



Università' Campus Bio-Medico Di Roma

Corso di Dottorato di ricerca in Bioingegneria e  
Bioscienze Curriculum Scienze e Tecnologie degli  
Alimenti

XXX ciclo a.a. 2014-2015

**Ruolo della proteina Ambra1 nel rapporto  
eccitazione/inibizione ippocampale: implicazioni  
nei disturbi del neurosviluppo**

**Francesca Sciarra**

Coordinatore:  
Prof. Marcello D'Amelio

Tutore:  
Dott.ssa Paraskevi Krashia

Tutore:  
Dott.ssa Annalisa Nobili

Tesi di dottorato in Bioingegneria e bioscienze - curriculum scienze e tecnologie degli alimenti, di Francesca Sciarra, discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 07/05/2018.  
La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca, a condizione che ne venga citata la fonte.

*A me stessa*

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

### Indice

<b>Abstract.....</b>	<b>6</b>
<b>1. Disturbi del neurosviluppo.....</b>	<b>8</b>
1.1 Disturbi del neurosviluppo .....	8
<b>2. Ippocampo.....</b>	<b>15</b>
2.1 Anatomia dell'Ippocampo .....	15
2.2 Circuiteria ippocampale.....	16
2.3 Trasmissione sinaptica eccitatoria .....	17
2.4 Trasmissione sinaptica inibitoria .....	19
2.5 Alterazione del bilancio eccitazione/inibizione nei disordini del neurosviluppo .....	20
<b>3. Ambra1.....</b>	<b>23</b>
3.1 La proteina Ambra1 e l'autofagia.....	23
3.2 Ruolo di Ambra1 nel neurosviluppo .....	24
3.3 Ruolo di Ambra1 nei disturbi del neurosviluppo .....	25
<b>4. Scopo del lavoro .....</b>	<b>27</b>
<b>5. Risultati.....</b>	<b>29</b>
5.1 Le femmine Ambra1 <sup>+/-</sup> presentano alterazioni nel comportamento sociale .....	29
5.2 Le femmine Ambra1 <sup>+/-</sup> presentano una riduzione maggiore dei livelli di proteina Ambra1 nell'Ippocampo rispetto ai maschi .....	34
5.3 Selettiva riduzione degli interneuroni PV+ nell'Ippocampo delle femmine Ambra1 <sup>+/-</sup> .....	36
5.4 L'Ippocampo delle femmine Ambra1 <sup>+/-</sup> non presenta alterazioni strutturali.....	38
5.5 Ambra1 è espressa negli interneuroni PV+ .....	39

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

5.6 Riduzione del numero di Interneuroni PV+ nell' Ippocampo di femmine Ambra1 <sup>+/-</sup> .....	40
5.7 Valutazione delle correnti sinaptiche inibitorie nell'Ippocampo: Riduzione delle oscillazioni gamma nel CA3-CA1 delle femmine Ambra1 <sup>+/-</sup> .....	42
5.8 Alterazioni nel rapporto eccitazione/inibizione delle femmine Ambra1 <sup>+/-</sup> .....	44
5.9 Valutazione della componente eccitatoria dell'Ippocampo .....	49
5.10 Aumento dell'eccitabilità e della plasticità sinaptica nelle femmine Ambra1 <sup>+/-</sup> .....	53
5.11 Aumento della densità di spine dendritiche nell'Ippocampo di femmine Ambra1 <sup>+/-</sup> .....	57
5.12 Espressione della proteina Ambra 1 nella MGE degli embrioni e13.5 .....	61
5.13 Espressione della proteina Ambra negli embrioni a e10.5 .....	63
5.14 Le cellule progenitrici degli interneuroni sono sensibili all'apoptosi nelle femmine Ambra1 <sup>+/-</sup> .....	64
<b>6. Discussione .....</b>	<b>66</b>
<b>7. Materiali e metodi.....</b>	<b>70</b>
7.1 Animali sperimentali .....	70
7.2 Genotipizzazione .....	70
7.3 Comportamento .....	71
7.3.1 Test interazione sociale.....	71
7.3.2 <i>Three-Chambers</i> test.....	72
7.4 Biochimica.....	73
7.4.1 Estrazione totale di proteine .....	73
7.4.2 <i>Immunoblotting</i> .....	73
7.5 Istologia .....	74
7.5.1 Immunistoichimica .....	74

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

7.5.2 Immunofluorescenza.....	75
7.5.3 TUNEL Assay.....	75
7.6 Analisi stereologica.....	76
7.6.1 Conta stereologica.....	76
7.7 Elettrofisiologia.....	77
7.7.1 Registrazione delle oscillazioni gamma.....	77
7.7.2 Registrazione dei potenziali post-sinaptici eccitatori.....	78
7.7.3 Registrazioni in <i>whole cell</i> .....	79
7.8. Morfologia.....	81
7.8.1 Morfologia delle spine dendritiche.....	81
7.9 Analisi statistica.....	82
<b>8. Bibliografia.....</b>	<b>84</b>
<b>9. Bibliografia delle figure.....</b>	<b>95</b>

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

### **Acronimi**

**AMPA:** A-amino-3-hydrossi-5 metil-4-isoxazepropionic

**CA1:** Corno di Ammone 1

**CB:** Calbindina

**CCK:** Colecistochinina

**CGE:** Eminenza Ganglionare Caudale

**CNVs:** Varianti *de novo*

**CR:** Calretinina

**GABA:** Acido Gamma Ammino Butirrico

**GD:** Giro Dentato

**LGE:** Eminenza Ganglionare Laterale

**LTD:** *Long term depression*

**LTP:** *Long term potentiation*

**MGE:** Eminenza Ganglionare Mediana

**NMDA:** N-methyl-D-aspartato

**NPY:** Neuro Peptide Y

**PSD:** Membrana Post Sinaptica

**PV+:** Parvalbumina positivo

**SNC:** Sistema Nervoso Centrale

**SNPs:** Polimorfismi a Singolo Nucleotide

**SOM:** Somatostatina

**VIP:** Proteina Intestinale Vasoattiva

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

### Abstract

Lo squilibrio della trasmissione sinaptica eccitatoria/inibitoria, è stato visto essere implicato nei disturbi del neurosviluppo, quali Autismo e Schizofrenia (Durand, M.C. et al., 2007; Bozdagi, O. et al., 2010). Nell'ambito di questi disturbi, un ruolo importante è rivestito dall'Ippocampo in quanto area adibita ai processi cognitivi e sociali. In questa regione, la trasmissione sinaptica eccitatoria è svolta dai neuroni piramidali, quella inibitoria è a carico degli interneuroni GABAergici, in particolare la sottopopolazione degli interneuroni che esprimono la Parvalbumina (PV+), sembra essere cruciale nel mantenimento di questo equilibrio (Filice, F. and Swaller, B., 2007). L'insorgenza di Autismo e Schizofrenia, è stata associata, secondo studi recenti, anche al gene *AMBRA1*, sia nel modello murino aploinsufficiente per la proteina *Ambra1* (*Ambra1<sup>+/-</sup>*) (Dere, E. et al., 2014) che nell'uomo (Mitjans, M. et al., 2017; Heinrich, A. et al., 2013). *Ambra1* è una proteina fondamentale nel periodo del neurosviluppo, infatti l'animale omozigote aploinsufficiente per *Ambra1* muore in età embrionale a causa di una eccessiva proliferazione cellulare e difetti nella chiusura del tubo neurale (Fimia, G.M. et al., 2007). Sulla base di queste evidenze, nel mio lavoro di tesi abbiamo voluto studiare il ruolo dell'aploinsufficienza della proteina *Ambra1* nel rapporto eccitazione/inibizione ippocampale e nei disturbi del neurosviluppo.

Dai nostri risultati emerge che gli animali *Ambra1<sup>+/-</sup>* adulti presentano comportamenti simil autistici e riduzione del numero di interneuroni PV+ ristretti solo al genere femminile. La riduzione del numero di interneuroni in Ippocampo, produce come conseguenza una ridotta trasmissione sinaptica inibitoria, che si traduce con la riduzione delle oscillazioni gamma, tipiche degli interneuroni PV+, ridotta plasticità sinaptica in CA1 e ridotta densità di spine dendritiche dei neuroni piramidali. Allo stadio embrionale e13.5 invece, abbiamo riscontrato una aumentata apoptosi nell'Eminenza Ganglionare Mediana (MGE) degli animali femmine *Ambra1<sup>+/-</sup>*, regione in cui si ha la formazione dei neuroni progenitori degli interneuroni PV+. Tutti questi dati, suggeriscono che vi sia un meccanismo

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

dipendente da Ambra1 che determina lo squilibrio tra componente eccitatoria/inibitoria in Ippocampo, contribuendo all'alterata attività cerebrale che sottende i disturbi del neurosviluppo.



## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

### **1. Disturbi del neurosviluppo**

Il neurosviluppo può essere definito come una relazione dinamica tra i fattori genetici, comportamentali, emozionali e cognitivi che avviene durante la vita di un individuo. L'alterazione di questo processo attraverso fattori ambientali o genetici può portare all'insorgenza di disturbi del neurosviluppo, che possono comparire durante la gestazione o nei primi anni di vita compromettendo l'ambito personale, sociale e scolastico (Boivin, M.J. et al., 2015). I disturbi del neurosviluppo, possono variare da limitazioni specifiche dell'apprendimento, difficoltà del linguaggio fino alla compromissione delle capacità relazionali o delle abilità intellettive. Rientrano nella classificazione dei disturbi del neurosviluppo il disturbo dello sviluppo intellettivo, il disturbo dello Spettro Autistico, la Schizofrenia, disturbi dell'apprendimento, *deficit* di attenzione/iperattività ed epilessia (American Psychiatric Association, 2014). Spesso nei bambini affetti dai disturbi del neurosviluppo coesistono due tipi di disturbi, ad esempio il 30% dei bambini affetti da Schizofrenia presentano comorbidità con l'Autismo. Viceversa, bambini affetti da sindrome da Spettro Autistico mostrano sintomi riconducibili alla Schizofrenia, suggerendo l'esistenza di una possibile relazione tra queste due patologie. Nonostante la sindrome da Spettro Autistico e la Schizofrenia si manifestino con una sintomatologia differente, che coinvolge l'interazione sociale e la sfera emotiva nel primo caso, disordini del pensiero e allucinazioni nel secondo, studi recenti hanno ipotizzato nello squilibrio tra eccitazione/inibizione neuronale una possibile causa comune (Lee, E. et al., 2017; Canitano, R. et al., 2017).

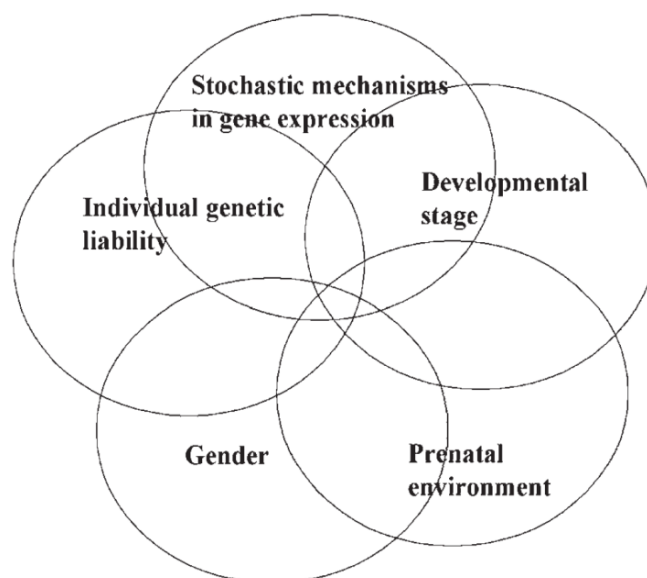
#### 1.1 Il Disturbo da Spettro Autistico e la Schizofrenia

L'Autismo e la Schizofrenia sono caratterizzate da una sintomatologia clinica complessa. Per la sindrome da Spettro Autistico, l'età di insorgenza si aggira intorno ai 3 anni di vita, con una variabilità dei sintomi che comprendono disturbi del linguaggio, della socializzazione e del movimento spesso associato a

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

stereotipie (Keller, F. and Persico, A.M., 2003). La prevalenza di diagnosi di Autismo negli Stati Uniti è cresciuta da 30 a 40 volte negli ultimi 20 anni, al punto che la comunità scientifica ha iniziato a parlare di Autismo “epidemico” (Graf, W.D. et al., 2017). Una tale crescita può essere attribuita al miglioramento dei criteri diagnostici e alla maggiore consapevolezza della patologia. Le diagnosi di Autismo vedono una prevalenza superiore nei maschi rispetto alle femmine con un rapporto di 4:1. Tuttavia tale rapporto varia a seconda delle diverse sottopopolazioni di pazienti, infatti questa disomogeneità si appiattisce nei pazienti autistici che presentano importanti disabilità; al contrario è più marcata nei pazienti affetti da normo-macroencefalia. Pertanto il sesso può essere considerato un fattore di rischio che si inserisce all'interno di un quadro diagnostico molto complesso, che vede la concausa di altri fattori quali variabilità genetica individuale, fattori ambientali, mutazioni genetiche sporadiche, alterazioni del fisiologico neurosviluppo (Fig. 1) (Keller, F. and Persico, A.M., 2003).



**Fig. 1: Fattori di rischio del Disturbo da Spettro Autistico:** L'immagine rappresenta in modo schematico l'interazione tra vari fattori di rischio che contribuiscono all'insorgenza della patologia (Keller, F. and Persico, A.M., 2003).

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

Per quanto riguarda i fattori ambientali, non si tratta di fattori di rischio indipendenti, piuttosto dipendono o influenzano i fattori genetici, e riguardano eventi avversi prenatali o successivi alla gravidanza, esposizione al fumo durante la gravidanza, depressione *post-partum* (Ronald, A. et al., 2011), diabete gestazionale, condizioni fetali di ipossia (Tordjman, S. et al., 2014). Uno studio recente ha individuato come variabile di rischio anche le infezioni materne contratte durante la gravidanza. Sembrerebbe infatti che queste, associate alla presenza di varianti genetiche predisponenti, possano concorrere all'insorgenza della patologia. Nel lavoro di Mazina e collaboratori, è stato studiato un campione di 1971 bambini affetti dalla Sindrome da Spettro Autistico tra i 4 e i 18 anni di età. I risultati dimostrano una maggiore suscettibilità dei bambini portatori di varianti genetiche predisponenti, agli effetti delle infezioni materne sul comportamento sociale e presenza di stereotipie (Mazina, V. et al., 2015). Rilevante importanza è stata attribuita anche all'elevata età paterna (Hultman, C.M. et al., 2011) o all'esposizione di tossine e fattori inquinanti con cui la madre entra in contatto durante il periodo gestazionale (Vijayakumar, N.T. and Judy, M.V., 2016). Tutte queste variabili, come abbiamo precedentemente detto, si inseriscono in una realtà complessa, rappresentando dei fattori di rischio piuttosto che variabili determinanti.

Il 90% dei casi di Autismo ha una derivazione genetica a carattere non mendeliano, che vede coinvolto, alterazioni di più geni. Le alterazioni genetiche possono essere trasmesse per via parentale alla progenie e rappresentano il 10% dei casi di malattia, oppure sono varianti che si inseriscono *de novo* nel genoma. Le mutazioni ereditarie comprendono la sindrome dell'X fragile, sindrome di Rett e sclerosi tuberosa (Marshall, C.R. et al., 2008).

Le varianti *de novo* sono alterazioni del DNA che compaiono spontaneamente nella linea parentale durante la meiosi (Conrad, D.F. et al., 2011). Queste varianti comprendono: variazioni nel numero di copie di un gene (CNVs), inserzioni/delezioni di piccola o grande entità e polimorfismi a singolo nucleotide

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

(SNPs). La maggior parte delle varianti *de novo* sono correlate all'età paterna: più è elevata e maggiore è la probabilità che le cellule progenitrici coinvolte nella spermatogenesi introducano errori (Kong, A. et al., 2012). Le CNVs sono mutazioni piuttosto rare nella popolazione sana, tuttavia insorgono con una frequenza superiore al 3% tra gli individui affetti (Kirov, G., 2015) di notevole importanza sono quelle che riguardano i geni coinvolti nella formazione delle sinapsi come: NRXN1, NLGN3, SHANK3, SHANK2, SYNGAP1.

Per quanto riguarda la Schizofrenia, definita come psicosi cronica, è caratterizzata da alterazioni nella socializzazione e da declino delle capacità intellettuali, al punto da essere definita anche come “demenza praecox” secondo la teoria proposta nel 1896 dallo psichiatra Emil Kraepelin. Successivamente, nel 1908 lo psichiatra svizzero Eugen Bleuer coniò il termine Schizofrenia, dal greco *schizein* (dividere) e *phrein* (mente), ovvero “mente divisa”, riferendosi principalmente alla condizione sintomatica vissuta da questi pazienti (Picchioni, M.M. et al., 2007). I sintomi principali sono rappresentati da allucinazioni, apatia, alterazioni del linguaggio e del comportamento, alterato stato emozionale, disordine del pensiero e del comportamento (Pourcain, B. et al., 2017). La prevalenza è dello 0,3-0,7% in tutto il mondo anche se varia a seconda del paese (van Os, J. and Kapur, S., 2009). Le cause sono ancora sconosciute, ma come per l'Autismo, un ruolo determinante è rappresentato dai fattori genetici, ambientali, sociali e fattori relativi al neurosviluppo. Nonostante la maggior parte delle diagnosi di Schizofrenia avvengano in età adolescenziale o adulta, si sente sempre di più parlarne come patologia del neurosviluppo. Sono infatti numerosi gli studi che documentano un ridotto punteggio di QI in bambini che successivamente svilupperanno la patologia (Lane, E.A. and Albee, G.W., 1964; Offord, D.R. and Cross, L.A., 1971). Studi effettuati su bambini che da adulti sono stati diagnosticati Schizofrenici, hanno mostrato la presenza di disturbi del linguaggio, del pensiero, alterazioni delle emozioni e comportamentali (Welham, J. et al., 2009). La presenza di concause ambientali e genetiche, rendono la Schizofrenia una patologia ad eziologia multifattoriale.

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

Riguardo la componente ambientale, come per la Sindrome dello Spettro Autistico, fattori predisponenti sono stati identificati nel periodo fetale, come infezioni materne, stress, ipossia e malnutrizione materna. Studi condotti su roditori e scimmie hanno dimostrato l'associazione tra un'infezione non specifica durante la gravidanza all'aumentato rischio di sviluppare la Schizofrenia o l'Autismo, in quanto provocherebbe alterazioni nel corretto sviluppo cerebrale (Köhler, O. et al., 2014). Anche infezioni dell'apparato genitale, respiratorio e riproduttivo sono state correlate alla Schizofrenia nei nati (Buka, S.L. et al., 2008).

Altri fattori ambientali incidono per lo sviluppo della Schizofrenia, ad esempio è stato dimostrato come il consumo di droghe quali la *cannabis* possa rappresentare un fattore di rischio importante, direttamente proporzionale alla frequenza del consumo. Le ragioni per cui tale sostanza possa provocare un effetto psicotico sono ancora sconosciute (Moore, T.H. et al., 2007). Nello studio condotto da Fernandes e collaboratori su adolescenti, sono stati correlati alti livelli di proteina C reattiva con l'aumentato rischio di sviluppare la Schizofrenia in età adulta (Fernandes, B.S. et al., 2016).

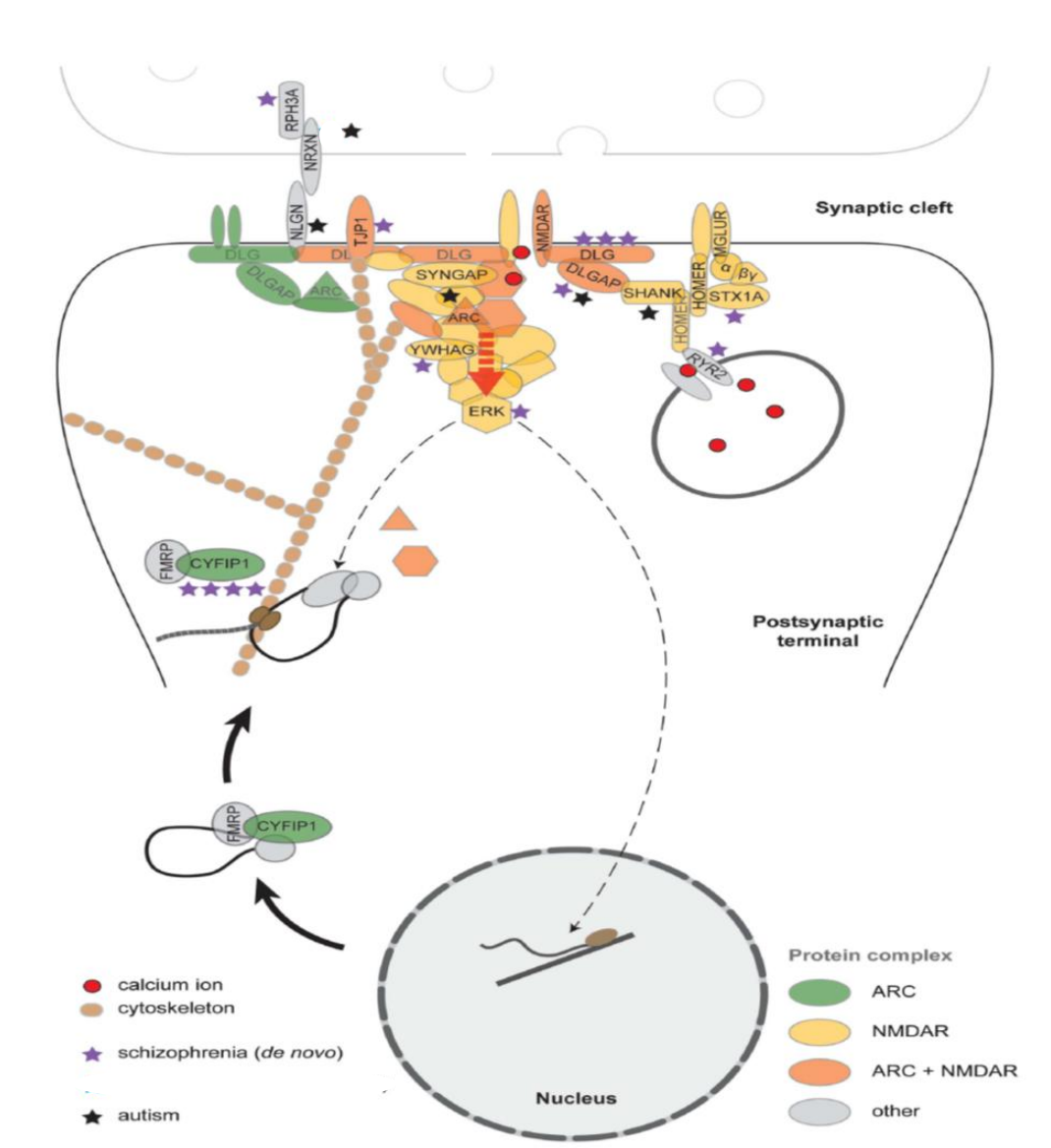
Per quanto riguarda i fattori di rischio genetico, come per l'Autismo, non esistono singoli geni in grado di indurre la patologia, ma piuttosto è l'interazione tra geni e tra geni e ambiente a determinare la predisposizione. Per quanto la Schizofrenia non possa essere definita una patologia ad eziologia esclusivamente genetica, studi sui gemelli ne suggeriscono una ereditabilità pari all'80% (van Os, J. and Kapur, S., 2009). Come per l'Autismo, studi di meta-analisi mostrano una correlazione tra l'età paterna (circa 40 anni) e la Schizofrenia, indicando l'importanza dell'epigenetica nella malattia (Wohl, M. and Gorwood, P., 2007). Nella Schizofrenia sono molteplici gli studi che hanno riscontrato nelle varianti genetiche comuni (CNVs), ereditarie e *de novo*, un fattore di rischio. In particolare le varianti CNVs sono considerate il fattore di rischio più importante nella Schizofrenia tra le varianti *de novo*. Questo tipo di mutazioni sono tanto più frequenti tanto più è elevata l'età materna e paterna, con maggiore frequenza

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

interessano i geni coinvolti nella formazione delle sinapsi. Numerose sono state le mutazioni *de novo* identificate dallo studio di Kirov e collaboratori sui geni DLG1, DLG2, DLGAP1, i geni che codificano per le proteine che formano il recettore N-methyl-D-aspartato (NMDA) ed altri geni che codificano per proteine fondamentali della PSD. Come per la sindrome da Spettro Autistico, anche in questo caso le mutazioni ricadono su geni coinvolti nel mantenimento del bilancio eccitazione/inibizione. L'analisi è stata condotta su 7907 individui affetti e 10585 controlli, ed ha permesso di identificare 2 delezioni sul gene DLG2 sul locus 11q14.1, 1 delezione sul gene DLGAP1 in corrispondenza del locus 18p11.31; 1 delezione sul gene RYR2, locus 1q43, che codifica per le proteine formanti il canale per il calcio attraverso il recettore NMDA. Dall'immagine (Fig. 11) è possibile notare come le CNVs *de novo* alterino la funzionalità del segnale *post* sinaptico a più livelli, intaccando sia i geni coinvolti nella formazione del recettore NMDA, che quelli formanti il canale per il calcio ed infine le proteine associate al citoscheletro (ARC). Per quest'ultimo gene gli autori dello studio parlano di un possibile suo coinvolgimento dal momento che non è stata riscontrata una significatività statistica (Kirov, G. et al., 2012).

