



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

FACOLTA' DI MEDICINA

DOTTORATO DI RICERCA IN  
NEUROSCIENZE

XX° CICLO

Studio della plasticità cortico-striatale  
in topi mutanti *reeler*

Maria Cristina Marrone

Docente Guida/Tutor: Prof. Nicola B. Mercuri  
Coordinatore: Prof. Giorgio Bernardi

<b>Parte I</b> .....	3
Introduzione .....	3
I gangli della base.....	5
Il nucleo striato.....	6
La plasticità sinaptica .....	9
La plasticità sinaptica corticostriatale .....	10
Farmacologia della plasticità sinaptica corticostriatale .....	12
Disturbi neurologici e psichiatrici correlati ad alterazioni della plasticità sinaptica corticostriatale e modelli animali .....	14
La reelina.....	16
Il topo reeler come modello animale di patologia del sistema nervoso.....	19
La reelina e la plasticità sinaptica .....	21
<b>Parte II</b> .....	23
Obiettivi della ricerca .....	23
Materiali e Metodi.....	25
Animali.....	25
Screening genico .....	25
Elettrofisiologia: tecnica di registrazione di field EPSP (potenziale di campo post- sinaptico eccitatorio) .....	26
Preparazione del tessuto .....	27
I fEPSPs .....	27
Immunoistochimica e morfologia .....	29
Esperimenti comportamentali .....	30
Il paradigma dell'evitamento attivo .....	30
Procedura sperimentale .....	30
<b>Parte III</b> .....	32

Risultati .....	32
La trasmissione sinaptica eccitatoria nello striato del topo reeler .....	32
Caratterizzazione della plasticità sinaptica nel topo reeler:.....	35
LTP corticostriatale.....	35
Un aumento dei livelli di GABA endogeno riduce la frequenza di induzione dell'LTP nei topi reeler .....	39
La dopamina non e' coinvolta nell'induzione dell'LTP striatale nei topi reeler.....	39
Alterazione della distribuzione e dell'espressione degli interneuroni GABAergici parvalbumina-positivi.....	42
Deficit di apprendimento condizionato nel topo reeler .....	46
Discussione .....	48
Bibliografia .....	53

# Parte I

## Introduzione

La reelina è una proteina di segnale che svolge un ruolo di guida nella migrazione neuronale durante l'embriogenesi, nel rimodellamento sinaptico e nella sopravvivenza neuronale.

Il topo *reeler* presenta una mutazione spontanea per la quale, in omozigosi, la reelina non viene prodotta, mentre in eterozigosi se ne ha una produzione approssimativa del 50% rispetto al soggetto wild type. Nell'animale omozigote, quindi, durante la corticogenesi vi è un'anomalia nel segnale sinaptico, così che i neuroni non riescono a collocarsi nelle corrette posizioni e ne consegue una grave alterazione dell'architettura e morfologia dell'encefalo, così come un'anomalia nella foliazione cerebellare e la distruzione del piano di formazione corticale. L'espressione più lampante della patologia nel topo *reeler* è osservabile dall'andatura atassica e caracollante, dal deficit dell'equilibrio e dall'incapacità di assumere una posizione verticale che, apparendo quasi subito dopo la nascita, conducono presto questi animali alla morte per cause secondarie alla mutazione.

Diverse anomalie nella morfologia e nella funzionalità del Sistema Nervoso Centrale sono state descritte in questi animali, fra le quali alterazioni nella plasticità sinaptica a livello dell'ippocampo. Ulteriore evidenza del legame proteina reelina-plasticità sinaptica è la forte concentrazione di questa proteina nel bulbo olfattivo di ratto, un'area che presenta un'altissima flessibilità delle connessioni sinaptiche.

Alterazioni della presenza di reelina nel Sistema Nervoso Centrale sono state correlate, a livello clinico, con diverse patologie neurologiche e psichiatriche. La mancanza di reelina nell'uomo causa una grave forma di lissencefalia, mentre una sua carenza è correlata con l'autismo e l'insorgenza della schizofrenia. Una iperconcentrazione di reelina è stata trovata negli encefali di soggetti affetti da Morbo di Alzheimer ed è stata correlata con la formazione delle placche neurofibrillari tipiche di questa patologia.

Lo striato è un nucleo dei gangli della base coinvolto sia nell'elaborazione e pianificazione motoria, sia in funzioni cognitive più fini. Alterazioni morfologiche

e funzionali dello striato sono infatti collegate a patologie caratterizzate da disturbi cognitivi e motori quali il Morbo di Parkinson, la Corea di Huntington e la Sindrome di Tourette.

Studi *in vivo* ed *in vitro* hanno dimostrato che la modificazione della efficacia sinaptica (plasticità) corticostriatale è considerata la base cellulare della memoria e dell'apprendimento motori e procedurali. Alterazioni della plasticità sinaptica sono state trovate in modelli animali di Morbo di Parkinson, Sclerosi Laterale Amiotrofica e Corea di Huntington.

Poiché lo striato è una delle aree dove si trova la maggiore espressione di reelina, è possibile che la mutazione caratterizzante il topo *reeler* sia collegata ad un'anomalia della funzionalità di quest'area, come della plasticità sinaptica che la caratterizza.

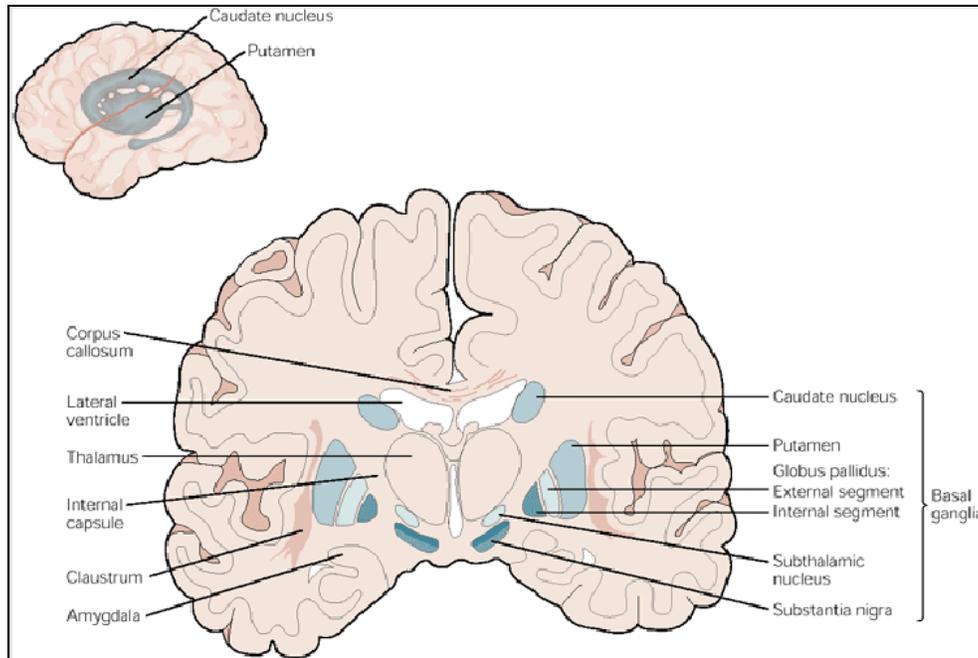
## **I gangli della base**

Con l'amigdala e la formazione ippocampale, i gangli della base costituiscono le strutture sottocorticali che compongono gli emisferi cerebrali, la parte dell'encefalo deputata all'elaborazione delle funzioni cognitive superiori.

I gangli della base sono composti da cinque formazioni sottocorticali: il nucleo caudato, il putamen, il globo pallido, il nucleo subtalamico e la sostanza nera. Questi nuclei sono ampiamente interconnessi tra loro e sono collegati ad elementi dell'apparato sensoriale, motorio, cognitivo e motivazionale dell'encefalo (fig 1). Alterazioni dei neuroni presenti in quest'area sono collegate a malattie quali il Morbo di Parkinson, il Morbo di Huntington e l'emiballismo. Tutte queste patologie sono caratterizzate dall'insorgenza di caratteristici disturbi motori, oltre che da disturbi della sfera affettiva e cognitiva.

Il nucleo caudato e il putamen originano embriogeneticamente da una stessa struttura telencefalica, da cui ne deriva una stretta omologia cellulare e funzionale. I due nuclei, inoltre, sono fusi nella parte anteriore e per questo sono generalmente citati come un'unica struttura: il neostriato (NS, o striato). Il globo pallido (GP), di derivazione diencefalica, suddiviso in segmento esterno ed interno, è disposto medialmente al putamen e lateralmente alla capsula interna; il nucleo subtalamico è situato sotto il talamo alla sua giunzione con il mesencefalo; mentre la sostanza

nera, suddivisibile in pars reticolata (SNr, citologicamente simile al GP) e pars compacta (SNc), è parte del mesencefalo (Kandel et al., 2000).



**Figura 1**

Gangli della base (sezione coronale). Da Kandel et al., 2000.

Le principali afferenze ai gangli della base provengono dalla corteccia cerebrale (via corticostriatale), dal talamo, e dalla SNc, e terminano a livello del neostriato. Le cellule del NS proiettano al GP (via striopallidale) e alla SN (via strionigrale). Le vie corticostriatale, striopallidale, strionigrale e le afferenze allo striato provenienti dai nuclei intralaminari del talamo sono organizzate in maniera topografica, ovvero regioni specifiche della corteccia si connettono tramite lo striato su zone specifiche del GP e della SN.

Le principali vie efferenti dei nuclei della base si originano dal segmento interno del GP e dalla SNr (centri di uscita) e raggiungono il talamo, da cui proiettano alla corteccia prefrontale, alla corteccia premotoria, all'area motrice supplementare e alla corteccia motrice. Anche le afferenze al nucleo subtalamico (dal GP segmento

esterno e dalla corteccia motrice e premotoria), e le sue efferenze (al GP e alla SNr) sono organizzate topograficamente.

Oltre a queste vie principali, ve ne sono di minori. Il circuito oculomotore, che proietta dalla corteccia al nucleo caudato e da questo al talamo e poi ai campi oculari frontali, regolando i movimenti saccadici. Il circuito della corteccia prefrontale dorsolaterale, con afferenze al caudato dalle aree associative corticali, ed efferenze dal caudato al talamo alla corteccia, probabilmente regolanti la memoria e l'orientamento spaziale. Infine, il circuito della corteccia orbitofrontale laterale, che connette questa parte della corteccia con la regione ventromediale del caudato, e che si ritiene implicato in meccanismi di modulazione comportamentale (Kandel et al., 2000).

## **Il nucleo striato**

Il nucleo neostriato (NS), più comunemente striato, è composto per la maggior parte da neuroni di proiezione definiti "spinosi" (da qui in poi "spiny neurons") per il grosso numero di spine che ne ricopre i dendriti. Hanno un corpo cellulare piccolo, fra i 12 e i 20  $\mu\text{m}$  di diametro, che dà origine a dendriti principali, e che a loro volta si diramano in numerosissimi dendriti secondari. Uno spiny neuron ha, generalmente 25-30 branche dendritiche che si dipartono in tutte le direzioni dal corpo cellulare coprendo un volume dal raggio di 300-500  $\mu\text{m}$ , con spine disposte fittamente fino al numero di 4-6 per 1  $\mu\text{m}$  di estensione dendritica. L'assone si dirama dal corpo cellulare o da uno dei dendriti principali, e forma diverse proiezioni collaterali vicino al soma, che danno origine ad una arborizzazione locale, ma l'output arriva fino alla SN e al complesso palliale (Tepper et al., 2007).

Se gli spiny neurons costituiscono circa il 95% della popolazione cellulare striatale nel ratto (il 75-80% nei primati), la rimanente parte è data sostanzialmente da tre tipi di interneuroni: gli interneuroni colinergici giganti, con un corpo cellulare grande (fino a 50-60  $\mu\text{m}$  nel diametro maggiore), le cellule canestro o "basket", contenenti GABA e parvalbumina, e gli interneuroni contenenti somatostatina e NOS (nitric oxide synthase; Kawaguchi et al., 1995; Tepper and Bolam, 2004).

Gli assoni degli spiny neurons formano piccoli fasci di fibre perforanti la materia grigia, creando le strie che caratterizzano questo nucleo, e rilasciano GABA e

neurotrasmettitori peptidici nelle stazioni di output del neostriato, GP e SN. Gli spiny neurons ricevono connessioni da ogni elemento dello striato e ne formano fra loro, la maggior parte delle quali di natura inibitoria.

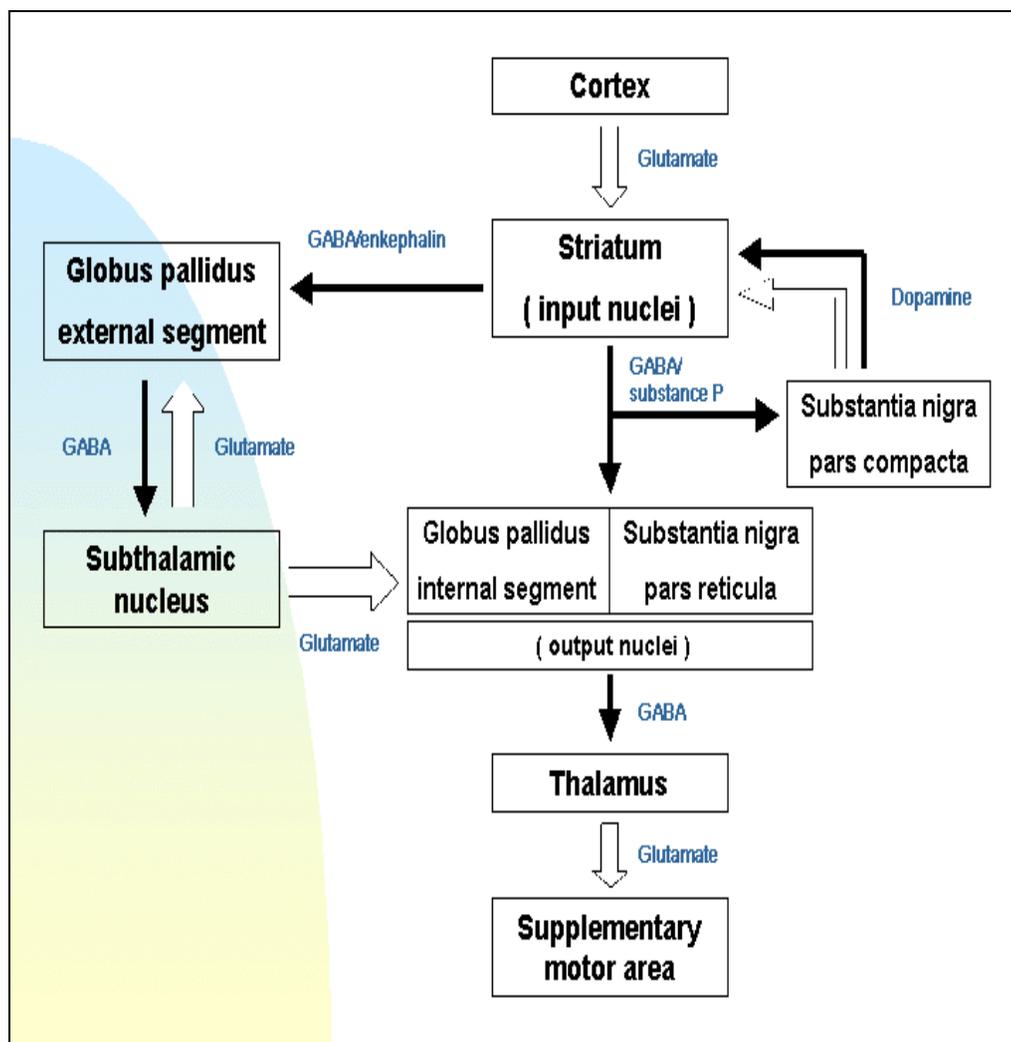
Il NS riceve inputs soprattutto dalla corteccia cerebrale, dai nuclei intralaminari del talamo e dai neuroni dopaminergici della SNc; ma afferenze minori si hanno anche dal nucleo dorsale del raphe e dal nucleo basolaterale dell'amigdala, oltre che dal segmento esterno del GP e dalla SNr. Le afferenze corticali allo striato sono eccitatorie e sono costituite da neuroni glutammatergici che proiettano sui neuroni striatali. Il segnale, elaborato nello striato, viaggia lungo due vie: diretta o indiretta. Attraverso la via diretta i segnali che giungono allo striato attivano neuroni GABAergici inibitori che proiettano a loro volta al globo pallido interno e alla SNr (centri di uscita inibitori), esercitando nel complesso un'azione disinibitoria sul talamo e quindi un'azione di stimolazione dei neuroni corticali. Attraverso la via indiretta i segnali dallo striato vengono trasferiti da neuroni GABAergici inibitori al globo pallido esterno; da qui partono altri neuroni inibitori che terminano sui nuclei subtalami eccitatori, che proiettano ai centri di uscita (GPI e SN). L'attivazione di questa via eccita i centri di uscita e quindi ripristina il controllo inibitorio GABAergico sul talamo determinando inibizione dei neuroni motori corticali (Kandel et al., 2000; fig 2).

I neuroni striatali che danno origine alle vie diretta ed indiretta sono molto simili nelle loro proprietà morfologiche ed elettrofisiologiche, ma sono distinti in quanto i neuroni della via diretta esprimono i recettori dopaminergici D1, oltre che Sostanza P e dinorfina, mentre quelli originanti la via indiretta esprimono recettori dopaminergici D2 ed encefalina (Bolam et al., 2000).

I diversi neurotrasmettitori rilasciati nello striato non hanno solamente un semplice effetto di depolarizzazione o iperpolarizzazione cellulare: studi fisiologici sugli spiny neurons mostrano che l'azione neurotrasmettitoriale è molto più complessa della mera variazione del potenziale di riposo di membrana. La dopamina, ad esempio, agisce come modulatore sui canali del Na<sup>+</sup> voltaggio dipendenti, regolando così l'induzione dei potenziali post sinaptici eccitatori (Calabresi et al., 1987; Schiffmann et al., 1995).

Una distinzione strutturale del NS lo vede suddiviso in due elementi: matrice e striosomi. E' la matrice a ricevere gli inputs dalla corteccia associativa parieto-temporo-occipitale, dalla corteccia motoria e da quella latero-frontale (Ragsdale

and Graybiel, 1981; 1990) e sarebbe la maggiore fonte di efferenza verso il GP e la SNr (Gimenez-Amaya and Graybiel, 1990). Gli striosomi, invece, ricevono afferenze dalle cortece prefrontale e limbica, mentre efferiscono soprattutto alla SNc (Gerfen, 1984; 1985). Vista la vastità e la complessità delle connessioni del NS è comprensibile come quest'area sia implicata nell'elaborazione di funzioni cognitive quali l'apprendimento condizionato e la formazione mnemonica (Parker and Gaffan, 1998).



**Figura 2**

Rappresentazione schematica dei circuiti neuronali coinvolgenti lo striato e le altre aree dei gangli della base. Sono riportati i diversi neurotrasmettitori implicati nelle interazioni tra i nuclei (freccie bianche: vie eccitatorie; freccie nere: vie inibitorie). Da Kandel et al., 2000.

## La plasticità sinaptica

La plasticità sinaptica viene definita come una modificazione duratura nell'efficacia di una sinapsi, ed è oggi considerata la base cellulare della memoria e dell'apprendimento.

Già agli inizi del XX secolo Donald Hebb ne poneva le basi scrivendo: “Quando l'assone di una cellula *A* è abbastanza vicino da eccitare una cellula *B* e ripetutamente o persistentemente prende parte alla sua eccitazione, in una o in entrambe le cellule si instaura un qualche processo di accrescimento o cambiamento metabolico tale da aumentare l'efficienza di *A*, come una delle cellule preposte all'attivazione di *B*” (Hebb, 1949). Successivamente Lomo (1966), poi in collaborazione con Bliss (1973) descrivevano un duraturo potenziamento della risposta elettrofisiologica indotto da una stimolazione ad alta frequenza (high frequency stimulation, HFS) della via perforante nel giro dentato ippocampale del coniglio. In seguito, cambiamenti nell'efficacia sinaptica sono stati descritti nei diversi circuiti dell'ippocampo, nella corteccia, nel cervelletto, nell'accumbens e nel neostriato di varie specie animali.

