug in the treatment of children with some brain tumours and osteosarcoma, but chronic neurotoxicity and nephrotoxicity have encouraged the development of less toxic platinum analogues.

A new platinum compound [Pt(O,O'-acac)(γ-acac)(DMS)] (Pt acacDMS) which shows interesting biological activities (1, 2, 3, 4), has been recently synthesized. The aim of the present study was to assess differences in nephrotoxicity induced by cisplatin and Pt acacDMS in neonatal rat kidneys. Treated rats –with a single subcutaneous injection of cisplatin or (Pt acacDMS), 0.5mg/ Kg b.w. at 10 days- were sacrificed at 1 (PD11) and 7 (PD17) post-injection days. The kidneys of the animals were quickly removed and processed for histochemical studies. The structural aspect of the renal parenchyma was evaluated on E&E, PAS and Toluidine Blue stained sections. The distribution pattern of vimentin and fibronectin in peritubular mesenchymal cells and matrix – both supporting development and branching of the tubule epithelia- was studied by immunohistochemistry. Generally, both structural organization and interstitium immunostaining of controls and Pt acacDMS treated animals were quite similar. In contrast, some changes were observed in cisplatin treated samples. In particular, the immunohistochemical analysis showed at both PD11 and PD17: - considerable fibronectin immunodeposits among some tubules; - distorted distribution of the vimentin positive mesenchymal cells altering the tissue architecture. In both cases, the peritubular immunostaining was stronger in the juxtamedullary labyrinth than in the cortex. Additionally, PAS stained sections revealed some altered proximal tubules and enlarged glomeruli at PD17. The overall findings point to a significant different susceptibility of the developing kidney to Pt acacDMS compared to cisplatin, mainly affecting the mesenchimal-epithelial relationships.

1) De Pascali *et al.*, 2005, 2009 ; 2, 3, 4) Muscella *et al.*, 2007, 2008, 2010

Grant: Fondazione Banca Monte Lombardia

The basal body protein *Ofd1* is essential for dorso-ventral patterning and axoneme elongation in the embryonic cortex

BICE AVALLONE¹, ANNA D'ANGELO², AMALIA DE ANGELIS², ROBERTA TAMMARO², BRUNELLA FRANCO²

¹Dipartimento delle Scienze Biologiche, sez. di Genetica e Biologia Molecolare Università di Napoli "Federico II"

²TIGEM Napoli

Oral-facial-digital type I syndrome (OFDI; OMIM 311200) is an X-linked dominant developmental ciliopathy with lethality in males. Female patients present malformations of the oral cavity, face, digits and central nervous system. The human disease gene *OFDI* encodes a centrosome/basal body protein. In the present study we analyzed the neurological phenotype in mouse development of *Ofd1* inactivation. Given that male mutant die very early during gestation we focused our analysis on heterozygous female at E12.5 and due to X-inactivation we observed a high degree of variability in phenotypes. The analysis of neurological defects in *Ofd1* severe mutant embryos revealed that the basal body protein has a crucial role in the brain development, controlling dorso-ventral patterning of the forebrain. Ultrastructural studies demonstrated that *Ofd1* inactivation affected ciliogenesis in severe mutant embryos leading to the absence of ciliary axonemes despite the presence of mature basal bodies correctly oriented and docked. Planar cell polarity pathway and cytoskeletal organization were defective in our mouse model most likely due to the lack of ciliary axonemes. The present study shed light on the role of the basal body protein *Ofd1* in development and in ciliogenesis.

Rigenerazione *in vitro* via embriogenesi somatica in *Arachis hypogaea* e *Jatropha curcas*

BARBARA BALDAN

Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Padova

Con il termine embriogenesi somatica si intende la formazione di embrioni a partire da cellule somatiche. In alcune specie ciò può avvenire spontaneamente ma spesso si ricorre all'induzione sperimentale ormai applicata a molte Gimnosperme, Dicotiledoni e Monocotiledoni.

Nei sistemi fino ad ora studiati, gli embrioni somatici hanno, dal punto di vista morfologico, un modello di sviluppo molto simile a quello degli embrioni zigotici. Raggiungono lo stadio di maturità passando attraverso gli stadi morfologici di embrione globulare, a cuore e a torpedine. Anche l'espressione genica è molto simile a quella degli embrioni zigotici. La messa a punto delle tecniche di rigenerazione *in vitro* via embriogenesi ha aperto la strada alla produzione di biomassa dalla quale estrarre metaboliti di interesse economico senza le restrizioni imposte dalla coltivazione in campo, dalle variazioni climatiche e stagionali.

Lo scopo di questo studio è l'ottenimento di embrioni somatici, a partire da espianti di *Arachis hypogaea* e *Jatropha curcas*, due piante che accumulano nei semi un'elevata quantità di trigliceridi potenzialmente utilizzabili per la produzione di biodiesel. La continua e massiccia richiesta di queste piante ha dato un notevole impulso alla ricerca, in laboratorio, di diverse modalità di propagazione clonale con l'obiettivo di un trasferimento su larga scala.

Embrioni somatici di *A. hypogaea* e di *J. curcas* sono stati ottenuti modulando concentrazioni e combinazioni di micro- e macro-elementi e di fitoregolatori nel mezzo di coltura. Per arachide la produzione di embrioni avviene con modalità indiretta da calli ottenuti a partire da espianti dell'asse di embrioni zigotici maturi. Gli embrioni, che si formano in concentrazioni piuttosto elevate di auxina, sono in grado di continuare la proliferazione di embrioni somatici (embriogenesi ripetitiva) se posti in un mezzo con basse concentrazioni di auxina. In *Jatropha* l'ottenimento di embrioni avviene sempre con modalità indiretta: da espianti di cotiledone e/o asse embrionale si forma un callo da cui, modificando le concentrazioni dei fitoregolatori, si ottengono embrioni somatici.

Questi risultati preliminari costituiscono un'ottima premessa per lo sviluppo di colture embriogeniche capaci di produrre biomassa in modo altamente ripetitivo in condizioni controllate.

Recognition and clearance of apoptotic cells during the colonial blastogenetic cycle in the compound ascidian *Botryllus schlosseri*

LORIANO BALLARIN, FILIPPO SCHIAVON, NICOLA FRANCHI

Dipartimento di Biologia, Università degli Studi Padova

Colonies of the compound ascidian *Botryllus schlosseri* feature cyclical generation changes, allowing continuous renewing of the colony, during which old zooids synchronously cease filtering and are resorbed in 24-26 h, while a new generation of buds reach the functional maturity, open their siphons and start filtering. It is possible to define a colonial blastogenetic cycle corresponding to the time interval of functional activity of a zooid generation (one week at 20°C), starting with the opening of the siphons of a new zooid generation and ending with the resorption or take-over (TO) of old zooids. During the TO, diffuse apoptosis occurs in zooid tissues followed by the massive recruitment of phagocytes which leave the circulation and infiltrate zooid tissues.

The interaction between phagocytes and effete cells, leading to their internalisation, is fundamental for the progression of the TO as colonies do not feed during the generation change and the products of the digestion of senescent cells represent the main source of nutrients for the colony during this period.

The recognition and engulfment of apoptotic cells is greatly promoted by molecules with opsonic activity, able to act as a bridge between the surface of effete cells and that of phagocytes.

B. schlosseri rhamnose-binding lectin (BsRBL) is a new member of the rhamnose-binding protein family, which exerts an opsonic role towards non-self cells. During the generation change, we observed an increase in the levels of mRNA, as revealed by sqRT-PCR, and of the protein, in immunoblot analysis, during the TO with respect to phases of the blastogenetic cycle far from the TO (mid-cycle; MC). This goes in parallel with a change in surface carbohydrates in apoptotic cells and an increased number of cells recognised by anti-BsRBL antibody at TO with respect to MC. All these data are consistent with a pivotal role of BsRBL in the interaction between phagocytes and apoptotic cells and corpses, never described before, and open new perspectives on the possible role of RBLs in vertebrates.

Sviluppo rigenerativo del braccio negli echinodermi ofiuroidi

ANNA BIRESSI, TILO SCHORN, FRANCESCO BONASORO, M. DANIELA CANDIA CARNEVALI

Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Milano

Gli ofiuroidi presentano sorprendenti capacità rigenerative, ancora largamente da esplorare. Il nostro gruppo di ricerca ha affrontato in questi anni lo studio della rigenerazione negli ofiuroidi, con particolare riferimento allo sviluppo rigenerativo del braccio in condizioni post-autotomiche. Al fine di dare una visione comparativa di questo complesso fenomeno, la nostra indagine ha dapprima individuato e caratterizzato le fasi principali dello sviluppo rigenerativo nel modello di *Ophioderma longicaudum* (specie molto diffusa nei mari italiani), per estendersi poi ad altre comuni specie di ofiuroidi, *Amphiura filiformis*, *Ophiocomina nigra* ed *Ophiotrix fragilis*.

Utilizzando tecniche di microscopia ottica ed elettronica, è stato possibile operare un confronto nello sviluppo rigenerativo del braccio tra specie dotate di caratteristiche filogenetiche ed ecologiche diverse, determinando, con l'ausilio di opportune analisi statistiche, il tasso di rigenerazione per ciascuna di esse. In termini di processi di crescita, le specie considerate presentano tassi di rigenerazione molto differenti sebbene, seppure con piccole differenze, i processi risultano simili tra loro in termini di istogenesi e citotipi coinvolti. In tutte le specie studiate, infatti, il processo rigenerativo segue un pattern di sviluppo comune, che può essere suddiviso in quattro fasi: riparativa, rigenerativa precoce, rigenerativa intermedia e rigenerativa avanzata. In termini di reclutamento e di plasticità cellulare, oltre al contributo di elementi staminali presuntivi, è stato riscontrato anche un forte contributo da parte di cellule differenziate, prevalentemente miociti, attraverso fenomeni di sdifferenziamento, trans-differenziamento e ri-differenziamento.

Tra i parametri ambientali che possono influenzare la rigenerazione, abbiamo considerato in via preliminare l'effetto della temperatura. A questo scopo sono stati condotti esperimenti di rigenerazione a due diverse temperature, tipiche rispettivamente del periodo invernale ed estivo. I risultati ottenuti mostrano come il fattore temperatura eserciti una notevole importanza sulla rigenerazione degli ofiuroidi: un aumento relativamente modesto della temperatura appare infatti correlato ad un rilevante accelerazione dei processi rigenerativi.

La vascolarizzazione di derma umano operata dal corioallantoide di pollo

PAOLO BLASI¹, MARCO ANDREASSI², LANFRANCO BARBERINI³, AURELIE SCHOUBBEN¹, PAOLO ALBERTI⁴, MAURIZIO RICCI¹, CECILIA ANSELMI², CARLO CIROTTO³, CARLO ROSSI¹, LUCIO ANDREASSI²

¹Dipartimento di Chimica e Tecnologia del Farmaco, Università degli Studi di Perugia

²Centro Interdipartimentale di Scienza e Tecnologia Cosmetiche, Università degli Studi di Siena

³Dipartimento di Biologia Cellulare e Ambientale

⁴Dipartimento di Medicina Interna, Università degli Studi di Perugia

L'Unione Europea ha vietato di condurre i test di ingredienti di cosmetici e di prodotti finiti sugli animali. Queste norme hanno stimolato la ricerca di modelli alternativi. Tra i più promettenti ci sono le colture di cheratinociti umani su supporti che permettono lo sviluppo delle cellule all'interfaccia tra il liquido di coltura e l'aria. Si sono ottenute, così, colture con strati cellulari differenziati, che presentano i caratteri tipici della funzione barriera. Il modello tridimensionale originale, realizzato coltivando i cheratinociti su derma de-epidermizzato (DED), è stato successivamente modificato utilizzando altri supporti capaci di fungere da derma-equivalenti, come il gel di collagene, o il collagene arricchito di fibroblasti o alcune biomembrane.

La fase successiva nel perfezionamento di modelli di cute ingegnerizzata consiste nella realizzazione di sistemi vascolarizzati. In questa comunicazione dimostriamo come possa essere sviluppato un modello di DED vascolarizzato utilizzando, come substrato, la membrana corioallantoidea (CAM) degli embrioni di pollo.

Porzioni di DED, rese acellulari mediante metodiche standard, sono state deposte sulla membrana corioallantoidea (CAM) di embrioni di pollo, opportunamente predisposta, al 6° giorno di incubazione. Al 12° giorno, la semplice osservazione microscopica dei campioni in toto è stata sufficiente ad evidenziare l'invasione del campione da parte di una fitta rete di vasi. L'esame istologico ha confermato la correttezza di tale osservazione, dimostrando la presenza di vasi neoformati delimitati da normali pareti endoteliali e contenenti eritrociti di pollo.

Questi risultati, molto promettenti, dimostrano la possibilità di utilizzare la CAM dell'embrione di pollo come supporto per l'ingegnerizzazione *in loco* di tessuti come la pelle.

