



Università degli Studi di Cagliari
DIPARTIMENTO DI CITOMORFOLOGIA

DOTTORATO DI RICERCA
SCIENZE MORFOLOGICHE XXIII° ciclo
(A.A. 2007/2010)

**Ruolo del trasportatore della serotonina in topi
ipomorfici per il gene monoamino ossidasi A
(MAO A): studio comportamentale e
immunoistochimico**

Settore scientifico disciplinare di afferenza
Bio 16

Presentato da: Dott. Alberto Casti

Coordinatore Dottorato: Prof.ssa Valeria Sogos

Tutor: Prof.ssa M. Serenella Lantini

Corelatore: Dott. M. Paola Castelli

Esame finale anno accademico 2009 – 2010

Indice

Introduzione	3
1.1 MAO: caratteristiche generali e molecolari.....	9
1.2 Trascrizione e trasduzione delle MAOs	14
1.3 Localizzazione e distribuzione delle MAOs.....	15
1.4 Ruolo delle MAOs nel comportamento: inibizione farmacologica.....	18
1.5 Inibitori MAOs: depressione, disturbi dell'umore e disturbi d'ansia.....	19
1.6 Inibitori MAO: sindrome da deficit di attenzione-iperattività e sindrome di Tourette .	21
1.7 Inibitori MAO-B: Morbo di Parkinson.....	21
1.8 Inibitori MAO-B: Morbo di Alzheimer.....	22
2 Ruolo delle MAO nel comportamento: evidenze cliniche.....	22
2.1 Delezioni della MAO-A e MAO-B nella malattia di Norrie	22
2.2 Totale deficienza della MAO-A: Sindrome di Brunner	23
2.3 Polimorfismi delle MAO	24
2.4 Ruolo delle MAOs nel comportamento: evidenze precliniche.....	25
2.5 Topi MAO-A Knockout (KO).....	26
2.6 Topi MAO-B KO.....	31
2.7 TOPI MAO-AB KO	32
Scopo dello studio	33
Materiali e metodi	35
3 Animali.....	35
3.1 Produzione e allevamento dei topi MAO-A ^{neo}	35
3.2 Generazione dei vettori Target dei MAO-A ^{neo}	36
3.3 Generazione dei topi MAO-A ^{neo}	37
3.4 Genotipizzazione	38
4 Farmaci.....	39
5 Studi biochimici	39
5.1 Analisi del mRNA MAO-A tramite <i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i> (RT-PCR).....	39
5.2 <i>Real-time quantitativa</i> (RT-PCR) dell'mRNA MAO-A dei topi WT e MAO-A ^{neo}	39
5.3 Analisi dell'attività catabolica della MAO-A.....	40
5.4 Determinazione dei livelli di monoamina.....	40

5.5	Analisi statistica.....	41
6	Immuisto chimica.....	42
6.1	Preparazione tessuto cerebrale.....	42
6.2	5-HTT l'immunofluorescenza.....	42
6.3	Immagini e analisi quantitativa dell'immunofluorescenza della 5-HTT.....	43
6.4	Analisi statistica.....	44
7	Test comportamentali.....	44
7.1	<i>Open field</i>	44
7.2	Resident-intruder test.....	45
7.3	<i>Marble burying</i>	45
7.4	<i>Elevated plus-maze</i>	46
7.5	<i>Water mist-induced grooming</i>	47
7.6	Analisi statistica.....	47
	Risultati	48
8	Biochimica.....	48
8.1	Il sequenziamento rivela un trascritto chimerico nei topi <i>Maoa^{neo}</i>	48
8.2	I topi maschi MAO-A ^{neo} presentano una bassa attività enzimatica della MAO-A nella corteccia prefrontale e nell'amigdala.....	48
8.3	I topi maschi MAO-A ^{neo} hanno livelli normali di 5-HT nella corteccia prefrontale, nell'amigdala e nello striato.....	50
9	5-HTT Immunoisto chimica.....	50
10	Test comportamentali.....	52
10.1	I topi MAO-A ^{neo} esibiscono risposte ansiose e compulsive ma una bassa aggressività nel <i>resident intruder test</i>	52
10.2	La fluoxetina migliora l'ansia e i comportamenti compulsivi nei MAO-A ^{neo}	53
	Discussione e conclusioni	68
	Bibliografia	74

Introduzione

La serotonina (5-HT) è una 5-idrossitriptamina, neurotrasmettitore monoaminico sintetizzato nei neuroni serotoninergici nel sistema nervoso centrale (SNC), nonché nelle cellule enterocromaffini nell'apparato gastrointestinale, e ha un ruolo importante come neurotrasmettitore/neuromodulatore nel SNC e nel sistema nervoso periferico (SNP), agendo su sistemi che regolano diverse funzioni comportamentali (Jacobs, 2010). La sostanza fu isolata a Roma da Vittorio Erspamer nel 1935, inizialmente considerata un polifenolo; due anni più tardi, in seguito a degli studi su ghiandole cutanee di *Discus glossus* e ghiandole salivari di polpi, fu rinominata enteramina, la quale fu definitivamente rinominata serotonina nel 1948. Le più alte concentrazioni di 5-HT si trovano in tre diversi siti corporei: a) nella parete intestinale dove le cellule *enterocromaffini*, cellule derivate dalla cresta neurale, simili a quelle della midollare del surrene, e mescolate alle cellule mucosali, principalmente nello stomaco e nell'intestino tenue, contengono circa il 90% della quantità totale di 5-HT presente nell'organismo; b) nel sangue dove la 5-HT è presente in elevate concentrazioni nelle piastrine, che la accumulano dal plasma attraverso un sistema di trasporto attivo e la rilasciano in seguito all'aggregazione che si verifica nei siti di danno tissutale; c) SNC, dove è presente in elevate concentrazioni in specifiche aree del mesencefalo.

Nel SNC, la 5-HT svolge un ruolo importante nella regolazione dell'umore, dell'apprendimento e della memoria, dell'aggressività, del sonno, della temperatura corporea, della sessualità e dell'appetito (Veenstra-VanderWeele et al., 2000; Mohammad-Zadeh et al., 2008); inoltre la 5-HT è coinvolta in numerosi disturbi neuropsichiatrici, quali il disturbo bipolare, la depressione e l'ansia, il disturbo

ossessivo compulsivo, l'emicrania, e il disturbo da abuso di sostanze (Lucki, 1998; Lesch, 2001).

La biosintesi della 5-HT endogena (Hasegawa e Nakamura, 2010) (fig. 1) segue una via simile a quella della noradrenalina, con la differenza che l'aminoacido precursore è il triptofano, invece della tirosina. Il triptofano viene convertito in 5-idrossitriptofano grazie all'azione della triptofano-idrossilasi (TPH). Il 5-idrossitriptofano (5-HTP) così prodotto viene decarbossilato a 5-HT, a opera dell'aminoacido decarbossilasi. Le piastrine accumulano la 5-HT durante il loro passaggio attraverso la circolazione intestinale, dove la concentrazione locale è relativamente alta. La 5-HT viene spesso immagazzinata nei neuroni e nelle cellule enterocromaffini come co-trasmettitore insieme ai vari ormoni di natura peptidica, come la somatostatina, la sostanza P, e il polipeptide vasoattivo intestinale.

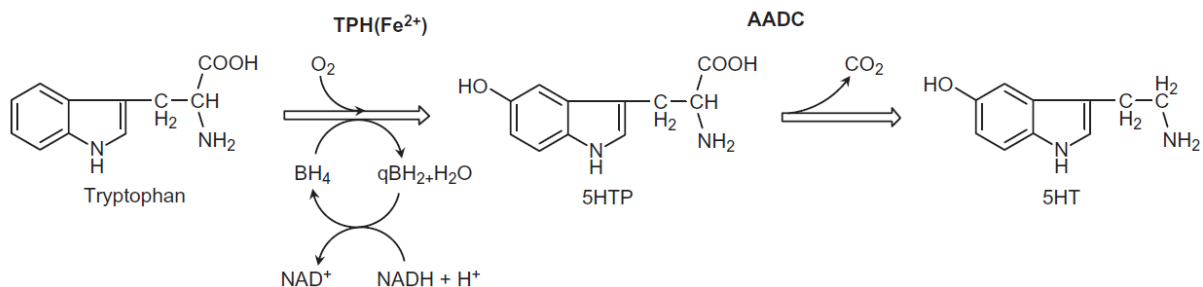


Figura 1. Biosintesi della serotonina

La serotonina (5-HT) è sintetizzata dal L-triptofano attraverso una reazione enzimatica a due step. La triptofano idrossilasi (TPH) catalizza la trasformazione del triptofano a 5-idrossi -L-triptofano (5HTP) in presenza di molecole di ossigeno (O₂) e della tetrabiopterina (BH₄), quale co-substrato. Inoltre l'enzima funziona in presenza di ioni ferro (Fe²⁺). Il prodotto ottenuto dalla reazione il 5HTP viene trasformato in 5-HT tramite un processo di decarbossilazione tramite l'enzima L-aromatico amino acido decarbossilasi (AADC).

Il segnale monoaminergico, incluso quello della 5-HT, è considerato uno dei meccanismi chiave per la modulazione dell'umore e delle emozioni, oltre che per il controllo delle funzioni motorie, percettive e cognitive.

Una delle funzioni essenziali per una corretta regolazione della neurotrasmissione serotonergica (5-HTergica) consiste nel suo rapido *reuptake*, tramite il trasportatore della serotonina (5-HTT) e nella sua degradazione enzimatica. Peraltro, la rapida degradazione delle monoamine cerebrali, come la 5-HT, la noradrenalina (NE) e la dopamina (DA) è essenziale per il corretto funzionamento della neurotrasmissione sinaptica (fig. 2-4).

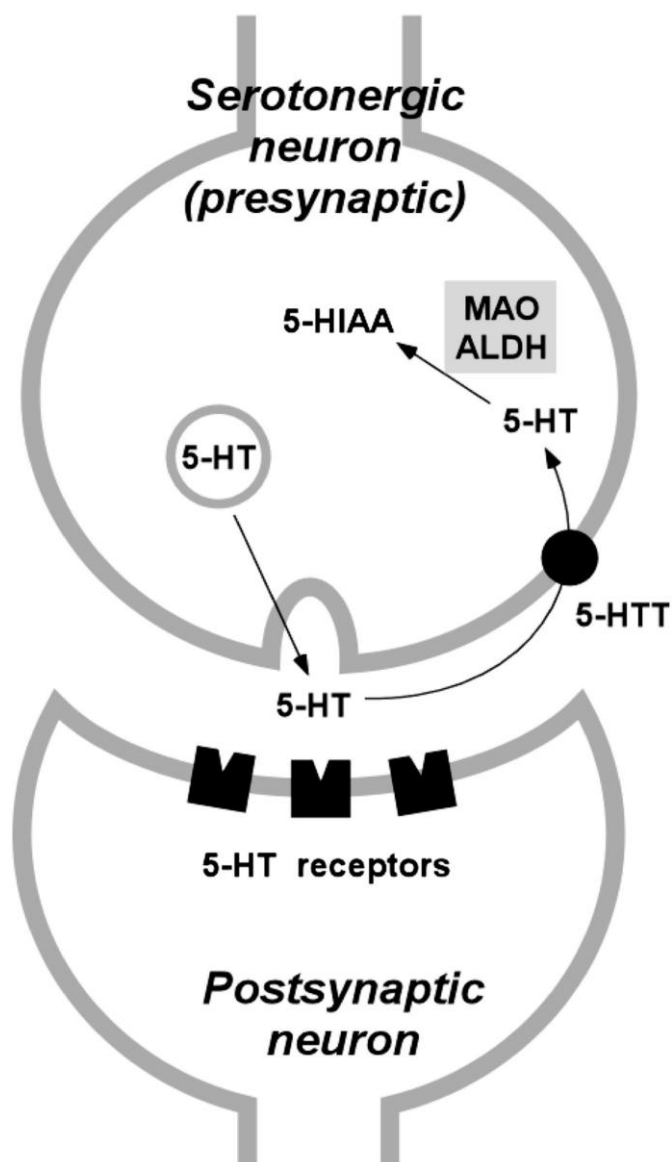


Figura 2. Elaborazione sinaptica della serotonina (5-HT)

Dopo il suo rilascio, l'attivazione dei recettori della 5-HT e il *reuptake* attraverso il trasportatore della 5-HT (5-HTT), la serotonina è degradata dalla MAO (monoaminossidasi) e dalla ALDH (aldeide deidrogenasi) nell'acido 5-idrossiindolo-3-acetico (5-HIAA).

