



Alterazioni neuronali e sinaptiche in topi *knock-out* IB2 (-/-) con fenotipo simil-autistico

Francesca Prestori², Matteo Rocchetti¹, Marianna Boso¹, Egidio D'Angelo²

¹Dipartimento di Scienze Sanitarie Applicate e Psicocomportamentali, Sezione di Psichiatria, e

²Dipartimento di Scienze Fisiologiche-Farmacologiche Cellulari-Molecolari, Sezione di Fisiologia Generale, Università degli Studi di Pavia, Pavia, Italia

Alterazioni neuronali e sinaptiche in topi *knock-out* IB2 (-/-) con fenotipo simil-autistico

La delezione del gene SHANK3 è associata alla sindrome di Phelan McDermid. Nella quasi totalità dei soggetti è stata riscontrata la co-delezione del gene IB2. Essendo questa condizione clinica caratterizzata dalla presenza di un fenotipo autistico e considerando il possibile ruolo del cervelletto nella patogenesi di questo fenotipo, abbiamo investigato le alterazioni elettrofisiologiche a livello della sinapsi tra fibra muscoide e cellula granulare in topi *knock-out* per il gene IB2. Le misurazioni sono state effettuate mediante l'impiego della tecnica detta *patch-clamp*, in configurazione di *voltage-clamp*, registrando le correnti post-sinaptiche eccitatorie spontanee ed evocate. I dati raccolti sono stati analizzati per ottenere una valutazione delle componenti AMPA ed NMDA delle correnti post-sinaptiche eccitatorie evocate ed un'analisi quantale del rilascio di glutammato.

La distruzione sperimentale del gene IB2 nei topi ha portato ad una riduzione delle correnti AMPA e ad un incremento delle correnti NMDA nella neurotrasmissione glutamatergica a livello delle sinapsi tra fibra muscoide e cellula granulare e ad una riduzione della probabilità di rilascio spontaneo di glutammato all'interno dei glomeruli cerebellari.

Dal momento che alterazioni del rapporto tra le componenti NMDA ed AMPA sono già state riscontrate in altri modelli animali recanti alterazioni genetiche associate alle patologie dello spettro autistico ed impiegati per lo studio della patologia autistica, suggeriamo il possibile ruolo della co-delezione del gene IB2 nel determinare il comportamento simil-autistico osservato nelle patologie da delezione di Chr22qter.

Neuronal and synaptical alterations in IB2 (-/-) knock-out mice with autistic-like phenotype

Deletion of gene SHANK3 is associated with Phelan McDermid Syndrome. In almost all subject there is the co-deletion of gene IB2. Starting from the possible relevant role of the cerebellum in the pathogenesis of an Autistic-like phenotype, which is found in Phelan McDermid Syndrome, and from the localisation of IB2 at the PSD level in cerebellar glomeruli, we investigate the electrophysiological alteration of neurotransmission in mossy fibre-granule cell synapse, that followed the deletion of IB2 in mice.

The measures was obtained by using the technique of patch-clamp, in a voltage-clamp configuration, and stimulating mossy fibers with different patterns, in order to evaluate the stimoulus-dependent EPSCs and the spontaneous mEPSCs. The data collected was analysed to obtain the evaluation NMDA and AMPA component of the EPSC and to perform a quantal analysis of glutamate release.

Experimental disruption of IB2 gene in mice reduces AMPA and enhances NMDA receptor-mediated glutamatergic transmission in cerebellum and reduces the release probability of glutamate in mossy fibre-granule cell synapses. Since alteration of the NMDA/AMPA ratio was found in different animal models bearing genetic alterations known to be associated with Autism Spectrum Disorders, we suggest the possible role of the co-deletion of IB2 gene in determine the autistic like behaviour observed in Chr22qter-associated cognitive disorders.