Valutazione di Sp17 in tessuti di *Xenopus* dopo trattamento con TCDD

PATRIZIA BONFANTI¹, FEDERICA ROSSI², ANITA COLOMBO¹, LAURA ASSI¹, GIOVANNI BERNARDINI², ROSALBA GORNATI²

¹Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio, Università di Milano Bicocca

²Dipartimento di Biotecnologie e Scienze Molecolari, Università dell'Insubria, Varese

Sp17 (Sperm protein 17) è una proteina molto conservata tra i mammiferi; la sua espressione è prevalente nelle gonadi maschili dove svolge un ruolo importante nella maturazione delle cellule germinali, nella loro motilità e nel legame alla zona pellucida. Svariati studi hanno dimostrato che l'RNA messaggero di Sp17 è presente, in quantità limitata, anche in diversi tessuti somatici dove media l'adesione cellula-cellula, e in tumori di varia natura istologica, tra cui il carcinoma ovarico e i mielomi multipli dove invece la sua espressione è decisamente elevata. Questa espressione anomala in tessuti patologici, ha fatto sì che Sp17 fosse inserito nella famiglia dei Cancer Testis Antigen.

Abbiamo anche voluto verificare se Sp17 potesse essere considerato un biomarcatore molecolare per problemi di infertilità associata ad inquinanti ambientali. Allo scopo è stata valutata la sua espressione, mediante PCR quantitativa, sia in embrioni che in tessuti di *Xenopus* adulto dopo trattamento acuto con TCDD, contaminante ambientale appartenente alla famiglia delle diossine e noto perturbatore endocrino.

Confermato che il messaggero di Sp17 è espresso a tutti gli stadi di sviluppo campionati e negli adulti in diversi tessuti oltre al testicolo, il lavoro è continuato valutando, mediante western blot e immunolocalizzazione, l'espressione della proteina.

In accordo con quanto riportato per i mammiferi, l'espressione di Sp17 non è ristretta alle cellule germinali ma è osservabile anche nei tessuti somatici indagati. Ad esempio nel rene la localizzazione di Sp17 si osserva a livello dei glomeruli, nel citoplasma delle cellule dei tubuli prossimali e in minor misura in quello delle cellule dei tubuli distali. Nel testicolo sono risultati immunopositivi il citoplasma di spermatociti e spermatidi e il flagello di spermatidi tardivi e spermatozoi.

Il trattamento con TCDD ha determinato un'apprezzabile variazione dell'espressione di Sp17 solo nel rene. Questi dati preliminari suggeriscono che, nelle condizioni sperimentali adottate, lo xenobiotico utilizzato non interferisce con l'espressione della proteina in testicolo. Sono quindi necessari ulteriori studi per chiarire se: 1- TCDD abbia effetto sulla fertilità di animali adulti; 2- Sp17 sia o meno un target di TCDD.

La rigenerazione negli echinodermi: modelli storici, nuove prospettive

M. DANIELA CANDIA CARNEVALI

Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Milano

Le potenzialità rigenerative si esprimono al massimo grado negli echinodermi. Questi animali, già largamente collaudati dagli embriologi sperimentali in studi storici, attualmente si ripropongono all'attenzione come modelli sperimentali ideali per un approccio integrato alla rigenerazione, molto appropriati e validi, sia in quanto deuterostomi, filogeneticamente affini ai vertebrati, sia in quanto organismi complessi in cui il fenomeno rigenerativo si esprime in tutto il suo range di possibilità, dal livello minimo di riparazione tissutale a quello massimo di clonazione asessuale di un intero individuo. In questa review viene presentata una breve rassegna di risultati relativi a differenti esempi di modelli sperimentali e a differenti tipi di approccio, *in vivo* e *in vitro*, che forniscono un'idea della complessità di meccanismi e processi regolativi a livello tissutale, cellulare e molecolare che controllano lo sviluppo ricostitutivo del pattern e che consentono al sistema di rigenerare con successo e mantenere la propria specificità e integrità morfologica e funzionale. Poiché negli echinodermi i fenomeni rigenerativi implicano in ogni caso il coinvolgimento di cellule progenitrici, presenti nei fluidi circolanti o nei tessuti, alcuni aspetti cruciali, di notevole interesse per le rilevanti ricadute applicative nell'ambito della medicina rigenerativa, sono quelli relativi alle proprietà e all'origine e derivazione delle cellule responsabili, in termini di staminalità (cellule staminali adulte vere e proprie o cellule somatiche differenziate opportunamente riprogrammate?), attività (proliferative e/o migratorie), plasticità e potenziale differenziativo (fenotipi cellulari derivati). Questi ed altri problemi di attualità vengono discussi alla luce di nuove prospettive di sviluppo per l'utilizzo degli echinodermi come modelli sperimentali per la ricerca applicata.

Autofagia e apoptosi nella gametogenesi di *Danio rerio*: ruolo dei probiotici

GIORGIA GIOACCHINI¹, GIULIA RUSSO¹, LUISA DALLA VALLE², FRANCESCA BENATO², MAURO PIACENTINI³, ROBERTA NARDACCI⁴, GIAN MARIA FIMIA⁴, FABIOLA CICCOSANTI⁴, OLIANA CARNEVALI¹

¹Dipartimento di Scienze del Mare, Università Politecnica delle Marche, Ancona

²Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Padova

³Dipartimento di Biologia, Università di Roma 'Tor Vergata'

⁴Istituto Nazionale Malattie Infettive IRCCS 'L. Spallanzani', Roma

L'atresia follicolare è un processo degenerativo con cui i follicoli ovarici dei vertebrati perdono la loro integrità e vengono eliminati prima dell'ovulazione. Nei mammiferi, più del 99% dei follicoli vanno incontro ad atresia e solo pochi di essi raggiungono la maturazione durante la vita sessualmente attiva. Molti studi hanno evidenziato come l'atresia follicolare sia regolata da un equilibrio esistente tra due diversi sistemi di regolazione dell'omeostasi cellulare ovvero apoptosi e autofagia. In questo studio è stata evidenziata per la prima volta la partecipazione dell'autofagia nello sviluppo follicolare di *Danio rerio*. Inoltre sono stati valutati gli effetti della somministrazione del probiotico *L. rhamnosus* IMC 501® (10⁶/ml CFU) sulla modulazione dell'autofagia e dell'apoptosi nei follicoli preovulatori (classi III e IV). Analisi di microscopia elettronica hanno evidenziato la presenza di autofagosomi nei follicoli pre-ovulatori e un incremento di queste strutture cellulari nei follicoli isolati da femmine trattate con il probiotico. Questi risultati sono stati confermati a livello molecolare da un aumento dei livelli di espressione di geni coinvolti nel meccanismo molecolare dell'autofagia come *Beclin-1*, *LC3*, *Ambra-1*, *Rubicon* e *UVRAG*. Inoltre, l'analisi tramite Western blot, ha evidenziato un aumento dei livelli proteici di LC3 II soprattutto in follicoli di classe III isolati da femmine trattate. L'aumento dell'autofagia nei follicoli di classe III e IV è stato concomitante alla riduzione dell'apoptosi negli stessi follicoli. Analisi di espressione genica hanno infatti evidenziato una diminuzione dell'espressione di fattori coinvolti nel processo apoptotico come *p53* e *casp3*. Inoltre la marcatura delle cellule apoptotiche tramite il saggio TUNEL ha confermato la riduzione di questo processo. I risultati ottenuti in questo studio hanno permesso di evidenziare la partecipazione dell'autofagia durante lo sviluppo del follicolo ovarico in zebrafish e per la prima volta è stato dimostrato un ruolo positivo del probiotico nella fisiologia ovarica grazie alla capacità di questo alimento funzionale di modulare apoptosi ed autofagia, migliorando così la sopravvivenza follicolare in *D. rerio*. Considerando che lo zebrafish è un ottimo modello per studi di riproduzione e sviluppo embrionale e più recentemente per ricerche biomediche, le conoscenze evidenziate in questo lavoro lasciano ipotizzare una buona potenzialità di questo integratore alimentare in tecniche di riproduzione assistita nei mammiferi.

Effetti tossici dell'impiego di nanoparticelle durante l'embriogenesi di *Xenopus laevis*

MARGHERITA TUSSELLINO, NADIA DE MARCO, SABATO FUSCO, PAOLO NETTI, RICCARDO TALEVI, ROSA CAROTENUTO

Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università degli Studi di Napoli "Federico II" Center for Advanced Biomaterials for Health Care @CRIB, Istituto Italiano di Tecnologia (NA)

L'impiego di nanoparticelle (NP) utili per diverse applicazioni quali cosmetica, abbigliamento, alimentazione e drug delivery riscuote un vivo interesse. In particolare, in medicina le NP offrono la possibilità unica di superare la barriera cellulare per dirigere molecole verso *targets* specifici, ad esempio, droghe utilizzate in chemioterapia. Per promuovere il giusto sviluppo di tali nanotecnologie è essenziale chiarire le potenziali conseguenze per la salute umana associate all'esposizione delle NP. La principale preoccupazione riguarda le piccole dimensioni delle NP e la possibilità che possano essere internalizzate in modo non adeguato, in rapporto con le loro caratteristiche fisico-chimiche e con la natura delle cellule *target* (Shawna et al., 2011; Gorth et al., 2011; Pompa et al., 2011). L'impiego del sistema modello *Xenopus laevis*, permette di saggiare l'eventuale tossicità delle NP *in vivo*, valutandone gli effetti sullo sviluppo embrionale. A questo scopo abbiamo utilizzato due diversi protocolli di somministrazione, la microiniezione in fasi precoci dello sviluppo e il contatto in fasi successive. NP di nuovo tipo, polistirene di 48 e 100 nm sono state microiniettate in uno dei blastomeri di embrioni allo stadio di 2 cellule; di questi embrioni sono state analizzate la morfologia e la percentuale di mortalità ma anche l'espressione di alcuni marcatori del mesoderma quali *bra* e *myoD*. Invece NP di 20 nm già utilizzate in medicina (Au, Ag, Fe₃O₄ e SiO₂) sono state messe a contatto, a diversa concentrazione, con embrioni a partire dallo stadio 35-36. Gli embrioni sia microiniettati che a contatto con i vari tipi di NP presentano un'alta percentuale di malformazione della testa, dell'intestino e della coda. Inoltre per gli embrioni trattati con NP di Au, Ag, Fe₃O₄ e SiO₂ sono state osservate particolari malformazioni a carico della cartilagine del cranio e dell'apparato respiratorio. Tutti gli embrioni trattati presentano una lunghezza inferiore rispetto ai w.t. controllo, in particolare quelli trattati con SiO₂. Solo gli embrioni trattati con NP di Ag o microiniettati con polistirene presentano un alto tasso di mortalità, mentre la maggior parte degli embrioni trattati con NP presenta un tasso di mortalità simile ai controlli w.t. Questi dati preliminari suggeriscono un effetto tossico ma non letale per gli embrioni trattati alle condizioni da noi saggiate.

Turning stem cells into retina: possible strategies for the cure of retinal degeneration.

ANDREA MESSINA¹, LEI LAN², TANIA INCITTI¹, ELISA MURENU¹, MICHELE BERTACCHI³, ROBERT VIGNALI², MASSIMILIANO ANDREAZZOLI², GIUSEPPINA BARSACCHI², FEDERICO CREMISI^{2,3}, SIMONA CASAROSA¹.

¹CIBIO, Università di Trento

²Dipartimento di Biologia, Università di Pisa

³Scuola Normale Superiore, Pisa

The main aim of regenerative medicine is to replace degenerating cells, and its success depends on the capability of the donor cells to correctly replace all the missing cell types. We have recently shown that in *Xenopus* embryos, proper doses of a single secreted molecule, Noggin, can drive animal cap embryonic stem (ACES) cells toward retinal cell differentiation without additional cues. This encourages further studies on the role of Noggin in the retinal differentiation of mammalian stem cells. Our aim is thus to gain further knowledge into the developmental mechanisms and cues necessary for the differentiation of stem cells into retinal neurons. We propose to initially address this issue in *Xenopus*, and to subsequently transfer the acquired knowledge to the differentiation of mammalian stem cells. The elucidation of the pathway through which Noggin elicits retinal fates in ACES cells will be a first step toward the setup of ameliorated protocols for the differentiation of stem cells toward retinal neurons. Successively, the appropriately differentiated ES cells will be transplanted in the damaged retinae of known mouse models of retinal degenerations. The potential outcome of this project is the possibility to cure retinal degeneration diseases in animal models and to gain further knowledge for human cell replacement therapies.

BTG, Rb e bZIP: un crocevia nella scelta del fato in *Dictyostelium discoideum*

DANIELE CONTE^{1,2}, ADRIANO CECCARELLI¹

¹Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi - NICO, Orbassano - Torino

²IRCC, Candiolo – Torino

BTG ed Rb sono noti come oncosoppressori per la loro funzione inibitrice sulla proliferazione. In particolare, la funzione antiproliferativa di BTG è mediata dalla funzione di controllo negativo da parte di Rb. Noi dimostriamo che *Dictyostelium discoideum* possiede un ortologo di BTG capace di regolare la scelta del fato e che cellule di *Dictyostelium* overesprimenti BTG acquisiscono la capacità di commutare fra due possibili fati in risposta a stimoli esterni. Per uno di essi, per il quale necessita la luce, la funzione di BTG è mediata dalla proteina Rb e le cellule adottano preferenzialmente il fato ALC. Questo effetto è assente in cellule null per l'allele Rb1A (l'ortologo di RB in *D. discoideum*). In assenza di luce invece gli aggregati sono costretti a migrare, e le cellule overesprimenti BTG segregano nella tip dell'aggregato ed assumono un fato pre-stelo. Mentre questa seconda via è indipendente da rblA, cellule dimBnull dimostrano che dimB, un fattore trascrizionale appartenente alla famiglia bZIP, è l'effettore di BTG per questa scelta differenziativa.