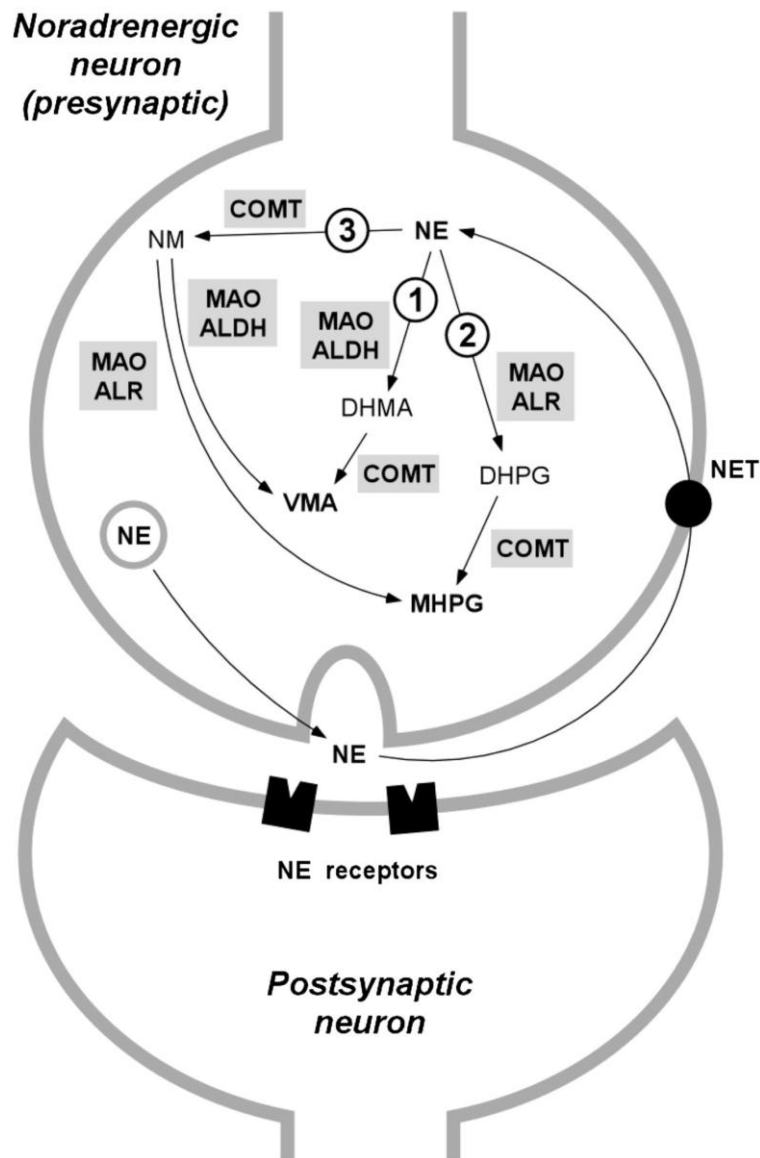


Figura 3. Elaborazione sinaptica della norepinefrina (NE)

Dopo il suo rilascio, l'attivazione dei recettori NE e il *reuptake* per mezzo del trasportatore della NE (NET), la NE è degradata attraverso tre principali vie enzimatiche. (1) Nella prima via, la MAO (monoamino ossidasi) e l'ALDH (aldeide deidrogenasi) trasformano la NE in acido 3,4-diidrossimandelico (DHMA); questo composto è poi processato e trasformato dalle catecol-O-metiltransferasi (COMT) nell'acido vanillilmandelico (VMA). (2) Nella seconda via, la MAO e la ALR (aldeide riduttasi) trasformano la NE in 3,4-diidrossifenilglicina (DHPG), la quale è ulteriormente degradata dalle COMT in 3-metossi-4-idrossifenilglicole (MHPG). (3) Nella terza via, le COMT metabolizzano la NE in normetanefrina (NM), che è successivamente trasformata o in MHPG (via MAO/ALR) o in VMA (via MAO/ALDH).

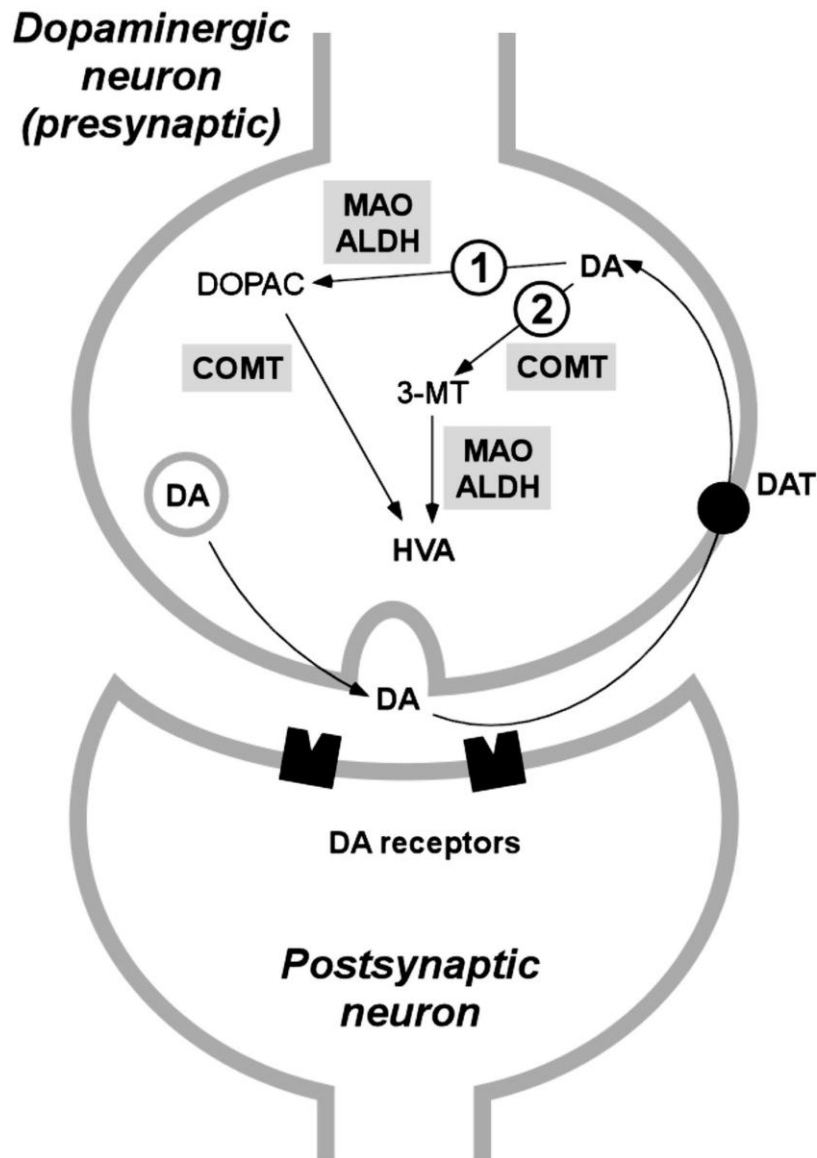


Figura 4. Elaborazione sinaptica della dopamina (DA)

Dopo il rilascio, l'attivazione del recettore DA e il *reuptake* per mezzo del trasportatore della DA (DAT), la DA è degradata attraverso due principali vie enzimatiche. (1) Nella prima via, le MAO (monoamminossidasi) e la ALDH (aldeide deidrogenasi) trasformano la DA nell'acido 3,4-diidrossifenilacetico (DOPAC); questo composto è poi processato e trasformato dalle catecol-O-metiltransferasi (COMT) nell'acido omovanillico (HVA). (2) Nella seconda via, le COMT metabolizzano la DA nel 3-metossitiramina (3-MT), che è trasformata in HVA dalle MAO e dall'ALDH.

Il principale circuito responsabile del catabolismo della 5-HT sia a livello cerebrale che periferico è mediato dall'enzima MAO e consiste nella sua deaminazione ossidativa in 5-idrossi-3-indolacetaldeide (5-HIAL). Tale prodotto viene ulteriormente processato da un NAD⁺-aldeide deidrogenasi in acido 5-idrossi-3-indol acetico (5-HIAA). Una piccola

quantità di 5-HT può essere trasformata in 5-idrossitriptofolo (5-HTOL) da un'altra NADPH-aldeide reduttase (ALR) o da una NADPH-alcooldeidrogenase (ADH) (Feldstein e Williamson, 1968; Consalvi et al., 1986; Svensson et al. 1999 (fig 5).

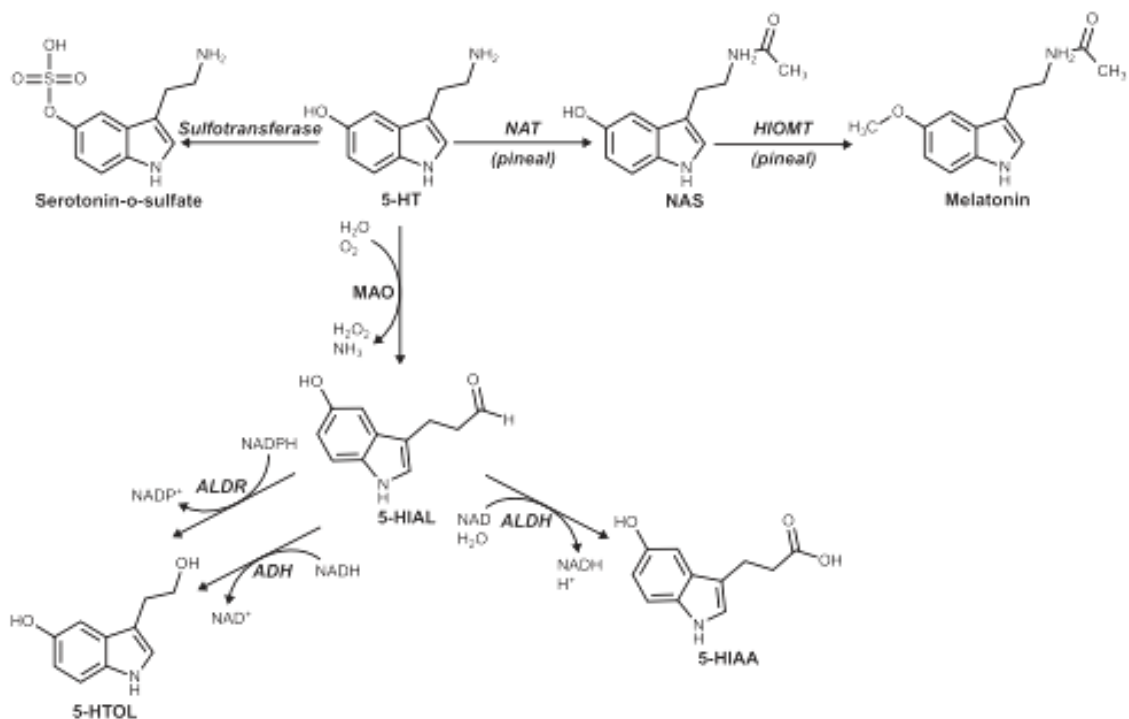


Figura. 5. Via metabolica della 5-HT

Le MAO catalizzano la trasformazione della 5-HT nel 5-idrossi-3-indolacetaldeide (5-HIAL), il quale è poi ulteriormente degradato nell'acido 5-idrossi-3-indolacetico (5-HIAA). In alternativa, la 5-HIAL può essere trasformata in 5-idrossitriptofolo (5-HTOL) dall'aldeide reduttasi (ALDR) o dall'alcool deidrogenasi (ADH). La 5-HT può anche essere coniugata a gruppi di solfato o di glucuronil (non mostrato) per mezzo della trasferasi. Nelle ghiandole pineali, la 5-HT è convertita a N-acetilserotonina (NAS) dalla N-acetiltransferasi. La NAS è poi trasformata in melatonina dall'idrossindolo-O-metiltransferasi