Introduzione

Le patologie dello spettro autistico hanno una prevalenza stimata attorno allo 0.6% della popolazione generale, e si caratterizzano per la presenza una compromissione delle capacità di relazione sociale, delle capacità di comunicazione, soprattutto verbale, e per la presenza di una ristretta gamma di interessi e di attività stereotipate [1-2]. Esistono diverse teorie riguardo alla fisiopatologia di questo gruppo di patologie. Tra le più citate sono da menzionare le teorie che sostengono il ruolo di un iperconnettività locale dei neuroni della corteccia cerebrale e di una compromissione dell'attività delle regioni temporale e prefrontale, nel determinare la compromissione delle funzioni integrative osservate in questi soggetti [3-4]. Molto interessanti sono anche gli studi neuroanatomici effettuati su soggetti autistici, in cui è stato evidenziato un deficit nella numerosità cellulare a livello delle regioni limbica e del cervelletto [5-6]. Questo fatto è supportato da studi su modelli animali, in cui una disfunzione cerebellare può condurre ad alterazioni comportamentali che richiamano quelle osservate nei soggetti autistici [7-8].

Le patologie dello spettro autistico possono avere differenti concause, tra cui insulti ambientali [9-10], e mutazioni genetiche [11-16]. È interessante notare come molte delle mutazioni riscontrate interessino geni codificanti per proteine coinvolte nell'architettura sinaptica [17]. Ad esempio, topi in cui sono state indotte le mutazioni dei geni neurexina o neuroligina corrispondenti a quelle riscontrate nei soggetti autistici, mostrano un alterato rapporto tra la neurotrasmissione eccitatoria e quella inibitoria, ed in qualche caso, alterazioni comportamentali simil-autistiche [18, 19, 20]. In alcuni casi sono invece state riscontrate alterazioni del rapporto tra le componenti NMDA ed AMPA dipendenti delle risposte post sinaitiche eccitatorie a livello delle sinapsi glutamatergiche [21-22].

Diversi lavori associano la presenza di alterazioni nella regione terminale del braccio lungo del cromosoma 22 alle patologie dello spettro autistico. Per esempio, la delezione del *locus* Chr22q13.13 determina la comparsa della sindrome di Phelan McDermid. Questa sindrome è caratterizzata dalla presenza di un comportamento autistico, un ritardo generalizzato dello sviluppo che può associarsi, o meno, ad un ritardo anche grave nell'acquisizione del linguaggio, oltre ad alcuni tratti dismorfici minori. La delezione del *locus* Chr22q13.3, riscontrata anche in alcuni soggetti affetti da patologie dello spettro autistico, determina la perdita del gene SHANK3, identificato come la minima regione deleta [13-14, 23-24]. Nella quasi totalità dei casi documentati, inoltre, la delezione si estende in direzione centromerica per 800 Kb a partire dal gene SHANK3, determinando la co-delezione del gene *MAPK8IP2* (altrimenti noto come *IB2*) situato a sole 70 Kb in senso prossimale rispetto SHANK3 [14, 23-24]. IB2 è una proteina espressa a livello dei neuroni e delle cellule neuroendocrine [25] dove è nota interagire con diverse proteine, tra cui IB1 [26], il sistema della MAP kinasi p38 [27-30], il fattore di scambio Rac [28], i recettori delle lipoproteine [29], la proteina precursore dell'amiloide [31] ed il sistema delle kinesine [32].

Scopo del lavoro

Valutare il possibile impatto della delezione del gene IB2 sull'elettrofisiologia della sinapsi tra fibra muscoide e cellula granulare, in un modello murino. I topi *knock-out* per il gene IB2 sono stati creati dalla dottoressa Giza e dal dottor Goldfarb presso l'istituto Hunter College, of City University of New York (Department of Biological Sciences, 695 Park Avenue, New York, NY 10065, USA). Successivamente, mediante un confronto con i risultati riportati in letteratura riguardanti altri modelli animali impiegati per lo studio dell'autismo, definire il possibile ruolo della delezione indotta nella patogenesi dei tratti autistici osservati nei soggetti affetti da Sindrome di Phelan McDermid.