BTG determina quindi l'acquisizione di due possibili fati, ALC e pre-stelo, la cui scelta dipende da stimoli esterni (luce, migrazione). A valle di questa biforcazione Rb e dimB agiscono da effettori in modo indipendente.

BTG di DD è l'unico esempio finora noto di un membro della famiglia APRO in un organismo non metazoo, suggerendo che le interazioni funzionali BTG-Rb e BTG-bZIP precedano la separazione fra Dictyostelidi e metazoi, e che le stesse interazioni potrebbero essere rilevanti anche nel controllo differenziativo dei metazoi.

L'embrione di riccio di mare come modello di studio dell'autofagia indotta da stress

ROBERTO CHIARELLI, MARIA AGNELLO, GIOVANNI MORICI, MARIA CARMELA ROCCHERI

Dipartimento STEMPIO (Biologia Cellulare), Università degli Studi di Palermo

Gli embrioni di riccio di mare, *Paracentrotus lividus*, sono in grado di attivare differenti strategie di difesa come risposta a stress chimico/fisici. Recentemente abbiamo dimostrato che il cadmio, metallo pesante altamente embriotossico, induce la sintesi di specifiche hsp e/o l'innescamento di processi apoptotici, via via che si accumula nelle cellule embrionali.

Nel presente lavoro, mostriamo che gli embrioni di *P. lividus* sono in grado di attivare l'autofagia come un aggiuntivo meccanismo atto a salvaguardare il programma di sviluppo, in seguito a esposizione a dosi citotossiche di CdCl₂.

L'autofagia è un meccanismo molecolare che può stimolare la sopravvivenza, attraverso la degradazione e il riciclo di macromolecole e organelli o, alternativamente, la morte cellulare. Inoltre, è stato riportato che l'autofagia svolge un ruolo cruciale durante l'embriogenesi di alcuni organismi. Pertanto, le cellule multipotenti degli embrioni di echinodermi possono rappresentare un idoneo modello sperimentale per lo studio di questo processo.

Diverse metodologie, qui di seguito riportate, sono state utilizzate per verificare l'induzione di processi autofagici in embrioni esposti a cadmio. Mediante saggi vitali con Neutral Red, sono stati evidenziati elevati livelli di organelli vescicolari acidi (AVOs), probabili autolisosomi. Analoghi risultati sono stati ottenuti mediante saggi vitali con Acridina Orange e microscopia confocale a scansione laser (CLSM); quest'ultima ha consentito di rilevare specifiche disposizioni spaziali nella localizzazione degli AVOs. L'induzione dell'autofagia è stata confermata mediante l'impiego di bafilomicina A1, uno specifico inibitore di questo processo. Questi dati sono stati rafforzati analizzando i livelli della proteina LC3, sicuro *marker* dell'autofagia, attraverso Western blotting e immunofluorescenza *in situ*.

I risultati di queste indagini hanno evidenziato che gli embrioni di *P. lividus* sono in grado di attivare significativi processi autofagici in condizioni di stress da cadmio, in una fase temporale che precede la risposta apoptotica massiva. Inoltre, livelli autofagici basali sono stati evidenziati durante lo sviluppo fisiologico.

In conclusione si può ipotizzare che l'autofagia svolga un ruolo fondamentale nella sopravvivenza cellulare, allo scopo di salvaguardare il programma di sviluppo o, in alternativa, possa servire a fornire l'ATP necessario a sostenere il processo apoptotico e/o operi la *clearance* dei corpi apoptotici.

Neural stem cells in the lateral ventricles of adult mouse brain. Presence and role of PPAR γ in the neurogenic niche

ANNAMARIA CIMINI¹, ERICA DI GIACOMO¹, LOREDANA CRISTIANO¹, SANDRA MORENO²,
FRANCESCA FANELLI², MARIA PAOLA CERÙ¹

¹Dipartimento di Biologia di Base ed Applicata, Università dell'Aquila

²Dipartimento di Biologia, Università Roma Tre

Neurogenesis takes place throughout life in two main areas of the adult mammalian brain: the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricles (LVs) and the subgranular zone (SGZ) of the hippocampus. Recently, a role for the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in regulating neurogenesis has been suggested. However their precise *in situ* localization in the adult SVZ is poorly understood, with the exception of PPAR γ , which has been reported to regulate neural stem and progenitor cells (NSC/NPC) proliferation and differentiation in mouse embryo and adult rat brain. In this work we focused on the *in situ* localization of PPAR γ in the adult mouse SVZ-LVs. To this purpose, we analyzed by immunofluorescence its pattern of expression along the A-P axis, together with markers of different stages of neurogenesis: GFAP and Nestin, which identify the putative NSCs/NPCs; SDNSF, a secreted factor so far described in the hippocampal SGZ as NSC/NPC marker; SOX2, a transcription factor expressed in NSCs/NPCs and involved in neuron maturation and survival; Dcx, a microtubule-associated protein expressed in migrating neuroblasts and young neurons; β III-tubulin, marker of early postmitotic and differentiated neurons. Expression of PPAR γ was found in ependymal, SVZ and rostral migratory cells, with a nuclear localization which suggests that the receptor is transcriptionally active. Furthermore, the analysis of serial rostro-caudal coronal sections showed that PPAR γ positivity decreases in the LV caudal portion, in agreement with the reported rostro-caudal gradual loss of neurogenic potential. The overlapping distribution of this factor with SOX2 along the A-P and dorso-ventral (D-V) axes, both in the ependyma, the SVZ and the rostral migratory region strongly suggests that PPAR γ is a component of the neurogenic pathway.

Concerning SDNSF, this is the first report on the presence of this factor in the LV neurogenic region, where a cytoplasmic staining, particularly evident in some ependymal and subependymal cells of the dorso-lateral layer of the LVs, was observed. Interestingly, the positivity is completely absent from the rostral migratory region and seems to decrease caudally, in agreement with the suggested role of SDNSF in the maintenance of stemness and multipotency.

DCX was observed both in scattered ependymal and subependymal cells, with an apparent nuclear/cytoplasmic localization, particularly abundant in the dorso-lateral portion and migratory region of rostral LVs, where migrating neuroblasts are described. Finally, the β III-tubulin immunostaining was exclusively found in the SVZ of the whole lateral walls of LVs and in the rostral migratory region, confirming its specificity as a marker for immature postmitotic neurons.

In conclusion, the results so far obtained strongly indicate that PPAR γ is involved in adult neurogenesis, being expressed both in the ependymal and subependymal layers of LVs, where the immature NSCs/NPCs are localized and in committed neuroblasts, both mitotic and postmitotic, migrating along the rostral migratory stream.

The p53 tumor suppressor integrates TGFbeta and FGF signaling for mesoderm induction in vertebrate embryos

MICHELANGELO CORDENONSI, STEFANO PICCOLO

Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Padova

During development and tissue homeostasis, cells must integrate different signals. We investigated how cell behavior is controlled by the combined activity of Transforming Growth Factor–beta (TGFbeta) and Fibroblast Growth Factor (FGF) signaling, whose intersection was known to be essential for the induction of mesoderm germ layer in Vertebrates. We started from our previous observation that depletion of the p53 tumor suppressor in *Xenopus* embryos led to inhibition of mesoderm induction and differentiation, and that key cellular response to TGFbeta rely on p53 both in *Xenopus* and mammals. As p53 is known to be a cellular sensor of many intracellular and extracellular inputs, we then investigated the possibility that this protein can convey FGF signals on TGFbeta gene responses. We find that FGF/Ras/MAPK (mitogen-activated protein kinase) activity induces p53 N-terminal phosphorylation, enabling the interaction of p53 with the TGFbeta–activated Smads. This mechanism allows the activation of multiple TGF-b target genes, and contributes, together with other p53-regulatory mechanisms, to confine mesoderm specification in *Xenopus* embryos.

Occurrence of two zebrafish paralogous *Ambra1* (activating molecule in beclin 1-regulated autophagy) transcripts and knockdown effects on development in *Danio rerio* embryos

DALLA VALLE LUISA¹, BENATO FRANCESCA¹, SKOBO TATJANA¹, GIOACCHINI GIORGIA², PIACENTINI MAURO^{3,4}, FIMIA GIAN MARIA⁴, CARNEVALI OLIANA²

¹Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Padova

²Dipartimento Scienze del Mare, Università Politecnica delle Marche

³Dipartimento di Biologia, Università di Roma "Tor Vergata"

⁴Istituto Nazionale per le Malattie Infettive "Lazzaro Spallanzani", Roma

The protein activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy (*Ambra1*) has been identified as a crucial factor in regulating the autophagic process in vertebrates. It promotes Beclin-1 interaction with its target lipid kinase VPS34, thus mediating autophagosome nucleation. The protein has been demonstrated to be crucial for nervous system development in mammals suggesting a role for autophagy during this process.

In zebrafish, expression analysis showed that two paralogous genes, here named as *ambra1-a* and *-b*, are expressed. The genes are located respectively on chromosome 25 and 7. Deduced proteins from the main *ambra1-a* and *-b* transcripts consist in 1360 and 788 amino acids respectively with *ambra1-b* presenting a reduced C-terminal region. In both proteins the *Ambra1* characteristic WD-40 repeats-region is present. Moreover, alternative RNA splicing was demonstrated by 3'-RACE analysis in embryos at 2 and 48 hours post-fertilization (hpf).

Both transcripts are present as maternal RNA in the ovulated eggs and display a decline till 8 hours, being replaced by zygotic *ambra1-a* and *-b* mRNA from 12 hpf onwards. Whole-mount *in situ* hybridization (WMISH) confirms these data with a strong hybridization signal until 6 hpf for both transcripts although higher for the form *a*. After 24 hpf the transcripts are mainly localized in the head. To check the functional significance of maternal *ambra1-a* and *-b* mRNAs, a reverse genetic approach was adopted by using morpholino knockdown to block translation (^{ATG}MO) of both maternal and zygotic transcripts. Preliminary analyses show that treatment with ^{ATG}MOs caused severe malformations: affected larvae could survive for only 4 and 3 days in *ambra1-a* and *-b* morphants respectively. Co-injection of an anti-p53 MO failed to rescue the ^{ATG}MO-phenotypes, eliminating the possibility of off-target effects. Although some defects, such as body growth delay, curved shape and hemorrhagic pericardial cavity, are present in both morphants, the occurrence of specific phenotypes, such as major abnormalities in brain development in *ambra1-a* morphants, suggests the possible acquisition of specific functions for the two genes.

Modificazioni strutturali del sistema nervoso durante la metamorfosi di *Clava multicornis*

FIORENZA DE BERNARDI¹, ALESSANDRO DELL'ANNA¹, PATRIZIA PAGLIARA², GIORGIO SCARI¹, GIULIANA ZEGA¹, STEFANO PIRAINO², ROBERTA PENNATI¹

¹Dipartimento di Biologia, Università di Milano

²Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Ambientali, Università del Salento

La larva planula reptante dell'idroide *Clava multicornis* ha un sistema nervoso complesso, costituito da diverse popolazioni di elementi neurali concentrati all'estremità anteriore che, a questo stadio, rappresenta il polo sensoriale. I neuroni possono essere identificati in base alla presenza di neuropeptidi caratteristici: i neuroni GLWamide positivi sono disposti a formare una cupola all'estremità anteriore; i neuroni RFamidici formano una cintura immediatamente posteriore: entrambi i tipi neuronali sono connessi a formare un plesso alla base dell'ectoderma (Piraino S. et al., J. Comp. Neurol. 2011 DOI 10.1002/cne.22614). All'inizio della metamorfosi, la larva aderisce al substrato con l'estremità anteriore, che si svilupperà nella regione basale del polipo, mentre la regione posteriore formerà la bocca. E' noto che nel polipo dell'idrozoo *Hydractinia echinata* i neuroni positivi a GLWamide e RFamide sono concentrati attorno alla bocca e nei tentacoli, in posizione opposta rispetto a quella occupata nella larva (Seipp S. et al., Invert. Neurosci. 2010, 10:77-91)

La distribuzione dei neuroni positivi a GLWamide e RFamide è stata osservata, mediante immunofluorescenza e microscopia confocale, a diversi stadi della metamorfosi di *C. multicornis*, allo scopo di chiarire il destino delle diverse popolazioni neuronali. Nei primi stadi di insediamento i neuroni immunoreattivi sono ancora presenti all'estremità anteriore, ma scompaiono gradualmente durante gli stadi successivi. In stadi avanzati compaiono neuroni positivi intorno alla bocca del giovane polipo. Nuclei apoptotici sono stati identificati mediante TUNEL nell'estremità anteriore della larva insediata, nella stessa zona dove erano presenti i neuroni immunopositivi. Questi risultati suggeriscono che almeno una parte dei neuroni larvali degenerino per apoptosi durante la metamorfosi e che almeno una parte del sistema nervoso dell'adulto si formi per differenziamento di nuove cellule. Lo studio del riarrangiamento del sistema nervoso durante la metamorfosi dei metazoi basali dovrebbe servire da modello per comprendere la plasticità neuronale nei metazoi più complessi .