La plasticità sinaptica può essere distinta in plasticità a breve o a lungo termine, a seconda che il cambiamento registrato perduri per pochi secondi o minuti, o si mantenga almeno per ore. Se nel primo caso la variazione riguarda solo la disponibilità recettoriale e neurotrasmettitoriale, nella plasticità a lungo termine sembra che si inducano degli adattamenti strutturali e metabolici del neurone, come la formazione (o eliminazione) di alcune sinapsi, la sintesi di nuove proteine e l'espressione genica (Kandel et al., 2000). La plasticità sinaptica a lungo termine può andare nel senso di un potenziamento (LTP) o di una depressione dell'efficacia sinaptica (LTD), e dipende dal tipo di protocollo applicato e dall'area in cui si registra.

I primi studi sull'LTP ippocampale hanno permesso di delineare alcune importanti caratteristiche generali della plasticità a lungo termine: cooperatività, specificità dell'input e associatività. Per cooperatività si intende la probabilità di induzione del cambiamento plastico correlata al numero di afferenze reclutate durante la somministrazione del tetano: sarà, quindi necessario che un numero minimo di vie afferenti venga reclutato dalla stimolazione (Mc Naughton et al., 1978). Per specificità dell'input si intende che l'LTP avviene solo a livello delle sinapsi attivate dalle fibre cui lo stimolo è stato applicato, ma non su altre fibre, anche se

afferenti alla stessa popolazione neuronale (Bliss and Lømo, 1973; Schwartzkroin and Wester, 1975; Dunwiddie and Lynch, 1978). Mentre per associatività si intende quando la stimolazione di un gruppo di fibre, di entità tale da non indurre LTP, diventa efficace o se data insieme ad una seconda stimolazione di un altro gruppo di fibre, purchè convergenti sullo stesso gruppo cellulare (Gustafsson and Wigström, 1986), oppure se assieme viene depolarizzato il neurone postsinaptico (“paired recordings”; Kelso et al., 1986; Sastry et al., 1986; Gustafsson et al., 1987).

## **La plasticità sinaptica corticostriatale**

Studi elettrofisiologici *in vitro* e *in vivo* mostrano che gli spiny neurons del NS hanno una bassissima capacità di firing spontaneo, dovuta ad un potenziale di membrana di riposo molto negativo (iperpolarizzato) causato dalle forti conduttanze di potassio operanti in queste cellule (Calabresi et al., 1997a). In preparazioni *in vitro* di fettine comprendenti corteccia e striato, gli spiny neurons sono iperpolarizzati ed hanno un potenziale di membrana di riposo intorno ai -85 mV. Nelle registrazioni intracellulari hanno una resistenza di membrana (“input resistance”) di circa 40 M $\Omega$  e potenziali d’azione tonici di grande ampiezza (circa 100 mV) e breve durata (1.1–1.3 ms; Wilson and Groves, 1980; Calabresi et al., 1992a; Cepeda et al., 1994; Stern et al., 1998).

Inoltre, la registrazione del potenziale cellulare mostra delle oscillazioni spontanee dallo stato iperpolarizzato a quello depolarizzato in coincidenza con il rilascio fasico di glutammato dai terminali corticostriatati (Wilson and Groves, 1980; Calabresi et al., 1996; Cowan and Wilson, 1994).

L’applicazione di una stimolazione elettrica ad alta frequenza delle afferenze corticali allo striato induce modificazioni sinaptiche a lungo termine, che vanno nel senso di una depressione dell’efficacia sinaptica (long term depression, LTD).

L’LTD corticostriatale è dipendente dall’azione del neurotrasmettitore glutammato sui recettori AMPA ( $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid) espressi dagli spiny neurons, poiché l’antagonista dei recettori AMPA, CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione disodium salt) blocca i potenziali post sinaptici eccitatori (EPSPs) evocati dalla stimolazione delle afferenze corticali. I recettori-canali NMDA (N-methyl-D-asparatato), invece, sono normalmente

chiusi dagli ioni magnesio per via dell'iperpolarizzazione cellulare. Infatti, quando la cellula viene depolarizzata dall'esterno o il magnesio ( $Mg^{++}$ ) viene tolto dal medium esterno, la componente NMDA viene liberata e, in questa condizione, l'applicazione dell'HFS induce un potenziamento dell'efficacia sinaptica a lungo termine (long term potentiation, LTP) della stessa via (Calabresi et al., 1992b). La LTP corticostriatale è anche stata osservata *in vivo* con registrazioni intracellulari quando stimolazioni ripetute delle afferenze corticali allo striato sono associate con una depolarizzazione postsinaptica (Charpier and Deniau, 1997), o anche *in vitro* su fettine di ratto di animali giovani (12–14 giorni) e in relazione all'area striatale coinvolta (Partridge et al., 2000; Smith et al. 2001). Una convergenza di diverse linee di ricerca indica che il NS non è solamente coinvolto nei processi motori ma anche in quelli mnestici. Questa struttura è considerata come il depositario innato dei programmi motori specie specifici (Greenberg et al., 1979), coinvolta nella formazione mnestica di guida del comportamento (Whinshaw et al., 1987) e soggiacente alla formazione delle associazioni sensomotorie (Mishkin and Appenzeller, 1987).

MacDonald e White, descrivendo il sistema di guida mnestica del comportamento, individuano tre substrati neuronali: l'ippocampo, coinvolto nell'acquisizione mnestica della relazione fra gli stimoli, l'amigdala, che stabilisce le relazioni fra gli stimoli esterni e quelli interni biologici, e il NS, indispensabile nel memorizzare l'associazione della risposta con lo stimolo rinforzato (MacDonald and White, 1994). Per via della connessione con la corteccia prefrontale, inoltre, lesioni e patologie neostriatali coinvolgono anche funzioni cognitive tipicamente corticali, determinando una sintomatologia comune alle patologie coinvolgenti un trauma diretto della corteccia prefrontale (Bhatia and Marsden, 1994; Cummings, 1993; Mesulam, 1986).

Benché entrambe le forme di plasticità sinaptica, LTD e LTP siano coinvolte nel ruolo di apprendimento e memoria motori e nell'attività cognitiva mediata dallo striato (Calabresi et al., 1996), non è noto in che modo queste forme si alternino per prendere parte alle diverse funzioni. Tuttavia, alcune indicazioni possono derivare dallo studio dei diversi neurotrasmettitori e recettori coinvolti nell'LTP e LTD striatale.

## **Farmacologia della plasticità sinaptica corticostriatale**

L'evento più importante che causa l'induzione sia dell'LTD che dell'LTP corticostriatale è l'occorrenza della depolarizzazione della membrana postsinaptica fino all'insorgenza del potenziale d'azione, con l'apertura dei canali del calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) a voltaggio dipendente ed un aumento postsinaptico del calcio intracellulare (Calabresi et al., 2000a). L'iperpolarizzazione infatti previene l'induzione dell'LTD (Calabresi et al., 1992a), così come il blocco dell'aumento postsinaptico di  $\text{Ca}^{++}$  (Calabresi et al., 1994; 2000a).

Come si è visto, il potenziale postsinaptico eccitatorio (excitatory postsynaptic potential; EPSP) evocato dalla stimolazione corticale sugli spiny neurons è mediato dall'azione del glutammato sui terminali postsinaptici non-NMDA. La somministrazione di antagonisti dei recettori AMPA glutamatergici (come il CNQX) ne provoca la scomparsa. Al contrario, antagonisti del recettore glutamatergico di tipo NMDA, come il d-AP5 (d(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid) non alterano né l'ampiezza né la durata del EPSP, ma impediscono la presentazione dell'LTP che, a differenza dell'LTD corticostriatale, è mediata dall'azione del glutammato sui recettori NMDA (Calabresi et al., 1992b; Lovinger et al., 1993; Walsh, 1993).

A livello postsinaptico, il glutammato non agisce solo sui recettori ionotropici NMDA e non-NMDA, ma anche sui metabotropici (mGLUR), di cui si conoscono otto sottogruppi suddivisi in tre famiglie. L'attivazione del tipo mGLUR1 è richiesta per l'induzione dell'LTD, poiché il blocco del recettore o l'applicazione di uno specifico antagonista ne previene la presentazione. Invece, l'entità dell'LTP indotta in soluzione senza  $\text{Mg}^{++}$  è ridotta del 50% dall'applicazione di antagonisti degli mGLUR1 o degli mGLUR5, e completamente impedita quando questi recettori sono antagonizzati assieme (Gubellini et al., 2001; 2003; 2004).

Un ruolo importantissimo sulla trasmissione e la plasticità corticostriatale è quello svolto dalla dopamina (DA), che esercita in quest'area un'azione sia eccitatoria che inibitoria attraverso l'azione dei suoi recettori di tipo 1 (D1) e di tipo 2 (D2), ma anche con la neuromodulazione esercitata attraverso i canali ionici (Kitai et al., 1976; Mercuri et al., 1985; Calabresi et al., 2007). Attraverso i recettori D1, ad esempio, la DA inibisce reversibilmente i potenziali d'azione agendo sui canali del sodio a voltaggio dipendente (Calabresi et al., 1987; Surmeier et al., 1992). Inoltre modula le correnti di calcio riducendo l'attivazione dei canali del  $\text{Ca}^{++}$  di tipo N e

P e stimolando quelli di tipo L nei neuroni striatali attraverso un meccanismo mediato dalla protein kinasi A (Surmeier et al., 1995). Attraverso la stimolazione dei recettori D2, la DA inibisce le correnti di calcio mediate dall'attivazione dei canali di tipo L, e modula le correnti del potassio (Hernandez-Lopez, 2000; Lin et al., 1996).

Antagonisti dei recettori D1 e D2 bloccano la LTD, mentre nell'LTP la stimolazione dei recettori D1 ha un'azione promuovente, quella dei D2 inibente. In modelli di denervazione da 6-OHDA sia la LTP che la LTD sono bloccate (Centonze et al., 1999b; Kerr and Wickens, 2001; Calabresi et al., 2000b).

Anche l'acetilcolina svolge un ruolo essenziale nella plasticità striatale. L'innervazione colinergica dello striato sembra essere quasi esclusivamente intrinseca, da parte soprattutto degli interneuroni colinergici, e la sua azione sembra estrinsecarsi sui recettori muscarinici (M1-M5) a livello postsinaptico. Gli spiny neurons esprimono alti livelli dei sottotipi M1-M4, e l'effetto postsinaptico eccitatorio indotto dall'agonista muscarina sembra essere generato dall'attivazione degli M1 attraverso il blocco della conduttanza di potassio (Calabresi et al., 2000b). La somministrazione di antagonisti muscarinici quali la scopolamina o la pirenzepina è in grado di bloccare l'LTP (Calabresi et al., 1999a). L'acetilcolina, inoltre, agisce sulla plasticità striatale bilanciando l'azione della DA (Calabresi et al., 2006). Il rilascio di DA nello striato è, anche, modulato dall'attivazione dei recettori nicotinici localizzati sui terminali dopaminergici. Lo stesso controllo sull'LTD striatale esercitato dalla DA potrebbe riflettere una diminuzione nell'attività del recettore colinergico M1 indotta dall'azione della DA sui recettori D2 degli interneuroni colinergici (Zhou et al., 2001; Partridge et al., 2002; Wang et al., 2006).

Anche gli endocannabinoidi sintetizzati e rilasciati postsinapticamente hanno un ruolo importante nell'induzione dell'LTD. Una volta rilasciati, gli endocannabinoidi agiscono come messaggeri retrogradi sui recettori CB1 presinaptici che, stimolati, inibiscono il rilascio di glutammato per mezzo dell'attivazione del recettore D2 (Gerdeman et al., 2002; Kreitzer and Malenka, 2005).

Inoltre, benché siano solo una minoranza (circa il 5%), le cellule non appartenenti alla categoria degli spiny neurons svolgono anch'esse un ruolo importante nella neuromodulazione dell'informazione e nella plasticità sinaptica. Gli interneuroni

NOS positivi stimolati dal glutammato liberato in seguito all'HFS rilasciano ossido nitrico (NO), indispensabile per la formazione dell'LTD negli spiny neurons attraverso un meccanismo di *feedforward*. Poiché il NO si diffonde liberamente, può influenzare i livelli di guanosin monofosfato ciclico (cGMP) sugli spiny neurons attraverso l'attivazione della guanilil ciclasi solubile (sGC) presente in queste cellule, visto che gli inibitori del NOS la bloccano (Calabresi et al., 1999b). La DA è coinvolta anche nel controllo esercitato dall'ossido nitrico sull'LTD: la sintesi dell'ossido nitrico neuronale è proprio attivata *in vivo* dai burst delle cellule dopaminergiche nigrostriatali attraverso un meccanismo D1 e D2 dipendente, così come la stimolazione dei recettori D1 e D5 localizzati sugli interneuroni sintetizzanti NO induce il rilascio da questi di NO, cruciale nell'induzione dell'LTD (Mammut et al., 2006).

## **Disturbi neurologici e psichiatrici correlati ad alterazioni della plasticità sinaptica corticostriatale e modelli animali**

In relazione al loro ruolo nella memoria e nell'apprendimento, le forme di LTD e LTP corticostriatale sono considerate come due varianti di uno stesso meccanismo fisiologico. Vi sono diverse situazioni in cui queste sono associate a condizioni patologiche, ossia non sono supportate dagli stessi meccanismi inducenti la risposta fisiologica e non rivestono lo stesso ruolo. Per questo motivo, le alterazioni della plasticità corticostriatale ed i modelli animali ad esse associati sono estremamente utili per la comprensione e la terapia dei disturbi clinici.

Il Morbo di Parkinson è caratterizzato da una perdita nel numero delle cellule e delle connessioni dopaminergiche della via nigrostriatale. Nel ratto può essere indotto un modello di questa patologia iniettando la neurotossina catecolamino specifica 6-OHDA nella sostanza nera dell'animale (Ungerstedt, 1971), che causa una permanente denervazione dopaminergica nello striato ipsilaterale, con ipocinesia unilaterale e disgregazione sensomotora (Schwartz and Huston, 1996; Picconi et al., 2005). In questi animali si osserva una scomparsa sia dell'LTD che dell'LTP corticostriatale, dovuta alla mancata attivazione dei recettori dopaminergici durante l'HFS (Calabresi et al., 1992a; Centonze et al., 1999b).

Il Morbo di Huntington (HD) è invece caratterizzato da una perdita selettiva degli spiny neurons striatali, determinante gravi deficit motori e cognitivi (Ferrante et al., 1987). La somministrazione sistemica cronica dell'acido 3-nitropropionico nel ratto crea un modello di HD (Brouillet et al., 1995). Questi animali mostrano un'alterazione della plasticità corticostriatale nella direzione di una LTP invece che LTD in condizioni di  $Mg^{++}$  fisiologico (Picconi et al., 2006).

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è una grave patologia neurodegenerativa del motoneurone che porta ad una progressiva e completa paralisi. Fra le forme familiari della malattia, circa il 20% sono associate alla mutazione del gene codificante la SOD1 (superossido dismutasi; Rosen et al., 1993). Il topo transgenico G93A+ è considerato un buon modello animale per lo studio della SLA) (Gurney, 1994). Su questo topo è stata trovata una perdita della LTD corticostriatale, sostituita preferenzialmente dalla LTP, e imputabile al deficit dopaminergico caratterizzante questi topi (Geracitano et al., 2003).

La terapia elettroconvulsiva (ECS) è spesso usata nel trattamento della sindrome maniaco-depressiva (Challiner and Griffiths, 2000; Fink, 2001) e lo striato viene considerato come un target in questa patologia, vista l'elevata presenza di recettori dopaminergici in quest'area e l'importanza che questo tipo di recettore svolge sia nei disturbi dell'umore sia nella formazione di entrambe le forme di plasticità. In effetti, è stato visto che i ratti trattati con ECS perdono la LTD dopo somministrazione dell'HFS (De Murtas, 2004), così come questa forma di plasticità viene persa dopo trattamento cronico con litio, una sostanza farmacologica ampiamente utilizzata nella terapia del disturbo bipolare (Calabresi et al., 1993a).

Il coinvolgimento dei recettori dopaminergici striatali è notoriamente fondamentale anche per la schizofrenia, la sindrome di Tourette e le tossicodipendenze, ed è sui recettori dopaminergici che agiscono molti dei farmaci antipsicotici, quali l'aloiperidolo. La somministrazione cronica di questa sostanza previene l'induzione della LTD corticostriatale in favore dell'emergenza della LTP (Centonze et al., 2004). Anche in animali trattati cronicamente (ma non dopo una sola somministrazione) con cocaina si è visto un deficit a livello della LTP corticostriatale, non nel senso della sua assenza, ma nella direzione di una sua mancata scomparsa in seguito ad una stimolazione a bassa frequenza, che

normalmente rimpiazza la LTP dopo HFS (fenomeno di depotenziamento), e che viene ripristinato dalla somministrazione di antagonisti D1 (Centonze et al., 2006). Infine, la deprivazione *in vitro* di ossigeno e glucosio, riproducente la condizione ischemica cerebrale, se applicata per un periodo inferiore a quello determinante la morte cellulare, induce una LTP, per via di un patologico aumento della trasmissione glutammatergica tale da liberare i recettori NMDA dal blocco fisiologico del  $Mg^{++}$  (Calabresi et al., 2002; Calabresi et al., 2003; Saulle et al., 2002).

## La reelina

La reelina è una proteina secreta nella matrice extracellulare, che svolge un ruolo fondamentale nella migrazione neuronale e nello sviluppo di strutture laminari del SNC (Quattrocchi et al., 2002).

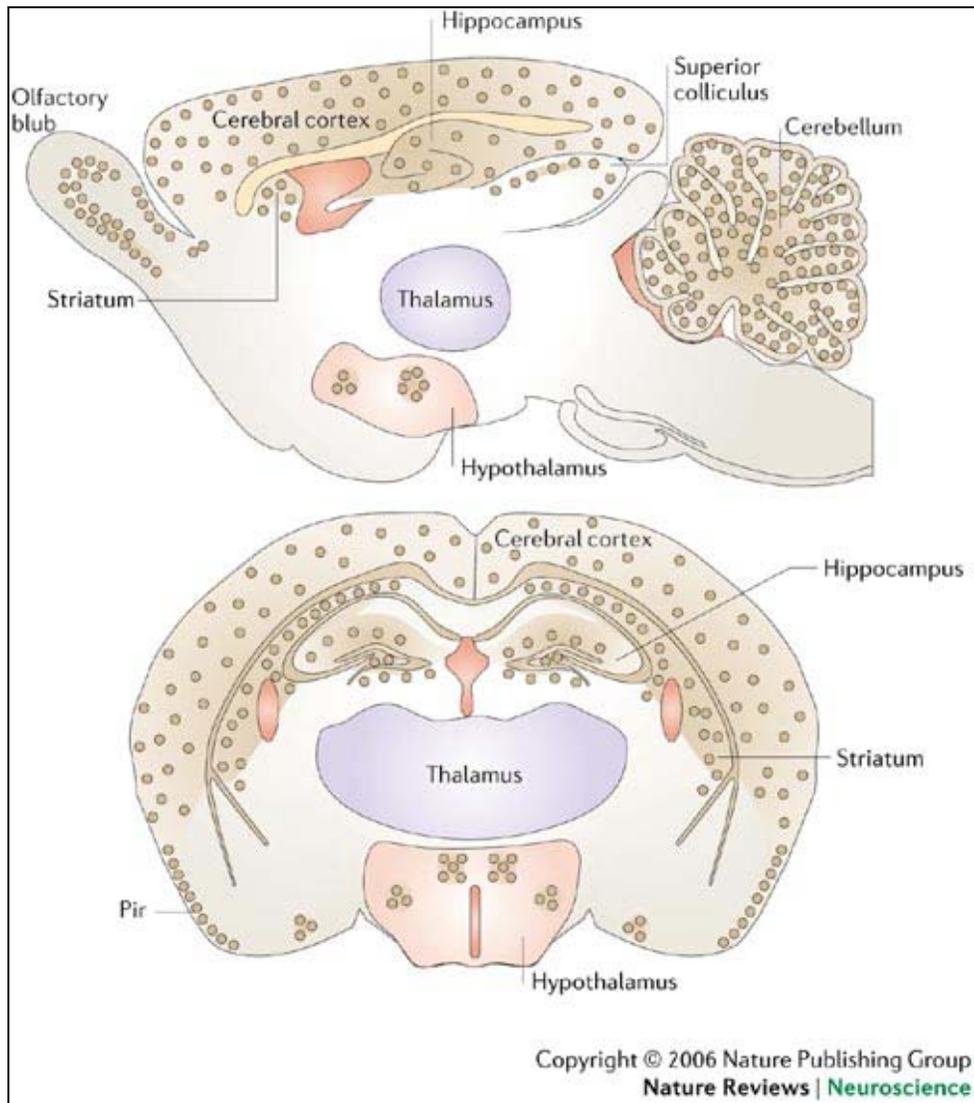
Benché il topo mutante *reeler* fosse stato descritto già dagli anni '60 (Falconer, 1963), solo nel 1995 è stata individuata e descritta la proteina coinvolta nella mutazione (D'Arcangelo et al., 1995). Nello stesso anno Ogawa e coll., in Giappone, trovava un anticorpo per la reelina, e due anni dopo è stato clonato il gene (D'Arcangelo et al., 1997).