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra



**Fig. 2: Distruzione delle connessioni post sinaptiche provocate dalla CNVs.** Gli asterischi identificano le CNVs *de novo* presenti nella Schizofrenia e nell'Autismo (Immagine modificata da Kirov, G. et al., 2012).

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

### 2. Ippocampo

L'Ippocampo è la regione adibita ai processi di memoria, apprendimento e al comportamento sociale. Numerosi sono gli studi che documentano una sua alterazione nei disturbi del neurosviluppo (Benes, F.M. et al., 1998; Amaral, D.G. et al., 2008). In particolare, uno studio condotto su bambini affetti da Autismo ha riscontrato un aumento del volume dell'Ippocampo rispetto a bambini sani (Schumann, C.M. et al., 2004), mentre uno studio condotto su pazienti affetti da Schizofrenia ha riscontrato una riduzione del volume Ippocampale (Ota, M. et al., 2017).

#### 2.1 Anatomia dell'Ippocampo

L'Ippocampo è collocato nella regione ventromediale del lobo temporale della Corteccia, prende parte alla formazione ippocampale insieme alla Corteccia Entorinale, al Subiculum, al parasubiculum e al Giro Dentato (GD). Tutte queste strutture comunicano tra di loro e sono coinvolte nella formazione di nuova memoria e processi di apprendimento. L'Ippocampo è a sua volta costituito dal Subiculum, Corno di Ammone e GD. Il Subiculum si trova tra il Corno di Ammone e il presubiculum, è costituito da uno strato di cellule superficiali, detto molecolare, e uno strato profondo composto dalle cellule piramidali. Il Corno di Ammone è suddiviso in tre regioni: Corno di Ammone 1 (CA1), composto da cellule piramidali, Corno di Ammone 2 (CA2) e Corno di Ammone 3 (CA3) composto anche esso da cellule piramidali (D'Amelio, M. and Rossini, P.M., 2012). Ogni regione del Corno di Ammone è a sua volta costituita da vari strati molecolari, a partire dal CA1 troviamo: *stratum oriens*, *stratum pyramidale*, *stratum lucidum* (in CA3), *stratum radiatum*, *stratum lacunosum-molecolare*. Nello *stratum oriens* si trovano i corpi cellulari degli interneuroni a canestro, così chiamati a causa dei loro assoni che innervano lo *stratum oriens*, lo *stratum pyramidale* e *radiatum*. Lo *stratum pyramidale* è prevalentemente composto dai corpi cellulari dei neuroni piramidali ed è facilmente distinguibile mentre lo



## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

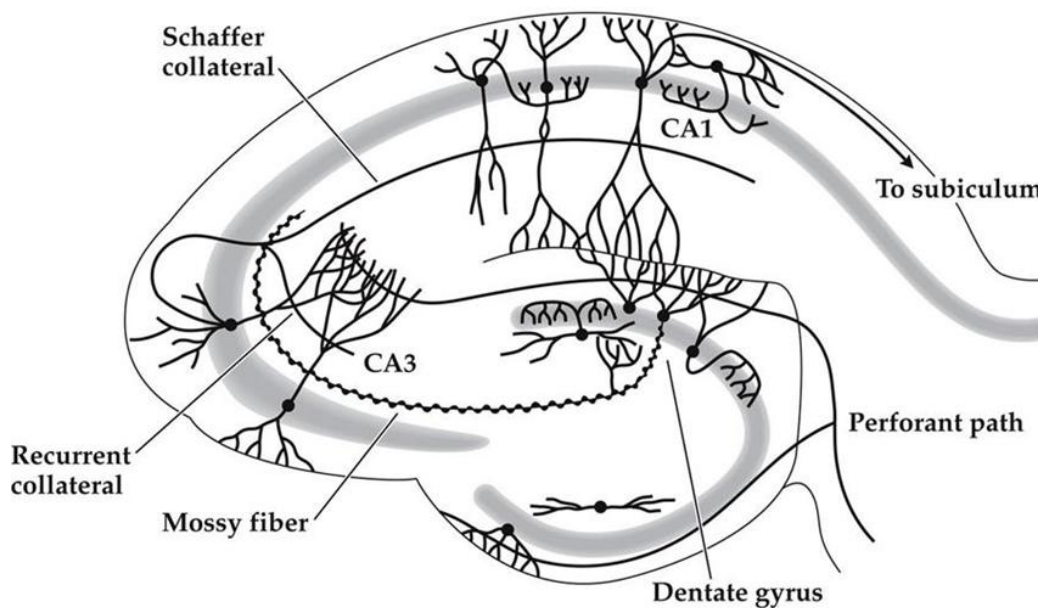
---

*stratum lucidum* è molto sottile, è attraversato dalle cellule dei granuli del Giro Dentato e contiene neuroni piramidali. Lo *stratum radiatum* contiene le fibre della “Collaterale di Shaffer” e alcuni interneuroni come le cellule a canestro. Infine lo *stratum lacunosum-moleculare* contiene fibre della “Collaterale di Shaffer” e dendriti apicali delle cellule piramidali (Gaudio E., 2011).

### 2.2 Circuiteria ippocampale

Le informazioni neuronali, sotto forma di potenziali di azione, partono dalla Corteccia Entorinale e formano un *pathway* chiamato “via perforante”. Gli assoni che costituiscono questo *pathway* sono formati dallo strato II e III della Corteccia Entorinale, e proiettano alle cellule granulari del GD attraverso il Subiculum. Da qui gli assoni che prendono il nome di *mossy-fiber*, proiettano il segnale alle cellule piramidali del CA3, le quali a loro volta invieranno il segnale alle cellule piramidali del CA1 costituendo il *pathway* della “Collaterale di Shaffer”. Gli assoni del III e IV strato della Corteccia Entorinale invece, proiettano alle cellule piramidali del CA1 (D’Amelio, M. and Rossini, P.M., 2012).

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra



**Fig. 3: Rappresentazione grafica delle connessioni ippocampali.** La via perforante è formata da assoni che giungono al Giro Dentato (GD) e alla CA3. I neuroni della CA3 ricevono segnali anche dal DG attraverso le *mossy-fibers* che vanno a formare la “Collaterale di Schaffer” proiettando alle cellule piramidali in CA1. I neuroni piramidali del CA1 a loro volta inviano segnali al Subiculum da cui escono la maggiorparte delle efferenze dell’Ippocampo (immagine modificata Human Anatomy Library., 2016).

### 2.3 La trasmissione sinaptica eccitatoria

Il principale neurotrasmettitore di tipo eccitatorio rilasciato dai neuroni ippocampali è il glutammato. Una volta rilasciato nella fessura sinaptica, il glutammato si lega ai recettori postsinaptici che si dividono in ionotropici (iGlu) e metabotropici (mGlu 1-8). I recettori iGlu sono canali ligando-dipendenti: recettori  $\alpha$ -amino-3-hydroxsi-5metil-4-isoxazelopropilonic (AMPA), recettori N-metil-D-aspartato (NMDAR) e recettori del kainate. Il legame del glutammato ai recettori AMPA ne determina un cambiamento conformazionale con conseguente ingresso principalmente di ioni  $\text{Na}^+$  nella cellula, inducendo quella che viene definita trasmissione sinaptica veloce. Il semplice legame del glutammato al recettore NMDA non è però sufficiente a determinarne l’apertura, infatti il canale, per sua conformazione strutturale, è bloccato da uno ione  $\text{Mg}^{2+}$ . Lo ione viene

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

rimosso solo in seguito ad una ampia depolarizzazione, consentendo così il passaggio degli ioni  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^+$ .

Un fenomeno ben caratterizzato della trasmissione glutamatergica dell'Ippocampo è la “*Long Term Potentiation*” (LTP). L'LTP è il fenomeno di plasticità a lungo termine, si tratta di una trasmissione sinaptica in grado di modificare in modo persistente la funzione cerebrale, formando nuove sinapsi e quindi nuova memoria. Può avvenire quando uno stimolo presinaptico abbastanza forte (tetanico) in combinazione con depolarizzazione postsinaptica, causano la rimozione del blocco da  $\text{Mg}^{2+}$  (fase iniziale del LTP) e l'aumento del calcio nelle spine dendritiche. L'ampio aumento di calcio induce l'attivazione della Fosfo-Chinasi C (PKC), della Chinasi Calcio Calmodulina-dipendente II (CAMKII) e della Fosfo-Chinasi A (PKA). Quest'ultima fosforila e attiva i recettori AMPA reclutandoli nella membrana, permettendo la *late phase* (mantenimento) dell'LTP. In antitesi a questo fenomeno, vi è la NMDA-dipendente “*Long Term Depression*” (LTD) indotta da stimolazioni a bassa frequenza per periodi prolungati della “Collaterale di *Shaffer*” nelle cellule del CA1. In questo caso i livelli di  $\text{Ca}^{2+}$  che entrano dai recettori NMDA non sono elevati, e quindi si ha l'attivazione delle fosfatasi  $\text{Ca}^{2+}$  dipendenti come la calcineurina. Quest'ultima defosforila la subunità GluA1 del recettore AMPA inducendo l'inattivazione e conseguentemente la sua internalizzazione (Cavallucci, V. et al., 2013).

I fenomeni dell'LTP e LTD sono alla base della “plasticità sinaptica”, ovvero quella capacità del Sistema Nervoso di modificarsi a seguito di stimoli esterni rendendo il *network* neuronale una struttura dinamica in continua evoluzione. Alterazioni di questi meccanismi, e nell'equilibrio tra trasmissione sinaptica eccitatoria e inibitoria in Ippocampo, sembrano essere coinvolti nei Disturbi dello Spettro Autistico e nella Schizofrenia (Senter, R.K. et al., 2016, Kirov, G. et al., 2012, Durand, C.M. et al., 2007).

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

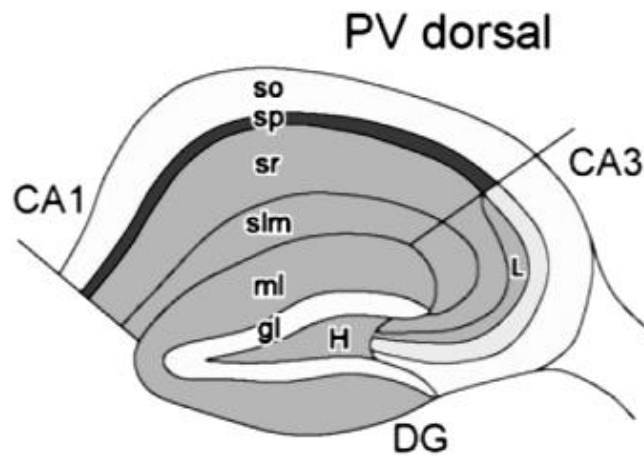
---

### 2.4 Trasmissione sinaptica inibitoria

Il principale neurotrasmettitore di tipo inibitorio nel Sistema Nervoso Centrale (SNC) è l'Acido Gamma Ammino Butirrico (GABA). I neuroni che secernono GABA effettuano un'azione inibitoria e disinibitoria dei neuroni ippocampali e corticali coordinando l'attività dei neuroni piramidali, creando così un equilibrio tra componente eccitatoria/inibitoria.

Nel SNC esistono varie sottopopolazioni di interneuroni GABAergici, che si differenziano in base all'espressione di uno o più marcatori neurochimici: Acido Glutammico Decarbossilasi 67 (GAD67); proteine leganti  $Ca^{2+}$  come Parvalbumina (PV), Calbindina (CB), Calretinina (CR); neuropeptidi come la somatostatina (SOM), Cholecistochinina (CCK), Neuropeptide Y (NPY) proteina intestinale vasoattiva (VIP); e sintesi neuronale di ossido nitrico (NOS) (Jinno, S. et al., 2006). La trasmissione inibitoria nell'Ippocampo è svolta principalmente da specifiche tipi di cellule, le cellule a canestro e a candelabro che prendono contatto con i neuroni piramidali attraverso la formazione di tre tipi di sinapsi: sinapsi asso-somatiche, sinapsi asso-assonali, sinapsi asso-dendritiche, interneurone-interneurone (Benes, F.M. et al., 2001). Le cellule a canestro popolano in grande quantità lo strato piramidale dell'Ippocampo (Fig. 4) e sono per lo più positive alla PV (PV+; Fig. 4) tranne per una sottopopolazione negativa alla PV ma positiva alla CCK e al VIP (Gulyas, A.I. et al., 1991). Studi in letteratura hanno dimostrato che la distruzione degli interneuroni ippocampali o la riduzione della loro funzione, è correlata al Disturbo dello Spettro Autistico e alla Schizofrenia (Lewis, D.A and Levitt, P., 2002).

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra



**Fig. 4: Rappresentazione grafica della densità dei neuroni PV positivi espressa in NDS,  $\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$  in Ippocampo.** L'Ippocampo è composto da: *stratum oriens*, *stratum pyramidale*, *stratum radiatum*, *stratum lacunosum-molecolare*, *stratum molecolare*, *stratum lucidum*, *stratum granulosum*, *ilum dentate*. Lo *stratum pyramidale* presenta la più elevata densità numerica di cellule PV positive, è rappresentato in figura dalla linea più scura (NDS <4). Le regioni in grigio hanno una NDS di circa 3-4, la regione bianca ha un NDS di circa 2-3 (Jinno, S. et al., 2006).

### 2.5 Alterazione del bilancio eccitazione/inibizione nei disordini del neurosviluppo

Il corretto bilancio tra meccanismi eccitatori e inibitori è fondamentale per la fisiologica formazione e trasmissione del segnale nervoso. Al contrario, uno squilibrio a favore di uno dei due meccanismi comporta alterazione della trasmissione sinaptica che si traduce in alterazioni del comportamento sociale, come avviene nell'Autismo e nella Schizofrenia. Un tipico esempio di alterazione del bilancio a carico dei meccanismi eccitatori, è rappresentato dall'alterazione del recettore AMPA, che è stato riscontrato nel modello murino di Autismo che presenta la delezione di una copia del gene SHANK3. La proteina SHANK3 è una proteina *scaffold* coinvolta nell'organizzazione della membrana post sinaptica (*Post Synaptic Density*) in cui è ampiamente espressa, ciò avverrebbe grazie al suo legame con i recettori AMPA e NMDA grazie ai domini SH3 e all'interazione con la proteina GKAP, proteina associata del complesso PSD95 (Durand, M.C. et al.,

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

2007; Bozdagi, O. et al., 2010). Esperimenti di elettrofisiologia su questo modello murino hanno evidenziato una ridotta neurotrasmissione basale in Ippocampo, ridotta trasmissione AMPA-mediata e incapacità di formare LTP, mentre dal punto di vista comportamentale mostra alterazioni motorie e riduzione del comportamento sociale (Bozdagi, O. et al., 2010). Il modello murino per Autismo *knockout* per la neuregulina-1 invece, mostra una significativa riduzione della funzionalità del recettore NMDA nell'Ippocampo e nello Striato, associato a riduzione dell'LTP. L'animale presenta anche alterazioni della socializzazione e un comportamento riconducibile all'autistico (Lee, E. et al., 2015).

Anche la riduzione nel numero o nella funzione degli interneuroni GABAergici, in particolare degli interneuroni PV+, è stata correlata ai disturbi del neurosviluppo, come la Schizofrenia e l'Autismo, determinando però due effetti opposti. Ovvero un ridotto numero dei neuroni PV+ porta ad una ridotta inibizione, mentre una ridotta funzione della proteina PV porta ad un aumento dell'inibizione (Filice, F. and Swaller, B., 2007). A sua volta, la riduzione dell'attività inibitoria degli interneuroni PV+, può essere attribuita o a difetti di trasmissione dagli interneuroni alle cellule piramidali, oppure ad una ridotta stimolazione degli interneuroni. Studi condotti su modelli murini di Schizofrenia e su pazienti affetti, hanno avallato l'ipotesi di una ridotta eccitazione degli interneuroni. Infatti il modello murino che presenta la delezione del gene che codifica per la subunità del recettore NMDA, NR1, negli interneuroni PV+, presenta una disinibizione delle cellule piramidali e sintomi riconducibili alla Schizofrenia (Gunduz-Bruce, H., 2009). Al contrario, la mancata produzione di interneuroni PV+, è stata correlata allo sviluppo di un comportamento simil-autistico. Uno studio recente, condotto su animali *knockout* per PV, ha rivelato alterazioni della plasticità sinaptica a breve termine dei neuroni corticali eccitatori e alterazioni relazionali associate a difficoltà comunicative e movimenti stereotipati (Wöhr, M. et al., 2015).

Un esempio di ipo-funzionalità degli interneuroni GABAergici, associata all'Autismo, è la loro mancata maturazione durante il neurosviluppo. Questa

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

condizione, determinerebbe la formazione di una Corteccia immatura sia dal punto di vista strutturale che funzionale (Huang, Z.J. et al., 1999).

Gli interneuroni nella vita pre-natale, originano nella porzione ventrale e del telencefalo, suddivisa in diverse aree definite Eminenza Ganglionare Laterale (LGE), Mediana (MGE) e Caudale (CGE). Dalla LGE derivano gli interneuroni del Bulbo Olfattorio e dello Striato. Dalla MGE e dalla CGE originano i neuroni Corticali e ippocampali, che successivamente migreranno nelle loro regioni di interesse grazie a molecole segnale attraenti o repellenti, come le proteine *slit1\2*, le semaforine e fattori di crescita come *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) e *plasminogen-related growth factor* (HGF). Quest'ultimo svolge la propria azione legandosi al suo recettore uPAR. Modelli murini portatori della delezione del gene che codifica per uPAR, durante lo stato embrionale mostrano una riduzione del 50% degli interneuroni Calbindina-positivi in Corteccia e in Ippocampo. Gli animali uPAR<sup>-/-</sup> adulti presentano una completa assenza delle cellule PV+ in Corteccia, un comportamento ansioso e riduzione significativa del comportamento sociale (Levitt, P. et al., 2004). Anche per la Schizofrenia, è stata riscontrata una correlazione positiva con i geni che codificano per neuregulina e il suo recettore. Durante il neurosviluppo, il *signaling* mediato dal legame della neuregulina-1 e del suo recettore ErbB4, sono fondamentali per la formazione del circuito GABAergico. La perdita di funzione del gene che codifica per ErbB4 negli interneuroni PV+ della Corteccia del topo, comporta la riduzione delle sinapsi con le cellule piramidali e quindi una ridotta inibizione di queste ultime. Conseguentemente la sovraeccitabilità delle cellule piramidali, provoca un comportamento schizofrenico (Fazzari, P. et al., 2010).

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

### 3. Ambra1

Ambra1 è una proteina di recente scoperta, coinvolta nella regolazione dell'autofagia e nel neurosviluppo (Fimia, G.M. et al., 2007). La proteina Ambra1 (*Activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy 1*) è codificata dal gene Ambra1 che nell'uomo è localizzato sul cromosoma 11, nel topo sul cromosoma 2. Si tratta di una proteina citosolica di circa 130 KDa, con un dominio di 40 amminoacidi terminali altamente conservata nei vertebrati. Ambra1 svolge numerose funzioni: gioca un ruolo fondamentale nel neurosviluppo e nell'autofagia, è coinvolta interazioni DNA-proteina, trasduzione del segnale, è coinvolta anche nella divisione cellulare (Fimia, G.M. et al., 2007).

#### 3.1. La proteina Ambra1 e l'autofagia

La funzione di Ambra1 sicuramente più conosciuta e studiata è quella legata alla regolazione del processo autofagico. L'autofagia è un processo di *clearance* cellulare che nelle cellule *post* mitotiche, quali i neuroni, ha la funzione di garantire la sopravvivenza della cellula in condizioni critiche, come ad esempio la carenza di nutrienti. Durante l'autofagia, gli organelli intracellulari e porzioni di *citosa* vengono sequestrati all'interno dei vacuoli autofagici, formando gli autofagosomi. Questi ultimi successivamente si fonderanno ai lisosomi per formare gli autofagolisosomi in modo che il contenuto cellulare possa essere digerito dagli enzimi lisosomiali (Fimia, G.M. et al., 2007).

Una volta che è stata indotta l'autofagia, si ha una fase iniziale caratterizzata dall'estensione della membrana autofagica grazie alla fosforilazione di Beclin1 e di Ambra1 ad opera di ULK1. In questa fase la proteina Ambra1 regola l'attività chinasi del complesso Beclin1, formato da Beclin1, Ambra1, Vps 15, Vps 34, Atg 14L; permettendo la formazione dell'autofagosoma. Un altro stadio di regolazione è rappresentato dal potenziamento dell'attività chinasi e stabilizzazione del complesso ULK1, grazie al suo legame con TRAF6 (ubiquitina ligasi E3). Ambra1 è coinvolta anche nella regolazione temporale dell'autofagia,



## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

grazie all'interazione di diverse ubiquitine ligasi Cullin-RING E3. Durante la stimolazione dell'autofagia Ambra1 viene rilasciata dal complesso Cullin4 e inibisce il complesso Cullin5 provocando la stabilizzazione del complesso DEPTOR che comprende anche mTOR, inibitore dell'autofagia (Antonoli, M. et al., 2014, Fimia, G.M. et al., 2007). Infine nella mitofagia, processo di degradazione dei mitocondri, Ambra1 che si trova all'interno dei mitocondri, in condizioni basali è legata a Bcl-2 che ne impedisce il legame con Beclin1 e quindi l'attivazione del meccanismo autofagico. A seguito dell'induzione della mitofagia, Ambra1 si dissocia da Bcl-2 e si lega a Beclin e a Parkin (E3 ubiquitina ligasi) così da indurre la digestione del mitocondrio (Antonoli, M. et al., 2015).

### 3.2 Ruolo di Ambra1 nel neurosviluppo

Il bilancio tra morte cellulare e proliferazione è fondamentale per lo sviluppo del Sistema Nervoso Centrale. Nel modello murino transgenico per Ambra1, l'inserzione di un *gene trap* nel *locus* del gene che codifica per la proteina, ha prodotto una mutazione che impedisce il fisiologico funzionamento del gene, producendo una riduzione dell'espressione della proteina Ambra1. Nella condizione di eterozigosi, allo stadio embrionale di e8,5 Ambra1 è espressa soprattutto nel neuroepitelio, a e11,5 nel midollo spinale, nella retina, negli arti, nelle vescicole encefaliche mentre negli ultimi stadi dello sviluppo embrionale è espressa in tutto il Sistema Nervoso (Fimia, G.M. et al., 2007). Una totale mancanza di espressione della proteina invece, (condizione di omozigosi) induce morte embrionale a e14.5, a causa di difetti nella chiusura del tubo neurale ed esencefalia, dovuta ad una incontrollata proliferazione cellulare (e8.5) seguita da una eccessiva apoptosi (e9) (Fimia, G.M. et al., 2007). Questi risultati indicano l'importanza che la proteina Ambra1 riveste nelle fasi del neurosviluppo, in particolare nel controllo della proliferazione cellulare e nel garantirne la sopravvivenza cellulare (Fimia, G.M. et al., 2007). Anche la mancanza di uno dei ligandi di Ambra1 è stato associato a morte prematura dell'embrione. Questo è il caso del modello murino *knockout* per TRAF6, proteina che lega Ambra1, in cui

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

l'animale muore prematuramente durante le fasi dello sviluppo presentando un'alterata organogenesi dei linfonodi, mentre in altri casi si verifica la morte embrionale con formazione di spina bifida ed esencefalia a e13.5 (Lomaga, M.A. et al., 2000).

### 3.3 Ruolo di Ambra1 nei disturbi del neurosviluppo

Correlazioni positive sono state individuate tra la proteina Ambra1 e il Disturbo da Spettro Autistico e la Schizofrenia.