Materiali e metodi

Le misure elettrofisiologiche sono state effettuate con la tecnica del *patch clamp*, in configurazione di *whole cell*, modalità di *voltage clamp*, nello strato granulare di fettine di cervelletto di topo. Sono stati utilizzati topi *knock-out* omozigoti IB2^{-/-} di età compresa tra i 18 e 22 giorni. I topi sono stati dapprima anestetizzati con alotano (*2-Bromo-2-Cloro-1,1,1-trifluoroetano*) ed in seguito decapitati. La scatola cranica è stata rimossa in modo da esporre il cervelletto, dal quale, con l'ausilio di un bisturi, si è prelevato il verme. In questa fase il preparato è stato tenuto in soluzione fisiologica extracellulare (Krebs) carbo-ossigenata con una miscela di O₂ (95%) e CO₂ (5%) per mantenere costante il pH a 7.4 e raffreddata in ghiaccio ad almeno 3°C. Mediante l'utilizzo di uno *slicer* (Dosaka Corp.) sono state ottenute fettine dello spessore di circa 250 µm secondo il piano parasagittale, le quali, poste all'interno di un beker, contenente Krebs (continuamente carbo-ossigenata) a sua volta immerso in un bagno termostatico a 24°C, sono state sottoposte alla fase di *recovery* per almeno un'ora prima di essere trasferite nella camera di registrazione. Questa procedura permette di mantenere le condizioni ottimali alla registrazione per 4-5 ore dopo il taglio. La fettina, prelevata dalla fase di *recovery*, viene alloggiata in una camera di registrazione, posizionata sullo *stage* di un microscopio diretto (Axioskop, Zeiss). La stabilità meccanica del preparato durante tutto il corso dell'esperimento è stata assicurata dalla presenza di un piccolo supporto in platino a forma di U, attraversato trasversalmente da sottili fili di nylon adesi ad esso. La camera di registrazione è stata continuamente perfusa con Krebs carbo-ossigenata ad una velocità di circa 2 ml/min. Tramite un circuito a feedback, un dispositivo termostatico (termostato; PBI) ha garantito una temperatura costante di 30-32°C all'interno della camera di registrazione. Il *set-up* sperimentale, alloggiato all'interno di una gabbia di Faraday, si compone di un tavolo pneumatico antivibrante (Newport) che accoglie il microscopio, ed i micromanipolatori triassiali (per l'elettrodo di registrazione in borosilicato e per l'elettrodo bipolare di stimolazione in tungsteno) al fine di garantire la stabilità meccanica richiesta durante la procedura di registrazione dei segnali. Esternamente alla gabbia di Faraday sono posizionati il perfusore locale ed i vari elementi coinvolti nell'acquisizione dati. Questi consistono in un amplificatore (Multiclamp 700, Axon Instruments) collegato in entrata con l'elettrodo di registrazione ed un convertitore analogico-digitale e digitale-analogico (AD/DA; Digitata 1322A, Axon Instruments) collegato in entrata ancora con l'amplificatore ed in uscita con un computer, impiegato per l'acquisizione dei dati. Il *set-up* è completato dalla presenza di uno stimolatore e un termostato (precedentemente nominato). Su tutti i componenti metallici e sulla strumentazione è stata effettuata la messa a terra.

Le soluzioni impiegate nelle diverse fasi del processo sono state la soluzione da taglio [K-gluconato (130 mM), KCl (15 mM), EGTA (0.2 mM), HEPES (20 mM), glucosio (11 mM), portata al valore di PH di 7.4 con NaOH], la soluzione Krebs [NaCl (120 mM), KCl (2 mM), MgSO₄ (1.2 mM), NaHCO₃

(26 mM), KH_2PO_4 (1.2 mM), glucosio (11 mM), CaCl_2 (2 mM)] e la soluzione intracellulare. [CsSO_4 (81 mM), NaCl (4 mM), HEPES (15 mM), BAPTA-free (0.1 mM), BAPTA- Ca^{2+} (0.05 mM), glucosio (15 mM), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2 mM), ATP- Mg^{2+} (3 mM), GTP- Na^+ (0.1 mM), QX-314 (1 mM)].

In alcuni esperimenti la soluzione extracellulare, utilizzata anche per il *recovery*, è stata ottenuta senza l'aggiunta del Mg^{2+} per evitare il blocco delle correnti NMDA. Per bloccare l'attività dei canali GABA_A è stato perfuso il farmaco bicucullina alla concentrazione di 10 μM , durante tutte le registrazioni.

