



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA  
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN

NEUROSCIENZE

XXI Ciclo

***La disfunzione del recettore striatale D2 induce un'alterata trasmissione  
GABAergica in un modello murino di distonia DYT1***

**Giuseppe Sciamanna**

A.A. 2008/2009

Docente Guida/Tutor: Prof. Antonio Pisani

Coordinatore: Prof. Giorgio Bernardi

*“...che tu sia per me il coltello  
col quale frugo dentro me stesso”*  
Franz Kafka

Sciamanna Giuseppe

**La disfunzione del recettore striatale D2  
induce un'alterata trasmissione GABAergica in un modello  
murino di distonia DYT1**



# Sommario

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| Prefazione                        | V  |
| Introduzione e scopo del progetto | VI |

## Parte Prima: concetti generali

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Distonia:caratteristiche generali</i>                                | 1  |
| <i>Alterazioni cerebrali della distonia</i>                             | 3  |
| <i>Ruolo della dopamina nella sindrome distonica</i>                    | 4  |
| <i>Early onset distonia DYT1</i>                                        | 5  |
| <i>Disfunzioni dopaminergiche nella distonia DYT1</i>                   | 5  |
| <i>Modelli animali di distonia</i>                                      | 6  |
| <i>Trattamento clinico della distonia</i>                               | 8  |
| <i>Gangli della base:organizzazione generale</i>                        | 9  |
| <i>Striato: popolazione cellulare</i>                                   | 11 |
| <i>Striato:organizzazione anatomo funzionale</i>                        | 14 |
| <i>GABA</i>                                                             | 16 |
| <i>Recettori GABAergici</i>                                             | 17 |
| <i>Circuito GABAergico striatale:caratteristiche e funzioni</i>         | 19 |
| <i>Dopamina e recettori dopaminergici</i>                               | 22 |
| <i>Localizzazione ed effetto dei recettori dopaminergici in striato</i> | 23 |

## Parte Seconda: risultati sperimentali

|                                        |    |
|----------------------------------------|----|
| <i>Metodi e procedure sperimentali</i> | 25 |
| <i>Risultati</i>                       | 29 |
| <i>Discussione</i>                     | 44 |

|              |    |
|--------------|----|
| Bibliografia | 49 |
|--------------|----|

## **Prefazione**

Il presente elaborato di tesi rappresenta l'esito finale dei tre anni di studio durante il corso di dottorato in Neuroscienze. Nonostante l'argomento cardine sia costituito dallo studio di specifiche alterazioni elettrofisiologiche in un modello animale di distonia, il presente lavoro rappresenta anche l'elaborazione scritta di conoscenze e abilità più generali acquisite nei tre anni di studio. Come risulterà chiaro nei successivi paragrafi, l'elaborato rappresenta l'esposizione di conoscenze affinate e migliorate durante la durata dell'intero corso. Conoscenze sia di natura teorica, sia di natura tecnico-sperimentale acquisite anche grazie ad esperienze professionali come il periodo di studio trascorso presso il laboratorio del Prof. Charles J Wilson dell'università del Texas (USA). Ne consegue che la riuscita specifica di questa tesi è stata resa possibile da una più generale crescita scientifica personale nell'ambito delle neuroscienze sperimentali.

Giuseppe Sciamanna

## **Introduzione e scopo del progetto**

Il presente elaborato di tesi rappresenta uno studio elettrofisiologico di alterazioni a carico del sistema GABAergico striatale in un modello animale di distonia DYT1. La distonia è un grave disturbo del movimento che causa spasmi e forti contrazioni dei muscoli oppositori. Esistono varie tipologie di questa sindrome così come diversi sono i fattori che ne possono indurre lo sviluppo. Notevole importanza rivestono a tale proposito alcune specifiche mutazioni genetiche. La distonia DYT1 è una forma generalizzata di distonia causata da una delezione nel gene che codifica per la proteina TorsinA. La funzione di questa proteina rimane tuttora poco chiara ma si ritiene sia implicata in processi quali il traffico proteico intracellulare, fusione di membrana, e l'attività secretoria. Nonostante i meccanismi che inducono la distonia non siano stati ancora del tutto individuati, un fattore importante è sicuramente rappresentato dalla disfunzione a carico del sistema dopaminergico. Evidenze a riguardo derivano sia da studi post-mortem su pazienti affetti da distonia sia da ricerche effettuate su modelli animali transgenici di distonia.

I gangli della base (GB) rappresentano una struttura sottocorticale adibita principalmente al controllo e alla modulazione dell'attività motoria. Al suo interno lo striato rappresenta il principale sito di ingresso degli input provenienti da strutture esterne quali la corteccia ed il talamo. I neuroni spinosi principali dello striato (MSNs) modulano, inibendola, l'attività della maggior parte delle altre strutture dei GB e sono sotto uno stretto controllo esercitato dalle fibre nigrostriatali provenienti dalla sostanza nera. La dopamina esercita in striato un forte controllo sia sulla sintesi che sul rilascio di GABA. Alterazioni dello striato a livello del circuito GABAergico sono stati messi in relazione con alcuni tipi di distonia.

Scopo di tale lavoro è stato per tanto quello di studiare la funzionalità del circuito GABAergico striatale in animali portatori della mutazione genica DYT1. Contestualmente a ciò è stato approfondito lo studio di come alterazioni a carico del sistema dopaminergico svolgano un ruolo decisivo nella fisiopatologia della distonia.

Lo studio di modelli animali, benché presenti delle inevitabili limitazioni, rappresenta un punto di primaria importanza nell'individuazione e nella comprensione di tutti quei meccanismi alla base dell'insorgenza della distonia.

Parte Prima

Concetti Generali



## **Distonia: caratteristiche generali**

La distonia rappresenta nell'uomo il terzo più comune disordine del movimento e comprende un'ampia gamma di differenti sindromi cliniche (Geyer H.L Bressman 2006). E' caratterizzata da alterazioni nel controllo del movimento con forti spasmi e contrazioni muscolari involontarie accompagnati in alcuni casi anche da forti dolori. Possono essere colpiti singoli muscoli (es palpebre), gruppi muscolari più ampi come quelli degli arti inferiori e superiori, o l'intero organismo. Muscoli oppositori si contraggono involontariamente e simultaneamente creando una sorta di "competizione" per il controllo delle varie parti del corpo. Queste contrazioni muscolari inducono movimenti ripetitivi di torsione e posture del tutto innaturali. Nei casi più gravi di distonia il soggetto diviene del tutto impossibilitato alla deambulazione o a mantenere una corretta stazione eretta. Ai casi di distonia non sono associati fenomeni evidenti di ritardo mentale o di disordini psichici, anche se limitati casi di depressione possono accompagnarsi alle sindromi distoniche. La distonia può essere distinta in due ampie categorie: primaria e secondaria. La distonia primaria si caratterizza per una insorgenza spontanea senza nessuna apparente causa specifica o in concomitanza con nessun'altra patologia. Una componente di natura congenita è stata riportata essere associata a diverse forme di questo tipo di patologia. Molte forme di distonia primaria mostrano attacchi parossistici associati talvolta a discinesie e possono essere innescati dall'assunzione di particolari sostanze, da stress o movimenti ripetitivi. All'interno della distonia primaria è possibile delineare una ulteriore distinzione separando le distonie ad insorgenza precoce (*early-onset dystonia*) da quelle a sviluppo tardivo (*late-onset*). La prima forma presenta una bassa frequenza di insorgenza con sintomi che progressivamente colpiscono varie regioni del corpo. Si caratterizza inoltre per una forte componente genetica ereditaria. I disturbi connessi alle distonie a sviluppo tardivo oltre ad essere più comuni rispetto alle distonie *early-onset*, sono spesso focalizzati in singole parti del corpo come palpebre, muscoli cervicali o muscoli facciali. Appartengono infatti a questa categoria il blefarospasmo, la distonia oromandibolare, la distonia cervicale, la distonia orofaringea e la distonia della mano o più comunemente conosciuta come crampo dello scrivano.. Anche in questo sembra esserci una componente ereditaria associata alla malattia.

Le distonie secondarie comprendono invece tutti i casi in cui i sintomi distonici si associano ad altre patologie o sono conseguenza di danni neuronali di vario genere. Un vasto e vario numero di disordini del movimento sono accompagnati da sindromi distoniche tra i quali i più importanti sono sicuramente la sindrome di Parkinson, il morbo di Huntington, e la malattia

di Wilson\*. Inoltre possono essere causa di questo tipo di sindrome distonica anche l'esposizione a determinate tossine o sostanze tossiche (intossicazione da manganese, da ossido di carbonio, disolfuro di carbonio o metanolo), l'abuso di farmaci come i neurolettici o antipsicotici, o i danni cerebrali causati sia da infezioni virali o batteriche (tubercolosi, sindrome di Reye) sia da traumi o ischemie cerebrali focali.

Una ulteriore classificazione della distonia che viene spesso utilizzata in ambito medico fa riferimento alla regione del corpo affetta dai sintomi. Si distinguono per tanto la distonia focale che coinvolge soltanto una zona del corpo, come ad esempio le palpebre o il collo (blefarospasmo, distonia cervicale). La distonia segmentale che colpisce invece due regioni del corpo adiacenti l'un l'altra, come collo e arti superiori (crampo dello scrivano). La distonia multifocale in cui due distinti punti non immediatamente collegati fra loro manifestano i sintomi distonici (palpebre e mani). Infine si parla di distonia generalizzata quando ad essere colpito si tratta dell'intero organismo sebbene la sintomatologia tenda ad insorgere come distonia focale per poi espandersi successivamente a tutto il corpo.

Notevole importanza nella sindrome distonica è costituita come detto dalla componente genica. Sono state infatti individuate più di 14 mutazioni monogeniche legate alla distonia, caratterizzate per la maggior parte da dominanza autosomica, anche se con una molto bassa incidenza. La debole penetranza che presentano queste mutazioni geniche induce a considerare la possibilità di un innesco secondario in aggiunta alla presenza stessa della singola mutazione. Oltre ai già citati stress di tipo fisico o ambientale, un ulteriore fattore di innesco potrebbe essere rappresentato da altre sequenze genetiche particolari, anch'esse trasmesse ereditariamente, che associate alle mutazioni distoniche facilitano l'insorgenza della malattia stessa. Le distonie associate direttamente a mutazioni genetiche sono varie e differenziate fra loro. La distonia *X-linked-parkinsonism* è una forma early-onset che si riscontra quasi esclusivamente nei soggetti maschi di una popolazione delle Filippine. E' l'unica forma di distonia a cui è associata una degenerazione di tessuto neuronale, più precisamente a carico del caudato-putamen. Alla fase tardiva di tale sindrome sono associati anche sintomi parkinsoniani E' causata da una mutazione in un gene di trascrizione TAF1. La distonia *DOPA-responsive* è una forma di distonia generalizzata a insorgenza precoce. Questo termine è tuttavia utilizzato per indicare un largo spettro di distonie che rispondono efficacemente al trattamento clinico con il precursore dopaminergico l-DOPA. Varie cause possono portare a questo tipo di distonia ma la forma meglio conosciuta di DOPA-responsive distonia è causata da una mutazione del gene che

---

\* E' causata da un anormale accumulo di rame nell'organismo, in particolare a carico di tessuti come fegato e cervello.

codifica per la GTP cyclohydrolase 1, un enzima implicato nella biosintesi di dopamina. La distonia mioclonica è caratterizzata da scatti muscolari rapidi e involontari, che possono presentarsi da soli o accompagnati da contrazioni generalizzate a tutto il corpo. E' causata da una mutazione che porta alla formazione di un'alterata proteina  $\epsilon$ -sarcoglican. Poco chiare sono ancora le funzioni di tale proteina. La distonia parossistica si caratterizza per movimenti improvvisi e involontari di breve durata. Sono movimenti di vario tipo che vanno dal tipo discinetico a quello coreico. Una volta conclusi gli attacchi i soggetti non mostrano alcun tipo di sintomatologia residua. E' causata dalla mutazione del gene che codifica per il *myofibrillogenesis regulator-1*. La distonia rapid-onset si caratterizza per l'insorgenza improvvisa di lenti movimenti di tipo parkinsoniano e di tipo più prettamente distonico innescati spesso da fenomeni di stress. E' causata da una mutazione nel gene ATP1A3 che codifica per la subunità  $\alpha 3$  della pompa  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ . La distonia *early-onset torsion* è una forma di distonia generalizzata ad insorgenza precoce, causata dalla delezione di una tripletta del gene DYT1 che codifica per la proteina TorsinA. La funzione di quest'ultima non è del tutto chiara ma si ritiene sia implicata nei processi intracellulari di interazione con il citoscheletro e di rilascio del neurotrasmettitore (vedi pag 5)

## **Alterazioni cerebrali nella distonia**

Nonostante le cause e i meccanismi alla base delle diverse sindromi distoniche siano ancora poco chiari, i molti e di diversa natura studi portati avanti negli ultimi anni hanno dimostrato alterazioni profonde nella struttura e nella funzionalità di distinte zone cerebrali di soggetti affetti da tale patologia. Studi di *imaging* in vivo su pazienti affetti sia da distonie primarie che secondarie hanno mostrato un aumento di volume dei gangli della base, un aumentata densità della materia grigia nella corteccia sensoriale primaria (Draganski et al., 2003). Nella distonia primaria grazie a studi di tomografia a emissione di positroni (PET) e di fMRI sono stati individuati varie anomalie nei circuiti sensoromotori e motori più in generale. In particolare nella corteccia premotoria e nel nucleo lentiforme è stato riscontrato un aumentato metabolismo del glucosio, mentre nel caudato-putamen erano alterati i livelli di binding del recettore D2 (Perlmutter et al., 1997). Tuttavia a dimostrazione del fatto di come la fisiopatologia della distonia sia alquanto complessa in relazione soprattutto al largo spettro di sindromi cliniche esistenti, è stato riscontrato che i livelli di binding del recettore D2 sono diminuiti in pazienti con distonia DYT1 (Asanuma et al., 2005) ma aumentati in soggetti con distonia DOPA-recessiva

(Eidelberg et al., 1998). Soggetti portatori della mutazione DYT1 con sintomatologia sia manifesta che non, presentavano un'aumentata attività metabolica basale nel nucleo lentiforme, nel cervelletto in altre varie aree motorie. Pazienti con distonia primaria e secondaria (crampo dello scrittore, distonia orofacciale) presentano un'aumentata attività in regioni quali la corteccia premotoria e la corteccia motoria supplementare durante l'esecuzione di movimenti.(Ceballos-Baumann et al., 1995) Tutti questi studi rappresentano degli interessanti passi avanti nella esatta caratterizzazione della distonia, ma come si evince anche da alcune contraddizioni che sorgono tra di essi soffrono di intrinseche problematiche quali talune differenze negli approcci metodologici e la inevitabile carenza di tessuti su cui condurre sperimentazioni.

### **Ruolo della dopamina nella sindrome distonica.**

Esistono ormai molte evidenze a sostegno dello stretto legame fra le disfunzioni del sistema dopaminergico e l'insorgenza della sindrome distonica. (Augood et al., 2002-2004; Perlmutter and Mink 2004). Ad esempio fenomeni di tipo distonico sono una prominente caratteristica associata alla malattia denominata "DOPA-responsive distonia". Tale malattia è causata da un difetto nel processo di sintesi della dopamina dovuto ad una ridotta attività dell'enzima GTP-cyclohydrolase (Ichinose et al., 1994). I pazienti affetti da questa patologia rispondono in maniera massiccia ed efficace a basse dosi di L-DOPA, un precursore della dopamina in grado di oltrepassare la barriera ematoencefalica ripristinando in parte i livelli di questo neurotrasmettitore. Fenomeni distonici sono inoltre associati a malattie causate da mutazioni di geni che codificano sia per enzimi coinvolti nel metabolismo dopaminergico (Knappskog et al., 1995) sia per recettori dopaminergici di tipo D2 o D5 (Klein et al., 1999; Placzek et al 2001). La distonia inoltre, come anche precedentemente ricordato si manifesta in patologie caratterizzate da disfunzioni a carico del sistema dopaminergico come la sindrome di Parkinson, ma anche come complicazione cronica di trattamenti a base di bloccanti dei recettori dopaminergici in pazienti con disturbi psichici o gastrointestinali (Pinnitti et al., 2006; Burke et al.,1982). Studi di PET-imaging hanno dimostrato anomalie nella trasmissione dopaminergica di molti pazienti affetti. E' stata infatti trovata una riduzione sia del binding dei recettori dopaminergici striatali (Perlmutter et al 1997a,b) sia nell'attività della DOPA decarbossilasi (Playford et al .,1993).

## **Early-onset distonia DYT1**

La sindrome detta *early-onset torsion distonia (DYT1)* è una grave forma ereditaria (autosomica dominante) di distonia generalizzata. Insorge in un arco di tempo che va dai 5 ai 28 anni di età . Nei casi più precoci, i sintomi si manifestano a partire dagli arti inferiori per poi espandersi alla parte superiore del corpo. In particolare sono sintomi iniziali i cambi nell'andatura corporea, il disallineamento nella postura dei piedi ( torsione verso l'interno o verso l'esterno) o problemi nella capacità di scrivere. Nei casi più tardivi la sintomatologia rimane invece localizzata principalmente alla metà superiore del corpo. Questa sindrome è associata ad una singola mutazione nel gene DYT1, (cromosoma 9q) caratterizzata dalla delezione di un'unica tripletta genica (ΔGAG). Tale mutazione causa la perdita di un residuo glutaminico nella regione carbossi-terminale della proteina TorsinA. La penetranza di questa mutazione è piuttosto bassa, in quanto solo il 30 % dei soggetti che ereditano il gene mutato sviluppano poi una sindrome distonica. TorsinA è presente ubiquitariamente nell'organismo umano, ma è espressa ad alti livelli, e soprattutto nelle fasi precoci di sviluppo corporeo, all'interno dei gangli della base, della corteccia cerebrale, dell'ippocampo del talamo e del cervelletto. A livello cellulare questa proteina è localizzata prevalentemente all'interno del reticolo endoplasmatico e della membrana nucleare. TorsinA appartiene alla famiglia delle ATPasi, ma la sua esatta funzione rimane tuttora poco chiara. Si ritiene sia coinvolta nella regolazione delle interazioni fra citoscheletro, membrana nucleare e reticolo endoplasmatico, e nei processi di trasporto delle vescicole sinaptiche all'interno degli assoni (Goodchild et al., 2005; Hewett et al., 2007).

## **Disfunzioni dopaminergiche nella distonia DYT1**

Il legame fra dopamina e distonia è messo in luce oltre che da evidenze indirette come quelle sopra riportate anche da risultati sperimentali effettuati direttamente sia su pazienti che su modelli animali manifestanti patologie distoniche, in particolare in modelli di distonia DYT1. Una evidente differenza che distingue la distonia da altre patologie legate a disfunzioni dopaminergiche come il morbo di Parkinson, risulta dalla mancanza di fenomeni di neurodegenerazione nelle patologie distoniche. Studi autoptici infatti hanno dimostrato l'assenza di degenerazione cellulare a carico dei neuroni dopaminergici della sostanza nera compatta (SNc), benchè tali neuroni presentino un soma cellulare di maggiori dimensioni rispetto al

normale.(Furukawa et al., 2000). I livelli striatali di dopamina registrati postmortem in cervelli di pazienti distonici sono risultati essere normali o solo leggermente diminuiti. (Augood et al., 2002; 2004). Molti autori, riportano tuttavia alterazioni funzionali nella trasmissione dopaminergica, in particolare un aumentato turnover della dopamina. (Augood et al., 2002; 2004). Gli esperimenti condotti su cervelli umani benchè molto interessanti soffrono di intrinseche problematiche dovute alla scarsità di campioni da analizzare e dalle non sempre paragonabili modalità di conservazione e trattamento dei tessuti. Tali discrepanze possono in parte spiegare eventuali divergenze di risultato in questo tipo di esperimenti. Evidenze molto più chiare del rapporto dopamina-distonia emergono dallo studio di modelli genetici animali di distonia DYT1. In particolare sono stati variamente studiati i livelli tissutali sia di dopamina sia di alcuni dei suoi cataboliti attivi come la DOPAC e l'HVA\* Topi knock-down DYT1 presentano livelli normali di dopamina ma livelli ridotti di DOPAC (Dang et al 2005). Topi invece knock-in possiedono bassi livelli di HVA.(Dang et al 2006). In un modello di distonia che sovra-esprime la proteina umana mutata Zhao e collaboratori (2008) hanno riscontrato dei livelli normali di dopamina striatale mostrando tuttavia come sia presente un alterato turn-over di questo trasmettitore, in virtù di alti livelli sia di DOPAC che di HVA. Oltre a disfunzioni a carico del metabolismo della dopamina sono stati inoltre riscontrate anomalie nella funzionalità del sistema dopaminergico. Balcioglu e colleghi (2007) hanno mostrato come topi hMT1 che sovraesprimono cioè la proteina umana mutata, presentino un più basso livello di dopamina indotto dalla somministrazione di amfetamine. Nello stesso tipo di animali infine Pisani e collaboratori (2006) hanno riscontrato una alterata funzionalità del recettore dopaminergico D2 a livello degli interneuroni colinergici striatali. La stimolazione di tale recettore da luogo infatti ad un abnorme e opposta azione rispetto a quella normalmente riscontrata negli animali di controllo. E' stato inoltre riscontrato che i livelli di binding del recettore D2 sono diminuiti in pazienti con distonia DYT1(Asanuma et al., 2005).