Correlazioni positive sono state riscontrate nell'uomo tra il gene AMBRA1 e la Schizofrenia. Lo studio condotto da Reitschel e collaboratori mediante la tecnica *genome-wide association* (GWA), ha mostrato la presenza di una variante intronica nel gene AMBRA1 in pazienti affetti da Schizofrenia. Lo studio è stato condotto su 3738 pazienti schizofrenici e 7802 controlli, ed è stata riscontrata una significatività statistica per quattro Polimorfismi a Singolo Nucleotide (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) nelle regioni introniche sul cromosoma 11: rs7112229, rs11819869, rs7130141 e rs12575668. In particolare lo SNP rs11819869 è localizzato nella regione del gene AMBRA1 fortemente associata al disequilibrio del SNC (Reitschel, M. et al., 2012). Un altro lavoro, condotto da Heinrich e collaboratori, ha studiato l'associazione tra il gene AMBRA1 e il comportamento impulsivo negli adolescenti. Il carattere dell'impulsività viene stabilito dall'associazione di due tecniche sperimentali, il test comportamentale *Stop Signal Task* (SST) e la misura dei livelli di ossigeno in Corteccia Prefrontale (BOLD) come indice di inibizione motoria. I risultati hanno dimostrato che gli adolescenti portatori dello SNPs rs11819869 presentano un carattere impulsivo dato da una non congruenza delle risposte nel SST associato ad un livello di ossigeno (BOLD) in Corteccia prefrontale significativamente più alto rispetto ai controlli. Questi risultati confermano il coinvolgimento dell'allele di rischio Ambra1 nella Schizofrenia (Heinreich, A. et al., 2013).

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

Il gene *AMBRA1* è stato associato positivamente anche all'Autismo. Infatti, l'analisi di due coorti indipendenti di individui maschi e femmine affetti da Schizofrenia e non, ha mostrato una corrispondenza tra la singola variante genetica AA, localizzata sul gene *AMBRA1* rs3802890, al comportamento autistico. L'analisi dell'mRNA ha inoltre riscontrato una riduzione dei livelli di proteina *Ambra1* nelle femmine portatrici dell'allele AA (Mitjans, M. et al., 2017).

A conferma dei dati ottenuti sull'uomo, anche nell'animale il gene *AMBRA1* è stato associato all'Autismo. Infatti Dere e collaboratori, hanno caratterizzato il modello murino aploinsufficiente per il gene *Ambra1* (*Ambra1*<sup>+/-</sup>) dal punto di vista comportamentale dal giorno di vita post-natale 4 (p4) a p21 per i cuccioli, dai 3 mesi fino a 10 per gli adulti, riscontrando alterate capacità relazionali in tutte le età analizzate solo nel genere femminile. Inoltre, i livelli di espressione di *Ambra1* sono più alti nella Corteccia delle femmine WT rispetto ai maschi WT. Tutte queste evidenze attribuiscono all'animale *Ambra1*<sup>+/-</sup> un fenotipo autistico ristretto esclusivamente al sesso femminile; comportamento che insorge nell'età neonatale per mantenersi in età adulta (Dere, E. et al., 2014).

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

### 4. Scopo del lavoro

Il Disturbo da Spettro Autistico e la Schizofrenia sono due patologie dai tratti comuni, caratterizzate fenotipicamente da alterazioni comportamentali e a livello funzionale da uno squilibrio tra la trasmissione sinaptica eccitatoria/inibitoria (Rubenstein, J.L. and Merzenich, M.M., 2003). Entrambe sono classificate nell'ambito dei disturbi del neurosviluppo e presentano una eziologia multifattoriale, dove la componente genetica interessa geni coinvolti nella formazione delle sinapsi e nelle funzioni ippocampali. Inoltre un ruolo critico per l'insorgenza dei disturbi del neurosviluppo, è svolto anche dalla proteina Ambra1, prodotta nello stadio embrionale, che regola i processi di proliferazione e morte cellulare (Fimia, G.M. et al., 2007).

Sulla base di tali evidenze, abbiamo deciso di indagare il ruolo dell'aploinsufficienza della proteina Ambra1 nella funzione ippocampale, e in che modo possa produrre il fenotipo alterato nelle femmine del modello murino eterozigote per Ambra1. Nel mio studio di tesi, ci siamo concentrati sull'Ippocampo in quanto svolge un ruolo fondamentale nel comportamento sociale, e da studi in letteratura è stato evidenziato un suo coinvolgimento nella Sindrome da Spettro Autistico e nella Schizofrenia (Levitt, P. et al., 2004; Fazzari, P. et al., 2010; Montagrin, A. et al., 2017; Benes, F.M. et al., 1998; Amaral, D.G. et al., 2008).

Abbiamo deciso di studiare gli effetti dell'aploinsufficienza di Ambra1 in età adulta, 2-3 mesi di età, andando a valutare le capacità relazionali del nostro modello sperimentale, attraverso il test comportamentale a tre camere comunicanti e il test della socializzazione, che hanno rivelato un comportamento simil-autistico solo nelle femmine eterozigoti.

Ci siamo quindi concentrati sulla struttura dell'Ippocampo, andando prima di tutto a valutare i livelli di espressione della proteina Ambra1 negli animali di entrambi i genotipi e sessi. Tramite la tecnica del *Western Blotting*, abbiamo riscontrato ridotti livelli di proteina sia nei maschi che nelle femmine Ambra<sup>+/-</sup>.

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

A questo punto, dal momento che, una delle possibili cause dei disturbi del neurosviluppo è rappresentata dallo sbilanciamento nel rapporto tra eccitazione/inibizione, abbiamo deciso di studiare la componente interneuronale GABAergica in Ippocampo. Analisi di immunohistochimica e di elettrofisiologia ci hanno permesso di effettuare una stima stereologica del numero di neuroni PV e di caratterizzare la fisiologia della trasmissione sinaptica in questo modello murino. Nel complesso queste analisi hanno permesso di individuare una riduzione degli interneuroni PV+ solo nell'Ippocampo delle femmine eterozigoti.

Infine, dal momento che gli interneuroni PV+ dell'Ippocampo si formano nella Eminenza Ganglionare Mediana (*Medial Ganglionic Eminence*, MGE) a e13.5, abbiamo voluto studiare se la riduzione osservata negli adulti femmine *Ambra*<sup>+/-</sup> potesse essere correlata ad alterazioni nel periodo dello sviluppo mediante tecniche molecolari e immunohistochimiche.

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

### 5. Risultati

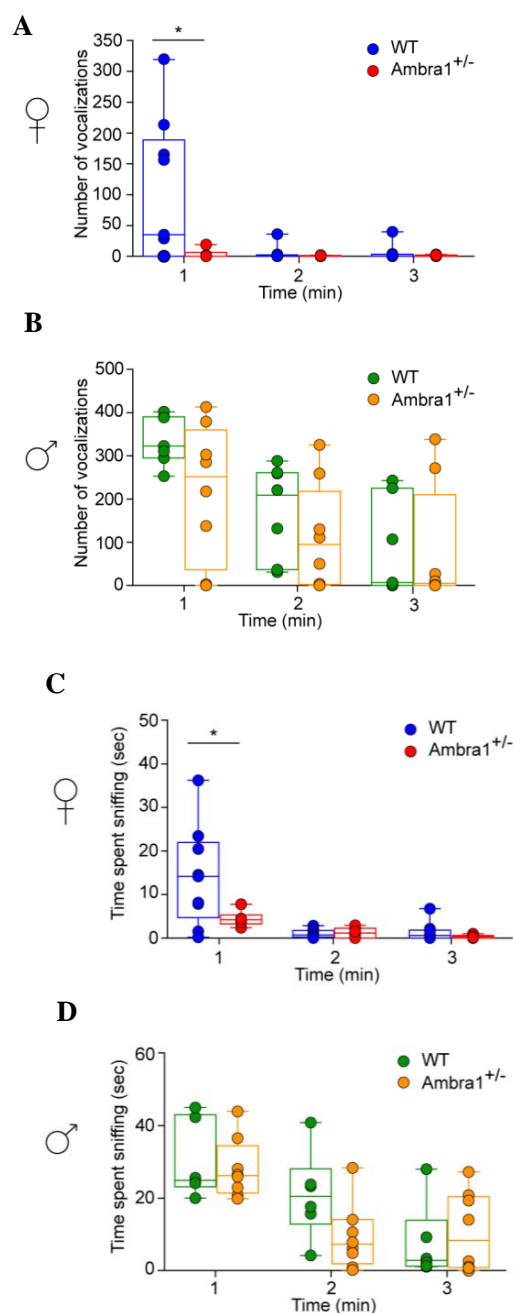
#### 5.1 Le femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> presentano alterazioni nel comportamento sociale

Nei topi, le difficoltà di socializzazione, caratteristica del fenotipo autistico, si manifestano con una riduzione del comportamento esplorativo e ridotta reattività agli stimoli sociali (Silverman, J.L. et al., 2010). Al fine di capire se gli animali eterozigoti per *Ambra1* presentano un fenotipo simil-autistico, maschi e femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> e rispettivi WT di 2-3 mesi di età, sono stati sottoposti a due tipi di *test* comportamentali. Il primo *test* comportamentale, valuta la capacità di socializzazione dell'animale sperimentale con un topo di sesso femminile estraneo (C57BL/6J) in termini di numero di vocalizzazioni e tempo trascorso nell'annusarlo (*sniffing*). Il test consiste nella valutazione delle vocalizzazioni ultrasoniche emesse ed il comportamento di ciascun animale sperimentale una volta posto in una gabbia contenente la femmina estranea. Ogni sessione sperimentale valutata aveva durata di 3 minuti.

L'analisi del numero di vocalizzazioni (Fig.1A) evidenzia una riduzione statisticamente significativa del numero di vocalizzazioni ultrasoniche da parte delle femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> rispetto ai WT nel primo minuto di sessione sperimentale. Anche l'analisi del tempo trascorso nell'interazione con il topo estraneo risulta essere alterata nelle femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup>, che interagiscono di meno rispetto alle femmine WT (Fig. 1B), indice di un mancato interesse allo stimolo sociale.

Lo stesso test è stato ripetuto sui maschi *Ambra1*<sup>+/-</sup> e rispettivi controlli (Fig. 1C, D). Il numero di vocalizzazioni emesse dai maschi e il tempo trascorso nell'interazione sono paragonabili a quelle dei rispettivi controlli.

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra



**Fig. 1: Misurazione del numero di vocalizzazioni e del tempo impiegato nell'interazione sociale.** (A) nel primo minuto di sessione sperimentale le femmine Ambra1<sup>+/-</sup> emettono un numero di vocalizzazioni significativamente più basso rispetto ai WT (n = 9 WT, 6 Ambra1<sup>+/-</sup> (A): ANOVA a due vie per vocalizzazioni x genotipo per 3 minuti di durata: P= 0,023; \*P< 0,050 con *post-hoc test* di *Turkey* per il primo minuto). (B) i topi maschi Ambra1<sup>+/-</sup> emettono un numero di vocalizzazioni paragonabili a quello dei WT (C) il tempo trascorso nell'interazione sociale è più basso nelle femmine

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

Ambra1<sup>+/-</sup> rispetto ai WT (ANOVA a due vie per *sniffing* x genotipo: P = 0,020; \*P < 0,050 con *post-hoc test* di *Turkey* per il primo minuto) (**D**) i topi maschi Ambra1<sup>+/-</sup> spendono un tempo paragonabile a quello dei controlli nell'interazione sociale con la femmina C57BL/6J estranea (**C,D**: n= 6 WT, 8 Ambra1<sup>+/-</sup>; **C**: ANOVA a due vie per vocalizzazioni x genotipo: P= 0,168; **D**: ANOVA a due vie per *sniffing* x genotipo: P= 0,795).

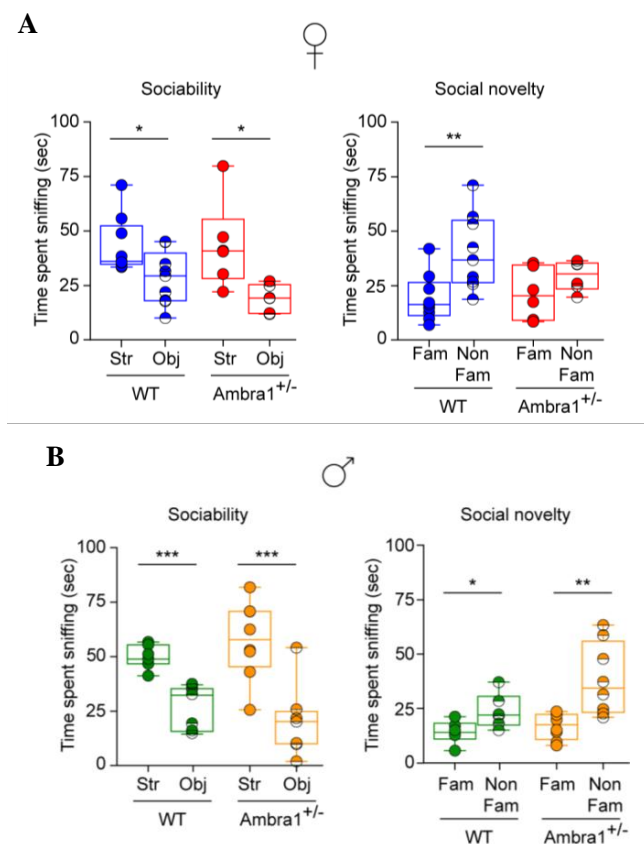


## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

Il *Three-Chambers* test è stato usato per quantificare la socializzazione e la preferenza per un animale estraneo (No Fam) rispetto ad uno familiare (Fam). Il test comportamentale è composto da varie fasi: due fasi di adattamento della durata di 10 minuti ciascuno, seguite da una prima sessione sperimentale di 10 minuti in cui si valuta il comportamento sociale, e da una seconda sessione sperimentale, sempre di 10 minuti, in cui si valuta la preferenza tra un animale conosciuto ed uno estraneo. Nella prima fase di adattamento, l'animale sperimentale viene posto in una gabbia divisa in tre camere comunicanti; a questa fase è seguita una seconda fase di adattamento della durata di 10 minuti, in cui l'animale sperimentale è stato lasciato libero di esplorare l'ambiente. A questo punto nella gabbia, vengono posti rispettivamente in una stanza un oggetto (Obj), rappresentato da una tazza metallica vuota capovolta, in un'altra stanza lo stesso oggetto contenente però un animale estraneo (Str) e si dà inizio alla prima sessione sperimentale detta *sociability phase*. Durante i 10 minuti di sessione sperimentale, sia maschi che femmine *Ambra1<sup>+/-</sup>* hanno mostrato una preferenza verso l'animale estraneo (Str) simile ai WT, trascorrendo più tempo nell'annusare la tazza contenente l'animale piuttosto che quella vuota (Fig. 2A, B). Nella seconda sessione sperimentale, detta *social novelty*, si introduce un secondo topo estraneo (No Fam) all'interno della tazza precedentemente vuota, e si valuta la preferenza che l'animale test manifesta per quest'ultimo o per quello familiare (Fam). Le femmine *Ambra1<sup>+/-</sup>* non mostrano preferenza tra il topo estraneo (No Fam) rispetto a quello familiare (Fam) (Fig. 2A), dimostrando indifferenza nei confronti dello stimolo sociale rispetto agli animali WT. I maschi *Ambra1<sup>+/-</sup>* invece hanno mostrato una preferenza statisticamente significativa per il topo estraneo rispetto a quello familiare, sovrapponibile ai WT (Fig. 2B). Entrambi i *test* comportamentali, denotano un comportamento simil-autistico ristretto al genere femminile di *Ambra1<sup>+/-</sup>*, rilevando difficoltà nella socializzazione e ridotto interesse nei confronti di stimoli sociali.

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra



**Fig. 2: Misurazione della preferenza tra l'oggetto/animale estraneo e tra l'animale familiare/animale estraneo.** (A) durante la prima fase sperimentale femmine  $Ambra1^{+/-}$  e WT (n=9 WT, 6  $Ambra1^{+/-}$  femmine) mostrano maggiore preferenza per l'animale estraneo (Str) piuttosto che per l'oggetto (Obj) (ANOVA a una via: WT \*P = 0,023;  $Ambra1^{+/-}$  \*P= 0,017). Nella seconda fase sperimentale (grafico a destra) le femmine  $Ambra1^{+/-}$  mostrano uguale preferenza tra l'animale familiare (Fam) e quello sconosciuto (No-Fam) (n= 9 WT, 6  $Ambra1^{+/-}$ ; ANOVA: WT, \*\*P= 0,007;  $Ambra1^{+/-}$  P=0,175). (B) durante la prima fase sperimentale i maschi  $Ambra1^{+/-}$  mostrano un comportamento sociale sovrapponibile a quello dei maschi WT, trascorrendo più tempo ad annusare l'animale estraneo (n= 6 WT, 8  $Ambra1^{+/-}$ ; ANOVA: WT, \*\*\*P=  $4,00 \times 10^{-4}$ ;  $Ambra1^{+/-}$ , \*\*\*P=  $6,00 \times 10^{-4}$ ). Nella seconda fase sperimentale, grafico a destra, i maschi  $Ambra1^{+/-}$  mostrano preferenza per l'animale non familiare (No-Fam) come i relativi controlli (n= 6 WT, 8  $Ambra1^{+/-}$  ANOVA: WT, \*P=0,032;  $Ambra1^{+/-}$  \*\*P=0,004).

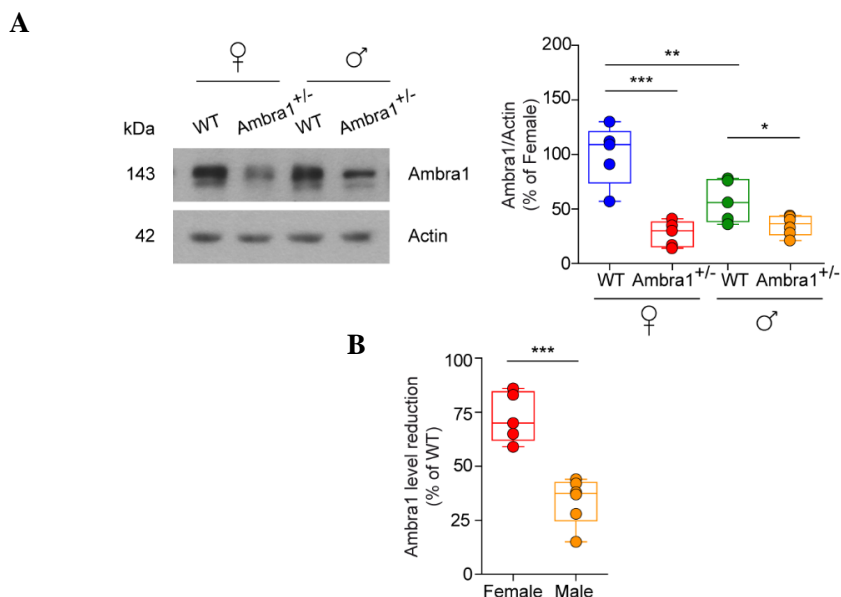
## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

5.2 Le femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> presentano una riduzione maggiore dei livelli di proteina *Ambra1* nell'Ippocampo rispetto ai maschi

L'Ippocampo è la regione maggiormente coinvolta nei disturbi del neurosviluppo, in quanto area adibita al comportamento sociale (Inan, M. et al., 2013). Per tale ragione, al fine di comprendere la neuropatologia che determina l'alterazione fenotipica nelle femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup>, abbiamo deciso di concentrarci sull'Ippocampo. In animali di 2-3 mesi di età abbiamo quantificato i livelli di proteina *Ambra1* nei maschi e nelle femmine eterozigoti e rispettivi controlli. Grazie ad analisi molecolari mediante la tecnica del *Western Blotting*, abbiamo osservato che la proteina *Ambra1* è ridotta significativamente negli animali *Ambra1*<sup>+/-</sup> rispetto ai WT in entrambi i sessi (Fig. 3A). Tuttavia, i livelli di espressione della proteina sono più elevati nelle femmine WT rispetto a maschi WT (Fig. 3A). Questo dato risulta di particolare interesse perché confrontando il rapporto tra i livelli di espressione della proteina *Ambra1* tra animali WT ed eterozigoti dello stesso sesso, la riduzione risulta più marcata nelle femmine rispetto ai maschi (Fig. 3B).

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra



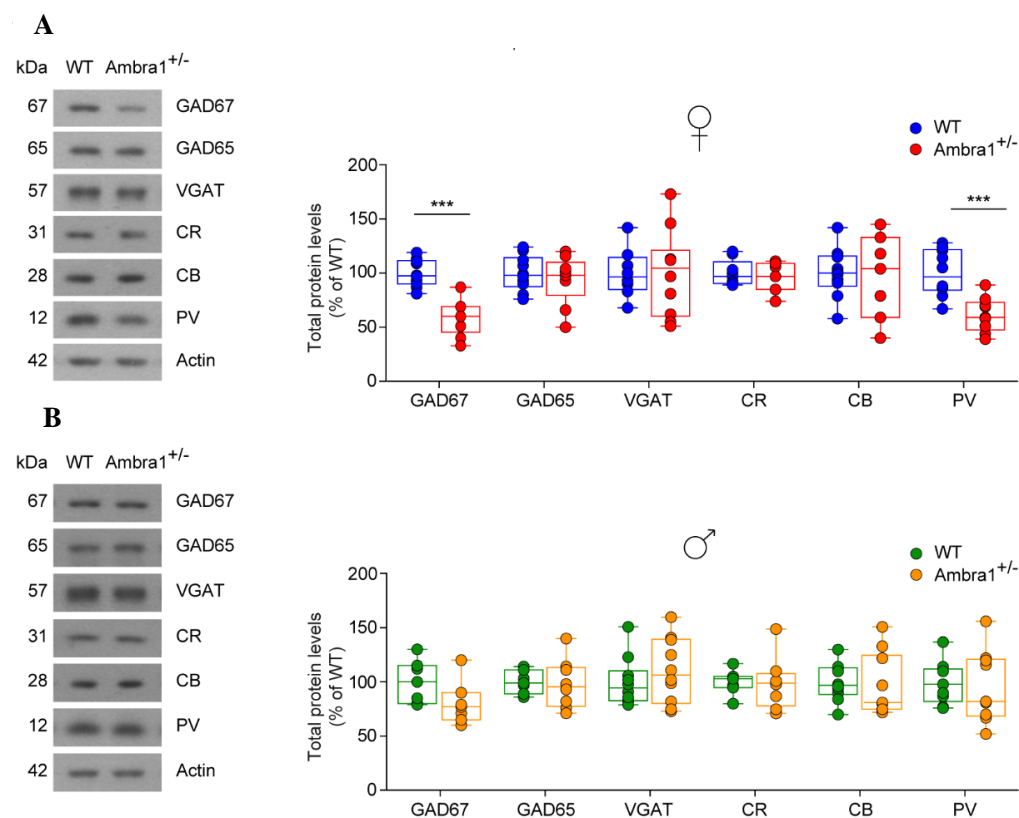
**Fig. 3: Quantificazione della proteina Ambra1 in estratti di proteine totali di Ippocampo: (A)** Immunoblot di estratti di proteine totali da Ippocampo di femmine e maschi Ambra1<sup>+/-</sup> e rispettivi controlli, marcati con l'anticorpo per Ambra1. L'Actina è stata utilizzata come controllo di caricamento. Il grafico mostra la quantificazione densitometrica delle bande in scala di grigio, espresse in % delle femmine WT (femmine: n= 5 WT e 5 Ambra1<sup>+/-</sup>; maschi: n= 5 WT e 6 Ambra1<sup>+/-</sup>; ANOVA per sesso x genotipo: P= 0,006, *post hoc* test di Bonferroni: WT femmine- Ambra1<sup>+/-</sup>-femmine, \*\*\*P<1.00 x 10<sup>-4</sup>; WT femmine-WT maschi, \*\*P<0,01; WT maschi- Ambra1<sup>+/-</sup> maschi, \*P<0,05) **(B)** il grafico mostra la riduzione della proteina Ambra1 in Ippocampo di maschi e femmine Ambra1<sup>+/-</sup> rispetto al proprio controllo ed espresse in % sulle femmine WT (n come in A; t-test *unpaired* tra i sessi: \*\*\*P= 3.00x10<sup>-4</sup>).