Le pipette in boro-salicilato, riempite di soluzione intracellulare, presentavano una resistenza di 5-7 M Ω prima della formazione del *seal*. A seguito dell'apertura della membrana, mediante suzione, alle cellule è stato imposto uno stato di *voltage-clamp* a -70 mV mediante l'utilizzo di Multiclamp 700B (Molecular Devices). Gli *input* sono stati campionati con una frequenza di 20 KHz, utilizzando il *software* pCLAMP9 fornito in combinazione con il convertitore A/D Digidata 1322 (Molecular Devices). Le fibre muscolari sono state stimulate mediante un elettrodo bipolare in tungsteno utilizzando un'unità di stimolazione (Clark Instruments). In questo modo sono state evocate le correnti post-sinaptiche eccitatorie ad una frequenza di 0.33 Hz. I parametri passivi della cellula sono stati monitorati in modo intermittente mediante l'analisi del transiente capacitivo indotto da un gradino di iperpolarizzazione di 10 mV. Le cellule sono state quindi mantenute a -70 mV per 5 minuti e a +60 mV per un minuto, al fine di poter valutare il rapporto tra le correnti NMDA ed AMPA. Questo metodo infatti, consente di valutare le differenti componenti senza l'utilizzo di farmaci [33-34]. Dopo aver ottenuto per ogni cellula la media delle registrazioni, si è provveduto a filtrare la traccia a 1.5 kHz e ad effettuare le misurazioni: durante il picco di corrente a -70 mV e a 15 ms dopo lo stimolo a +60 mV, al fine di stimare le correnti AMPA ed NMDA, rispettivamente. In alcuni esperimenti il rapporto tra NMDA ed AMPA è stato stimato direttamente a -70 mV in assenza di Mg^{2+} .

Per l'analisi quantale le cellule sono state mantenute ad un potenziale di -70 mV in presenza di magnesio [35-36] e sono state valutate le mini correnti eccitatorie post sinaptiche spontanee. I parametri del rilascio quantale sono stati ottenuti utilizzando tre differenti metodi statistici, i quali hanno portato a risultati comparabili [35, 37-40].

Risultati

Le cellule granulari hanno mostrato normali proprietà statiche di membrana. Resistenza e capacità sono risultate infatti comparabili a quelle registrate nei topi *wild type* e sovrapponibili a quanto riportato in letteratura (Tabella 1). La componente AMPA delle correnti post-sinaptiche eccitatorie registrata nei preparati ottenuti dai topi $\text{IB2}^{-/-}$ è risultata ridotta rispetto a quella registrata nei preparati ottenuti dai topi *wild type* (-21.1 ± 2.2 pA, n=8 nei topi $\text{IB2}^{-/-}$ e -31.6 ± 3.8 pA, n=5 nei topi *wild type*, $p < 0.05$), mentre la componente NMDA è risultata aumentata, sempre rispetto a quella registrata nei topi *wild type* (30.3 ± 6.4 pA, n=8 nei topi $\text{IB2}^{-/-}$ e 13.3 ± 2.6 pA, n=5 nei topi *wild type*, $p < 0.005$). Ne risulta un incremento del rapporto NMDA/AMPA di 3.3 volte nei topi mutanti rispetto ai controlli (1.5 ± 0.2 , n=8 vs 0.46 ± 0.04 , n=5; $p < 0.005$) come indicato nella tabella 1. I risultati degli esperimenti volti a determinare le proprietà quantali della neurotrasmissione tra la fibra muscolare e la cellula granulare hanno mostrato ulteriori alterazioni (Tabella 2). I dati emersi dai topi $\text{IB2}^{-/-}$ indicano una minor ampiezza nelle minime risposte post-sinaptiche eccitatorie rispetto a quanto rilevato nei topi *wild type* (-15.8 ± 1.8 pA, n=8 vs -24.8 ± 1.2 pA, n=8, $p < 0.001$) e un maggior coefficiente di variazione (0.58 ± 0.06 , n=8 vs 0.36 ± 0.04 , n=8; $p < 0.01$). Nei campioni prelevati dai topi *knock-out* è inoltre stata registrata una percentuale di *failures* (FR) maggiore che nei controlli (19.3 ± 3.6 %, n=8 vs 5.3 ± 1.7 %, n=8; $p < 0.01$).