Durante l'embriogenesi, la reelina è espressa sostanzialmente dalle cellule di Cajal-Retzius (CR) nella neocorteccia, da cellule simili alle CR nell'ippocampo e da neuroni postmitotici nel cervelletto.

In un encefalo *reeler*, queste cellule non producono reelina extracellulare, portando all'alterazione del normale pattern di sviluppo corticale, detto di inside-out, in cui i neuroni che si generano prima formano lo strato più profondo, mentre i successivi si posizionano più superficialmente. Nell'encefalo *reeler*, gli strati corticali non si formano, perché i neuroni che migrano dopo, normalmente destinati a formare il piatto corticale, non sono in grado di sovrapporsi ai loro predecessori, ma si accumulano in posizioni più basse (Rice and Curran, 2001). Nel cervelletto *reeler* l'anormalità maggiore è data dalla dislocazione e riduzione delle cellule di Purkinje e delle cellule granulari, oltre che da un'anomalia nella densità e topologia delle sinapsi. E anche nell'ippocampo dei soggetti *reeler* l'organizzazione neuronale è ampiamente modificata, in particolar modo nella formazione dello strato piramidale (D'Arcangelo and Curran; 1998).

Nell'encefalo adulto i neuroni di Cajal-Retzius , che esprimevano la reelina durante l'embriogenesi, sono ampiamente rimpiazzati da interneuroni GABAergici nella neocorteccia e nell'ippocampo (Weeber et al., 2002). Anche le cellule mitrali e una sottopopolazione di neuroni periglomerulari del bulbo olfattivo contengono elevate quantità di questa proteina, così come le cellule granulari del cervelletto; ma anche l'ipotalamo, lo striato e il collicolo superiore ne esprimono discrete quantità (Rice and Curran, 2001; fig 3). Oltre che nel cervello, inoltre, questa proteina è diffusa nel midollo spinale e in diversi organi e tessuti esterni al sistema nervoso.

Nella sua azione, la reelina si lega al VLDLR (very low density lipoprotein receptor) e all'ApoER2 (ApoE receptor 2) che sono i recettori di due delle proteine di membrana della famiglia delle LDL (low density lipoprotein) espressi dai neuroni. I complessi reelina-VLDL e reelina-ApoE si legano alla proteina citoplasmatica mDab1 e, attivandola, danno il via alla cascata di eventi che risultano nell'azione della reelina nel sistema nervoso (Rice and Curran, 2001; Jossin et al., 2003). Le lipoproteine VLDL e l'ApoE sono quindi delle componenti indispensabili nella via di trasmissione del segnale della reelina attraverso la membrana plasmatica (Trommsdorff et al., 1999). Il loro ruolo è coordinato e, in parte, sovrapposto: i VLDLR e l'ApoER2 sono, infatti, parzialmente ridondanti , così che negli encefali degli animali che presentano l'assenza di uno o dell'altro recettore non si osservano dei grossi deficit (Weeber et al., 2002).



### Figura 3

Espressione della reelina (pallini gialli) nell'encefalo adulto, sezioni sagittale (in alto) e coronale (in basso). La reelina è espressa principalmente dagli interneuroni GABAergici neocorticali, con livelli massimali negli strati I e V. Nell'ippocampo la reelina è presente negli strati oriens e radiatum del CA1 e del CA3, e nell'ilo del giro dentato. Inoltre è espressa dalle cellule mitrali del bulbo olfattivo e in quelle granulari del cervelletto. Anche alcune aree dell'ipotalamo, dello striato e del collicolo superiore ne esprimono quantità significative. Da Herz and Chen, 2006.

## **Il topo *reeler* come modello animale di patologia del sistema nervoso**

I primi topi *reeler* sono stati descritti, come mutazione spontanea, alla fine degli anni '40, da DS Falconer, Edimburgo. Nel 1951 è stato descritto per la prima volta il fenotipo comportamentale, sempre da Falconer, ma solo negli anni '60 si è avuto il primo rapporto su una patologia di tipo reelinico (Hamburgh, 1963). Attualmente, questo ceppo è mantenuto nei laboratori della Jackson, come B6C3Fe e se ne può osservare sia il genotipo omozigote (*rl/rl*), sia quello eterozigote (*rl/+*), che il congenere wild type (*+/+*).

I topi *reeler* mostrano, in omozigosi, atassia, tremori e deficit dell'equilibrio, con un'andatura loro tipica, che appare attorno alle due settimane dopo la nascita; mentre gli eterozigoti non si distinguono dai wild type (D'Arcangelo and Curran, 1998).

Il gene umano per la reelina è stato clonato e mappato al cromosoma 7q22. Ha il 94.2% d'identità con quello murino ma, nell'uomo, il corrispettivo del fenotipo murino *reeler* omozigote, dà una sintomatologia molto grave di lissencefalia, accompagnata da ritardo nello sviluppo fisico ed intellettuale, con atassia e ipotonia muscolare, ritardo mentale e spesso mancato sviluppo del linguaggio (Hong et al., 2000; Crino, 2001).

Il topo *reeler* è stato proposto come modello per diversi disturbi psichiatrici e nervosi. Fra le ipotesi più considerate, è che via sia una correlazione fra alterazioni dei livelli di reelina e l'autismo, soprattutto perché in encefali di soggetti autistici si è vista una riduzione fino al 44% sia della proteina reelina che del suo RNA messaggero (RNAm) a livello corticale e cerebellare. Inoltre sembra esserci una suscettibilità genetica all'autismo localizzata sul cromosoma 7q, lo stesso del gene *RELN* (Fatemi et al., 2005). Anche dati sul fenotipo indicano alcuni aspetti di somiglianza fra *reeler* omozigoti e soggetti autistici, quali l'ipoplasia cerebellare e la riduzione del numero delle cellule di Purkinje (Bartlett et al., 2004).

Gli eterozigoti dei *reeler*, invece, sono stati considerati come un modello di schizofrenia. Sia questi animali che i pazienti umani, infatti, presentano una ridotta espressione di reelina-decarbossilasi e dell'acido glutammico-decarbossilasi (GAD) nella corteccia prefrontale, una diminuzione delle spine dendritiche e deficit sensomotori postpuberali (Ballmaier et al.; 2002). Inoltre, in base alla teoria dopaminergica della schizofrenia (Davis et al.; 1991), nei soggetti affetti da questa

patologia vi è un deficit del sistema dopaminergico mesolimbico, oltre che un elevato livello di recettori D3 nello striato ventrale (Ballmaier et al., 2002). Rispetto ad animali sani, anche gli eterozigoti dei *reeler* hanno dei difetti nella struttura delle cellule dopaminergiche dell'area tegmentale ventrale e delle strutture limbiche correlate, una riduzione dei livelli di tirosina idrossilasi e del suo mRNA, ed un aumento dell'mRNA dei recettori D3 nello striato ventrale.

Studi sull'uomo, mostrano che nell'encefalo (corteccia temporale, cervelletto, ippocampo e nucleo caudato) di pazienti schizofrenici, l'mRNA per il gene *reelin* è significativamente inferiore a quello di omologhi soggetti non psichiatrici (Impagnatiello et al., 1998; Tissir and Goffinet, 2003).

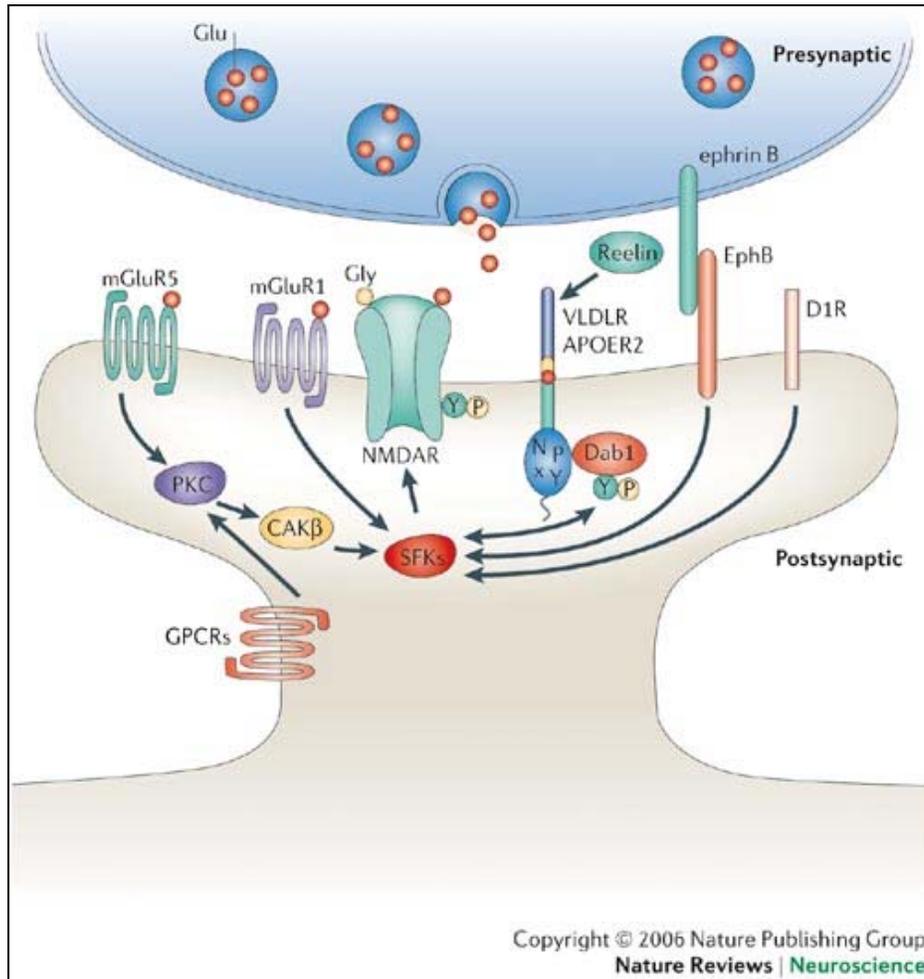
Nel lavoro di Salinger e coll. (2003) invece, si vede come gli omozigoti presentino delle anomalie comportamentali che non possono essere spiegate dal solo deficit motorio: eccessiva dominanza nel comportamento sociale, livelli d'ansia molto bassi quando esposti a condizioni di novità ambientale, deficit nella memoria di lavoro spaziale, ridotta prepulse inhibition, risposta di inibizione anormale, attività ripetitive non locomotorie nell'open field. Queste caratteristiche comportamentali anomale presentano delle analogie con l'autismo e la schizofrenia. Anche secondo Costa e coll. (2002) esisterebbero dei deficit comportamentali negli eterozigoti che costituirebbero un parallelismo con patologie come la schizofrenia.

Benché queste siano le proposte prevalenti per lo studio del topo *reeler* come modello di patologia nervosa, si è visto che una diminuzione dei livelli di *reelin* è anche comune nei pazienti affetti da disordini dell'umore bipolari (Guidotti et al., 2000); così come una diminuzione di espressione *reelinica* ippocampale si trova in pazienti affetti da epilessia del lobo temporale, in correlazione con la dispersione delle cellule granulari, una delle maggiori caratteristiche di questa patologia (Heinrich et al., 2006). Anche nei malati di Alzheimer l'espressione ed il metabolismo della *reelin* sono alterati. Nella corteccia di questi pazienti vi sono livelli di *reelin* aumentati fino al 40 % (Botella-Lopez et al., 2006). Inoltre in topi deficienti in *reelin* o VLDLR e ApoER2 ci sono livelli elevati di proteina Tau iperfosforilata, una proteina associata al microtubulo importante nell'organizzazione del citoscheletro, la cui iperfosforilazione è stata associata con la malattia di Alzheimer, mentre le mutazioni della Tau sono legate a diverse forme di demenza (Rice and Curran, 2001).

## La reelina e la plasticità sinaptica

Diverse evidenze mostrano come la reelina sia coinvolta nei meccanismi regolanti la plasticità sinaptica. Nel bulbo olfattivo del ratto, area in cui è espressa un'elevata quantità di questa proteina, si è osservato un continuo e attivo rimodellamento delle connessioni sinaptiche (Rice and Curran, 2001). Inoltre, secondo Niu e coll. (2004) la reelina è un fattore indispensabile nella stimolazione della crescita dendritica dei neuroni ippocampali, attraverso l'attivazione del Dab1 durante lo sviluppo postnatale. Registrazioni elettrofisiologiche dimostrano che animali che non hanno i recettori ApoER2 e VLDLR, cui la reelina si lega per estrinsecare la sua attività, o in topi wild type in cui questi recettori vengono inibiti, non si ha induzione di LTP ippocampale. La somministrazione di reelina negli animali wild type è invece in grado di aumentare la probabilità di induzione di LTP, ma non nei topi VLDLR- o ApoER2- (Weeber et al., 2002; Beffert et al., 2005).

Il ruolo della reelina nella neurotrasmissione, e' evidenziato dal fatto che questa proteina, insieme ai suoi recettori ApoER2 e VLDLR, e' localizzata a livello sinaptico, dove controlla l'attività' del recettore NMDAR (Herz and Chen, 2006). Gli stessi autori propongono un modello che mostra come l'ApoER e il VLDLR agiscano nell'encefalo adulto come recettori per la reelina, in un meccanismo di modulazione della plasticità sinaptica per mezzo del controllo dell'ingresso del  $Ca^{++}$  attraverso i recettori NMDA (fig 4).



**Figura 4**

La reelina modula l'attività del recettore NMDA per mezzo delle tirosin chinasi (SFKs). I recettori postsinaptici accoppiati con la proteina G (GPCRs), gli mGLU5 attivano la SFKs, invece, attraverso l'azione sulla protein chinasi C (PKC). Entrambe le azioni conducono alla fosforilazione della tirosina, che modula le proprietà di apertura del recettore NMDA, attivazione mediata anche dal PKC e dal recettore dopaminergico D1. Da Herz and Chen, 2006.

# Parte II

## Obiettivi della ricerca

La reelina è una proteina di segnale che ha un ruolo importantissimo nello sviluppo del sistema nervoso durante l'embriogenesi e nel periodo postnatale (Quattrocchi et al., 2002), e ultimamente è diventata sempre più forte l'evidenza di una sua correlazione con l'autismo, la schizofrenia ed altre gravi patologie neurologiche e psichiatriche (Fatemi et al., 2005; Salinger et al., 2003; Heinrich et al., 2006; Botella-Lopez et al., 2006).

Il topo *reeler* presenta, per una mutazione spontanea, un'alterazione nella codificazione della proteina reelina tale che, in omozigosi, esso ne è completamente privo, mentre in eterozigosi ne esprime circa la metà di un animale normale (D'Arcangelo and Curran, 1998).

In considerazione del merito che i modelli animali hanno nel mostrare spesso le cause di patologie umane, pur talvolta non riproducendone la sintomatologia per differenze di specie, il topo *reeler* è stato spesso usato come modello murino di diverse malattie psichiatriche e neurologiche, con interessanti risultati. La convergenza di evidenze genetiche, morfologiche e comportamentali ha messo in luce l'utilità del topo omozigote nello studio dell'autismo (Fatemi et al., 2005; Bartlett et al., 2004; Salinger et al., 2003); mentre il parziale deficit di reelina a livello corticale e le anomalie a carico del sistema dopaminergico mesolimbico hanno suggerito una correlazione fra l'animale *reeler* eterozigote ed il paziente schizofrenico (Ballmaier et al., 2002). Inoltre, l'uso di questo animale si è anche rivelato utile nello studio dei disturbi dell'umore (Guidotti et al., 2000), del Morbo di Alzheimer (Rice and Curran, 2001; Botella-Lopez et al., 2006) e dell'epilessia del lobo temporale (Heinrich et al. 2006).

In questo modello murino è stata osservata più di una anomalia nell'espressione della plasticità sinaptica ippocampale (Weeber et al., 2002; Beffert et al., 2005). Infatti, la mancanza di reelina e un'alterata distribuzione neuronale della stessa può determinare alterazioni nella plasticità sinaptica, considerato il ruolo importantissimo che questa proteina riveste nella corretta locazione delle sinapsi durante e dopo lo sviluppo.

Nello striato la reelina e' presente ad alte concentrazioni sia nella parte ventrale che in quella dorsale (Ballmaier et al., 2002). Inoltre, lo striato è un'area che riveste enorme importanza sia per la progettazione e la messa in atto dell'attività motoria, che per l'apprendimento ed il ricordo di essa.

La plasticità corticostriatale, che si osserva dopo stimolazione ad alta frequenza delle afferenze glutammatergiche che dalla corteccia si dirigono allo striato, è considerata la base cellulare di questa funzione cognitiva neostriatale (Calabresi et al., 1992a).

L'osservazione che il topo *reeler* omozigote ha un profondo deficit nelle funzioni motorie, insieme all'evidenza che in questo animale manca totalmente la reelina, ci ha portato a considerare come una delle sue possibili disfunzioni un' alterazione della plasticità corticostriatale.

Approfondendo questa ipotesi speriamo di capire che cosa possa determinare a livello sinaptico i deficit motori e cognitivi in questo animale privo di reelina e che la comprensione dei meccanismi che determinano quest'anomalia possa aiutare a comprendere meglio il ruolo della reelina nella plasticità sinaptica e, soprattutto, nelle patologie con le quali è strettamente correlata, quali l'autismo e la schizofrenia.

# Materiali e Metodi

## Animali

Sono stati utilizzati topi del ceppo B6C3Fe (*reeler*) maschi, adulti (2-4 mesi di età), omozigoti per la mutazione del gene *RELN* (*rl/rl*), ed i congeneri wild type (+/+).

Le coppie fondatrici all'origine della colonia di topi *reeler* utilizzati sono state ottenute dai Laboratori Jackson (Bar Harbor, Maine, U.S.A), e sono portatrici della mutazione *rl<sub>jx</sub>* in un background inbred C57/B16. Gli animali sono stati stabulati in stanze con ciclo luce-buio di 12 ore (luce dalle h 8.00 alle h 20.00), temperatura di  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidità relativa di  $60 \pm 10\%$ . Cibo e acqua sono stati disponibili *ad libitum*. Gli animali sono stati tenuti in gabbie di plexiglas trasparente (33 x 13 x 14 cm), con coperchio in griglia di alluminio e con lettiera in segatura.

Tutti gli esperimenti sugli animali descritti sono stati effettuati nel rispetto della direttiva 86/609/EEC dello European Communities Council sull'uso degli animali nella ricerca.

## Screening genico

La genotipizzazione per la mutazione *reeler* è stata realizzata tramite tecniche di PCR (polymerase chain reaction) su DNA estratto da un frammento di coda. Il tessuto, conservato a  $-80^\circ\text{C}$ , è stato digerito con proteinasi K 400  $\mu\text{g/ml}$  in tampone costituito da 100 mM Tris-HCl, pH 8,5, 5 mM EDTA (acido etilene diamminotetracetico) 0,2% SDS, 200 mM NaCl, tenendolo in un bagno a  $55^\circ\text{C}$  per una notte. Il DNA è stato poi estratto e precipitato con una miscela di fenolo e cloroformio. Il prodotto di digestione è stato prima di tutto centrifugato per 10 min a 14.000 rpm e si è prelevato il sovrantante. Si è quindi aggiunta la miscela fenolo-cloroformio, preparata in rapporto 1:1, agitato il tutto per 3 min e centrifugato a 14.000 rpm per 10 min. Questa fase è stata ripetuta per tre volte. A questo punto al sovrantante è stato aggiunto acetato di sodio 3 M in un rapporto

1: 10 ed etanolo al 100%. La miscela è stata lasciata per 1-2h a -80°C. Dopo un'ulteriore centrifugazione a 14.000 rpm per 15 min si è isolato il precipitato e lo si è ridisciolti in ddH<sub>2</sub>O. La quantità di DNA ed il rapporto DNA/proteine sono state quindi determinate con lo spettrofotometro; la misurazione della concentrazione di DNA è stata fatta a 260 nm e quella delle proteine a 280 nm.