## **Modelli animali di distonia**

Un contributo fondamentale allo studio di malattie rare come la distonia viene fornito dall'utilizzo di modelli animali in grado di riprodurre seppure parzialmente caratteristiche fisiopatologiche della malattia stessa. Negli ultimi decenni sono stati sviluppati un ampio numero di modelli animali legati alla distonia che possono essere sostanzialmente distinti in modelli fenotipici e

---

\*l'acido 3,4-diidrossifenilacetico (DOPAC) e l'acido omovanillico (HVA) rappresentano due cataboliti prodotti nei processi di inattivazione della dopamina.

modelli genetici. Nei modelli genetici vengono riprodotte nel genoma dell'animale quelle mutazioni che sono riconosciute essere associate a sindromi distoniche. I modelli fenotipici invece sono in grado di riprodurre la sintomatologia distonica sia grazie a lesioni cerebrali, sia sfruttando mutazioni genetiche che avvengono nell'animale in maniera del tutto naturale e spontanea. I modelli genetici possono inoltre distinguersi anche sulla base di come la mutazione viene introdotta nel genoma dell'animale. Esistono ad esempio due diverse tipologie di modelli murini di distonia DYT1: un modello in cui al gene murino *dyl* è stata inserita la mutazione distonica  $\Delta$ GAG, e un secondo tipo in cui gli animali esprimono la proteina umana mutata (hMT). Quest'ultimo tipo, creato e caratterizzato da Sharma e collaboratori (2005) rappresenta il modello animale utilizzato per gli esperimenti riportati in questo elaborato (vedi metodi). Nonostante tali animali non presentino evidenti comportamenti distonici, mostrano tuttavia alterazioni motorie riscontrabili con l'utilizzo di specifici test comportamentali. In particolare sono state riscontrate iperattività, movimenti rotatori ripetuti, deficit della coordinazione e dell'apprendimento motorio (Breakefield et al 2008). Tutti i modelli murini in cui la mutazione distonica sia di tipo omozigote non sono in grado di sopravvivere dopo la nascita. Molti altre mutazioni geniche sono state utilizzate per creare diversi modelli animali di distonia. Topi knock-out per il gene DYT11 presentano mioclonia, iperattività e alterazioni dell'apprendimento motorio. Topi eterozigoti per il gene DYT12 mutato presentano deficit dell'apprendimento spaziale e iperattività (Breakefield et al 2008).

Tra i modelli animali fenotipici si annoverano come detto anche delle linee animali che presentano mutazioni geniche che sono insorte in maniera del tutto naturale e non indotta artificialmente. Queste mutazioni danno luogo a sindromi di tipo distonico ma non sono mai localizzate sugli stessi geni che sono associati alla distonia umana. Il modello detto Tottering presenta una mutazione nei canali del calcio P/Q che induce attacchi discinetici episodici. Il modello di distonia parossimale *dt/dt hamster* presenta invece profonde alterazioni nella trasmissione sia glutamatergica che GABAergica così come alterazioni nei canali del potassio KCNQ. Esistono infine modelli, in cui le sindromi distoniche vengono indotte con lesioni a carico soprattutto dei gangli della base, o tramite induzione forzata di movimenti ripetuti, ad esempio degli arti superiori. Nonostante il notevole aiuto che sono in grado di fornire alla ricerca scientifica è necessario tenere presente che tali modelli non sono in grado di riprodurre la sintomatologia distonica in tutti i suoi aspetti. Ne segue pertanto la difficoltà di generalizzare i risultati ottenuti in un singolo modello alla distonia umana e il riscontro a volte di incongruenze tra due differenti modelli. Questo approccio sperimentale ha reso tuttavia possibile una larga

parte di progressi nell'individuazione delle cause della distonia e rappresenta sicuramente il metodo di maggiore interesse per le ricerche future.

## **Trattamento clinico della distonia**

Nonostante la complessità e varietà delle sindromi distoniche esistono ad oggi varie possibilità di trattamento, anche se di natura prettamente sintomatico, della distonia. Pazienti affetti, possono infatti presentare miglioramenti del quadro clinico grazie all'assunzione di farmaci in grado di agire a livello del sistema colinergico, dopaminergico e GABAergico. Vengono infatti usati sostanze quali trihexyphenidyl e il diphenhydramine, il baclofen, la levodopa, o diverse benzodiazepine come il clonazepam o la carbamazepine. Casi di distonia focale possono essere efficacemente trattati anche grazie ad iniezioni intramuscolari di botulino. Tale tossina blocca il rilascio colinergico dai motoneuroni periferici portando quindi ad una riduzione dell'attività dei muscoli implicati nella sindrome distonia. Di notevole importanza nel trattamento distonico è inoltre la cosiddetta *deep brain stimulation* (DBS). Consiste nel posizionamento di un ago di stimolazione a livello del globus pallidus interno, che genera una stimolazione costante di circa 60Hz. L'ago è collegato ad una batteria impiantata sottocutaneamente a livello del torace del paziente. Tale metodo presenta dei risultati clinici molto evidenti soprattutto in casi di distonia early-onset, e dimostra in maniera indiretta ma evidente come delle alterazioni della funzionalità dei gangli della base siano primariamente responsabili della sindrome distonica.



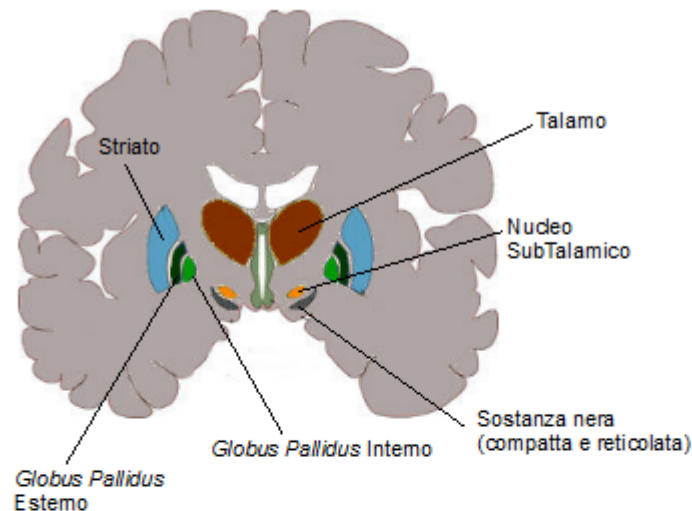
## Gangli della base: organizzazione generale

I gangli della base (GB) sono un riccamente interconnesso gruppo di nuclei sottocorticali implicati nella codifica e nel controllo del movimento. Ne fanno parte lo striato (nei primati diviso in caudato e putamen), la sostanza nera reticolata (SNr) e compatta (SNc), il globus pallidus interno (GPi) ed esterno (GPe), l'area segmentale ventrale (VTA) e il nucleo subtalamico (STN). L'ampia gamma di connessioni di natura sia eccitatoria che inibitoria che intercorre fra i nuclei sopradetti rende alquanto complessa una esatta determinazione della circuitistica all'interno dei GB. (fig 1). Lo striato all'interno dei gangli della base rappresenta sia il nucleo di maggiori dimensioni, sia il punto di arrivo della maggior parte degli input provenienti da altre strutture cerebrali. Allo striato infatti convergono afferenze provenienti dalla corteccia motoria, sensoriale e associativa, input dai nuclei intralaminari del talamo, input dopaminergici dalla SNc e afferenze serotoninergiche provenienti dal nucleo del *Raphè*. Riceve inoltre connessioni provenienti dal sistema limbico (amigdala) e dall'ippocampo. Lo striato proietta esclusivamente ad altre strutture interne ai GB. In particolare a tre di questi nuclei: GPe, GPi e SNr. GPi e SNr costituiscono il maggior output dei gangli della base proiettando principalmente al talamo, alla fascia laterale dell'*habenular nucleus*, e agli strati profondi del *colliculus* superiore. GPe proietta invece massimamente al nucleo subtalamico. Benchè di piccole dimensioni questo nucleo riveste una notevole importanza all'interno del circuito dei GB. Riceve afferenze da una larga parte della corteccia frontale e dal talamo, proiettando invece verso GPi, GPe e sostanza nera. Nonostante le vie di accesso ai gangli della base possono essere varie e distinte, il punto di accesso più importante rimane principalmente rappresentato dallo striato. Quest'ultimo rappresenta dunque una struttura cardine all'interno dei GB, posizionandosi come un efficiente punto intermedio di snodo fra input ed output dei GB.

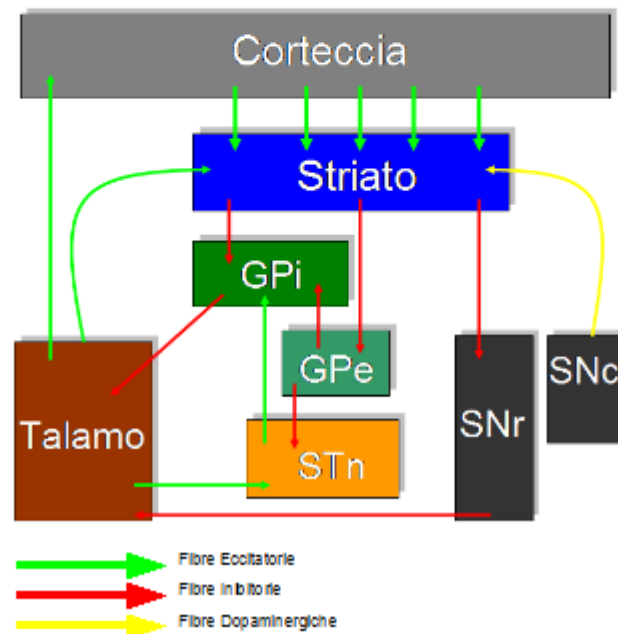
Nel sistema di proiezioni all'interno dei gangli della base si possono riconoscere due distinti *pathways* di trasmissione entrambi facenti capo allo striato. La cosiddetta *via diretta* è costituita da neuroni che proiettano direttamente verso il GPi o la sostanza nera. La *via indiretta* invece è rappresentata da neuroni che si connettono esclusivamente al GPe. La via diretta rappresenta quindi un percorso immediato di trasmissione dell'informazione dallo striato verso gli output esterni dei GB. A questa classificazione anatomica si associa anche una distinzione molecolare. I neuroni della via diretta sono infatti immunoreattivi per la sostanza P ed esprimono il recettore dopaminergico D1-like. I neuroni della via indiretta contengono invece encefalina ed

esprimo il recettore della dopamina D2-like. E' ad ogni modo necessario sottolineare come questa classificazione in due distinte vie non possa essere rigidamente accettata in quando alcune recenti indagini mostrano come ci siano molte situazioni intermedie o di sovrapposizione tra i due pathways. (Parent et al., 2000; Nambu et al., 2002).

A



B



**Fig 1** A) Il disegno mostra la localizzazione cerebrale delle astrutture appartenenti ai GB. B) Rappresentazione schematica delle connessioni tra le varie strutture dei GB

## Striato: popolazione cellulare

La popolazione striatale può essere sostanzialmente divisa in due classi: neuroni principali spinosi ed interneuroni. La maggior parte delle cellule all'interno dello striato (93-94%) appartengono alla categoria dei cosiddetti neuroni spinosi principali (*medium spiny neurons*-MSNs). Sono neuroni di tipo GABAergico e rappresentano le uniche cellule dello striato a proiettare verso strutture esterne allo striato stesso. Il loro nome deriva dalla peculiare caratteristica di possedere delle evidenti spine che ricoprono interamente le ramificazioni dendritiche della cellula (fig2a). Le spine dendritiche si presentano come rigonfiamenti sferoidali collegati al ramo dendritico da un breve tratto di membrana. Il lume cellulare dei MSNs ha un diametro compreso fra i 12 e 20  $\mu\text{m}$  e da esso si originano alcuni brevi tratti di tronchi dendritici primari privi di spine. Da questi ultimi dipartono vari rami dendritici secondari che danno origine ad una fitta arborizzazione sferica intorno alla cellula che può irradiarsi per uno spazio di 300-500  $\mu\text{m}$ . La densità delle spine è direttamente proporzionale alla distanza dal soma (picco massimo 4-6 spine per ogni  $\mu\text{m}$  di dendrite ad una distanza dal soma di 80 $\mu\text{m}$ ) e a questa crescita del numero si accompagna una graduale diminuzione delle dimensioni delle spine. Il tronco assonico può originare sia dal soma che dal primo tratto dendritico e nelle immediate vicinanze della cellula dà origine ad una vasta arborizzazione collaterale che è alla base della cosiddetta *feedback inhibition* (vedi pag 9) diretta verso altri MSNs nello spazio circostante.

Gli interneuroni striatali sono suddivisi in due categorie: interneuroni colinergici e interneuroni di tipo GABAergico. A quest'ultima categoria appartengono sia interneuroni immunoreattivi per la parvalbumina, sia interneuroni immunoreattivi per somatostatina e l'ossido nitrico sintetasi. Gli interneuroni colinergici rappresentano soltanto il 2-4% dell'intera popolazione cellulare. Possiedono un soma cellulare di enormi dimensioni se paragonato a tutte le altre cellule dello striato, di forma triangolare con un diametro massimo di circa 50-60 $\mu\text{m}$ . Pochi rami dendritici originano dal soma dando tuttavia luogo ad una abbastanza estesa ramificazione secondaria che si estende in uno spazio di circa 500-700  $\mu\text{m}$ . L'assone prende origine dal tronco dendritico e costituisce una fitta rete di innervazione che si estende fino ad 1 mm dal soma (fig 2b).

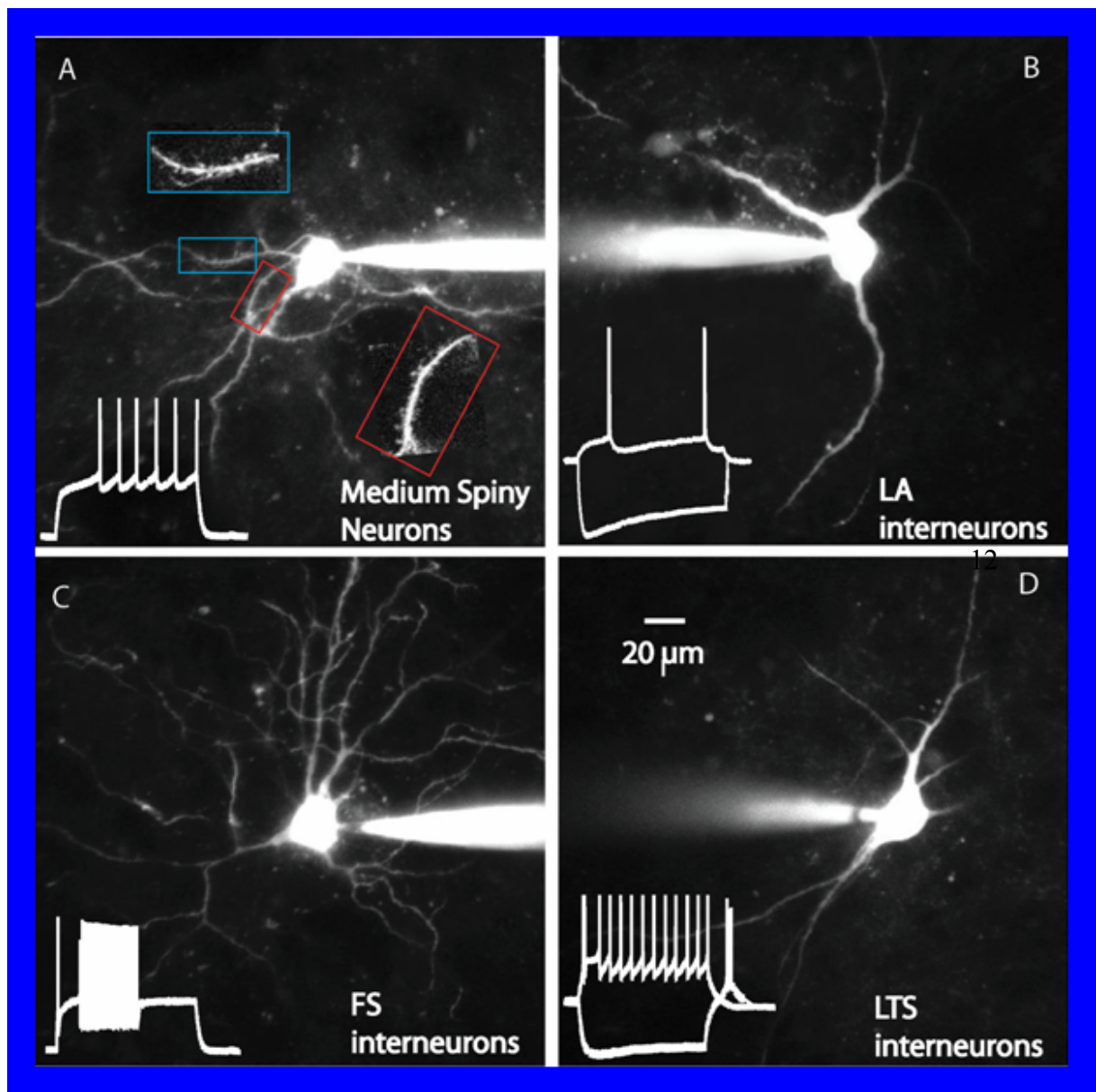
Gli interneuroni GABAergici Fast Spiking (FS) rappresentano il 3-5% dell'intera popolazione cellulare striatale e si caratterizzano per la loro immunoreattività oltre che al GABA anche per la Parvalbumina, una proteina che appartiene al cosiddetto gruppo delle *calcium*

*binding protein*\*. Hanno un soma di forma prettamente sferica, di dimensioni paragonabili a quelle degli MSNs, non presentano spine dendritiche anche se sono presenti in alcuni casi delle piccole varicosità. L'arborizzazione assonale è piuttosto ampia e diretta massicciamente verso gli MSNs attorno ai quali forma una intensa rete di connessioni. Caratteristica importante di queste cellule è la loro connessione elettrotonica tramite *gap-junction* dendritiche. Tale connessione le rende potenzialmente capaci di agire come un unico e ampio network di cellule sincronizzate. Nonostante la scarsità di dati certi a riguardo gli interneuroni Fast Spiking possono essere divisi in due sottotipi cellulari a seconda della ampiezza della loro arborizzazione assonale e dendritica. Esistono infatti FS con ramificazioni che si stendono relativamente vicino al soma ( 100-150  $\mu\text{m}$ ) ed FS con una arborizzazione che si proietta molto più in lontananza ( $>300\mu\text{m}$ ). (Koss T and Tepper JM, 1999). Nonostante ciò, nessuna differenza significativa all'interno della popolazione degli FS è stata riscontrata riguardo caratteristiche elettrofisiologiche o funzionali di tali cellule (fig2c).

Una ulteriore classe di interneuroni GABAergici è costituita da cellule immunoreattive per la ossido-nitrico sintetasi (NOS), per la somatostatina (SOM) e il neuropeptide-Y. Questi neuroni rappresentano l'1-2% della popolazione striatale. Hanno dimensioni somatiche paragonabili ai MSNs, e non presentano spine dendritiche. Le ramificazioni sia dendritiche che assonali sono poco ampie ma si proiettano ad una notevole distanza rispetto al soma cellulare (fig2d). Questa classe cellulare è sicuramente la meno conosciuta all'interno della popolazione striatale. Infatti, la classificazione di tali cellule risulta ancora essere poco chiara ma si ritiene che esistano almeno due differenti sottotipi neuronali distinti da diverse caratteristiche elettrofisiologiche ( Tepper JM et al., 2008).

---

□ Le *calcium binding protein* sono proteine implicate nella modulazione della trasduzione del segnale intracellulare mediata dal Calcio. Ne fanno parte oltre alla Parvalbumina anche la Calmodulina e la Calsequestrina.



**Fig 2**

**Popolazione cellulare Striatale:** il pannello mostra le 4 classi di cellule striatali di ratto adulto. Le immagini sono ottenute tramite l'aggiunta alla normale soluzione intracellulare di registrazioni, di ALEXA fluor 594. L'acquisizione delle immagini è stata ottenuta tramite microscopio 2Fotoni presso il laboratorio del prof Wilson, dept Biologia UTSA-university TX. A) Neuroni spinosi (MSNs). Si nota il tipico firing tonico a bassa frequenza. I riquadri mostrano inoltre le tipiche spine presenti sui dendriti di tali neuroni. B) Inteneurone colinergico (LA). Sono cellule di dimensioni maggiori rispetto a tutte le altre con scarsa arborizzazione in prossimità del soma. La traccia mostra la tipica  $I_h$  in risposta a correnti iperpolarizzanti. C) Inteneurone Fast Spiking. Sono cellule di dimensioni paragonabili agli MSNs con un'ampia arborizzazione priva di spine. Caratteristico il firing ad alta frequenza di tipo burstiforme. D) Inteneurone LTS. Di dimensioni leggermente superiori ai MSNs, ha una forma allungata con due tipici tratti dendritici poco ramificati che si diramano in direzioni opposte. Si nota la tipica spike a bassa soglia che si sviluppa subito dopo uno step iperpolarizzante.