Attraverso il coefficiente di variazione (CV) e la FR è stato possibile calcolare la probabilità di rilascio del neurotrasmettitore (p) che è risultata significativamente inferiore nei topi IB2^{-/-} rispetto ai controlli. Il valore di p calcolato partendo dal CV è risultato di 0.46±0.08 (n=8) nei topi mutanti e 0.69±0.06 (n=8) nei controlli (p<0.05). Il valore ottenuto invece partendo dalla FR è risultato di 0.44±0.04 (n=8) nei mutanti e di 0.65±0.04 (n=8) nei controlli (p<0.05). Questi dati suggeriscono che la riduzione complessiva della corrente AMPA nei topi *knock-out* è da attribuire principalmente alla riduzione della probabilità di rilascio pre-sinaptica del neurotrasmettitore.

Discussione

Il gene IB2 ha mostrato di possedere molte proprietà che supportano l'ipotesi di un suo possibile ruolo nella patogenesi delle patologie dello spettro autistico. Prima di tutto il gene IB2 giace nella regione terminale del locus 13.3 del braccio lungo del cromosoma 22, che si è dimostrata essere deleta in alcuni soggetti affetti da autismo e virtualmente in tutti i soggetti affetti dalla sindrome di Phelan McDermid, sindrome caratterizzata da severo ritardo nell'acquisizione delle capacità motorie e sintomi simil-autistici. Inoltre, come per altre componenti della sinapsi, la cui mutazione è spesso responsabile di forme monogeniche di autismo, la mancanza della proteina IB2 si associa a modifiche dell'elettrofisiologia neuronale. Nei risultati ottenuti dai topi IB2^{-/-} è stato riscontrato un alterato rapporto tra le correnti dovute ai recettori NMDA e le correnti dovute ai recettori AMPA nella sinapsi glutammatergica tra fibra muscoide e cellula granulare. Questo rapporto è infatti più che triplicato essendo la corrente NMDA aumentata più del doppio e la corrente AMPA diminuita di circa un terzo. Proprio l'alterazione del bilancio NMDA/AMPA è risultata alterata in modelli animali in cui si è indotta la perdita del gene α -neurexina o una mutazione *missense* del gene della neurologina, proteine associate all'autismo [22, 41]. È importante ricordare che questi esperimenti sono stati effettuati su topi IB2^{-/-} e quindi con una perdita totale della proteina IB2 mentre nei soggetti con una delezione della regione terminale del braccio lungo del cromosoma 22 è riscontrabile un'emizigotà regionale. Rimane quindi da indagare se alterazioni elettrofisiologiche simili a quelle rilevate sono registrabili in topi IB2^{+/-} o in topi con doppia emizigotà per IB2 e geni contigui, come per esempio SHANK3, deleti nella sindrome di Phelan McDermid.

È noto il ruolo cruciale della corrente NMDA indotta da uno stimolo nel versante post-sinaptico della sinapsi tra fibra muscoide e cellula granulare, nel determinare le proprietà della scarica della cellula granulare. Le caratteristiche cinetiche della corrente NMDA la rendono necessaria per la sommazione temporale delle correnti post-sinaptiche eccitatorie e determinano la frequenza di risposta della cellula granulare quando le fibre muscoidi scaricano in un range compreso tra i 20 ed i 100 Hz [42]. La corrente NMDA inoltre media entrambi i fenomeni di plasticità sinaptica a lungo termine detti LTP (*Long-Term Potentiation*) e LTD (*Long-Term Depression*) a livello della sinapsi tra fibra muscoide e cellula granulare [33, 43]. Infine la corrente NMDA è indispensabile per lo sviluppo di potenziamento a lungo termine dell'eccitabilità intrinseca della cellula granulare, in seguito ad un input ad alta frequenza proveniente dalla fibra muscoide [44]. In base a queste conoscenze è possibile ipotizzare che l'incremento riscontrato nei topi IB2^{-/-} abbia un impatto significativo sul processo di elaborazione dell'informazione a livello del circuito deputato a ricevere gli input cerebellari. Il meccanismo attraverso il quale la delezione della proteina IB2 possa portare all'incremento della corrente NMDA non è ancora noto e rimane da indagare.