Il 5-HIAA viene rapidamente eliminato per diffusione, trasportato nel torrente ematico e, tramite un meccanismo di filtrazione glomerulare e di escrezione attiva tubulare (Despopoulos e Weissback, 1957), viene eliminato per via renale (Udenfriend et al. 1956). Le concentrazioni urinarie di 5-HIAA sono considerate un indice della concentrazione periferica di 5-HT (o dell'attività della MAO) e vengono comunemente utilizzate per monitorare gli effetti dell'inibizione farmacologica della MAO o per lo

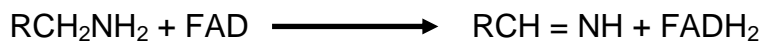
screening della sindrome carcinoide, caratterizzata da un aumentato rilascio di 5-HT da parte di alcuni tumori endocrini gastrointestinali. Simili presupposti hanno portato i ricercatori a considerare le concentrazioni di 5-HIAA nel liquido cerebrospinale (CSF) indicatori del turnover della 5-HT (Jimerson, 1985). Bassi livelli di 5-HIAA sono state associati a diversi disordini psichiatrici, quali l'impulsività, tentativi suicidari, e il comportamento antisociale (Asberg et al., 1976; Mehlman et al., 1994; Virkkunen et al., 1995). Oltre alla degradazione mediata dalla MAO, la 5-HT può essere biotrasformata o con una reazione di coniugazione con un solfato tramite una sulfotransferasi o glucuronata tramite una glucuronil-transferase. Inoltre, la 5-HT può essere trasformata in melatonina tramite una reazione di acetilazione (catalizzata dal N-acetil transferase) e successiva metilazione tramite una idrossindol-O-metiltransferase (Fig 5). Questa via di degradazione, presente soprattutto nella ghiandola pineale, si trova anche in altri tessuti quali la retina, il sistema gastrointestinale e la tiroide (Kvetnoy, 1999).

1.1 MAO: caratteristiche generali e molecolari.

La MAO [amine:ossigeno ossidoriduttasi (deaminante) (contenente flavine); MAO] è una flavoproteina legata ai mitocondri, che come precedentemente detto catalizza l'ossidazione, tramite deaminazione, della 5HT, di altri neurotrasmettitori monoaminergici (DA, NE, epinefrina) e delle amine alimentari. Inoltre la MAO ha un ruolo citoprotettivo grazie alla degradazione delle ammine esogene, che alterando l'omeostasi cardiovascolare ed endocrina hanno effetti tossici. L' enzima è stato isolato nel 1928 dagli estratti di fegato di coniglio da Mary Hare, che l'ha denominato tiramina ossidasi, grazie alla sua capacità di catalizzare la conversione della tiramina in acido paraidrossifenilacetico (Hare, 1928). La corrente nomenclatura è stata invece proposta

circa 10 anni fa in seguito all'identificazione dello spettro completo dei substrati monoaminergici utilizzati dall'enzima (Zeller, 1938).

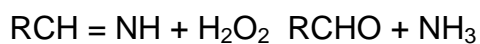
Le MAO sono enzimi legati al cofattore flavina adenina dinucleotide (FAD), appartenenti alla classe delle ossidoreduttasi, che catalizzano la trasformazione delle monoamine nei corrispondenti aldeidi (Edmondson et al., 1993; Miller e Edmondson, 1999). Diversi autori hanno dimostrato che l'azione catalitica delle MAO inizia con il taglio del legame C_α-H della forma deprotonata delle monoamine. In particolare, la FAD accetta 2 atomi di idrogeno e viene ridotta a FADH₂, mentre l'amina è trasformata nella corrispondente immina:



Il secondo *step* della reazione enzimatica delle MAO consiste nella riossidazione della FADH₂ con la trasformazione dell'O₂ in perossido di idrogeno:



Infine l'immina è idrolizzata nella corrispondente aldeide e ammoniaca (NH₃).



Le aldeidi sono ossidate in acidi dall'aldeide deidrogenasi (ADLH) o trasformate in alcool o glicole dall'aldeide riduttasi (ALR).

I prodotti di queste reazioni includono prodotti neurotossici, quali l'ammoniaca e il perossido di idrogeno. Quest'ultimo, in particolare, può indurre la produzione di molecole ossigeno reattive (ROS) determinando danni mitocondriali e apoptosi neuronale. Lo stress ossidativo indotto dall'attivazione delle MAO è un fattore critico nei meccanismi fisiopatogenetici di diverse sindromi nei quali questo enzima è stato implicato, quale la sindrome di Parkinson o la depressione (Bortolato, 2008).

Nel 1968 sono stati identificati due isotipi di MAO, denominati rispettivamente MAO-A e MAO-B, sulla base della loro differente specificità per i diversi substrati e della loro differente selettività agli inibitori di tali enzimi. MAO-A venivano definiti quegli enzimi che erano inibiti da basse dosi di clorgilina, mentre quelli denominati MAO-B erano inibiti da concentrazioni nanomolari di (R)-deprenil (selegilina) (Johnston, 1968; Squires, 1968; Knoll e Magyar, 1972). La caratterizzazione farmacologica delle due isoforme ha dimostrato che nessuna delle due ha una specificità assoluta per un singolo substrato e che lo spettro di azioni enzimatiche mediate dalle MAO-A e MAO-B è in parte sovrapponibile. Nonostante ciò la 5-HT è soprattutto degradata dalla MAO-A con un'affinità 120 volte maggiore rispetto alla MAO-B. La MAO-A ha quindi una maggiore affinità per la 5-HT e la NE, mentre la MAO-B ha una maggiore affinità per la feniletilamina (PEA). Il catabolismo della DA e della tiramina, anche se con considerevoli differenze nelle diverse specie, è attivato da entrambe le isoforme enzimatiche. Infatti, la degradazione della DA nel cervello dei ratti è indotta principalmente dalla MAO-A (Fornai, 1999), nell'uomo e nei primati la stessa funzione è svolta dalla MAO-B gliale e nel topo ad elevate concentrazioni da entrambe le isoforme (Cases, 1995; Fornai, 1999). Indipendentemente dal tessuto e dalle differenze date dalla specie, i due isoenzimi sono stati ben caratterizzati sulla base di criteri farmacologici come illustrato in tabella 1.

Tabella 1. Inibitori MAO

Group	Class	Compound	MAO selectivity
Non-selective	Hydrazines	Isocarboxazid Phenelzine Nialamide Iproniazid Iproclozide	A and B A and B A and B
Selective-irreversibile	Amphetamine derivates Propargylamines	Tranykypromine Clorgyline Selegiline Rasagiline	A and B A B B
Selective-reversible (RIMAS)	Piperidylbenzofurans Morpholinobenzamides Oxazolidinones	Brofaromine Moclobemide Toloxatone Linezolid Befloxatone Cimoxatone	A A A A A A
Mixed MAO- cholinesterase inhibitos	Propylamines	Ladostigil	A and B

La diversa natura molecolare delle due isoforme è stata dimostrata in maniera inequivocabile nel 1988 grazie al *cloning* dei cDNA codificanti i due geni umani *Maoa* e *Maob* (Bach et al., 1988; Hsu et al. 1988). Il confronto delle sequenze aminoacidiche ha dimostrato che i due isoenzimi hanno un'identità nella sequenza aminoacidica del 70%, costituita rispettivamente per la MAO-A e la MAO-B da 527 e 520 aminoacidi e un peso molecolare di 59.7 KDa e 58.8 KDa. I successivi *cloning* delle MAO-A e-B nel ratto e nel bovino (Ito et al., 1988; Powell et al., 1989; Kuwahara et al., 1990) hanno rivelato un alto livello di identità fra le diverse specie dei mammiferi. La disponibilità dei cloni di cDNA della MAO ha reso possibile l'identificazione, la localizzazione e la caratterizzazione della struttura del gene umano *Maoa* e *Maob* (Pintar et al., 1981; Bach et al., 1988; Ozelius et al., 1988, Lan et al, 1989)

Entrambi i geni localizzati nel cromosoma X (Xp11.23 nell'uomo), in direzione opposta con un orientamento coda-coda, sono costituiti da un identico numero di esoni (15) ed

hanno una stessa organizzazione introne-esone, suggerendo che essi derivino probabilmente da una duplicazione dello stesso gene ancestrale (Grimbsy et al., 1991).

La disponibilità dei cloni MAO-A e MAO-B ha permesso la selettiva transfezione dei loro cDNA nelle cellule mammifere, portando alla scoperta che gli enzimi espressi sono cataliticamente attivi e hanno le stesse affinità per i substrati e specificità per gli inibitori simili a quelle degli enzimi endogeni (Lan et al., 1989b) (Fig. 6)

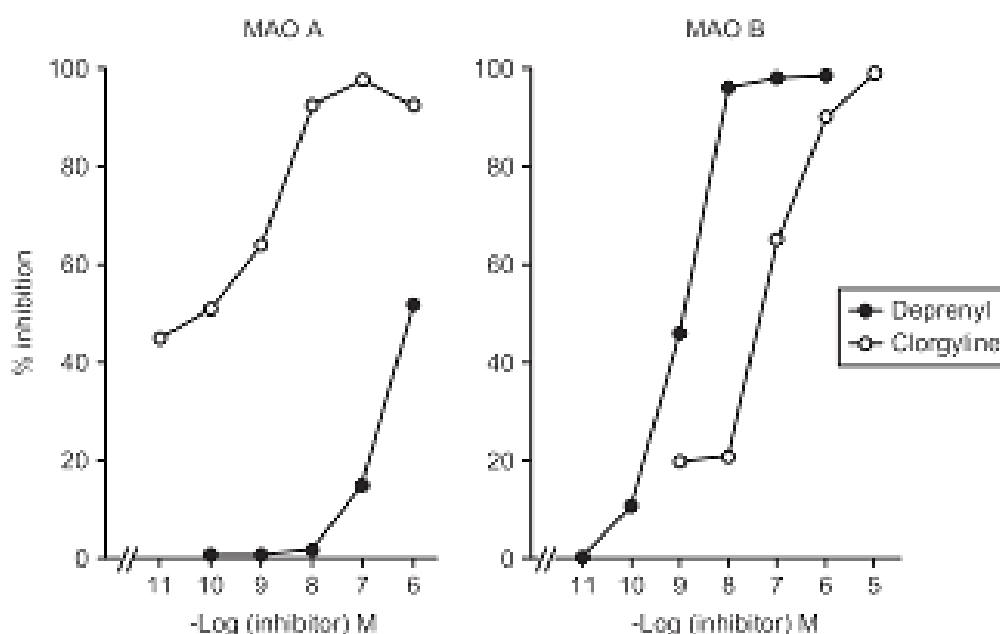


Figura 6. Inibizione con deprenil e clorgilina della MAO-A e MAO-B espresse nelle cellule COS.