## **Striato: organizzazione anatomo-funzionale.**

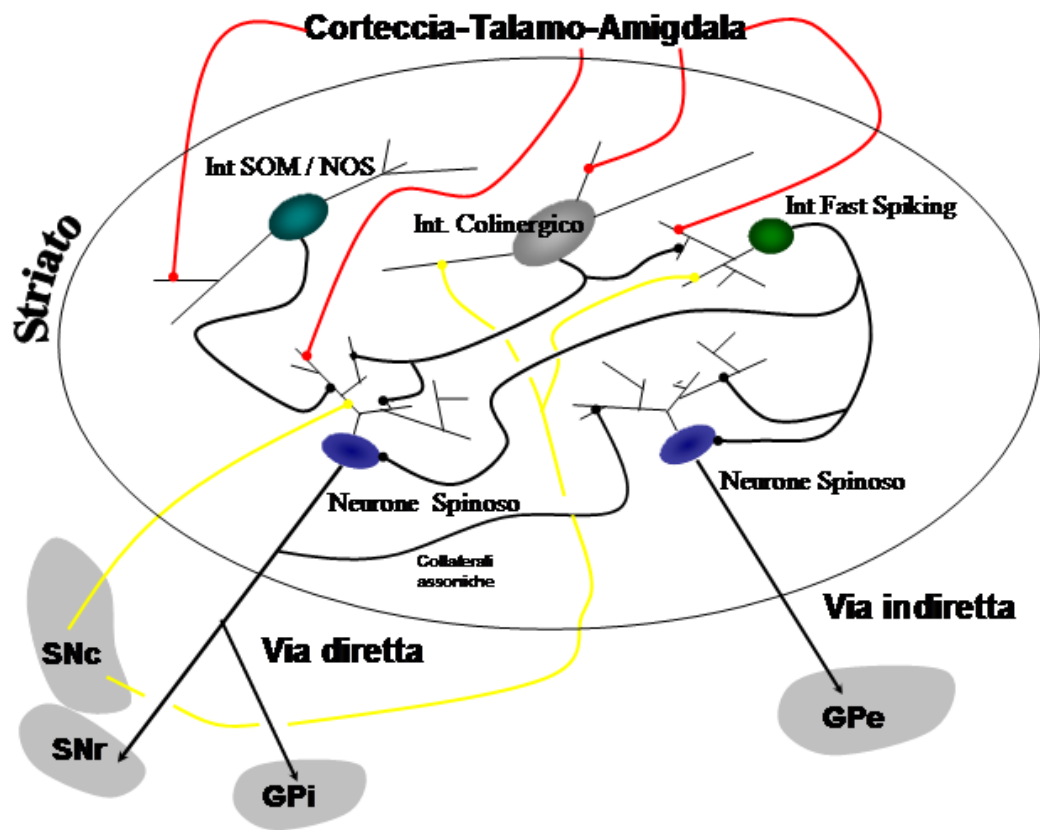
Come riportato nei paragrafi precedenti lo striato riceve un ampio spettro di input da varie strutture del SNC. Le afferenti che provengono dalla corteccia e dal talamo costituiscono in striato una arborizzazione che per la sua organizzazione viene detta *assodendritica cruciforme*. Le fibre afferenti si inoltrano in striato attraverso un relativamente stretto corridoio di tessuto, connettendosi con le ramificazioni dendritiche della popolazione cellulare striatale che incrocia durante il suo percorso. Ne segue che ogni singola fibra afferente sinapta con le ramificazioni dendritiche di molte distinte cellule, creando tuttavia un basso numero di sinapsi con ognuna di esse. Ogni singola cellula striatale riceve quindi input da molte distinte fibre ma senza però riceverne molte sinapsi. Esiste tuttavia una diversa organizzazione di una parte di fibre provenienti dalla corteccia o dal talamo. Assoni provenienti dal nucleo parafascicolare del talamo e una parte di assoni facenti capo alla corteccia creano in striato una vasta rete di sinapsi di tipo focale, limitata cioè a piccole zone di tessuto. Indipendentemente dal tipo di organizzazione le sinapsi talamo-corticali sono di tipo asimmetrico e sinaptano i MSNs sia a livello dell'albero dendritico che delle spine. Le afferenze provenienti dalla sostanza nera si proiettano in striato con una organizzazione strettamente focalizzata a specifiche zone piuttosto sparse tra di loro, con possibilità tuttavia di piccole sub-ramificazioni secondarie. Tale organizzazione implica che ogni singola zona dello striato riceve un'innervazione dopaminergica esclusivamente da un piccolo numero di neuroni dopaminergici (Prensa e Parent 2001). Le sinapsi dopaminergiche sono di tipo simmetrico e circa il 50% di esse contattano gli MSNs attraverso le spine dendritiche in una situazione di stretto contatto con le sinapsi provenienti dalla corteccia o dal talamo. Il resto delle sinapsi dopaminergiche sinaptano a livello dei rami dendritici.

Lo striato deve il suo nome al fatto che se osservato al microscopio presenta delle ben visibili strie fibrose di colore scuro alternate a zone più chiare di materia grigia (fig4). Tali fibre sono costituite dagli assoni dei neuroni spinosi i quali si raccolgono in fasci di piccole dimensioni perforano la materia grigia e proiettano verso gli altri gangli della base. Come già ricordato i principali target striatali sono il globus pallidus esterno e la sostanza nera reticolata. In queste due strutture gli assoni provenienti dallo striato arborizzano in maniera molto caratteristica, detta *assodendritica-longitudinale*. I singoli assoni striatali corrono paralleli alle ramificazioni dendritiche sia del pallido che della sostanza nera producendo un'alta serie di connessioni sinaptiche con la quasi totalità delle strutture dendritiche.

A differenza di altre strutture cerebrali allo striato non è mai stata associata una evidente

organizzazione spaziale, in quanto la popolazione cellulare al suo interno sembra distribuirsi in maniera piuttosto casuale. Tale idea si è rivelata progressivamente non veritiera in quanto si è trovata, soprattutto nei primati, una compartimentazione della popolazione striatale, in cui una parte di neuroni sono raggruppati in zone ad alta densità (striosomi) separate da aree con un più basso numero di cellule (matrice). Questa compartimentazione detta a mosaico, risulta essere molto importante soprattutto alla luce del fatto che alcune afferenze, in particolare quelle corticali, proiettano preferenzialmente agli striosomi mentre altre preferenzialmente alla matrice (Eblen e Graybiel 1995). Inoltre anche gli output efferenti dallo striato verso la sostanza nera sembrano rispettare questa suddivisione. I neuroni degli striosomi proiettano principalmente alla sostanza nera compatta, mentre i neuroni della matrice proiettano verso la sostanza nera reticolata (Gerfen 1985). Ne risulta dunque che almeno parzialmente le fibre che dallo striato proiettano verso strutture esterne ai gangli della base siano separate in due distinte vie di trasmissione. Le cellule appartenenti agli striosomi piuttosto che alla matrice possono essere riconosciute anche grazie a differenti marcatori biochimici come ad esempio il  $\mu$ -opiate che è espresso ad alte concentrazioni solo sui neuroni degli striosomi.

La compartimentazione a mosaico striatale non è in relazione alcuna con la distinzione fra via diretta e via indiretta in quanto sovrapposte l'una con l'altra. Sia gli striosomi che la matrice contengono infatti sia neuroni della via diretta sia di quella indiretta, anche se i neuroni spinosi della matrice e degli striosomi non sono connessi tra di loro tramite collaterali assoniche.



**Fig 3**

Rappresentazione schematica delle afferenze all'interno della popolazione cellulare dello striato. Sono mostrate: le connessioni eccitatorie dalla corteccia dal talamo e dall'amigdala (rosso). Le connessioni dopaminergiche (giallo) e il circuito intrinseco GABAergico (nero). Si nota la segregazione della via diretta e indiretta all'interno delle efferenze dei MSNs (blu)

## GABA

L'acido  $\gamma$ -amminobutirico (GABA) rappresenta il neurotrasmettitore inibitorio maggiormente diffuso all'interno del sistema nervoso centrale (SNC). Si tratta di un neurotrasmettitore amminoaacidico la cui formula chimica è  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ . Unico fra tutti i neurotrasmettitori il GABA è una zwitterione\* (punto isoelettrico 7.3). La sua presenza nel cervello è stata per la prima volta riscontrata soltanto a partire dal 1950. Il GABA si forma a partire dalla decarbossilazione dell'acido glutammico. Tale reazione è catalizzata dalla L-

\* Molecola elettricamente neutra nella sua totalità ma che presenta sia una carica formale positiva sia una carica formale negativa su due diversi atomi che la compongono.



glutamic acid decarboxylase (GAD) un enzima ampiamente presente all'interno del SNC ma che assieme al GABA è stato anche riscontrato in tessuti quali intestino, pancreas o in fluidi corporei. La degradazione del GABA avviene invece per mezzo dell'enzima GABA- $\alpha$ -chetooglutaricotransaminasi (GABA-T) che deammina il GABA producendo semialdeide succinica. Il gruppo amminico incorporato dalla GABA-T viene trasferito ad una molecola di  $\alpha$ -chetoglutarato formando così una nuova molecola di acido glutammico da cui sarà poi possibile generare nuovamente il neurotrasmettitore. La distribuzione del GABA è come detto ampia all'interno del SNC ma non omogenea. Le massime concentrazioni si riscontrano infatti nella sostanza nera, nel *globus pallidus*, nel cervelletto e nell'ippocampo. La sua funzione di neurotrasmettitore si esplica principalmente aumentando la permeabilità delle membrana cellulare a particolari ioni ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ) in modo da bilanciare eventuali depolarizzazioni della membrana stessa. Sostanzialmente il GABA facilita il ritorno al potenziale di riposo di membrane cellulari depolarizzante, e stabilizza le membrane cellulari non depolarizzante diminuendone la sensibilità alla stimolazione. Tuttavia, in particolari condizioni cellulari in cui i livelli di cloro intracellulare sono particolarmente elevati (es. neuroni immaturi dello strato granulare dell'ippocampo) il GABA esercita una funzione eccitatoria, inducendo una diminuzione del potenziale di membrana.

L'azione di neurotrasmettitore del GABA si esplica tramite l'attivazione di tre distinti tipi di recettore denominati GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub>, GABA<sub>C</sub>. I recettori GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>C</sub> sono di tipo ionotropico (ligand-gate) mentre il recettore GABA<sub>B</sub> è di tipo metabotropico (G-protein coupled). Questi tre recettori sono tra loro distinti sia dal punto di vista strutturale, farmacologico e funzionale.

## **Recettori GABAergici**

Il recettore GABA<sub>A</sub> è un recettore transmembrana a struttura pentamerica. Appartiene alla super famiglia dei recettori *Cys-Loop* di cui fanno parte anche i recettori nicotinici per l'acetilcolina, i recettori della glicina e il recettore serotonergico 5HT<sub>3</sub>. Le 5 distinte sub-unità del recettore si assemblano assieme attorno ad un poro centrale adibito al transito dello ione  $\text{Cl}^-$ . Esistono molteplici e distinte sub-unità e in particolare sono state identificate almeno 6 distinte isoforme di sub-unità  $\alpha$  ( $\alpha 1$ - $\alpha 6$ ), tre isoforme della sub-unità  $\beta$  ( $\beta 1$ - $\beta 3$ ), tre della sub-unità  $\gamma$  ( $\gamma 1$ - $\gamma 3$ ) e una per la subunità  $\delta$ . Tutte queste sub-unità possono combinarsi in differenti modi ma

la combinazione maggiormente presente è quella contenete 2 sub-unità  $\alpha$ ,  $2\beta$  e  $1\gamma$ . Tuttavia la molteplicità di combinazioni possibili suggerisce un ampio spettro di funzioni per questo tipo di recettore in diverse zone del sistema nervoso centrale. Il recettore GABA<sub>A</sub> è permeabile esclusivamente allo ione  $\text{Cl}^-$  che fluisce attraverso esso spinto da un gradiente elettrochimico. Essendo l'equilibrio del cloro (mediamente -70mV) generalmente vicino o più negativo rispetto al potenziale di membrana della maggior parte dei neuroni del SNC l'attivazione del recettore GABA<sub>A</sub> tende a stabilizzare o iperpolarizzare il potenziale di membrana avvicinandolo appunto a quello del  $\text{Cl}^-$ . L'attivazione del recettore avviene tramite il legame di due molecole di GABA. Il punto di legame è localizzato alla intersezione tra la sub-unità  $\alpha$  e  $\beta$ .

I recettori GABA<sub>A</sub> possono presentare vari siti di legame per diverse sostanze che ne modulano l'attività. Recettori contenenti le sia sub-unità  $\alpha$  sia  $\gamma$  presentano all'intersezione tra queste due parti il sito di legame per le benzodiazepine ed altre molecole benzodiazepino-mimetiche. Il legame delle benzodiazepine causa una modificazione conformazionale del recettore che ne aumenta l'affinità per il GABA generando così una aumentata probabilità di apertura e un conseguente aumento del flusso di ioni cloro. Il sito per le benzodiazepine è riconosciuto anche da molecole ad azione agonista inversa ( $\beta$ -carboline), molecole cioè capaci di ridurre l'affinità del recettore per il GABA. Ne risulta pertanto che la stimolazione di questo sito può generare effetti anche diametralmente opposti, (ansiolitici, convulsionanti, ansiogeni, ipnogeni) a secondo del tipo di sostanza che agisce.

All'interno del canale per il cloro è inoltre presente il sito di legame per i barbiturici. Tale posizione rende possibile l'attivazione del recettore e conseguente afflusso di ioni  $\text{Cl}^-$ , indipendentemente dalla presenza delle 2 molecole di GABA.

I recettori GABA<sub>B</sub> sono recettori metabotropici, costituiti da 7 domini transmembrana, accoppiati alle proteine Gi e Go. Queste ultime a seguito della stimolazione recettoriale da parte del GABA agiscono, inibendo, sull'adenilato ciclasi con conseguente riduzione dei livelli intracellulari di cAMP. Di seguito si ha quindi una riduzione delle conduttanza dei canali del calcio voltaggio dipendenti VDCCs. La stimolazione dei recettori GABA<sub>B</sub> porta inoltre ad una apertura dei canali del potassio con conseguente iperpolarizzazione della cellula e inibizione dell'attività di firing.

Per la corretta funzionalità del recettore GABA<sub>B</sub> è in realtà necessaria l'interazione di due distinti sottotipi recettoriali chiamati GABA<sub>B</sub>(1) e GABA<sub>B</sub>(2), che costituiscono un eterodimero funzionale. Il sito di legame per il GABA è posizionato sulla sub-unità GABA<sub>B</sub>(1) il sito di

interazione per le proteine G e localizzato sulla sub-unità GABAb(2). A differenza dei recettori GABAa, i GABAb sono insensibili alla bicucullina, alla benzodiazepine e ai barbiturici.

Il recettore GABAc è tra tutti il meno studiato e il meno conosciuto. Così come il GABAa è un recettore di tipo ionotropico *ligand-gated*. E' espresso largamente all'interno del SNC ma si incontra ad alti livelli soprattutto nella retina. E' permeabile agli ioni Cl<sup>-</sup> determinando quindi una iperpolarizzazione con inibizione cellulare. La corrente ionica innescata dal GABAc insorge piuttosto lentamente (time constant ~ 10 sec) soprattutto se paragonata a quella mediata dal GABAa, ma rispetto a quest'ultimo risulta essere di durata nettamente maggiore. Il GABAc è inoltre almeno 10 volte più sensibile all GABA rispetto al recettore GABAa. E' costituito dalla oligomerizzazione di 5 subunità di tipo  $\delta$ , assemblate a formare un poro centrale permeabile allo ione. Ad oggi sono state clonate tre distinte subunità  $\delta$  il cui diverso reciproco assemblaggio genera vari tipi di recettore GABAc. Il GABAc non è sensibile alla bicucullina né al Baclofen (potente attivatore del recettore GABAb), così come non è modulato da benzodiazepine barbiturici o neurosteroidi. Come il GABAa anche il GABAc è inibito dalla picrotossina.

## Circuito GABAergico Striatale: caratteristiche e funzioni

Lo striato è composto in larga misura da neuroni di tipo GABAergico che danno vita ad un'intensa innervazione intrinseca di tipo inibitorio. Questa innervazione origina da due distinti pathway denominati, *feedforward* (FfI) e *feedback inhibition* (FbI). La FfI trae origine dagli interneuroni GABAergici striatali (FS, LTS) (pag 11) mentre la FbI è mediata dagli MSNs stessi tramite le loro collaterali assoniche. Queste due forme di inibizione hanno diversa intensità e si ritiene abbiano differenti effetti funzionali nell'inibire i MSNs.

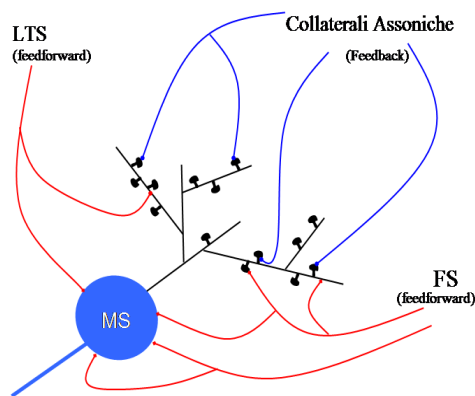


Fig 4

Rappresentazione schematica del circuito GABAergico striatale. I MSNs ricevono afferenze inibitorie sia dalle collaterali assoniche di altri neuroni spinosi, sia dalle due principali classi di interneuroni: FS e LTS. Si nota come le collaterali sinaptino principalmente a livello dendritico mentre gli interneuroni FS soprattutto a livello somatico

Gli interneuroni GABAergici sono costituiti da almeno due distinte classi cellulari (FS , LTS) e nonostante il loro esiguo numero rappresentano un'importante attività modulatoria sugli MSNs. La classe di interneuroni meglio conosciuta è sicuramente quella degli FS. (par XX) che costituiscono la componente maggiore della *feedback inhibition*. In esperimenti condotti su fettine di cervello di ratti adulti, è stato calcolato che ogni singolo FS contatta sinapticamente almeno il 25% dei neuroni MSNs presenti in un raggio di  $\sim 250\mu\text{m}$ . Esperimenti di *paired-recording* fra un FS e un neurone principale limitrofo hanno dimostrato inoltre come l'inibizione indotta sia mediata prettamente dal recettore GABA<sub>A</sub> con un marcato grado di efficacia. Tali connessioni sono inoltre sempre unidirezionali, ovvero dirette dall'FS al MSNs e mai il contrario. (Koos e Tepper 1999). La *feedforward inhibition* risulta dunque essere estremamente potente in quanto un singolo potenziale di azione prodotto dall'FS è in grado di inibire l'attività di firing di uno o più spinosi (Koos e Tepper 1999). L'innervazione proveniente dall'FS è inoltre limitatamente convergente. Ciò significa che ogni MSNs riceve un elevato numero di sinapsi dagli FS (142-568 sinapsi per ogni MSNs), ma che ogni singolo interneurone contatta con un basso numero di neuroni principali (1-4 sinapsi per ogni FS). Gli FS inoltre rispondono rapidamente agli input eccitatori che arrivano allo striato. La loro repentina attivazione porta ad un altrettanto rapida e massiccia inibizione sugli spinosi prima che questi possano essere a loro volta eccitati dallo stesso input che ha stimolato gli FS (Gustafson et al., 2005). Gli interneuroni FS possiedono inoltre delle *gap-junction* a livello delle terminazioni dendritiche. Koos e Tepper (1999) hanno dimostrato come circa il 42% degli FS fossero accoppiati elettrotonicamente. Nonostante sia piuttosto debole tale connessione è in grado di sincronizzare i potenziali di azione generati da una depolarizzazione fra due FS limitrofi. Ne segue che tali cellule possono agire come un ampio network inibitorio in grado di modulare con efficacia e precisione l'attività di un vasto numero di MSNs. Gli interneuroni SOM oltresì detti LTS, benchè meno studiati (vedi pag 11), agiscono all'interno della *feedforward inhibition* in maniera del tutto analoga agli FS per ciò che riguarda l'intensità di inibizione, ma presentano una efficacia inferiore a quella se paragonata a quella degli FS (Koos e Tepper 1999). La classificazione di tali cellule è però ancora oggetto di studio e risulta pertanto difficile individuare un loro preciso ruolo all'interno del circuito GABAergico striatale. La *feedback inhibition* come detto è mediata dalle collaterali assoniche degli MSNs stessi. Tale tipo di innervazione è molto ampia dal punto di vista prettamente anatomico ma più debole funzionalmente rispetto a quella mediata dagli interneuroni. Esperimenti di *paired recording* hanno dimostrato come l'attività di *feedback inhibition* presenti un basso grado di efficacia (circa il 20% ) ma è generata da un elevatissimo numero di

connessioni. L'albero dendritico di ogni singolo MSNs si dirama per uno spazio all'interno del quale sono potenzialmente presenti circa 2850 altri spinosi. Considerando che come detto il grado di efficacia delle sinapsi fra due MSNs si aggira attorno al 20%, ogni neurone potrebbe ricevere connessioni da almeno altri 400 MSNs (Tepper et al., 2004). Per spiegare in parte la differenza di intensità fra *feedback* e *feedforward inhibition* registrata nei vari esperimenti di *paired recording* occorre considerare la distinta localizzazione delle sinapsi facenti capo a l'una o all'altra via. Le collaterali assoniche infatti sinaptano principalmente al livello delle spine dendritiche (88%), mentre solo il 12 % di esse è localizzato a livello del soma. Opposta è la situazione per quel che riguarda gli interneuroni.. Gli FS infatti formano una avvolgente rete sinaptica attorno al soma dei MSNs, ed è stato stimato che circa il 20% delle sinapsi dirette verso gli MSNs siano a livello somatico. Anche gli LTS presentano questo tipo di organizzazione, anche se con percentuali inferiori a quelle degli FS. Circa il 14% infatti delle loro sinapsi sugli MSNs si trovano sul soma cellulare. Essendo dunque gli esperimenti classici di elettrofisiologia prodotti tramite registrazioni di correnti somatiche, risulta chiaro come la *feedback inhibition* sia intrinsecamente più difficile da misurare e confrontare. E' stato tuttavia proposto che l'inibizione delle collaterali assoniche abbia un importante ruolo nell'attività dei MSNs proprio in virtù della loro efficacia prettamente dendritica. (Tepper et al., 2004). I potenziali sinaptici generati dalla *feedback inhibition* infatti potrebbero efficacemente inibire le correnti dendritiche indotte dalle fibre corticali o talamiche presenti nello spazio circostante. Potrebbero inoltre agire bloccando le correnti  $Ca^{2+}$  implicate in fenomeni di plasticità sinaptica NMDA mediata (Calabresi et al 2000) o agire modulando le conduttanze potassiche (inwardly rectifying) responsabili del mantenimento del cosiddetto *down-state* di iperpolarizzazione.

## Dopamina e recettori dopaminergici

La dopamina (DA) ( $\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ ) è un neurotrasmettitore appartenente alla famiglia delle catecolamine che costituisce inoltre un precursore nella biosintesi di altre molecole quali la noradrenalina e l'adrenalina. DA è sintetizzata a partire da un precursore aminiacidico (L-tyrosine) che viene incamerato all'interno dei neuroni dopaminergici dopo aver oltrepassato la barriera emato-encefalica. Tramite l'enzima *L-tyrosine hydroxylase* l'*L-tyrosine* viene convertita in *L-dihydroxyphenylalanine* (L-DOPA). Quest'ultima viene poi decarbossilata a formare dopamina tramite la *L-aromatic aminoacid decarboxylase*. L'innervazione dopaminergica del SNC dei mammiferi è costituita da un piccolo numero di neuroni (~15.000-20.000 per ciascun emisfero) altamente collaterizzati raccolti nel mesencefalo ventrale a formare due principali strutture: la sostanza nera (SN) e l'area segmentale ventrale (VTA). Tali neuroni svolgono un'ampia e differenziata serie di funzioni all'interno del SNC a cui possono essere ricondotti la modulazione dell'attività motoria, i fenomeni di apprendimento (motivazione e reward learning), la working memory, l'attenzione, l'umore etc. I recettori specifici per la dopamina sono tutti di tipo metabotropico accoppiati ad una proteina G. La loro attivazione pertanto non produce evidenti fenomeni elettrofisiologici quali depolarizzazioni o iperpolarizzazioni di membrana, ma si esplica piuttosto tramite un'attività modulatoria delle proprietà cellulari innescata da meccanismi intracellulari.