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

### 5.3 Selettiva riduzione degli interneuroni PV+ nell'Ippocampo delle femmine

#### Ambra1<sup>+/-</sup>

Da numerosi studi in letteratura, sappiamo che le alterazioni comportamentali nel neurosviluppo sono associate allo squilibrio tra componente eccitatoria/inibitoria (Rubenstein, J.L et al., 2003; Nelson, S.B and Valakh, V., 2015). Abbiamo quindi deciso di studiare i principali marcatori degli interneuroni GABAergici dell'Ippocampo: GAD67, GAD65, Calbindina (CB), Parvalbumina (PV), VGAT (Fig.4). L'analisi biochimica ha evidenziato una riduzione statisticamente significativa esclusivamente nelle femmine Ambra1<sup>+/-</sup> per i marcatori GAD67 e PV (Fig.4A). Al contrario, nei maschi non si evidenziano riduzioni per nessun tipo di marcatore (Fig. 4B)



**Fig. 4: Quantificazione dei livelli di marcatori di interneuroni GABAergici in Ippocampo.** (A,B) immunoblot rappresentativi dei principali marcatori di neuroni GABAergici, GAD67, GAD65, VGAT, CR, CB, PV, estratti da Ippocampo totale di

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

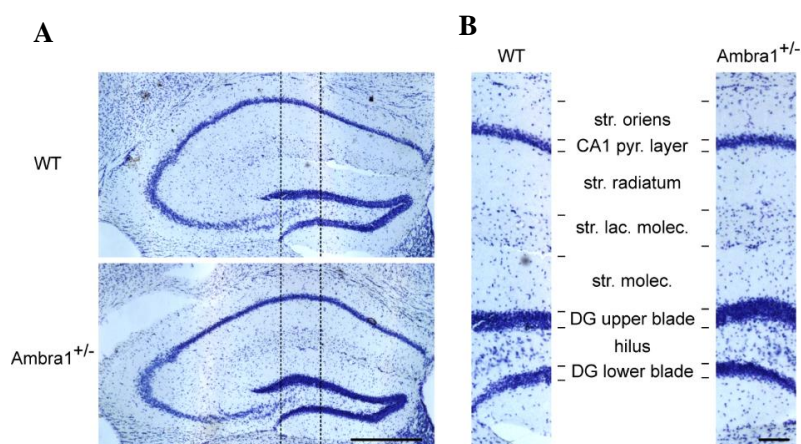
---

femmine (**A**) e maschi (**B**) WT e  $Ambra1^{+/-}$  marcati con i relativi anticorpi. L'Actina è stata utilizzata come controllo di caricamento. I grafici a destra rappresentano la quantificazione densitometrica dell'*immunoblot* espressa come % su WT (n= 9 animali per genotipo e per sesso). Gli animali femmine  $Ambra1^{+/-}$  mostrano ridotti livelli di GAD67 (*unpaired t-test*:\*\*\*P< 1.00x10<sup>-4</sup>) e PV (\*\*\*P= 4.00x10<sup>-4</sup>).

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

### 5.4 L'Ippocampo delle femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> non presenta alterazioni strutturali

Per capire se la riduzione dei *marker* neuronali GABAergici osservata nelle femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> potesse essere attribuita ad una malformazione strutturale dell'Ippocampo, è stata studiata la morfologia degli strati Ippocampali di femmine WT e *Ambra1*<sup>+/-</sup> su sezioni di Ippocampo dorsale (Fig. 5A, B). Dall'osservazione delle immagini, non si evidenziano alterazioni strutturali.



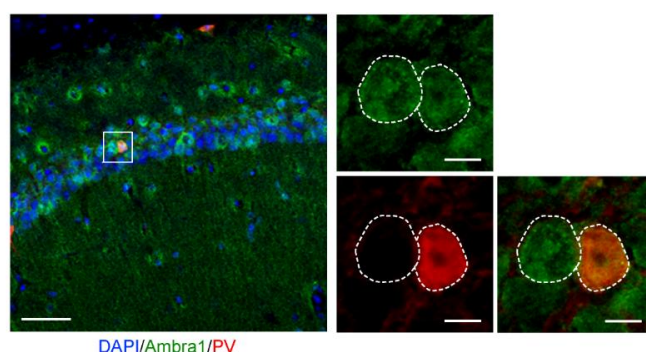
**Fig. 5: Analisi morfologica su sezioni di Ippocampo dorsale in animali WT e *Ambra1*<sup>+/-</sup> femmine.** (A) rappresentazione della marcatura con *Nissl* di sezioni coronali di Ippocampo dorsale di animali WT e *Ambra1*<sup>+/-</sup> femmine (scala: 500  $\mu$ m). (B) suddivisione degli strati Ippocampali usati per l'analisi morfometrica (*stratum oriens*, *stratum pyramidale* del CA1, *stratum radiatum*, *stratum lacunosum-molecolare*, *stratum molecolare*, *girum dentate* superiore, *ilum dentate*, *girum dentate* inferiore). Le femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> mostrano una normale composizione degli strati ippocampali (n= 3 per genotipo).

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

### 5.5 Ambra1 è espressa negli interneuroni PV+

Al fine di valutare se la proteina d'interesse Ambra1 fosse espressa negli interneuroni PV+, abbiamo condotto uno studio di immunofluorescenza nella regione del CA1 dell'Ippocampo. Come mostrato in Fig. 6, è possibile osservare che la proteina Ambra1 è espressa nei neuroni PV+ nel CA1 dell'Ippocampo.



**Fig. 6: Espressione di Ambra1 negli interneuroni PV+.** Doppia marcatura di immunofluorescenza per Ambra1 (verde) e PV (rosso) nella regione del CA1 dell'Ippocampo di una femmina WT. Le sezioni sono state marcate con il DAPI (blu) per evidenziare i nuclei (scala: 50  $\mu$ m). In basso a destra è mostrata l'immagine ingrandita (scala: 5  $\mu$ m) di cellule dello strato piramidale, in cui è visibile un neurone PV+ (rosso), in alto a destra è mostrata l'immagine ingrandita di un altro neurone (verde). L'ultimo ingrandimento a destra mostra il merge (arancione) del neurone PV+ che esprime la proteina Ambra1 (n= 3 animali; 3 sezioni per animale).

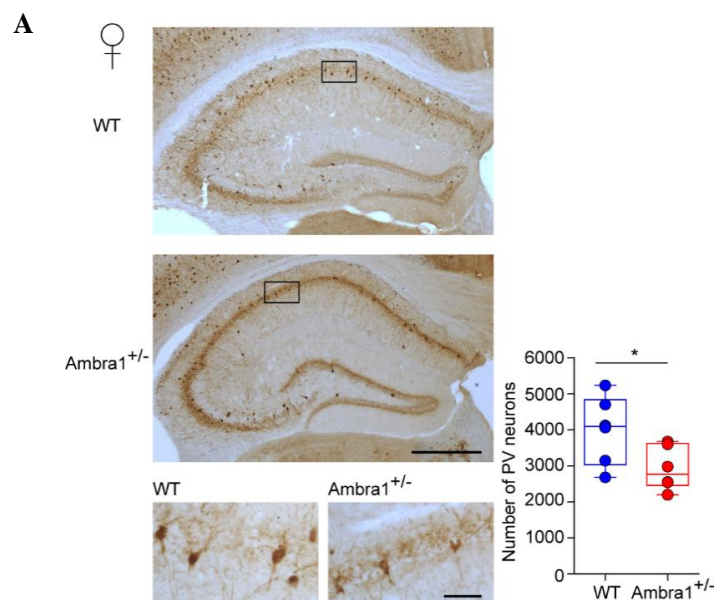


## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

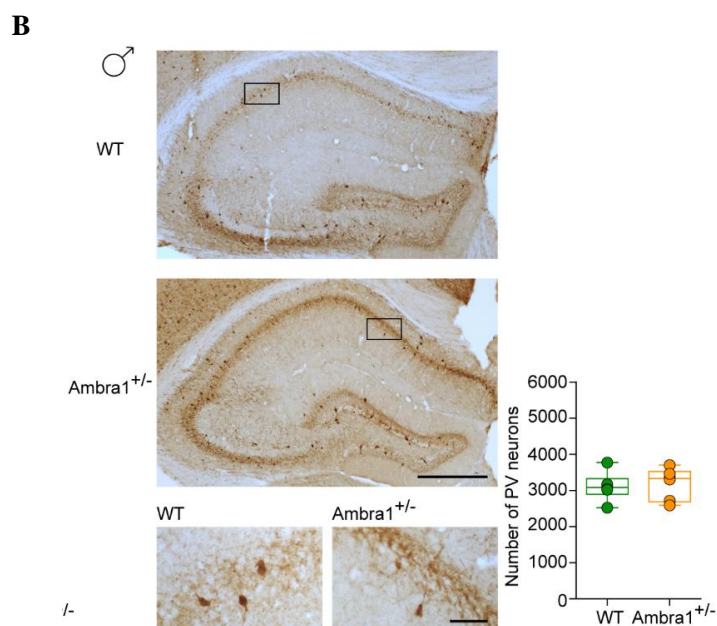
### 5.6 Riduzione del numero di Interneuroni PV+ nell' Ippocampo di femmine

#### Ambra1<sup>+/-</sup>

A questo punto ci siamo chiesti se la riduzione della proteina PV, osservato per *Western Blotting* nelle femmine Ambra1<sup>+/-</sup>, potesse essere provocata dalla riduzione del numero di interneuroni PV+. A questo scopo abbiamo proceduto effettuando la marcatura mediante immunostochimica della proteina PV per visualizzare i neuroni PV+ e quindi abbiamo effettuato la conta stereologica degli interneuroni PV+ in Ippocampo di animali femmine (Fig. 7A) e maschi (Fig. 7B) di entrambi i genotipi. Come è possibile notare dalla figura, le femmine Ambra1<sup>+/-</sup> mostrano una riduzione statisticamente significativa degli interneuroni PV+ in Ippocampo rispetto ai WT. Al contrario, la conta stereologica nell'Ippocampo degli animali maschi Ambra1<sup>+/-</sup> è paragonabile a quella dei controlli. Questi risultati indicano che nell'Ippocampo delle femmine Ambra1<sup>+/-</sup>, ci sono meno neuroni PV+, in accordo con i dati biochimici.



## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra



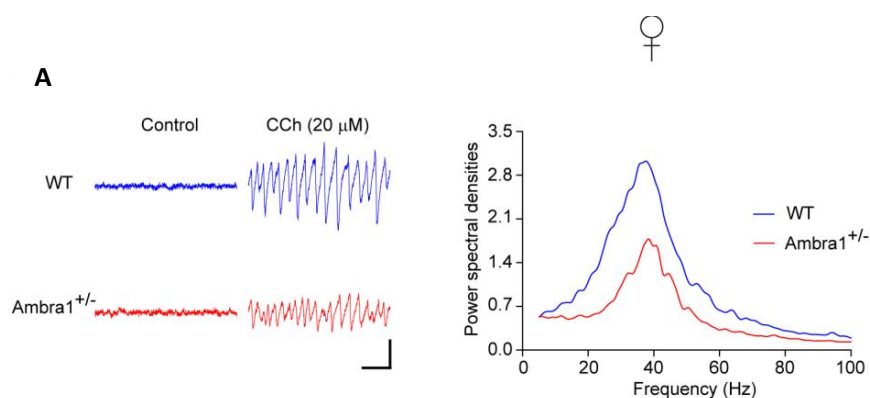
**Fig. 7: Riduzione del numero di interneuroni PV+ in Ippocampo delle femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup>.** Marcatura mediante la tecnica di immunistochemica dei neuroni PV+ in sezioni coronali di Ippocampo dorsale ottenute da femmine (A) e maschi (B) WT e *Ambra1*<sup>+/-</sup> (scala: 500  $\mu$ m). Gli ingrandimenti della zona contrassegnata sono riportati in basso alle rispettive immagini (scala: 50  $\mu$ m). I grafici mostrano la quantificazione della conta stereologica degli interneuroni PV+ ippocampali (n=6 per genotipo e per sesso; 14 sezioni per animale) (*unpaired t-test*: \*P: 0,043).

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

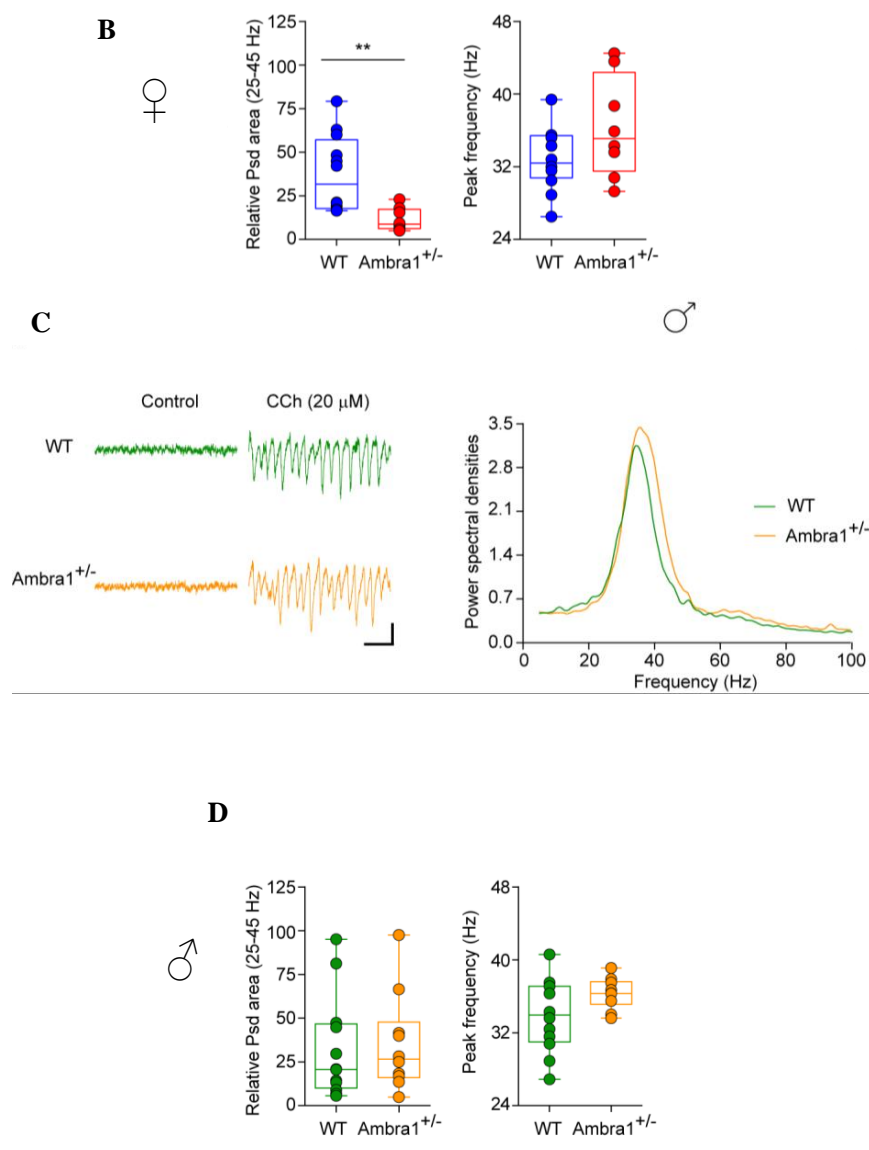
### 5.7 Valutazione delle correnti sinaptiche inibitorie nell'Ippocampo: Riduzione delle oscillazioni gamma nel CA3-CA1 delle femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup>

La stimolazione degli interneuroni PV+ è in grado di generare oscillazioni gamma, si tratta di onde con una frequenza compresa tra 25 Hz e 100 HZ che caratterizzano la trasmissione inibitoria in Ippocampo e Amigdala (Hughes, J.R. 2008). Inoltre, la stimolazione *in vitro* degli interneuroni ippocampali è in grado di determinare oscillazioni a circa 40 Hz nel CA3 (Fisahn, A. et al., 1998). Disfunzioni nella sincronizzazione delle oscillazioni gamma sono state associate ai disturbi di Autismo e Schizofrenia (Lewis, et al., 2005). Dal momento che le femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> presentano meno interneuroni PV+, ci siamo chiesti se potessero esserci alterazioni nella formazione delle oscillazioni gamma.

Negli esperimenti è stato utilizzato il farmaco carbachol (CCh), in grado di indurre oscillazioni gamma *in vitro* (Fisahn, A. et al., 1998) e le registrazioni sono state effettuate nella regione Ippocampale del CA3-CA1. Le registrazioni *in vitro*, in presenza del farmaco, mostrano una forte riduzione dell'area delle oscillazioni gamma (frequenza 25-45 Hz) nelle femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> (Fig. 8A) ma non nei maschi (Fig. 8C), come conseguenza del ridotto numero di interneuroni PV+. La frequenza (Fig. 8B, D) è invece inalterata in entrambi i sessi.



## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

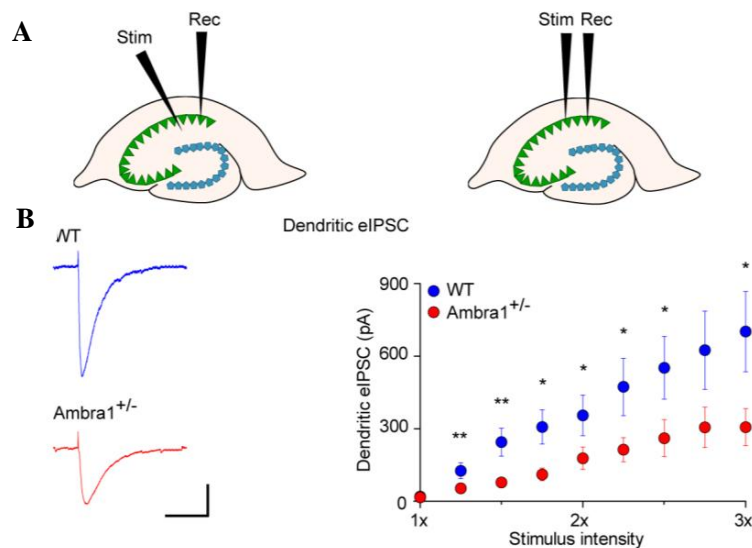


**Fig. 8: Riduzione della potenza delle oscillazioni gamma nell'Ippocampo delle femmine  $Ambra1^{+/-}$ .** (A) A sinistra le tracce mostrano registrazioni dei potenziali locali mediante *array* a multi-elettrodo nello strato piramidale dell'Ippocampo di femmine WT e  $Ambra1^{+/-}$  prima (sinistra) e durante (destra) l'applicazione del farmaco CCh nel bagno di perfusione (scala: 100 ms, 30  $\mu$ V). A destra sono rappresentati gli spettri dei segnali durante la presenza del farmaco. (B) i grafici indicano i cambiamenti nel *power spectral density* (Psd) nelle oscillazioni gamma (25-45 Hz; t-test:  $^{***}P=0,004$ ) e la frequenza (grafico a destra) in 20  $\mu$ M CCh (n= 12 fettine WT e 8 fettine  $Ambra1^{+/-}$  provenienti da 3 animali WT e 3 animali  $Ambra1^{+/-}$ ). (C-D) stesse valutazioni in A-B ma nei maschi WT e  $Ambra1^{+/-}$  (n= 12 fettine WT e 10 fettine  $Ambra1^{+/-}$  provenienti da 3 animali WT e 3 animali  $Ambra1^{+/-}$ ).

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

### 5.8 Alterazioni nel rapporto eccitazione/inibizione delle femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup>

I neuroni PV+ sono in grado di modulare l'attività neuronale eccitatoria agendo sui dendriti e sul soma dei neuroni piramidali dell'Ippocampo. Per studiare gli effetti della riduzione dei neuroni PV+ sul bilancio tra componente eccitatoria/inibitoria, sono state effettuate registrazioni delle correnti eIPSC. Per valutare eventuali alterazioni dell'inibizione della componente dendritica la registrazione è stata effettuata nei neuroni piramidali del CA1 e la stimolazione nello *stratum radiatum*. Per valutare invece, l'inibizione della componente somatica, la registrazione è avvenuta nello strato piramidale del CA1 ma la stimolazione nello strato piramidale (Fig. 9A). A seguito della stimolazione della "Collaterale di *Shaffer*" a varie intensità di corrente, le femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> mostrano una riduzione statisticamente significativa dell'ampiezza di eIPSC e una curva *input/output* più bassa rispetto ai WT (grafico Fig. 9B). Questi dati confermano una ridotta inibizione dendritica dei neuroni piramidali nelle femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup>.



**Fig. 9: Riduzione di eIPSC nell'Ippocampo delle femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup>.** (A) rappresentazione schematica dell'Ippocampo dorsale che mostra il posizionamento dell'elettrodo di stimolazione e di registrazione per registrare eIPSC dendritica (destra) e

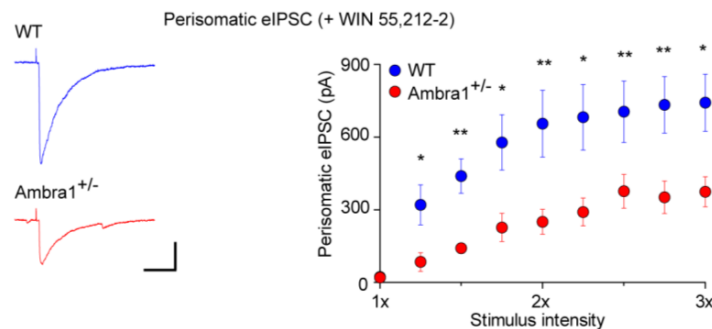
## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

di quella somatica (sinistra). **(B)** Esempio della stimolazione della “Collaterale di Shaffer” a metà del massimale di stimolazione registrato da femmine WT e *Ambra1<sup>+/-</sup>* nei neuroni piramidali del CA1 (-70 mV; scale bar: 100 ms, 100 pA). Il grafico mostra le curve input/output (+/- sem) per eIPSC (n= 17 cellule WT e 16 cellule *Ambra1<sup>+/-</sup>*, 3 animali per genotipo) in risposta a stimolazioni crescenti (1x è l'intensità dello stimolo per 15-20 pA di risposta). eIPSC sono ridotti nelle femmine *Ambra1<sup>+/-</sup>* (t-test \*P= 0.050, \*\*P< 0.010).

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

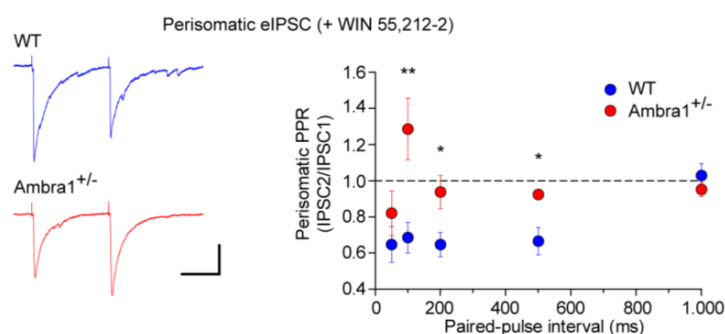
L'inibizione peri-somatica dei neuroni piramidali è mediata principalmente da neuroni PV+ e neuroni positivi alla CCK+. Per isolare la corrente mediata da neuroni PV+, è stato utilizzato il farmaco WIN55,212-2. Si tratta di un agonista dei recettori dei cannabinoidi CB1 che si trovano nei neuroni CCK+, ma che non sono presenti nei neuroni PV+ (Glickfeld, L.L et al., 2008) ed è in grado di bloccare il rilascio di GABA dai neuroni CCK+. Utilizzando questo farmaco, la misura dell'ampiezza dell'eIPSC è 2 volte più bassa nelle femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> rispetto ai WT (Fig. 10), indicando una ridotta inibizione a livello somatico delle femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup>.



**Fig. 10: Riduzione dell'inibizione peri-somatica dei neuroni piramidali.** Esempio di traccia dei neuroni piramidali nel CA1 con registrazione nello strato piramidale in presenza del farmaco WIN55,212-2 (1  $\mu$ M) (-70 mV, scala: 20 ms, 100 pA). Le curva *input/output* (destra) (+- sem, n= 8 cellule WT e 7 cellule *Ambra1*<sup>+/-</sup>, 3 animali per genotipo) mostrano la riduzione di eIPSCs nelle femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> (t-test per le intensità indicate: \*P<0,050, \*\*P<0,010).

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

Inoltre abbiamo valutato la PPR di eIPSC perisomatica in presenza del farmaco WIN55,212-2. La PPR valuta la probabilità di rilascio del neurotrasmettitore da parte del neurone pre-sinaptico, nel nostro caso la PPR risulta aumentata nell'intervallo tra 100-500 ms nelle femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> (Fig. 11). Questo risultato dimostra una probabilità minore di rilascio di GABA nei neuroni PV+ delle femmine eterozigoti rispetto ai WT.