L'attività MAO-A e MA-B è stata misurata utilizzando come substrati rispettivamente la 5HT e la β -feniletilamina in presenza di varie concentrazioni di inibitori (Lan et al., 1989a)

L'espressione nelle cellule COS dei cloni mutati ha confermato che la sequenza primaria dei due isoenzimi ha una sequenza peptidica (Ser-Gly-Gly-Cys-Tyr), che lega il cofattore FAD alla cisteina (Cys-406 nella MAO-A e Cys-397 nelle MAO-B) attraverso un legame tioesterasico covalente, essenziale per la loro attività enzimatica. La sequenza primaria è cruciale per le differenze nelle attività catalitiche tra la MAO-A e la MAO-B, infatti ulteriori studi di mutagenesi hanno dimostrato che i segmenti interni (tra

gli aminoacidi 152 e 366) determinano l'inibizione e la specificità ai substrati. Entrambe le proteine sono principalmente localizzate nella membrana esterna dei mitocondri, ai quali sono ancorati per mezzo di un dominio C-terminale (Rebrin I, 2001). La struttura 3D delle MAO è stata creata e ricostruita solo negli ultimi anni ed ha rivelato che la MAO-A umana ha un'organizzazione monometrica (Andrés et al., 2004; De Colibus et al., 2005), mentre la MAO-B cristallizza come un dimero (Hubalek et al., 2005).

1.2 Trascrizione e trasduzione delle MAOs

Negli ultimi 20 anni diversi gruppi (Shih et al., 1990; Zhu et al., 1992; Andrés et al., 2004) hanno contribuito alla comprensione della regolazione trascrizionale dei geni e dei promotori delle MAO-A e MAO-B. Recenti lavori (Chen et al., 2004; Shih et al., 2004) dimostrano che la MAO-A e la MAO-B sono attivate e represses da differenti fattori di trascrizione, i quali potrebbero giustificare le differenze di localizzazione di questi due isoenzimi (Shih et al., 1999). Infatti, nonostante nell'uomo entrambe le isoforme siano espresse nella maggior parte dei tessuti periferici e in vari organi, la MAO-A è prevalentemente localizzata nei fibroblasti e nei tessuti placentali, mentre la MAO-B è l'unica isoforma presente nelle piastrine e nei linfociti (Shih et al., 1999).

L'espressione della MAO-B umana è attivata dalla proteina chinasi C (PKC) e dal *pathway* trasduzionale delle MAP chinasi (Wong et al., 2002), mentre è diminuita dalla metilazione (Wong et al., 2003). Un ruolo chiave nella regolazione di entrambi i geni è svolto dalla famiglia del fattore di trascrizione Sp1 (Zhu et al., 1994; Wong et al., 2001). Chen et al. (2005) ha identificato un nuovo repressore dell'espressione del gene: R1. Inoltre entrambi i fattori Sp1 e R1 sono modulati dai glucocorticoidi e dagli ormoni androgeni (Ou et al., 2006).

In maniera analoga ad altre proteine ribosomiali le MAOs sono sintetizzate dai ribosomi liberi nel citosol (Sagara e Ito, 1982), tuttavia nessuno dei due enzimi possiede la sequenza segnale nel dominio N-terminale tipico dei precursori delle proteine ribosomiali (Roise e Schatz et al., 1998). L'inserzione di entrambi gli enzimi, la MAO-A e la MAO-B nella membrana esterna mitocondriale richiede la presenza di ubiquitina e ATP (Zhuang et al., 1988, 1992). Peraltro l'esatto meccanismo responsabile dell'incorporazione dei due enzimi nella membrana esterna mitocondriale non è ancora completamente chiaro.

1.3 Localizzazione e distribuzione delle MAOs

La distribuzione sia della MAO-A che della -B nel SNC e nei tessuti periferici è stata studiata mediante diversi approcci, quali l'immunoistochimica, l'autoradiografia e l'ibridizzazione in situ. Nella maggior parte dei tessuti, con l'ovvia eccezione dei globuli rossi (Greenawalt e Schnaitman, 1970), le MAOs si presentano legate alla membrana esterna mitocondriale.

Nell' uomo la MAO-A è espressa ad alti livelli nel fegato, nei polmoni, nella placenta e nel piccolo intestino, mentre è presente a bassi livelli nella milza e nei microvasi cerebrali, ed è assente nelle piastrine e nei linfociti (Donnelly e Murphy, 1977). Al contrario, i livelli della MAO-B sono alti nel piccolo intestino, nel fegato e nel cervello, mentre sono bassi nel pancreas, nella milza, nel polmone e nei fibroblasti cutanei. Inoltre, entrambi gli isoenzimi sono presenti nel cervello e hanno una localizzazione regionale e cellula-specifica sorprendentemente differente. In particolare, studi di immunoistochimica e autoradiografia nel cervello hanno rivelato la presenza della MAO-A nei neuroni catecolaminergici (in particolare nel locus coeruleus, nucleus

accumbens, complesso ipotalamico e mammillare), mentre la MAO-B è principalmente espressa nei neuroni 5-HTergici, nelle cellule istaminergiche e negli astrociti (Westlund et al., 1988; Saura et al., 1994; Luque et al., 1995; Jahng et al., 1997).

Il significato funzionale del pattern di distribuzione degli isoenzimi MAOs è ancora poco chiaro ed è in apparente contrasto con le evidenze farmacologiche (specificità del substrato). Infatti molteplici evidenze dimostrano la presenza della MAO-B nei neuroni 5-HTergici anche se la 5-HT è prevalentemente degradata dalla MAO-A e conseguentemente i livelli di 5-HT sono aumentati dopo inibizione della sola MAO-A, e non della MAO-B (Cases et al., 1995; Grimsby et al., 1997). Inoltre la MAO-B è il solo isoenzima identificato nel corpo cellulare e nei dendriti dei neuroni 5-HTergici nel nucleo del rafe (Levitt et al., 1982). Nonostante ciò mRNA per la MAO-A è stato identificato in queste cellule da diversi autori (Luque et al., 1995; Jahng et al., 1997; Filipenko et al., 2002).

Una intrigante ipotesi per spiegare tali apparenti discrepanze è che nei neuroni 5-HTergici la proteina MAO-A possa essere sintetizzata nel corpo cellulare, ancorata a selezionati mitocondri, e trasportata tramite i microtubuli o altri meccanismi negli assoni terminali in diverse aree cerebrali, quali la corteccia, l'amigdala, l'ippocampo etc (Jacobs e Azmitia et al., 1992).

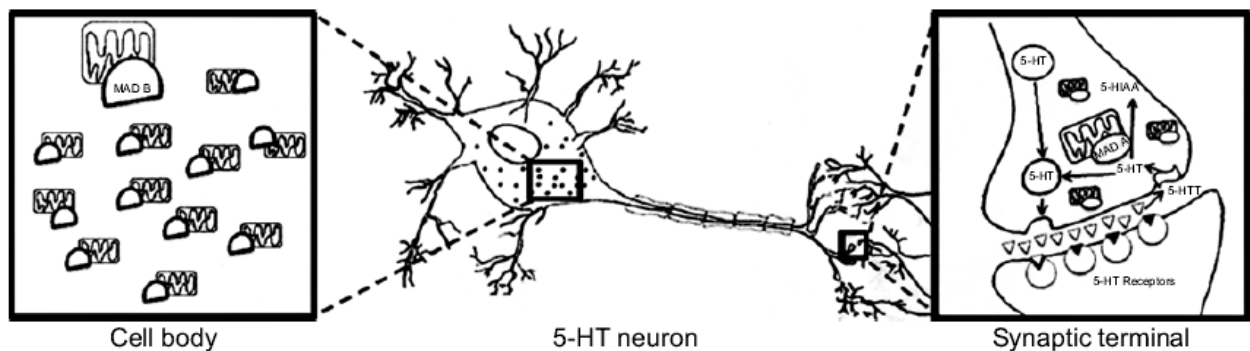


Figura 7. Compartmentalizzazione ipotetica della MAO-A e MAO-B in un neurone 5-HTergico.

E' proposta la localizzazione della MAO-B (rappresentata dalla forma semi-ovale nel box di sinistra) limitata nei mitocondri del corpo cellulare e dei dendriti dei neuroni 5-HTergici. Al contrario, la MAO-A (schematizzata con una forma ellittica nei mitocondri del box di destra) potrebbe essere principalmente distribuita nelle terminazioni sinaptiche, dove potrebbe essere degradata la 5-HT dopo la sua *reuptake* tramite il trasportatore 5-HT (5-HTT).

Questa ipotesi è indirettamente supportata dalla scoperta che l'espressione della MAO-B è abbondante nei mitocondri localizzati nel soma dei neuroni 5-HTergici, ma è completamente assente nei loro terminali assonici (Arai et al., 2002). La differente localizzazione subcellulare dei mitocondri contenenti o no la MAO-B può riflettere una differente interazione con le chinesine, proteine motrici responsabili, attraverso i microtubuli, del suo trasporto anterogrado (Hollenbeck e Saxton 2005). La proposta compartmentalizzazione delle MAOs nei neuroni 5-HTergici potrebbe rispondere a specifiche richieste fisiologiche per la corretta sintesi, cattura vescicolare e degradazione della 5-HT. Infatti, diversi studi evidenziano un' indipendente regolazione della formazione e degradazione della 5-HT nel corpo cellulare e negli assoni dei neuroni 5-HTergici (Neckers et al., 1982; Daszuta et al., 1984a e 1984b). La sintesi della 5-HT sebbene possa avvenire anche negli assoni terminali è fisiologicamente più abbondante nel soma cellulare (Pivac et al., 2003). Pertanto data l'alta affinità della MAO-A per la 5-HT, la localizzazione di tale enzima nel soma cellulare, è più probabile

che esso compete con il meccanismo di gradiente del *reuptake* vescicolare. D'altra parte la presenza della MAO-A nel terminale sinaptico può facilitare la degradazione della 5-HT dopo il suo *reuptake* mediata dal trasportatore 5-HTT. Al contrario la presenza della MAO-B nei neuroni 5-HTergici può prevenire il *reuptake* di "falsi" neurotrasmettitori amminici nelle vescicole. Inoltre questo isoenzima può degradare tracce di amine quali la β -feniletilamina e la triptamina, che possono esaurire il contenuto di 5-HT nelle vescicole con un meccanismo simil-amfetaminico (Burchett e Hicks, 2006).

1.4 Ruolo delle MAOs nel comportamento: inibizione farmacologica

Lo sviluppo e il disegno degli inibitori delle MAO ha avuto inizio grazie alla fortunata scoperta degli effetti antidepressivi della iproniazide, un derivato dell'isoniazide originalmente disegnato per migliorare le proprietà antitubercolari di tale agente (Fox e Gibas, 1953). Questa scoperta, insieme alle dimostrazioni che l'iproniazide era un potente inibitore delle MAO (Zeller e Barsky, 1952), ha portato a disegnare e produrre altri inibitori delle MAO, quali la fenilzina e la nialamide (Rowe et al., 1959; Saunders et al., 1959). Il diffuso successo e uso nella pratica clinica degli inibitori delle MAO però è stato accompagnato da molteplici effetti collaterali di tali isoenzimi; infatti gli inibitori delle MAO derivati dall'idrazina inducono tossicità epatica. In particolare, un altro indesiderabile e temibile effetto secondario degli inibitori delle MAO non-selettivi è la cosiddetta "cheese reaction", che consiste in una grave, potenzialmente letale, crisi ipertensiva con emorragia cerebrale, in seguito all'assunzione di tiramina o altre ammine simpatico-mimetiche presenti nei formaggi, nel vino e in altri cibi fermentati (Anderson et al., 1993). Infatti l'inattivazione, tramite inibitori non selettivi, delle MAO

intestinali provoca l'assorbimento e il passaggio nel torrente circolatorio di alte concentrazioni di tali ammine presenti nella dieta, che inducono un aumento del rilascio della NE nella midollare surrenale, con conseguente attivazione del sistema simpatico e vasocostrizione sistemica. L'alto rischio secondario all'assunzione dei primi inibitori non selettivi della MAO ha spinto i ricercatori allo sviluppo di nuove categorie di agenti antidepressivi con differenti meccanismi d'azione (quali gli antidepressivi triciclici e gli inibitori selettivi per il *reuptake* della serotonina), e di nuovi inibitori selettivi per la MAO-A e la MAO-B privi di pericolosi effetti collaterali. La caratterizzazione di nuove famiglie chimiche di inibitori MAO è stata condotta in parallelo allo studio dei loro putativi omologhi endogeni. Diverse linee di ricerca hanno identificato alcuni peptidi che agiscono come inibitori MAO, come la neurocatina o l'isatina. Tuttavia, il ruolo fisiologico di queste molecole rimane ancora ignoto.