Sono stati caratterizzati 5 distinti recettori di membrana per la dopamina raggruppabili in due classi principali: D1-like e D2-like. La distinzione tra questi due gruppi si basa sulla diversa proteina G a cui i recettori sono accoppiati e in virtù della maggiore o minore lunghezza della coda carbossilica presente nel recettore. In particolare il gruppo D1 like è costituito da due classi di recettori: D1 e D5. Sono accoppiati alle proteine Gs, Gq o G-Olf e presentano una più lunga coda carbossilica. Il gruppo D2-like comprende i recettori D2, D3 e D4, accoppiati alla proteina Gi e con una coda carbossilica più corta. La proteina G accoppiata a tali recettori è costituita da tre sub-unità  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  e può presentarsi in uno stato attivato o inattivato. Quando è inattiva la sub-unità  $\alpha$  è legata al nucleotide GDP. La presenza del neurotrasmettitore provoca al recettore dei cambiamenti conformazionali che inducono la sub-unità  $\alpha$  a perdere il GDP legandosi al GTP. Tale scambio fa sì che la sub-unità  $\alpha$  si dissocia dalle altre due sub-unità del recettore andando poi ad agire nei confronti dell'adenilato ciclasi, una proteina transmembrana che converte l'adenosina trifosfato (ATP) in adenosina 3,5monofosfato (cAMP). Il fattore determinante nella diversa funzionalità delle due classi di recettori dopaminergici è rappresentato dunque dall'enzima

adenilato ciclastasi e quindi dai livelli intracellulari di cAMP. I recettori D1-like fosforilando l'adenilato-ciclastasi stimolano la produzione di cAMP, mentre i D2-like inibendo tale enzima inducono un effetto opposto. Gli alti livelli di cAMP inducono tra l'altro la fosforilazione della proteina DARPP-32 con conseguente formazione di una proteina fosfatasi PP-1 in grado di agire potentemente su vari canali ionici voltaggio dipendenti quali  $\text{Na}^+$  o  $\text{Ca}^{2+}$ . Schematicamente è possibile dunque caratterizzare i recettori D1-like come prettamente eccitatori mentre i recettori D2-like come inibitori. Anche se sostanzialmente veritiera tale distinzione deve essere considerata come molto parziale soprattutto in relazione ai molteplici e ancora poco conosciuti meccanismi intracellulari innescati dalla dopamina.

### **Localizzazione ed effetto dei recettori dopaminergici in striato.**

Nonostante lo striato non presenti un'organizzazione spaziale regolare o segregata è possibile individuare una sorta di compartimentazione proprio studiando la localizzazione di diversi recettori dopaminergici sui MSNs (vedi pag 9). Infatti i neuroni che partecipano alla cosiddetta via diretta esprimono alti livelli del recettore D1 mentre quelli che fanno parte della via indiretta possiedono alti livelli del recettore D2. Benché affascinante questa segregazione si è dimostrata meno netta delle aspettative. Esiste infatti una non indifferente quota di MSNs (~ 20-25%) che coesprime entrambi questi recettori (Surmeier et al., 1996). Esperimenti di RT-PCR hanno inoltre dimostrato come recettori meno abbondanti quali il D3, D4 o D5 sono variamente espressi all'interno dei MSNs che coesprimono i recettori D1 e D2, rendendo problematica una chiara e sicura localizzazione dei recettori D1-like e D2-like. I recettori D4 e D5 sembrano essere i meno presenti in striato, mentre i recettori D3 sono espressi ad alti livelli in una popolazione di MSNs stimata intorno al 40% e che esprime contemporaneamente anche i recettori D1 e la sostanza P (Nicola et al., 2000). I recettori dopaminergici sono presenti anche nella popolazione di interneuroni striatali. Esperimenti di ibridazione in situ hanno mostrato come gli interneuroni colinergici esprimono il recettore D2 ma non il D1 (le Moine et al., 1990). Analisi di RT-PCR hanno inoltre mostrato come anche il D5 è espresso da queste ultime cellule. GABAergici. Studi di immunoistochimica ultrastrutturale hanno mostrato come ci sia una contemporanea localizzazione del recettore D2 e del neurotrasmettitore GABA sui terminali assonici, i dendriti e il soma sia dei MSNs che degli interneuroni GABAergici (DelleDonne et al., 2007). Soltanto il 20% degli FS esprimono l' mRNA per il recettore D2 (Lenz et al., 1994), ma pochi dati morfologici o immunohistologici sono fin'ora disponibili riguardo l'esatta localizzazione del recettore

D2 all'interno delle differenti classi di interneuroni GABAergici. Il recettore D2 è stato inoltre localizzato sul soma sui dendriti e sui terminali assonici degli interneuroni colinergici (Alcantara et al., 2003).

Una lunga serie di esperimenti sono stati realizzati nel corso degli anni per determinare le modalità di azione della dopamina in striato. È stato dimostrato ad esempio come nei neuroni spinosi striatali l'attivazione dei recettori D1-like, induca la diminuzione dell'eccitabilità cellulare tramite l'inibizione dei canali del  $\text{Na}^+$  attraverso un meccanismo che coinvolge le protein-kinasi A e la DARPP-32. (Calabresi et al. 1987, Schiffmann et al., 1995). La stimolazione D1 inoltre diminuisce le correnti del potassio a lenta in attivazione tramite una fosforilazione dei canali stessi del potassio ad opera della protein-kinasi A (Surmeier e Kitai 1993, Dong et al 2003). Sempre nei neuroni spinosi agonisti D1-like o attivatori dell'cAMP, aumentano le correnti del  $\text{Ca}^{2+}$  mediate dal canale *L-type* (Song e Surmeier 1996) riducendo invece quelle di tipo *N* e *P/Q-type* (Surmeier et al., 1995). Gli effetti dell'attivazione del recettore D2-like sono ancora non del tutto definiti in virtù del fatto che sembrano coesistere effetti a volte contrapposti. I recettori D2-like possono modulare nei MSNs i canali del  $\text{Na}^+$  del  $\text{K}^+$  e del  $\text{Ca}^{2+}$ , ma tale effetto può variare da una cellula all'altra. Il D2-like può infatti sia aumentare che sopprimere le correnti del  $\text{Na}^+$  voltaggio dipendenti (Surmeier et al 1992). Nei MSNs il D2-like inoltre, aumenta le correnti potassiche mediate da depolarizzazione (Kitai e Surmeier 1992) e riduce presinapticamente l'ampiezza degli IPSCs evocati e la frequenza degli IPSC spontanei (Delgado et al., 2000). La dopamina modula attivamente anche gli interneuroni colinergici. Tramite il recettore D2 infatti, facilita il rilascio dell'acetilcolina, agendo a livello dei canali del calcio voltaggio dipendenti (Yan e Surmeier 1996). Sempre negli interneuroni colinergici, e agendo sui canali presinaptici del  $\text{Ca}^{2+}$  N-type la dopamina riduce l'ampiezza degli IPSC evocati, e la frequenza dei minisIPSCs. L'attivazione del recettore D1 depolarizza gli interneuroni Fast Spiking mentre il recettore D2 induce in queste stesse cellule una riduzione dell'ampiezza degli IPSCs evocati (Bracci et al., 2002)



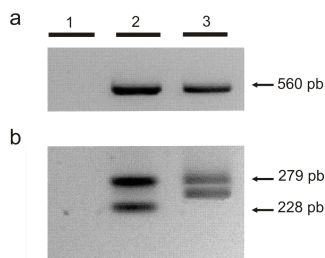
Parte Seconda

Risultati Sperimentali

## Materiali e procedure sperimentali.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in osservanza alle linee guida della Comunità europea (86/609/EEC) e approvate dall'Università di "Tor Vergata" (n. 153/2001A). I topi utilizzati per gli esperimenti facevano parte di una colonia animale ottenuta a partire da progenitori forniti dalla prof Nutan Sharma dell'università di Harvard. In particolare sono stati utilizzati i topi denominati hMT che sovraesprimono la proteina umana mutata TorsinA e i topi detti hWT che esprimono la proteina umana TorsinA non mutata. Sono stati considerati come topi di controllo gli animali *littermates* dei topi hMT che esprimevano la normale proteina murina TorsinA. Una costante progenie di animali hMT e hWT veniva mantenuta attraverso l'accoppiamento di questi ultimi animali con topi del ceppo C57/BL6 forniti dalla compagnia Charles River. La percentuale di animali che presentavano la mutazione genica DYT1 risultava essere nell'ordine del 30-40% per ogni singola nidiata ottenuta. La genotipizzazione degli animali è stata realizzata nel mio stesso laboratorio con le seguenti modalità sperimentali.

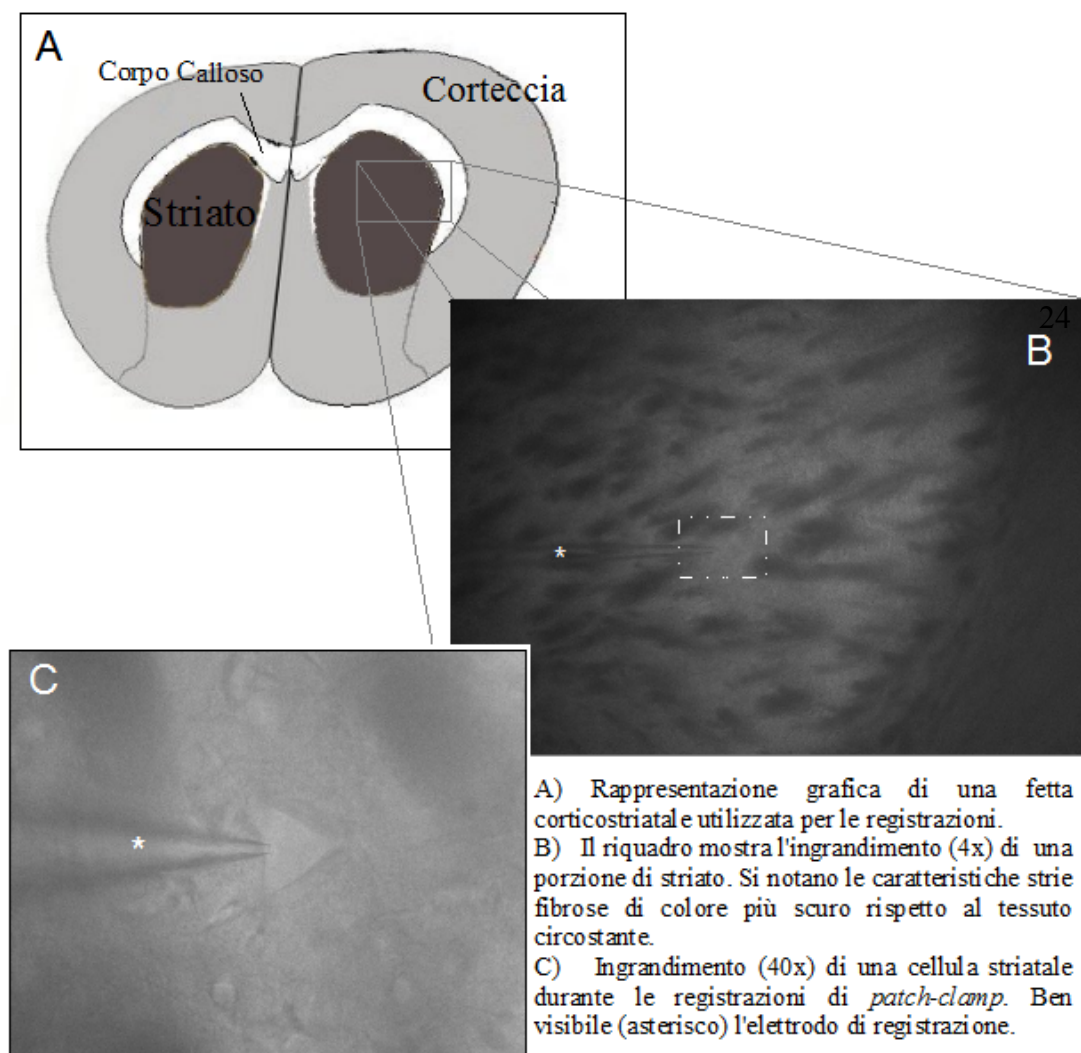
L'estrazione e l'amplificazione del DNA genomico è stata realizzata su piccole estremità di coda di ogni topo nato dall'accoppiamento di progenitori hMT e hWT. E' stato utilizzato il kit di estrazione EXTRACT-N-Amp<sup>TM</sup> Tissue PCR Kit (Sigma # XNAT2). La genotipizzazione avveniva dopo il compimento del 18mo giorno di età. I due primers utilizzati per l'individuazione del genotipo mutato (hMT) e wild-type (hWT) presentavano la sequenza: 5'CACATTGCACTTTCCACATGCT -3', 5'- GTTTTGCAGCCTTTATCTGA-3', e il processo di individuazione comprendeva una amplificazione di un frammento di 560bp attraverso 35 cicli, temperatura di annealing di 60 °). I prodotti ottenuti dalla PCR sono stati separati su un gel di agarosio (1,5%) contenente SYBR Safe (Invitrogen). La conferma finale della genotipizzazione è stata ottenuta eseguendo sui prodotti di PCR una digestione con BseRI (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA). Frammenti di lunghezza di 279 bp, 238bp, 24bp, e 22bp sono caratteristici per hWT; frammenti di lunghezza di 279bp, 259bp e 22bp caratteristici per hMT; i frammenti sono identificati su un gel di agarosio al 2% contenente SYBR Safe (Invitrogen) (Zhao et al. 2008).



**Fig 3 L'immagine mostra il risultato di esperimenti di PCR per la verifica del genotipo di animali hWT e hMT.**

(A)Prodotti di PCR ottenuti tramite elettroforesi su gel. La banda 1 rappresenta l'assenza di gene mutato. La banda 2 e 3 rappresentano rispettivamente il gene mutato(hMT) e quello umano non mutato (hWT)

(B)Frammenti di restrizione ottenuti tramite elettroforesi in gel



**Fig 6**

Sono stati utilizzati per gli esperimenti solo animali che avessero raggiunto la maturità fisica, che nei topi si colloca al secondo mese di età. I topi sono stati sacrificati tramite dislocazione cervicale in condizioni di anestesia indotta da etere e il cervello immediatamente rimosso dal cranio. Tramite l'utilizzo di un vibratomo sono state ricavate fette di tessuto cortico-striatale (sezione coronale, fig6) dello spessore di 200 $\mu$  m costantemente mantenute in una soluzione salina contenente: 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.3 MgCl<sub>2</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.4 CaCl<sub>2</sub>, 10 glucose, 18 NaHCO<sub>3</sub> (soluzione Krebs) ossigenata con una miscela di O<sub>2</sub> (95%) e CO<sub>2</sub> (5%). Dopo circa 30-60 minuti una singola fetta veniva trasferita su di una piastra di registrazione (0.5-1 ml di volume), continuamente perfusa tramite soluzione Krebs con un flusso di ricircolo di circa 2.5-

3ml/min ad una temperatura di 32°C . La piastra di registrazione era agganciata ad un microscopio (BX51WI, Olympus) equipaggiato con un obiettivo ad immersione (40x, 0.95 n.a.;XLUMPlan,Olympus)

Tutti gli esperimenti sono stati prodotti utilizzando la tecnica di *Patch-Clamp* in configurazione whole-cell (modalità *current* e *voltage-clamp*). Ogni singola cellula veniva visualizzata tramite apparecchiatura di videomicroscopia ottica basata su un sistema di *Infrared differential interference contrast* (IR-DIC). Tutte le registrazioni sono state ottenute tramite un amplificatore Multiclamp 700b (Axon Instruments, Foster City CA) e utilizzando capillari di vetro-borosilicato (diametro esterno 1.5 mm, diametro interno 0.86 mm) prodotti tramite un Puller P-97 (Sutter Instruments). La resistenza elettrica dei capillari era mediamente di 3.5 MΩ . Le proprietà elettriche di membrana (*input resistance*, *access resistance*, capacità di membrana) venivano continuamente monitorate per tutta la durata degli esperimenti tramite un sistema *on-line* di verifica.

Per le registrazioni delle *spontaneous excitatory postsynaptic currents* (sEPSCs), i capillari venivano riempiti con una soluzione interna contenente (in mM) : K<sup>+</sup>-gluconate (125), NaCl (10), CaCl<sub>2</sub> (1.0), MgCl<sub>2</sub> (2.0), 1,2-bis (2-aminophenoxy) ethane-N,N,N,N-tetra-acetic acid (BAPTA) (1), Hepes (10), GTP (0.3) M<sub>g</sub>-ATP (2.0); con pH stabilizzato a 7.3 con l'aggiunta di KOH (~ 10μ L). Bicucullina (10μ M) veniva aggiunta alla soluzione di perfusione al fine di bloccare la trasmissione sinaptica mediata dal recettore GABA<sub>A</sub>. Le cellule venivano mantenute ad un potenziale (holding potential, HP) di -80mV. Spontaneous (sIPSCs) e miniature (mIPSCs) *inhibitory postsynaptic currents*, mediate dal recettore GABA<sub>A</sub> sono state registrate utilizzando capillari contenenti (in mM): CsCl (110), K<sup>+</sup>-gluconate (30), EGTA (1.1), Hepes (10), CaCl<sub>2</sub> (0.1), Mg-ATP (2.0), GTP (0.3). I neuroni venivano mantenuti ad un potenziale di holding di -75 mV. MK-801 (30uM) e CNQX (10uM) venivano aggiunti alla soluzione di perfusione per bloccare la trasmissione glutamatergica mediata da recettori AMPA e NMDA. *Tetrodotoxin* (1uM) veniva invece aggiunta per lo studio dei mIPSCs. Le cellule venivano mantenute ad un potenziale di -75mV. In tali condizioni sperimentali, e in base al potenziale di equilibrio degli ioni del Cloro, gli eventi sinaptici registrati apparivano come correnti ioniche procedenti dall'esterno verso l'interno della cellula (inward current) Gli esperimenti riguardanti la *evoked GABA<sub>A</sub>-mediated synaptic currents* (eIPSCs) venivano realizzati tramite stimolazione intrastriatale utilizzando un elettrodo bipolare. La distanza massima tra l'elettrodo e il soma della cellula registrata non superava i 200μ m. La stimolazione applicata era compresa fra i 5-15 volt

per una durata a sua volta compresa fra 20 e 40  $\mu$ sec. La soluzione di perfusione per questo tipo di esperimenti conteneva MK-801 (30  $\mu$ M) and CNQX (10  $\mu$ M). La frequenza di stimolazione era mantenuta costante a 0.1 Hz. Le cellule venivano mantenute a 0mV e in tali condizioni, gli eIPSCs registrati si presentavano come correnti procedenti dall'interno verso l'esterno della cellula (outward current) (Centonze et al., 2003).

Tutti i dati sono stati acquisiti con il software pCLAMP 9.2 (Axon Instruments) e analizzati off-line tramite MiniAnalysis 5.1 (Synaptosoft, Leonia, New Jersey). Esclusivamente le cellule che mostravano cambi nella propria frequenza inferiori al 20% durante il campionamento di controllo venivano analizzati. Tutte le sostanze utilizzate sono state acquistate dalla Tocris Cokson (UK), ad eccezione del TTX fornito dalla Alomone Labs, Israel. Tutti i dati sono stati riportati come  $\pm$  SEM e la differenza statistica fra due gruppi è stata valutata utilizzando sia Student *t*-test (paired, unpaired) sia paired Wilcoxon's test. Confronti fra tre gruppi sono stati analizzati utilizzando la *one-way analysis of variance* (ANOVA) seguita da post-hoc Tukey's test ( $\alpha = 0.01$ ) (GraphPrism 3.02). Il livello di significatività era fissato a  $p < 0.05$ . Le differenze statistiche fra due distribuzioni cumulative sono state verificate tramite *Kolmogorof-Smirnoff test*. Per ogni animale utilizzato sono stati registrati da uno a sei neuroni. Ciascun risultato elettrofisiologico nei tre differenti gruppi è stato ottenuto raccogliendo dati da almeno sei distinti animali. Soltanto una cellula per ogni fetta è stata registrata in esperimenti che prevedevano l'utilizzo di Quinpirolo o TTX.