A livello della sinapsi tra fibra muscoide e cellula granulare nei topi IB2^{-/-}, è stato inoltre indagato dal punto di vista elettrofisiologico il versante pre-sinaptico, al fine di approfondire le motivazioni della

ridotta corrente evocata AMPA. Attraverso lo studio delle mini risposte post sinaptiche spontanee eccitatorie, del loro coefficiente di variazione e della percentuale di *failures*, è stato possibile calcolare la probabilità di rilascio del neurotrasmettitore. Proprio la riduzione di questo parametro si suppone essere la causa principale della riduzione riscontrata nella corrente AMPA. L'effetto della mutazione indotta nel gene IB2, riscontrato sia nel versante pre-sinaptico, dov'è presente una minor probabilità di rilascio del glutammato, sia nel versante post-sinaptico, dov'è presente un incremento della conduttanza NMDA, potrebbe quindi indicare una perdita del ruolo di IB2 ad entrambi i livelli. In alternativa i deficit osservati potrebbero derivare da una cascata di eventi originatasi precocemente nello sviluppo dei topi mutanti e conseguente all'alterazione del segnale di competenza di IB2. La via di informazione, necessaria ad una corretta trasmissione sinaptica, attraverso cui IB2 esplica la propria funzione, alterata quindi nei topi mutanti, non è stata identificata. Tra gli argomenti già citati saranno da indagare il pathway della MAP chinasi p38 [27, 28, 29], la modulazione dell'attività della chinasi *scr-like* [45] e la kinesina associata ad IB2, nota per avere un ruolo nel trasposto macromolecolare [32].

In considerazione a quanto esposto nel quarto capitolo, le possibili spiegazioni di come la mutazione indotta possa modificare le capacità cognitive ed il comportamento del nostro modello animale sono due ma non si escludono mutualmente, potendo coesistere. La prima ipotesi coinvolge il circuito cerebro-cerebellare per cui, un'alterazione nel procedimento di elaborazione dell'informazione a livello cerebellare può condurre ad alterazioni dei processi cognitivi, del comportamento e dell'affettività [46]. Anche in altri modelli animali questa ipotesi è stata verificata. Infatti topi mutanti con agenesia congenita del cervelletto mostrano deficit nel comportamento di esplorazione di nuovi oggetti [7] mentre ratti a cui è stato asportato chirurgicamente il verme cerebellare mostrano una riduzione dell'ansia e alterazioni del comportamento sociale [8]. Anche in soggetti affetti da autismo la riduzione delle dimensioni del verme cerebellare correlano con una riduzione nell'esplorazione di nuovi ambienti e con un aumento nei comportamenti stereotipati [5]. La seconda ipotesi invece prende in considerazione l'ampia distribuzione della proteina IB2 all'interno dell'encefalo. È verosimile che le proprietà delle sinapsi glutammatergiche siano alterate in tutto il sistema nervoso centrale e che ne derivi, quindi, un sovertimento globale del normale processo di elaborazione dell'informazione. Emerge la necessità di ulteriori studi per poter identificare con maggior dettaglio il ruolo che questa proteina ricopre nel determinare un fenotipo così evocativo dei tratti tipici della patologia autistica.

Tabelle e figure

Tabella 1. Parametri elettrofisiologici delle cellule granulari di topo IB2^{-/-}.

Parametro	IB2 ^{+/+} (n=14)	IB2 ^{-/-} (n=15)	P value
Capacità di membrana (pF)	4.3±0.2	4.0±0.2	
Resistenza di membrana (GΩ)	1.6±0.3	1.9±0.2	
Resistenza in serie (MΩ)	20.7±3	18.9±2.5	
Frequenza di voltage-clamp (kHz)	2.2±0.2	2.0±0.2	
I _{NMDA} al picco (pA) a +60 mV	13.3±4.6	30.3±4.6	<0.005
I _{AMPA} al picco (pA) a -70 mV	-31.6±3.8	-21.1±2.2	<0.05
I _{NMDA} /I _{AMPA}	0.46±0.04	1.5±0.4	<0.005

Tabella 2. Analisi quantale delle AMPA-EPSCs evocate dalla stimolazione della fibra muscoide nelle cellule granulari di topo IB2^{-/-}.