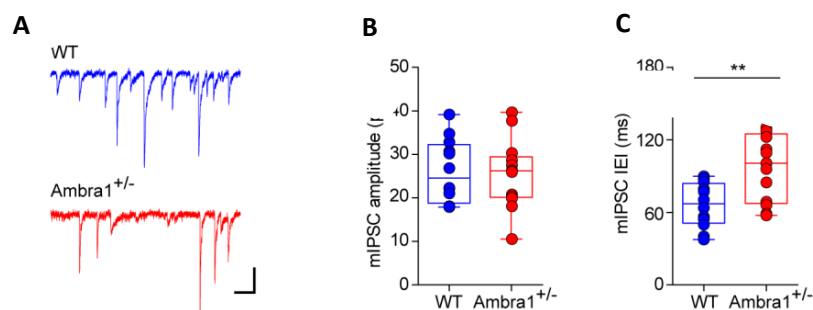


**Fig. 11: Aumento della PPR in presenza del farmaco WIN55,212-2 nelle femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup>.** Le tracce indicano le registrazioni eIPSC perisomatiche dai neuroni piramidali di femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> e WT (a intervalli di 100 ms) (-70 mV, scala: 50 ms, 100 pA) a doppia stimolazione a metà del massimale nello strato piramidale in presenza di WIN55,212-2. La PPR dell'inibizione peri-somatica è aumentata nelle femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> (t-test per gli intervalli indicati: \* $P < 0,050$ , \*\* $P < 0.010$ ;  $n=8$  cellule WT e 7 cellule *Ambra1*<sup>+/-</sup>, 3 animali per genotipo).



## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

Per confermare che la ridotta inibizione nel CA1 delle femmine  $Ambra1^{+/-}$  fosse dovuta ad un meccanismo pre-sinaptico e non *post*-sinaptico, sono state registrate le correnti mIPSC dai neuroni piramidali del CA1 in presenza di lidocaina, farmaco che blocca i potenziali di azione. L'ampiezza di mIPSC non varia tra femmine  $Ambra1^{+/-}$  e WT, dimostrando l'inalterazione della risposta dei recettori GABA nella porzione post-sinaptica. Tuttavia si ha una riduzione significativa della frequenza di mIPSC nelle femmine  $Ambra1^{+/-}$ , in accordo con la riduzione della probabilità di rilascio di GABA.

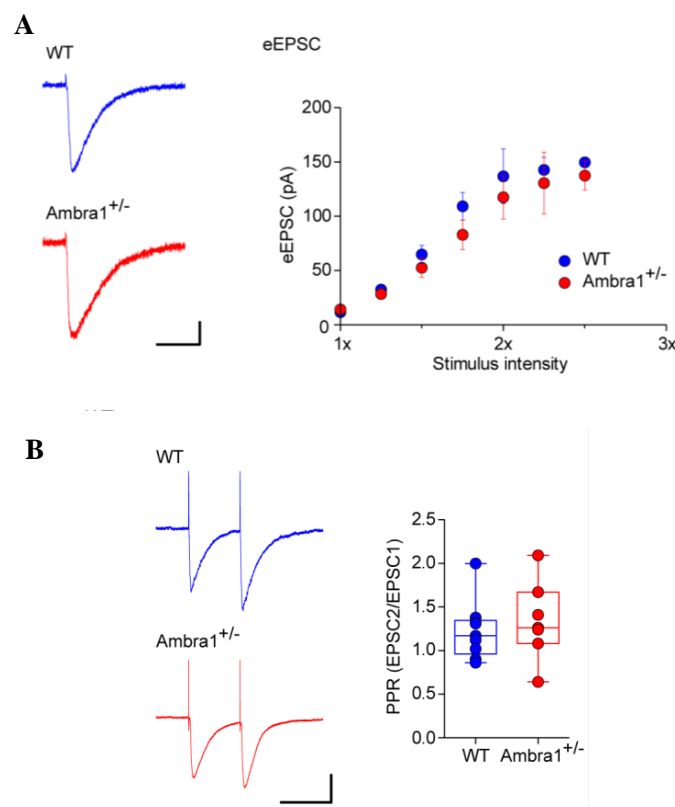


**Fig. 12: Analisi della componente post-sinaptica mIPSC.** (A) rappresentazione dei mIPSC registrati da neuroni piramidali di femmine  $Ambra1^{+/-}$  e WT (-70 mV; scala: 100 ms, 20 pA). (B) ampiezza dei mIPSC non varia tra femmine  $Ambra1^{+/-}$  e WT, ma l'intervallo tra eventi (*inter-event interval* IEI) è significativamente ridotto (C) (n= 12 cellule WT e 13 cellule  $Ambra1^{+/-}$ , 3 animali per genotipo; t-test: \*\*P= 0,003).

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

### 5.9 Valutazione della componente eccitatoria dell'Ippocampo

Per lo studio della neurotrasmissione eccitatoria dei neuroni piramidali, è stata studiata la corrente eEPSC. A seguito dello stimolo della “Collaterale di *Shaffer*”, non si evidenziano cambiamenti nell'ampiezza dei eEPSC nè nelle curve di *input/output* tra femmine eterozigoti e WT (Fig. 13A). Anche la misurazione del PPR di eEPSCs non varia tra le femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> e WT, suggerendo una simile probabilità del rilascio di glutammato tra i due genotipi (Fig. 13B). Nel complesso questi dati indicano che non c'è alterazione della trasmissione eccitatoria nell'Ippocampo delle femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup>.



**Fig. 13: Le femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> non mostrano alterazioni della trasmissione sinaptica eccitatoria.** (A) tracce rappresentative di eEPSC a intensità di stimolazione a metà del massimale e curve di *input/output* per le registrazioni di eEPSC dei neuroni piramidali del CA1 da femmine WT e *Ambra1*<sup>+/-</sup> a -70 mV (n= 7 cellule WT e 10 cellule *Ambra1*<sup>+/-</sup>, 3 animali per genotipo; scala: 50 ms, 20 pA) in risposta all'aumento dell'intensità della

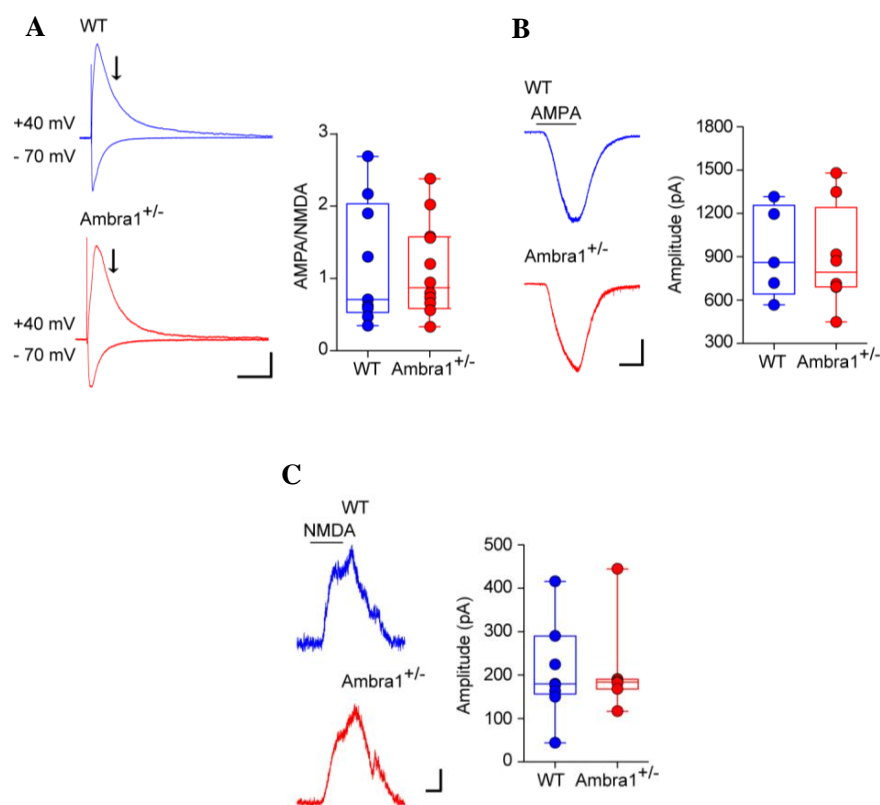
## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

stimolazione della “Collaterale di *Schaffer*”. **(B)** le tracce rappresentano la risposta a doppia stimolazione (a intervalli di 100 ms, -70 mV; scala: 100 ms, 50 pA) di registrazioni eEPSC dei neuroni piramidali del CA1 con stimolazione a metà del massimale. La PPR non varia tra i due genotipi (n= 9 cellule WT e 7 cellule *Ambra1*<sup>+/-</sup>, 3 animali per genotipo).

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

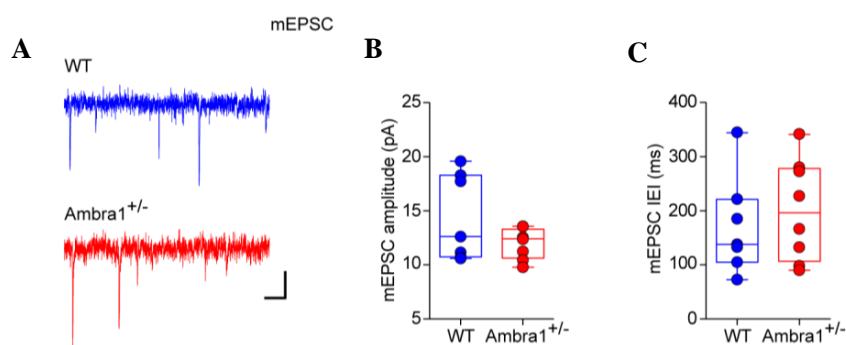
Per confermare questo dato abbiamo misurato il rapporto tra correnti AMPA/NMDA (Fig. 14A) e della corrente AMPA-mediata e NMDA-mediata, e abbiamo osservato che non sussiste variazione tra femmine WT e *Ambra1*<sup>+/-</sup> (Fig. 14 B,C).



**Fig. 14: Analisi della AMPA/NMDA ratio e delle correnti AMPA-NMDA indotte:** (A) tracce di eEPSC del recettore AMPA (a -70 mV) e AMPA+NMDA (a +40 mV) di femmine WT e *Ambra1*<sup>+/-</sup> nei neuroni piramidali del CA1 (scala: 100 ms, 40 pA) (n= 9 cellule WT e 12 cellule *Ambra1*<sup>+/-</sup>, 3 animali per genotipo). (B) rappresentazione delle correnti AMPA indotte applicando AMPA nel bagno di perfusione in presenza di CTZ (scala: 2 min, 200 pA) (C) rappresentazione delle correnti NMDA indotte applicando NMDA nel bagno di perfusione (scala: 1 min, 50 pA). I grafici mostrano le registrazioni dei neuroni piramidali del CA1 a -70 mV e +40 mV. Non ci sono differenze tra animali WT e *Ambra1*<sup>+/-</sup> (B: n=5 cellule WT e 8 cellule *Ambra1*<sup>+/-</sup>, 2 animali per genotipo; C: n=9 cellule WT e 7 cellule *Ambra1*<sup>+/-</sup>, 2 animali per genotipo).

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

Infine abbiamo analizzato la frequenza e l'ampiezza delle correnti *miniature post-sinaptiche* eccitatorie AMPAR-mediate, che non dimostrano alcuna differenza tra le femmine  $Ambra1^{+/-}$  e i WT. (Fig. 15A, B, C). Questi dati dimostrano che non c'è un'alterazione nella componente eccitatoria nelle femmine eterozigoti per  $Ambra1$ .

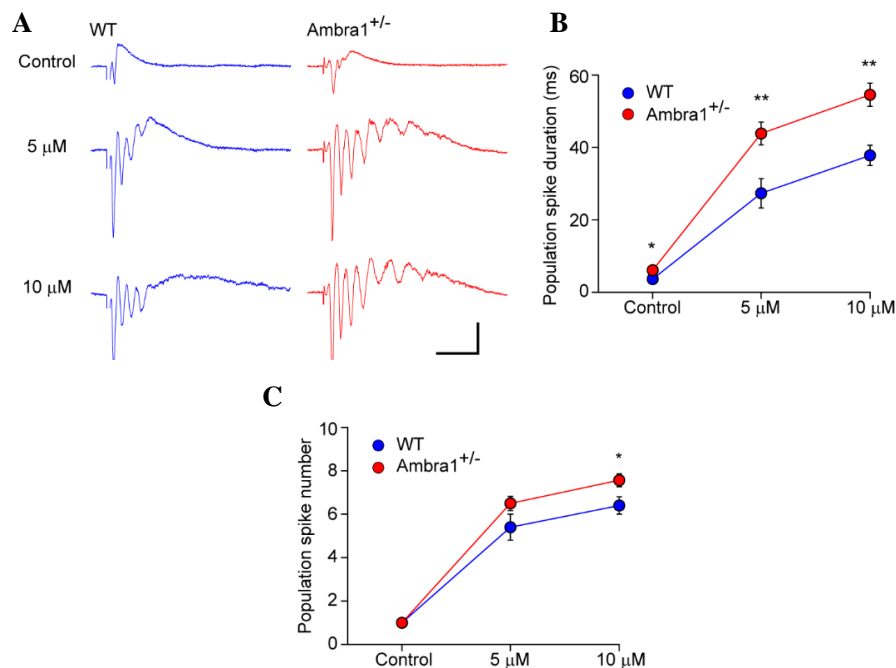


**Fig. 15: Registrazioni mEPSC AMPAR-mediate.** (A) rappresentazione degli mEPSC AMPAR-mediate provenienti dai neuroni piramidali del CA1 di femmine WT e  $Ambra1^{+/-}$  (-70 mV, scala: 100 ms, 5 pA). (B) il grafico mostra l'ampiezza di mEPSC (C) il grafico mostra l'intervallo tra eventi (n= 7 cellule WT e 8 cellule  $Ambra1^{+/-}$  3 animali per genotipo).

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

### 5.10 Aumento dell'eccitabilità e della plasticità sinaptica nelle femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup>

Per valutare le conseguenze funzionali dello squilibrio tra il rapporto inibizione/eccitazione nelle femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup>, abbiamo studiato la predisposizione del circuito ippocampale del CA1 all'ipereccitabilità mediante registrazioni di *population spikes* nello strato piramidale. La stimolazione nello *stratum radiatum* genera un singolo picco nelle fettine degli animali WT, mentre nelle femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> il primo picco è seguito da un secondo picco, evidenziando un aumento della durata totale della risposta (Fig. 16A, B). Successivamente durante la perfusione è stata applicata la bicucullina alle concentrazioni di 5 e 10  $\mu\text{M}$ . La bicucullina è un antagonista del recettore GABA<sub>A</sub>, la sua somministrazione quindi determina l'insorgenza di molteplici picchi (sinonimo di iper-eccitazione) sia nelle sezioni di animali di controllo che *Ambra1* (Fig. 16A). Nelle sezioni di animali *Ambra1*<sup>+/-</sup>, l'effetto della bicucullina è più marcato ad entrambe le concentrazioni (Fig. 16A, B, C).



**Fig. 16:** Le femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> presentano una aumentata attività epilettica in risposta alla somministrazione del farmaco bicucullina. (A) registrazioni di

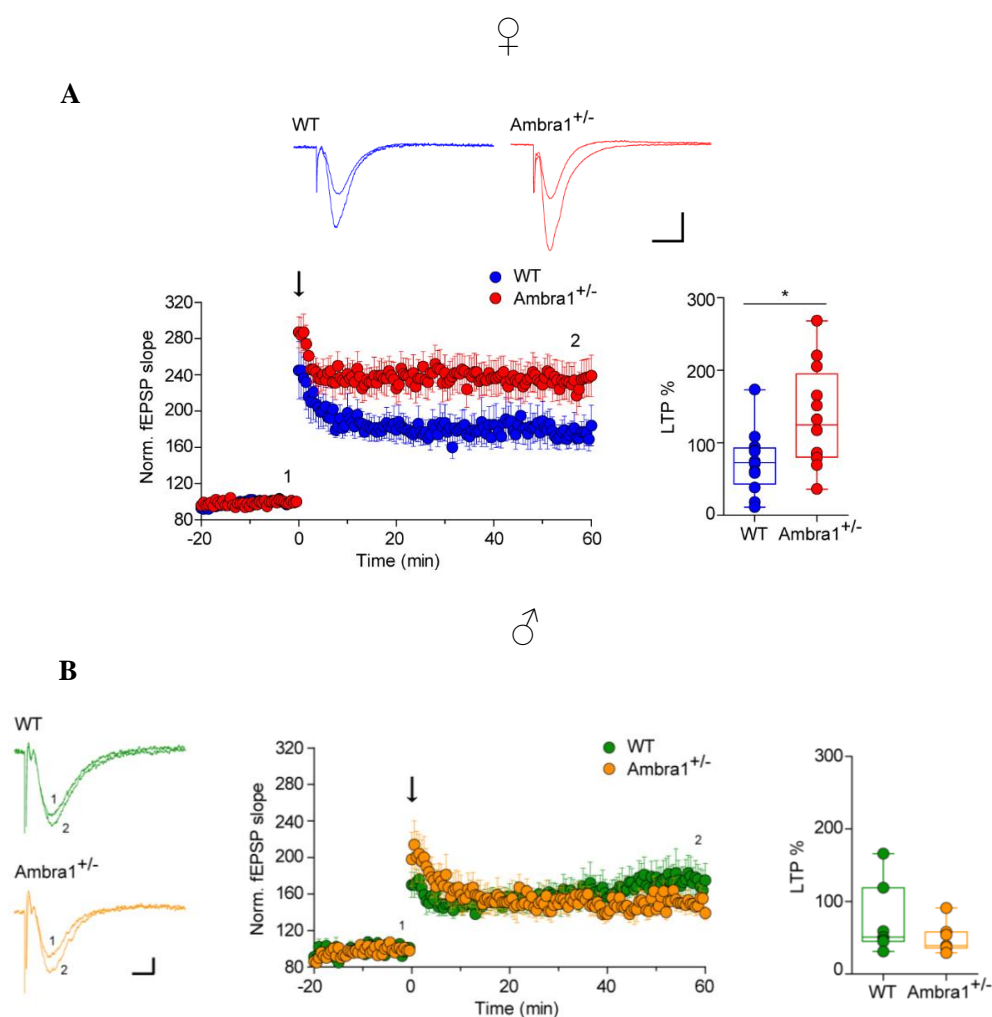
## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

popolazioni di picchi evocati nello strato piramidale seguiti da stimolazione a metà del massimale della “Collaterale di *Schaffer*” in assenza (condizione di controllo) e in presenza di bicucullina 5  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$  nelle sezioni di Ippocampo dorsale di animali WT e *Ambra1*<sup>+/-</sup> (scala: 20 ms, 0,5 mV). Nelle femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> sono maggiori sia la durata delle risposte evocate (**B**) che il numero dei picchi (**C**) (n= 5 fettine WT e 8 sezioni *Ambra1*<sup>+/-</sup> per 3 genotipi ciascuno; t-test **B**: \*P=0,048 per il controllo, \*\*P= 0,008 per 5  $\mu\text{M}$ , \*\*P=0,004 per 10  $\mu\text{M}$ ; **C**: \*P=0,037).

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

Abbiamo quindi analizzato la plasticità ippocampale delle sinapsi del CA3-CA1, che è stata studiata stimolando la “Collaterale di *Schaffer*” e registrando il *field* potenziale *post*-sinaptico eccitatorio (fEPSP) nei dendriti del CA1. L'LTP è significativamente maggiore nelle femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> rispetto ai WT, in accordo con la riduzione dell'inibizione peri-somatica e dendritica dei neuroni piramidali del CA1 (Fig. 17A). Al contrario, la misurazione dell'LTP non mostra variazioni nei maschi *Ambra1*<sup>+/-</sup> rispetto ai relativi WT (Fig. 17B).



**Fig. 17: Analisi della plasticità sinaptica nel CA1 dell'Ippocampo animali WT e *Ambra1*<sup>+/-</sup> maschi e femmine.** (A) Nel grafico a destra è rappresentata la misura della plasticità sinaptica intesa come % LTP tra femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> e WT, al centro invece è espressa la pendenza fEPSP in funzione del tempo, registrata a riposo (1) e un'ora dopo l'induzione di un treno ad alta frequenza (2). Le femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> presentano un aumento della pendenza di fEPSP a 55-60 minuti dopo il treno (n= 12 femmine provenienti



## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

da 6 animali per genotipo; t-test: \*P= 0,018). **(B)** L'LTP non mostra differenze tra maschi WT e Ambra1<sup>+/-</sup> (n= 7 fettine provenienti da 3 animali per genotipo).

|

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

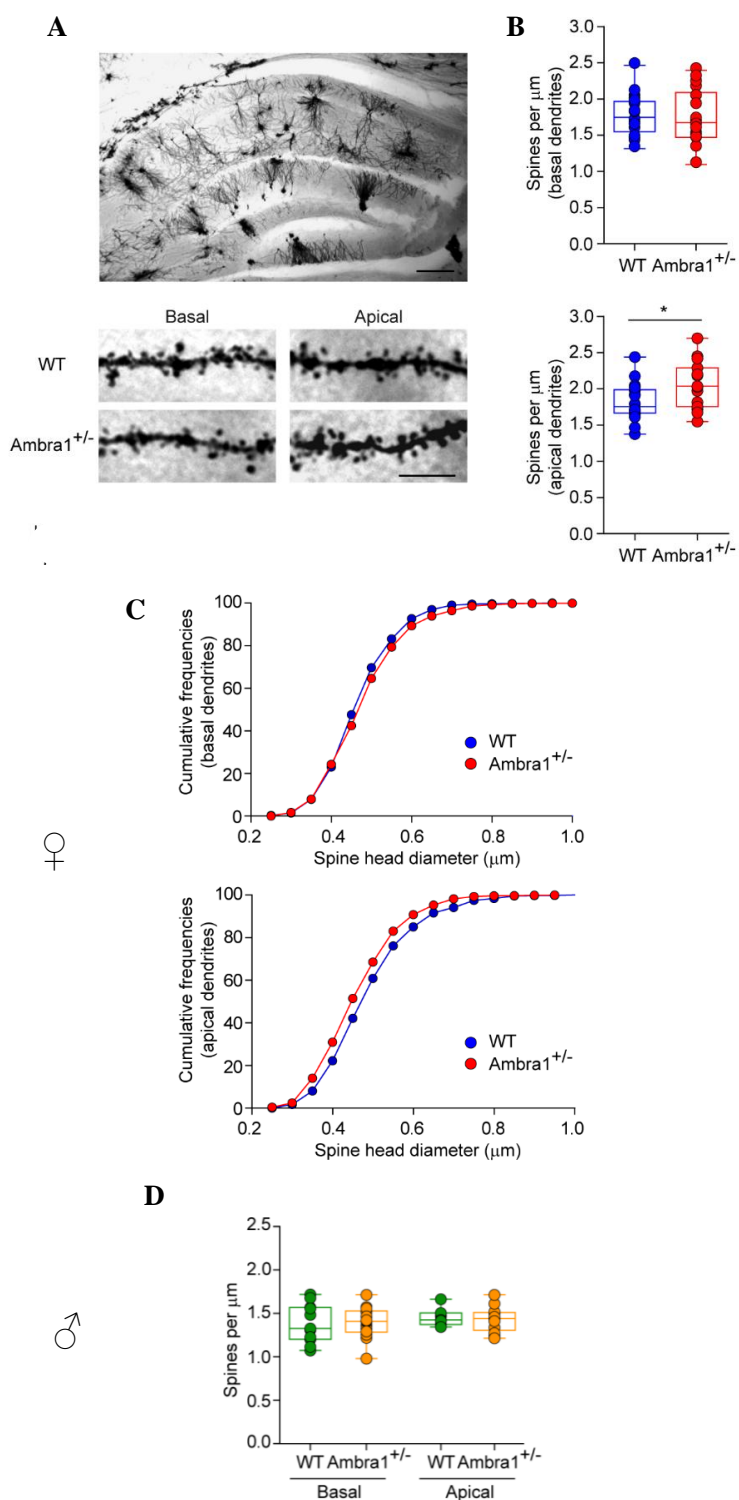
---

### 5.11 Aumento della densità di spine dendritiche nell'Ippocampo di femmine

#### Ambra1<sup>+/-</sup>

Numerosi studi in letteratura hanno correlato anomalie strutturali delle spine dendritiche sia negli esseri umani che nei modelli murini affetti da Autismo (Penzes, P. et al., 2011, Hutsler, J.J. et al., 2010). Sulla base di tali evidenze, ci siamo chiesti se l'alterato LTP fosse dovuto ad un'alterazione della morfologia delle spine dendritiche. Abbiamo quindi proceduto all'analisi delle spine mediante la marcatura di Golgi dei neuroni piramidali del CA1 (Fig. 18A). Dall'analisi della densità e del diametro della testa delle spine dendritiche, emerge un aumento della densità delle spine dendritiche apicali situate nello *stratum radiatum* delle femmine Ambra1<sup>+/-</sup> ai WT. Rimane invece inalterato tra femmine Ambra1<sup>+/-</sup> e WT il numero delle spine dendritiche basali localizzate nello *stratum oriens* (Fig. 18B). Abbiamo anche effettuato un'analisi volta alla misurazione del diametro della testa delle spine, dal momento che cambiamenti nelle dimensioni determinano alterazioni della trasmissione sinaptica (Harris, K.M. et al., 1992). Dall'analisi degli esperimenti effettuati con la marcatura del Golgi, si evidenzia un aumento del diametro nella testa delle spine basali degli animali Ambra1<sup>+/-</sup> femmine rispetto ai WT, mentre il diametro risulta ridotto per la testa delle spine apicali degli animali Ambra1<sup>+/-</sup> femmine (Fig. 18C). Al contrario la densità delle spine dendritiche apicali e basali effettuata sui maschi Ambra1<sup>+/-</sup> e WT, non ha riportato differenze tra i due genotipi (Fig. 18D).