L'identificazione del gene *RLN* mutato è stata effettuata seguendo il protocollo di D'Arcangelo e coll. (1996) con piccole modificazioni. Per ogni animale è stato prelevato 1mg di DNA estratto, messo a reagire nel tampone di reazione (ddH<sub>2</sub>O sterile, tampone 10x – 100 mM Tris-HCL pH 8.3, 500 mM KCL, 15 mM MgCl<sub>2</sub>) contenente 10 mM dNTPs (desossiribonucleotidi), 20mM di primers oligonucleotidici e 5 U/ml Taq polimerasi ricombinante. Il primer forward (GM75) è in comune all'allele wild type e a quello mutato (sequenza 5' TAA.TCT.GTC.CTC.ACT.CTG.CC 3'); un primer reverse (3WI) è specifico per l'allele wild type (sequenza 5' ACA.GTT.GAC.ATA.CCT.TAA.TC 3'), mentre l'altro è specifico per l'allele *reeler* (sequenza 5'TGC.ATT.AAT.GTG.CAG.TGT.TG 3'). L'apparecchiatura di PCR utilizzata è la PTC-100 (MJR). Il programma di amplificazione è il seguente:

1 ciclo a 94°C per 5'

30 cicli a 94°C per 1' / 55°C per 2' / 72°C per 3'

1 ciclo a 72° per 10'

I prodotti di reazione sono stati quindi separati per mezzo di elettroforesi su gel di agarosio all'1,5%, caricando 10ml di campione per pozzetto e utilizzando come marker di riferimento per il peso molecolare il 100bp DNA ladder. Le bande sono state evidenziate per mezzo di colorazione con bromuro di etidio e visualizzate in luce UV per mezzo di un transilluminatore (Kodak EDAS 290). La PCR porta all'amplificazione di due frammenti di DNA uno di 280 bp, corrispondente all'allele wild type, e l'altro di 380 bp, corrispondente all'allele *reeler*.

## **Elettrofisiologia: tecnica di registrazione di field EPSP (potenziale di campo post sinaptico eccitatorio)**

Gli esperimenti di elettrofisiologia sono stati effettuati *in vitro*, su fettine di tessuto comprendenti lo striato dorsale e la corteccia. La tecnica consisteva nella registrazione extracellulare di potenziali post sinaptici eccitatori di un gruppo di

cellule costituenti il campo target di osservazione (fEPSPs). Questa tecnica ha il vantaggio di essere di semplice applicazione e di permettere registrazioni di lunga durata. Il protocollo presenta diverse fasi:

### **Preparazione del tessuto**

Il tessuto è stato ottenuto da animali previamente anestetizzati con alotano e poi decapitati. L'encefalo è stato rimosso rapidamente e, con l'uso di un vibratomo, sono state fatte delle fettine (slices) coronali di 300  $\mu\text{m}$  di spessore in soluzione di fluido cerebrospinale artificiale (aCSF) a 20-25°C. Le slices sono state poi poste in un bagnetto termostato a 33°C fino al momento di essere trasferite per la registrazione. Durante la registrazione, la fettina veniva tenuta in una cameretta completamente immersa di aCSF termostato a 33°C e fluente a 3 ml/min. Durante tutte le procedure, la soluzione aCSF è stata mantenuta ossigenata da un gas composto da 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>.

La soluzione fisiologica di perfusione (aCSF) era così composta: NaCl 126 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM; MgCl<sub>2</sub> 1.2 mM; CaCl<sub>2</sub> 2.4 mM; KCl 2.5 mM; NaHCO<sub>3</sub> 18 mM; glucosio 10 mM. pH 7.4.

Le sostanze sono state disciolte nell'aCSF alla loro concentrazione finale per mezzo di siringhe collegate al sistema di perfusione, e impiegavano circa 40 sec per raggiungere la camera di registrazione. Tutte le sostanze sono state applicate 20 min prima della somministrazione dell'HFS.

### **I fEPSPs**

I fEPSP sono stati evocati attraverso la stimolazione delle efferenze corticali verso lo striato, per mezzo di un elettrodo stimolante bipolare posto nella sostanza bianca fra la corteccia e lo striato a livello dorsomediale. Un microelettrodo registrante in vetro riempito di NaCl 2 M, della resistenza di 5-10 M $\Omega$  veniva posto nello striato, adiacente all'elettrodo stimolante.

I segnali evocati sono stati amplificati con un amplificatore Iso DAM8 (WPI), filtrati ad 1 kHz e acquisiti ed analizzati con il programma LTP (Anderson and Collingridge, 2001).

L'ampiezza del fEPSP viene definita come la media fra l'ampiezza da il picco positivo precedente a quello negativo, e l'ampiezza dal picco negativo a quello positivo successivo, secondo la definizione di Alger e Teyler (1976).

Durante gli esperimenti, è stato rilasciato uno stimolo ogni 60 secondi, della durata di 100-300  $\mu$ sec, a 10-30 V, tale da evocare una risposta che fosse circa il 50% di quella massimale. Dopo almeno 15 minuti di risposta stabile, si è somministrata la stimolazione ad alta frequenza (HFS) con le seguenti caratteristiche: 3 treni di scariche della durata di 1 sec, 100 Hz, intervallati da 6 sec. Solo durante la somministrazione dell'HFS è stata usata come stimolazione quella necessaria ad evocare la risposta massimale. Dopo la somministrazione dell'HFS si è continuato a registrare per minimo 60 min con i parametri della stimolazione di base.

Per avere un indice dell'attività presinaptica sono state anche somministrate 3 coppie di stimoli (paired pulse) con le stesse caratteristiche della stimolazione base (gli elementi di ogni coppia intervallati da 50 msec) prima dell'inizio di ogni esperimento. Due stimoli così appaiati forniscono una forma di plasticità, che può essere nel senso di una facilitazione (PPF, dove la risposta al secondo stimolo è maggiore di quella al primo stimolo), o nel senso di una depressione (PPD, dove la seconda risposta è inferiore alla prima). Si tratta di un fenomeno puramente presinaptico (Isaac et al., 1998), ed è spesso usato per monitorare i cambiamenti presinaptici nell'applicazione di protocolli di plasticità sinaptica. Molte sinapsi inibitorie rilascianti GABA esprimono una PPD, un processo attivo controllato dagli autorecettori GABAergici. Il GABA rilasciato dal primo stimolo ritornerebbe ai terminali presinaptici, attivando gli autorecettori GABA<sub>B</sub> e inibendo l'ulteriore rilascio di neurotrasmettitore. Questo effetto ha un caratteristico corso temporale che si aggira fra i 20 e i 200 msec (Davies et al., 1998).

La variazione relativa nell'ampiezza del potenziale di field è stata effettuata confrontando la risposta media normalizzata misurata dai 45 ai 60 min dopo l'HFS e la risposta media misurata i 15 min prima dell'HFS. Il criterio usato per stabilire l'induzione di LTP, LTD o nessun cambiamento era basato su una percentuale di variazione del 15% rispetto alla baseline sui valori normalizzati. Degli stimoli accoppiati è stato calcolato il rapporto dell'ampiezza del secondo stimolo sull'ampiezza del primo. Le differenze fra i gruppi sono state valutate con

l'applicazione del Test t di Student. Le analisi quantitative all'interno di ogni gruppo sulla modificazione plastica (LTP, LTD o nessun cambiamento) sono state effettuate con l'analisi binomiale.

## **Immunoistochimica e morfologia**

Gli animali sono stati anestetizzati con una miscela di ketamina e medetomidina e successivamente perfusi attraverso il ventricolo cardiaco sinistro con PBS (phosphate buffered saline) 1X per 1min, seguito da una soluzione al 4% di paraformaldeide e 0.5% di glutaraldeide per 5 min. Gli encefali sono stati immediatamente prelevati e immersi nello stesso fissativo e lasciati per una notte. Il mattino seguente sono stati immersi in una soluzione crioprotettiva di saccarosio al 30% per 48 ore e successivamente congelati a -80°C. Sono state effettuate dagli encefali delle sezioni coronali di 50 µm. Le cellule positive per la parvalbumina (PV<sup>+</sup>) sono state identificate immunoistochimicamente con il metodo della avidina-biotina perossidasi modificato. In breve, dopo un lavaggio in PBS, le sezioni sono state immerse in PBS con albumina di siero bovino per 1 ora, per bloccare gli antigeni non specifici, e successivamente sono state incubate con un anticorpo murino monoclonale antiparvalbumina (diluito in PBS 1:10000). Dopo essere state incubate a 4°C per tutta la notte, le sezioni sono state lavate con PBS, poi incubate per 1 ora a temperatura ambiente con un anticorpo secondario biotinilato antimurino (diluito in PBS 1:200). Dopo lavaggio con PBS, le sezioni sono state incubate a temperatura ambiente con il complesso avidina DH-biotina perossidasi (diluito in PBS 1:100) per 30 min. Dopo un ulteriore lavaggio con PBS i prodotti immunoreattivi sono stati visualizzati per mezzo di un'incubazione a temperatura ambiente in soluzione di PBS 0.1 M con 0.05% di 3,3'-diaminobenzidina e 0.01% di perossido d'ossigeno.

La conta dei neuroni PV<sup>+</sup> è stata effettuata su sezioni striatali a tre diversi livelli lungo l'asse rostro-caudale, dove il rostrale corrisponde approssimativamente a 1.18 mm nell'Atlante Stereotassico di Topo (Paxinos and Franklin, 2001), l'intermedio è approssimativamente 0.02 mm, e il caudale -1.58 mm. La porzione intermedia dello striato è stata inoltre suddivisa in quattro sottoregioni: dorsolaterale, dorsomediale, ventrolaterale e ventromediale.

La densità dei neuroni PV<sup>+</sup> è stata determinata con lo Stereo Investigator System (MicroBrightField Europe e.K., Magdeburg, Germania). Ogni regione d'interesse è stata abbozzata a bassa risoluzione, e poi scannerizzata con un obiettivo 10X (100X di amplificazione totale) usando la funzione Meander scan. Tutte le cellule PV<sup>+</sup> entro la regione d'interesse sono state contate. La densità cellulare è stata determinata dividendo il numero delle cellule per l'area d'interesse.

## **Esperimenti comportamentali**

### **Il paradigma dell'evitamento attivo**

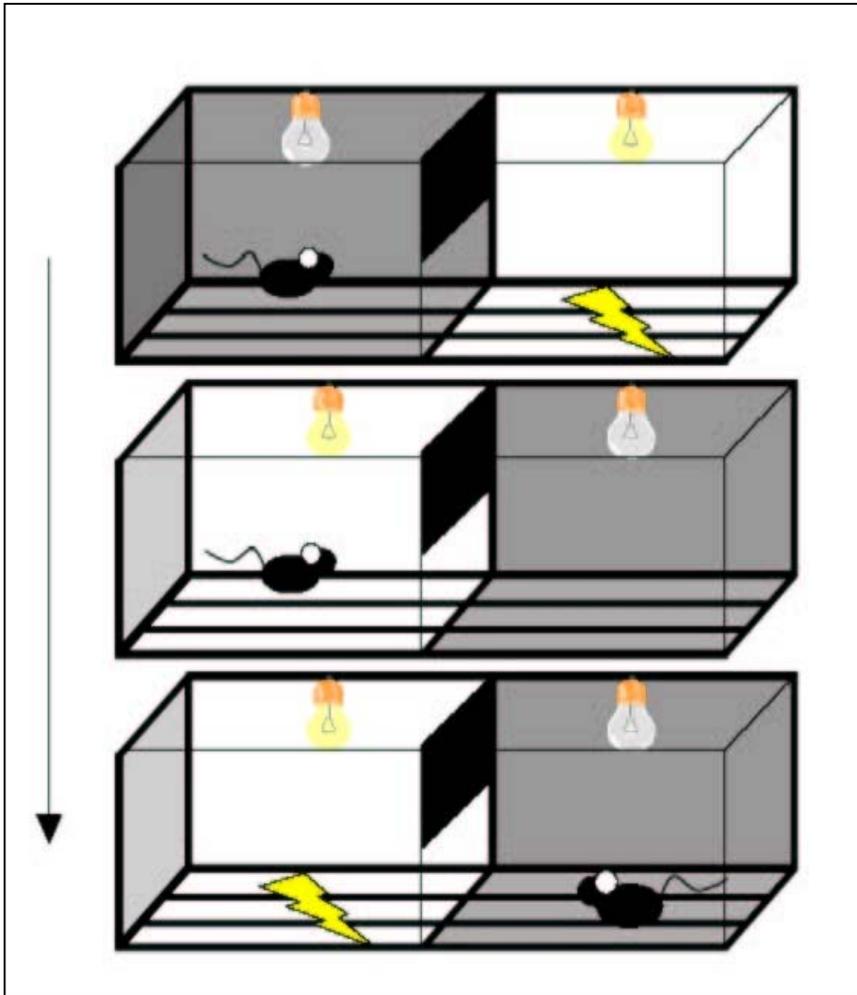
Questo test permette di valutare la capacità dell'animale di formare delle associazioni stimolo-risposta. Essendo lo striato coinvolto nella formazione dell'apprendimento associativo, il test permette quindi indirettamente di valutare l'integrità funzionale dell'area.

### **Procedura sperimentale**

Il dispositivo è una gabbia formata da due compartimenti rettangolari. Un'apertura nella parete divisoria permette l'accesso da un compartimento all'altro. Il pavimento è costituito da una griglia metallica che favorisce la somministrazione di un lieve shock elettrico (stimolo incondizionato, 0.7 mA, 25 sec). Una lampada (10 W) collocata sopra ogni compartimento assicura la presentazione di uno stimolo visivo (stimolo condizionato; schema 1).

La prova si svolge in tre giorni nel modo seguente: lo stimolo visivo viene presentato per 30 secondi in uno dei due scompartimenti. Dopo 5 secondi, un lieve shock somministrato tramite il pavimento costringe l'animale a fuggire nel compartimento non illuminato dove viene interrotta la somministrazione dello shock. L'apprendimento consiste nell'evitare lo shock fuggendo nel compartimento non illuminato durante i primi 5 secondi di presentazione dello stimolo visivo.

Gli animali hanno effettuato 90 prove di condizionamento nell'arco di 45 min per ogni sessione.



### **Schema 1**

Rappresentazione schematica del test dell'evitamento attivo.

Un segnale luminoso (30 s, 10 W) viene presentato in un compartimento (stimolo condizionato) 5 s prima dell'applicazione dello shock elettrico (0.7 mA, 25 s: stimolo incondizionato). La risposta di evitamento consiste nello scappare nella parte buia della gabbia (non elettrificata) prima della somministrazione dello shock.

# Parte III

## Risultati

### La trasmissione sinaptica eccitatoria nello striato del topo *reeler*

Lo striato riceve le principali afferenze eccitatorie dalla corteccia, attraverso terminali glutammatergici. La caratterizzazione del fEPSP striatale ha mostrato che questo è dipendente dall'attivazione dei recettori glutammatergici AMPA, ma non da quelli NMDA.

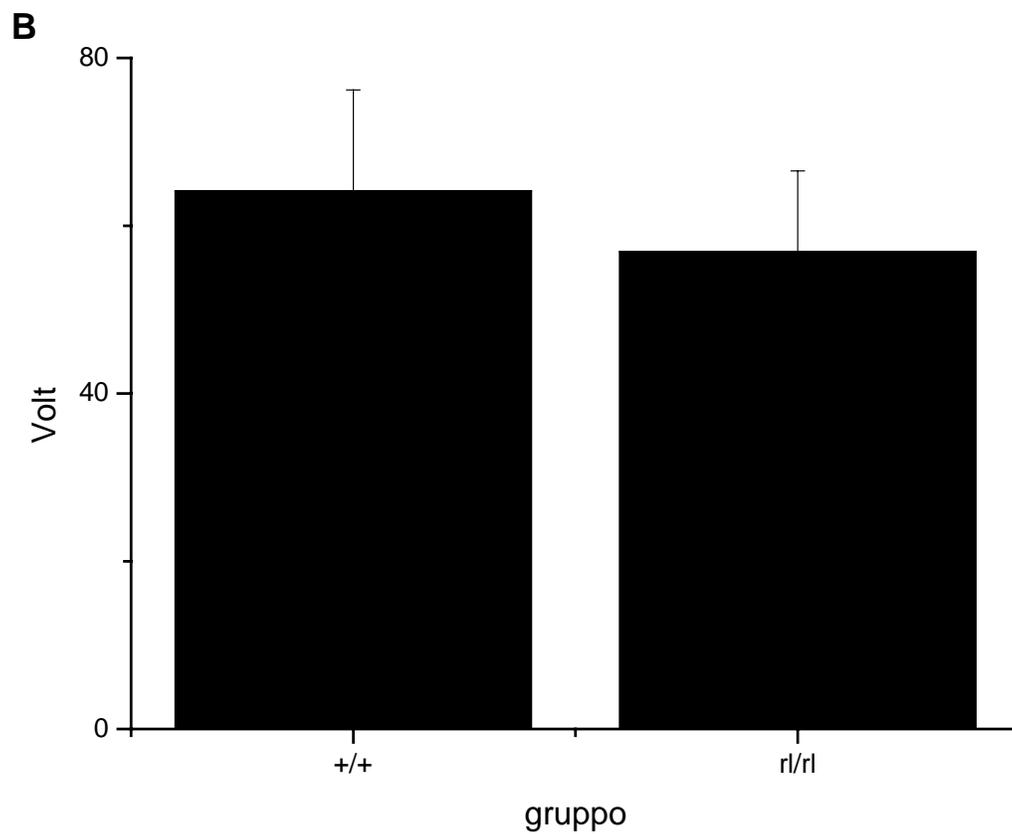
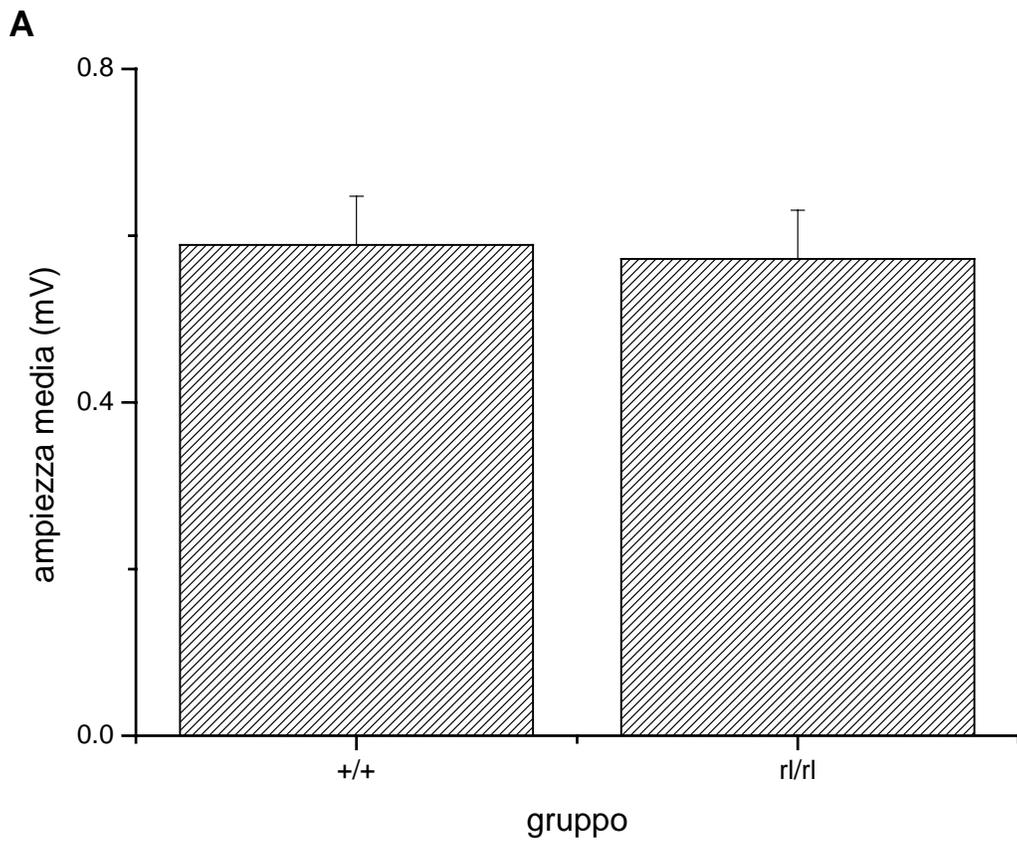
I fEPSPs evocati dalla stimolazione corticostriatale dei topi mutanti *rl/rl* e dei congeneri *+/+* non vengono modificati, nell'ampiezza, dalla somministrazione di un tipico antagonista dei recettori NMDA (l'acido D-2-amino-5-fosfonopentanoico, DAP5, 50  $\mu$ M); mentre la risposta si riduce fino a scomparire quando viene applicato l'antagonista dei recettori AMPA CNQX (6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-dione, 10  $\mu$ M).