In *Xenopus laevis*, il segnale igf/pi3k/akt che regola la determinazione dell'occhio è governato dall'interazione igfr/eif6/gipc2

NADIA DE MARCO, MARGHERITA TUSSELLINO, CHIARA CAMPANELLA, ROSA CAROTENUTO

Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università di Napoli Federico II

L'*eukaryotic initiation factor 6* (eIF6) regola la traduzione impedendo l'associazione delle subunità ribosomali in seguito a stimolazione da parte di fattori di crescita (Gandin et al., 2008). Tale regolazione però riguarda selettivamente la traduzione di messaggeri specifici come quello della β -catenina (Ji et al., 2008). eIF6 è anche implicata nel silenziamento post-trascrizionale mediato da miRNA (Chendrimada et al., 2007). In *Xenopus laevis* ha un ruolo anti-apoptotico a monte di bcl2 ed agisce su di un fattore sconosciuto che a sua volta agisce sulla trascrizione di bcl-2, costituendo quindi un altro esempio di azione selettiva (De Marco et al., 2010). L'iniezione di eif6 in uno dei blastomeri dell'embrione a due cellule induce tre fenotipi tra cui il ritardo nello sviluppo dell'occhio del lato iniettato, oggetto del nostro studio. Il fenotipo oculare è transitorio perché, pur manifestandosi a st35-36 ed ancor prima, nella neurula, come riduzione dei marcatori dell'occhio, a stadio 42 l'occhio recupera pienamente. I dati ottenuti (De Marco et al., in press) fanno ritenere che livelli di eif6 al di sotto di una soglia fisiologica siano sufficienti per garantire una corretta morfogenesi oculare, mentre livelli al di sopra di tale soglia provochino il ritardo dell'occhio. Questo fenotipo inoltre è indipendente sia dalla funzione anti-apoptotica di eif6 che dalle sue capacità anti associative. Qui mostriamo che eif6 co-immunoprecipita con igfr e che a valle di tale interazione vengono diminuiti i livelli di akt fosforilata, ma non di pmapk, mostrando che viene toccata la via del segnale pi3k/akt. Infatti, p110*, una subunità costitutivamente attiva di pi3k, recupera il fenotipo oculare degli iperespressi di eif6. eif6 immuno-precipita con gipc2-Kermit2, un interattore di igfr, necessario e specifico per lo sviluppo dell'occhio (Wu et al., 2006). Gli embrioni che iper-esprimono eif6 presentano una diminuzione dose-dipendente dei livelli di gipc2. La co-iniezione di eif6 e gipc2 permette il recupero del fenotipo oculare. Infine gipc2 sembra regolare i livelli di eif6. Questi dati fanno ipotizzare l'esistenza di un *loop* regolativo tra le due proteine. Quindi eif6 fa parte del *signalling* di igf-like che in *Xenopus* regola la formazione dell'occhio e la sua interazione con gipc2 sembra responsabile del mantenimento dei valori soglia delle due proteine alla base della corretta morfogenesi dell'occhio.

Nanotossicità e sviluppo embrionale

BERNARDETTA ANNA TENUZZO¹, ELISABETTA CARATA¹, ANTONIO SERRA², DANIELA MANNO²,
LUCIANA DINI¹

¹ Di.S.Te.B.A.

² Dipartimento di Scienze dei Materiali, Università del Salento, Lecce

Le nanotecnologie non costituiscono solo un semplice ramo della conoscenza, ma una concreta presenza quotidiana in continua crescita. Le applicazioni delle nanoparticelle sono le più svariate e continuamente il campo di utilizzo si amplia. Ma proprio l'aumento del volume di produzione e di uso delle nanoparticelle, spinge a conoscerne i possibili rischi per l'ambiente, per gli organismi e per la salute dell'uomo. È necessario valutare questi possibili rischi in relazione alla tipologia di nanoparticelle, alla loro concentrazione nell'ambiente e alla loro tossicità per gli organismi, in particolare quelli acquatici. In questo studio abbiamo valutato gli eventuali effetti citotossici su un modello animale largamente impiegato per test di tossicità per inquinanti ambientali di varia natura chimica, il *P. lividus*. La tossicità di nanoparticelle di argento (diametro medio < 20nm) e di carbonio (diametro medio 10 nm con una dispersione di 3 nm) è stata testata durante i primi stadi dello sviluppo di *P. lividus*, dalla fecondazione fino allo stadio di larva pluteo e su larve pluteo normali. Gli eventuali effetti legati alla concentrazione delle nanoparticelle sono stati considerati, e per questo sono state utilizzate tre differenti concentrazioni. Le nanoparticelle sono state caratterizzate e ne è stata valutata la stabilità nel tempo mediante microscopia Raman, spettroscopia UV-visibile e microscopia elettronica a trasmissione. Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in condizioni ottimali di luce/buio, di ossigeno e di temperatura in acqua di mare filtrata e sterile. I risultati hanno indicato una sensibilità maggiore da parte delle larve pluteo alla presenza delle nanoparticelle rispetto agli stadi precoci. In generale le nanoparticelle di argento sono risultate più tossiche di quelle di carbonio in maniera concentrazione dipendente. Le modificazioni più frequentemente osservate durante lo sviluppo precoce sono ascrivibili a difetti della segmentazione (asimmetria delle divisioni). In parallelo, è stata iniziata un'indagine preliminare per verificare se e come i geni che regolano lo sviluppo risultano alterati dalla presenza delle nanoparticelle.

Approcci microscopici integrati nello studio del potenziale embriotossico di nanoparticelle di ZnO in *Xenopus laevis*

RENATO BACCHETTA¹, PARIDE MANTECCA², ELISA MOSCHINI², NADIA SANTO³, UMBERTO FASCIO³, MARINA CAMATINI²

¹Dipartimento di Biologia – Università degli Studi di Milano

²Centro di ricerca POLARIS – Università Milano-Bicocca

³C.I.M.A. - Centro Interdipartimentale Microscopia Avanzata – Università degli Studi di Milano

Le nanoparticelle (NP) metalliche rappresentano la componente principale della produzione di nuovi nanomateriali a causa della loro grande versatilità di utilizzo. Le NP di ZnO sono ampiamente utilizzate in numerosi prodotti cosmetici, nelle creme solari, negli adesivi, nei rivestimenti dei più svariati materiali per le loro capacità antimicrobiche e nelle coibentazioni. Considerato l'utilizzo, è inevitabile che questi nanomateriali entrino nell'ambiente acquatico per il quale, esistono ancora pochi dati di tossicità.

In questa ottica, nell'ambito di un progetto più ampio, è stato valutato il potenziale effetto letale e teratogeno di NP di ossido di Zinco (<100nm) su embrioni dell'anfibio *Xenopus laevis*. I primi risultati hanno evidenziato assenza di mortalità degli embrioni, ma un'alta percentuale di malformazioni, soprattutto a livello intestinale. Più in particolare sono state evidenziate gravi alterazioni alla mucosa, con fenomeni di assottigliamento e lisi dell'intera parete. Utilizzando il metodo della riflessione al microscopio confocale, sono state evidenziati aggregati di NP a livello dell'epitelio intestinale, mentre l'utilizzo di tecniche di spettroscopia a perdita di energia applicate alla microscopia elettronica a trasmissione, EFTEM, ha consentito di localizzare queste NP soprattutto nelle vie paracellulari. L'analisi è stata ulteriormente approfondita mediante la dissezione e la successiva analisi di intestini immunocolorati *in toto* che ha permesso di evidenziare nelle cellule dell'epitelio intestinale danni a livello del citoscheletro. Il danno ossidativo prodotto dalle NP di ZnO e le alterazioni indotte a livello delle componenti citoscheletriche possono essere responsabili della morte cellulare.

PEG-idrogel per la ricostruzione di muscolo scheletrico

STEFANO CANNATA¹, DROR SELIKTAR², GIULIO COSSU³, CESARE GARGIOLI¹

¹ Dipartimento di Biologia, Università di Roma “Tor Vergata”, Roma

² Facoltà di Ingegneria Biomedica, Technion-Instituto di Biotecnologia d’Israele, Haifa

³ Divisione di Medicina Rigenerativa, S. Raffaele, Milano

L’ingegneria tissutale aspira a ricostruire tessuti e organi in modo di ripristinarne le funzionalità in seguito a danno o mal funzionamento degli stessi. Tale disciplina si basa sull’interazione di due componenti: uno biologico (cellule) ed uno chimico (biomateriali). Nei nostri esperimenti la componente biologica è rappresentata da mioblasti primari (cellule satelliti del muscolo, MSC) e da progenitori cellulari associati ai vasi sanguigni (Mesoangioblasti, Mabs), mentre per la componente chimica sono stati studiati vari biomateriali per individuare l’elemento migliore che mostrasse influenza sull’attività miogenica della componente biologica aumentandone l’efficienza.

Il PEG-fibrinogeno (PF), idrogel basato sulla polimerizzazione del polietilenglicole, è in grado di promuovere *in vitro* il differenziamento di cellule miogeniche in muscolo scheletrico. Il PF, prodotto nel laboratorio del Prof. Seliktar presso il Technion Institute di Haifa, polimerizza sotto l’effetto di una sorgente UV a bassa penetranza. La co-coltura in 3D di MSC e Mabs immersi in PF ha mostrato una considerevole sopravvivenza cellulare e soprattutto un’accelerazione del processo differenziativo in muscolo scheletrico. Inoltre gli esperimenti *in vivo*, eseguiti su un modello murino di danno muscolare (cardiotossina) utilizzando il PF come veicolo per l’iniezione di Mabs, hanno mostrato un aumento della sopravvivenza delle cellule trapiantate, una migliore ritenzione cellulare nei muscoli iniettati e soprattutto il PF mostra un’azione nel migliorare il grado di fusione delle cellule trapiantate con i muscoli dell’ospite nel formare fibre mature.

La sfida maggiore per l’ingegneria tissutale del muscolo scheletrico è di ripristinare l’allineamento parallelo, naturale, delle fibre muscolari in modo da poter ottenere un muscolo artificiale completamente funzionante. Il pensiero generale ritiene indispensabile l’azione meccanica della contrazione sull’organizzazione e l’orientamento delle fibre muscolari. Quindi rifacendoci a questa idea abbiamo provato ad impiantare PF e Mabs sotto la cute in stretta vicinanza del Tibiale Anteriore (TA) di topi Rag2/Gamma Chain^{-/-} per studiare se il movimento naturale del TA potesse influenzare l’organizzazione e quindi l’orientamento e la funzionalità delle fibre muscolari del tessuto artificiale.

I dati preliminari raccolti a 4 e 12 settimane dall’impianto hanno evidenziato l’effettiva influenza dei movimenti del TA sull’organizzazione e l’allineamento delle miofibre del tessuto in differenziamento, indicando la possibilità con l’ingegneria tissutale, in particolare tramite l’impiego di PF e Mabs, di sviluppare un muscolo artificiale a tutti gli effetti.

Angiogenesis in the extracorporeal circulatory system of the colonial ascidian *Botryllus schlosseri* and regenerative impact of injected human VEGF and EGF.

FABIO GASPARINI, LUCIA MANNI, PAOLO BURIGHEL, FRANCESCA BORTOLIN, GIOVANNA ZANIOLO

Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Padova

Angiogenesis, the process of new blood vessel formation from pre-existing ones, results essential for a wide variety of human physiological and pathological processes. Understanding the biology of angiogenesis should provide novel insights for clinical manipulations of pathological conditions and, to advance in its knowledge, benefits can be found in using simple whole organisms.

Botryllus schlosseri is a small colonial ascidian, so part of the group now thought to be the closest one to vertebrates. The individuals (zooids) of each colony are embedded in a transparent extracellular matrix, the tunic, that holds an intricate extracorporeal network of anastomized vessels forming the colonial circulatory system (CCS). The CCS vessels, defined by simple epithelium, originate from epidermal extensions of zooids. The CCS appears an optimal model for investigations of several aspects of circulation, particularly can be very useful for understanding the regulation of angiogenesis and its evolution in metazoans.

We have demonstrated that CCS vessels form through the typical mechanism of sprouting characterizing vertebrate angiogenesis. Moreover, analyzing experimentally ablated vascular system in colonies, we evidenced that also vessel regeneration occurs mainly by sprouting. Interestingly, CCS regeneration appears to be under the control of the major mediators of new blood vessel formation in vertebrates (i.e., Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF).

All these observations show that correspondences exist between the CCS sprouting modality of *B. schlosseri* and angiogenic sprouting in vertebrates, during normal development and regeneration, and support the idea that this morphogenetic mechanism was co-opted during the evolution of various developmental processes in different taxa.

We are now investigating if molecules stimulating and inhibiting angiogenesis in human impact on regeneration of this circulatory system. For this, we are also defining an experimental protocol and data analysis procedure for testing injected solutes on the *B. schlosseri* CCS. Preliminary data indicate that human endogenous molecules stimulating angiogenesis (i.e., VEGF and EGF) injected into the *B. schlosseri* CCS stimulate and significantly impact on regeneration of this circulatory system.