## Risultati

### Proprietà intrinseche di membrana dei sottotipi striatali neuronali

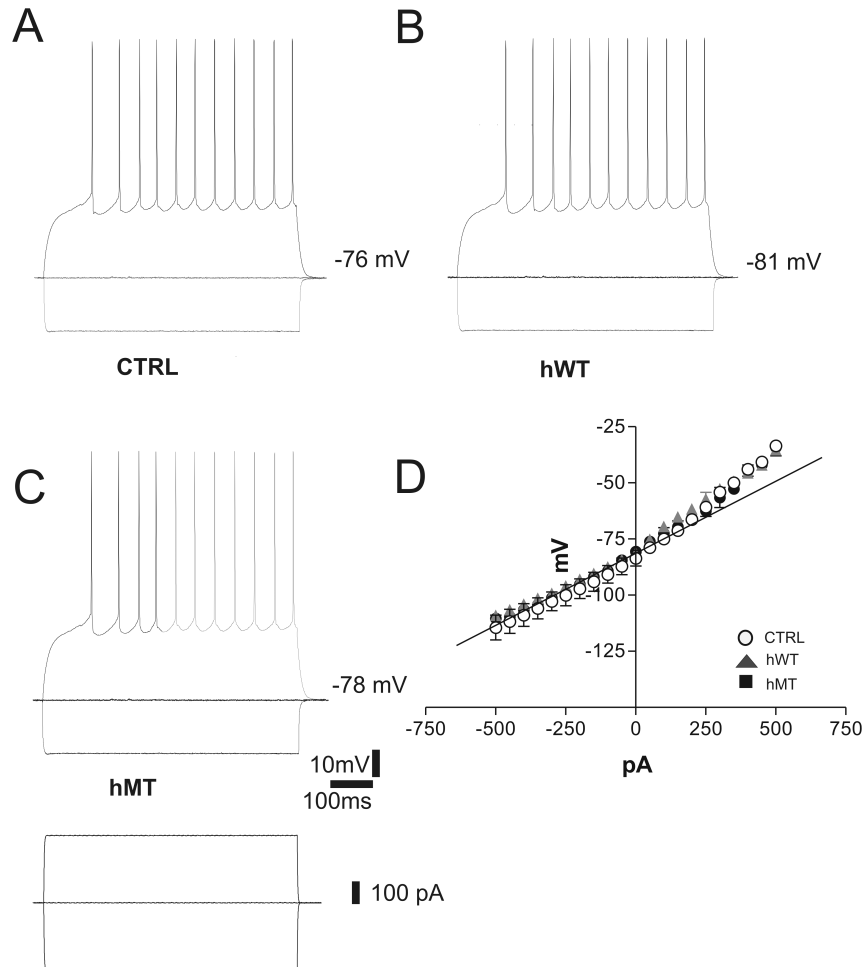
Registrazioni in *whole cell* sono state effettuate su MSNs striatali da topi non-trangenic (Ctrl) (n=81), hWT (n=76), hMT (N=88). Ogni neurone è stato classificato sulla base delle proprie caratteristiche elettrofisiologiche in accordo con criteri standard di caratterizzazione (Kita et al., 1984; Calabresi et al., 1990). MSNs appartenenti a ciascun gruppo erano silenti al proprio potenziale di membrana di riposo, e a seguito dell'induzione di gradini di corrente depolarizzante mostravano una tipica rettificazione della corrente di membrana e una scarica di potenziali di azione di tipo tonico (Fig 7). Il potenziale di membrana a riposo (RMP), l'ampiezza del potenziale di azione e la resistenza di membrana erano del tutto simili nei tre gruppi di animali (Fig. 7; Tab 1;  $p>0.05$ ) e non differivano da quelli precedentemente descritti riguardo ai MSN registrati da topo (Kitada et al., 2007; Centonze et al., 2003). La relazione corrente-voltaggio non ha mostrato significative differenze all'interno dei tre gruppi (Fig 7D;  $p>0.05$ ). Gli interneuroni GABAergici FS sono stati identificati sulla base delle loro peculiari proprietà di membrana che li distinguono chiaramente da tutte le altre classi neuronali presenti in striato (Kawaguchi et al., 1990) (Fig 8; Tab 1). In confronto ai MSNs, gli interneuroni FS possedevano un più depolarizzato RMP e valori maggiori di resistenza di membrana. Gli FS si presentavano inoltre silenti al potenziale di riposo e a seguito di una breve depolarizzazione mostravano un veloce potenziale di azione, (width at half amplitude  $<1\text{ms}$ ), caratterizzato da una precoce insorgenza e una profonda e veloce fase di ripolarizzazione. In risposta a gradini di corrente depolarizzante di lunga durata, gli interneuroni FS mostravano sia un breve *burst* di potenziali di azione sia una precoce spike seguita poi da *firing* tonico che non presentava fenomeni di accomodazione (Fig 8, Tab 1). Le proprietà di membrana degli FS di topi NTm (n=23) non differivano da quelle misurate nei topi hWT (n=12) e hMT (n=20);  $p>0.05$ ).

| MSN                                    | CTRL     | hWT      | hMT      |
|----------------------------------------|----------|----------|----------|
| Potenziale di membrana a riposo (mV)   | -77±1.7  | -76±1.4  | -76±2.5  |
| Input resistance (MΩ)                  | 80.7±4.5 | 83.1±3.9 | 81.4±6.3 |
| Tipo di Firing                         | Tonico   | Tonico   | Tonico   |
| Ampiezza del potenziale di azione (mV) | 73±3.4   | 77±2.2   | 70±3.6   |
| Width at half amplitude(ms)            | 1.48±0.1 | 1.33±0.1 | 1.45±0.2 |

| FS                                     | CTRL         | hWT          | hMT          |
|----------------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| Potenziale di membrana a riposo (mV)   | -67±5.1      | -71±3.4      | -70±0.6      |
| Input resistance (MΩ)                  | 83.8±10.8    | 86.7±11.9    | 84.8±8.8     |
| Tipo di Firing                         | Tonico/Burst | Tonico/Burst | Tonico/Burst |
| Ampiezza del potenziale di azione (mV) | 71±2.5       | 70±4.2       | 68±3.1       |
| Width at half amplitude(ms)            | 0.7±0.01     | 0.6±0.01     | 0.7±0.02     |

Tab 1. Proprietà intrinseche di membrana di MSNs e interneuroni FS

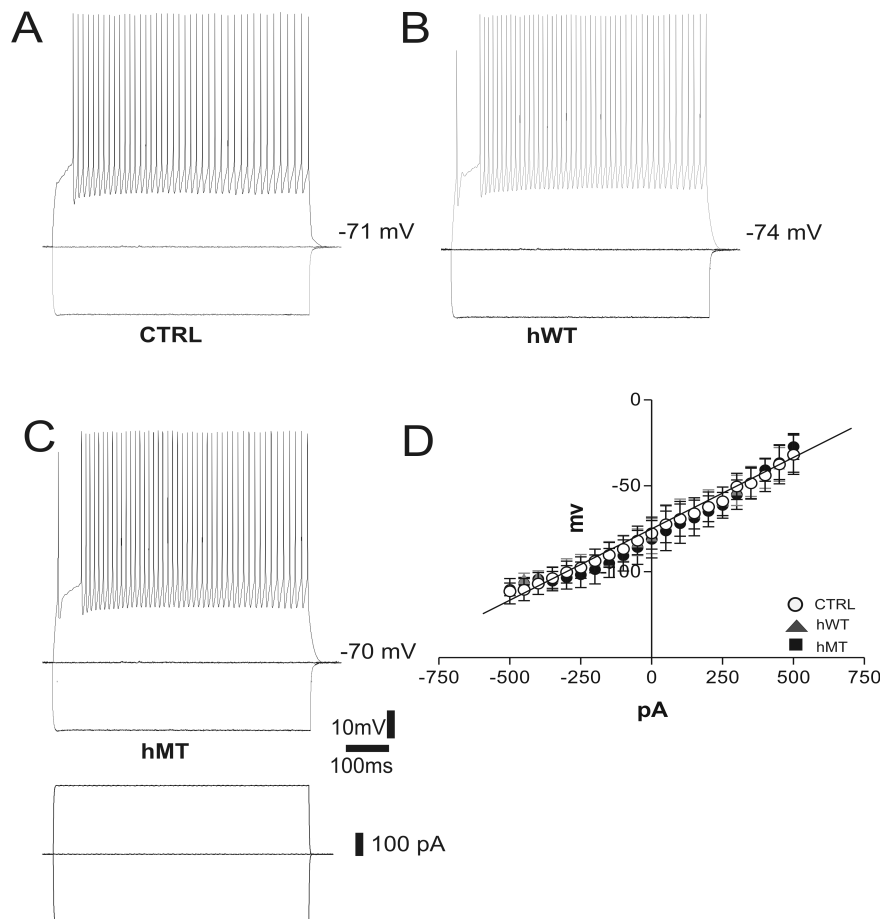


**Fig 7**

### **Caratterizzazione elettrofisiologica dei neuroni spinosi striatali MSNs**

Il pannello mostra registrazioni in modalità *current clamp* in risposta a step di corrente sia depolarizzante che iperpolarizzante (300 pA, 600 ms) ottenute da singoli neuroni di animali di Controllo (A), hWT (B) e hMT (C)

D) il grafico riporta la relazione corrente-voltage media di neuroni registrati da tutti e tre i gruppi di animali. Si nota il caratteristico effetto di rettificazione in risposta a step di corrente depolarizzante



**Fig 8**

### **Caratterizzazione elettrofisiologica di interneuroni fast-spiking (FS)**

Il pannello mostra registrazioni in modalità *current clamp* in risposta a step di corrente sia depolarizzante che iperpolarizzante (300pA, 600ms) ottenute da singoli interneuroni di animali di Controllo (A), hWT (B) e hMT(C). Si nota la tipica alta frequenza di firing associata ad una ampia e veloce fase di ripolarizzazione(AHP).

(D) il grafico riporta la relazione corrente-voltage media di interneuroni registrati da tutti e tre i gruppi di animali.

### **Attività spontanea sinaptica glutamatergica e GABAergica in neuroni spinosi striatali**

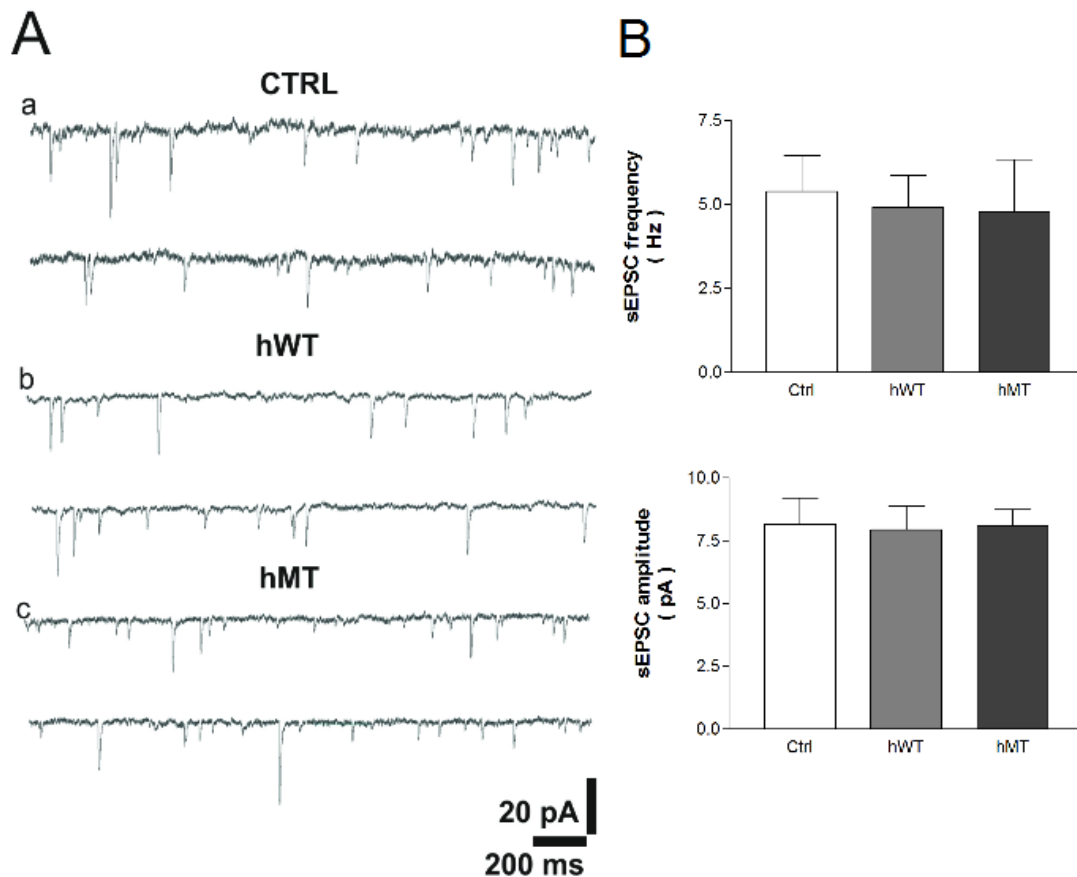
Gli MSNs striatali ricevono abbondante innervazione eccitatoria glutamatergica proveniente dalla corteccia e dal talamo. Per tale motivo in neuroni spinosi di topi Ctrl, abbiamo misurato gli sEPSCs, che sono considerati un efficace indicatore della attività corticostriatale. Gli MSNs erano mantenuti ad un potenziale di membrana di -80mV e gli sEPSCs sono stati registrati in



presenza di Bicucullina ( $10\mu\text{M}$ ), un antagonista del recettore GABA<sub>A</sub>, al fine di escludere contaminazioni dovute ad attività di tipo inibitorio. Per verificare che l'attività spontanea registrata fosse esclusivamente eccitatoria e quindi mediata da solo da recettori glutamatergici, in esperimenti di verifica, assieme alla bicucullina sono stati somministrati contemporaneamente degli antagonisti specifici per i recettori NMDA e AMPA (rispettivamente MK801  $30\mu\text{M}$  e CNQX  $10\mu\text{M}$ ). Questi ultimi eliminavano completamente l'attività sinaptica delle cellule ad ulteriore prova del fatto che il nostro protocollo sperimentale ci permetteva di registrare esclusivamente attività glutamatergica. La maggior parte degli EPSCs registrati dai Ctrl ( $n=11$ ) avevano un'ampiezza e una frequenza con valori medi compresi fra 5 e 40 pA, e tra 0.6 e 7 Hz. Tali valori non differivano significativamente da quelli ottenuti allo stesso modo per hWT ( $n=10$ ) e hMT ( $n=11$ ) (Fig 9,  $p>0.05$ ). Le proprietà cinetiche degli EPSCs come *Rise time*, *Decay Time* e *Half Width Amplitude* erano simili in tutti e tre i gruppi considerati.

In seguito come indicatore dell'attività sinaptica striatale di tipo GABAergico, abbiamo misurato le correnti sinaptiche GABAergiche (sIPSCs). Il protocollo sperimentale è stato in parte modificato al fine di avere una più efficace e consistente registrazione degli eventi sinaptici spontanei mediati dal GABA<sub>A</sub>. I capillari per le registrazioni sono stati infatti riempiti utilizzando una soluzione a base di cesio-cloride (CsCl), il potenziale di membrana delle cellule era mantenuto al valore di -75mV e alla normale soluzione di perfusione venivano aggiunti MK-801 ( $30\mu\text{M}$ ) e CNQX ( $10\mu\text{M}$ ). Anche in questo caso, l'evidenza che la somministrazione contemporanea di bicucullina e i bloccanti glutamatergici sopra riportati eliminasse completamente ogni attività sinaptica spontanea della cellula, garantiva chiaramente che l'attività GABAergica studiata non venisse contaminata da input sinaptici di diversa natura. L'ampiezza (7-40 pA) degli sIPSCs registrati da MSNs di topi di controllo ( $17\pm 2.2$   $n=15$ ), era simile a quella registrata in topi hWT ( $20.8\pm 3.2$   $n=10$ ) e hMT ( $21.3\pm 3$   $n=11$ ) (fig 10;  $p>0.05$ ). Nessuna differenza significativa all'interno dei tre gruppi ( $p>0.05$ ) è stata riscontrata per ciò che riguarda le proprietà cinetiche di membrana. Al contrario invece, la frequenza media degli sIPSCs era significativamente aumentata nei MSNs degli hMT ( $3.01\pm 0.5$  Hz), rispetto sia ai controlli ( $1.9\pm 0.2$  Hz) che agli hWT ( $2.2\pm 0.2$  Hz) (Fig 10  $p<0.05$ ). Tale dato suggeriva un evidente stato di aumentato input GABAergico verso gli MSNs. Per un'ulteriore analisi dell'attività sinaptica GABAergica, ho poi registrato i cosiddetti *miniature*-IPSCs (mIPSCs). Tali eventi sono stati indotti utilizzando TTX un potente bloccante dei canali del sodio voltaggio dipendenti, al fine di inibire la componente di GABA mediata da potenziali di azione. Tali eventi avvengono in maniera casuale e del tutto spontanea e costituiscono una sorta di rilascio basale del terminale

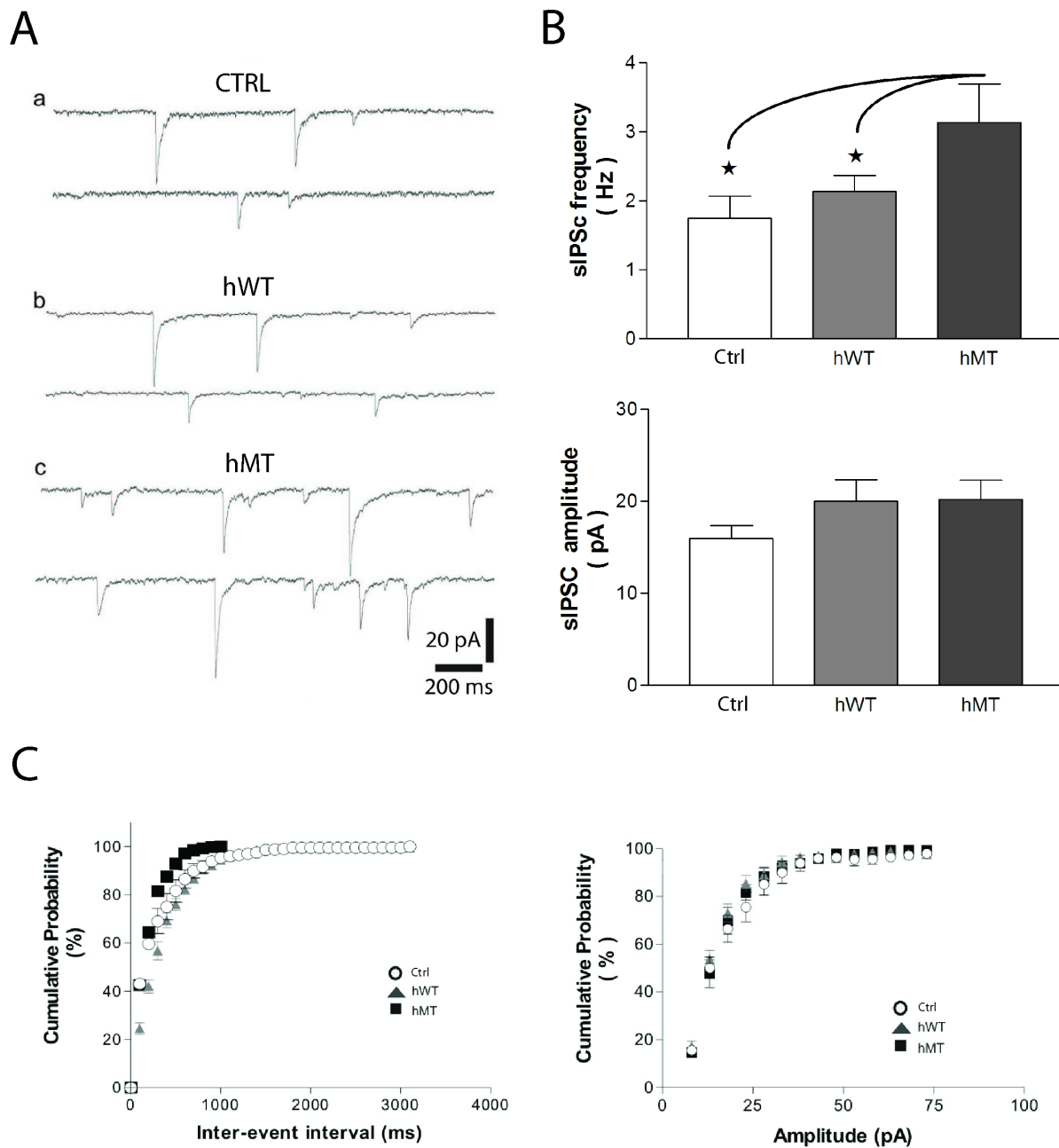
sinaptico. Coerentemente alle attese, il TTX produce una omogenea riduzione della frequenza ma non della ampiezza degli eventi sinaptici se confrontata con gli sIPSCs (72% del controllo,  $n=13$ ). Inoltre ho trovato un significativamente più alto valore di frequenza degli mIPSCs registrati da MSNs di hMT ( $1.7 \pm 0.3$  Hz  $n=11$ ) in confronto agli hWT ( $1 \pm 0.1$   $n=10$ ) e ai Ctrl ( $0.99 \pm 0.1$   $n=12$ ) (fig 11,  $p < 0.05$ ). Tale risultato suggerisce che l'incremento del rilascio sinaptico del GABA, è mediato almeno in parte da un meccanismo indipendente dai potenziali di azioni presinaptici.



**Fig 9 Attività glutamatergica eccitatoria (sEPSCs) in MSNs**

A) Taccie esemplificative degli sEPSCs registrati da MSNs in presenza di bicucullina (10  $\mu$ M) nella soluzione di perfusione di animali di controllo (a), hWT (b) e hMT (c).

B) I grafici mostrano la mancanza di variazioni significative fra i tre gruppi sia in termini di ampiezza sia di frequenza degli eventi registrati.