Questi dati sono serviti a confermare che la risposta striatale alla stimolazione del rilascio glutammatergico corticale presenta delle caratteristiche, in questo animale, conformi a quelle descritte in letteratura nel ratto (Calabresi et al., 1992a; Lovinger et al., 1993; Walsh, 1993).

Un'ulteriore eventualità, oltre alla possibile anomalia nella circuiteria corticostriatale, era che vi fosse a priori una differenza nell'ampiezza del fEPSP fra gli animali *rl/rl* ed i congeneri *+/+*, o differenze nella stimolazione usata per ottenere questa risposta. Questa ipotesi ha quindi indotto all'osservazione di questi parametri nei due gruppi di animali, così che si è potuto accertare che non esistevano differenze fra i gruppi né nell'ampiezza media dei fEPSPs (considerata sulla baseline, al 50% del potenziale massimo), né nella stimolazione usata per ottenere le risposte (fig 1).

Le proprietà sinaptiche di base, considerate anche con la somministrazione di tre coppie di stimoli appaiati e separati da 50 ms, non hanno mostrato alcun cambiamento plastico: paired pulse facilitation (PPF) verso paired pulse

depression (PPD) o il contrario. Per i *rl/rl* la percentuale della media del rapporto fra il primo ed il secondo pulso (PPR) è stata di circa 94%, e per i WT di circa l'88%. Oltre a non esserci alcuna variazione plastica infragruppo, dunque, non ci sono neanche delle differenze fra i due gruppi in questo parametro.



**Fig 1**

I gruppi WT e *rl/rl* non si differenziano per l'ampiezza dei fEPSPs (A), né per la stimolazione necessaria a sollecitarli (B). Da Marrone et al., 2006.

## Caratterizzazione della plasticità sinaptica nel topo *reeler*:

### *LTP corticostriatale*

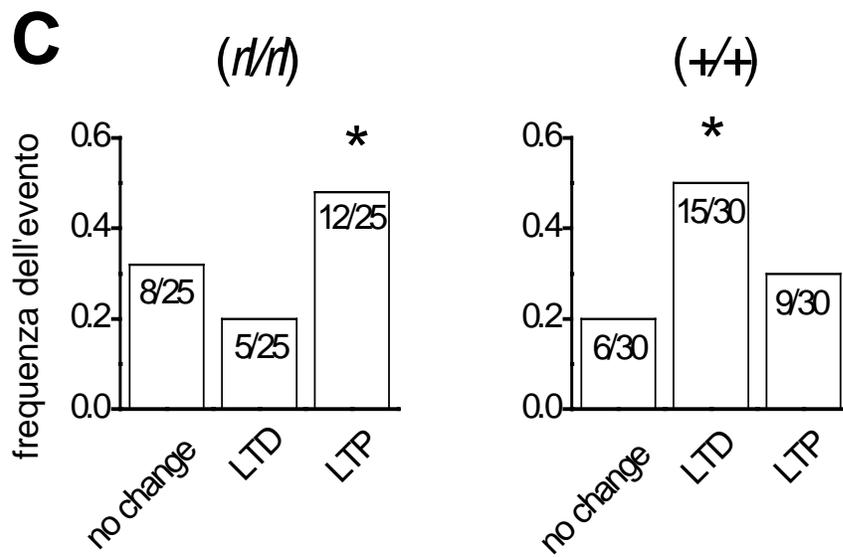
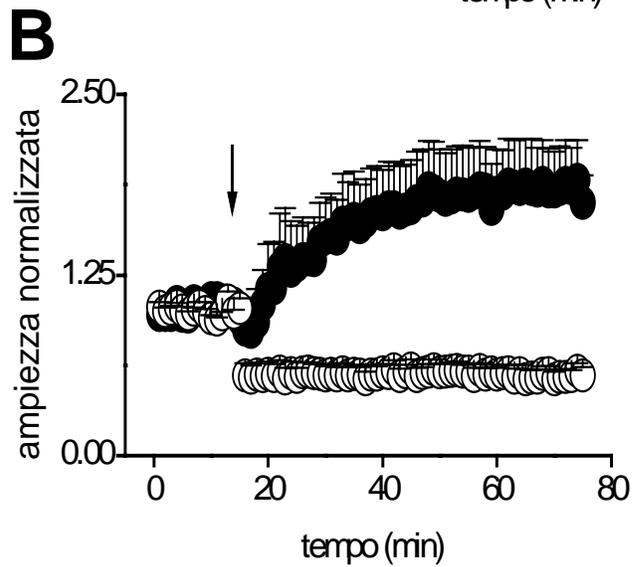
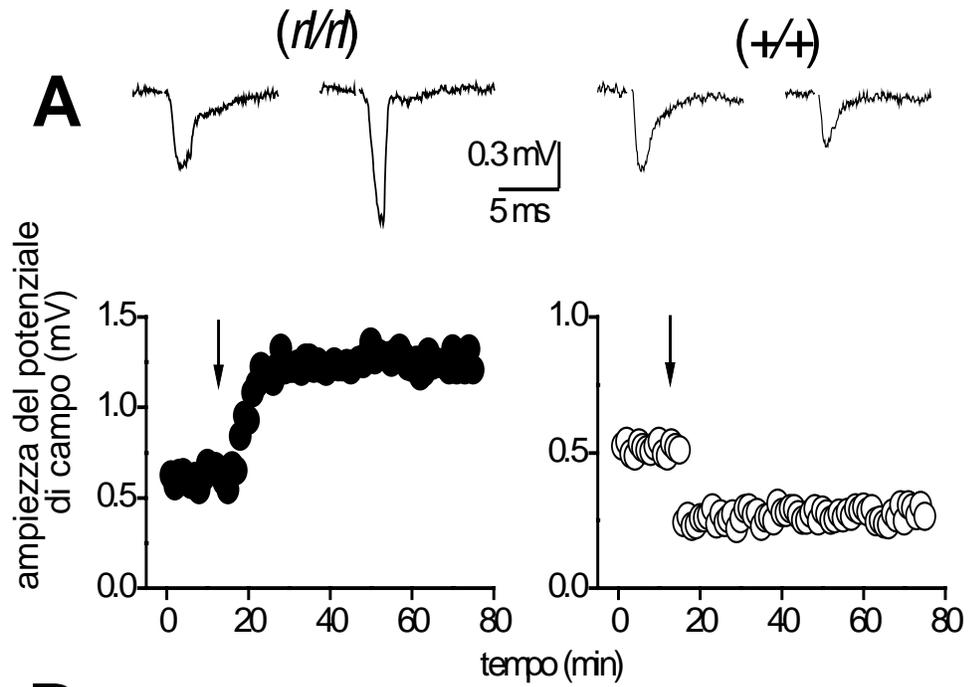
La somministrazione di un treno di scariche ad alta frequenza (HFS) sulle fettine ottenute dai topi *rl/rl* induce un potenziamento a lungo termine dell'efficacia sinaptica, a differenza degli esperimenti effettuati sulle fettine del gruppo *+/+* (fig 2A-B).

L'LTP indotto nel soggetto *rl/rl* è di ampia entità (circa il 186% della baseline, misurato sulle medie dei valori normalizzati). Sebbene questa risposta non sia assoluta, ma si presenti in 12/25 esperimenti, si tratta della risposta plastica prevalente in queste condizioni (5/25 esperimenti mostrano LTD, 8/25 non presentano alcun cambiamento nell'efficacia sinaptica).

Negli animali *+/+*, invece, l'applicazione dello stesso protocollo di stimolazione induce preferenzialmente LTD (in 15/30 esperimenti), LTP in 9/30 e nessun cambiamento (NO CHANGE) in 6/30 esperimenti (fig 2C).

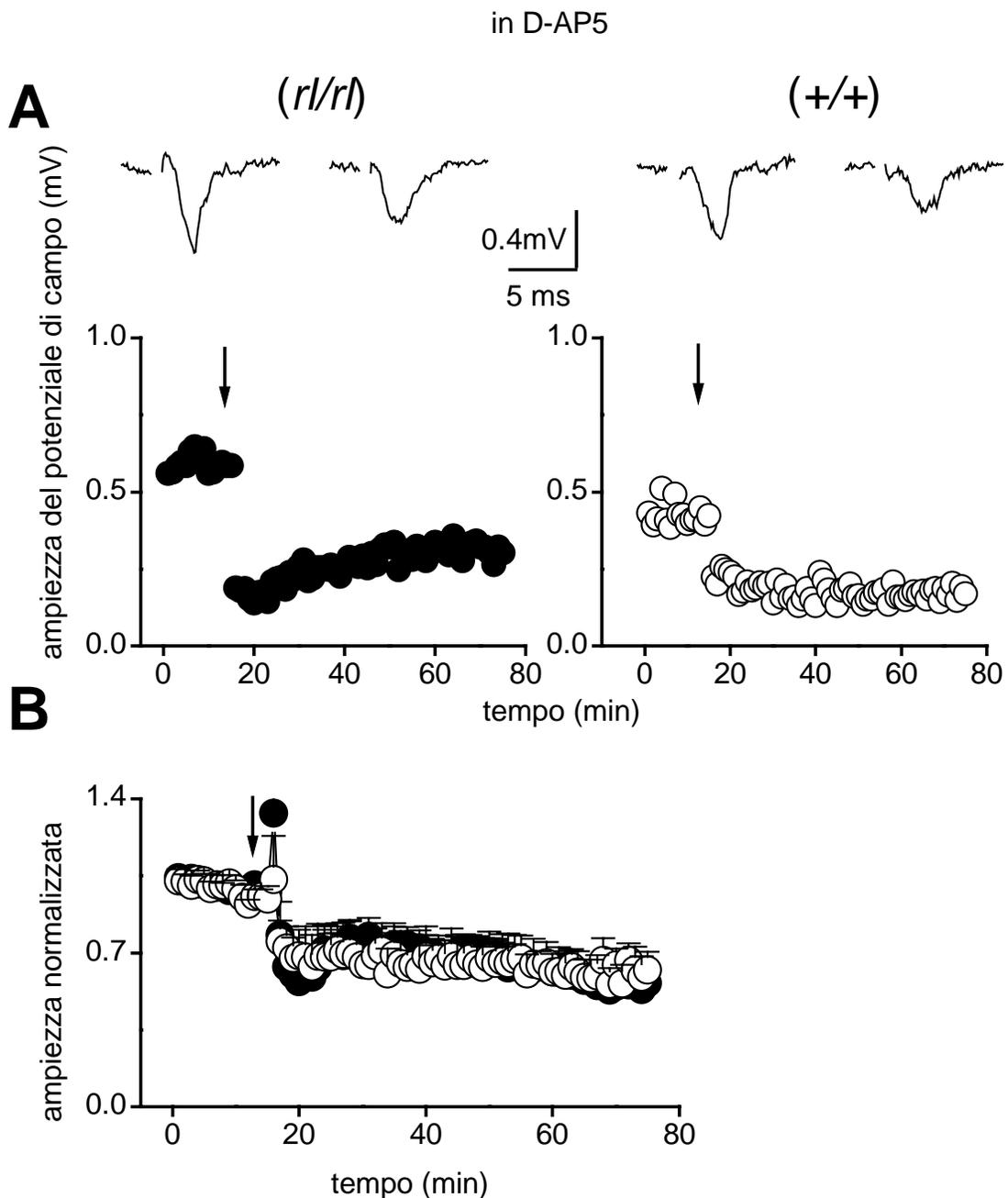
### **Fig 2:**

LTP nei topi *reeler*. (A) Le tracce mostrano un esempio di field EPSP prima e dopo l'applicazione dell'HFS nel topo mutante (*rl/rl*) e nel wild type (*+/+*), mentre subito sotto le ampiezze dei fEPSP in esperimenti singoli mostranti la LTP dei *rl/rl* e la LTD tipica dei *+/+*; le frecce indicano l'applicazione dell'HFS. (B) Il pannello mostra la media (e l'errore standard) delle ampiezze normalizzate degli esperimenti nei due gruppi. I pallini neri indicano i (*rl/rl*), quelli bianchi i (*+/+*). (C) Gli istogrammi mostrano la frequenza di presentazione dell'LTP, LTD e NO CHANGE nei due gruppi in seguito al treno di stimoli. L'asterisco sopra la barra indica che vi è significatività statistica (analisi binomiale) nella presentazione di una modificazione sinaptica all'interno di un gruppo. Da Marrone et al., 2006.



Come si è visto in letteratura, l'LTP corticostriatale dipende, come quello ippocampale, dalla liberazione del blocco ai recettori NMDA indotto dagli ioni  $Mg^{++}$  (Calabresi et al., 1992b; Charpier and Deniau, 1997; Charpier et al., 1999; Centonze et al., 2001).

Visti i numerosi deficit caratterizzanti l'anatomia e la fisiologia del sistema nervoso dei *reeler*, si è considerato utile valutare un eventuale coinvolgimento dei recettori NMDA anche nell'LTP dei soggetti mutanti. Con la somministrazione dell'antagonista D-AP5 (50  $\mu$ M), si è visto un completo capovolgimento nella risposta sinaptica dopo l'HFS. Infatti, in questa condizione la risposta LTD si è presentata nella maggior parte degli esperimenti (12/16, mentre i rimanenti 4 non hanno presentato alcun cambiamento nell'ampiezza del potenziale del field (fig 3). Inoltre l'ampiezza media dei fields nella LTD dei topi *rl/rl* trattate con il D-AP5 (il 57.38% della baseline) è sostanzialmente la stessa di quelle osservate nelle fettine di *+/+* (55.15% della baseline). Questi esperimenti dimostrano che i recettori NMDA sono coinvolti nella risposta predominante nei topi *reeler* (LTP) e che l'antagonismo del recettore NMDA è sufficiente per ripristinare una condizione di controllo (LTD) nell'alterazione della plasticità del *reeler*.



**Fig 3**

La somministrazione dell'antagonista del recettore NMDA DAP5 (50  $\mu$ M) previene l'induzione dell'LTP nei *rl/rl*. (A) L'applicazione dell'HFS (freccia) in presenza di DAP5 induce LTD in entrambi i gruppi *rl/rl* e *+/+*. Le tracce in alto mostrano un esempio di fEPSP prima e dopo l'applicazione dell'HFS. (B) La media (+ ES) dei valori normalizzati delle ampiezze dei fEPSP mostra che non c'è differenza nell'entità dell'LTD del gruppo di controllo *+/+* e in quella indotta nei *rl/rl* in presenza di DAP5. Da Marrone et al., 2006.

*Un aumento dei livelli di GABA endogeno riduce la frequenza di induzione dell'LTP nei topi reeler*

Diversi studi precedenti a questo avevano mostrato un'alterazione del sistema GABAergico nel topo *rl/rl*, con livelli recettoriali ridotti sia nello striato che nell'ippocampo, ed una diminuzione nella frequenza del turnover GABAergico striatale (Carboni et al., 2004; Gilerovich and Grigor'ev, 2005; Pascual et al., 2004; Guidotti et al., 2005).

Per questo motivo sono stati effettuati degli esperimenti focalizzati a stabilire se l'LTP osservata nei *reeler* potesse essere imputata ad un'alterazione in questi animali della funzionalità GABAergica.

La tiagabina, è un inibitore del GAT-1, il più diffuso trasportatore del GABA. Il suo effetto è conseguentemente quello di aumentare la permanenza di GABA a livello sinaptico, e quindi la sua disponibilità. Per questo motivo è un farmaco utilizzato nel trattamento delle epilessie.

La tiagabina (30  $\mu$ M) è stata somministrata *in vitro* sulle fettine dei soggetti mutanti *rl/rl*. In queste condizioni diminuisce sensibilmente il numero di esperimenti in cui è stata osservata LTP dopo il treno di scariche. Rispetto ai mutanti in controllo (12/25 LTP), nelle fettine trattate con tiagabina la frequenza di LTP e' significativamente ridotta (4/10 esperimenti; fig 4B).

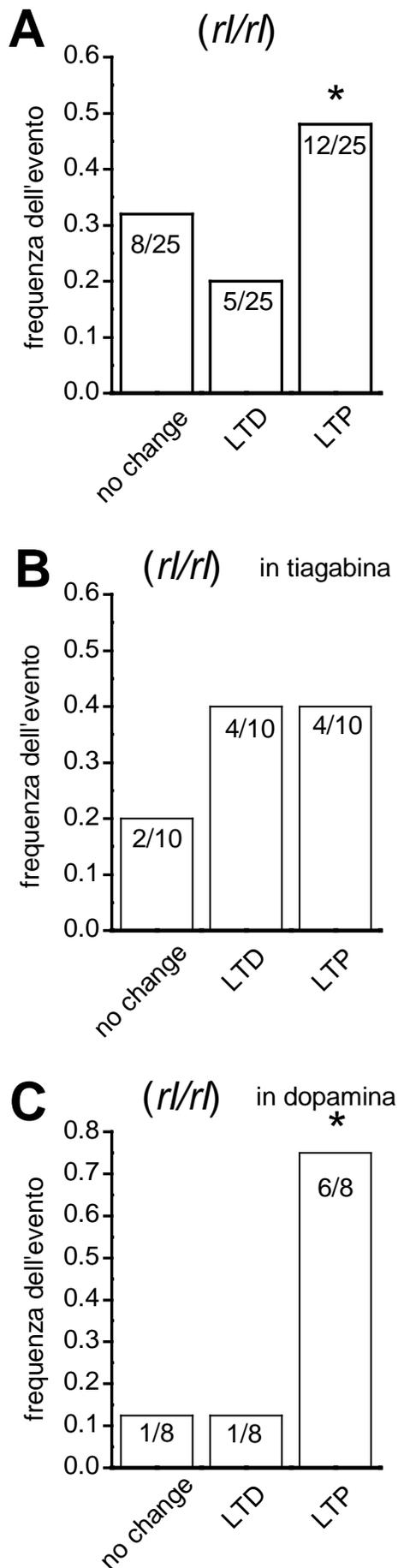
Questa osservazione suggerisce un coinvolgimento del GABA nella plasticità striatale dei soggetti mutanti, in particolare un deficit del sistema GABAergico potrebbe essere il responsabile dell'alterazione nella plasticità corticostriatale osservata sui soggetti mutanti *rl/rl*.

*La dopamina non e' coinvolta nell'induzione dell'LTP striatale nei topi reeler*

Come si è già accennato in riferimento alla letteratura, il mutante *reeler* presenta un'alterazione delle fibre dopaminergiche (Nishikawa et al., 2003), condizione che potrebbe portare ad una deficienza nella stessa trasmissione dopaminergica nigrostriatale e, come è stato osservato in altri lavori (Calabresi et al., 1997b;

Centonze et al., 2001; Kerr and Wickens, 2001), essere il motivo dell'induzione dell'LTP nei topi *reeler*.

Prendendo in considerazione questa possibilità, abbiamo effettuato gli stessi esperimenti di cui sopra, in presenza di dopamina (30  $\mu$ M) in fettine corticostriatali degli animali mutanti (*rl/rl*). Nonostante l'aggiunta di dopamina esogena, si è ugualmente osservata l'induzione di LTP nei soggetti mutanti nella maggior parte degli esperimenti (6/8). Questi risultati escludono l'ipotesi del deficit dopaminergico come causa dell'induzione dell'LTP in questi topi (fig 4C).