1.5 Inibitori MAOs: depressione, disturbi dell'umore e disturbi d'ansia

Gli inibitori delle MAO, la prima categoria di antidepressivi mai sviluppati, hanno un'alta efficacia nel migliorare l'umore. Il meccanismo di azione della loro azione antidepressiva è basato sull'inibizione della MAO-A, particolarmente per la loro azione sul metabolismo della 5-HT e sulla loro abilità di contrastare la riduzione di 5-HT presente nella sindrome depressiva. L'inibizione della MAO-A determina un incremento delle concentrazioni di 5-HT nello spazio sinaptico (Sharp et al., 1997) e un aumento del *firing* dei neuroni 5-HTergici nel nucleo del rafe dorsale (Aghajanian et al., 1970; Blier e Montigny, 1985) e sono questi effetti che sembrano sottendere l'azione antidepressiva degli inibitori della MAO-A. Il legame tra gli effetti antidepressivi degli inibitori delle MAO e sistema 5-HTergico è avvalorato ulteriormente da diverse

evidenze precliniche che dimostrano come le conseguenze biochimiche, neurofisiologiche e comportamentali dell'inibizione delle MAO sia bloccato dagli antagonisti dei recettori serotoninergici 5-HT_{1A} (Verge et al. 1986; Sotelo et al., 1990; Sharp et al., 1997). Tuttavia, è possibile che anche l'azione di inibizione sulla NE (e in misura minore sulla DA) possa contribuire all'efficacia di tali isoenzimi soprattutto in alcuni sintomi depressivi, quali la distimia, la bulimia e l'ipersonnia (Vallejo et al., 1987; Thase et al., 1992; Carruba et al., 2001).

Le attuali linee guida per il trattamento dei più gravi disturbi depressivi, emanato dall'American Psychiatric Association e dalla British Association per la psicofarmacologia, suggeriscono che gli inibitori MAO possono essere considerati, a causa dei loro numerosi effetti secondari, agenti terapeutici di seconda scelta dopo gli inibitori selettivi del *reuptake* serotoninergico e/o degli agenti triciclici. Infatti, l'introduzione di agenti selettivi, i quali nella pratica clinica mostrano una miglior tollerabilità, hanno gradualmente sostituito l'uso degli inibitori MAO. Tuttavia, lo sviluppo di inibitori reversibili della MAO-A (RIMAs) ha rinnovato l'interesse per questa categoria di composti, in particolare si è valutata la loro efficacia nei trattamenti depressivi resistenti, nella distimia e nella depressione atipica, un sottotipo più grave di disturbo depressivo caratterizzato dalla bulimia, dall'affaticamento e dall'ipersonnia (Nierenberg et al., 1998).

Gli inibitori MAO sono stati suggeriti come agenti terapeutici in un numero notevole di disturbi legati allo spettro dell'ansia, che sembrano dipendere da alterazioni del *pathway* 5-HTergico, quali le fobie sociali, agorafobia, disturbi di panico, stress post-traumatico (PTSD) (Cyr e Farrar, 2000) e disturbi ossessivo compulsivo (OCD) (Jenike et al., 1983). La moclobemide e altri RIMAs sono considerati una categoria promettente di farmaci per tali disturbi, e potrebbero essere un'ottima scelta in particolare per i

PTSD e i disturbi di panico. Infatti gli inibitori reversibili MAO hanno un'alta efficacia terapeutica nell' OCD, in particolare quando tale disturbo è accompagnato da ansia fobica (Jenike., 1983).

1.6 Inibitori MAO: sindrome da deficit di attenzione-iperattività e sindrome di Tourette

Il deprenil, sulla base di studi preliminari che riportavano la capacità degli inibitori della MAO-B di avere effetti stimolanti e di migliorare i comportamenti iperattivi, è stato inizialmente utilizzato in casi di deficit di attenzione-iperattività (ADHD) associati con la sindrome di Tourette. Questo approccio ha avuto un grande successo terapeutico, caratterizzato da un miglioramento generale dei sintomi dell'ADHD e un miglioramento marginale dei tics. Successivi trials clinici hanno confermato che il deprenil riduce i sintomi dell'ADHD, con particolare efficacia nei deficit attenzionali di questo disturbo (Akhondzadeh et al., 2003; Rubinstein et al., 2006). Un possibile intrigante meccanismo d'azione degli inibitori MAO-B nell'ADHD potrebbe essere l'aumento dei livelli di PEA, che sembra agire come un anfetamina endogena (Janssen, 1999).

1.7 Inibitori MAO-B: Morbo di Parkinson

Il razionale per l'utilizzo degli inibitori MAO-B nel morbo di Parkinson (PD) era basato inizialmente sul presupposto che la DA nel sistema dopaminergico nigrostriatale dell'uomo veniva preferibilmente deamidata da questo enzima. L'aumento dei livelli di DA causata dall'inibizione della MAO-B doveva in tal modo compensare il deficit nigrostriatale dopaminergico. Studi condotti con il deprenil, inibitore prototipo delle

MAO-B, hanno rivelato che le azioni mediate da questo composto riflettevano anche le azioni neuroprotettive indotte dall'inibizione delle MAO. Di conseguenza, recenti evidenze hanno dimostrato che la moclobemide, inibitore reversibile della MAO-A (RIMA), ha effetti antiparkinsoniani. Il perossido d'idrogeno, uno dei sottoprodotti delle reazioni mediate dalle MAO (vedi catabolismo), contribuisce alla formazione dei ROS e può indurre danni mitocondriali e morte neuronale. Questi dati sono ulteriormente supportati dalla scoperta che l'MPTP è trasformata dalla MAO-B nella tossina MPP+, e che l'aumentata attività della MAO-B negli astrociti è responsabile di sintomi parkinsoniani (Mallajosyula, 2008).

1.8 Inibitori MAO-B: Morbo di Alzheimer

L'aumento dell'attività della MAO-B legata all'età, oltre agli effetti neuroprotettivi dei suoi inibitori, è considerata la base razionale per l'utilizzo degli inibitori MAO-B nel morbo di Alzheimer (AD). Sebbene gli effetti terapeutici degli inibitori MAO-B per l'AD sono stati contestati da recenti studi di meta-analisi (Birks et al., 2003), alcuni esperimenti preclinici supportano l'idea che il blocco della MAO-B possa indurre alcuni miglioramenti cognitivi.

2 Ruolo delle MAO nel comportamento: evidenze cliniche

2.1 Delezioni della MAO-A e MAO-B nella malattia di Norrie

Il primo caso di una deficienza della MAO-A nell'uomo è stato riportato in alcuni pazienti affetti dalla malattia di Norrie (ND), un disordine genetico indotto da una

mutazione del gene NPD (malattia di Norrie, pseudoglioma), localizzato nel cromosoma Xp 11.4. La ND è una sindrome caratterizzata da cecità congenita, progressiva perdita dell'udito e ritardo nello sviluppo motorio e nelle capacità cognitive (Warburg et al., 1975). Data la stretta vicinanza del gene NPD con i geni per la MAO-A e -B, è stato visto che alcuni individui affetti da ND presentavano delle delezioni a livello delle MAO-A e -B (Sims et al., 1989; Chen, 1995). In tali pazienti la perdita della funzionalità delle MAO determina un aumento delle concentrazioni urinarie di β -feniletilamina e tiramina (Murphy et al., 1990, 1991; Collins et al., 1992). Tale alterazione è accompagnata da diversi sintomi quali severo ritardo mentale, comportamenti simil-autistici e un alterato pattern del sonno (Sims et al., 1989; Collins et al., 1992).

2.2 Totale deficienza della MAO-A: Sindrome di Brunner

Nel 1993 Brunner e collaboratori hanno descritto per la prima volta un disturbo genetico indotto da una mutazione puntiforme *nonsense* nell' esone 8 del gene Maa, che determinava un totale deficit della MAO-A in alcuni individui olandesi (Sindrome di Brunner) (Brunner et al., 1993a, 1993b). Le caratteristiche nosografiche di questa complessa sindrome comprendevano un lieve ritardo mentale, aggressività-impulsività e violente risposte agli stress ambientali. Il difetto genetico della MAO-A era associato con un incremento (5 volte) delle concentrazioni urinarie di 5-HT e dei metaboliti della DA e NE.

2.3 Polimorfismi delle MAO

Diversi studi hanno identificato polimorfismi del gene *Maoa* (Ozelius et al., 1988; Black et al., 1991; Hinds et al., 1992) e hanno associato tali polimorfismi a diversi disordini psichiatrici (Shih e Thompson, 1999). Il primo studio che ha descritto un'associazione tra un disturbo psichiatrico e un polimorfismo della MAO-A è quello che ha correlato in alcuni individui un' aumentata incidenza di alcolismo e abuso di sostanze stupefacenti (Vanyukov et al., 1995) con la presenza di un lungo dinucleotide (CA) nell'introne 2 del gene (Black et al., 1991). Inoltre, numerosi lavori hanno dimostrato che diversi polimorfismi sono associati con diverse attività enzimatiche (Hotamisligil e Brekenfield, 1991). Il polimorfismo funzionale maggiormente studiato è quello caratterizzato dalla presenza di un numero variabile di tandem *repeat* (VNTR), 1.2 Kb a monte del sito di trascrizione; inoltre sono state identificate sei differenti varianti alleliche nella popolazione umana, la più frequente delle quali ha tre *repeat* (3R) e quattro *repeat* (4R) (Huang et al., 2004; Sabol et al., 1998; Jonsson et al., 2000). I primi studi relativi alle varianti VNTR nel promotore del gene hanno documentato, in cellule transfettate e in culture di fibroblasti umani, una maggiore trascrizione del gene MAO-A e un' aumentata attività enzimatica associati con una variante all'elica 4R (Sabol et al., 1998; Denney et al., 1999). In accordo con queste evidenze, studi sull'uomo hanno dimostrato che la variante 3R è associata ad alcune caratteristiche comportamentali quali una personalità antisociale, impulsività-aggressività indotte da una bassa attività della MAO-A (Oreland et al., 2007; Buckholtz e Meyer-Lindenberg, 2008). Inoltre, studi con la risonanza magnetica funzionale (fMRI) hanno rivelato un' associazione tra le varianti VTNR e differenze strutturali e funzionali cerebrali (Meyer-Lindenberg, 2006). Studi post-mortem hanno inoltre dimostrato una più alta attività enzimatica (tendenza non

significativa) della MAO-A in cervelli di soggetti adulti portatori della variante 4R rispetto a quelli portatori della variante 3R (Balciuniene et al., 2002).

In conclusione, tutti questi dati indicano una correlazione tra la presenza di polimorfismi VNTR, bassa attività enzimatica e comportamento antisociale (Manuck et al., 2000). Inoltre, recentemente è stato dimostrato che l'attività della MAO-A in diverse aree corticali e subcorticali è inversamente correlata con i livelli di aggressività nell'uomo (Ali-Klein et al., 2008).

2.4 Ruolo delle MAOs nel comportamento: evidenze precliniche

Sebbene le isoforme delle MAOs possono essere distinte sulla base della loro affinità per i diversi substrati e la loro differente selettività agli inibitori di tali enzimi, molteplici studi hanno invece dimostrato che ad alte dosi sia gli inibitori della MAO-A che della MAO-B non sono completamente selettivi. Per ovviare a questo problema diversi gruppi (Shih e Chen, 1999; Cases et al., 1995) hanno sviluppato alcune linee di topi transgenici con mutazioni *nonsense* per ciascuna isoforma MAO. La caratterizzazione dei fenotipi di questi animali ha offerto un sostanziale contributo per la comprensione del ruolo delle MAO nella regolazione del comportamento e delle funzioni del cervello. Una tabella sinottica delle caratteristiche comportamentali e neurochimiche presenti nelle differenti linee di topi MAO KO è presente nella tabella 2.