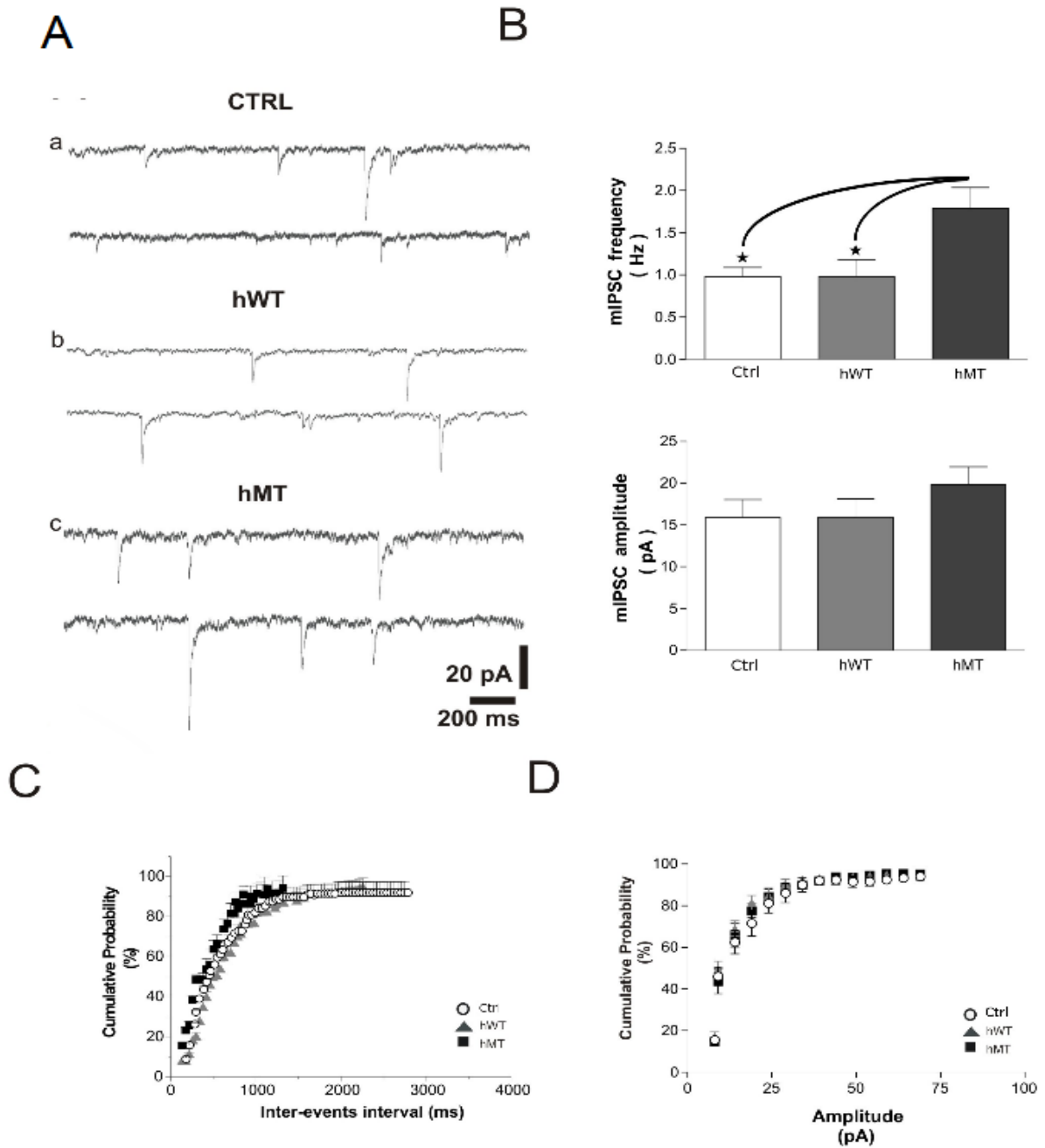


**Fig 10 Attività GABAergica inibitoria (sIPSCs) in MSNs**

(A) Taccie esemplificative degli sIPSCs registrati da MSNs in presenza di MK801(30 $\mu$ M) e CNQX (10 $\mu$ M) nella soluzione di perfusione di animali di controllo (a), hWT (b) e hMT (c).

(B) I grafici mostrano come ci sia una significativa aumentata attività GABAergica nei MSNs dei topi hMT rispetto sia ai controlli che agli hWT. Nessun cambiamento invece è presente riguardo l'ampiezza degli eventi registrati, suggerendo l'implicazione di meccanismi prettamente presinaptici.

(C) I cumulative-plot riportati confermano l'aumentata frequenza di attività GABAergica nei topi hMT senza nessun implicazione nell'ampiezza misurata degli eventi sinaptici ( $p < 0.05$  Kolmogorov-Smirnoff test)



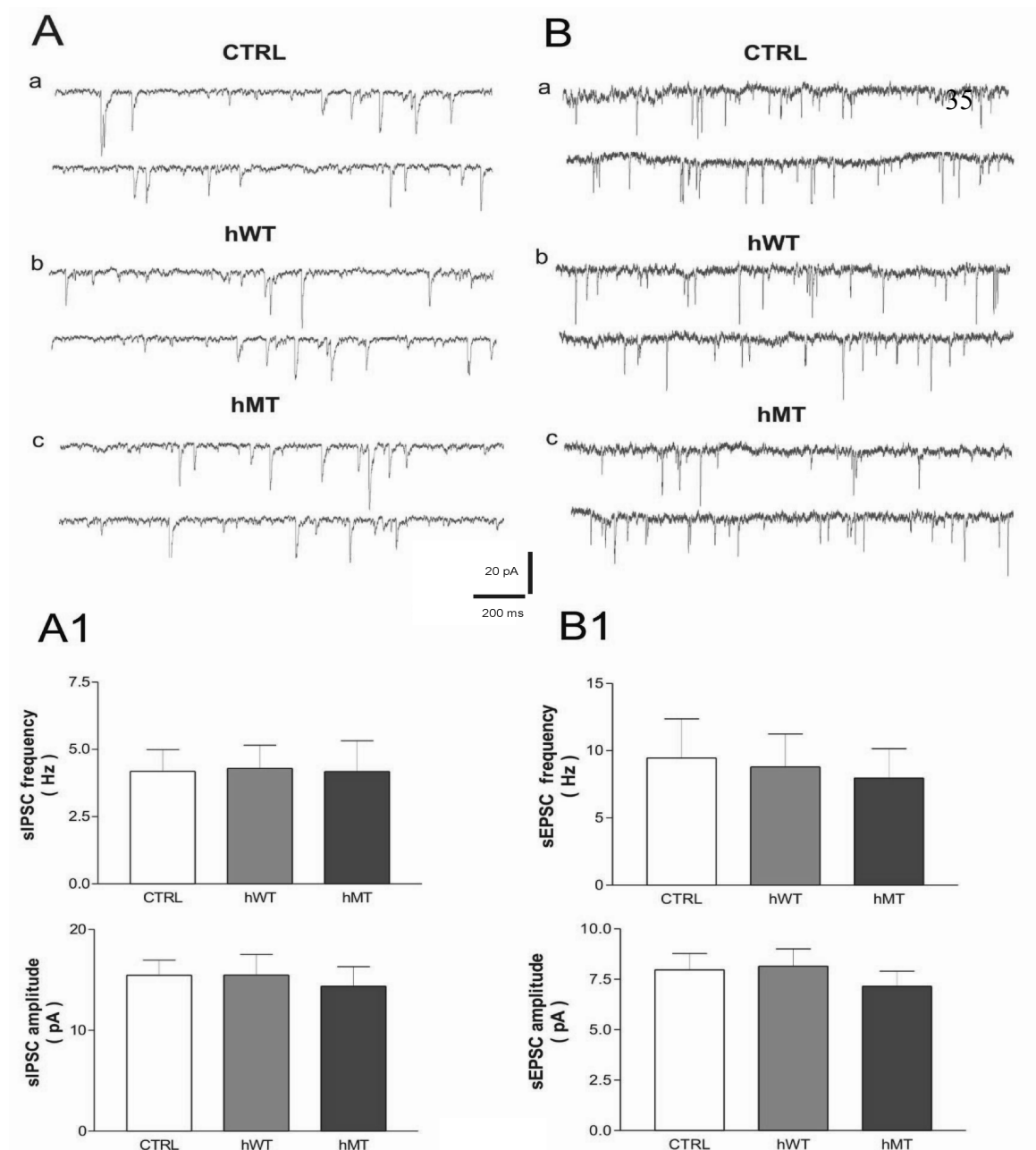
**Fig 11 Attività GABAergica inibitoria *TTX-insensitive* (mIPSCs) in MSNs**

(A) Taccie esemplificative degli mIPSCs registrati da MSNs di controllo (a), hWT (b) e hMT (c).in presenza di TTX (1 $\mu$ M), MK801(30 $\mu$ M) e CNQX (10 $\mu$ M) nella soluzione di perfusione. (B) I grafici mostrano il significativo aumento degli eventi mIPSCs nei MSNs dei topi hMT rispetto sia ai controlli che agli hWT. Nessun cambiamento invece è presente riguardo l'ampiezza degli eventi registrati. (C) I cumulative-plot riportati confermano l'aumentata frequenza di attività GABAergica nei topi hMT senza nessun implicazione nell'ampiezza degli eventi misurati.( $p < 0.05$  Kolmogorov-Smirnoff test)

## **Attività spontanea sinaptica glutamatergica e GABAergica in interneuroni GABAergici Fast Spiking.**

Gli interneuroni Fast Spiking costituiscono il più intenso input inibitorio diretto verso gli MSNs. Nonostante il loro esiguo numero all'interno dello striato (2-3%) rappresentano un importante network cellulare in grado di inibire efficacemente un ampio numero di neuroni principali (Koos e Tepper 1999, Tepper et al., 2004). Gli interneuroni FS ricevono inoltre una ricca innervazione eccitatoria dalla corteccia. Risulta quindi chiaro che il tentativo di trovare la causa dell'aumentato tono GABAergico riscontrato nei MSNs dei topi mutati dovesse necessariamente avere inizio dallo studio di tali interneuroni. A tal fine ho quindi esplorato la possibilità che gli interneuroni FS nei topi mutati presentassero un'alterata attività spontanea eccitatoria o inibitoria. Che mostrassero cioè di ricevere degli alterati livelli di input glutamatergico o GABAergico tali da giustificare l'aumentata attività GABA nei MSNs dei topi hMT come conseguenza di una loro anomala attività cellulare. Sono stati pertanto registrati sia sIPSCs sia sEPSCs da interneuroni fast spiking da animali di controllo, hWT e hMT.

Nessuna significativa differenza nei tre diversi gruppi di animali è stata riscontrata sia riguardo l'attività glutamatergica sia riguardo quella GABAergica (fig 12). Gli eventi sEPSCs nei tre gruppi testati mostravano una assoluta omogeneità nella frequenza e nell'ampiezza sia nei Ctrl ( $9.4 \pm 3$  Hz;  $8 \pm 0.8$  pA  $n=7$ ), nei hWT ( $8.2 \pm 0.9$  Hz;  $8.2 \pm 0.9$  pA  $n=6$ ), sia nei hMT ( $8.8 \pm 2.4$  Hz;  $7.1 \pm 0.8$  pA  $n=8$ ). Anche gli eventi sIPSC non mostravano significative disparità: Ctrl ( $4.2 \pm 0.8$  Hz,  $15.5 \pm 1.5$  pA,  $n=7$ ), hWT ( $4.3 \pm 0.9$  Hz;  $14.4 \pm 2$  pA), hMT ( $4.2 \pm 1.1$  Hz,  $15.5 \pm 2$  pA  $n=8$ ). Anche l'analisi delle proprietà cinetiche delle correnti sinaptiche spontanee non mostrava alcuna differenza significativa fra controlli, hWT e hMT. Questi dati dimostrano quindi come tali interneuroni non ricevano nei topi mutati degli input sinaptici alterati, e che quindi non presentano quella anomala attività cellulare in grado di poter provocare, di riflesso, un loro maggiore input GABAergico nei confronti degli MSNs. Gli FS tuttavia non sono gli unici interneuroni in grado di inibire potentemente i MSNs. Gli LTS rappresentano un altro importante drive inibitorio, ma il loro esiguo numero e la loro non ancora ben definita caratterizzazione non ha reso possibile un approfondito studio di tali cellule che rappresentano tuttavia un interessante spunto per ulteriori e futuri lavori.



**Fig 12**

**Attività glutamatergica eccitatoria (sEPSCs) e GABAergica inibitoria (sIPSCs) in interneuroni FS.**

(A) Taccie esemplificative degli sIPSCs registrati da FS di animali di controllo (a), hWT (b) e hMT (c) in presenza di MK801 (30  $\mu$ M) e CNQX (10  $\mu$ M) nella soluzione di perfusione.

(B) Taccie esemplificative degli sEPSCs registrati da FS di animali di controllo (a), hWT (b) e hMT (c) in presenza di bicucullina (10  $\mu$ M) nella soluzione di perfusione.

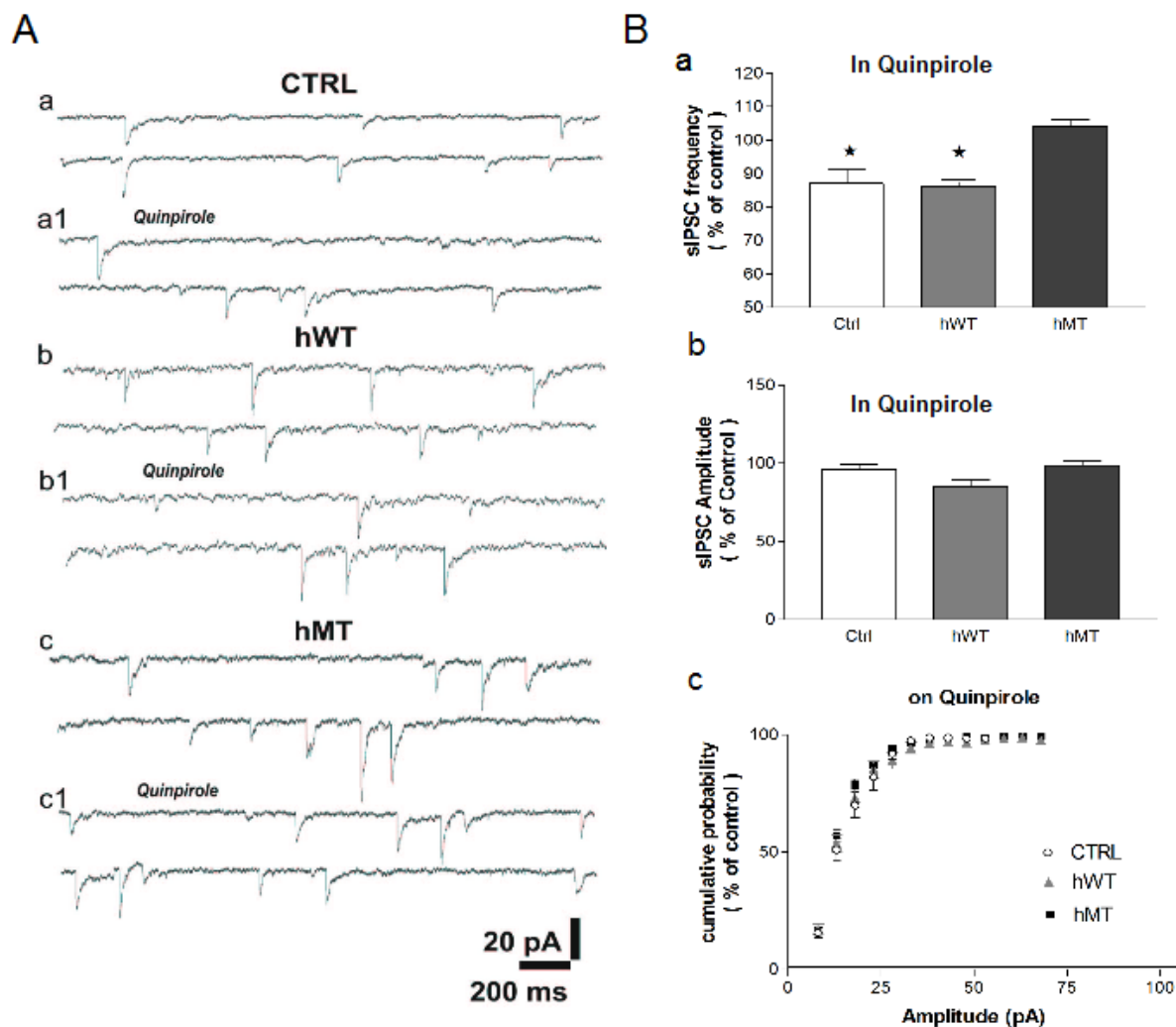
(A1-B1) I grafici confermano come nessun significativo aumento di attività sia GABAergica che glutamatergica sia presente fra i tre diversi gruppi di animali. Non si evidenzia infatti nessun cambiamento nella frequenza o nell'ampiezza degli eventi registrati.

### **Attività sinaptica GABAergica: effetto dell'attivazione del recettore dopaminergico D2-Like in neuroni spinosi striatali.**

In condizioni fisiologiche normali, la sintesi ed il rilascio di GABA in striato, è efficacemente sotto il controllo della dopamina attraverso il recettore D2-Like, espresso a livello dei terminali sinaptici GABAergici (Delgado et al., 2000; Guzmán et al., 2003; Centonze et al., 2003). Esclusa quindi l'ipotesi che gli aumentati livelli di GABA negli hMT derivassero da alterazioni a carico degli FS, risultava consistente l'idea che potessero essere coinvolti fattori di regolazione di tipo farmacologico come appunto l'attività inibitoria indotta dal recettore D2-like. Per verificare questa nuova ipotesi ho inizialmente valutato l'efficacia dell'agonista D2-like quinpirolo nell'indurre una riduzione dell'attività GABAergica nei MSNs. L'azione agonistica del quinpirolo è diretta non soltanto nei confronti del recettore dopaminergico D2 ma anche del recettore D3. Quest'ultimo recettore tuttavia risulta non essere espresso ad alti livelli nello striato dorsale, e quindi l'effetto del quinpirolo può essere considerato come mediato esclusivamente da una attivazione del recettore D2 (LeMoine and Bloch, 1996; Guzmán et al., 2003). Tale affermazione verrà comunque confermata successivamente grazie all'utilizzo di bloccanti specifici del recettore D2. Confermando le previsioni, l'applicazione in bagno di quinpirolo ( $10\mu\text{M}$ , 10 minuti) induceva una riduzione nella frequenza degli sIPSCs registrati pari al  $87.63\pm 2.7\%$  nei controlli, e dell' $86.09\pm 1.26\%$  negli hWT (Fig.13a/a1;b/b1), non inducendo alcuna modificazione nelle proprietà intrinseche di membrana a conferma del fatto che l'effetto fosse del tutto fisiologico. Nessuna modifica si aveva inoltre nell'ampiezza degli eventi: Ctrl  $95.90\pm 3.21\%$ , hWT  $85.02\pm 4.5\%$ . Per quel che riguarda le proprietà cinetiche degli eventi sinaptici registrati, nessuna differenza è stata riscontrata tra i valori raccolti prima e dopo l'applicazione del quinpirolo. Tale dato suggerisce come l'effetto dell'agonista D2 sia prettamente di tipo presinaptico. La concentrazione  $10\mu\text{M}$  di quinpirolo come valore standard per la realizzazione di tutti gli esperimenti è stata scelta sulla base di esperimenti preliminari che mostravano come il massimo e più ripetibile effetto del quinpirolo fosse indotto proprio ad una concentrazione di  $10\mu\text{M}$ . Al fine poi di confermare che l'inibizione riscontrata fosse totalmente ed esclusivamente mediata dal recettore D2, lo stesso tipo di esperimento è stato ripetuto in presenza di un antagonista specifico. Il pretrattamento delle fettine con *l*-sulpiride ( $3\mu\text{M}$ , 10 minuti) aboliva totalmente l'effetto inibitorio del quinpirolo ( $n=3$ ), confermando l'ipotesi iniziale.

Contrariamente agli animali di controllo e agli hWT, nei MSNs registrati da animali mutati ( $n=11$ ) l'applicazione in bagno del quinpirolo non induceva alcuna riduzione significativa

della frequenza degli sIPSCs ( $102.6 \pm 5.3\%$ ). Nessuna alterazione si è riscontrata inoltre riguardo l'ampiezza ( $99.2 \pm 6.2\%$ ) (fig 13c/c1,  $n=22$   $p>0.05$ ) e le proprietà cinetiche degli eventi sinaptici. Tale dato conferma l'ipotesi che almeno parzialmente l'aumentato livello GABAergico sia legato ad alterati meccanismi di modulazione farmacologica. L'effetto del quinpirolo è stato inoltre testato sugli IPSCs degli interneuroni FS. Nessuna modificazione nella frequenza o nell'ampiezza è stata tuttavia verificata in nessuno dei tre gruppi studiati (Freq. Ctrl  $102.4 \pm 3.5\%$ , hWT  $100.8 \pm 5.2\%$ , hMT  $99.5 \pm 3.6\%$ ; amplitude  $101.1 \pm 5.1\%$ , hWT  $102.6 \pm 4\%$ , hMT  $93.6 \pm 5.9$   $p>0.05$ ).



**Fig 13**

**Perdita dell'effetto di attivazione del recettore dopaminergico D2 sugli sIPSCs di MSNs**

(A) Taccie esemplificative di sIPSCs registrati prima e 10 minuti dopo l'applicazione di quinpirolo ( $10\mu\text{M}$ ) in MSNs di controllo (a,a1), hWT (b,b1) e hMT (c,c1). MK801( $30\mu\text{M}$ ) e CNQX ( $10\mu\text{M}$ ) erano costantemente presenti nella soluzione di perfusione

(B) I grafici mostrano la perdita dell'effetto inibitorio del quinpirolo sulla frequenza degli sIPSCs, in topi hMT rispetto sia ai controlli che agli hWT. Nessun cambiamento si riscontra nell'ampiezza degli eventi registrati. pre e post applicazione.

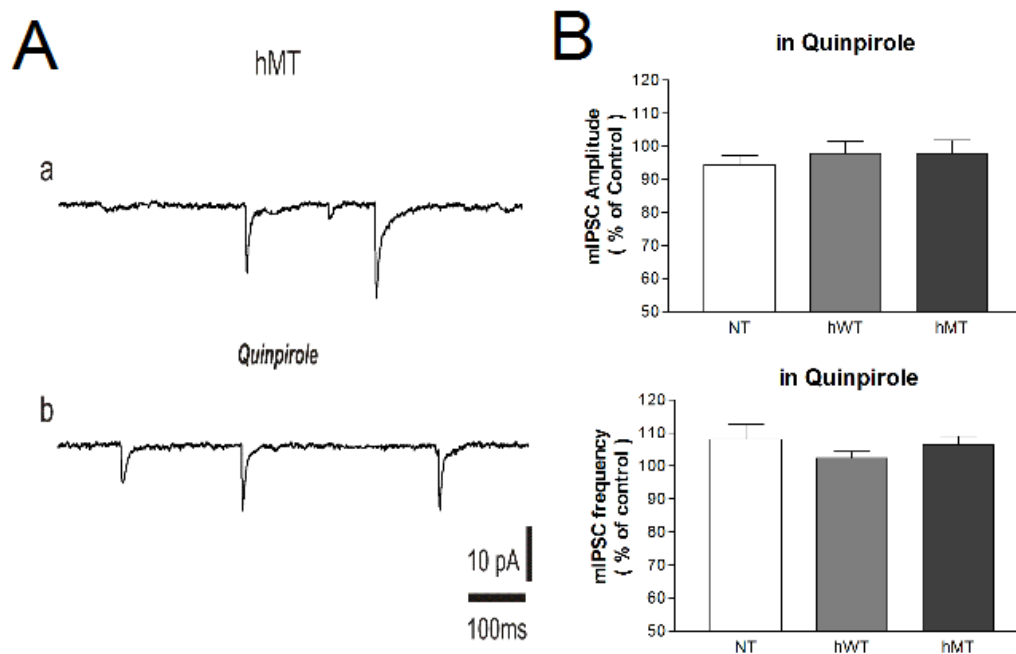
(C) Distribuzione cumulativa dell'ampiezza degli eventi in presenza di quinpirolo.