Parametro	IB2 ^{+/+} (n=8)	IB2 ^{-/-} (n=8)	P value
Picco di ampiezza minimo (pA)	-24.8±1.2	-15.8±1.8	<0.005
Varianza delle mEPSCs [CV]	0.36±0.04	0.58±0.06	<0.01
Percentuale di failures [FR] delle mEPSCs (%)	5.3±1.7	19.3±3.6	<0.01
Probabilità di release [p]:			
• calcolata dal CV	0.69±0.06	0.46±0.08	<0.01
• calcolata da FR	0.65±0.04	0.44±0.04	<0.05
Rapporto tra il secondo ed il primo impulso (PPR)	0.48±0.13	0.80±0.06	<0.5

Bibliografia

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th edn, text revision. DC, Washington 2000.
2. Wing L, Gould J. Severe impairments of social interaction and associated abnormalities in children: epidemiology and classification. *J Autism Dev Disord* 1979;9(1):11-29.
3. Belmonte MK, Allen G, Beckel-Mitchener A et al. Autism and abnormal development of brain connectivity. *J Neurosci* 2004;24:9228-9231.
4. Just MA, Cherkassky VL, Keller TA et al. Cortical activation and synchronization during sentence comprehension in high-functioning autism: evidence of underconnectivity. *Brain* 2004;127:1811-1821.
5. Pierce K, Courchesne E. Evidence for a cerebellar role in reduced exploration and stereotyped behavior in autism. *Biol Psychiatry* 2001;49:655-664.
6. Bauman ML, Kemper TL. Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions. *Int J Dev Neurosci* 2005;23:183-187.
7. Caston J, Chianale C, Delhaye-Bouchaud N et al. Role of the cerebellum in exploration behavior. *Brain Res* 1998;808:232-237.
8. Bobee S, Mariette E, Tremblay-Leveau H et al. Effects of early midline cerebellar lesion on cognitive and emotional functions in the rat. *Behav Brain Res* 2000;112:107-117.
9. Moore SJ, Turnpenny P, Quinn A et al. A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes. *J Med Genet* 2000;37:489-497.
10. Rasalam AD, Hailey H, Williams JH et al. Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. *Dev Med Child Neurol* 2005;47:551-555.
11. Jamain S, Quach H, Betancur C et al. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet* 2003;34:27-29.
12. Muhle R, Trentacoste SV, Rapin I. The genetics of autism. *Pediatrics* 2004;113:472-486.
13. Durand CM. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet* 2007;39:25-27.
14. Sebat J. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* 2007;316:445-449.
15. Szatmari P. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat Genet* 2007;39:319-328.
16. Alarcon M, Abrahams BS, Stone JL et al. Linkage, association, and gene-expression analyses identify CNTNAP2 as an autism-susceptibility gene. *Am J Hum Genet* 2008;82:150-159.
17. Bourgeron T. A synaptic trek to autism. *Curr Opin Neurobiol* 2009;19:231-234.
18. Tabuchi K, Blundell J, Etherton MR et al. A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. *Science* 2007;318:71-76.
19. Jamain S, Radyushkin K, Hammerschmidt K et al. Reduced social interaction and ultrasonic communication in a mouse model of monogenic heritable autism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:1710-1715.
20. Etherton MR, Blaiss CA, Powell CM et al. Mouse neurexin-1alpha deletion causes correlated electrophysiological and behavioral changes consistent with cognitive impairments. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:17998-18003.
21. Kattenstroth G, Tantalaki E, Sudhof TC et al. Postsynaptic N-methyl-D-aspartate receptor function requires alpha-neurexins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:2607-2612.
22. Khosravani H, Altier C, Zamponi GW et al. The Arg473Cys-neuroligin-1 mutation modulates NMDA mediated synaptic transmission and receptor distribution in hippocampal neurons. *FEBS Lett* 2005;579:6587-6594.
23. Wilson HL, Wong AC, Shaw SR et al. Molecular characterisation of the 22q13 deletion syndrome supports the role of haploinsufficiency of SHANK3/PROSAP2 in the major neurological symptoms. *J Med Genet* 2003;40:575-584.