**Fig 4**

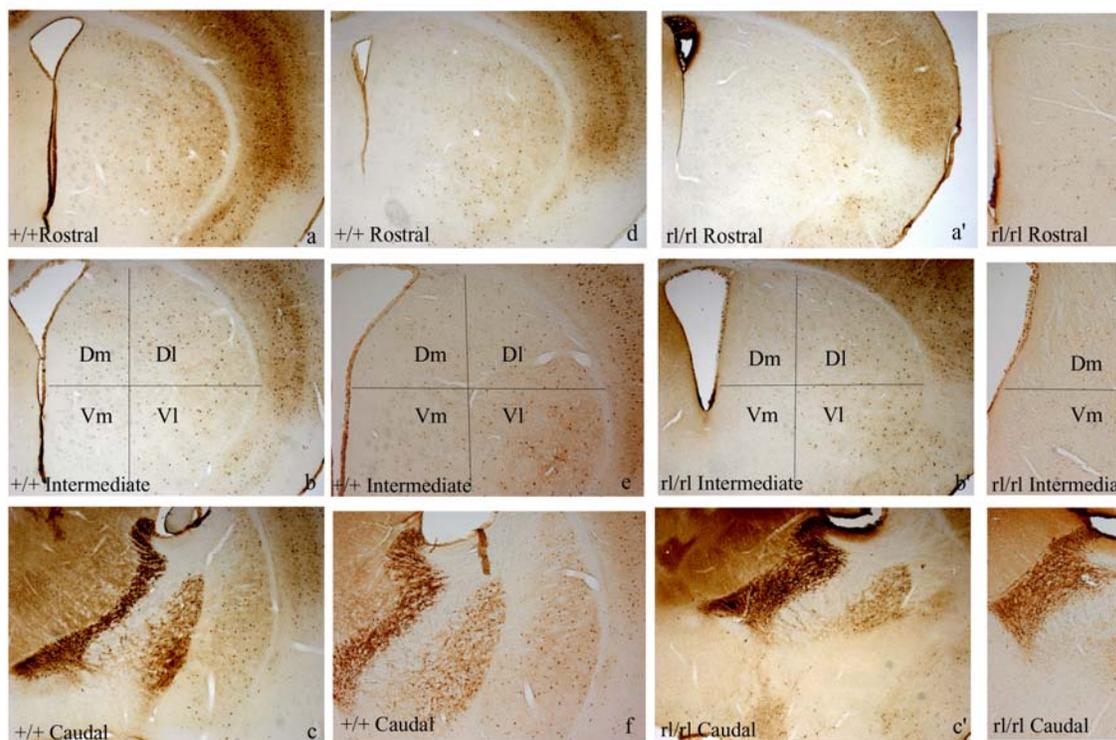
La somministrazione della tiagabina (30  $\mu$ M), bloccante della ricaptazione del GABA, diminuisce la frequenza di osservazione della LTP nei *rl/rl*. Al contrario, la somministrazione di dopamina (30  $\mu$ M) non ha alcun effetto. Gli istogrammi mostrano il numero di casi in cui la somministrazione dell'HFS induce LTP, LTD o non induce alcun cambiamento dell'efficacia sinaptica (NO CHANGE). (A) Negli esperimenti di controllo vi è una preponderanza di LTP rispetto agli altri eventi. (B) In presenza di tiagabina questa preponderanza scompare, mentre persiste in presenza di dopamina (C). Gli asterischi indicano significatività statistica nel numero di osservazioni della LTP rispetto agli altri eventi. Da Marrone et al., 2006.

## **Alterazione della distribuzione e dell'espressione degli interneuroni GABAergici parvalbumina-positivi**

Fra gli interneuroni presenti nello striato, una piccola parte di questi esprimono GABA e parvalbumina (PV). Nonostante siano solo una minima parte dei neuroni neostriatali (circa il 3-5% del totale), costituiscono comunque la maggiore fonte inibitoria in quest'area (Kawaguchi et al., 1995; Koos and Tepper, 1999).

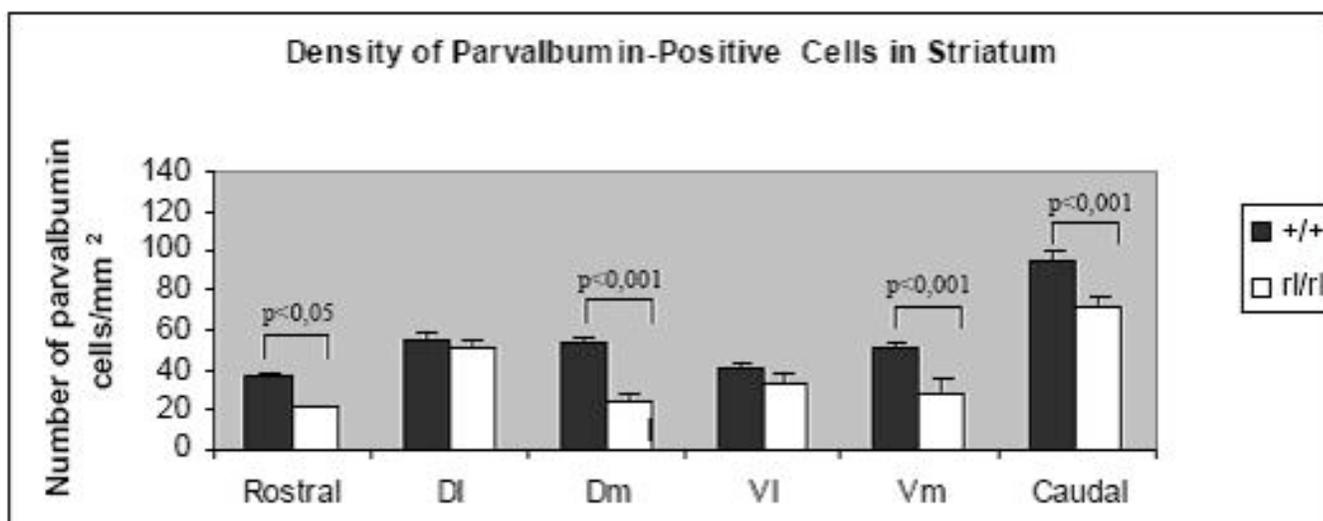
In seguito ai risultati ottenuti con l'analisi elettrofisiologica del deficit GABAergico negli animali *reeler* omozigoti, sono state condotte misurazioni anatomiche sulla distribuzione e numero di questi neuroni inibitori, la cui identificazione è stata effettuata con l' anticorpo parvalbumina (Cowan et al., 1990; Kawaguchi et al., 1995). Con la collaborazione del laboratorio di Neuroscienze dello Sviluppo dell'Università Campus Bio-Medico di Roma, diretto dal prof. Keller, si è proceduto alla caratterizzazione morfologica di queste cellule positive per la parvalbumina (PV<sup>+</sup>) nello striato di questi animali (*rl/rl* e *+/+*).

L'analisi immunohistochemica ha evidenziato una significativa diminuzione del numero di interneuroni PV<sup>+</sup> nel neostriato dei topi mutanti *reeler* rispetto ai congeneri wild type. L'area di densità delle cellule contenenti parvalbumina è stata studiata a diversi livelli dello striato lungo l'asse rostro-caudale utilizzando metodi di conteggio stereologico, mostrando una significativa differenza di densità cellulare fra i *rl/rl* ed i *+/+* in quasi tutte le sottoregioni striatali: rostrale (-40.9%), dorsolaterale (DI; -9.1%), dorsomediale (Dm; -56.2%), ventrolaterale (VI; -18.8%), ventromediale (Vm; -46.3%) e caudale (-25.3%); mentre non si è osservata nessuna differenza per le aree striatali laterale e la porzione intermedia (figg. 5-7).



**Fig 5**

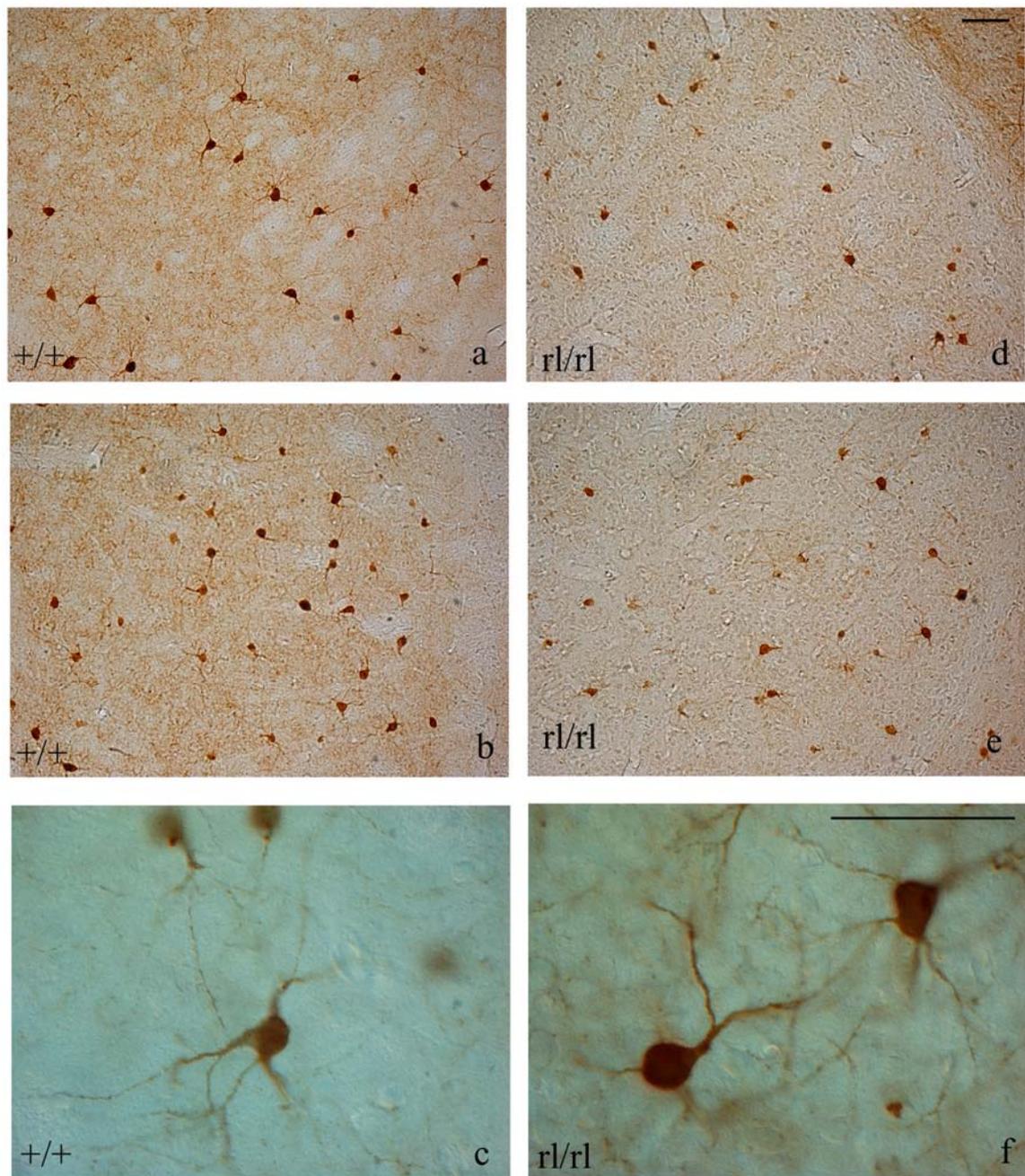
Interneuroni PV<sup>+</sup> in sezioni coronali di striato di topi *rl/rl* (a'-f') e congeneri wild type (+/+, a-f). La conta delle cellule positive per la parvalbumina è stata fatta nelle regioni striatali rostrale (a, a', d, d'), caudale (c, c', f, f'), e in diverse regioni intermedie: dorsolaterale, dorsomediale, ventrolaterale e ventromediale (b, b', e, e'). Nel topo *rl/rl* si è osservata una riduzione degli interneuroni GABAergici nelle aree striatali rostrale, caudale, Dm e Vm. Da Marrone et al., 2006.



**Fig 6**

Densità degli interneuroni GABAergici PV<sup>+</sup> in sezioni coronali dello striato di topi *rl/rl* e *+/+*. Le cellule PV<sup>+</sup> sono state contate nelle regioni striatali rostrale, caudale, e in diverse regioni intermedie: dorsolaterale, dorsomediale, ventrolaterale e ventromediale. È stata trovata una riduzione statisticamente significativa nella densità degli interneuroni GABAergici PV<sup>+</sup> nei soggetti *rl/rl* confrontati con i *+/+* nelle regioni rostrale e caudale, Dm e Vm. Da Marrone et al., 2006.





**Fig 7**

Ingrandimento degli interneuroni PV<sup>+</sup> in sezioni coronali di striato da topi *rl/rl* (d-f) e +/+ (a-c). Da Marrone et al., 2006.

## **Deficit di apprendimento condizionato nel topo *reeler***

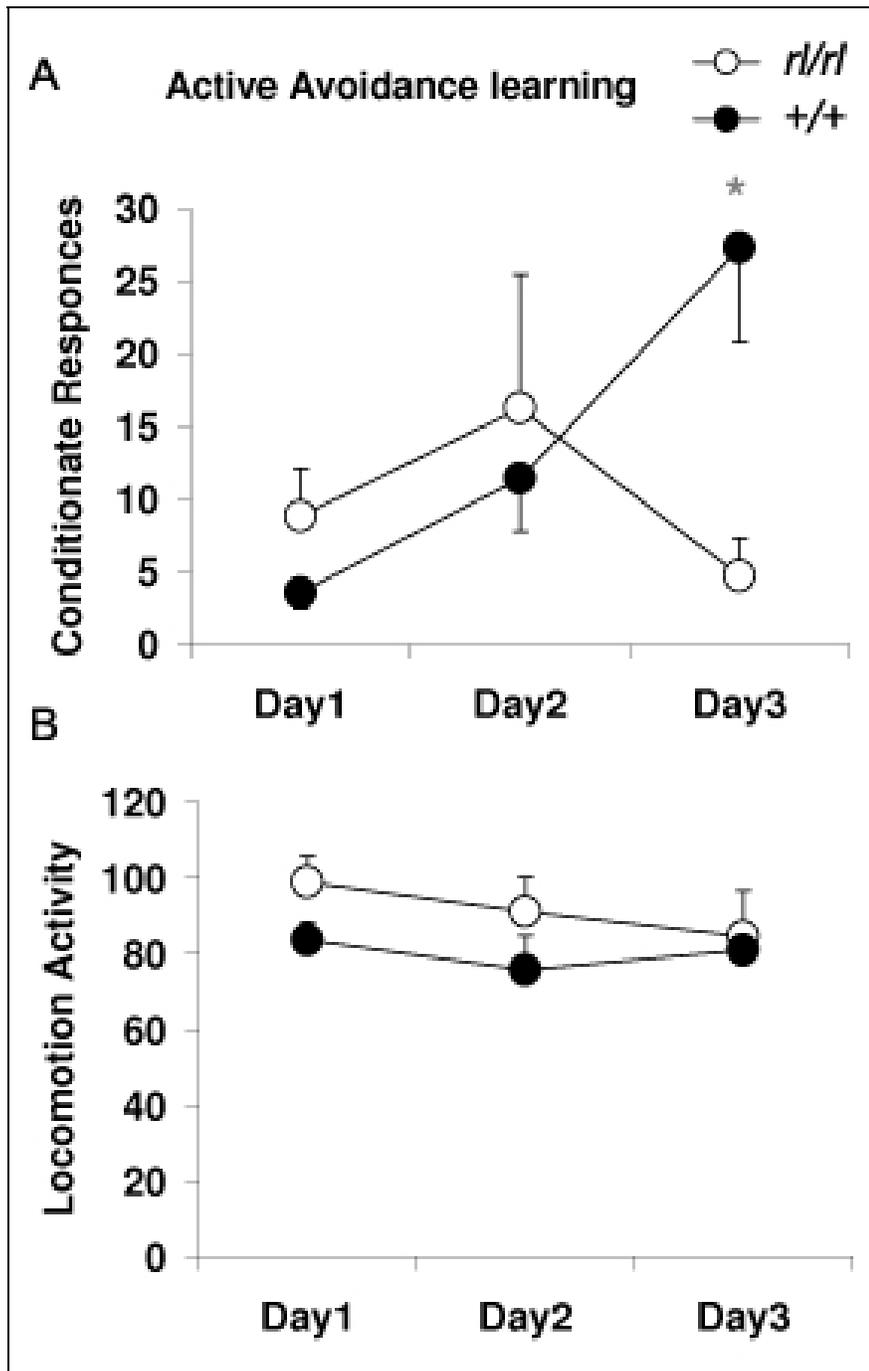
Il test dell'evitamento attivo è usato per valutare l'apprendimento associativo ed è ampiamente considerato come una valutazione indiretta della funzionalità delle strutture fronto-striatali.

Questi esperimenti sono stati svolti in collaborazione con il Laboratorio di Psicobiologia e Psicofarmacologia del CNR di Roma, diretto dalla prof. Ammassari-Teule.

Il numero delle risposte condizionate durante le sessioni del test dell'evitamento attivo è stato monitorato, mostrando che vi era un significativo aumento delle risposte corrette di associazione stimolo incondizionato-stimolo condizionato (SI-SC) col passare del tempo per entrambi i gruppi sperimentali. Nonostante questo, si è osservata una significativa differenza fra i due gruppi nelle prestazioni, in quanto gli animali *reeler* hanno effettuato un numero significativamente inferiore di risposte condizionate rispetto ai loro congeneri wild type.

Anche il numero di attraversamenti della gabbia di condizionamento è stato monitorato, sia durante la presentazione dello stimolo condizionato che di quello incondizionato, per evitare che il deficit di associazione mostrato dai mutanti fosse da imputare alla loro difficoltà di movimento. Questo monitoraggio ha permesso di osservare che, nonostante l'andatura atassica e caracollante caratteristica degli omozigoti *reeler*, non vi era alcuna differenza nel numero di attraversamenti della gabbia che essi sono in grado di effettuare, rispetto ai loro congeneri +/+.

In questo studio è stata valutata un'altra possibile variabile, la soglia del dolore, nell'eventualità che il deficit associativo fosse da imputare ad una inferiore sensibilità al dolore dei soggetti mutanti. I risultati dimostrano che non ci sono differenze significative tra i *rl/rl* e i +/+ (fig 8).



**Fig 8**

Test dell'evitamento attivo nei topi  $rl/rl$  e  $+/+$ . (A) Media (+ SE) delle risposte di evitamento attivo nei tre giorni di test. Per ognuno dei due gruppi c'è una variazione significativa nel numero delle risposte di evitamento col passare dei giorni ma, mentre per i  $+/+$  vi è un progressivo e costante aumento, nei  $rl/rl$  vi è una netta diminuzione delle risposte condizionate il terzo giorno. (B) I valori corrispondono al numero di attraversamenti dei due compartimenti della gabbia operante, effettuati al presentarsi sia dello SC che dello SI. Non c'è alcuna differenza nell'attività motoria fra i due gruppi che possa far addurre a questo il deficit mostrato in A. Da Marrone et al., 2006.

## Discussione

Il risultato principale di questo studio è l'osservazione del potenziamento della plasticità sinaptica corticostriatale a lungo termine (LTP) nei topi mutanti *reeler* in seguito a stimolazione ad alta frequenza della via glutammatergica corticostriatale. Al contrario, i topi wild type esprimono preferenzialmente una depressione a lungo termine (LTD), fenomeno ampiamente descritto in letteratura (Calabresi et al., 1992a; Walsh, 1993; Lovinger and Tyler, 1996; Centonze et al., 2001; Geracitano et al., 2003; Wang et al., 2006). Sia nel topo *reeler* che nel suo congenere wild type la trasmissione sinaptica eccitatoria basale è mediata dall'attivazione dei recettori glutammatergici di tipo AMPA, come dimostrato sperimentalmente dalla completa abolizione del potenziale di campo ad opera dell'antagonista dei recettori AMPA, CNQX. Al contrario, il D-AP5, antagonista del recettore glutammatergico ionotropico NMDA, reverte la LTP dell'omozigote *rl/rl* in LTD. Questo risultato indica che la LTP nei *reeler* dipende dall'attivazione del recettore NMDA, come l'LTP precedentemente descritta nel ratto (Calabresi et al., 1992b; Pennartz et al., 1993; Kombian and Malenka, 1994; Geracitano et al., 2003).

È interessante notare che, nonostante una prevalente e significativa induzione di LTP, i *reeler* esprimono anche una forma di LTD, fenomeno che è NMDA-indipendente. Questo suggerisce che anche nei mutanti la LTD è presente, ma è mascherata dalla forte componente NMDA.

In realtà, nonostante vi sia un'ampia letteratura che afferma la preponderanza dell'LTD striatale in risposta alla stimolazione delle afferenze corticali, vi sono molti lavori che presentano una preferenza nell'induzione dell'LTP corticostriatale. Tale discordanza dipende dal tipo di tecnica sperimentale (*in vivo* o *in vitro*), dall'età e dalla specie animale, e dalla particolare sede di stimolazione o registrazione entro lo striato (Charpier and Deniau, 1997; Charpier et al., 1999; Akopian et al., 2000; Spencer and Murphy, 2000; Ding and Perkel, 2004; Fino et al., 2005).

Nonostante queste osservazioni, nel presente studio sono state caratterizzate due forme di plasticità: LTD, principalmente espressa nei wild type, e la LTP, principalmente espressa nei topi mutanti.