### **mIPSCs-miniature: effetto dell'attivazione del recettore dopaminergico D2-Like in neuroni spinosi striatali.**

L'effetto del quinpirolo è stato poi verificato anche a livello dell'attività spontanea GABAergica di tipo TTX-*insensitive* (mIPSCs). Come riportato in un precedente paragrafo, anche questo tipo di attività risulta essere alterata nei MSNs dei topi mutati. Risultava per tanto interessante verificare anche in questo caso l'effetto indotto dall'attivazione del recettore D2. Sorprendentemente, il quinpirolo non mostrava alcun efficacia inibitoria in nessuno dei tre gruppi di animali studiati sia considerando la frequenza che l'ampiezza degli eventi (ctrl n=8, hWT n=5, hMT n=7,  $p > 0.05$ ). (Fig 14). Questo dato rappresenta un'apparente contraddizione se riferito esclusivamente all'effetto D2-mediato riscontrato sugli sIPSCs. Considerando tuttavia i distinti meccanismi che sono alla base degli mIPSCs e degli sIPSCs è possibile superare tale contrasto aggiungendo inoltre un ulteriore punto di interesse nello studio delle alterazioni in questo modello genetico di Distonia. Il rilascio sinaptico *spike-mediato* di neurotrasmettitori viene innescato dall'afflusso nel terminale presinaptico di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  attraverso canali voltaggio dipendenti *calcium-selective*. La dopamina modula i canali del calcio N-type e P/Q-type (Tecuapetla et al., 2007), e in particolare l'attivazione del recettore D2 inibisce le correnti del calcio mediate dal canale N-type (Yan et al 1997). Ne segue dunque che un punto di legame tra l'attività sinaptica spike-mediata e l'effetto della dopamina sia rappresentato proprio dagli ioni  $\text{Ca}^{2+}$ . Al contrario invece è stato riportato che gli eventi sinaptici TTX-insensitive sono indipendenti dall'afflusso di calcio nel terminale presinaptico (Centonze et al., 2008). In questo lavoro infatti, gli autori riportano come nei MSNs striatali l'applicazione di cadmio, un bloccante dei canali del calcio, non portasse ad alcuna modifica della frequenza degli mIPSCs, dimostrando come tale eventi fossero indipendenti dai livelli di calcio. Inoltre un altro ben conosciuto modulatore dell'attività GABAergica, il recettore CB1 per i cannabbinoidi, mostra due distinti effetti nei confronti degli sIPSCs e dei mIPSCs. Hoffman e collaboratori (2000) hanno dimostrato in fette di ippocampo che il recettore CB1 riduce la frequenza ma non l'ampiezza degli sIPSCs senza alterare in alcun modo i mIPSCs. Risultati simili sono stati riportati anche nell'amigdala (Zhu et al., 2005). In particolare, quest'ultimo lavoro mostra come il CB1 modula gli IPSCs spike-mediati senza alterare gli mIPSCs registrati in presenza oltre che di TTX anche di bloccanti dei canali del Calcio voltaggio dipendenti. Infine un recente studio in fette di ippocampo ha mostrato che le trasmissioni sinaptiche mediate o indipendenti dall'attività di spike sono sostenute da un distinto *pool* di vescicole secrete con una limitata interazione reciproca.

(Sara et al., 2005). Tutti questi dati sono in accordo con i risultati ottenuti nei miei esperimenti e con l'idea che le attività sinaptiche spontanee di tipo spike dipendente o spike-indipendente siano mediate da distinti meccanismi intracellulari. Ne risulta quindi il superamento dell'apparente contraddizione dell'effetto del quinpirolo negli sIPSCs e mIPSCs.



**Fig 14**

**mIPSCs-miniature: effetto dell'attivazione del recettore dopaminergico D2-Like in MSNs**

(A) Taccie esemplificative di mIPSCs registrati su MSNs di topi hMT in presenza di quinpirolo (10μM).

(B) I grafici mostrano come non ci sia nessun effetto significativo indotto dal quinpirolo sia sulla frequenza che sull'ampiezza degli eventi registrati in tutti i tre gruppi registrati (ctrl, hWT, hMT)

**Attività GABAergica evocata in MSNs e interneuroni FS: assenza dell'inibizione mediata dal recettore D2-like.**

Al fine di realizzare una più approfondita analisi dell'attività modulatoria del recettore D2-like ho proseguito in una ulteriore serie di esperimenti atti a studiare l'attività sinaptica inibitoria di tipo evocato (eIPSCs) indotta tramite stimolazione elettrica. Nella prima serie di esperimenti tali

eventi sono stati studiati in neuroni MSNs. Così come per l'attività sinaptica spontanea anche per quella evocata è stata utilizzata una soluzione intracellulare con alte concentrazioni di CsCl al fine di potenziare le correnti mediate dai recettori GABA e alla soluzione di recovering venivano aggiunti antagonisti specifici dei recettori NMDA ed AMPA (CNQX-MK801). Le cellule venivano mantenute ad un potenziale di holding di 0mV in accordo con il protocollo sperimentale già utilizzato per questo stesso tipo di esperimenti (Centonze et al., 2003). In tali condizioni le correnti registrate apparivano come correnti di tipo *outward*, con una direzione di flusso dall'interno verso l'esterno della membrana cellulare. Inoltre al fine di verificare che l'attività evocata fosse esclusivamente mediata da recettori GABAergici in una serie di esperimenti preliminari è stato testato l'effetto della bicucullina, un antagonista dei recettori GABA<sub>A</sub>. L'applicazione in bagno di tale sostanza (3μM, 5-10 minuti) assieme agli antagonisti glutamatergici sopra menzionati portava alla completa soppressione dell'attività sinaptica evocata. Gli eIPSCs registrati nei tre distinti gruppi (Ctrl n=8, hWT n=6, hMT n=10) non mostravano significative differenze in termini di ampiezza media e di cinetica. A parità di stimolazione (5-15 V) infatti, tutte le cellule mostravano valori di eIPSCs compresi fra 30 e 150 pA, con una durata compresa fra gli 800 e 1100 μsec.

Nei MSNs registrati da topi di controllo e hWT, l'applicazione in bagno di quinpirolo (10μM, 10 minuti) portava ad una riduzione significativa dell'ampiezza degli eIPSCs senza alterare in alcun modo le proprietà intrinseche di membrana delle cellule. (Ctrl 56.98±3.24%, hWT 41.75±5.55 \*p<0.05, Fig 15). Questo dato risulta coerente sia con i risultati ottenuti dallo studio dell'attività sinaptica spontanea, sia con i dati riportati in letteratura riguardo la modulazione inibitoria del recettore D2-like. Nei MSNs registrati da topi hMT al contrario, l'effetto inibitorio del quinpirolo risultava essere assente (96.85% ±6.24, p>0.05, Fig 15) dimostrando ulteriormente come la mutazione DYT1 induca una alterata funzionalità del recettore D2-like.

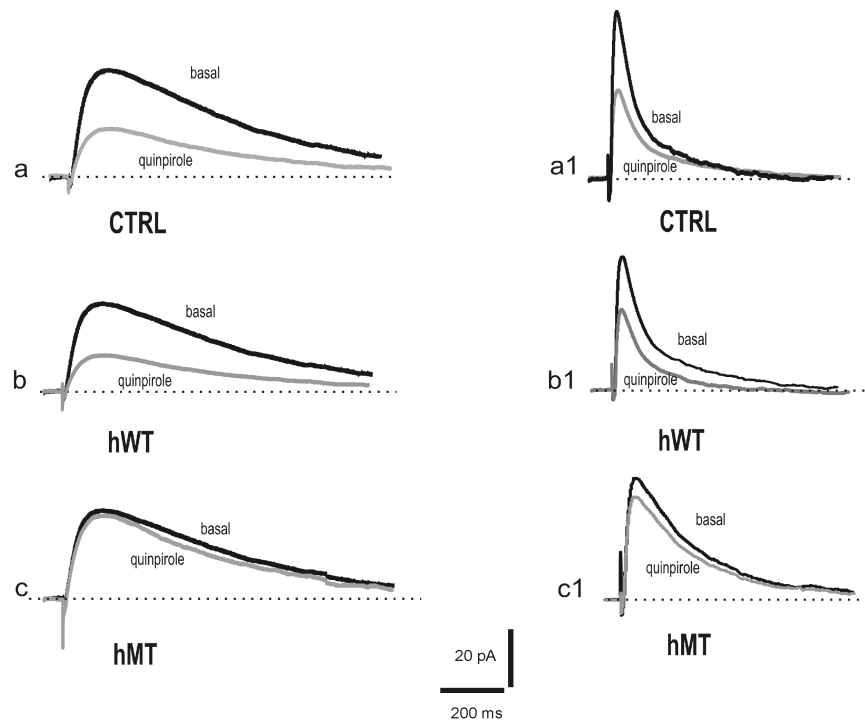
In accordo con i dati in letteratura (Centonze et al 2003) l'inibizione indotta dal quinpirolo si esercita anche a livello dell'attività sinaptica evocata degli interneuroni FS. Lo stesso tipo di esperimenti è stato quindi poi ripetuto su questa classe cellulare. Allo stesso modo degli MSNs, negli interneuroni registrati da topi di Ctrl e hWT, gli eIPSCs presentavano una corretta inibizione indotta da quinpirolo (Ctrl 61.49±2.56% , hWT 60.04±2.89% Fig 15 p<0.05, fig 15) non accompagnata comunque da modificazioni delle proprietà di membrana. Negli eIPSCs

---

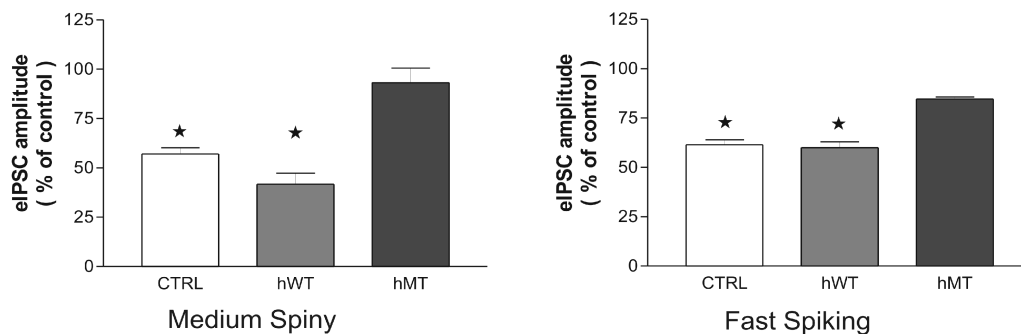
\* Tutti i valori percentuali dell'effetto del quinpirolo riportati nel testo si intendono riferiti ai valori di controllo precedenti l'applicazione della sostanza stessa.

registrati da topi hMT, il quinpirolo manteneva una modesta efficacia inibitoria ( $84.96 \pm 0.76\%$ ,  $p > 0.05$ , fig 15 ) ma che era significativamente inferiore a quella esercitata nei topi di controllo o hWT.

**A**



**B**



**Fig 15 Attività GABAergica evocata in MSNs e interneuroni FS: assenza dell'inibizione mediata dal recettore D2-like.**

(A) Le tracce sovrapposte mostrano l'attività GABAergica evocata da stimolazione sinaptica prima (nero) e dopo (grigio) l'applicazione di quinpirolo ( $10\mu\text{M}$ ), in MSNs registrati da CTRL(a), hWT(b), e hMT(c). Si nota la perdita di effetto del quinpirolo nei topi hMT. rispetto agli altri due gruppi considerati.

(B) Modulazione del quinpirolo sull'attività sinaptica evocata in FS. In topi di controllo (a1) e hWT(b1) l'attivazione del recettore D2 inibisce l'ampiezza degli eventi evocati. ma tale effetto è largamente ridotto negli hMT (c1) (C) I grafici riassumono l'inibizione indotta da quinpirolo nei MSNs (sinistra) e negli FS (destra) (asterisco =  $P < 0.05$ )

## Discussione

Il principale risultato di questo elaborato di tesi risulta essere la chiara dimostrazione della presenza di un'alterata attività GABAergica striatale in un modello animale di distonia DYT1. Ho riscontrato infatti come i MSNs striatali di topi mutati ricevono un aumentato input inibitorio GABAergico rispetto agli animali di controllo. Tale aumentata attività può essere in parte giustificata da un'alterazione del meccanismo modulatorio che la dopamina esercita sia sulla sintesi che sul rilascio striatale di GABA. Ho riscontrato infatti che negli animali mutati, risulta assente il fisiologico e ben conosciuto meccanismo di inibizione dell'attività GABAergica ad opera del recettore della dopamina D2-like. Tali dati costituiscono una ulteriore dimostrazione di come la dopamina possa esercitare un ruolo centrale nella fisiopatologia della distonia.

I MSNs dei topi mutati presentavano una alterata attività GABAergica misurabile soltanto nella frequenza ma non nell'ampiezza degli eventi registrati. Tale dato supporta l'idea che sia coinvolto un meccanismo di tipo presinaptico, che ci sia cioè un maggior input GABAergico derivante da uno o più tipi cellulari striatali che sinaptano sui MSNs. Come riportato in precedenza, nello striato è presente un importante microcircuito intrinseco di tipo inibitorio GABAergico che è possibile schematizzare in due distinte vie: la inibizione *feedback* e l'inibizione *feedforward*. La inibizione *feedforward* è mediata da almeno tre distinte classi di interneuroni GABAergici che nonostante siano presenti in un esiguo numero, esercitano una forte inibizione monosinaptica sugli MSNs striatali. Interneuroni Fast spiking (FS) e Low Threshold Spike (LTS) inducono un forte controllo nella regolazione dell'attività di firing dei MSNs (*spike-time activity*) (Koos e Tepper 1999) e rappresentano, in particolar modo gli FS, la classe di interneuroni GABAergici meglio conosciuta. Esistono tuttavia evidenze che portano a ipotizzare la presenza di almeno una seconda classe di interneuroni di tipo LTS a tutto oggi però poco conosciuta e non ancora ben definita. (Tepper et al., 2008). L'inibizione *feedback* origina dalle collaterali assoniche dei MSNs stessi, che sono in grado di inibire una vasta rete di altri neuroni principali nello spazio immediatamente circostante. Le sinapsi che gli MSNs producono fra essi stessi attraverso appunto le collaterali assoniche sono in numero nettamente superiore rispetto a quelle prodotte fra interneuroni e neuroni principali. Tale dato ha portato a considerare a lungo che l'inibizione *feedback* fosse il più importante *drive* inibitorio verso gli MSNs. Nel corso degli anni tuttavia tale ipotesi è stata progressivamente smentita. Eleganti esperimenti di registrazioni simultanee di due distinte cellule striatali hanno dimostrato infatti, come l'attività sinaptica che intercorre fra due

MSNs sia sostanzialmente più debole rispetto a quella che esiste tra un interneurone e un MSNs. Infatti l'induzione in un interneurone FS o LTS di una breve attività di *firing* porta ad una evidente corrente sinaptica GABAergica registrata simultaneamente in un neurone spinoso (Koos e Tepper 1999). E' da notare tuttavia che tale differenza di intensità fra inibizione *feedback* e *feedforward* trovi una sua parziale spiegazione nella diversa localizzazione cellulare che hanno le sinapsi provenienti da altri MSNs rispetto a quelle provenienti dagli interneuroni. Questi ultimi infatti sinaptano principalmente a livello del soma cellulare degli MSNs, mentre le collaterali assoniche prendono contatto principalmente a livello delle spine dendritiche (Kita et al., 1990; Guzmàn et al., 2003; Tepper et al 2004). Gli esperimenti classici di *patch-clamp* registrano le correnti ioniche a livello del soma cellulare, risulta pertanto chiaro che correnti prettamente dendritiche come la *feedback inhibition*, siano misurabili con molta più difficoltà e minor precisione. La distinzione fra inibizione *feedback* e *feedforward* sembra dunque essere più di natura funzionale che non legata ad una semplice intensità dell'effetto. Il sistema *feedback* sembra infatti controllare fenomeni dendritici come la retropropagazione della spike e l'afflusso di calcio, modulando quindi indirettamente sia l'eccitabilità cellulare che fenomeni più complessi come la plasticità sinaptica (Plenz et al., 2003).

Inoltre un interessante aspetto legato alla *feedback inhibition* è emerso da studi sulle interazioni sinaptiche fra MSNs appartenenti alla cosiddetta via diretta o indiretta. Taverna e collaboratori (2008) hanno mostrato come le collaterali assoniche provenienti dagli MSNs prendano contatto con altri MSNs non casualmente ma in maniera differenziata e distinta a seconda che si tratti di MSNs che esprimono il recettore D2 piuttosto che D1. In particolare è stato osservato che le sinapsi derivanti da MSNs di tipo D2 esercitano una inibizione locale più forte rispetto a quella esercitata da MSNs di tipo D1. Tale evidenza suggerisce che l'aumentato input GABAergico riscontrato nel nostro modello animale possa essere spiegato dalla mancanza di inibizione indotta da MSNs che esprimono il recettore D2. Nonostante tutto gli interneuroni FS rappresentano comunque il drive GABAergico più importante e meglio conosciuto. Risulta quindi chiaro che lo studio di tali cellule fosse di primaria importanza nella individuazione dell'origine dei livelli alterati di GABA sui neuroni spinosi. I miei esperimenti non riportano tuttavia nessuna alterazione a carico di tali interneuroni, tale da giustificare l'alterato input verso i MSNs. L'esclusione degli FS come possibile causa lascia aperta l'ipotesi che sia presente un coinvolgimento degli interneuroni LTS. Sfortunatamente non esiste ancora una esatta classificazione di tali cellule\*, e in considerazione inoltre del loro esiguo numero, non è stato

---

\*Tepper e collaboratori (2008) hanno infatti riportato l'esistenza di almeno due distinte classi di

possibile vagliare nel dettaglio tale interessante ipotesi. I risultati riguardo le alterazioni riscontrate a carico dei mIPSCs consentono di individuare un altro possibile meccanismo responsabile degli alterati livelli di attività GABAergica sui MSNs. Il rilascio di neurotrasmettitore, sia eccitatorio che inibitorio, avviene in maniera costantemente e continuativa a livello delle sinapsi nervose, in una maniera indipendente dalla propagazione dei potenziali di azione (Bekkers et al., 1990). I miei dati, che dimostrano come tali eventi siano anch'essi alterati nei topi mutati, inducono a considerare che gli aumentati livelli striatali di GABA possano dipendere da un meccanismo di rilascio sinaptico di tipo spike independent a carico sia di sinapsi fra distinti MSNs sia fra FS/LTS e MSNs.

Il rilascio dei neurotrasmettitori è indotto dall'afflusso presinaptico di ioni calcio. I MSNs possiedono a livello delle loro terminazioni sinaptiche sia i canali del calcio di tipo N-Type sia quelli di tipo P/Q-type (Tecuapetla et al., 2007). Anche se in maniera non del tutto chiara, è stata riscontrata la presenza a livello dei terminali nervosi sia degli MSNs che degli interneuroni FS del recettore dopaminergico D2 (Delle Donne et al., 1997). Tale recettore agisce tramite i canali del calcio di tipo N-Type nel modulare l'attività GABAergica striatale (Yan et al., 1997). È stato inoltre riscontrato che nello stesso modello animale da me utilizzato per il presente lavoro, il recettore dopaminergico D2 presenta una anormale funzionalità a livello degli interneuroni colinergici striatali (Pisani et al., 2006). Coerentemente dunque a tutti questi dati ho riscontrato come nei topi hMT l'effetto inibitorio mediato dall'attivazione del recettore D2 risultasse assente, sia per quel che riguarda l'attività spontanea sinaptica (sIPSCs) sia riguardo l'attività evocata (eIPSCs) dei MSNs. Gli interneuroni FS presentavano invece un apparente contrasto riguardo l'effetto del agonista D2-like (quinpirolo). Infatti a differenza di quanto ho verificato nei MSNs l'attivazione del recettore D2 non induce sugli FS alcuna riduzione dell'attività GABAergica spontanea, sia nei topi di controllo sia in quelli mutati. Al contrario analizzando l'attività evocata, il quinpirolo riduce l'ampiezza degli eIPSCs degli FS dei topi di controllo. Quest'ultimo effetto viene a mancare negli animali mutati in maniera paragonabile a quanto visto per i MSNs. Questi discordanti risultati possono essere interpretati alla luce della diversa innervazione GABAergica dei MSNs in confronto agli FS. Come visto i MSNs possiedono un'abbondante innervazione collaterale che esprime il recettore D2, mentre gli FS mancano di un così ampio network inibitorio. Risulta inoltre ancora poco chiaro se e in che misura sia espresso il recettore D2 sui terminali assonici che contattano gli FS. La differenza di effetto del recettore D2 fra MSNs e FS riguardo l'attività sinaptica spontanea potrebbe dunque essere spiegata sulla base di queste differenze sia anatomiche che funzionali delle connessioni sinaptiche che ricevono questi due tipi

di neuroni. L'attività evocata tramite stimolazione elettrica è invece in grado di attivare un numero di fibre inibitorie molto ampio, comprendenti fibre provenienti sia da MSNs, da FS e dalle altre classi di interneuroni GABAergici. Viene innescato e registrato elettrofisiologicamente un rilascio di GABA più ampio di quello che normalmente risulta comporre l'attività spontanea. Ne segue quindi che l'effetto modulatorio del recettore D2, registrato negli FS solo sull'attività evocata, agisca su delle fibre che solitamente non sono implicate nell'attività spontanea ma che la stimolazione elettrica è in grado di reclutare.