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra



**Fig. 18: Analisi della densità e del diametro delle spine dendritiche nei neuroni piramidali mediante la marcatura di Golgi. (A)** immagine rappresentativa di una

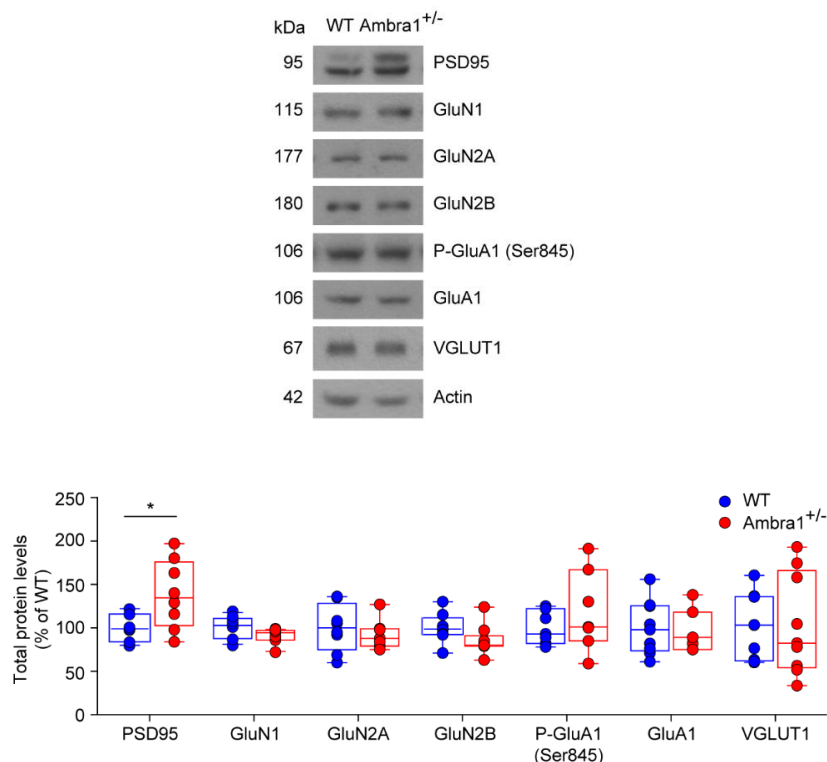
## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

sezione di Ippocampo dorsale marcata con la tecnica del Golgi (scala: 50  $\mu\text{m}$ ). In basso sono rappresentati segmenti di dendriti basali e apicali dei neuroni piramidali del CA1 in animali femmine WT e  $\text{Ambra1}^{+/}$  (scala: 5  $\mu\text{m}$ ). **(B)** densità delle spine dendritiche nel topo femmina, espresse come numero di spine per 1  $\mu\text{m}$  di segmento dendritico (\* $P=0,023$ ,  $n=5$  animali per genotipo, 18 segmenti di dendriti basali di 60  $\mu\text{m}$  per WT e 17 per  $\text{Ambra1}^{+/}$ , 18 segmenti di dendriti basali  $\mu\text{m}$  per WT e 15 per  $\text{Ambra1}^{+/}$ ) **(C)** nei grafici sono riportate le frequenze cumulative del diametro della testa delle spine dendritiche nei dendriti basali e apicali dei neuroni piramidali di animali femmine (basali,  $P=0,018$ ,  $Z=1,532$ ; apicali,  $P=1,00 \times 10^{-5}$ ,  $Z=2,490$ ; con Kolmogorov-Smirnov *test*) **(D)** il grafico rappresenta la densità delle spine dendritiche basali e apicali dei neuroni piramidali del CA1 nei maschi WT e  $\text{Ambra1}^{+/}$ .

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

Per confermare i dati ottenuti, sono state effettuate analisi molecolari su estratti ippocampali totali. I livelli delle subunità recettoriali eccitatorie (GluN1, GluN2A, GluN2B, P-GluA1, GluA1) e del trasportatore del glutammato (VGLUT1) sono invariati tra femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> e WT. È stato evidenziato però l'aumento statisticamente significativo del marcatore PSD95, proteina strutturale importante per la funzione delle sinapsi, nelle femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> rispetto ai WT (Fig. 19).



**Fig. 19: Analisi biochimica di estratti ippocampali totali di animali femmine WT e *Ambra1*<sup>+/-</sup>:** immagine rappresentativa di *Immunoblot* di estratti di proteine totali marcate per PSD95, GluN1, GluN2A, GluN2B, P-GluA1, GluA1, VGLUT1. L'Actina è stata utilizzata come controllo di caricamento. Il grafico mostra la quantificazione densitometrica di ciascun marcatore espressa come % sul valore WT di riferimento (n=8 topi per genotipo e per sesso). Le femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> mostrano livelli aumentati di PSD95 (t-test: PSD95, \*P= 0,032).

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

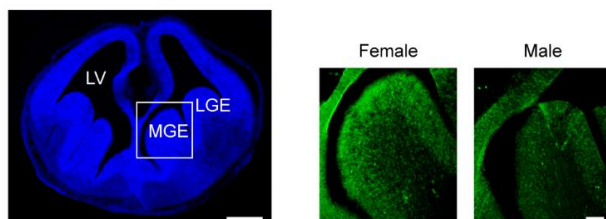
---

### 5.12 Espressione della proteina Ambra1 nella MGE degli embrioni e13.5

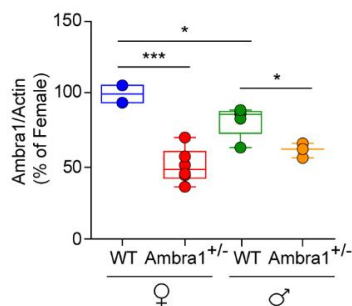
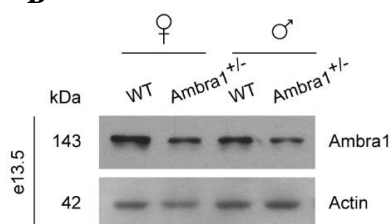
In età embrionale gli interneuroni PV+ nei topi originano dall'area ganglionare mediana (MGE) tra il giorno 11 (e11) ed e17, con un picco per i neuroni del CA1 e CA3 a e13.5. Al fine di comprendere se la riduzione degli interneuroni PV+ riscontrata in età adulta (2-3 mesi) potesse essere correlata ad alterazioni delle cellule progenitrici degli interneuroni nel periodo del neurosviluppo, sono state effettuate analisi su embrioni maschi e femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> e rispettivi WT a diverse età. La prima analisi che abbiamo condotto è stata volta a confermare che la proteina *Ambra1* fosse espressa nella MGE dei WT maschi e femmine a e13.5. Abbiamo quindi osservato che la proteina è espressa in entrambi i sessi sebbene l'intensità di espressione sia ridotta nei maschi (Fig. 20A). Questo dato è stato confermato anche da esperimenti molecolari, in cui è stata valutata l'espressione della proteina in estratti totali di embrioni maschi e femmine di entrambi i genotipi (Fig. 20B). Emerge in maniera univoca che i livelli della proteina *Ambra1* sono ridotti nella MGE degli embrioni *Ambra1*<sup>+/-</sup> in entrambi i genotipi rispetto ai rispettivi WT. La riduzione di espressione della proteina *Ambra1* negli embrioni *Ambra1*<sup>+/-</sup> femmine e maschi rispetto al proprio controllo è invece mostrata *nel* grafico a destra (Fig. 20C), che mostra una riduzione della proteina *Ambra1* più pronunciata nelle femmine rispetto ai maschi.

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

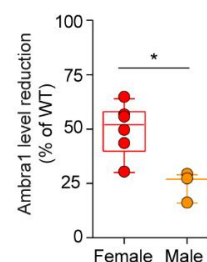
**A**



**B**



**C**

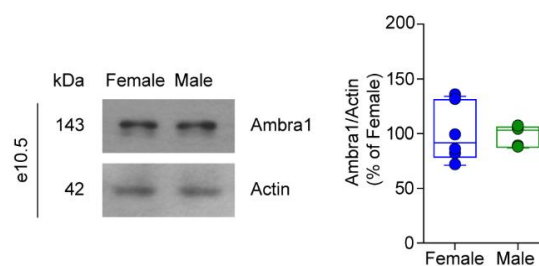


**Fig. 20: Espressione della proteina Ambra1 nella MGE di embrioni maschi e femmine WT e Ambra1<sup>+/-</sup> a e13.5.** (A) sinistra, sezione coronale di embrione WT femmina e13.5 marcata con DAPI (blu); destra, immagine ingrandita di MGE marcata per immunofluorescenza con l'anticorpo Ambra1 (verde). La proteina Ambra1 è espressa nella MGE e la sua espressione è maggiore negli embrioni femmine rispetto ai maschi (scala: 500  $\mu$ m; inset 50  $\mu$ m). (B) Immunoblot rappresentativo di estratti di proteine totali da cervello di embrioni femmine e maschi WT e Ambra1<sup>+/-</sup> marcati con l'anticorpo Ambra1. L'Actina è stata usata come controllo di caricamento. Il grafico mostra la quantificazione densitometrica delle bande in grigio espressa come % di femmine WT (femmine: n=4 WT e 6 Ambra1<sup>+/-</sup>; maschi: n= 5 WT e 3 Ambra1<sup>+/-</sup>; ANOVA a due vie per gender x genotipo: P= 0,009; Bonferroni *post-hoc* test: WT femmine- Ambra1<sup>+/-</sup> femmine, \*\*\*P= 1,00x10<sup>-4</sup>; WT femmine-WT maschi, \*P<0,05; WT maschi- Ambra1<sup>+/-</sup> - maschi, \*P<0,05). (C) il grafico mostra la riduzione della proteina Ambra1 nel cervello degli embrioni maschi e femmine Ambra1<sup>+/-</sup> a E13.5 rispetto al proprio controllo ed espresse in % sulle femmine WT (n come in B; t-test tra i sessi: \*P= 0,012).

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

### 5.13 Espressione della proteina Ambra negli embrioni a e10.5

È noto che il differenziamento gonadico, che avviene nel topo a circa e10.5, determina una diversa espressione di alcune proteine. Per valutare se la differenza di espressione di Ambra1 tra maschi e femmine WT, sia dovuta all'influenza degli ormoni gonadici oppure a fattori genetici relativi al sesso, abbiamo quantificato i livelli di proteina Ambra1 a e10.5. L'analisi molecolare non ha evidenziato differenze in termini di livelli di proteina Ambra1 tra gli embrioni maschi e femmine WT (Fig. 21). Questi risultati indicano quindi che gli ormoni sessuali giocano un ruolo nell'espressione della proteina Ambra1 nelle femmine eterozigoti rispetto ai maschi.



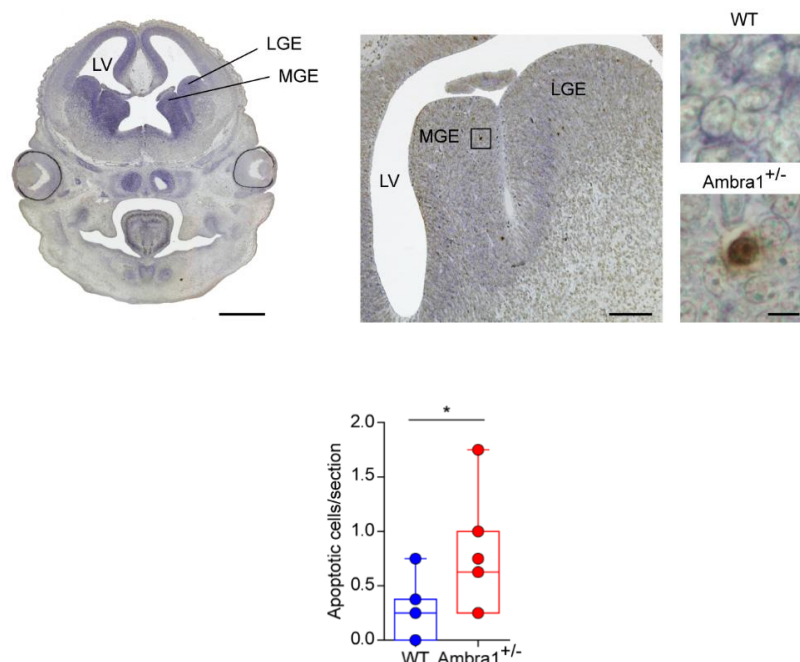
**Fig. 21: Immunoblot di estratti totali di cervello embrionale a e10.5 marcati per Ambra1<sup>+/-</sup>.** Immagine rappresentativa di *immunoblot* per la proteina Ambra1. L'Actina è stata usata come controllo di caricamento. Il grafico a destra mostra la quantificazione densitometrica delle bande in grigio espresse come % di animali femmine WT (femmine: n=6, maschi: n=5).



## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

### 5.14 Le cellule progenitrici degli interneuroni sono sensibili all'apoptosi nelle femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup>

Dal momento che la proteina *Ambra1* è un regolatore positivo dell'autofagia, coinvolto nella degradazione di componenti cellulari al fine di consentire la sopravvivenza della cellula in condizioni critiche, abbiamo cercato di capire se la riduzione significativa degli interneuroni PV+ nelle femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> adulte potesse essere dovuta ad un'aumentata sensibilità all'apoptosi delle cellule progenitrici. Abbiamo quindi marcato le cellule apoptotiche mediante la tecnica del TUNEL che marca le estremità 3'-OH libere dei frammenti di DNA. In questa marcatura si sfrutta l'attività dell'enzima terminal desossinucleotidil trasferasi (TdT) che lega desossiribonucleotidi, in particolare dUTP. Grazie all'analisi istologica del TUNEL, abbiamo riscontrato un aumento delle cellule apoptotiche (TUNEL positive) nella MGE di femmine *Ambra1*<sup>+/-</sup> a e13.5 (Fig. 22).



**Fig. 22: Marcatura delle cellule apoptotiche mediante il saggio TUNEL su sezioni coronali di embrioni a e13.5.** A sinistra, sezione coronale di embrione WT a e13.5; al centro, immagine della MGE e della LGE della sezione di embrione femmina *Ambra1*<sup>+/-</sup>,

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

con le relative aree ingrandite a destra che mostrano i neuroni positivi al TUNEL per gli animali *Ambra1<sup>+/+</sup>* e WT (scala: 500  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ ). Il grafico mostra il numero di neuroni positivi al TUNEL per sezione nelle aree analizzate (n=7 animali per genotipo, 4 sezioni per animale; t-test \*P= 0,044). LV, ventricolo laterale; LGE, eminenzia ganglionare laterale; MGE eminenzia ganglionare mediana.

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

### 6. Discussione

Negli ultimi 20 anni si è assistito ad un aumento delle diagnosi di Autismo e Schizofrenia, entrambi classificati come disturbi del neurosviluppo. Nonostante le due patologie si presentino con sintomi clinici differenti, per l'Autismo rappresentati da difficoltà comunicative e sociali, per la Schizofrenia da disordini del pensiero, del comportamento e allucinazioni, in realtà sembrano essere due facce della stessa medaglia. Per entrambe le condizioni patologiche infatti, non esiste un fattore scatenante, bensì è l'interazione tra geni predisponenti e ambiente a determinarne l'insorgenza. Già da molti anni, gli studi scientifici si sono concentrati sulla ricerca di alterazioni genetiche che possano predisporre queste patologie dimostrando che solo una piccola percentuale di casi di Autismo sono riferibili ad alterazioni genetiche ereditabili (Marshall, C.R. et al., 2008). Per la Schizofrenia invece, gli studi condotti su gemelli ne attribuiscono una ereditabilità dell'80% (van Os, J. and Kapur, S., 2009). Per entrambe le patologie, i geni coinvolti sono quelli che svolgono un ruolo chiave nella formazione e nel funzionamento delle sinapsi eccitatorie ed inibitorie, determinando uno squilibrio nel bilancio eccitazione/inibizione (Kirov, G. et al., 2012; Kirov, G., 2015; Durand, M.C. et al., 2007; Bozdagi, O. et al., 2010). Se tale condizione si verifica in un'area del cervello come l'Ippocampo, potrebbero insorgere alterazioni comportamentali e difficoltà comunicative, in quanto regione adibita ai processi di memoria, apprendimento e al comportamento sociale (Inan, M., et al., 2013; Benes, F.M. et al., 1998). Nell'Ippocampo, la trasmissione sinaptica eccitatoria è mediata dai neuroni piramidali la cui attività è modulata dagli interneuroni GABAergici. Tra questi, gli interneuroni Parvalbumina positivi (PV+), sono estremamente importanti per la fine modulazione dei neuroni piramidali, al punto che alterazioni a loro carico sono state correlate ai disturbi del neurosviluppo (Filice, F. and Swaller, B., 2007). Un gene fondamentale nel periodo del neurosviluppo è il gene *AMBRA1*. Studi pubblicati recentemente sia sul modello animale *Ambra1<sup>+/-</sup>* (Dere, E. et al., 2014) che su pazienti (Mitjans, M. et al., 2017;

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

Heinreich, A. et al., 2013) hanno dimostrato un'associazione tra il gene *AMBRA1* e il Disturbo da Spettro Autistico e la Schizofrenia.

In questo ampio e complesso scenario, si colloca il mio lavoro di tesi, che pone un tassello importante nella comprensione del ruolo della proteina *Ambra1* nella funzione ippocampale e del suo coinvolgimento in questi disturbi. Di particolare rilevanza, è il fatto che tutti gli esperimenti eseguiti rivelano un'alterazione ristretta esclusivamente agli animali *Ambra1<sup>+/-</sup>* femmine. Questa caratteristica sembra essere in contrasto con quanto riportato in letteratura sull'Autismo negli esseri umani, che invece evidenzia una maggiore prevalenza della patologia nei maschi rispetto alle femmine, con un rapporto di 4:1. Tuttavia, questo rapporto è rappresentativo solo di alcuni tipi di Autismo e sembra addirittura sovrastimato a causa del ridotto numero di diagnosi nelle femmine (Halladay, A.K. et al., 2015).

In questo lavoro abbiamo dimostrato che l'animale eterozigote per *Ambra1* presenta un comportamento simil autistico, caratterizzato da difficoltà nella comunicazione e nel comportamento sociale, ristretto al genere femminile. Causa di tale fenotipo, abbiamo dimostrato essere la riduzione degli interneuroni PV+ nella regione dell'Ippocampo, area cerebrale che gioca un ruolo cruciale nella cognizione e nel comportamento sociale. Dal momento che le femmine eterozigoti presentano un ridotto numero di interneuroni PV+, abbiamo caratterizzato la trasmissione GABAergica in Ippocampo. Come mostrato dai nostri risultati, la riduzione del numero di interneuroni in Ippocampo, produce una ridotta trasmissione sinaptica inibitoria nell'Ippocampo delle femmine *Ambra1<sup>+/-</sup>* che si traduce con la riduzione delle oscillazioni gamma, tipiche degli interneuroni PV+, ridotta plasticità sinaptica nel CA3-CA1 e ridotta densità delle spine dendritiche dei neuroni piramidali; mentre l'eccitabilità dei neuroni piramidali sotto l'effetto del farmaco bicucullina è aumentata. Abbiamo inoltre dimostrato che i neuroni piramidali delle femmine *Ambra1<sup>+/-</sup>* presentano una ridotta inibizione a livello perisomatico (confermate dagli esperimenti con il farmaco WIN55,212-2).

Tutte le differenze osservate in età adulta tra i genotipi e i sessi, sono attribuibili alla maggiore espressione della proteina *Ambra1* nelle femmine WT rispetto ai maschi WT. È interessante osservare che la diversa espressione della proteina

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

Ambra1 non si mantiene costante durante la vita dell'animale: infatti nell'embriogenesi, la differenza tra maschi e femmine è rilevabile a e13.5 mentre, più precocemente, a e10 i livelli di proteina sono identici tra i due sessi.

Tale differenza potrebbe essere dipendente dalla differenziazione gonadica, che determinerebbe una maggiore espressione della proteina Ambra1 negli animali di sesso femminile.

Gli interneuroni PV+, sono generati nella MGE dallo stadio e11 a e17 e successivamente migrano nell'Ippocampo. I nostri esperimenti condotti sugli embrioni a e13.5, hanno dimostrato un aumento di cellule apoptotiche nei neuroni della MGE di femmine Ambra1<sup>+/-</sup>. La proteina Ambra1 infatti, svolge un ruolo fondamentale nella mitofagia. Noi ipotizziamo che i ridotti livelli di Ambra1, impediscono un'adeguata eliminazione di eventuali mitocondri danneggiati, rendendo le cellule progenitrici degli interneuroni ippocampali più sensibili all'apoptosi. Questa ipotesi trova riscontro se consideriamo il fatto che i mitocondri sono organelli indispensabili per lo sviluppo degli interneuroni, per il loro metabolismo e per la loro migrazione, inoltre disfunzioni mitocondriali sono state associate all'Autismo, ad epilessia e disordini del pensiero (Marin, O. et al., 2012; Rossignol, D. A. and Frye, R. E., 2012). La condizione di aploinsufficienza della proteina Ambra1 in eterozigosi, risulta più dannosa negli embrioni femmine in quanto probabilmente richiedono maggiori livelli di espressione della proteina per completare il fisiologico sviluppo degli interneuroni.

Sulla base di questi risultati, possiamo affermare il coinvolgimento della proteina Ambra1 nello squilibrio del rapporto eccitazione/inibizione nell'Ippocampo delle femmine Ambra1<sup>+/-</sup>, provocato dalla riduzione del numero di interneuroni PV+.

Al momento però, non sappiamo se la riduzione del numero degli interneuroni PV+ sia dovuta solo agli eventi apoptotici in MGE durante la formazione delle cellule progenitrici o se si verificano altri fenomeni apoptotici durante la migrazione dalla MGE all'Ippocampo o nella maturazione *post* natale. A questo scopo, abbiamo intenzione di studiare la migrazione e la maturazione degli interneuroni mediante tecniche istologiche. Nel campo delle tecniche istologiche,

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

ci avvarremo dell'immunofluorescenza, sfruttando la marcatura con la 5-bromo-2'-deossiuridina (BrdU). La BrdU è un composto che viene incorporato nel DNA di nuova sintesi, marcando cellule in attiva proliferazione (Russo, A. et al., 1984). La marcatura con BrdU sarà effettuata allo stadio e13.5, in cui si ha il picco della formazione degli interneuroni ippocampali e valuteremo mediante conta stereologica il numero delle cellule BrdU positive a p0, p7 e p21. Le analisi condotte a p0 ci permetteranno di valutare se la morte dei neuroni in età embrionale, osservata in MGE a e13.5, produce una differenza significativa di precursori neuronali che giungono in Ippocampo. Le analisi che effettueremo a p7 e p21 ci permetteranno di capire se la riduzione del numero di neuroni avviene durante la fase di maturazione o se invece è successiva.

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

### 7. Materiali e metodi

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in accordo con la Direttiva del Consiglio Europeo EU 2010/63EU. L'approvazione degli esperimenti è stata ottenuta dal Ministero della Salute Italiano.

#### 7.1 Animali Sperimentali

Per gli esperimenti sono stati utilizzati animali eterozigoti *Ambra1* maschi, femmine e rispettivi animali di controllo *wild type* (WT, C57BL/6J) a 2-3 mesi di età e allo stato embrionale di e10.5 ed e13.5. Gli animali eterozigoti per *Ambra1* sono stati ottenuti dall'incrocio del topo maschio *Ambra1* con la femmina C57BL/6J. Gli animali sono stati stabulati 4 per gabbia, in condizioni (umidità dell'ambiente, temperatura e illuminazione) costantemente controllate, con libero accesso ad acqua e cibo e con un ciclo di luce/buio di 12 ore. Tutte le pratiche sono state svolte in modo da ottimizzare il numero di animali utilizzati e rendere minima la loro sofferenza.