In letteratura sono presenti diversi studi che mostrano un'alterazione della plasticità sinaptica nell'ippocampo dei topi *reeler* (Weeber et al., 2002; Beffert et al., 2005). In particolare è stato osservato che la somministrazione di reelina esogena aumenta l'LTP ippocampale nei wild type, mentre animali knock out per i recettori della reelina VLDLR e APOER mostrano un deficit nell'LTP. Questi risultati sono in apparente contraddizione con quello riportato dal presente studio: l'LTP è indotto dalla mancanza di reelina. Alterazioni opposte della plasticità sinaptica dipendenti dal genotipo fra lo striato e l'ippocampo sono già state riportate. Il topo G93A+, modello animale per la Sclerosi Laterale Amiotrofica familiare (Gurney et al., 1994) presenta una diminuzione delle capacità mnestiche striato-dipendenti accompagnata ad un'LTP corticostriatale (Geracitano et al., 2003). Lo stesso animale presenta invece un aumento delle capacità di elaborazione dello spazio, con una più facile induzione dell'LTP ippocampale rispetto ai soggetti wild type (Spalloni et al., 2006).

Tra i meccanismi coinvolti nell'alterazione della plasticità corticostriatale del *reeler*, uno è la modulazione della trasmissione glutammatergica da parte della reelina, direttamente o attraverso un'alterazione di altri sistemi neurotrasmettitoriali. In particolare, i nostri dati mostrano che l'induzione dell'LTP corticostriatale nel *reeler* è significativamente ridotta quando aumentano i livelli di GABA, ad esempio in presenza di un antagonista del trasportatore del GABA, la tiagabina. Queste alterazioni della trasmissione GABAergica sono state confermate dai nostri studi di anatomia, che mostrano una riduzione della densità cellulare degli interneuroni GABAergici PV<sup>+</sup> nello striato del *reeler*. Insieme questi risultati suggeriscono che un'alterazione della trasmissione GABAergica striatale è in parte responsabile dell'alterata plasticità corticostriatale nei *reeler*. In accordo con questa ipotesi, è stato dimostrato che l'induzione dell'LTP è dipendente dall'entità dell'inibizione GABAergica nei neuroni dopaminergici del mesencefalo (Liu et al., 2005).

È interessante considerare che l'alterazione del posizionamento cellulare e della guida assonale che avvengono durante il primo periodo dello sviluppo potrebbero essere responsabili della maggiore LTP negli animali in cui manca la reelina. La distorta organizzazione neuronale e le afferenze corticali anomale potrebbero contribuire alla diminuzione della soglia di scarica e alla suscettibilità convulsiva dei neuroni corticali (Patrylo et al., 2006), facilitando così l'input corticale

eccitatorio allo striato durante ripetute stimolazioni elettriche. In considerazione di quanto detto la tiagabina, bloccando la ricaptazione del GABA, agirebbe diminuendo l'eccessiva eccitabilità corticale nei topi *reeler*.

La trasmissione sinaptica striatale potrebbe essere alterata anche se uno degli indici da noi usati per valutare le proprietà sinaptiche di base, la paired pulse ratio, non è diverso nei soggetti mutanti rispetto ai congeneri wild type. Questo rapporto fra i due pulsii somministrati alla distanza di 50 millisecondi, e quindi appaiati, permette di osservare l'attività presinaptica e, nelle sinapsi inibitorie, è dipendente soprattutto dall'azione esercitata dal GABA sugli autorecettori presinaptici. In questo senso, il fatto che gli animali usati in questo studio non presentano un rapporto fra i pulsii nel verso di una depressione, potrebbe significare che vi è un'alterazione nella trasmissione GABAergica anche nel soggetto wild type, che viene smascherata però solo durante una ripetuta stimolazione. La possibile alterazione della trasmissione GABAergica potrebbe facilitare l'induzione dell'LTP negli animali mutanti solo quando sia gli input glutammatergici che quelli GABAergici sono simultaneamente attivati dal protocollo di stimolazione ad alta frequenza.

Poiché la mutazione reelinica coinvolge gli interneuroni GABAergici, che esercitano un controllo inibitorio sulle proiezioni neostriatali, (Koos and Tepper, 1999), l'effetto finale può consistere in un aumento a lungo termine nella forza della trasmissione sinaptica eccitatoria a livello delle sinapsi corticostriatali (vedi schema 1).

La conferma di questa ipotesi richiederebbe il confronto sulla frequenza e l'ampiezza degli eventi sinaptici spontanei eccitatori ed inibitori fra i topi *reeler* ed i soggetti di controllo wild type. Confronto che non è stato possibile realizzare in questo studio per via delle difficoltà tecniche legate alla registrazione in patch clamp degli spiny neurons striatali nell'animale adulto.

Considerato che sia l'LTD (Calabresi et al., 1992a; Kreitzer and Malenka, 2005) che l'LTP (Wickens et al., 1995; Spencer and Murphy, 2000; Kerr and Wickens, 2001) corticostriatale sono controllati dalla trasmissione dopaminergica, un'altra spiegazione dell'anomalia nella plasticità sinaptica a lungo termine dei topi *reeler* potrebbe essere data da un difetto in queste sinapsi. Ad esempio, il dato che la reelina sia differentemente concentrata nello striato in matrici e patches (Nishikawa et al., 2003) suggerisce che in assenza di questa proteina lo sviluppo

dell'organizzazione dei compartimenti striatali e il loro relativo contenuto di dopamina potrebbe essere alterato. Gli esperimenti che abbiamo effettuato in presenza di dopamina esogena sui topi *reeler*, però, dimostrano che un'eventuale alterazione del tono dopaminergico non influisce sull'induzione dell'LTP striatale in questi mutanti. In realtà questa osservazione è anche supportata dal dato di Ballmaier e coll. (2002) che mostra un'assenza di alterazione significativa nei markers dopaminergici nel neostriato *reeler*.

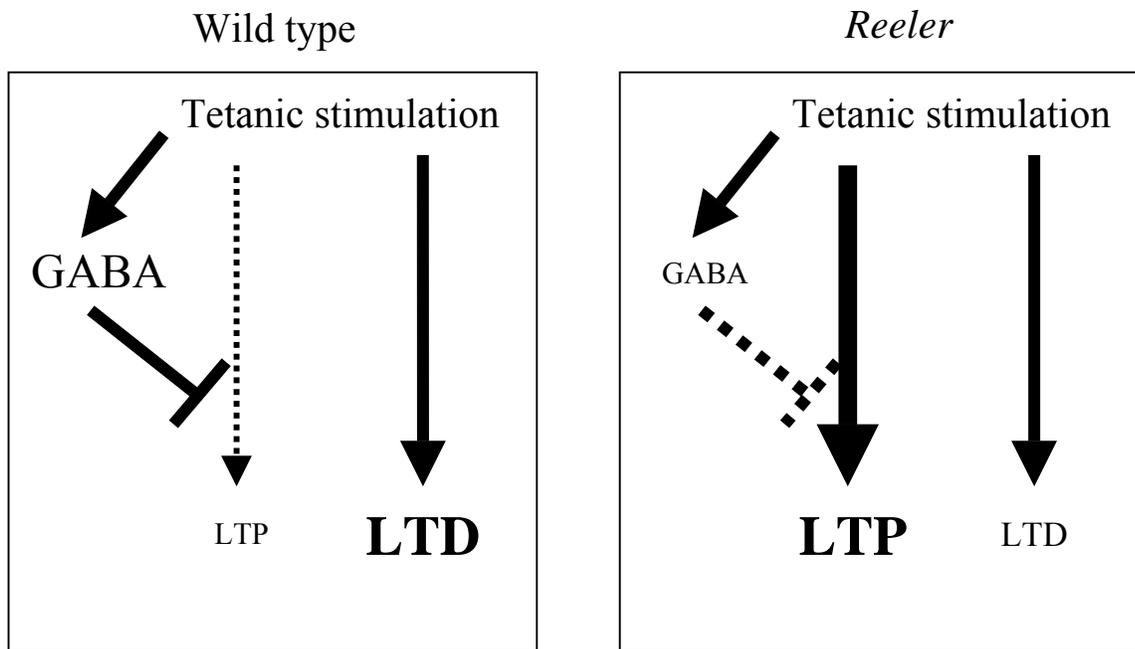
Per quanto riguarda il dato comportamentale, il topo *reeler* mostra un'abilità inferiore nel test dell'evitamento attivo, come ci si aspetta in base ai dati che mostrano come alterazioni della via corticostriatale inducano effettivamente un deficit nell'apprendimento associativo (Goldowitz and Koch, 1986; Kelly et al., 1977; Geracitano et al., 2003).

Il deficit presentato dai *reeler* sembra essere nell'associazione fra il suono (SC) e lo shock elettrico (SI), in concordanza con la perdita della funzione corticostriatale dell'associazione stimolo-risposta. L'inabilità dei topi mutanti in questo test non è, infatti, legata alla loro atassia, deficit motori o una deficienza nella percezione nocicettiva. I topi *reeler*, infatti, negli esperimenti hanno mostrato di avere la stessa velocità e frequenza nelle risposte di fuga indotte negli studi di controllo, così come hanno una pari sensibilità all'applicazione dello shock elettrico alle zampe attraverso l'elettificazione del pavimento della gabbia di evitamento.

In conclusione, l'LTP corticostriatale dopo stimolazione ad alta frequenza delle afferenze glutammatergiche può essere visto come un evento patologico che in modo abbastanza frequente si associa con un deficit nell'apprendimento procedurale in modelli animali di disordini psichiatrici (Calabresi et al., 1996). Questo studio ne fornisce un'ulteriore prova e delinea un possibile meccanismo per mezzo del quale la mancanza di reelina possa alterare le funzioni cognitive. Soprattutto la relazione fra la depressione del sistema GABAergico e l'induzione dell'LTP nelle sinapsi corticostriatali dei *reeler* dovrebbe essere meglio considerato. Infatti, un deficit GABAergico è già stato correlato con la carenza di reelina in pazienti schizofrenici e bipolari (Costa et al., 2004). Dati convergenti, inoltre, dimostrano un'aumentata eccitabilità di circuiti chiave soggiacente il deficit autistico (Keller and Persico, 2003; Ma et al., 2005).

Per questo motivo, uno sforzo atto a comprendere, e eventualmente rimediare, all'alterazione della plasticità sinaptica corticostriatale del soggetto *reeler*

attraverso un aumento del tono GABAergico, potrebbe avere rilevanza clinica se esportato a diverse patologie del sistema nervoso.



### Schema 1

Lo schema illustra la possibile alterazione nella trasmissione GABAergica nei topi *rl/rl* rispetto ai *+/+*. E' evidente come una stimolazione tetanica della via cortico-striatale quando è associata ad un deficit della trasmissione GABAergica, favorisce l'induzione dell'LTP nel topo *reeler*.

Da Marrone et al., 2006.

## Bibliografia

Akopian G, Musleh W, Smith R, Walsh JP.

Functional state of corticostriatal synapses determines their expression of short- and long-term plasticity.

Synapse. 2000 Dec 1;38(3):271-80.

Alger BE, Teyler TJ.

Long-term and short-term plasticity in the CA1, CA3, and dentate regions of the rat hippocampal slice.

Brain Res. 1976 Jul 16;110(3):463-80.

Ballmaier M, Zoli M, Leo G, Agnati LF, Spano P.

Preferential alterations in the mesolimbic dopamine pathway of heterozygous reeler mice: an emerging animal-based model of schizophrenia.

Eur J Neurosci. 2002 Apr;15(7):1197-205.

Beffert U, Weeber EJ, Durudas A, Qiu S, Masiulis I, Sweatt JD, Li WP, Adelman G, Frotscher M, Hammer RE, Herz J.

Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2.

Neuron. 2005 Aug 18;47(4):567-79.

Beffert U, Weeber EJ, Morfini G, Ko J, Brady ST, Tsai LH, Sweatt JD, Herz J.

Reelin and cyclin-dependent kinase 5-dependent signals cooperate in regulating neuronal migration and synaptic transmission.

J Neurosci. 2004 Feb 25;24(8):1897-906.

Bhatia KP, Marsden CD.

The behavioural and motor consequences of focal lesions of the basal ganglia in man.

Brain. 1994 Aug;117 ( Pt 4):859-76.

Bliss TVP, Lomo T.

Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path.

J of Phys. 1973;232: 331.

Bock HH, Jossin Y, Liu P, Forster E, May P, Goffinet AM, Herz J.

Phosphatidylinositol 3-kinase interacts with the adaptor protein Dab1 in response to Reelin signaling and is required for normal cortical lamination.

J Biol Chem. 2003 Oct 3;278(40):38772-9. Epub 2003 Jul 25.

Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA, Bevan MD.

Synaptic organisation of the basal ganglia.

J Anat. 2000 May;196 ( Pt 4):527-42. Review.

Botella-Lopez A, Burgaya F, Gavin R, Garcia-Ayllon MS, Gomez-Tortosa E, Pena-Casanova J, Urena JM, Del Rio JA, Blesa R, Soriano E, Saez-Valero J.

Reelin expression and glycosylation patterns are altered in Alzheimer's disease.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Apr 4;103(14):5573-8. Epub 2006 Mar 27.

Brouillet E, Hantraye P, Ferrante RJ, Dolan R, Leroy-Willig A, Kowall NW, Beal MF.

Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Jul 18;92(15):7105-9.

Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Marfia GA, Pisani A, Sancesario G, Bernardi G.

Synaptic transmission in the striatum: from plasticity to neurodegeneration.

Prog Neurobiol. 2000a Jun;61(3):231-65. Review.

Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Bernardi G.

Activation of M1-like muscarinic receptors is required for the induction of corticostriatal LTP.

Neuropharmacology. 1999a Feb;38(2):323-6.

Calabresi P, Centonze D, Pisani A, Cupini L, Bernardi G.

Synaptic plasticity in the ischaemic brain.

Lancet Neurol. 2003 Oct;2(10):622-9. Review.

Calabresi P, De Murtas M, Bernardi G.

The neostriatum beyond the motor function: experimental and clinical evidence.

Neuroscience. 1997a May;78(1):39-60. Review.

Calabresi P, Gubellini P, Centonze D, Picconi B, Bernardi G, Chergui K, Svenningsson P, Fienberg AA, Greengard P.

Dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein 32 kDa controls both striatal long-term depression and long-term potentiation, opposing forms of synaptic plasticity.

J Neurosci. 2000b Nov 15;20(22):8443-51.

Calabresi P, Gubellini P, Centonze D, Sancesario G, Morello M, Giorgi M, Pisani A, Bernardi G.

A critical role of the nitric oxide/cGMP pathway in corticostriatal long-term depression.

J Neurosci. 1999b Apr 1;19(7):2489-99.

Calabresi P, Maj R, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G.

Long-term synaptic depression in the striatum: physiological and pharmacological characterization.

J Neurosci. 1992a Nov;12(11):4224-33.

Calabresi P, Mercuri N, Stanzione P, Stefani A, Bernardi G.

Intracellular studies on the dopamine-induced firing inhibition of neostriatal neurons in vitro: evidence for D1 receptor involvement.

Neuroscience. 1987 Mar;20(3):757-71.

Calabresi P, Picconi B, Parnetti L, Di Filippo M.

A convergent model for cognitive dysfunctions in Parkinson's disease: the critical dopamine-acetylcholine synaptic balance.

Lancet Neurol. 2006 Nov;5(11):974-83. Review.

Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Di Filippo M.

Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity.

Trends Neurosci. 2007 May;30(5):211-9. Epub 2007 Mar 23. Review.

Calabresi P, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G.

Long-term Potentiation in the Striatum is Unmasked by Removing the Voltage-dependent Magnesium Block of NMDA Receptor Channels.

Eur J Neurosci. 1992b;4(10):929-935.

Calabresi P, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G.

Post-receptor mechanisms underlying striatal long-term depression.

J Neurosci. 1994 Aug;14(8):4871-81.

Calabresi P, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G.

The corticostriatal projection: from synaptic plasticity to dysfunctions of the basal ganglia.

Trends Neurosci. 1996 Jan;19(1):19-24. Review.

Calabresi P, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G.

Lithium treatment blocks long-term synaptic depression in the striatum.

Neuron. 1993a May;10(5):955-62.

Calabresi P, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G.

Heterogeneity of metabotropic glutamate receptors in the striatum: electrophysiological evidence.

Eur J Neurosci. 1993b Oct 1;5(10):1370-7.

Calabresi P, Saiardi A, Pisani A, Baik JH, Centonze D, Mercuri NB, Bernardi G, Borrelli E.

Abnormal synaptic plasticity in the striatum of mice lacking dopamine D2 receptors.

J Neurosci. 1997b Jun 15;17(12):4536-44.

Calabresi P, Saulle E, Centonze D, Pisani A, Marfia GA, Bernardi G.

Post-ischaemic long-term synaptic potentiation in the striatum: a putative mechanism for cell type-specific vulnerability.

Brain. 2002 Apr;125(Pt 4):844-60.

Caplan LR, Schmahmann JD, Kase CS, Feldmann E, Baquis G, Greenberg JP, Gorelick PB, Helgason C, Hier DB.

Caudate infarcts.

Arch Neurol. 1990 Feb;47(2):133-43. Review.

Carboni G, Tueting P, Tremolizzo L, Sugaya I, Davis J, Costa E, Guidotti A.

Enhanced dizocilpine efficacy in heterozygous reeler mice relates to GABA turnover downregulation.

Neuropharmacology. 2004 Jun;46(8):1070-81.

Centonze D, Costa C, Rossi S, Prosperetti C, Pisani A, Usiello A, Bernardi G, Mercuri NB, Calabresi P.

Chronic cocaine prevents depotentiation at corticostriatal synapses.

Biol Psychiatry. 2006 Sep 1;60(5):436-43. Epub 2006 Feb 14.

Centonze D, Gubellini P, Bernardi G, Calabresi P.

Permissive role of interneurons in corticostriatal synaptic plasticity.

Brain Res Brain Res Rev. 1999a Dec;31(1):1-5. Review.

Centonze D, Gubellini P, Picconi B, Calabresi P, Giacomini P, Bernardi G.

Unilateral dopamine denervation blocks corticostriatal LTP.

J Neurophysiol. 1999b Dec;82(6):3575-9.

Centonze D, Picconi B, Gubellini P, Bernardi G, Calabresi P.

Dopaminergic control of synaptic plasticity in the dorsal striatum.

Eur J Neurosci. 2001 Mar;13(6):1071-7. Review.

Centonze D, Usiello A, Costa C, Picconi B, Erbs E, Bernardi G, Borrelli E, Calabresi P.

Chronic haloperidol promotes corticostriatal long-term potentiation by targeting dopamine D2L receptors.

J Neurosci. 2004 Sep 22;24(38):8214-22. Erratum in: J Neurosci. 2005 Jan 26;25(4):1034-5.

Cepeda C, Walsh JP, Peacock W, Buchwald NA, Levine MS.

Neurophysiological, pharmacological and morphological properties of human caudate neurons recorded in vitro.

Neuroscience. 1994 Mar;59(1):89-103.

Challiner V, Griffiths L.

Electroconvulsive therapy: a review of the literature.

J Psychiatr Ment Health Nurs. 2000 Jun;7(3):191-8. Review.

Charpier S, Deniau JM.

In vivo activity-dependent plasticity at cortico-striatal connections: evidence for physiological long-term potentiation.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Jun 24;94(13):7036-40.

Charpier S, Mahon S, Deniau JM.

In vivo induction of striatal long-term potentiation by low-frequency stimulation of the cerebral cortex.

Neuroscience. 1999;91(4):1209-22.

Costa E, Chen Y, Davis J, Dong E, Noh JS, Tremolizzo L, Veldic M, Grayson DR, Guidotti A.

REELIN and schizophrenia: a disease at the interface of the genome and the epigenome.

Mol Interv. 2002 Feb;2(1):47-57.

Costa E, Grayson DR, Guidotti A.

Epigenetic downregulation of GABAergic function in schizophrenia: potential for pharmacological intervention?

Mol Interv. 2003 Jun;3(4):220-9. Review.

Costa E, Davis JM, Dong E, Grayson DR, Guidotti A, Tremolizzo L, Veldic M.

A GABAergic cortical deficit dominates schizophrenia pathophysiology.

Crit Rev Neurobiol. 2004;16(1-2):1-23. Review.

Cowan RL, Wilson CJ.

Spontaneous firing patterns and axonal projections of single corticostriatal neurons in the rat medial agranular cortex.

J Neurophysiol. 1994 Jan;71(1):17-32.

Cowan RL, Wilson CJ, Emson PC, Heizmann CW.

Parvalbumin-containing GABAergic interneurons in the rat neostriatum.

J Comp Neurol. 1990 Dec 8;302(2):197-205.

Crino P.

New RELN Mutation Associated with Lissencephaly and Epilepsy.

Epilepsy Curr. 2001 Nov;1(2):72.

Cummings JL.

Frontal-subcortical circuits and human behavior.

Arch Neurol. 1993 Aug;50(8):873-80. Review.

D'Arcangelo G, Curran T.

Reeler: new tales on an old mutant mouse.

Bioessays. 1998 Mar;20(3):235-44. Review.