Il quinpirolo non esercita sugli mIPSCs degli MSNs lo stesso effetto inibitorio visto a carico degli sIPSCs, negli animali di controllo. Tale discordanza è spiegabile analizzando la diversa natura degli eventi *spike-sensitive* e *spike-insensitive*. Gli mIPSCs sono eventi indipendenti sia dai canali del sodio che da quelli del calcio. E' stato verificato infatti che nei MSNs striatali le correnti mIPSCs sono insensibili al blocco dei canali del calcio indotto tramite la somministrazione di cadmio (Rossi et al 2008). Come noto invece, l'azione del recettore D2 si esplica tramite i canali del calcio N-Type.(Yan et al 1997). La mancanza di effetto del quinpirolo sugli mIPSCs dei MSNs non rappresenta dunque una vera contraddizione, ma piuttosto un interessante punto di studio e di possibile approfondimento. Dimostra infatti come negli aumentati livelli striatali di GABA siano coinvolti più di un unico meccanismo, ovvero che possono verosimilmente sovrapporsi fattori di tipo modulatorio (alterata attività del recettore D2) con alterazioni intrinseche a livello della funzionalità di base delle sinapsi GABAergiche (alterazioni mIPSCs). Tutti i dati fin qui riportati mostrano una piuttosto netta relazione fra alterati livelli di attività GABAergica e perdita dell'inibizione mediata dal recettore D2. Molte altre evidenze dimostrano come questi due fattori sia strettamente legati da una relazione di causa effetto. Topi *knock-out* per il recettore D2 mostrano infatti l'assenza dell'inibizione striatale mediata da quest'ultimo recettore accompagnata da un significativo aumento nell'attività dell'enzima acido glutammico decarbossilasi\* (Centonze et al., 2003; An et al., 2004). Inoltre la delezione delle fibre dopaminergiche aumenta sia la sintesi che il rilascio di GABA striatale. (Lindfors, 1993). Inoltre sostanze in grado di favorire il rilascio di dopamina come la cocaina e l'anfetamina, inducono una riduzione del livello di attività GABAergica tramite il recettore D2. Nei ratti privati delle afferenze dopaminergiche dopo trattamento con 6-idrossidopamina, sia la cocaina che l'anfetamina perdono il loro effetto sulle correnti GABAergiche benchè tuttavia sia mantenuta la capacità inibitoria indotta dalla stimolazione diretta del recettore D2 per mezzo del quinpirolo (Centonze et al., 2002)

---

\*Enzima implicato nella sintesi del neurotrasmettitore GABA



Lo striato rappresenta all'interno dei gangli della base un punto nevralgico per una corretta modulazione dell'attività motoria. Questa struttura infatti riceve una massiccia innervazione eccitatoria estrinseca e induce contestualmente un'ampia inibizione verso la quasi totalità delle altre strutture dei gangli della base. La corretta funzionalità della via diretta e indiretta che fa capo allo striato risulta quindi di cruciale importanza nel controllo motorio. La via indiretta in particolare è stata proposta essere implicata nell'inibizione di popolazioni cellulari collegate a movimenti non necessari o non voluti. Alterazioni in questa specifica funzionalità potrebbero essere direttamente implicate nella patogenesi della distonia (Perlmutter e Mink 2004). Le alterazioni nel recettore D2 assieme alle evidenze dell'alterato binding del recettore D2 in soggetti portatori sani del gene mutato DYT1 (Augood et al.,2002) porta ad ipotizzare che le disfunzioni a carico di tale recettore rappresentino una caratteristica dello stato non manifesto della malattia distonica.

In conclusione, questo lavoro rappresenta una dimostrazione ulteriore di come i gangli della base e nello specifico lo striato subiscano importanti alterazioni nella sindrome distonica. In particolare rappresenta un'ulteriore evidenza di come il ruolo della dopamina in tale patologia sia del tutto primario. Tuttavia diversi fattori inducono alla cautela. Innanzitutto come ricordato in precedenza i modelli animali nella loro totalità, seppure utilissimi ai fini scientifici presentano delle intrinseche limitazioni, soprattutto in quanto non riescono a riprodurre completamente la sintomatologia umana. Inoltre va sottolineato come la complessità delle connessioni tra i gangli della base e del circuito intrastriale rendano difficile una eccessiva speculazione sulle dinamiche causa-effetto legate alla distonia rendendo necessarie molte altre evidenze sperimentali per poter chiarire nel dettaglio la patofisiologia distonica

# Bibliografia

Alcantara, A.A., Chen, V., Herring, B.E., Mendenhall, J.M., Berlanga, M.L., 2003 Localization of dopamine D2 receptors on cholinergic interneurons of the dorsal striatum and nucleus accumbens of the rat.

An, J.J., Bae, M.H., Cho, S.R., Lee, S.H., Choi, S.H., Lee, B.H., Shin, H.S., Kim, Y.N., Park, K.W., Borrelli, E., Baik, J.H., 2004. Altered GABAergic neurotransmission in mice lacking dopamine D2 receptors. *Mol Cell Neurosci* 25:732-41.

Asanuma, K., Ma, Y., Okulski, J., Dhawan, V., Chaly, T., Carbon, M., Bressman, S.B., Eidelberg, D., 2005. Decreased striatal D2 receptor binding in non-manifesting carriers of the DYT1 dystonia mutation. *Neurology* 64:347-9.

Augood, S.J., Hollingsworth Z, Albers D.S., Yang, L., Leung, J., Breakefield, X.O., Standaert, D.G., 2004 *Adv Neurol.*;94:53-60. Dopamine transmission in DYT1 dystonia.

Augood, S.J., Hollingsworth, Z, Albers, D.S., Yang, L., Leung, J.C., Muller, B, Klein, C, Breakefield, X.O., Standaert, D.G., 2002. Dopamine transmission in DYT1 dystonia: a biochemical and autoradiographical study. *Neurology* 59:445-8.

Balcioglu, A, Kim M.O., Sharma N, Cha J.H., Breakefield X.O., Standaert D.G., 2007. Dopamine release is impaired in a mouse model of DYT1 dystonia. *J Neurochem* 102:783-8.

Bekkers, J.M., Richerson, G.B., Stevens, C.F., 1990. Origin of variability in quantal size in cultured hippocampal neurons and hippocampal slices. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5359-62.

Bonsi, P., Sciamanna, G., Mitrano, D.A., Cuomo, D., Bernardi, G., Platania, P., Smith, Y., Pisani, A., 2007. Functional and ultrastructural analysis of group I mGluR in striatal fast-spiking interneurons. *Eur J Neurosci* 25:1319-31.20

Bracci, E., Centonze, D., Bernardi, G., Calabresi, P., J Neurophysiol. 2002 Apr;87(4):2190-4.  
Dopamine excites fast-spiking interneurons in the striatum.

Breakefield, X.O., Blood, A.J., Li Y., Hallett, M., Hanson, P.I., Standaert, D.G., 2008. The pathophysiological basis of dystonias. Nat Rev Neurosci. 9:222-34.

Burke, R.E., Fahn, S., Jankovic, J., Marsden, C.D., Lang, A.E., Gollomp, S., Ilson, J., 1982  
Tardive dystonia: late-onset and persistent dystonia caused by antipsychotic drugs. Neurology.  
Dec;32(12):1335-46.

Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., Marfia, G.A., Pisani, A., Sancesario, G., Bernardi, G.,  
2000 Synaptic transmission in the striatum: from plasticity to neurodegeneration. Prog Neurobiol.  
Jun;61(3):231-65. Review.

Calabresi, P., Mercuri, N., Stanzione, P., Stefani, A., Bernardi, G., 1987 Intracellular studies on  
the dopamine-induced firing inhibition of neostriatal neurons in vitro: evidence for D1 receptor  
involvement. Neuroscience. Mar;20(3):757-71.

Ceballos-Baumann, A.O., Passingham, R.E., Warner, T., Playford, E.D., Marsden, C.D., Brooks,  
D.J., 1995 Overactive prefrontal and underactive motor cortical areas in idiopathic dystonia. Ann  
Neurol. Mar;37(3):363-72.

Centonze, D., Picconi, B., Baunez, C., Borrelli, E., Pisani, A., Bernardi, G., Calabresi P., 2002.  
Cocaine and amphetamine depress striatal GABAergic synaptic transmission through D2  
dopamine receptors. Neuropsychopharmacology 26:164-75.

Centonze, D., Grande, C., Usiello, A., Gubellini, P., Erbs, E., Martin, A.B., Pisani, A., Tognazzi,  
N., Bernardi, G., Moratalla, R., Borrelli, E., Calabresi, P., 2003. Receptor subtypes involved in the  
presynaptic and postsynaptic actions of dopamine on striatal interneurons. J Neurosci 23:6245-  
54.

Dang, M.T., Yokoi, F., Pence, M.A., Li, Y., 2006 Motor deficits and hyperactivity in Dyt1  
knockdown mice. Neurosci Res. Dec;56(4):470-4.

Dang, M.T., Yokoi, F., McNaught, K.S., Jengelley, T.A., Jackson, T., Li, J., Li, Y., 2005 Generation and characterization of Dyt1 DeltaGAG knock-in mouse as a model for early-onset dystonia. *Exp Neurol*. Dec;196(2):452-63.

Delgado, A., Sierra, A., Querejeta, E., Valdiosera, R.F., Aceves J., 2000. Inhibitory control of the GABAergic transmission in the rat neostriatum by D2 dopamine receptors. *Neuroscience* 95:1043-8.

Delle Donne, K.T., Sesack, S.R., Pickel, V.M., 1997. Ultrastructural immunocytochemical localization of the dopamine D2 receptor within GABAergic neurons of the rat striatum. *Brain Res* 746:239-55.

Draganski, B., Thun-Hohenstein, C., Bogdahn, U., Winkler, J., May, A., 2003 "Motor circuit" gray matter changes in idiopathic cervical dystonia. *Neurology*. Nov 11;61(9):1228-31.

Eblen, F., Graybiel, A.M., 1995 Highly restricted origin of prefrontal cortical inputs to striosomes in the macaque monkey. *J Neurosci*. Sep;15(9):5999-6013

Eidelberg, D., Moeller, J.R., Antonini, A., Kazumata, K., Nakamura, T., Dhawan, V., Spetsieris, P., deLeon, D., Bressman, S.B., Fahn, S., 1998 Functional brain networks in DYT1 dystonia. *Ann Neurol*. Sep;44(3):303-12.

Furukawa, Y., Hornykiewicz, O., Fahn, S., Kish, S.J., 2000. Striatal dopamine in early-onset primary torsion dystonia with the DYT1 mutation. *Neurology* Mar 14;54(5):1193-5

Gerfen, C.R., The neostriatal mosaic. 1985 . Compartmental organization of projections from the striatum to the substantia nigra in the rat. *J Comp Neurol*. Jun 22;236(4):454-76.

Gerfen, C.R., Engber, T.M., Mahan, L.C., Susel, Z., Chase, T.N., Monsma, F.J. Jr., Sibley, D.R. 1990. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429-32.

- Girault, J.A., Spampinato, U., Glowinski, J., Besson, M.J., 1986. In vivo release of [3H]gammaaminobutyric acid in the rat neostriatum--II. Opposing effects of D1 and D2 dopamine receptor stimulation in the dorsal caudate putamen. *Neuroscience* 19:1109-17.21
- Goodchild, R.E., Kim, C.E., Dauer, W.T., 2005. Loss of the dystonia-associated protein torsinA selectively disrupts the neuronal nuclear envelope. *Neuron* 48:923-32.
- Granata, A., Watson, R., Collinson, L.M., Schiavo, G., Warner, T.T., 2007. The dystonia-associated protein torsinA modulates synaptic vesicle recycling. *J Biol Chem*. 283(12):7568-79.
- Geyer, H.L., Bressman, S.B., 2006 The diagnosis of dystonia *Lancet Neurol*. Sep;5(9):780-90..
- Grundmann, K., Reischmann, B., Vanhoutte, G., Hübener, J., Teismann, P., Hauser, T.K., Bonin, M., Wilbertz, J., Horn, S., Nguyen, H.P., Kuhn, M., Chanarat, S., Wolburg, H., Van der
- Linden, A., Riess O., 2007. Overexpression of human wildtype torsinA and human DeltaGAG torsinA in a transgenic mouse model causes phenotypic abnormalities. *Neurobiol Dis*. 27:190-206.
- Gustafson, N., Gireesh-Dharmaraj, E., Czubayko, U., Blackwell, K.T., Plenz, D., 2006 A comparative voltage and current-clamp analysis of feedback and feedforward synaptic transmission in the striatal microcircuit in vitro. *J Neurophysiol*. Feb;95(2):737-52. Epub 2005 Oct 19.
- Guzmán, J.N., Hernández, A., Galarraga, E., Tapia, D., Laville, A., Vergara, R., Aceves, J., Bargas, J., 2003. Dopaminergic modulation of axon collaterals interconnecting spiny neurons of the rat striatum. *J Neurosci*, 23:8931-40.
- Hewett, J.W., Tannous, B., Niland, B.P., Nery, F.C., Zeng, J., Li, Y., Breakefield, X.O., 2007. Mutant torsinA interferes with protein processing through the secretory pathway in DYT1 dystonia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:7271-6.

- Hoffman, A.F., Lupica, C.R., 2000. Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABAA synaptic transmission in the hippocampus. *J Neurosci.* 20: 2470-2479.
- Ichinose, H., Ohye, T., Takahashi, E., Seki, N., Hori, T., Segawa, M., Nomura, Y., Endo, K., Tanaka, H., Tsuji, S., et al., 1994 Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. *Nat Genet.* Nov;8(3):236-42.
- Kita, T., Kita, H., Kitai, S.T. 1984. Passive electrical membrane properties of rat neostriatal neurons in an in vitro slice preparation. *Brain Res.* 300:129-39. 22
- Kita, H., Kosaka, T., Heizmann, C.W., 1990. Parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat neostriatum: a light and electron microscopic study. *Brain Res* 536:1-15.
- Kitada, T., Pisani, A., Porter, D.R., Yamaguchi, H., Tscherter, A., Martella, G., Bonsi, P., Zhang, C., Pothos E.N., Shen J., 2007. Impaired dopamine release and synaptic plasticity in the striatum of PINK1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:11441-6.
- Kitai, S.T., Surmeier, D.J., 1993. Cholinergic and dopaminergic modulation of potassium conductances in neostriatal neurons. *Adv. Neurol.* 60: 40– 52
- Klein, C., Brin, M.F., Kramer, P., Sena-Esteves M., de Leon D., Doheny D., Bressman S., Fahn S., Breakefield X.O., Ozelius L.J., 1999 Association of a missense change in the D2 dopamine receptor with myoclonus dystonia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 27;96(9):5173-6.
- Knappskog, P.M., Flatmark, T., Mallet, J., Lüdecke, B., Bartholomé, K., 1995 Recessively inherited L-DOPA-responsive dystonia caused by a point mutation (Q381K) in the tyrosine hydroxylase gene. *Mol Genet.* Jul;4(7):1209-12.
- Koós, T., Tepper, J.M., 1999. Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons. *Nat Neurosci* 2:467-72.
- Le Moine, C., Tison, F., Bloch, B., 1990. D2 dopamine receptor gene expression by cholinergic neurons in the rat striatum. *Neurosci Lett* 117:248-252.

Le Moine, C., Bloch, B., 1996. Expression of the D3 dopamine receptor in peptidergic neurons of the nucleus accumbens: comparison with the D1 and D2 dopamine receptors. *Neuroscience* 73:131-143.

Lenz, S., Perney, T.M., Qin, Y., Robbins, E., Chesselet, M.F., 1994 GABA-ergic interneurons of the striatum express the Shaw-like potassium channel Kv3.1. *Synapse*. Sep;18(1):55-66.

Lindfors, N., 1993. Dopaminergic regulation of glutamic acid decarboxylase mRNA expression and GABA release in the striatum: a review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 17:887-903.

Nicola, S.M., Surmeier, J., Malenka, R.C., 2000; Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci* 23:185-215.

Ozelius, L.J., Hewett, J.W., Page, C.E., Bressman, S.B., Kramer, P.L., Shalish, C., de Leon, D., Brin, M.F., Raymond, D., Corey, D.P., Fahn, S., Risch, N.J., Buckler, A.J., Gusella, J.F., Breakefield, X.O., 1997. The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein. *Nat Genet* 17:40-8.

Perlmutter, J.S., Tempel, L.W., Black, K.J., Parkinson, D., Todd, R.D., 1997a MPTP induces dystonia and parkinsonism. Clues to the pathophysiology of dystonia. *Neurology*. Nov;49(5):1432-8.

Perlmutter, J.S., Stambuk, M.K., Markham, J., Black, K.J., McGee-Minnich, L., Jankovic, J., Moerlein, S.M., 1997b. Decreased [<sup>18</sup>F]spiperone binding in putamen in idiopathic focal dystonia. *J Neurosci* 17:843-50.

Perlmutter, J.S., Mink, J.W., 2004. Dysfunction of dopaminergic pathways in dystonia. *Adv Neurol* 94:163-70.

Pisani, A., Martella, G., Tscherter, A., Bonsi, P., Sharma, N., Bernardi, G., Standaert, D.G., 2006. Altered responses to dopaminergic D2 receptor activation and N-type calcium currents in striatal cholinergic interneurons in a mouse model of DYT1 dystonia. *Neurobiol Dis* 24:318-25.

Pinninti, N.R., Mago, R., Adityanjee. 2006 Tardive dystonia-associated prescription of aripiprazole.

J Neuropsychiatry Clin Neurosci.;18(3):426-7.

Pisani, A., Bernardi, G., Ding, J., Surmeier, D.J., 2007. Re-emergence of striatal cholinergic interneurons in movement disorders. Trends Neurosci 30:545-53.

Placzek, M.R., Misbahuddin, A., Chaudhuri, K.R., Wood, N.W., Bhatia, K.P., Warner, T.T. 2001 Cervical dystonia is associated with a polymorphism in the dopamine (D5) receptor gene. J Neurol Neurosurg Psychiatry. Aug;71(2):262-4.

Plenz, D., 2003. When inhibition goes incognito: feedback interaction between spiny projection neurons in striatal function. Trends Neurosci. 26, 436–443.24

Playford, E.D., Fletcher, N.A., Sawle, G.V, Marsden, C.D., Brooks, D.J., 1993 Striatal [18F]dopa uptake in familial idiopathic dystonia. Brain. Oct;116 ( Pt 5):1191-9.

Prensa, L., Parent, A., 2001 The nigrostriatal pathway in the rat: A single-axon study of the relationship between dorsal and ventral tier nigral neurons and the striosome/matrix striatal compartments. J Neurosci. Sep 15;21(18):7247-60.

Rossi, S., De Chiara, V., Musella, A., Kusayanagi, H., Mataluni, G., Bernardi, G., Usiello, A., Centonze, D. 2008. Chronic psychoemotional stress impairs cannabinoid-receptor-mediated control of GABA transmission in the striatum. J Neurosci 28:7284-7292.

Sara, Y., Virmani, T., Deák, F., Liu, X., Kavalali, E.T., 2005 An isolated pool of vesicles recycles at rest and drives spontaneous neurotransmission. Neuron. Feb 17;45(4):563-73.

Schiffmann, S.N., Lledo, P.M., Vincent, J.D.,1995. Dopamine D1 receptor modulates the voltage-gated sodium current in rat striatal neurones through a protein kinase A. J Physiol. Feb 15;483 ( Pt 1):95-107



- Sharma, N., Baxter, M.G., Petravic, J., Bragg, D.C., Schienda, A., Standaert, D.G., Breakefield, X.O., 2005. Impaired motor learning in mice expressing torsinA with the DYT1 dystonia mutation. *J Neurosci* 25:5351-5.
- Sohn, Y.H., Hallett, M., 2004. Surround inhibition in human motor system. *Exp Brain Res* 158:397-404.
- Song, W.J., Surmeier, D.J., 1996 Voltage-dependent facilitation of calcium channels in rat neostriatal neurons. *J Neurophysiol.* Oct;76(4):2290-306.
- Surmeier, D.J., Bargas, J., Hemmings, H.C.Jr, Nairn, A.C., 1995 Greengard P. Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron.* Feb;14(2):385-97
- Surmeier, D.J., Eberwine, J., Wilson, C.J., Cao, Y., Stefani, A., Kitai, S.T., 1992. Dopamine receptor subtypes colocalize in rat striatonigral neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10178–82
- Surmeier, D.J., Song, W.J., Yan, Z., 1996 Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J Neurosci.* Oct 15;16(20):6579-91.
- Taverna, S., Ilijic, E., Surmeier, D.J. 2008. Recurrent collateral connections of striatal medium spiny neurons are disrupted in models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 28:5504-12.
- Tecuapetla, F., Carrillo-Reid, L., Bargas, J., Galarraga, E., 2007. Dopaminergic modulation of short-term synaptic plasticity at striatal inhibitory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10258-63.
- Tepper, J.M., Koós, T., Wilson, C.J., 2004. GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends Neurosci* 27:662-9.
- Tepper, J.M., Wilson, C.J., Koós, T., 2008. Feedforward and feedback inhibition in neostriatal GABAergic spiny neurons. *Brain Res Rev* 58:272-281.25

Todd, R.D., Perlmutter, J.S., 1998. Mutational and biochemical analysis of dopamine in dystonia: evidence for decreased dopamine D2 receptor inhibition. *Mol Neurobiol* 16:135-147.

Yan, Z., Song, W.J., Surmeier, J. 1997. D2 dopamine receptors reduce N-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a membrane-delimited, protein-kinase-C-insensitive pathway. *J Neurophysiol* 77:1003-15.

Zhao, Y., DeCuypere, M., LeDoux, M.S., 2008. Abnormal motor function and dopamine neurotransmission in DYT1 DeltaGAG transgenic mice. *Exp Neurol* 210:719-730.

Zhu, P.J., Lovinger, D.M., 2005. Retrograde endocannabinoid signaling in a postsynaptic neuron/synaptic bouton preparation from basolateral amygdala. *J Neurosci* 25:6199-6207.