Tabella 2: Caratteristiche biochimiche e comportamentali dei topi MAO-A, MAO-B e MAO-AB KO

Phenotypical features		MAO A KO	MAO B KO	MAO AB KO
Neurotransmitter levels	5-HT (serotonin) NE (norepinephrine) DA (dopamine) PEA (Phenylethylamine)	200%↑ 130%↑ 110%↑ -	- - - 700%	700%↑ 200%↑ 200%↑ 1400%↑
Locomotor activity Startle reactivity	Open field	↓ ↓	- ?	↓↓ ?
Aggression	Resident-intruder aggression Aggression in familiar environment	↑↑ ↑	- -	↑ ↑
Anxiety and fear	Plus-maze anxiety Open-field anxiety (periphery/center ratio) Fear conditioning	- - ↑	- - ?	↑ ↑↑ ?
Depression	Immobility time in forced swim test Immobility time in tail suspension test	↓ ↓	↓ ?	? ?

2.5 Topi MAO-A Knockout (KO)

La prima linea di animali KO creata per studiare le funzioni della MAO-A in vivo è stata ottenuta tramite l'inserzione di una cassetta di interferone nell'esone 2 e 3 del gene MAO-A dei topi C3H/HeJ (Cases et al., 1995). A causa delle caratteristiche della mutazione X-linked, i maschi emizigoti in questa specie hanno un completo deficit dell'attività enzimatica MAO-A con un conseguente significativo aumento nel cervello dei livelli di 5-HT e NE e un modesto aumento della DA. I maschi MAO-A KO presentano inoltre un vasto e complesso assortimento di alterazioni fenotipiche morfologiche e comportamentali. I *pups* KO hanno alterazioni locomotorie, quali movimenti rapidi della testa, tremori, *rearing* e tempo di immobilità nel *force swimming test*. (Cases et al., 1995; Cazalets et al., 2000). Questa ritardata maturazione della locomozione è accompagnata da alterazioni del sistema respiratorio e delle funzioni sensoriali (Bou-Flores et al., 2000). Inoltre, i *pups* all'età di 11-16 giorni presentano iperattività locomotoria, fenomeni di *jumping*, e posture anomale (Cases et al., 1995). I

MAO-A KO adulti invece esibiscono un drammatico aumento dei comportamenti aggressivi, misurati attraverso il paradigma del *resident-intruder*. (Cases et al., 1995; Chen et al., 1999). Questi comportamenti anomali sono associati ad una marcata riduzione dell'attività esploratoria e alla risposta acustica di *startle* e ad un aumento della motilità nel *forced swimming test* (Cases et al., 1995), considerato un modello animale di depressione. Questo particolare modello, oltre ad altri aspetti, può rilevare anche la tendenza dell'animale a rassegnarsi di fronte ad uno stress percepito come altamente minaccioso. Una stretta analisi etologica delle reazioni comportamentali dei topi MAO-A KO nel *forced swimming test* sembra indicare che la riduzione dell'immobilità è principalmente indotta da un aumento dell'attività natatoria, considerata un omologo dell'attività *goal-directed*. Fenomeni simili sono stati descritti in un altro valido modello anti-depressivo, il *tail-suspension test*, nel quale il topo è tenuto sospeso per la coda ad un gancio per sei minuti (Lucki, 1998). Infatti, sebbene il tempo di immobilità totale sia simile tra i topi MAO-A KO e *wild-type* (WT), vi è una chiara differenza nelle modalità dell'attivazione motoria tra i due genotipi: i MAO-A KO mostrano un maggior numero di torsioni del corpo e di tentativi di arrivare al gancio rispetto ai topi WT. Inoltre, il numero di boli fecali prodotti dagli animali durante il *tail-suspension test* è significativamente ridotto nei MAO-A KO rispetto ai corrispondenti topi WT. I topi MAO-A KO rispetto agli animali WT mostrano numerose alterazioni del comportamento emozionale, quale un' aumentata tendenza a stare al centro dell'arena, alti livelli di memoria ritentiva dopo *conditioned passive avoidance* (Kim et al., 1997; Agatsuma et al., 2006; Dubrovina e Zinov'ev, 2007). Nonostante ciò, i MAO-A KO non manifestano evidenti modificazioni di tipo ansioso nel test comportamentale *elevated plus maze* (Popova et al., 2001) e hanno minori reazioni endocrine in risposta a stress acuti e cronici. (Papova et al., 2006). Dal momento che i topi C3H/HeJ sono ciechi alcune alterazioni comportamentali presenti nei MAO-A KO, che derivano dai C3H/HeJ,

potrebbero essere secondarie o collegate al deficit visivo. Il recente sviluppo di una nuova linea di topi 129/Sv MAO-A KO, che ha una mutazione *nonsense* nell'esone 8 (in una posizione molto vicina a quella modificata nella sindrome di Brunner) ha permesso di confermare la maggior parte delle modificazioni comportamentali associate all'alterata funzionalità della MAO-A (Scott et al., 2008). In conclusione, le anomalie comportamentali presenti nei topi MAO-A KO sembrano suggerire un generale deterioramento della reattività agli stimoli ambientali con un aberrante regolazione delle risposte adattive allo stress in una maniera molto simile a quelle dei soggetti affetti da sindrome di Brunner. L'analisi morfologica dei pattern neuronali nel cervello dei MAO-A KO sembra indicare la possibilità che le anomalie comportamentali possano dipendere da *deficits* sensoriali indotti dalla carenza dell'attività enzimatica MAO-A. I topi MAO-A KO hanno sia delle alterazioni nei circuiti uditivi-visivi (Upton et al., 1999; Thompson et al., 2008) sia una alterata morfogenesi dei *barrel fields* del quarto strato della corteccia somatosensoriale (S1) (Cases et al., 1995). I *barrel fields* sono la rappresentazione corticale delle vibrisse nel muso dei roditori e la loro formazione è dipendente dalle proiezioni talamocorticali provenienti dai nuclei talamici ventrobasali (Erzurumli e Jhaveri, 1990). Le vibrisse hanno un ruolo chiave nella regolazione del comportamento esploratorio e nella tigmotassi dei roditori e quindi l'alterazione dei *barrel fields* presente nei MAO-A KO potrebbe essere responsabile delle risposte anomale nel *open field* da parte di tali animali.

Le basi neurochimiche che sottendono alle alterazioni fenotipiche in questi topi sono ancora elusive. In maniera interessante la maggior parte delle alterazioni comportamentali e neuromorfologiche osservate nei MAO-A KO possono essere in parte riprodotte con un trattamento cronico di inibitori della MAO-A durante le fasi precoci dello sviluppo, ma non durante la vita adulta. Per esempio, mentre il blocco

delle MAO-A durante la vita adulta non induce atteggiamenti aggressivi, lo stesso regime terapeutico durante il periodo perinatale determina una diminuzione del tempo di latenza all'attacco nei ratti adulti (Mejia et al., 2002). Inoltre un precoce trattamento con la clorgilina, inibitore selettivo della MAO-A, induce aberrazioni comportamentali e un deterioramento dello sviluppo talamocorticale molto simile a quello che si verifica nei topi MAO-A KO (Cases et al., 1995; Boylan et al., 2000). Al contrario, il reinserimento del gene MAO-A nel proencefalo dei topi MAO-A KO determina il recupero delle anomalie comportamentali e morfogenetiche (Chen et al., 2007).

Molteplici evidenze sperimentali supportano il ruolo chiave della 5-HT nelle alterazioni morfologiche e funzionali in questa linea di animali trasgenici. La precoce somministrazione di p-clorofenialanina (PCPA), un inibitore della sintesi della 5-HT, normalizza la maggior parte delle anomalie comportamentali presenti in questi animali (Cases et al., 1995; Upton et al., 1999; Bou-Flores et al., 2000). Inoltre, i maschi emizigoti hanno alti livelli di 5-HT, NE ed un modesto incremento della DA. In particolare le differenze nelle concentrazioni di 5-HT tra MAO-A KO e WT sono particolarmente elevate (oltre 10 volte) durante i primi stadi di vita post-natale (Cases et al., 1995; Lajard et al., 1999) (Fig. 8).

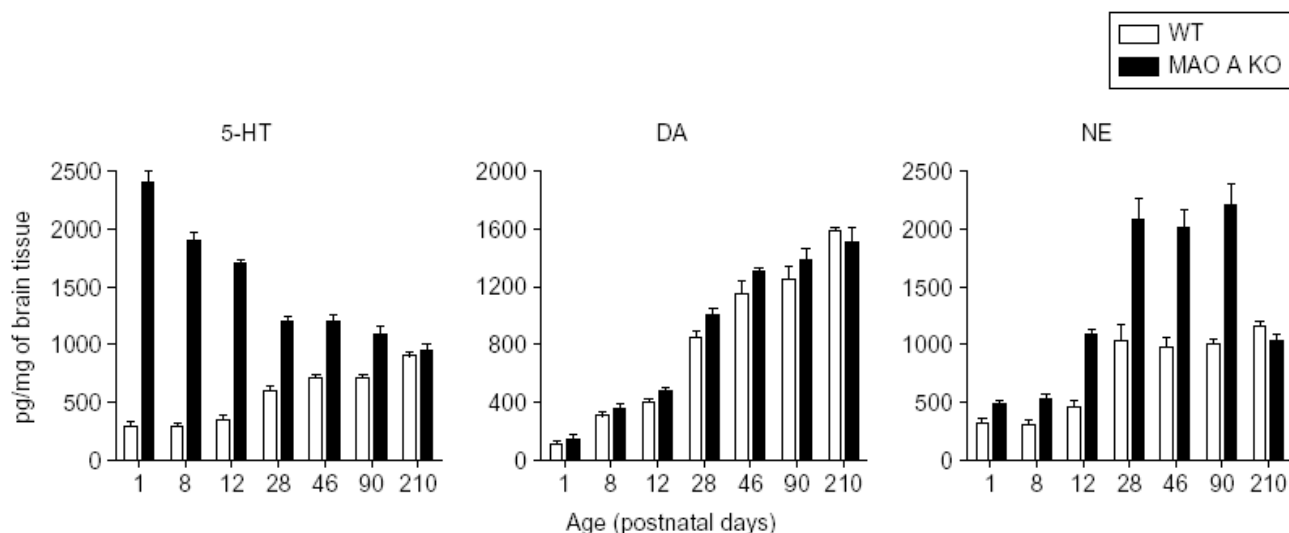


Figura 8. I livelli di 5HT, dopamina (DA) e noradrenalina (NE) sono significativamente più alti nei MAO-A KO rispetto ai WT in maniera età-dipendente. I valori ottenuti con HPLC sono espressi in pg/mg di cervello e rappresentano la media \pm SEM. Adattata da Cases et al., 1995)

L'importanza della 5-HT è stata inoltre dimostrata in maniera inequivocabile nei fenomeni dismorfogenetici presenti in questi topi. Questo concetto concorda con le esaurienti evidenze che dimostrano l'effetto trofico della 5-HT sui progenitori neuronali (Lieske et al., 1999; Lotto et al., 1999), sulla morfogenesi della corteccia sensoriale e locomotoria, probabilmente attraverso l'attivazione di diversi recettori (Vitalis e Parnavelas, 2003; Nakajima et al., 1998; Lebrand et al., 2006). Allo stesso modo, è stato dimostrato che le anomalie dei *barrel fields* sono indotte dagli altissimi livelli di 5-HT presenti durante la prima settimana di vita postnatale, tramite l'attivazione dei recettori serotoninergici 5-HT_{1B} (Salichon et al., 2001). Infine sono stati studiati gli effetti dell'inattivazione della MAO-A sul sistema 5-HTergico evidenziando negli animali MAO-A KO rispetto ai controlli WT una ridotta attività elettrica dei neuroni 5-HTergici, una *down regulation* del 5-HTT, dei recettori 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} (Shih et al., 2000; Evrard et al., 2002; Lanoir et al., 2006).