Metalloproteasi nella biologia dei mesoangioblasti di topo

FABIANA GERACI, GIUSEPPINA TURTURICI, ROSARIA TINNIRELLO, GABRIELLA SCONZO

Dipartimento STEM BIO, sezione Biologia Cellulare, Università di Palermo

Problematica: I mesoangioblasti sono cellule staminali associati ai vasi con la capacità di differenziarsi in varie tipologie cellulari di derivazione mesodermica. Durante l'istogenesi, quando i vasi penetrano nei tessuti in via di sviluppo i mesoangioblasti penetrano in questi stessi tessuti adottandone il destino. Capacità migratorie dei mesoangioblasti si evidenziano anche durante la vita post-natale. In seguito a danneggiamento muscolare nel processo di riparazione vengono reclutate cellule staminali miogeniche, inclusi i mesoangioblasti che si localizzano nel muscolo danneggiato in maniera selettiva e preferenziale. Un ruolo importante in questi processi di migrazione è svolto dalle MMP 2/9. Abbiamo dimostrato che i mesoangioblasti rilasciano, attraverso vescicole di membrana, le forme attive delle due MMP. Ora stiamo indagando sul meccanismo di regolazione dell'espressione della MMP2

Metodologie e Risultati: Nello studio sono stati utilizzati il clone A6 di mesoangioblasti di topo e due cloni, con un silenziamento parziale della proteina Hsp70. Saggi di real time PCR condotti con RNA ottenuti dai tre cloni di mesoangioblasti, hanno mostrato un diverso livello di espressione dell'mRNA della MMP2 che è correlato ai livelli di Hsp70. In particolare ad una diminuzione nei livelli di Hsp70 corrisponde una diminuzione nei livelli del messaggero della MMP2. In maniera analoga, tramite saggi di zimografia, è stata anche evidenziata una correlazione nei livelli di MMP2 attiva rilasciata dalle cellule nell'ambiente extracellulare tramite vescicole di membrana. Saggi di immunoprecipitazione hanno dimostrato l'esistenza di un legame di p65, subunità del fattore NF-kB responsabile dell'attivazione trascrizionale di MMP2, con Hsp70. Non si riscontra invece interazione tra Hsp70 ed il regolatore negativo di NF-kB IκB. Saggi di chemiotassi condotti piastrandolo i mesoangioblasti A6 su uno strato di gelatina B, in presenza o assenza del fattore HMGB1, hanno evidenziato in entrambi i casi la capacità di queste cellule di degradare la gelatina e migrare.

Conclusioni: I risultati ottenuti indicano che la produzione di MMP2, importante per la funzione migratoria di queste cellule, è regolata, in maniera NF-kB dipendente, con un meccanismo che implica l'Hsp70.

Evidenze di nuovi meccanismi molecolari controllati dal fattore di trascrizione Rx1 nello sviluppo retinico

MARTINA GIANNACCINI^{1,2}, GUIDO GIUDETTI², DANIELE BIASCI², SARA MARIOTTI², MARCO DELLA SANTINA², ANDREA DEGL'INNOCENTI², GIUSEPPINA BARSACCHI², MASSIMILIANO ANDREAZZOLI².

¹ Scuola Superiore di Studi Universitari e di Perfezionamento Sant'Anna, Pisa

² Dipartimento di Biologia, Università di Pisa

Il fattore di trascrizione Rx1 svolge un ruolo cruciale nel controllo della specificazione del campo morfogenetico dell'occhio e nel mantenimento della multipotenza delle cellule staminali retiniche. Nonostante l'importanza di questo fattore di trascrizione nello sviluppo dell'occhio, il programma genetico da esso regolato rimane largamente da decifrare. Per identificare la rete genica controllata da Rx1, il trascrittoma di embrioni di *Xenopus laevis* di controllo è stato comparato alternativamente a quello di embrioni sovraespressanti Rx1 o a quello di embrioni in cui era stata indotta perdita di funzione di Rx1. Quest'analisi, effettuata mediante "microarray" Affymetrix, ha identificato 51 trascritti che mostrano un comportamento "coerente", cioè aumentano la loro espressione negli esperimenti di guadagno di funzione e la diminuiscono negli esperimenti di perdita di funzione, o viceversa. Nella maggior parte dei casi, i dati sono stati confermati mediante esperimenti di "real time PCR" e di ibridazioni *in situ*. L'annotazione funzionale dei trascritti selezionati indica molteplici ruoli di Rx1 nel controllo delle diverse fasi della specificazione retinica. Tra questi sono compresi: la regolazione dei movimenti cellulari durante la formazione del campo morfogenetico dell'occhio, la determinazione delle dimensioni del campo dell'occhio, il mantenimento della multipotenza delle cellule staminali retiniche e la repressione dei geni endomesodermici. In particolare, quest'ultima funzione rappresenta un nuovo ruolo critico per un fattore di trascrizione retinico, che sembra bloccare in modo "cell-autonomous", segnali endomesodermici noti per inibire il destino retinico e per far uscire dallo stato multipotente le cellule staminali. Inoltre, l'attivazione della trascrizione di una istone metiltransferasi, suggerisce che Rx1 potrebbe avere un ruolo nel controllo epigenetico della trascrizione dei geni da esso regolati.

Sviluppo gonadico e profili di espressione di miRNA in *Gadus morhua*

ALESSIA GIANNETTO¹, JORGE M.O. FERNANDES², ANGELA MAUCERI¹, SALVATORE FASULO¹

¹Dipartimento di Biologia Animale ed Ecologia Marina – Università di Messina

²Faculty of Biosciences and Aquaculture - University of Nordland, Bodø, Norway

Il merluzzo atlantico, *Gadus morhua*, appartiene alla famiglia dei Gadidae ed è considerato una delle più importanti risorse economiche per tutta Europa. In cattività emette facilmente le uova e, quando è sottoposto a condizioni di coltura intensiva, matura prima dei due anni di vita, molto prima rispetto alla controparte selvatica che raggiunge la maturità sessuale, in genere, dai due ai quattro anni di età. Tale “precoce” maturazione ha un impatto significativo sulla redditività dato che questa riduce il potenziale di crescita e aumenta nettamente il tempo di produzione, causando gravi perdite economiche per il settore dell’acquacoltura e riducendo, inoltre, la qualità delle carni. Al fine di minimizzare l’impatto negativo della precoce maturazione sessuale sulla performance di crescita, ci è parso utile incrementare le conoscenze sui meccanismi molecolari coinvolti nello sviluppo gonadico come il ruolo dei miRNA. Questi ultimi rappresentano una famiglia, recentemente studiata, di piccole molecole regolatrici di 22 nucleotidi la cui funzione è quella di modulare la sintesi di proteine a livello post-trascrizionale. Nonostante la loro importanza in numerosi processi biologici, fra i quali la maturazione gonadica, già documentata nei mammiferi, nei pesci il ruolo dei miRNA in tale processo, non è stato ancora studiato.

In questo lavoro, usando il sequenziamento in parallelo di nuova generazione SOLiD, abbiamo comparato i profili di miRNA espressi in ovociti allo stadio di sviluppo perinucleare in individui di femmine immature rispetto a quelli espressi in ovociti maturi in vitellogenesi. Gli stadi di sviluppo delle gonadi sono documentati da routinarie colorazioni morfologiche.

Rispetto al numero totale di letture di miRNA ottenute, l’85% risulta essere nelle gonadi mature rispetto al rimanente 15% delle gonadi immature. Su un totale di 170 miRNA, ne abbiamo rintracciato 25 differenzialmente espressi tra i due gruppi di gonadi esaminati. In particolare vi è un’importante differenza di espressione tra 2 tipi di miRNA e le relative forme star nei due gruppi sperimentali.

Questi dati mostrano che i profili di miRNA dipendono marcatamente dallo stato di maturazione delle gonadi femminili. Ulteriori analisi, attualmente in corso, sui miRNA coinvolti nello sviluppo gonadico sarà di grande aiuto per la comprensione del network genetico che è alla base di questo processo e potrebbe fornire preziose informazioni per il controllo della precoce maturazione sessuale, uno dei principali fattori che ostacola il settore dell’acquacoltura.

Effetti teratogeni additivi di miscele di fungicidi azolici

ERMINIO GIAVINI, FRANCESCA DI RENZO, ELENA MENEGOLA

Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Milano

In questi ultimi anni il nostro gruppo di ricerca ha evidenziato come numerosi fungicidi azolici posseggano uno specifico effetto teratogeno a carico degli archi branchiali e dei loro derivati (strutture cranio-facciali). Il meccanismo d'azione proposto è l'inibizione nell'embrione dell'enzima CYP26 che controlla il catabolismo di Acido Retinoico (AR). Il conseguente incremento della concentrazione di AR provocherebbe un'alterazione della struttura del rombencefalo (rombomeri) ed una anomala migrazione delle cellule delle creste neurali. Poiché le molecole che agiscono attraverso uno stesso meccanismo d'azione tossicologico vengono considerate come appartenenti ad un "*Common Mechanism Group*" (CMG) e poiché le sostanze chimiche CMG sono in grado di indurre effetti additivi quando somministrate in miscele, scopo di questo lavoro è stato quello di valutare gli effetti teratogeni di miscele di fungicidi azolici su embrioni di ratto coltivati *in vitro*. In un primo esperimento abbiamo esposto gli embrioni alla miscela di due agrochimici: triadimefon (FON) e imazalil (IMA) ovvero a FON+IMA + il fungicida di uso clinico fluconazolo (FLUCO). Le concentrazioni scelte sono state quelle che in precedenti esperimenti non avevano indotto effetti sugli embrioni: 12.5µM FON, 5µM IMA e 62,5µM FLUCO. L'esposizione alle singole molecole non ha provocato effetti sugli embrioni, mentre le miscele sono state in grado di indurre malformazioni a livello degli archi branchiali (fusione del I e del II arco). In un successivo esperimento abbiamo esposto *in vitro* gli embrioni a miscele di sei agrochimici azolici (MIX6). Le concentrazioni scelte sono state calcolate sulla base dell'ipotetico massimo livello plasmatico ottenibile nell'uomo in seguito ad esposizione alla Dose Giornaliera Ammissibile (DGA) di ciascun agrochimico. Due ulteriori gruppi sperimentali prevedevano l'esposizione a MIX6 più la minima concentrazione plasmatica efficace di FLUCO (1.3µM, MIX6 +BFluco) ovvero dieci volte questo livello (13µM, MIX6+AFluco). Tutti e tre i gruppi miscele sono stati in grado di indurre malformazioni agli archi branchiali con un evidente effetto miscela-dipendente: MIX6<MIX6+Bfluco<MIX6+AFluco. Questi risultati confermano che i fungicidi azolici appartengono ad un CMG, supportando la nostra ipotesi di un comune meccanismo d'azione e focalizzano l'attenzione sui possibili effetti additivi causati da esposizioni multiple ad azoli sullo sviluppo embrionale.

EU-Grant N. 245163 "ACROPOLIS"

Nanobiologia: enzimi veicolati da nanoparticelle per la cura dei tumori

ADRIANA BAVA, FRANCESCA CAPPELLINI, FEDERICA ROSSI, GIOVANNI BERNARDINI, ROSALBA GORNATI

Dipartimento di Biotecnologie e Scienze della Vita, Università dell'Insubria

Nonostante i notevoli progressi ottenuti nella cura dei tumori, i trattamenti finora impiegati causano ancora pesanti effetti collaterali. In particolare molte difficoltà sono associate al trattamento di tumori solidi dove l'accesso del farmaco è spesso limitato da una bassa ed ineguale vascolarizzazione. Un recente approccio per il trattamento di questi tumori fa affidamento su enzimi che possano essere indirizzati e quindi attivati mediante la somministrazione di un substrato non tossico. Tra gli enzimi capaci di generare specie reattive dell'ossigeno (ROS), la cui sovrapproduzione provoca morte cellulare, di grande interesse è la D-Amminoacido ossidasi (DAAO) la cui attività può essere modulata attraverso la somministrazione di D-amminoacidi. Per veicolare efficientemente l'enzima nell'area da trattare, proponiamo una strategia di targeting basata sull'impiego di nanoparticelle (NP) magnetiche. A tale scopo, le NP di ossido di ferro sono state ricoperte e funzionalizzate con amminopropiltriectossisilano (APTES) e coniugate all'enzima, via coupling con glutaraldeide (1% v/v). Il legame covalente dell'APTES con le NP è stato confermato mediante spettroscopia FT-IR, mentre l'attività dell'enzima coniugato è stata determinata mediante saggio colorimetrico. Le NP così coniugate (NP@APTES-DAAO) sono state testate su linee cellulari di carcinoma ovarico umano (SKOV-3) e di glioblastoma (U87) per verificarne l'efficacia. Dopo 24h di esposizione e in assenza di substrato (D-alanina), le NP@APTES-DAAO provocano sulle SKOV-3 una citotossicità comparabile a quella indotta dalle NP non rivestite, ma superiore a quella della DAAO libera. In presenza di D-alanina (1mM), l'incremento di mortalità indotto dalle NP@APTES-DAAO è risultato più marcato rispetto a quello provocato dall'enzima non legato. Anche sulle U87, le NP@APTES-DAAO risultano essere più efficaci dell'enzima libero. Questi risultati preliminari dimostrano la validità del sistema NP@APTES-DAAO da noi ideato aumentando le potenzialità di impiego della DAAO nella cura dei tumori.