#### 7.2 Genotipizzazione

Per determinare il genotipo e il sesso degli animali, è stato isolato il DNA dal tessuto digerito delle code dei topi. La lisi del tessuto è avvenuta a 56°C in *lysis buffer* contenente in mM: 50 Tris-Hcl pH 8.0, 100 EDTA pH 8.0, 100 NaCl, 1% SDS e 1 µg/µl proteinasi K. Il DNA è stato isolato con il metodo Phenolo:Cloroformio. Per la genotipizzazione sono stati utilizzati primer *Ambra1* con sequenza: 5'-ATACTTTCTCGGCAGGAGCA-3' (NeoF) e 5'-AGACAATCGGCTGCTCTGAT-3' (NeoR). Il DNA è stato amplificato utilizzando la *MyTaq Biotline* alle seguenti condizioni: 4 min, 95°C (1 ciclo); 95°C per 1 min (25 cicli); 30 sec a 56°C; 30 sec a 72°C (25 cicli), 72°C per 10 sec.

Il sesso degli animali è stato confermato dall'amplificazione dei geni *Sry* e *Myog*:  
5'-TCATGAGACTGCCAACCACAG-3'; 5'-

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

CATGACCACCACCACCACCAA-3'; 5'-TTACGTCCATCGTGGACAGC-3';  
5'-TGGGCTGGGTGTTAGTCTTA-3'. Il DNA è stato amplificato usando la Taq Euroclone alle seguenti condizioni: 94°C per 5 min (1 ciclo), 94°C per 1 min (35 cicli) poi 58°C per 45 sec e 72°C per 1 min, 72°C per 10 min (1 ciclo). I prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante elettroforesi a 1,5% di agarosio e visualizzati con *GelRed Nucleic Acid Gel Stein* (Biotium) sotto la luce UV.

### 7.3 Comportamento

#### 7.3.1 Test di interazione sociale

Per valutare l'interazione sociale tra topi dello stesso sesso (femmina-femmina), una femmina WT (C57BL/6J) estranea (di età e peso comparabile all'animale sperimentale) è stata posta nella gabbia dell'animale sperimentale in cui sia le vocalizzazioni emesse che il comportamento sono stati valutati. Per valutare l'interazione sociale tra il topo maschio e la femmina, sono state utilizzate femmine WT (C57BL/6J) in estro. Ogni sessione ha avuto la durata di 3 minuti, per ogni sessione sono state registrate le vocalizzazioni mediante il microfono ultrasuoni con una sensibilità tra 10 e 180 kHz (*Avisoft UltraSoundGate, Germany*) montato a 20 cm al di sopra della gabbia. Le registrazioni sono state effettuate utilizzando il software *Avisoft RECORDER* (versione 3.2). Per le analisi acustiche le registrazioni sono state trasferite in *Avisoft SASLabPro* e convertite in spettrogrammi ottenuti mediante trasformata di Fourier a 512 punti e ad una finestra temporale oltre il 75%. L'analisi quantitativa degli ultrasuoni emessi ha incluso il numero di vocalizzazioni. Per le registrazioni video è stata montata una telecamera (*Sony monochrome charge-coupled*) di fronte alla gabbia e mediante un software (*Noldus Information Technology, USA*) è stato possibile attribuire un punteggio per ogni parametro che valuta l'interazione sociale. La socialità è stata valutata in termini di durata dell'interazione sociale tra il topo estraneo e quello sperimentale (come somma dello *sniffing* della zona anogenitale, del corpo e della



## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

testa). Non sono stati considerati ai fini della socialità comportamenti quali combattimento, monta e colpi di code.

### 7.3.2 *Three-Chambers test*

Questo test prevede l'utilizzo di un apparato rettangolare (lungo 60 cm x 40 cm di ampiezza x 40 cm di altezza) in Plexiglas diviso in tre camere, comunicanti tra loro grazie a due porte posizionate nelle pareti centrali. Prima della sessione sperimentale, l'animale è stato fatto abituare nella camera centrale per un tempo di 10 minuti, successivamente per 10 minuti è stato lasciato libero di esplorare tutte e tre le camere. La seconda sessione di adattamento, ha avuto lo scopo di verificare che l'animale non avesse preferenze tra le varie camere. Dopo le due sessioni di adattamento, il topo sperimentale è stato posto nella camera centrale, mentre ai due lati dell'apparato sono stati posti rispettivamente un oggetto (tazza metallica rovesciata) e un'altra tazza metallica rovesciata contenente un topo estraneo (C57BL/6J). La sessione sperimentale (*sociability phase*) ha avuto una durata di 10 minuti, durante i quali l'animale è stato lasciato libero di muoversi tra la camera contenente l'oggetto e quella contenente l'animale estraneo. Al termine del *test*, ogni animale è stato sottoposto ad un'altra sessione sperimentale (*social novelty phase*) di 10 minuti per valutare la preferenza sociale tra l'animale familiare e un secondo animale estraneo (C57BL/6J). In questa fase il secondo topo è stato chiuso nella tazza metallica lasciata vuota nella sessione precedente e il topo sperimentale è stato lasciato libero di socializzare con il l'animale familiare o quello estraneo. La posizione (destra o sinistra) dell'oggetto e dei topi estranei è stata sistematicamente alternata. I topi estranei sono comparabili per età e sesso con quelli sperimentali. Il numero di ingressi in ogni stanza, il tempo trascorso e il tempo che hanno trascorso gli animali nell'annusare sia l'oggetto che il topo estraneo, durante le sessioni sperimentali, è stato valutato mediante le registrazioni utilizzando il software Noldus Observer XT.

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

### 7.4 Biochimica

#### 7.4.1 Estrazione totale di proteine

Le sezioni di Ippocampo sono state isolate dall'intero cervello. Per l'analisi dei marcatori dei neuroni GABAergici, il tessuto è stato omogenizzato in *lysis buffer* contenente (mM): 320 saccarosio, 50 NaCl, 50 Tris-HCL pH 7.5, 1% Triton X-100, 1 sodio ortovanadato, 5 b-glicerofosfato, 5 NaF e *cocktail* di inibitori di proteasi.

Per l'analisi delle proteine di membrana (subunità recettoriali e proteine strutturali), il tessuto è stato omogenizzato in RIPA contenente (mM): 50 Tris-HCL pH 7.4, 150 NaCl, 1 EDTA, 5 MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 0,25% Na-deossicolato, 0,1% SDS e *cocktail* di inibitori di proteasi.

Per le analisi sugli embrioni, i tessuti sono stati omogenizzati in *lysis buffer* arricchito con 10% di glicerolo. Gli omogenati sono stati incubati in ghiaccio per 30 minuti e centrifugati a 15,000g per 10 minuti a 4 °C. Il contenuto di proteine totali è stato valutato mediante il metodo *Bradford*.

#### 7.4.2 Immunoblotting

Gli estratti proteici sono stati sottoposti ad elettroforesi SDS-PAGE e trasferiti su membrana *polyvinylidene difluoride* (PVDF). Le analisi di *immunoblotting* sono state eseguite utilizzando il kit di chemiluminescenza. I livelli di immunoreattività sono stati determinati mediante analisi densitometrica utilizzando il software *ImageJ*. Gli anticorpi primari utilizzati sono: Ambra1 (1:100 Novus Biological), GAD67 (1:1000, Abcam), GAD65 (1:1000, Abcam), VGAT (1:1000, Santa Cruz), Calretinina (1:1000, Millipore), Calbindina (1:1000, Sigma-Aldrich), Parvalbumina (1:1000, Abcam), PSD95 (1:1000 Millipore), GluN1 (1:1000, Santa Cruz), GluN2a (1:250, Santa Cruz), GluN2B (1:1000, Millipore), P-GluA1 Ser845 (1:1000, Millipore), GluA1 (1:1000, Millipore), VGLUT1 (1:1000, Millipore), Actin (1:25,000 Sigma-Aldrich). Gli anticorpi secondari utilizzati

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

sono: *goat anti-mouse* IgG (1:3000, Bio-Rad), *goat anti-rabbit* IgG (1:3000, Bio-Rad), *rabbit anti-goat* IgG (1:3000 Bio-Rad). Le membrane sono state “strippate” utilizzando il *Re-Blot Plus Strong Solution* (Millipore) per 15 minuti a temperatura ambiente.

### 7.5 Istologia

#### 7.5.1 Immunoistochimica

Gli animali adulti sono stati anestetizzati con *Rompun* (20 mg/mL, 0,5 mL/kg, Bayer) e *Zoletil* (100 mg/mL, 0,5 mL/kg, Virbac) e successivamente perfusi con 50 ml di soluzione salina seguita da paraformaldeide 4% in *phosphate buffer saline* (PBS, 0,1 M, pH 7,4). Il cervello è stato prelevato immediatamente e *post-fissato* nella soluzione di paraformaldeide 4% in PBS per 4 ore e successivamente crioprotetto in una soluzione di saccarosio al 30% in PBS a 4 °C fino a precipitazione. I cervelli sono stati congelati e tagliati al criostato in sezioni coronali di 30 µm.

Gli embrioni sono stati fissati in 4% paraformaldeide in PBS per tutta la notte e trasferiti in saccarosio 30% e PBS a 4°C fino a precipitazione. I cervelli sono stati tagliati in posizione coronale a 40 µm con il criostato.

Per la marcatura dei neuroni positivi alla Parvalbumina sono state processate fettine alternate. Al fine di bloccare i siti aspecifici, le fettine sono state lavate in TBS contenente 3% di siero albumina di bovino (BSA) per 2 ore a temperatura ambiente. Successivamente sono state incubate con l'anticorpo primario anti-PV (1:500 Novus) in TBS con 1% di BSA overnight a 4°C. Le sezioni sono poi state lavate in TBS + 0,025% Triton X-100, per bloccare i siti endogeni della perossidasi sono state incubate in 0,3% di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TBS per 15 minuti. A questo punto le fettine sono state incubate con anticorpo secondario anti-*rabbit* biotilato, mentre la rilevazione del segnale è avvenuta utilizzando il metodo avidina biotina e 3,3-diamminobendina in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> come cromogeno. Infine le fettine sono state montate su vetrini polilisinati e lasciate asciugare sotto

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

cappa per 24 ore, in seguito reidratate in passaggi di etanolo crescente, chiarificate in xilene e chiuse mediante il vetrino copri-oggetto. La specificità del segnale è stata confermata dal controllo negativo rappresentato dalla sostituzione dell'anticorpo primario con PBS. Tutte le immagini sono state convertite in formato TIFF, contrasto e luminosità sono state calibrate e le figure finali sono state composte con Adobe Illustrator CS3.

### 7.5.2 Immunofluorescenza

Per marcare i neuroni positivi ad Ambra1/Parvalbumina le fettine sono state permeabilizzate con PBS contenente 1% Trito X-100 per 10 minuti a temperatura ambiente. Le sezioni sono poi state incubate con l'anticorpo primario per Ambra1 (1:20 Novus Biological) e Parvalbumina (1:500 Swant) in *goat serum* 2% per 2 ore a 37°C e 3 giorni a 4°C. Successivamente sono state lavate in PBS e incubate per 2 ore a temperatura ambiente con gli anticorpi secondari fluorescinati (1:300 AlexaFluor 488 donkey anti-rabbit IgG, e 1:300 AlexaFluor 555 donkey anti-mouse IgG). Le sezioni sono state montate utilizzando un montante acquoso *Fluormount* (Sigma-Aldrich) e analizzate al microscopio confocale (LSM700, Zeiss). La specificità del segnale è stata confermata dal controllo negativo rappresentato dalla sostituzione dell'anticorpo primario con PBS. Tutte le immagini sono state convertite in formato TIFF, contrasto e luminosità sono state calibrate e le figure finali sono state composte con Adobe Illustrator CS3.

### 7.5.3 TUNEL Assay

Il saggio TUNEL è un metodo attraverso il quale è possibile rilevare la presenza di cellule apoptotiche nei tessuti. L'apoptosi determina la frammentazione del DNA e tali frammenti espongono i gruppi 3'-OH. Nella tecnologia TUNEL si sfrutta l'attività dell'enzima terminal desossinucleotidil trasferasi (TdT) che lega desossiribonucleotidi, in particolare dUTP, alle estremità 3'-OH libere. I dUTP sono marcati con digossigenina e quindi, in seguito alla reazione enzimatica,

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

segue una reazione immunoenzimatica in cui si utilizza un anticorpo anti-digossigenina marcato con perossidasi. Tale anticorpo si va a legare alla digossigenina legata al dUTP e questo legame viene evidenziato con una reazione cromogena DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le cellule TUNEL-positive appaiono di colore marrone (precipitazione DAB).

Per lo *staining* con il TUNEL gli embrioni sono stati fissati in *Bouin solution* (5% acido acetico, 9% formaldeide, 0,9% acido picrico) *overnight*, lavati in etanolo al 70% e successivamente disidratati in *step* di concentrazioni crescenti di alcol (50%, 70%, 95% e 100%), poi chiarificati in *xylene* e infine inclusi in paraffina. Gli embrioni sono stati tagliati al microtomo in sezioni coronali spesse 5 µm. La reazione del TUNEL è stata effettuata usando *l'Apoptag Plus Peroxidase In-Situ Apoptosis Detection Kit* (Millipore). Le fettine colorate sono state poi trattate con *Cresyl-Violet* per evidenziare i nuclei. Successivamente sono state visualizzate al microscopio ottico Leitz DMRB a 100x. Le cellule sono state definite apoptotiche (TUNEL positive) se mostravano tipici nuclei con cromatina condensata o con frammentazione nucleare, o entrambi.

### 7.6 Analisi Stereologica

#### 7.6.1 Conta dei neuroni PV+

Le sezioni processate per immunistochemica sono state utilizzate per stimare il numero totale degli interneuroni PV+ nella sezione coronale dell'ippocampo dorsale. La conta è stata eseguita usando lo *Stereo Investigator System* (MicroBrightField Europe e.K.) che comprende un software interfacciato ad un microscopio Olympus BX50 con uno *stage* motorizzato e ad una camera digitale HV-C20 Hitachi applicato ad un PC Pentium II. È stata applicata una sonda ottica 3D a conteggio frazionato (x, y, z dimensione di 50x50x25 µm). L'ippocampo è stato delineato usando un obiettivo 5x e le cellule neuronali sono state osservate con un obiettivo 40x. La conta è avvenuta in cieco per gli animali di ciascun

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

genotipo e sesso. Il numero totale dei neuroni PV+ è stato calcolato con la formula:

$$N = SQ \times 1/ssf \times 1/asf \times 1/hsf$$

- SQ rappresenta il numero di neuroni contati;
- Ssf è il rapporto tra le sezioni analizzate su numero totale di sezioni di tessuto;
- Asf è l'area del *counting frame* fratto la *grid area*;
- hsf è l'altezza del *counting frame* sullo spessore della sezione.

### 7.7 Elettrofisiologia

Gli animali sono stati anestetizzati mediante alotano e successivamente decapitati. Il cervello è stato rapidamente rimosso e tagliato al vibratomo (Leica VT1200S) in sezioni parasagittali con spessore di 250-300  $\mu\text{m}$  contenenti l'ippocampo dorsale in continua presenza di soluzione di liquido artificiale cerebrospinale (aCSF; contenete in mM: 124 NaCL, 3 KCL, 1.25 NaHCO<sub>3</sub>, 1 MgSO<sub>4</sub>, 2 CaCL<sub>2</sub>, 10 glucosio, 300 mOsm, pH 7.4) alla temperatura di 4°C ed ossigenato (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). Le sezioni ottenute sono state incubate per 1 ora in aCSF a 30-32°C e poi trasferite a temperatura ambiente fino a 30 minuti prima della registrazione.

#### 7.7.1 registrazione delle oscillazioni gamma

Le registrazioni delle oscillazioni gamma sono state ottenute da registrazioni su fettine di ippocampo parasagittale su una piastra multi-elettrodo (MEA) di 64 elettrodi (MED64, Alpha MED Sciences, Kadoma, Japan). Le fettine sono state posizionate sul MEA sotto il controllo visivo di un microscopio (Leica DM-LFS, Leica Microsystem, Wetzlar, Germany) in modo che gli elettrodi coprissero le aree dell'ippocampo da CA3 a CA1. I segnali del voltaggio sono stati acquisiti usando il software Mobius (Alpha MED Sciences, Kadoma, Japan), digitalizzati a 20 kHz e filtrati a 1.0 Hz. Le fettine sono state immerse in una cameretta di registrazione continuamente perfusa con aCSF ossigenato ad un flusso di 6

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

ml/min a 30°C, adagate sopra la maglia di nylon e bloccate mediante un anello di platino. La *power spectral density* è stata calcolata tramite l'acquisizione del segnale del voltaggio da uno degli elettrodi registranti, dove le oscillazioni avevano l'ampiezza più alta durante l'applicazione di Carbacolo (CCh- 20 µM). Il segnale è stato campionato a 200 Hz e la potenza dello spettro è stata calcolata usando il software NeuroExplorer (Nex Technologies, littleton, USA) prima e durante la perfusione di CCh. Abbiamo poi calcolato l'integrale della potenza dello spettro all'interno del *range* delle frequenze gamma (25-45 Hz) e la frequenza del picco specifico, al momento in cui le oscillazioni gamma raggiungevano l'ampiezza maggiore poiché vi è una grande variabilità nella potenza assoluta delle oscillazioni, la potenza della densità spettrale delle aree è stata normalizzata a quella ottenuta all'interno dello stesso *range* di frequenza, durante i due minuti che precedono la perfusione di CCh.

### 7.7.2 Registrazione dei potenziali post-sinaptici eccitatori

La singola fettina parasagittale del cervello è stata trasferita nella camera di registrazione del microscopio verticale (Axioskop 2-FS; Zeiss, Germany) e immersa in aCSF (3-4 ml/min; 30°C). La risposta alla stimolazione è stata indotta da un elettrodo stimolante concentrico bipolare (FHC Inc.; Bowdoin, ME) posto nelle "Collaterale di Schaffer" nello *stratum radiatum* e la stimolazione afferente (100 µs di durata) è stata emessa ogni 30 s. Le registrazioni sono state effettuate con un elettrodo registrante in vetro riempito con aCSF, posizionato nello *stratum pyramidale* del CA1, a 200-300 µm dall'elettrodo di stimolazione. Le curve di stimolo-risposta sono state ottenute misurando l'ampiezza delle principali popolazioni di picchi a stimoli crescenti di 10 µA ed in seguito tutti gli esperimenti sono stati eseguiti a intensità a metà della stimolazione massimale. Per indurre lo stato epilettico, costituito dall'insieme di picchi principali e secondari, sono state effettuate registrazioni dopo la somministrazione di Bicucullina methochloride (Abcam) a 5 e 10 µM per 10-12 minuti. Sono state registrate almeno 5 tracce per le condizioni di controllo e per ciascuna

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

concentrazione di Bicucullina e le risposte medie sono state utilizzate per calcolare il numero di picchi (soglia impostata a 0.2 mV) e la durata totale delle risposte evocate (misurate dall'inizio della prima popolazione di picchi alla fine dell'ultima).

Per indurre *field* potenziali *post*-sinaptiche eccitatorie fEPSP, è stato posizionato un elettrodo registrante di vetro borosilicato nello *stratum radiatum* del CA1 dell'ippocampo, a 200-300  $\mu\text{m}$  dall'elettrodo di stimolazione. Le curve di *input-output* sono state ottenute misurando la pendenza iniziale di fEPSP a stimolazioni afferenti di 10  $\mu\text{A}$ . Per gli esperimenti di LTP, dopo almeno 20 minuti di test di stimolazione (intensità a metà del massimale, ogni 30s) per valutare la stabilità della pendenza di fEPSP, la fetina è stata stimolata con due treni consecutivi (1s) a 100 Hz ad intervallo di 20s, seguiti dal test di stimolazione fino ad 1 h. L'LTP è stata valutata dalla pendenza dell'inizio del fEPSP a 55-60 min dall'induzione del treno, normalizzata alla pendenza prima dell'induzione. Tutte le risposte sono state registrate con un amplificatore *MultiClamp 700B* e digitalizzate con *Digidata 1322A*. I dati sono stati campionati a 20 kHz. Le tracce sono state ottenute con *pClamp 9.2* e analizzate usando *Clampfit 9.2* (*Molecular Devices; Sunnyvale, CA*).

### 7.7.3 RegISTRAZIONI in *whole-cell*

Le registrazioni *patch-clamp* in *whole-cell* da singole fettine di cervello sono state eseguite dal soma dei neuroni piramidali ippocampali nello *stratum pyramidale* del Corno di Ammone (CA1). Tutte le registrazioni sono state effettuate con l'amplificatore *MultiClamp 700B*, usando il filtro *low-pass* 3-4 Hz, digitalizzate con *Digidata 1322A* e i dati sono stati salvati con una frequenza di campionamento a 5 volte la frequenza del filtro. Gli elettrodi di registrazione (3-6 M $\Omega$ ) sono stati ricavati da tubi di vetro borosilicato (TW150F4; *World Precision Instruments, Germany*). La resistenza di accesso è stata monitorata *online* per ogni esperimento e le registrazioni sono state scartate se durante l'esperimento si aveva un aumento maggiore del 25% o della resistenza di accesso o dell'aumento di



## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

corrente holding. Le correnti *post*-sinaptiche evocate eccitatorie (eEPSC) sono state evocate da stimolazioni nello *stratum radiatum* e registrate a -70 mV usando una soluzione a base di Cesio contenente (in mM): 117.5 Cs-methanesulfonate, 15.5 CsCl, 8 NaCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 HEPES, 0.25 EGTA, 10 TEA-Cl, 2.5 QX314-Cl, 4 Mg-ATP, 0.3 Na-GTP (~290 mOsm, pH 7.2), in presenza di picrotossina nel bagno di perfusione (50 µM; Tocris) e CGP55845 (1 µM; Abcam). Per calcolare il rapporto AMPA/NMDA, sono stati indotti singoli eEPSC ad intensità a metà del massimale, la componente del recettore AMPA è stata fissata dal picco della corrente entrante misurata a -70 mV del potenziale, mentre la componente del recettore NMDAR è stata valutata ad un'ampiezza della corrente in uscita della stessa risposta sinaptica a +40 mV del potenziale, 70 ms dopo l'artefatto della stimolazione.

Le correnti *post*-sinaptiche evocate inibitorie (eIPSC, a -70 mV potenziale) sono state registrate usando pipette riempite con (in mM): 140 CsCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 2.5 QX31-4-Cl, 4 Mg-ATP (~290 mOsm, pH 7.2), in presenza di NBQX (10 µM; Tocris), D-AP5 (50 µM; Tocris) e CGP55845 (1 µM; Abcam). Le correnti inibitorie sono state evocate posizionando l'elettrodo di stimolazione in prossimità del neurone da registrare o nello *stratum radiatum* per valutare l'inibizione dendritica, o nello *stratum pyramidale* per valutare l'inibizione perisomatica. L'eIPSCs perisomatiche (-70 mV) mediate dagli interneuroni perisomatici sono state registrate in presenza di 1 µM WIN55,212-2((R)-(+)-[2,3-dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)pyrrolo[1,2,3-de]-1,4benzoxazin-6-yl]-1-naphthalenylmethanone mesylate;Tocris] per bloccare il rilascio di GABA dalle cellule di *basket* CCK positive. Per tutte le registrazioni è stato usato come elettrodo di stimolazione un elettrodo di vetro riempito con aCSF e gli stimoli (100 µs di durata ogni 30 sec) sono stati applicati con un isolatore di stimolo ISO-Flex (A.M.P.I, Israel). Per le curve di *input/output* degli eEPSCs e eIPSCs l'intensità di stimolo è riferita a 1x è stata determinata come intensità che ha evocato una risposta tra 15 e 20 pA. La stimolazione è stata aumentata in modo proporzionale per sviluppare curve di stimolo-risposta. Il *range* dell'intensità dello stimolo è compreso tra 20 e 100 µA. La *Paired-pulse ratio* (PPR) è stata

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

calcolata dal rapporto di due correnti evocate ad intensità media dello stimolo massimale ed intervallate da 100 ms di tempo l'una dall'altra. Le correnti evocate farmacologicamente AMPAR-mediate (-70 mV) sono state registrate in presenza di AMPA (1  $\mu$ M; Abcam) aggiunto nel bagno di perfusione e ciclotiazide (CTZ, 20 $\mu$ M; Abcam), per prevenire la desensibilizzazione precoce del recettore (20  $\mu$ M; Abcam), in aggiunta a farmaci antagonisti specifici dei recettori NMDA (D-AP5 50  $\mu$ M; Abcam) e canali del sodio voltaggio dipendenti (lidocaina 500  $\mu$ M; Abcam).