2.6 Topi MAO-B KO

I topi MAO-B KO hanno un aumento nel SNC dei livelli di PEA(β -feniletilammina), ma non di 5-HT, NE e DA. Queste alterazioni non sono accompagnate da una riduzione del tempo di immobilità nel *forced swimming test*, da alterazioni dell'attività locomotoria nell'*open field* ed nell'*elevated plus maze*. (Grimsby, 1997).

Mentre bassi livelli di MAO-B sono stati ripetutamente associati ad un aumento delle risposte a nuovi oggetti (*novelty*), osservazioni sperimentali relativi ad una disinibizione comportamentale non hanno confermato questa caratteristica nei topi MAO-B KO. Per esempio, i topi MAO-B KO non esibiscono differenze nel consumo e nella preferenza di nicotina in confronto agli animali WT (Lee, 2004), mentre il numero di interazioni sociali sono risultati inferiori rispetto ai WT. Una delle ragioni prioritarie di questa discrepanza potrebbe essere data dall'osservazione che, mentre nell'uomo la MAO-B esercita un notevole contributo sul metabolismo della DA, nei roditori questo ruolo è svolto principalmente dalla MAO-A.

Infatti, i topi MAO-B KO non hanno un'alterazione nel rilascio o *reuptake* della DA. Dal momento che la PEA è presente nel cervello in piccolissime concentrazioni e svolge funzioni simili a quelle dell'anfetamina nella modulazione della neurotrasmissione DAergica e NEergica non è sorprendente che le alterazioni fenotipiche osservate nei topi MAO-B KO siano meno accentuate di quelle dei topi MAO-A KO.

In particolare, recenti linee di evidenza indicano che la PEA sia l'attivatore principale del recettore *trace-amine-associated-receptor 1* (TAAR1), i quali modulano il segnale catecolaminergico (Wolinsky, 2007). È interessante notare che i topi MAO-B KO mostrano diverse anomalie che possono essere collegate ad alterazioni indotte da alti livelli di PEA: per esempio, essi mostrano una diminuzione degli effetti iperlocomotori

dell'anfetamina, o alterazioni nella distribuzione del flusso sanguigno cerebrale (Yin, 2006). In questi animali la PEA è probabilmente responsabile anche della riduzione dei recettori D2-like e della supersensibilità dei recettori D1 nello striato (Chen, 1999).

Recentemente, la PEA e il recettore TAAR sono stati considerati possibili ed importanti bersagli per alcuni studi psichiatrici quali la schizofrenia, la mania, l'ADHD e la dipendenza da metanfetamina.

2.7 TOPI MAO-AB KO

Recentemente è stata caratterizzata e sviluppata una nuova linea di topi MAO-AB KO (Chen et al., 2004), i quali hanno una mutazione spontanea puntiforme della MAO-A e un'ablazione della MAO-B. Questi topi presentano una vasta gamma di fenotipi unici, che non possono essere ricondotti a una mera somma dei fenotipi MAO-A KO e MAO-B KO. I livelli di 5-HT, NE, DA e PEA sono molto più alti rispetto a quelli presenti sia nei MAO-A KO che MAO-B KO (vedi tabella 2). Inoltre, il fenotipo comportamentale in questi animali è caratterizzato da una bassa locomozione indotta da un oggetto nuovo, da alti livelli di comportamenti ansiosi nell'*elevated plus maze* e da una bassa latenza di attacco nel paradigma del *resident-intruder* (Chen et al., 2004).

Scopo dello studio

Come precedentemente menzionato studi clinici e di base suggeriscono l'associazione tra una bassa attività della MAO-A e tratti comportamentali aggressivi e antisociali (Alia-Klein, 2008; Orelan, 2007). La sindrome di Brunner rappresenta la migliore esemplificazione del *link* esistente tra la presenza di una mutazione puntiforme *nonsense* nel gene *Maoa* e un comportamento antisociale ed impulsivo (Brunner, 1993). Lo sviluppo e la caratterizzazione di una linea di topi KO per il gene *Maoa* ha permesso di ampliare le conoscenze relative ai meccanismi fisiopatologici che sottendono a tale sindrome (Cases, 1995; Scitt, 2008).

Molteplici evidenze sperimentali hanno inoltre suggerito il coinvolgimento dell'enzima MAO-A nel controllo della reattività emozionale e dell'impulsività (Caspi, 2002; Brummett, 2008; Manuck, 2000). Recentemente, diversi lavori hanno dimostrato un'associazione tra la presenza di varianti polimorfiche del gene *Maoa*, bassa attività della MAO-A e il disturbo ossessivo compulsivo (OCD) (Camarena, 2001; Kim, 2006). Tuttavia, il ruolo svolto dalla MAO-A nell'OCD e nei comportamenti anormali associati a tale disturbo non può essere studiato in maniera ottimale nei MAO-A KO. Infatti, la severità e la complessità delle anomalie sia comportamentali che neurochimiche che si manifestano in questi animali sembrano mascherare disturbi emozionali più sottili. Un attraente e alternativo approccio che permetta di superare tale difficoltà è lo sviluppo di una linea di topi mutanti caratterizzati da una variante ipomorfa della MAO-A, che determina una bassa penetranza dei fenotipi comportamentali anormali associati con una deficienza della MAO-A. Un metodo altamente affidabile per la produzione di topi portatori di mutazione ipomorfa è l'inserzione intronica di cassette estranee nel gene

in esame (Barrow, 1996; Rucker, 2000). Gli obiettivi di questo studio sono stati: a) la generazione e lo sviluppo di una nuova linea di topi transgenici, caratterizzati da un ipomorfismo della MAO-A, i MAO-A^{neo}; b) la caratterizzazione morfologica, neurochimica e comportamentale di questa linea di topi transgenici e c) il loro confronto rispetto ai topi MAO-A KO ed ai wild-type (WT).

Il costrutto e i topi MAO-A^{neo} sono stati forniti dal *Department of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, University of Southern California, Los Angeles, CA, USA*.

Materiali e metodi

3 Animali

3.1 Produzione e allevamento dei topi MAO-A^{neo}

Il costrutto MAO-A^{neo} è stato disegnato e realizzato per ospitare una cassetta *floxed* neomicina selettiva (*Neo^R*) e la sequenza loxP nell'introne 11. Questa particolare configurazione è stata progettata per permettere, tramite la ricombinazione delle sequenze *Cre*, la rimozione della cassetta NeoR e dell'esone 12 (il quale codifica per il sito attivo dell'enzima). I dettagli della generazione dei topi MAO-A^{neo} sono illustrati nella figura 9. Brevemente, il vettore targeting MAO-A^{neo} deriva dal plasmide pPGHneo-I- contenente la cassetta NeoR con il promotore della fosfogliceratochinasi 1 (PGK1) – e un clone MAO-A BamHI di 9-kb (Fig. 9A). Il vettore target MAO A^{neo} è stato introdotto, tramite elettroporazione come precedentemente descritto da Wu et al., (1994), all'interno di cellule staminali embrionali che sono state successivamente incubate in un mezzo di coltura contenente la gentamicina per la selezione dei cloni neomicina-resistenti. Due indipendenti cloni omologhi ricombinanti neomicina-resistenti sono stati selezionati e usati per generare le due linee di topi 129S6/SvEvTac. La presenza del loxP è stata accertata tramite PCR del DNA genomico, e la linea di topi MAO A^{neo} selezionata è stata poi ampliata all'interno di una colonia stabile.

All'interno dello studio i topi MAO A^{neo} sono stati confrontati con topi della stessa età di WT e i MAO-A KO con il background genetico dei topi 129S6. In particolare, per i topi MAO-A KO, sono stati utilizzati usando i topi MAO-AA863T KO, i quali presentano

una mutazione spontanea *nonsense* sorprendentemente simile a quella che caratterizza la sindrome di Brunner. Ciascuna linea è stata allevata con coppie omogenotipiche e re-incrociate con 129S6 ogni 3 generazioni.

In tutti gli esperimenti sono stati utilizzati topi maschi 129S6 (dell'età di 2-3 mesi) del peso di 25 e 35 g., stabulati in stanze con una temperatura di circa 22°C con un ciclo luce/buio di 12h. In ciascun test biochimico e comportamentale sono stati utilizzati topi provenienti da tre differenti figliate.

3.2 Generazione dei vettori Target dei *MAO-A*^{neo}

Per costruire il vettore target è stato usato un frammento BamHI di 9-kb del gene della MAO-A contenente gli esoni 10-13 (Fig.9). Questo frammento è costituito da un frammento di 6.7 kb e da un frammento EcoRI-BamHI di 2.0 kb. Il frammento 6.7 kb contiene un unico sito di SphI tra l'esone 11 e 12, che è stato usato per l'inserzione del loxP. Il frammento di 2.0 kb è stato usato per legare la cassetta NeoR al sito 5' EcoRI nell'esone 13.

La cassetta EcoRI-NeoR di 1.6 kb, isolata dal vettore pPGK1neo, contiene il promotore di 460-bp della fosfogliceratochinasi (PGK1), seguito da una regione di 828 bp che codifica la NeoR e da un segnale poliadenilato fiancheggiato da due sequenze loxP. La sequenza 3'-terminale loxP è stata isolata tramite digestione SacI-EcoRI. Il frammento di 280 bp ottenuto è stato legato blunt-end al sito SphI tra l'esone 11 e 12, dando origine ad un frammento BamHI-BglII di 7.0 kb con una sequenza di loxP dentro l'introne 11. La direzione del loxP è stata rilevata tramite sequenziamento dei prodotti PCR usando i primers In11F2 e In11R1. Le condizioni della PCR usate sono: 3 min alla temperatura di 94°C, seguita da 30 cicli di 30 sec a 94°C, 30 sec a 50°C, 45 sec a

72°C, e 3 min a 72°C. Il clone, contenente un frammento BamHI-BglII di 7.0 kb, digerito con EcoRI per rimuovere l'esone 10 e produrre un frammento ECORI di 5.7 kb con l'esone 11-loxP-esone12, è stato clonato nel vettore pBSK. Un frammento EcoRI-BamHI contenente l'esone 13 è stato clonato direzionalmente al 3'-terminale della cassetta loxP NeoR producendo un frammento EcoRI-BamHI di 3.6 kb. Questo frammento è stato successivamente legato con il frammento di 5.7 kb, ottenendo il finale vettore target MAO A NeoR nel PBSK .

3.3 Generazione dei topi MAO-A^{neo}

Il vettore target della MAO A^{neo} (plasmide pBSK-Ex11//loxP/12/Neo/13) è stato linearizzato con *XhoI*, prodotto tramite elettroporazione nelle cellule staminali embrionali (ES) 1×10^7 J1, e incubato in terreni di coltura con gentamicina solfato (G418) per selezionare i cloni neomicina-resistenti. Tre piastre di 96 pozzetti sono state scrinate tramite PCR per la ricombinazione omologa e verificate tramite *Southern blot*. Come previsto, nei cloni di cellule ES è stata isolata una banda *BamHI* di 11-kb, costituita da un frammento di 0.28 kb *LoxP* nell'introne 11 e una cassetta *floxed Neo^R* di 1.6-kb nell'introne 12; nei topi WT di controllo privi delle inserzioni è stato identificato un frammento di 9-kb.

I cloni delle cellule ES con la ricombinazione omologa per la MAO-A^{neo} sono stati utilizzati per la generazione chimerica dei topi MAO A^{neo}.