Nuove acquisizioni sull'organizzazione dello spermatozoo degli isopodi oniscidei (Crustacea)

GUGLIELMO LONGO¹, VERONICA MAZZEI¹, MICHELANNA TROVATO¹, FULVIA SINATRA²

¹Dipartimento di Biologia "Marcello La Greca", Università di Catania

²Dipartimento "G. F. Ingrassia", Università di Catania

Gli isopodi oniscidei presentano, così come altri sottordini di Peracaridi, un peculiare modello di spermatozoo aflagellato la cui organizzazione è stata già da tempo oggetto di numerose indagini ultrastrutturali (BLANCHARD *et al.*, 1961; REGER, 1964, 1966; FAIN-MAUREL, 1966; REGER e FAIN-MAUREL, 1973; COTELLI *et al.*, 1976; LONGO e MUSMECI, 2002) che, tuttavia, non hanno mai chiarito il preciso significato della complessa organizzazione dell'acrosoma, il ruolo della lunga, elastica coda dalla struttura paracristallina e, soprattutto, i suoi meccanismi di interazione con il gamete femminile. La nostra ricerca, condotta al microscopio a fluorescenza sugli spermatozoi di alcune specie del genere *Armadillidium* incubati in FITC-falloidina ha, per la prima volta, consentito di evidenziare la presenza di una consistente quantità di F-actina nella regione apicale della testa spermatica. L'incubazione in una soluzione di falloidina coniugata con oro colloidale di sezioni ultrasottili di spermatozoi inclusi in Lowicryl KM4 ha dimostrato che l' F-actina è localizzata a livello di parte dell'acrosoma, nella regione citoplasmatica compresa tra acrosoma e nucleo ed, inoltre, all'interno del sottile anello citoplasmatico che circonda la porzione più apicale del nucleo stesso.

Sebbene lo spermatozoo degli oniscidei sia da sempre ritenuto totalmente immotile, la scoperta della presenza di un citoscheletro di F-actina ci induce ad avanzare l'ipotesi di una possibile acquisizione della motilità al momento della sua interazione con il gamete femminile, ipotesi, ovviamente, tutta da verificare.

Un'ulteriore indagine ultrastrutturale concernente gli aspetti relativi alla conservazione a lungo termine degli spermatozoi all'interno dell'apparato genitale femminile ha messo in evidenza l'esistenza di diffusi fenomeni di spermiofagia osservabili sia nel ricettacolo seminale sia nell'ovario, attività spermiofagica che sembra riguardare esclusivamente la sola coda spermatica il cui ruolo, sinora sconosciuto, sarebbe quello di rappresentare un consistente investimento trofico paterno nei riguardi del processo riproduttivo.

Generation of induced pluripotent stem cells from cryopreserved lung tissue of the pygmy sperm whale (*Kogia breviceps*)

ANNALaura MANCIA^{1,2}, LUIGI ABELLI¹, DANFORTH A. NEWTON², WAYNE E. MCFEE³, DEMETRI D. SPYROPOULOS², JOHN E. BAATZ²

¹ Department of Biology and Evolution, Section of Comparative Anatomy, Università di Ferrara

² Marine Biomedicine and Environmental Science Center, Medical University of South Carolina, Hollings Marine Laboratory, Charleston, SC, 29412, USA

³ Center for Coastal Environmental Health and Biomolecular Research, National Ocean Service, NOAA, 219 Ft. Johnson Road, Charleston, SC, 29412, USA

Concerns about marine mammal health and environmental threats have risen in the last decade due to increases in mortality, unusual mortality events and previously unseen pathologies. Because opportunities for *in vitro* studies on pelagic organisms, such as marine mammals, are limited, it is necessary to establish systems whereby cultures of cells and reconstitution of functional tissues from these organisms can be used as surrogates for the animal in the wild. Isolated primary cells are, in fact, common models for the study of protein functions, cellular mechanisms, organ-specific functions and responses to environmental parameters. Because there is a limited availability of marine mammalian samples and primary cell types we first developed a method to cryopreserve tissues. Starting from fragments of long-term cryopreserved tissues (several months after the stranding event), we were able to establish cultures of viable primary cultures of different lung cell types. To further circumvent the limited availability of samples, we then used one of these primary cultures (a primary culture of lung fibroblasts) to generate induced pluripotent stem (iPS) cells. iPS cells are a potential source for most primary cell types in large numbers, and therefore a useful approach to circumvent the limited availability of pygmy sperm whale samples. In a field with a lack of basic knowledge due to the limited availability of tools and samples and to the protected status of the animals, the development and establishment of primary cultures from 1) cryopreserved tissues and 2) reprogramming of pluripotent stem cells, has the potential to create the reagents necessary to revolutionize our understanding of the basic biology of marine mammals and understand the impact of stressors on marine and land animal health.

Sviluppo delle cellule capellute in *Ciona intestinalis*

FRANCESCA RIGON¹, SEBASTIAN SHIMELD², FABIO GASPARINI¹, FEDERICO CAICCI¹, PAOLO BURIGHEL¹, GIOVANNA ZANIOLO¹, LUCIA MANNI¹

¹ Dipartimento di Biologia, Università degli studi di Padova

² Department of Zoology, University of Oxford, UK

Le ascidie posseggono un organo meccanocettore a livello del sifone orale, l'organo coronale, composto di cellule sensoriali ciliate di tipo secondario, chiamate cellule capellute, che in alcune specie possiedono anche stereovilli degradanti in altezza. Per queste caratteristiche le cellule capellute delle ascidie sono state paragonate alle cellule capellute dei vertebrati e alcuni dati morfologici e molecolari supportano l'esistenza di omologia tra l'organo coronale e il sistema acustico-laterale dei vertebrati. Al fine di approfondire la relazione evolutiva tra queste strutture, abbiamo intrapreso lo studio dello sviluppo dell'organo coronale nell'ascidia *Ciona intestinalis* a livello morfologico e molecolare. Individui di *C. intestinalis* sono stati fecondati e lo sviluppo delle larve è stato seguito durante la metamorfosi e nelle fasi giovanili, selezionando specifici stadi di sviluppo. I nostri risultati mostrano che l'organo coronale è presente nei tentacoli fin dalla loro comparsa (che avviene dopo 5 giorni circa dall'adesione delle larve al substrato). Le cellule capellute inizialmente possiedono corte ciglia, accompagnate da microvilli ramificati, ma dopo circa 10 giorni dall'adesione raggiungono la morfologia che le caratterizza nell'adulto, ovvero presentano ciglia e corti microvilli non ramificati. Fin dalla loro comparsa, le cellule capellute sono contattate alla loro base neuriti provenienti dal ganglio cerebrale e tipiche sinapsi possono essere riconosciute. Aree di proliferazione cellulare sembrano essere presenti principalmente alla base e all'apice del tentacolo in crescita, dove alcuni geni (Musashi, Notch e Delta), caratterizzanti il differenziamento del sistema acustico-laterale, sembrano dare uno specifico segnale. Altri geni, come ABCg2 and Dazap, non sembrano essere direttamente coinvolti nel differenziamento delle cellule capellute delle ascidie. I risultati sono a sostegno di una possibile origine comune delle cellule capellute nei cordati.

Serotonin 2B receptor signaling is required for craniofacial and ocular morphogenesis in *Xenopus*

MICHELA ORI, ELISA REISOLI, GIULIA MARRAS, IRMA NARDI

Unità di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Dipartimento di Biologia, Università di Pisa

Serotonin (5-HT) is a neuromodulator that plays many different roles in adult and embryonic life. Among the 5-HT receptors, 5-HT_{2B} is one of the key mediators of 5-HT functions during development. We used *Xenopus laevis* as a model system to investigate the role of 5-HT_{2B} in embryogenesis. By means of gene gain- and loss-of-function approaches and tissue transplantation assays, we demonstrated that 5-HT_{2B} modulates, in a cell-autonomous manner, postmigratory skeletogenic cranial neural crest cell (NCC) behavior. 5-HT_{2B} overexpression induced the formation of an ectopic visceral skeletal element and altered the dorsoventral patterning of the branchial arches. Loss-of-function experiments revealed that 5-HT_{2B} signaling is necessary for jaw joint formation and for shaping the mandibular arch skeletal elements. In particular, 5-HT_{2B} signaling is required to define and sustain the *Xbap* gene expression necessary for jaw joint formation. We also showed that the phospholipase C beta 3 (PLC) is the effector of the transduction pathway acting downstream of 5-HT_{2B}. The in vivo experiments also revealed that serotonin signaling, via 5-HT_{2B} receptors, results in the formation of defective eyes, characterized by irregular form, position and coloboma. Interestingly, we showed that the 5-HT_{2B} gene is expressed in periocular mesenchyme that represents a key signaling center required for a correct eye morphogenesis. These results contribute to the understanding of the interactive networks of patterning signals that are involved in the development of the vertebrate craniofacial and ocular structures.

Le laccasi nello sviluppo di *Tuber melanosporum*

OSVALDO ZARIVI¹, ANTONELLA BONFIGLI¹, SABRINA COLAFARINA¹, ANNA MARIA RAGNELLI¹, PIERPAOLO AIMOLA¹, GIOVANNI PACIONI², MICHELE MIRANDA¹.

¹Dipartimento di Biologia di Base ed Applicata, Università degli Studi dell'Aquila

²Dipartimento di Scienze Ambientali, Università degli Studi dell'Aquila

Le laccasi (EC 1.10.3.2 benzenediol: oxygen oxidoreductase) sono enzimi con sito catalitico a rame ampiamente diffusi nelle piante e nei funghi. Si ritiene che il loro ruolo, oltre alla ossidazione di polifenoli a melanine, sia importante nella digestione della lignina.

Abbiamo qui studiato l'espressione di due geni per le laccasi, Tmelcc1 e Tmelcc2, individuati nel genoma di *Tuber melanosporum* durante lo sviluppo di questo fungo, dallo stadio di micelio a vita libera, sino allo stadio di piena maturazione del corpo fruttifero.

Mediante l'uso di primer specifici preparati in base alle sequenze clonate dei cDNA per le due laccasi sopraindicate, si è misurata per qPCR l'espressione trascrizionale dei due geni relativi. L'attività enzimatica è invece stata indagata per via spettrofotometrica. Il massimo di espressione dei geni Tmelcc1 e Tmelcc2 avviene allo stadio di micorriza, cioè quando si stabilisce l'interazione fungo-pianta come dimostrato sia a livello di mRNA che di attività enzimatica. Dopo lo stadio di micorriza quando cioè non è più necessario invadere i tessuti dell'ospite, i due geni si spengono, così come l'attività enzimatica. Le laccasi di *Tuber melanosporum* sono filogeneticamente vicine a quelle di *Aspergillus niger* ed *Emericella nidulans*.

Ectodermin/Tif1g regola negativamente l'attività di Smad permettendo il corretto patterning dell'embrione mammifero

LEONARDO MORSUT, ELENA ENZO, MARIACELESTE ARAGONA, SANDRA M. SOLIGO, GIORGIO BRESSAN, SIRIO DUPONT, STEFANO PICCOLO

Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Padova

Il controllo della staminalità e l'induzione di specifici destini cellulari differenziativi sono strettamente legati al rigoroso controllo della segnalazione dei ligandi della famiglia di Tgfb. Nonostante i meccanismi di regolazione extracellulare della disponibilità dei ligandi di questa via di segnale siano stati estensivamente studiati, i fattori intracellulari che regolano negativamente l'attività di Smad nei tessuti mammiferi sono poco studiati. Tramite delezione genetica, qui mostriamo come ectodermin (Ecto, o Trim33, o Tif1g), un inibitore di Smad4, sia richiesto per limitare la responsività delle cellule a Nodal nell'embrione murino. Negli embrioni deleti di Ecto si osserva una situazione di eccessiva segnalazione da parte di Nodal: ciò esita in fenotipi assolutamente nuovi che sono associati ad un alterato scenario di risposta mediata da Smad, sia nei territori embrionali che in quelli extraembrionali. In particolare, nell'endoderma extraembrionale Ecto è richiesto per confinare l'espressione degli antagonisti di Nodal all'endoderma viscerale anteriore. Nelle cellule del trofoblasto, la presenza di Ecto permette di dosare l'attività di Nodal in modo da permettere un bilanciamento tra il differenziamento e l'auto-replicazione delle cellule staminali ivi presenti. La delezione epiblasto-specifica di Ecto spinge infine il differenziamento del mesoderma verso destini di nodo/organizer: questo risultato rivela come una corretta inibizione della segnalazione via Smad sia indispensabile per permettere la precisa allocazione di cellule lungo la stria primitiva. Nel complesso, questo studio rivela come il controllo intracellulare negativo operato da ectodermin/Tif1g sulla segnalazione via Smad sia un elemento cruciale della risposta cellulare ai segnali Tgfb nei tessuti mammiferi.

La linea di cellule staminali embrionali *Tph2-eGFP*: un modello per lo studio *in vitro* dello sviluppo e del funzionamento dei neuroni serotonergici

GIULIA PACINI¹, ATTILIO MARINO¹, BARBARA PELOSI¹, SARA MIGLIARINI¹, ALDO FERRARI², MASSIMO PASQUALETTI¹

¹Dipartimento di Biologia, Unità di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università di Pisa

²ETH, Zurigo, CH

La generazione di modelli *in vitro* dei sistemi biologici può semplificare lo studio dei complessi meccanismi che ne regolano lo sviluppo ed il funzionamento permettendo di operare in condizioni sperimentali controllate. La possibilità di combinare l'uso di traccianti vitali come la eGFP con il differenziamento *in vitro* di cellule staminali embrionali (ESCs) verso molteplici tipi cellulari costituisce una straordinaria strategia per studiare nel tempo gli aspetti dinamici di numerosi processi biologici.