D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T.

A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler.

Nature. 1995 Apr 20;374(6524):719-23.

- D'Arcangelo G, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K, Curran T.  
Reelin is a secreted glycoprotein recognized by the CR-50 monoclonal antibody.  
J Neurosci. 1997 Jan 1;17(1):23-31.
- D'Arcangelo G, Miao GG, Curran T.  
Detection of the reelin breakpoint in reeler mice.  
Brain Res Mol Brain Res. 1996 Jul;39(1-2):234-6.
- Davies CH, Starkey SJ, Pozza MF, Collingridge GL.  
GABA autoreceptors regulate the induction of LTP.  
Nature. 1991 Feb 14;349(6310):609-11.
- De Murtas M, Tatarelli R, Girardi P, Vicini S.  
Repeated electroconvulsive stimulation impairs long-term depression in the  
neostriatum.  
Biol Psychiatry. 2004 Mar 1;55(5):472-6.
- Ding L, Perkel DJ.  
Long-term potentiation in an avian basal ganglia nucleus essential for vocal  
learning.  
J Neurosci. 2004 Jan 14;24(2):488-94.
- Dunwiddie T, Lynch G.  
Long-term potentiation and depression of synaptic responses in the rat  
hippocampus: localization and frequency dependency.  
J Physiol. 1978 Mar;276:353-67.
- Falconer DS.  
2 new mutants, trembler and reeler, with neurological actions in the house mouse  
(*mus-musculus* l).  
J of Genet 1951;50 2):92-201.

Fatemi SH, Snow AV, Stary JM, Araghi-Niknam M, Reutiman TJ, Lee S, Brooks AI, Pearce DA.

Reelin signaling is impaired in autism.  
Biol Psychiatry. 2005 Apr 1;57(7):777-87.

Ferrante RJ, Kowall NW, Beal MF, Martin JB, Bird ED, Richardson EP Jr.  
Morphologic and histochemical characteristics of a spared subset of striatal neurons in Huntington's disease.  
J Neuropathol Exp Neurol. 1987 Jan;46(1):12-27.

Fink M.  
Convulsive therapy: a review of the first 55 years.  
J Affect Disord. 2001 Mar;63(1-3):1-15.

Fino E, Glowinski J, Venance L.  
Bidirectional activity-dependent plasticity at corticostriatal synapses.  
J Neurosci. 2005 Dec 7;25(49):11279-87.

Geracitano R, Paolucci E, Prisco S, Guatteo E, Zona C, Longone P, Ammassari-Teule M, Bernardi G, Berretta N, Mercuri NB.  
Altered long-term corticostriatal synaptic plasticity in transgenic mice overexpressing human CU/ZN superoxide dismutase (GLY(93)-->ALA) mutation.  
Neuroscience. 2003;118(2):399-408.

Gerdeman GL, Ronesi J, Lovinger DM.  
Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum.  
Nat Neurosci. 2002 May;5(5):446-51.

Gerfen CR.  
The neostriatal mosaic: compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems.  
Nature. 1984 Oct 4-10;311(5985):461-4.

Gerfen CR.

The neostriatal mosaic. I. Compartmental organization of projections from the striatum to the substantia nigra in the rat.

J Comp Neurol. 1985 Jun 22;236(4):454-76.

Gilerovich EG, Grigor'ev IP.

Gaba- and serotonin-immunoreactive structures and ca(2+)-binding protein in the neocortex of the reeler mouse mutant.

Neurosci Behav Physiol. 2005 Nov;35(9):887-90.

Gimenez-Amaya JM, Graybiel AM.

Compartmental origins of the striatopallidal projection in the primate.

Neuroscience. 1990;34(1):111-26.

Goldowitz D, Koch J.

Performance of normal and neurological mutant mice on radial arm maze and active avoidance tasks.

Behav Neural Biol. 1986 Sep;46(2):216-26.

Greenberg N, MacLean PD, Ferguson JL.

Role of the paleostriatum in species-typical display behavior of the lizard (*Anolis carolinensis*).

Brain Res. 1979 Aug 24;172(2):229-41.

Gubellini P, Saulle E, Centonze D, Bonsi P, Pisani A, Bernardi G, Conquet F, Calabresi P.

Selective involvement of mGlu1 receptors in corticostriatal LTD.

Neuropharmacology. 2001 Jun;40(7):839-46.

Gubellini P, Saulle E, Centonze D, Costa C, Tropepi D, Bernardi G, Conquet F, Calabresi P.

Corticostriatal LTP requires combined mGluR1 and mGluR5 activation.

Neuropharmacology. 2003 Jan;44(1):8-16.

Gubellini P, Pisani A, Centonze D, Bernardi G, Calabresi P.

Metabotropic glutamate receptors and striatal synaptic plasticity: implications for neurological diseases.

Prog Neurobiol. 2004 Dec;74(5):271-300. Review.

Guidotti A, Auta J, Davis JM, Di-Giorgi-Gerevini V, Dwivedi Y, Grayson DR, Impagnatiello F, Pandey G, Pesold C, Sharma R, Uzunov D, Costa E.

Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study.

Arch Gen Psychiatry. 2000 Nov;57(11):1061-9.

Gurney ME.

Transgenic-mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.

N Engl J Med. 1994 Dec 22;331(25):1721-2.

Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, et al.

Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutasi mutation.

Science. 1994 Jun 17;264(5166):1772-5.

Gustafsson B, Wigstrom H.

Hippocampal long-lasting potentiation produced by pairing single volleys and brief conditioning tetani evoked in separate afferents.

J Neurosci. 1986 Jun;6(6):1575-82.

Gustafsson B, Wigstrom H, Abraham WC, Huang YY.

Long-term potentiation in the hippocampus using depolarizing current pulses as the conditioning stimulus to single volley synaptic potentials.

J Neurosci. 1987 Mar;7(3):774-80.

Hamburgh M.

Analysis of the postnatal developmental effects of "reeler," a neurological mutation in mice. a study in developmental genetics.

Dev Biol. 1963 Oct;19:165-85.

Hebb D.

The organization of behavior.

1949; New York: Wiley.

Heinrich C, Nitta N, Flubacher A, Muller M, Fahrner A, Kirsch M, Freiman T, Suzuki F, Depaulis A, Frotscher M, Haas CA.

Reelin deficiency and displacement of mature neurons, but not neurogenesis, underlie the formation of granule cell dispersion in the epileptic hippocampus.

J Neurosci. 2006 Apr 26;26(17):4701-13.

Hernandez-Lopez S, Tkatch T, Perez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H, Surmeier DJ.

D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca<sup>2+</sup> currents and excitability via a novel PLC[β]1-IP3-calcineurin-signaling cascade.

J Neurosci. 2000 Dec 15;20(24):8987-95.

Herz J, Chen Y.

Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity.

Nat Rev Neurosci. 2006 Nov;7(11):850-9. Review.

Hong SE, Shugart YY, Huang DT, Shahwan SA, Grant PE, Hourihane JO, Martin ND, Walsh CA.

Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations.

Nat Genet. 2000 Sep;26(1):93-6.

Impagnatiello F, Guidotti AR, Pesold C, Dwivedi Y, Caruncho H, Pisu MG, Uzunov DP, Smalheiser NR, Davis JM, Pandey GN, Pappas GD, Tueting P, Sharma RP, Costa E.

A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Dec 22;95(26):15718-23.

Isaac JT, Luthi A, Palmer MJ, Anderson WW, Benke TA, Collingridge GL.  
An investigation of the expression mechanism of LTP of AMPA receptor-mediated synaptic transmission at hippocampal CA1 synapses using failures analysis and dendritic recordings.  
Neuropharmacology. 1998 Oct-Nov;37(10-11):1399-410.

Kahn L, Alonso G, Robbe D, Bockaert J, Manzoni OJ.  
Group 2 metabotropic glutamate receptors induced long term depression in mouse striatal slices.  
Neurosci Lett. 2001 Dec 28;316(3):178-82.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM.  
Principles of Neural Science.  
2000; 4th edition, New York.

Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC.  
Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization.  
Trends Neurosci. 1995 Dec;18(12):527-35. Review.

Keller F, Persico AM.  
The neurobiological context of autism.  
Mol Neurobiol. 2003 Aug;28(1):1-22. Review.

Kelly J, Alheid GF, McDermott L, Halaris A, Grossman SP.  
Behavioral and biochemical effects of knife cuts that preferentially interrupt principal afferent and efferent connections of the striatum in the rat.  
Pharmacol Biochem Behav. 1977 Jan;6(1):31-45.

Kelso SR, Ganong AH, Brown TH.  
Hebbian synapses in hippocampus.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Jul;83(14):5326-30.

Kerr JN, Wickens JR.

Dopamine D-1/D-5 receptor activation is required for long-term potentiation in the rat neostriatum in vitro.

J Neurophysiol. 2001 Jan;85(1):117-24.

Kitai ST, Sugimori M, Kocsis JD.

Excitatory nature of dopamine in the nigro-caudate pathway.

Exp Brain Res. 1976 Feb 26;24(4):351-63.

Kombian SB, Malenka RC.

Simultaneous LTP of non-NMDA- and LTD of NMDA-receptor-mediated responses in the nucleus accumbens.

Nature. 1994 Mar 17;368(6468):242-6.

Koos T, Tepper JM.

Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons.

Nat Neurosci. 1999 May;2(5):467-72.

Kreitzer AC, Malenka RC.

Dopamine modulation of state-dependent endocannabinoid release and long-term depression in the striatum.

J Neurosci. 2005 Nov 9;25(45):10537-45.

Lin YJ, Greif GJ, Freedman JE.

Permeation and block of dopamine-modulated potassium channels on rat striatal neurons by cesium and barium ions.

J Neurophysiol. 1996 Sep;76(3):1413-22.

Liu QS, Pu L, Poo MM.

Repeated cocaine exposure in vivo facilitates LTP induction in midbrain dopamine neurons.

Nature. 2005 Oct 13;437(7061):1027-31.

Lømo, T.

Frequency potentiation of excitatory synaptic activity in the dentate area of the hippocampal formation.

Acta physiol scand. 1966 68;suppl:277-128.

Lovinger DM, Tyler EC, Merritt A.

Short- and long-term synaptic depression in rat neostriatum.

J Neurophysiol. 1993 Nov;70(5):1937-49.

Ma DQ, Whitehead PL, Menold MM, Martin ER, Ashley-Koch AE, Mei H, Ritchie MD, DeLong GR, Abramson RK, Wright HH, Cuccaro ML, Hussman JP, Gilbert JR, Pericak-Vance MA.

Identification of significant association and gene-gene interaction of GABA receptor subunit genes in autism.

Am J Hum Genet. 2005 Sep;77(3):377-88. Epub 2005 Jul 15.

McDonald RJ, White NM.

Parallel information processing in the water maze: evidence for independent memory systems involving dorsal striatum and hippocampus.

Behav Neural Biol. 1994 May;61(3):260-70.

McNaughton BL, Douglas RM, Goddard GV.

Synaptic enhancement in fascia dentata: cooperativity among coactive afferents.

Brain Res. 1978 Nov 24;157(2):277-93.

Mercuri N, Bernardi G, Calabresi P, Cotugno A, Levi G, Stanzione P.

Dopamine decreases cell excitability in rat striatal neurons by pre- and postsynaptic mechanisms.

Brain Res. 1985 Dec 9;358(1-2):110-21.

Mesulam MM.

Frontal cortex and behavior.

Ann Neurol. 1986 Apr;19(4):320-5.

Mishkin M, Appenzeller T.

The anatomy of memory.  
Sci Am. 1987 Jun;256(6):80-9.

Nishikawa S, Goto S, Yamada K, Hamasaki T, Ushio Y.  
Lack of Reelin causes malpositioning of nigral dopaminergic neurons: evidence from comparison of normal and Reln(rl) mutant mice.  
J Comp Neurol. 2003 Jun 23;461(2):166-73.

Niu S, Renfro A, Quattrocchi CC, Sheldon M, D'Arcangelo G.  
Reelin promotes hippocampal dendrite development through the VLDLR/ApoER2-Dab1 pathway.  
Neuron. 2004 Jan 8;41(1):71-84.

Ogawa M, Miyata T, Nakajima K, Yagy K, Seike M, Ikenaka K, Yamamoto H, Mikoshiba K.  
The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons.  
Neuron. 1995 May;14(5):899-912.

Parker A, Gaffan D.  
Memory after frontal/temporal disconnection in monkeys: conditional and non-conditional tasks, unilateral and bilateral frontal lesions.  
Neuropsychologia. 1998 Mar;36(3):259-71.

Partridge JG, Tang KC, Lovinger DM.  
Regional and postnatal heterogeneity of activity-dependent long-term changes in synaptic efficacy in the dorsal striatum.  
J Neurophysiol. 2000 Sep;84(3):1422-9.

Partridge JG, Apparsundaram S, Gerhardt GA, Ronesi J, Lovinger DM.  
Nicotinic acetylcholine receptors interact with dopamine in induction of striatal long-term depression.  
J Neurosci. 2002 Apr 1;22(7):2541-9.

- Patrylo PR, Browning RA, Cranick S.  
Reeler homozygous mice exhibit enhanced susceptibility to epileptiform activity.  
*Epilepsia*. 2006 Feb;47(2):257-66.
- Paxinos G, Franklin KBJ.  
The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.  
2001; Academic Press, San Diego.
- Pennartz CM, Ameerun RF, Groenewegen HJ, Lopes da Silva FH.  
Synaptic plasticity in an in vitro slice preparation of the rat nucleus accumbens.  
*Eur J Neurosci*. 1993 Feb 1;5(2):107-17.
- Pesold C, Impagnatiello F, Pisu MG, Uzunov DP, Costa E, Guidotti A, Caruncho HJ.  
Reelin is preferentially expressed in neurons synthesizing gamma-aminobutyric acid in cortex and hippocampus of adult rats.  
*Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 17;95(6):3221-6.
- Picconi B, Passino E, Sgobio C, Bonsi P, Barone I, Ghiglieri V, Pisani A, Bernardi G, Ammassari-Teule M, Calabresi P.  
Plastic and behavioral abnormalities in experimental Huntington's disease: a crucial role for cholinergic interneurons.  
*Neurobiol Dis*. 2006 Apr;22(1):143-52. Epub 2005 Dec 2.
- Picconi B, Pisani A, Barone I, Bonsi P, Centonze D, Bernardi G, Calabresi P.  
Pathological synaptic plasticity in the striatum: implications for Parkinson's disease.  
*Neurotoxicology*. 2005 Oct;26(5):779-83. Epub 2005 May 31. Review.
- Podhorna J, Didriksen M.  
The heterozygous reeler mouse: behavioural phenotype.  
*Behav Brain Res*. 2004 Aug 12;153(1):43-54.

Quattrocchi CC, Wannenes F, Persico AM, Ciafre SA, D'Arcangelo G, Farace MG, Keller F.

Reelin is a serine protease of the extracellular matrix.

J Biol Chem. 2002 Jan 4;277(1):303-9.

Ragsdale CW Jr, Graybiel AM.

The fronto-striatal projection in the cat and monkey and its relationship to inhomogeneities established by acetylcholinesterase histochemistry.

Brain Res. 1981 Mar 16;208(2):259-66.

Ragsdale CW Jr, Graybiel AM.

A simple ordering of neocortical areas established by the compartmental organization of their striatal projections.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Aug;87(16):6196-9.

Rice DS, Curran T.

Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development.

Annu Rev Neurosci. 2001;24:1005-39. Review.

Rosen DR.

Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis.

Nature. 1993 Jul 22;364(6435):362.

Salinger WL, Ladrow P, Wheeler C.

Behavioral phenotype of the reeler mutant mouse: effects of RELN gene dosage and social isolation.

Behav Neurosci. 2003 Dec;117(6):1257-75.

Sammut S, Dec A, Mitchell D, Linardakis J, Ortiguella M, West AR.

Phasic dopaminergic transmission increases NO efflux in the rat dorsal striatum via a neuronal NOS and a dopamine D(1/5) receptor-dependent mechanism.

Neuropsychopharmacology. 2006 Mar;31(3):493-505.

Sastry BR, Goh JW, Auyeung A.

Associative induction of posttetanic and long-term potentiation in CA1 neurons of rat hippocampus.

Science. 1986 May 23;232(4753):988-90.

Saulle E, Centonze D, Martin AB, Moratalla R, Bernardi G, Calabresi P.

Endogenous dopamine amplifies ischemic long-term potentiation via D1 receptors.

Stroke. 2002 Dec;33(12):2978-84.

Schiffmann SN, Lledo PM, Vincent JD.

Dopamine D1 receptor modulates the voltage-gated sodium current in rat striatal neurones through a protein kinase A.

J Physiol. 1995 Feb 15;483 ( Pt 1):95-107.

Schwartzing RK, Huston JP.

The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments.

Prog Neurobiol. 1996 Oct;50(2-3):275-331. Review.

Schwartzkroin PA, Wester K.

Long-lasting facilitation of a synaptic potential following tetanization in the in vitro hippocampal slice.

Brain Res. 1975 May 16;89(1):107-19.

Smith R, Musleh W, Akopian G, Buckwalter G, Walsh JP.

Regional differences in the expression of corticostriatal synaptic plasticity.

Neuroscience. 2001;106(1):95-101.

Spencer JP, Murphy KP.

Bi-directional changes in synaptic plasticity induced at corticostriatal synapses in vitro.

Exp Brain Res. 2000 Dec;135(4):497-503.

- Stefani A, Pisani A, Mercuri NB, Bernardi G, Calabresi P.  
Activation of metabotropic glutamate receptors inhibits calcium currents and GABA-mediated synaptic potentials in striatal neurons.  
J Neurosci. 1994 Nov;14(11 Pt 1):6734-43.
- Stern EA, Jaeger D, Wilson CJ.  
Membrane potential synchrony of simultaneously recorded striatal spiny neurons in vivo.  
Nature. 1998 Jul 30;394(6692):475-8.
- Surmeier DJ, Bargas J, Hemmings HC Jr, Nairn AC, Greengard P.  
Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons.  
Neuron. 1995 Feb;14(2):385-97.
- Surmeier DJ, Eberwine J, Wilson CJ, Cao Y, Stefani A, Kitai ST.  
Dopamine receptor subtypes colocalize in rat striatonigral neurons.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Nov 1;89(21):10178-82.
- Tepper JM, Abercrombie ED, Bolam JP.  
Basal ganglia macrocircuits.  
Prog Brain Res. 2007;160:3-7. Review.
- Tepper JM, Bolam JP.  
Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons.  
Curr Opin Neurobiol. 2004 Dec;14(6):685-92. Review.
- Tissir F, Goffinet AM.  
Reelin and brain development.  
Nat Rev Neurosci. 2003 Jun;4(6):496-505. Review.
- Tognazzi N, Bernardi G, Moratalla R, Borrelli E, Calabresi P.

Receptor subtypes involved in the presynaptic and postsynaptic actions of dopamine on striatal interneurons.

J Neurosci. 2003 Jul 16;23(15):6245-54.

Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J, Hammer RE, Richardson JA, Herz J.

Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2.

Cell. 1999 Jun 11;97(6):689-701.

Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J, Ungerstedt U.

Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system.

Acta Physiol Scand 1971 Suppl.

Walsh JP.

Depression of excitatory synaptic input in rat striatal neurons.

Brain Res. 1993 Apr 9;608(1):123-8.

Wang Z, Kai L, Day M, Ronesi J, Yin HH, Ding J, Tkatch T, Lovinger DM, Surmeier DJ.

Dopaminergic control of corticostriatal long-term synaptic depression in medium spiny neurons is mediated by cholinergic interneurons.

Neuron. 2006 May 4;50(3):443-52.

Weeber EJ, Beffert U, Jones C, Christian JM, Forster E, Sweatt JD, Herz J.

Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning.

J Biol Chem. 2002 Oct 18;277(42):39944-52. Epub 2002 Aug 7.

Whishaw IQ, Mittleman G, Bunch ST, Dunnett SB.

Impairments in the acquisition, retention and selection of spatial navigation strategies after medial caudate-putamen lesions in rats.

Behav Brain Res. 1987 May;24(2):125-38.

Wickens JR, Kotter R, Alexander ME.

Effects of local connectivity on striatal function: stimulation and analysis of a model.

Synapse. 1995 Aug;20(4):281-98. Review.

Wilson CJ, Groves PM.

Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular inject of horseradish peroxidase.

J Comp Neurol. 1980 Dec 1;194(3):599-615.

Zhou FM, Liang Y, Dani JA.

Endogenous nicotinic cholinergic activity regulates dopamine release in the striatum.

Nat Neurosci. 2001 Dec;4(12):1224-9.