24. Delahaye A, Toutain A, Aboura A et al. Chromosome 22q13.3 deletion syndrome with a de novo interstitial 22q13.3 cryptic deletion disrupting SHANK3. *Eur J Med Genet* 2009;52:328-332.
25. Negri S, Oberson A, Steinmann M et al. cDNA cloning and mapping of a novel islet-brain/JNK-interacting protein. *Genomics* 2000;64:324-330.
26. Yasuda J, Whitmarsh AJ, Cavanagh J et al. The JIP group of mitogenactivated protein kinase scaffold proteins. *Mol Cell Biol* 1999;19:7245-7254.
27. Schoorlemmer J, Goldfarb M. Fibroblast growth factor homologous factors are intracellular signaling proteins. *Curr Biol* 2001;11:793-797.
28. Buchsbaum RJ, Connolly BA, Feig LA. Interaction of Rac exchange factors Tiam1 and Ras-GRF1 with a scaffold for the p38 mitogen-activated protein kinase cascade. *Mol Cell Biol* 2002;22:4073-4085.
29. Schoorlemmer J, Goldfarb M. Fibroblast growth factor homologous factors and the islet brain-2 scaffold protein regulate activation of a stress-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2002;277:49111-49119.
30. Robidoux J, Cao W, Quan H et al. Selective activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 and p38alpha MAP kinase is essential for cyclic AMP-dependent UCP1 expression in adipocytes. *Mol Biol Cell* 2005;25:5466-5479.
31. Taru H, Iijima KI, Hase M et al. Interaction of Alzheimer's beta -Amyloid Precursor Family Proteins with Scaffold Proteins of the JNK Signaling Cascade. *J Biol Chem* 2002;277:20070-20078.
32. Verhey KJ, Meyer D, Deehan R et al. Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules. *J Cell Biol* 2001;152:959-970.
33. D'Angelo E, Rossi P, Armano S et al. Evidence for NMDA and mGlu receptordependent long-term potentiation of mossy fiber-granule cell transmission in rat cerebellum. *J Neurophysiol* 1999;81:277-287.
34. Rossi P, Sola E, Taglietti V et al. NMDA receptor 2 (NR2) C-terminal control of NR open probability regulates synaptic transmission and plasticity at a cerebellar synapse. *J Neurosci* 2002;22:9687-9697.
35. Sola E, Prestori F, Rossi P et al. Increased neurotransmitter release during long-term potentiation at mossy fibre-granule cell synapses in rat cerebellum. *J Physiol* 2004;557:843-861.
36. Saviane C, Silver RA. Errors in the estimation of the variance: implications for multipleprobability fluctuation analysis. *J Neurosci Methods* 2006;153:250-260.
37. McLachlan EM. The statistics of transmitter release at chemical synapses. *Int Rev Physiol* 1978;17:49-117.
38. Clements JD, Silver RA. Unveiling synaptic plasticity: a new graphical and analytical approach. *Trends Neurosci* 2000;23:105-113.
39. Clements JD. Variance-mean analysis: a simple and reliable approach for investigating synaptic transmission and modulation. *J Neurosci Methods* 2003;130:115-125.
40. Mapelli L, Rossi P, Nieuwenhuis T et al. Tonic activation of GABAB receptors reduces release probability at inhibitory connections in the cerebellar glomerulus. *J Neurophysiol* 2009;101:3089-3099.
41. Buzsáki, G. Rhythms of the Brain. *Oxford University Press*, USA 2006.
42. D'angelo E, De Filippi G, Rossi P et al. Synaptic excitation of individual rat cerebellar granule cells in situ: evidence for role of NMDA receptors. *J Physiol* 1995;484:397-413.
43. Mapelli J, D'Angelo E. The spatial organization of long-term synaptic plasticity at the input stage of cerebellum. *J Neurosci* 2007;27, 1285-96.
44. Armano S, Rossi P, Taglietti V et al. Long-term potentiation of intrinsic excitability at the mossy fiber-granule cell synapse of rat cerebellum. *J Neurosci* 2000;20, 5208-5216.
45. Kennedy NJ, Martin G, Ehrhardt AG et al. Requirement of JIP scaffold proteins for NMDAmediated signal transduction. *Genes Dev* 2007;21:2336-2346.
46. Schmahmann JD. Disorders of the cerebellum: ataxia, dysmetria of thought, and the cerebellar cognitive affective syndrome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2004;16, 367-378.