La serotonina (5-HT) è un importante neurotrasmettitore coinvolto nello sviluppo e nel funzionamento del sistema nervoso centrale, ed infatti alterazioni a carico della neurotrasmissione serotonergica sono associate a numerose patologie neuropsichiatriche.

Molteplici tipi neuronali distinti tra cui i neuroni serotonergici possono essere ottenuti *in vitro* dal differenziamento di ESCs. Tuttavia, la necessità di ricorrere a tecniche di immunocitochimica per l'individuazione dei tipi neuronali previene la possibilità di seguirne il differenziamento e di studiare in tempo reale i vari aspetti della loro biologia.

Abbiamo generato la linea *Tph2-eGFP* di ESCs in cui la eGFP è stata introdotta nel *locus* del gene *Tph2* che si esprime selettivamente nei neuroni serotonergici. In seguito al differenziamento delle cellule *Tph2-eGFP* in senso neurale è stato possibile ottenere neuroni positivi per eGFP che sono risultati immunoreattivi per la presenza di 5-HT. Inoltre, analisi morfologiche e molecolari hanno confermato che i neuroni eGFP positivi mostrano caratteristiche analoghe a quelle dei neuroni serotonergici presenti *in vivo*. Analisi condotte con microscopia "time-lapse" hanno evidenziato che i neuroni serotonergici differenziati *in vitro* migrano con un meccanismo di nucleocinesi e che esiste una correlazione inversa tra i livelli di eGFP e la velocità di migrazione, suggerendo un'interessante correlazione tra il loro stato differenziativo ed il potenziale migratorio.

Dai dati ottenuti si può concludere che la linea *Tph2-eGFP* costituisce un modello *in vitro* che funziona come un accurato sensore per il differenziamento dei neuroni serotonergici particolarmente adatto per effettuare saggi in coltura anche su larga scala e costituisce una piattaforma semplice ed accessibile per lo studio della biologia dei neuroni serotonergici sia in condizioni fisiologiche che patologiche.

Sistema cannabinergico e risposte neuroendocrine nello sviluppo di larve di *Solea solea* trattate con probiotici

FRANCESCO A. PALERMO¹, GILBERTO MOSCONI¹, PAOLO COCCI¹, MATTEO AVELLA², OLIANA CARNEVALI², CINZIA CECCHINI¹, CRISTINA VERDENELLI¹, ALBERTA MARIA POLZONETTI-MAGNI¹

¹ Scuola di Bioscienze e Biotecnologie, Università di Camerino

² Dipartimento di Scienze del Mare, Università Politecnica delle Marche

In acquacoltura, modificazioni delle condizioni di allevamento possono portare all'attivazione dell'asse neuroendocrino che controlla la risposta allo stress e incidere sul benessere degli animali determinando una riduzione dei tassi di sopravvivenza. Studi recenti hanno dimostrato come l'utilizzo dei probiotici rappresenti un approccio innovativo per il miglioramento del benessere degli animali allevati. Scopo della presente ricerca è stato quello di valutare gli effetti dell'utilizzo di *Enterococcus faecium* IMC 511, come probiotico, sulla modulazione delle risposte mediate dal sistema neuroendocrino durante lo sviluppo larvale di sogliola (*Solea solea*); la possibile correlazione funzionale tra sistema melanocortico e sistema endocannabinoide, entrambi coinvolti nella modulazione delle risposte adattative e del "food intake", è stata investigata attraverso lo studio delle variazioni sia di espressione genica della proopiomelanocortina (POMC) e del recettore per i cannabinoidi di tipo 1 (CB1) sia dei livelli plasmatici di cortisolo. I risultati ottenuti dimostrano che il trattamento con i probiotici è in grado di indurre un incremento sia del cortisolo plasmatico che dell'espressione genica di POMC e di CB1 negli animali campionati al decimo giorno dopo la schiusa (dph), mentre a partire da 30 dph si osserva una chiara modulazione negativa dell'espressione di entrambi i geni. Il campionamento a 60 dph sembra invece indicare che, nelle fasi avanzate dello sviluppo larvale, il trattamento effettuato non abbia più effetti sui target esaminati. Nel complesso, il lavoro svolto dimostra come l'utilizzo di *Enterococcus faecium* induca l'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-interrene (HPI) nelle fasi iniziali dello sviluppo larvale mentre a partire da 30 dph si osserva una netta diminuzione di espressione dei geni esaminati suggerendo la possibile attivazione di un meccanismo compensatorio in grado di promuovere lo sviluppo larvale, di modulare il "food intake" e di ridurre il tasso di mortalità.

Ruolo della serotonina nella regolazione dell'arborizzazione dei terminali assonici serotoninergici in specifici distretti del SNC

SARA MIGLIARINI¹, GIULIA PACINI¹, BARBARA PELOSI¹, GIANLUIGI LUNARDI², MASSIMO PASQUALETTI¹

¹ Dipartimento di Biologia, Unità di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università di Pisa

² Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova

Numerose evidenze sperimentali mostrano che la serotonina (5-HT), oltre ad avere un importante ruolo come neurotrasmettitore, è coinvolta anche nel controllo dello sviluppo del sistema nervoso centrale (SNC) dei mammiferi. I neuroni serotoninergici differenziano durante le prime fasi dello sviluppo embrionale nella regione ventrale del rombencefalo e proiettano i loro assoni verso tutte le regioni dell'encefalo. La concomitanza della comparsa dei neuroni serotoninergici nel telencefalo embrionale con eventi quali proliferazione, migrazione, differenziamento neuronale e formazione dei circuiti neurali, ha permesso di ipotizzare che la 5-HT possa avere un ruolo nello sviluppo del SNC. Inoltre, è stato mostrato che nell'uomo anomalie della neurotrasmissione serotoninergica sono associate a numerose patologie neuropsichiatriche come ad esempio la schizofrenia, i disordini della sfera affettiva e dell'autismo.

Per indagare il ruolo della 5-HT nello sviluppo del SNC abbiamo generato la linea di topo "knockin" *Tph2-eGFP*. Come mostrato precedentemente, l'abrogazione selettiva della sintesi di 5-HT nel SNC causa negli animali mutanti una letalità del 60% ed un forte deficit di crescita nei sopravvissuti. L'espressione della eGFP permette la visualizzazione dei neuroni e delle fibre serotoninergiche negli animali in cui la sintesi della 5-HT è stata abrogata. Sebbene negli animali depleti per la 5-HT il numero e la distribuzione dei neuroni serotoninergici siano inalterati, il confronto tra animali eterozigoti +/- e mutanti -/- per il gene *Tph2* ha evidenziato importanti alterazioni a carico dello sviluppo delle fibre serotoninergiche che proiettano al cervello anteriore. In particolare sono stati individuati due scenari contrapposti in cui la densità delle fibre serotoninergiche è significativamente ridotta, come ad esempio nel nucleo soprachiasmatico, oppure in cui le fibre serotoninergiche presentano una più elevata arborizzazione, come nel caso dell'ippocampo.

Questi risultati dimostrano che la 5-HT è implicata nel controllo dello sviluppo delle fibre serotoninergiche rivestendo un ruolo chiave nella regolazione dell'arborizzazione dei terminali assonici dei neuroni serotoninergici in specifici distretti del cervello. È possibile speculare che perturbazioni a carico dei livelli di 5-HT in fasi critiche dello sviluppo possano causare alterazioni del sistema serotoninergico che sono alla base delle sopracitate patologie neuropsichiatriche.

Localizzazione di specifici miRNA durante lo sviluppo del sistema nervoso di ascidia

ROBERTA PENNATI, ROBERTA DE SANCTIS, FIORENZA DE BERNARDI

Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Milano

I microRNA sono piccoli RNA non codificanti coinvolti nella regolazione genica durante lo sviluppo embrionale e il differenziamento cellulare. Dal momento che i miRNA sono evolutivamente conservati, il loro studio in un animale modello può contribuire alla comprensione del ruolo specifico di queste molecole nei network di regolazione genica di altri organismi.

A tale scopo abbiamo studiato durante lo sviluppo embrionale e in diversi stadi della metamorfosi di due specie di ascidia, *Ciona intestinalis* e *Phallusia mammillata*, il pattern d'espressione di sei famiglie di miRNA noti per essere espressi esclusivamente o prevalentemente nel sistema nervoso di vertebrati e invertebrati. È interessante notare che l'espressione di alcune di queste molecole è conservata tra ascidie e vertebrati, in altri casi l'espressione nelle due specie di ascidia è più simile a quella nota in altri invertebrati. Dati di questo lavoro possono contribuire a gettar luce sull'evoluzione dei meccanismi coinvolti nello sviluppo del sistema nervoso nei cordati.

Studio neurochimico del sistema nervoso centrale di anfiosso durante lo sviluppo

MARIO PESTARINO, LUCA MORONTI, GRETA GARBARINO, SIMONA CANDIANI

Dipartimento di Biologia, Università di Genova

Le conoscenze sullo sviluppo del SNC dell'anfiosso consistono essenzialmente in dati morfologici. Utilizzando marker molecolari quali alcuni trasportatori vescicolari ed enzimi coinvolti nella biosintesi dei neurotrasmettitori, abbiamo identificato le diverse popolazioni di neuroni presenti nell'anfiosso *Branchiostoma floridae* durante lo sviluppo mediante ibridazione in situ whole mount. In particolare abbiamo localizzato neuroni glutamatergici, gabaergici, glicinergerici, colinergici, serotoninergici e dopaminergici, definito la sequenza temporale della loro comparsa e ricostruita una prima mappa neurochimica.

Ricerca svolta con fondi PRIN 2008, 2088JEHW3_001

Regolazione del segnale TGF-beta durante lo sviluppo embrionale: da Spemann ai microRNAs

STEFANO PICCOLO

Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Padova

Durante lo sviluppo embrionale, i segnali TGF β e BMP giocano un ruolo chiave nella definizione dei destini cellulari. La loro via di trasduzione è, in apparenza, estremamente semplice: il ligando causa l'attivazione di un recettore eterodimerico che fosforila le Smads mandandole nel nucleo, dove le Smad legano i loro promotori bersaglio. In questo seminario presenterò alcuni esempi sulla regolazione di questa via di trasduzione che avviene sia a livello extracellulare che intracellulare. Da un lato, queste regolazioni sono qualitative e modificano l'intensità o la durata del segnale, rendendo conto della funzione di TGF β /BMP come morfogeni. Dall'altro lato, in modo più qualitativo, i regolatori stabiliscono i territori embrionali in cui un segnale deve essere acceso o spento. In particolare, nel mio intervento utilizzerò come paradigma le funzioni di TGF β nello sviluppo e funzioni dell'Organizzatore di Spemann.

Entering new dimensions of evolutionary research

THOMAS STACH

Freie Universität Berlin, Department of Biology, Zoological Institute, Animal Systematics and Evolution, Königin-Luise-Straße 1-3, 14109 Berlin, Germany

Although the famous biogenetic law “ontogeny recapitulates phylogeny” is currently resurrected in form of the “molecular phylotypic stage,” I argue that both concepts are empirically questionable and logically untenable. Instead, I propose to include ontogenetic characters from all available organismic levels in phylogenetic analyses in order to properly elucidate evolutionary history. Using examples from comparative developmental morphology of deuterostomes, I suggest how embryological data could be profitably utilized in a phylogenetic context. Simultaneously, I demonstrate the recent progress in microscopical techniques and its effect on embryological research. Computer assisted three-dimensional reconstructions allow detailed comparisons that can be used to propose hypotheses of primary homology as well as indirectly to infer hypotheses of function. Adding the fourth ontogenetic dimension, time, considerably increases the number of characters that can be investigated and reveals similarities in embryological processes, such as between neurulation in chordates and neurulation of the collar cord in enteropneusts. Similarly, 4D-microscopy can reveal correspondences between morphogenetic events on a cellular level, as exemplified by neurulation and the torsion of the larval tail in some tunicates. Moreover, this latter technique elegantly reveals precise cell-lineages at a level unattainable for traditional cell-lineage studies. These advances together with the current explosion of molecular data and in combination with internet-based research tools such as databases and interactive collaborative phylogenetic matrices hold great potential for comparative embryology.