Le correnti NMDAR-mediate (+40 mV) sono state registrate in presenza dell'agonista specifico del recettore NMDA (10  $\mu$ M; Abcam) e glicina (10  $\mu$ M; Abcam) e in presenza di antagonista per recettori AMPA (NBQX 10  $\mu$ M; Abcam) e lidocaina 500  $\mu$ M. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in presenza dell'antagonista selettivo del recettore GABA<sub>A</sub> (picrotossina 100  $\mu$ M; Tocris). Le correnti spontanee *miniature post-sinaptiche* eccitatorie (mEPSC) e inibitorie (mIPSC) del neurone piramidale sono state registrate a -70 mV usando le stesse soluzioni e farmaci come per le correnti evocate, in presenza nel bagno di perfusione di lidocaina (500  $\mu$ M; Abcam). I singoli eventi sono stati analizzati con il software *Mini Analysis* (Synaptosoft Inc, USA) e valutati per ampiezza e intervallo tra gli eventi (*inter-event interval* IEI). I valori medi di IEI e l'ampiezza di almeno 400 eventi sono stati analizzati per ogni esperimento.

### 7.8 Morfologia

L'analisi morfologica è stata condotta su sezioni colorate con il colorante Nissl. Le fettine sono state montate su vetrini, lasciati asciugare per 24h e successivamente disidratati con etanolo a concentrazioni crescenti, chiarificati in *xylene* e chiusi con il vetrino copri-oggetto.

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

### 7.8.1 Morfologia delle spine dendritiche

I cervelli di animali *Ambra1<sup>+/-</sup>* e WT sono stati processati per la marcatura dell'apparato del Golgi. Gli animali sono stati perfusi con 0,9% di soluzione salina e i campioni sono stati immersi nella soluzione di Golgi (1% potassio dicromato, 1% di cloruro di mercurio e 0,8% di potassio cromato) a temperatura ambiente per 6 giorni. Il settimo giorno i cervelli sono stati trasferiti in una soluzione contenente il 30% di saccarosio e sezionati con il vibratomo. Sono state effettuate sezioni coronali di 100  $\mu\text{m}$  incubate in *step* successivi di: acqua (1 min), idrossido di ammonio (30 min), acqua (1 min), soluzione di sviluppo (Kodak fix 100%, 30 min) e acqua (1 min). Le sezioni sono state poi disidratate attraverso *step* successivi a concentrazioni crescenti di alcol (50%, 75%, 95% e 100%) e chiuse con i vetrini copri-oggetto. L'analisi delle spine è stata eseguita su segmenti basali e apicali dei dendriti dei neuroni piramidali del CA1. I neuroni sono stati identificati prima con il microscopio (Leica DMLB) all'obiettivo 20x. Successivamente la quantificazione delle spine dendritiche è avvenuta mediante l'utilizzo dell'obiettivo 100x e di una telecamera *Qimaging Qicam Fast1394* connessa al microscopio. Per la conta delle spine, per ogni cervello sono stati selezionati 5 neuroni e per ciascun neurone sono stati selezionati casualmente 5 segmenti dendritici da 30-100  $\mu\text{m}$ . Solo protrusioni con una chiara connessione della testa della spina all'albero del dendrite sono considerate come spine, utilizzando il software *NeuroLucida* (v11, MBF Bioscience). Le analisi della grandezza delle spine è stata effettuata selezionando casualmente le spine, misurando il diametro della testa della spina rispetto al dendrite usando il software *ImageJ*. La grandezza della testa delle spine è stata espressa come frequenza cumulativa.

### 7.9 Analisi statistica

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate mediante *Prism* (*GraphPad Software V.5*). I dati del test comportamentale per la socializzazione sono stati

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

analizzati con il test di ANOVA a due vie considerando il genotipo (WT *versus* Ambra) e il numero di vocalizzazioni o la durata dello *sniffing* sono stati valutati come fattori indipendenti; confronti multipli *post hoc* sono stati effettuati usando il test HSD di *Tukey*. I dati relativi alla socializzazione e al test di *Three-Chambers* sono stati analizzati con l'ANOVA a una via in ogni gruppo per animale estraneo *versus* l'oggetto e l'animale familiare *versus* l'animale estraneo. Per confrontare le frequenze cumulative del diametro delle spine dendritiche è stato usato il test di *Kolmogorov-Smirnov*. Per valutare i livelli di proteina Ambra1 i dati sono stati analizzati usando l'ANOVA a due vie con sesso e genotipo come variabili indipendenti, seguita dal *post-hoc* test di Bonferroni. Tutti gli altri dati sono stati analizzati usando il t-test a due code (WT *versus* Ambra1). I valori di  $P < 0,05$  sono stati considerati significativi dal punto di vista statistico (come mostrato nelle figure \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ).

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

### 8. Bibliografia

- American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-5. Edizione italiana a cura di Raffaello Cortina Editore 2014
- Amaral, D.G., Schumann, C.M., and Nordahl, C.W. (2008). Neuroanatomy of autism. *Trends Neurosci.* *31*, 137–145.
- Antonioli, M., Albiero, F., Fimia, G.M., and Piacentini, M. (2015). AMBRA1-regulated autophagy in vertebrate development. *Int. J. Dev. Biol.* *59*, 109–117.
- Antonioli, M., Albiero, F., Nazio, F., Vescovo, T., Perdomo, A.B., Corazzari, M., Marsella, C., Piselli, P., Gretzmeier, C., Dengjel, J., et al. (2014). AMBRA1 interplay with cullin E3 ubiquitin ligases regulates autophagy dynamics. *Dev. Cell* *31*, 734–746.
- Barnes, S.A., Pinto-Duarte, A., Kappe, A., Zembrzycki, A., Metzler, A., Mukamel, E.A., Lucero, J., Wang, X., Sejnowski, T.J., Markou, A., et al. (2015). Disruption of mGluR5 in parvalbumin-positive interneurons induces core features of neurodevelopmental disorders. *Mol. Psychiatry* *20*, 1161–1172.
- Bast, T., Pezze, M., and McGarrity, S. (2017). Cognitive deficits caused by prefrontal cortical and hippocampal neural disinhibition. *Br. J. Pharmacol.* *174*, 3211–3225.
- Benes, F.M., Kwok, E.W., Vincent, S.L., and Todtenkopf, M.S. (1998). A reduction of nonpyramidal cells in sector CA2 of schizophrenics and manic depressives. *Biol. Psychiatry* *44*, 88–97.
- Boivin, M.J., Kakooza, A.M., Warf, B.C., Davidson, L.L., and Grigorenko, E.L. (2015). Reducing neurodevelopmental disorders and

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

disability through research and interventions. *Nature* 527, S155-160.

- Bozdagi, O., Sakurai, T., Papapetrou, D., Wang, X., Dickstein, D.L., Takahashi, N., Kajiwara, Y., Yang, M., Katz, A.M., Scattoni, M.L., et al. (2010).  
  
Haploinsufficiency of the autism-associated Shank3 gene leads to deficits in synaptic function, social interaction, and social communication. *Mol Autism* 1, 15.
- Buka, S.L., Cannon, T.D., Torrey, E.F., Yolken, R.H., and Collaborative Study Group on the Perinatal Origins of Severe Psychiatric Disorders (2008). Maternal exposure to herpes simplex virus and risk of psychosis among adult offspring. *Biol. Psychiatry* 63, 809–815.
- Canitano, R., and Pallagrosi, M. (2017). Autism Spectrum Disorders and Schizophrenia Spectrum Disorders: Excitation/Inhibition Imbalance and Developmental Trajectories. *Front Psychiatry* 8, 69.
- Cecconi, F., and Levine, B. (2008). The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death. *Dev. Cell* 15, 344–357.
- Conrad, D.F., Keebler, J.E.M., DePristo, M.A., Lindsay, S.J., Zhang, Y., Casals, F., Idaghdour, Y., Hartl, C.L., Torroja, C., Garimella, K.V., et al. (2011). Variation in genome-wide mutation rates within and between human families. *Nat. Genet.* 43, 712–714.
- Corfas, G., Roy, K., and Buxbaum, J.D. (2004). Neuregulin 1-erbB signaling and the molecular/cellular basis of schizophrenia. *Nat. Neurosci.* 7, 575–580.
- D'Amelio, M., and Rossini, P.M. (2012). Brain excitability and connectivity of neuronal assemblies in Alzheimer's disease: from animal models to human findings. *Prog. Neurobiol.* 99, 42–60.

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

- Danglot, L., Triller, A., and Marty, S. (2006). The development of hippocampal interneurons in rodents. *Hippocampus* 16, 1032–1060.
- de Lecea, L., del Río, J.A., and Soriano, E. (1995). Developmental expression of parvalbumin mRNA in the cerebral cortex and hippocampus of the rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 32, 1–13.
- Durand, C.M., Betancur, C., Boeckers, T.M., Bockmann, J., Chaste, P., Fauchereau, F., Nygren, G., Rastam, M., Gillberg, I.C., Anckarsäter, H., et al. (2007). Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat. Genet.* 39, 25–27.
- Esclassan, F., Francois, J., Phillips, K.G., Loomis, S., and Gilmour, G. (2015). Phenotypic characterization of nonsocial behavioral impairment in neurexin 1 $\alpha$  knockout rats. *Behav. Neurosci.* 129, 74–85.
- Etherton, M., Földy, C., Sharma, M., Tabuchi, K., Liu, X., Shamloo, M., Malenka, R.C., and Südhof, T.C. (2011). Autism-linked neuroligin-3 R451C mutation differentially alters hippocampal and cortical synaptic function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 13764–13769.
- Eur Psychiatry. 2007 Jan;22(1):22-6. Epub 2006 Dec 4. Paternal ages below or above 35 years old are associated with a different risk of schizophrenia in the offspring. Wohl M1, Gorwood P.
- Fazzari, P., Paternain, A.V., Valiente, M., Pla, R., Luján, R., Lloyd, K., Lerma, J., Marín, O., and Rico, B. (2010). Control of cortical GABA circuitry development by Nrg1 and ErbB4 signalling. *Nature* 464, 1376–1380.
- Fernandes, B.S., Steiner, J., Bernstein, H.-G., Dodd, S., Pasco, J.A., Dean, O.M., Nardin, P., Gonçalves, C.-A., and Berk, M. (2016). C-reactive protein is increased in schizophrenia but is not altered by antipsychotics:

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

meta-analysis and implications. *Mol. Psychiatry* 21, 554–564.

- Filice, F., and Schwaller, B. (2017). Parvalbumin and autism: different causes, same effect? *Oncotarget* 8, 7222–7223.
- Fimia, G.M., Stoykova, A., Romagnoli, A., Giunta, L., Di Bartolomeo, S., Nardacci, R., Corazzari, M., Fuoco, C., Ucar, A., Schwartz, P., et al. (2007). Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* 447, 1121–1125.
- Fisahn, A., Pike, F.G., Buhl, E.H., and Paulsen, O. (1998). Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus in vitro. *Nature* 394, 186–189.
- Freund, T.F., and Katona, I. (2007). Perisomatic inhibition. *Neuron* 56, 33–42.
- Gaudio E., con la collaborazione di Carpinio G., Franchitto A., Morini S., Onori P. (2011). *Istituzioni di Anatomia dell'uomo*. Edizione Piccin.
- Geschwind, D.H. (2009). Advances in autism. *Annu. Rev. Med.* 60, 367–380.
- Gonzalez-Burgos, G., Cho, R.Y., and Lewis, D.A. (2015). Alterations in cortical network oscillations and parvalbumin neurons in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 77, 1031–1040.
- Graf, W.D., Miller, G., Epstein, L.G., and Rapin, I. (2017). The autism “epidemic”: Ethical, legal, and social issues in a developmental spectrum disorder. *Neurology* 88, 1371–1380.
- Gulyás, A.I., Tóth, K., Dános, P., and Freund, T.F. (1991). Subpopulations of GABAergic neurons containing parvalbumin, calbindin D28k, and cholecystokinin in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 312, 371–378.



## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

- Gunduz-Bruce, H. (2009). The acute effects of NMDA antagonism: from the rodent to the human brain. *Brain Res Rev* 60, 279–286.
- Halladay, A.K., Bishop, S., Constantino, J.N., Daniels, A.M., Koenig, K., Palmer, K., Messinger, D., Pelphrey, K., Sanders, S.J., Singer, A.T., et al. (2015). Sex and gender differences in autism spectrum disorder: summarizing evidence gaps and identifying emerging areas of priority. *Mol Autism* 6, 36.
- Harris, K.M., Jensen, F.E., and Tsao, B. (1992). Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J. Neurosci.* 12, 2685–2705.
- Heinrich, A., Nees, F., Lourdasamy, A., Tzschoppe, J., Meier, S., Vollstädt-Klein, S., Fauth-Bühler, M., Steiner, S., Bach, C., Poustka, L., et al. (2013). From gene to brain to behavior: schizophrenia-associated variation in *AMBRA1* alters impulsivity-related traits. *Eur. J. Neurosci.* 38, 2941–2945.
- Heterozygous *ambra1* deficiency in mice: a genetic trait with autism-like behavior restricted to the female gender. - PubMed - NCBI.
- Huang, Z.J., Kirkwood, A., Pizzorusso, T., Porciatti, V., Morales, B., Bear, M.F., Maffei, L., and Tonegawa, S. (1999). BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell* 98, 739–755.
- Hughes, J.R. (2008). Gamma, fast, and ultrafast waves of the brain: their relationships with epilepsy and behavior. *Epilepsy Behav* 13, 25–31.
- Hultman, C.M., Sandin, S., Levine, S.Z., Lichtenstein, P., and Reichenberg, A. (2011). Advancing paternal age and risk of autism: new

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

evidence from a population-based study and a meta-analysis of epidemiological studies. *Mol. Psychiatry* 16, 1203–1212.

- Hutsler, J.J., and Zhang, H. (2010). Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Res.* 1309, 83–94.
- Inan, M., Petros, T.J., and Anderson, S.A. (2013). Losing your inhibition: linking cortical GABAergic interneurons to schizophrenia. *Neurobiol. Dis.* 53, 36–48.
- Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Råstam, M., Colineaux, C., Gillberg, I.C., Soderstrom, H., Giros, B., Leboyer, M., Gillberg, C., et al. (2003). Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat. Genet.* 34, 27–29.
- Jiang, M., Oliva, A.A., Lam, T., and Swann, J.W. (2001). GABAergic neurons that pioneer hippocampal area CA1 of the mouse: morphologic features and multiple fates. *J. Comp. Neurol.* 439, 176–192.
- Jinno, S., and Kosaka, T. (2006). Cellular architecture of the mouse hippocampus: a quantitative aspect of chemically defined GABAergic neurons with stereology. *Neurosci. Res.* 56, 229–245.
- Keller, F., and Persico, A.M. (2003). The neurobiological context of autism. *Mol. Neurobiol.* 28, 1–22.
- Kirov, G. (2015). CNVs in neuropsychiatric disorders. *Hum. Mol. Genet.* 24, R45-49.
- Kirov, G., Pocklington, A.J., Holmans, P., Ivanov, D., Ikeda, M., Ruderfer, D., Moran, J., Chambert, K., Toncheva, D., Georgieva, L., et al. (2012). De novo CNV analysis implicates specific abnormalities of postsynaptic signalling complexes in the pathogenesis of schizophrenia.

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

Mol. Psychiatry 17, 142–153.

- Köhler, O., Benros, M.E., Nordentoft, M., Farkouh, M.E., Iyengar, R.L., Mors, O., and Krogh, J. (2014). Effect of anti-inflammatory treatment on depression, depressive symptoms, and adverse effects: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *JAMA Psychiatry* 71, 1381–1391.
- Kong, A., Frigge, M.L., Masson, G., Besenbacher, S., Sulem, P., Magnusson, G., Gudjonsson, S.A., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Jonasdottir, A., et al. (2012). Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature* 488, 471–475.
- Lane, E.A., and Albee, G.W. (1964). Early childhood intellectual differences between schizophrenic adults and their siblings. *J Abnorm Psychol* 68, 193–195.
- Lee, E., Lee, J., and Kim, E. (2017). Excitation/Inhibition Imbalance in Animal Models of Autism Spectrum Disorders. *Biol. Psychiatry* 81, 838–847.
- Levitt, P., Eagleson, K.L., and Powell, E.M. (2004). Regulation of neocortical interneuron development and the implications for neurodevelopmental disorders. *Trends Neurosci.* 27, 400–406.
- Lewis, D.A., and Levitt, P. (2002). Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 409–432.
- Lomaga, M.A., Henderson, J.T., Elia, A.J., Robertson, J., Noyce, R.S., Yeh, W.C., and Mak, T.W. (2000). Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) deficiency results in exencephaly and is required for apoptosis within the developing CNS. *J. Neurosci.* 20, 7384–7393.

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

- Marshall, C.R., Noor, A., Vincent, J.B., Lionel, A.C., Feuk, L., Skaug, J., Shago, M., Moessner, R., Pinto, D., Ren, Y., et al. (2008). Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 477–488.
- Mazina, V., Gerds, J., Trinh, S., Ankenman, K., Ward, T., Dennis, M.Y., Girirajan, S., Eichler, E.E., and Bernier, R. (2015). Epigenetics of autism-related impairment: copy number variation and maternal infection. *J Dev Behav Pediatr* 36, 61–67.
- Montagrin, A., Saiote, C., and Schiller, D. (2017). The social hippocampus. *Hippocampus*.
- Moore, T.H.M., Zammit, S., Lingford-Hughes, A., Barnes, T.R.E., Jones, P.B., Burke, M., and Lewis, G. (2007). Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review. *Lancet* 370, 319–328.
- National Institute for Health and Clinical Excellence (NHS) Autism: Recognition, Referral, diagnosis and management of adults on the autism spectrum. NICE Clinical Guideline 142
- Nelson, S.B., and Valakh, V. (2015). Excitatory/Inhibitory Balance and Circuit Homeostasis in Autism Spectrum Disorders. *Neuron* 87, 684–698.
- Offord, D.R., and Cross, L.A. (1971). Adult schizophrenia with scholastic failure or low IQ in childhood. A preliminary report. *Arch. Gen. Psychiatry* 24, 431–436.
- Ota, M., Sato, N., Hidese, S., Teraishi, T., Maikusa, N., Matsuda, H., Hattori, K., and Kunugi, H. (2017). Structural differences in hippocampal subfields among schizophrenia patients, major depressive disorder patients, and healthy subjects. *Psychiatry Res* 259, 54–59.

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

- Penzes, P., Cahill, M.E., Jones, K.A., VanLeeuwen, J.-E., and Woolfrey, K.M. (2011). Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat. Neurosci.* 14, 285–293.
- Petilla Interneuron Nomenclature Group, Ascoli, G.A., Alonso-Nanclares, L., Anderson, S.A., Barrionuevo, G., Benavides-Piccione, R., Burkhalter, A., Buzsáki, G., Cauli, B., Defelipe, J., et al. (2008). Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 557–568.
- Picchioni, M.M., and Murray, R.M. (2007). Schizophrenia. *BMJ* 335, 91–95.
- Rietschel, M., Mattheisen, M., Degenhardt, F., Genetic Risk and Outcome in Psychosis (GROUP Investigators), Mühleisen, T.W., Kirsch, P., Esslinger, C., Herms, S., Demontis, D., Steffens, M., et al. (2012). Association between genetic variation in a region on chromosome 11 and schizophrenia in large samples from Europe. *Mol. Psychiatry* 17, 906–917.
- Ronald, A., and Hoekstra, R.A. (2011). Autism spectrum disorders and autistic traits: a decade of new twin studies. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 156B, 255–274.
- Rossignol, D.A., and Frye, R.E. (2012). Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Mol. Psychiatry* 17, 290–314.
- Rubenstein, J.L.R., and Merzenich, M.M. (2003). Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav.* 2, 255–267.
- Russo, A., Gianni, L., Kinsella, T.J., Klecker, R.W., Jenkins, J., Rowland, J., Glatstein, E., Mitchell, J.B., Collins, J., and Myers, C. (1984). Pharmacological evaluation of intravenous delivery of 5-

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

- bromodeoxyuridine to patients with brain tumors. *Cancer Res.* 44, 1702–1705.
- Russo, A., Gianni, L., Kinsella, T.J., Klecker, R.W., Jenkins, J., Rowland, J., Glatstein, E., Mitchell, J.B., Collins, J., and Myers, C. (1984). Pharmacological evaluation of intravenous delivery of 5-bromodeoxyuridine to patients with brain tumors. *Cancer Res.* 44, 1702–1705.
  - Schumann, C.M., Hamstra, J., Goodlin-Jones, B.L., Lotspeich, L.J., Kwon, H., Buonocore, M.H., Lammers, C.R., Reiss, A.L., and Amaral, D.G. (2004). The amygdala is enlarged in children but not adolescents with autism; the hippocampus is enlarged at all ages. *J. Neurosci.* 24, 6392–6401.
  - Senter, R.K., Ghoshal, A., Walker, A.G., Xiang, Z., Niswender, C.M., and Conn, P.J. (2016). The Role of mGlu Receptors in Hippocampal Plasticity Deficits in Neurological and Psychiatric Disorders: Implications for Allosteric Modulators as Novel Therapeutic Strategies. *Curr Neuropharmacol* 14, 455–473.
  - Sepe, S., Nardacci, R., Fanelli, F., Rosso, P., Bernardi, C., Cecconi, F., Mastroberardino, P.G., Piacentini, M., and Moreno, S. (2014). Expression of Ambra1 in mouse brain during physiological and Alzheimer type aging. *Neurobiol. Aging* 35, 96–108.
  - Shen, D.-N., Zhang, L.-H., Wei, E.-Q., and Yang, Y. (2015). Autophagy in synaptic development, function, and pathology. *Neurosci Bull* 31, 416–426.
  - Smalley, S.L. (1997). Genetic influences in childhood-onset psychiatric disorders: autism and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 1276–1282.

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

- St Pourcain, B., Robinson, E.B., Anttila, V., Sullivan, B.B., Maller, J., Golding, J., Skuse, D., Ring, S., Evans, D.M., Zammit, S., et al. (2017). ASD and schizophrenia show distinct developmental profiles in common genetic overlap with population-based social communication difficulties. *Mol. Psychiatry*.
- Tang, G., Gudsnuk, K., Kuo, S.-H., Cotrina, M.L., Rosoklija, G., Sosunov, A., Sonders, M.S., Kanter, E., Castagna, C., Yamamoto, A., et al. (2014). Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits. *Neuron* 83, 1131–1143.
- Tordjman, S., Somogyi, E., Coulon, N., Kermarrec, S., Cohen, D., Bronsard, G., Bonnot, O., Weismann-Arcache, C., Botbol, M., Lauth, B., et al. (2014). Gene  $\times$  Environment interactions in autism spectrum disorders: role of epigenetic mechanisms. *Front Psychiatry* 5, 53.
- Uzunova, G., Pallanti, S., and Hollander, E. (2016). Excitatory/inhibitory imbalance in autism spectrum disorders: Implications for interventions and therapeutics. *World J. Biol. Psychiatry* 17, 174–186.
- van Os, J., and Kapur, S. (2009). Schizophrenia. *Lancet* 374, 635–645.
- Volkmar, F.R., and McPartland, J.C. (2014). From Kanner to DSM-5: autism as an evolving diagnostic concept. *Annu Rev Clin Psychol* 10, 193–212.
- Welham, J., Isohanni, M., Jones, P., and McGrath, J. (2009). The antecedents of schizophrenia: a review of birth cohort studies. *Schizophr Bull* 35, 603–623.
- Wohl, M., and Gorwood, P. (2007). Paternal ages below or above 35 years old are associated with a different risk of schizophrenia in the offspring. *Eur. Psychiatry* 22, 22–26.

## Tesi di Dottorato Francesca Sciarra

---

- Wöhr, M., Orduz, D., Gregory, P., Moreno, H., Khan, U., Vörckel, K.J., Wolfer, D.P., Welzl, H., Gall, D., Schiffmann, S.N., et al. (2015). Lack of parvalbumin in mice leads to behavioral deficits relevant to all human autism core symptoms and related neural morphofunctional abnormalities. *Transl Psychiatry* 5, e525.

### **9. Bibliografia delle Figure**

- Jinno, S., and Kosaka, T. (2006). Cellular architecture of the mouse hippocampus: a quantitative aspect of chemically defined GABAergic neurons with stereology. *Neurosci. Res.* 56, 229–245
- Kirov, G., Pocklington, A.J., Holmans, P., Ivanov, D., Ikeda, M., Ruderfer, D., Moran, J., Chambert, K., Toncheva, D., Georgieva, L., et al. (2012). De novo CNV analysis implicates specific abnormalities of postsynaptic signalling complexes in the pathogenesis of schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 17, 142–153
- Human Foot Anatomy (2016). *Anatomy of the Hippocampus*. Human Anatomy Library.
- Sapias, T., Caltech Division of Biology and Biological Research