Biologia riproduttiva ed ormoni steroidei nel comune riccio di mare *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)

MICHELA SUGNI¹, SILVIA MERCURIO¹, DENISE FERNANDES², CINTA PORTE², PAOLO TREMOLADA, M. DANIELA CANDIA CARNEVALI¹

¹Dipartimento di Biologia “Luigi Gorini”, Università degli Studi di Milano

²Department of Environmental Chemistry, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Barcelona, Spain

Il riccio di mare *Paracentrotus lividus* è uno dei modelli più noti, e storicamente più utilizzati, nel campo biologia riproduttiva e dello sviluppo. Ciononostante i meccanismi ormonali che regolano lo sviluppo della gonade e dei gameti sono poco conosciuti. Questo lavoro si focalizza sul ruolo degli steroidi e in particolare dell’estradiolo (E2), uno dei principali regolatori della biologia riproduttiva dei vertebrati. Negli echinodermi, questo ormone è stato rilevato in diversi tessuti, dove presenta variazioni stagionali e differenze sesso-specifiche. Il nostro protocollo sperimentale prevede l’iniezione di 17 β -estradiolo in esemplari adulti di *Paracentrotus lividus*, a tre diverse concentrazioni (2 ng/mL, 20 ng/mL and 200 ng/mL) e per un periodo di 2 e 12 settimane. La concentrazione minore risulta prossima a quella fisiologica, precedentemente misurata in esemplari di campo. Sono stati misurati i seguenti parametri: 1) livelli ormonali nei fluidi e nella gonade, 2) attività di enzimi coinvolti in sintesi/metabolismo di E2, 3) sviluppo dimensionale (GI) della gonade, 4) stadio di maturazione delle gonade, 5) contenuto lipidico della gonade. Nonostante si sia rilevato un effettivo incremento di ormone circolante (più ridotto nel caso del tessuto gonadico), entrambi i trattamenti, a breve e lungo termine, non hanno indotto evidenti variazioni né nel GI (apparentemente più influenzato dall’alimentazione) né nello stadio maturativo della gonade sia femminile sia maschile. Al contrario, il contenuto lipidico è risultato negativamente correlato ai livelli di ormone misurato nella gonade, suggerendo un’inibizione di questo parametro da parte dell’E2. Infine l’attività degli enzimi coinvolti nella sintesi/metabolismo di E2 suggerisce la presenza di meccanismi omeostatici che mantengono i livelli endogeni di ormone entro certi valori critici, proteggendo i tessuti da eccessivi sbalzi ormonali. Nel complesso i risultati ottenuti forniscono un contributo alla conoscenza dell’endocrinologia degli echinoidei. In particolare, si evidenzia come, diversamente dai vertebrati e dagli echinodermi asteroidei, l’E2 non influenzi direttamente la biologia riproduttiva di questa specie regolandone lo sviluppo della gonade e la maturazione dei gameti. Piuttosto, l’ormone sembra essere coinvolto in altre funzioni fisiologiche specifiche correlate alla riproduzione, quali ad esempio la regolazione della composizione biochimica e dell’accumulo di sostanze di riserva all’interno della gonade.

L'acetilcolina di derivazione assonale rappresenta un nuovo segnale in grado di dirigere la mielinizzazione nelle cellule di Schwann

ADA MARIA TATA¹, CAROLINA UGGENTI¹, ANNALINDA PISANO¹, M. EGLE DE STEFANO¹, FEDERICA DE ANGELIS¹, VALERIO MAGNAGHI², CLAUDIO TALORA³, JURGEN WESS⁴

¹Dip. di Biologia e Biotecnologie Charles Darwin, Centro di ricerca in Neurobiologia Daniel Bovet, La Sapienza Università di Roma

²Dipartimento di Endocrinologia, Fisiopatologia e Biologia Applicata, Università di Milano

³Dipartimento di Medicina Sperimentale, La Sapienza Università di Roma

⁴NIDDK, National Institutes of Health, Bethesda, USA

Diversi neurotrasmettitori (es. GABA, adenosina e acetilcolina) modulano la proliferazione, la sopravvivenza e il differenziamento di cellule gliali. Nostri precedenti studi hanno dimostrato che l'acetilcolina è in grado di modulare la proliferazione e/o il differenziamento delle cellule gliali mielinizzanti sia nel SNC che nel SNP attraverso la selettiva attivazione di due differenti recettori muscarinici (M3 e M2 rispettivamente). Le cellule di Schwann in vitro rispondono alle selettiva attivazione del recettore muscarinico M2 da parte dell'agonista arecaidina bloccando la proliferazione cellulare e avviando il programma differenziativo verso il fenotipo mielinizzante. Benché le cellule di Schwann in vitro non siano in grado di differenziare terminalmente quando coltivate in assenza di un assone, l'avvio del programma differenziativo verso il fenotipo mielinizzante è possibile dimostrarlo valutando l'espressione delle proteine della mielina. Noi abbiamo dimostrato che trattando in vitro le cellule di Schwann con arecaidina si determina un incremento di espressione della Po, PMP22 e MBP sia in termini di trascritto che di proteina. Questo si accompagna ad una aumentata espressione di fattori di trascrizione coinvolti nella progressione delle cellule di Schwann immature verso il fenotipo mielinizzante (krox 20/egr2; sox 10) e una ridotta espressione di fattori di trascrizione coinvolti nell'acquisizione del fenotipo non mielinizzante o nel processo di de-differenziamento delle cellule di Schwann (es. krox 24/egr1, c-jun, Notch-1, Jagged.-1). Analisi morfometriche condotte su sezioni ottiche di nervi sciatici di topi WT e topi KO M2/M4 e KO M1 hanno indicato che l'assenza di questi recettori determina una riduzione del numero delle fibre di grosso calibro; quelle comunque presenti mostrano un'alterata organizzazione della mielina (mielina lassa e decompattata) a cui si accompagnano quadri di degenerazione assonale. Le fibre di piccolo calibro con una mielina meno spessa risultano meno danneggiate, suggerendo che l'attivazione del recettore muscarinico M2 potrebbe essere maggiormente richiesta nella formazione e stabilizzazione della mielina di assoni di grosso calibro come ad es. quelli originati dai motoneuroni spinali. I dati ottenuti quindi suggeriscono che l'acetilcolina, di probabile derivazione assonale, potrebbe rappresentare un segnale aggiuntivo o alternativo richiesto per modulare la mielinizzazione di fibre di grosso calibro.

Analisi comparativa dello sviluppo dei neuroni di topo e di ratto in coltura: ruolo del fattore di trascrizione MeCP2

GABRIELE BAJ, ANGELA PATRIZIO, ENRICO TONGIORGI

Dipartimento di Scienze della Vita, BRAIN Centre for Neuroscience, Università di Trieste

I neuroni sono generalmente caratterizzati da un lungo e sottile assone e da molteplici dendriti ramificati. Lo sviluppo dei neuroni di ippocampo segue una sequenza altamente stereotipata i cui meccanismi molecolari non sono del tutto chiari. La sequenza conosciuta ad oggi, è stata definita grazie a colture primarie di neuroni di ratto e consta di 5 fasi: stadio 1 formazione di lamellipodi, stadio 2 emissione di corti processi indifferenziati, stadio 3 differenziamento dell'assone, stadio 4 crescita dei dendriti e stadio 5 maturazione che comprende il differenziamento del dendrite apicale. Sorprendentemente, un'analisi simile non esiste nel topo che rappresenta il modello principale per studi sui meccanismi molecolari dello sviluppo nei mammiferi. Utilizzando colture primarie di neuroni ippocampali prelevati al giorno postnatale P2 da topo del ceppo C57Bl6 e ratto Wistar, abbiamo analizzato in modo comparativo dal giorno *in vitro* 2 al giorno 10 i seguenti parametri morfologici: n. di neuriti primari e secondari, lunghezza totale dei neuriti, n. di biforcazioni. Abbiamo evidenziato che mentre nel ratto vi è una progressiva crescita fino al giorno 8 di dendriti indifferenziati seguiti da un periodo intensa riorganizzazione e con retrazione e crescita dinamica dei dendriti, nel topo la fase dinamica è anticipata al giorno 5 *in vitro* seguita da una crescita lineare fino al giorno 7 a cui fa seguito una fase crescita esplosiva dei dendriti secondari. Questi risultati preliminari, suggeriscono la necessità di una revisione degli stadi dello sviluppo *in vitro*, con la suddivisione dello stadio 5 in 2 o 3 stadi ulteriori, per lo meno nel topo. Successivamente, mediante overespressione e silenziamento del fattore di trascrizione MeCP2 ne valuteremo l'impatto sulle diverse fasi di crescita.

eif6 e gipc2, interattori di igfr, regolano lo sviluppo del rene in *Xenopus laevis*

MARGHERITA TUSSELLINO, NADIA DE MARCO, CHIARA CAMPANELLA, ROSA CAROTENUTO

Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale Università degli studi di Napoli "Federico II"

eif6 (β 4 binding protein/eucaryotic initiation factor 6) regola la sintesi proteica impedendo l'associazione delle subunità ribosomali che avviene solo in seguito a fosforilazione in Ser235 da parte della protein chinasi C (Ceci et al., 2003). Inoltre eif6 regola la traduzione di messaggeri specifici ed è implicata nel silenziamento post-trascrizionale mediato da miRNA (Ji et al., 2008; Chendrimada et al., 2007). L'iniezione di eif6 in uno dei blastomeri dell'embrione a due cellule induce tre fenotipi: il ripiegamento a ferro di cavallo dell'embrione st28, il ritardo nello sviluppo dell'occhio e la formazione di un edema. L'analisi dei primi due fenotipi ha evidenziato che, in *Xenopus laevis*, eif6 ha un ruolo anti-apoptotico a monte di Bcl-2 ed il sito responsabile di questa funzione è la Ser235 (De Marco et al., 2010). Inoltre eif6 è implicata nella formazione dell'occhio (De Marco et al., in press), in quanto agisce lungo il signaling di igf, down-regolando selettivamente gipc2 che è una proteina necessaria allo sviluppo di quest'organo (Wu et al., 2006; De Marco et al. in prep.). L'edema degli embrioni che iper-esprimono eif6 compare nella parte anteriore della zona ventrale allo st32 ed aumenta durante la crescita, suggerendo una possibile alterazione della funzionalità renale. Poiché nell'uomo è stato dimostrato che il signaling di IGF contribuisce alla regolazione dell'ultrafiltrazione glomerulare, alla crescita del nefrone e del rene (Hirschberg et al., 1998), abbiamo ipotizzato che eif6 e gipc2 possano essere implicate nella formazione del pronefro in *X. laevis*. Poiché il primo abbozzo di quest'organo si forma a st22 dal mesoderma intermedio, abbiamo effettuato ibridazioni *in situ* con marcatori generici per il mesoderma (*bra*) e specifici per il mesoderma intermedio (*lim1*) che darà il pronefro e quello laterale (*myoD*) che darà i miotomi. Gli embrioni iper-esprimenti eif6 o morfanti per gipc2 presentano alterazioni solo nell'espressione di *lim1* suggerendo un'azione specifica sulla formazione del rene e non su altre strutture di origine mesodermica. Inoltre abbiamo effettuato ibridazioni con marcatori di differenziamento terminale delle varie parti del pronefro (*sgltik* per il tubulo prossimale, *cick* e *Cadherin16* per il tubulo intermedio, distale e il dotto pronefrico) su embrioni st38 iniettati o con eif6 mRNA o con gipc2 morfolino. Abbiamo così dimostrato che queste due molecole sono coinvolte sia negli eventi induttivi precoci che in quelli successivi di morfogenesi del pronefro. Quindi eif6 ed gipc2, interattori di igfr, sono essenziali nella formazione dell'occhio e del rene. Studi futuri dovranno comprendere l'eventuale implicazione di altre molecole che restringono in tali territori il segnale di igfr/pi3k/akt.

Ruolo di XHMGA2 nelle creste neurali di *Xenopus laevis*

SIMONE MACRI^{1,2}, MARCO ONORATI^{1,2}, RICCARDO SGARRA³, GLORIA ROS³, GUIDALBERTO MANFIOLETTI³, ROBERT VIGNALI^{1,2}

¹Dipartimento di Biologia, Università di Pisa

²Istituto Toscano Tumori, Firenze

³Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste

Le proteine HMGA sono piccole proteine che legano il DNA tramite motivi conservati definiti “AT-hook”, modificando la conformazione della cromatina e cooperando nella regolazione dell’espressione genica. Due proteine HMGA, HMGA1 e HMGA2, sono state descritte nei mammiferi, codificate da geni distinti. Le proteine HMGA sono altamente espresse durante l’embriogenesi in tessuti proliferanti e indifferenziati, ma non in tessuti adulti, dove i geni *HMGA* vengono però riattivati nella progressione tumorale. In *Xenopus*, è stato descritto solo il gene *hmga2* (*Xhmga2*). I primi trascritti localizzati sono rilevati allo stadio di neurula, a livello dei territori presuntivi del sistema nervoso centrale (SNC), del campo oculare e nelle creste neurali (CN). Negli stadi successivi, *Xhmga2* è espresso nel SNC, nelle vescicole otiche, nelle CN in migrazione e nei loro derivati, nella notocorda e nel mesoderma medio-laterale. Stiamo in particolare studiando il possibile ruolo di *Xhmga2* nelle CN, mediante l’iniezione di oligo morfolino (MO) antisense in embrioni di *Xenopus*. Abbiamo iniettato due diversi MO contro l’mRNA di *Xhmga2*, indirizzandolo nella regione delle CN presuntive; il fenotipo osservato negli embrioni iniettati mostra una severa alterazione degli archi faringei, assenti o gravemente compromessi. L’analisi di marcatori molecolari mostra una forte riduzione o assenza della espressione di *Xtwist* e *Xdll4*, normalmente trascritti nelle CN allo stadio di bottone caudale. L’iniezione del MO produce estesi fenomeni di morte cellulare nella regione normalmente occupata dalle CN. Iniezioni di MO di controllo non producono simili alterazioni. Questi dati suggeriscono che *Xhmga2* sia richiesto per la sopravvivenza delle CN, possibilmente durante la transizione epitelio-mesenchimale e/o la fase migratoria delle CN verso le tasche branchiali.

Si ringrazia

Banca Popolare di Vicenza



ZANICHELLI

farmogal