3.4 Genotipizzazione

Per i topi MAO-A^{neo}, sono stati usati specifici primer per il DNA genomico della MAO-A (porzione intronica), In11F2 e In11R1 (Tabella 3). Il DNA è stato amplificato tramite *hot start* di 4 min a 94°C, seguita da 35 cicli di 30 sec a 94°C, 40 sec a 50°C e 45 sec a 72°C, e successivamente un'estensione finale di 5 min a 72°C. La dimensione del prodotto della PCR è di 220 bp per i WT e di 500 bp per i MAO-A^{neo} (Fig. 12). Per i topi MAO-A^{lox} e MAO-A^{Δ12} KO, sono stati usati i primer In11F and In12R4. Il DNA è stato amplificato con un *hot start* di 3 min a 94°C, seguita da 35 cicli di 30 sec a 94°C, 40 sec a 54°C e 90 sec a 72°C, e successivamente un'estensione finale di 5 min a 72°C. La dimensione del prodotto della PCR è di 1.5 kb per i MAO-A^{lox}, 0.6 kb per i MAO-A^{Δ12} KO e di 1.2 kb per i topi WT (Fig. 12).

Tabella 3. Sequenze dei primers per la genotipizzazione e l'RT-PCR

Primer name	Primer sequence (5' to 3')
Per la genotipizzazione PCR:	
In11F1	GAATCTGTACGAATGAGAG
In11F2	CGAATGAGAGTATCCTCTCTTCC
In11R1	GGAAAAGAGGGAGGAGTAAG
In12R4	GTGGGATACTATATCCTATGTCTG
Per RT-PCR:	
Ex11F	GGAAAATCTGTGAGCTGTATGCC
Ex12F	CCTGGTATCATGACTCTGTATGG
Ex14R	CTTGGACTCAGGCTCTTGAAC
NeoR1	CGCTCAGAAGAACTCGTCAAG

F: forward; R: reverse; Ex: esone; In: introne

4 Farmaci

La clorgilina idrocloride e la fluoxetina idrocloride (Sigma Aldrich, St. Luis, MO) sono stati disciolti in 0.9% di soluzione salina e somministrati i.p. in un volume di iniezione di 10ml/kg.

5 Studi biochimici

5.1 Analisi del mRNA MAO-A tramite *Reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR)

Topi adulti maschi WT e MAO-A^{neo} sono stati sacrificati e i loro cervelli rimossi. L'RNA totale è stato isolato usando il reagente Trizol[®] (Invitrogen) e sono stati utilizzati 5 microgrammi di RNA totale per la sintesi del primo *strand* di cDNA utilizzando la trascrittasi inversa (Invitrogen). Per la reazione PCR sono stati utilizzati il set di *primers forward*, E11F, e *reverse* NeoR1, la cui sequenza è illustrata nella Tabella 3.

5.2 *Real-time quantitativa* (RT-PCR) dell'mRNA MAO-A dei topi WT e MAO-A^{neo}

Le reazioni di RT-PCR sono state effettuate utilizzando i primers E11F e NeoR1 (tab. 3) e i reagenti *SyBr Green*. Le condizioni della reazione di PCR sono state le seguenti: 95 °C per 3 min., 35 cicli consistenti in 30 s a 94 °C, 30 s a 56 °C, e infine uno step di 30s a 72 °C. I prodotti della PCR sono stati quindi visualizzati e quantizzati tramite il sistema ottico iCycler della Bio-Rad. Per eliminare le differenze indotte da una diversa quantizzazione del RNA utilizzato nella reazione di RT-PCR, abbiamo utilizzato come

standard interno il 18s rRNA. Le reazioni con il 18s rRNA sono state effettuate in triplicato in tubi separati e le medie dei valori soglia dei cicli (C_T) è stato utilizzato per i calcoli quantitativi. Le relative differenze del mRNA fra gli animali WT e MAO-A^{neo} sono state calcolate usando il metodo $\Delta\Delta C_T$ rappresentati come percentuale dell'input uguali al 100%.

5.3 Analisi dell'attività catabolica della MAO-A

I topi adulti sono stati anestetizzati con alotano e immediatamente decapitati 40 minuti dopo l'iniezione intraperitoneale di clorgilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (10 mg/kg) o di salina. I cervelli sono stati rimossi velocemente (30 sec dalla decapitazione) e le sezioni di cervello, individuate seguendo l'Atlante Franklin e Paxinos (1997), sono state congelate in ghiaccio secco e conservate a -80°C prima di essere utilizzate per l'analisi. Le aree individuate e utilizzate per l'analisi corrispondono a: corteccia prefrontale (1.60-2.50 mm rostrale al bregma); amigdala (1.20-2.80 mm caudale al bregma); ippocampo (2.00-4.00 mm caudale al bregma); striato (1.40-0.10 mm rostrale al bregma); mesencefalo (4.00-6.00 mm caudale al bregma); cervelletto (6.50-10 mm caudale al bregma). L'attività della MAO-A (espressa in nanomoli per 20min/mg di proteina) è stata determinata secondo il protocollo precedentemente descritto da Wu H-F (1983), utilizzando come substrato il [³H]5-HT.

5.4 Determinazione dei livelli di monoamina

Gli animali sono stati sacrificati e le aree di cervello sezionate come descritto nel paragrafo precedente. I campioni sono stati successivamente omogeneizzati in una soluzione contenente 0.1 M di acido tricloroacetico, 10 mM di acetato di sodio, e 0.1

mM di EDTA, un 1 μ M di isoprotenerolo quale standard interno. L'omogenato è stato sonicato e centrifugato, e il surnatante è stato usato per l'analisi all'HPLC (high performance liquid chromatography). Sono stati usati come standards 5-HT, NE, DA, 5-HIAA e DOPAC. Le concentrazioni delle proteine sono state determinate tramite il kit della Pierce, utilizzando il protocollo fornito dalla ditta. La fase mobile è stata costituita dal buffer di omogenizzazione (privo di isoprotenerolo) contenente il 7% di metanolo per il rilevamento della 5-HT e della 5-HIAA. La NE, la DA, e il DOPAC sono stati quantificati separatamente usando come fase mobile una soluzione di acido tricloroacetico priva di metanolo. La fase mobile è stata filtrata e degasata, e la velocità della pompa settata a 1.5 ml/min. La colonna della fase-inversa usata è una Rexchrom S50100-ODS C18 con un'altezza di 25 cm e un diametro interno di 4.6 mm (Regis, Morton Grove, IL). I composti sono stati misurati a +0.7 V usando un detector elettrochimico *Shimadzu* L-ECD-6°.

5.5 Analisi statistica

L'attività enzimatica della MAO-A, i livelli della 5-HT e della NE nei tre diversi genotipi sono stati calcolati su una media \pm SEM (n. 6-12). I valori sono stati analizzati e comparati attraverso una *one way-ANOVA*- seguita dal Tukey test per il post-doc.

6 Immuistochimica

6.1 Preparazione tessuto cerebrale

I topi sono stati anestetizzati con cloralio idrato (400 mg/Kg, i.p.) e perfusi per via transcardiaca con il 4% di paraformaldeide in 0.1 M di buffer fosfato salino (PBS, pH 7.4). I cervelli sono stati rapidamente rimossi e post-fissati nello stesso fissativo per 6 h. Dopo ripetuti lavaggi in 0,1 M di PBS, i cervelli sono stati crioprotetti in 30% di sucroso in PBS per 48 h. Sono state preparate con un criostato sezioni coronali (spesse 40 μm) contenenti nei vari livelli le aree del cervello selezionate, e l'*immunostaining* è stata svolta in sezioni in *free-floating*. Sono state raccolte sezioni contigue e marcate con Neutral Red per facilitare l'identificazione delle aree selezionate.

6.2 5-HTT l'immunofluorescenza

Per bloccare le immunoglobuline endogene del topo, le sezioni di tessuto sono state incubate per 1 ora alla temperatura di 20 °C in una soluzione di M.O.M™, reagente bloccante delle immunoglobuline del topo, preparato seguendo le specifiche della ditta (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Successivamente, dopo lavaggi in PBS/0.2% Triton X-100 è stato eseguito un pre-blocco delle sezioni di tessuto con il 10% di siero normale di capra, l'1% di siero albumina bovina (BSA) e lo 0,2 % di Triton x-100 in PBS per 1 h a temperatura ambiente. Le sezioni sono state incubate per 24 h alla temperatura di 4 °C con l'anticorpo anti-5HTT monoclonale prodotto in topo (1:1000; Chemicon, Temecula, CA, USA). In seguito, dopo lavaggi in PBS/0.2% Triton X-100, le sezioni sono state incubate con Alexa Fluor® 488-labeled goat anti-mouse (1:250,

Molecular Probes, Eugene, OR, USA) per 1 h in camera oscura a temperatura ambiente. Successivamente, le sezioni di tessuto sono state risciacquate e montate su vetrini *Superfrost* con una soluzione antifading. Gli esperimenti standard di controllo sono stati eseguiti con l'omissione degli anticorpi primari o secondari non rivelano nessuna immunofluorescenza.

6.3 Immagini e analisi quantitativa dell'immunofluorescenza della 5-HTT

Le regioni cerebrali individuate per l'analisi, in accordo con l'Atlante *Paxinos e Watson* (1997) corrispondono a: l'area 3 e 1 (Cg3 e Cg1) della corteccia cingolata (AP+2.20), il caudato-putamen (CPu), il core (NAcC) e lo shell (NAcS) del nucleo accumbens (AP+1.10), e i nuclei dell'amigdala basolaterale (BLA) (AP-1.34) (Fig.12). Tutte le immagini, sono state realizzate utilizzando un microscopio a fluorescenza olympus 71X equipaggiato con obiettivi (plan-apocromatici) con ingrandimenti 2.5, 4, 10, 20 e 60X ad immersione ad olio e sono state catturate con una telecamera View II 12-bit CCD F (Olympus, Hamburg, Germany). La risoluzione delle immagini digitali, effettuate con l'ingrandimento 60X, è di 0.1 $\mu\text{m}/\text{pixel}$. L'eccitazione della luce è attenuata con il 6% di trasmittanza usando un filtro a densità neutra. L'analisi semi-quantitativa è stata eseguita, utilizzando l'ingrandimento 60X, su tre aree non sovrapposte ($\sim 16\,000\ \mu\text{m}^2$) di due sezioni di tessuto per ogni regione cerebrale di ogni animale. Ogni immagine è ottenuta sommando l'intensità massima di 8 immagini prese ad un intervallo di 0,25 μm di profondità, per un totale di 2 μm di spessore utilizzando il modulo Z-stack del software (Olympus soft Imaging solution, GNHB, Munster, Germany). Le composizioni dei colori sono state realizzate utilizzando le immagini ottenute con ogni singolo anticorpo come canali RGB. L'analisi delle immagini è stata fatta utilizzando il software

Cell P AnalySIS. Le fibre positive sono state quantificate applicando una soglia di densità ad ogni singolo canale in scala di grigi. Successivamente è stata stimata la percentuale della superficie di ciascuna immagine occupata dalle fibre positive. I valori medi sono stati calcolati su sei immagini per ogni regione del cervello di ciascun animale.

6.4 Analisi statistica

I dati di densitometria sono stati calcolati su una media \pm SEM di sei immagini non-sovrapposte per regione di cervello in ciascun animale, espresse come una percentuale dell'area coperta dalla immunoreattività del 5-HTT, analizzata con un *one way-ANOVA*. Il test di *Newman-Keuls* è stato usato per tutti i confronti post-doc.

7 Test comportamentali

7.1 Open field

L'analisi dell'attività locomotoria è stata svolta come descritta da Scott et al. (2008). L'*open field* consiste in un'arena quadrata e grigia (40 x 40 cm) con 4 pareti nere (alte 40 cm). Nel pavimento sono state definite due zone di area equivalente: un quadrato centrale di 28.28 cm per lato, e una cornice concentrica periferica che include un area di 11.72 cm dalle pareti. Gli animali sono stati posizionati nelle aree centrali per tre giorni consecutivi e il comportamento è stato monitorato per la durata di 5 min. L'analisi dell'attività locomotoria, la durata del tempo trascorso nella zona centrale e nella periferia, la distanza percorsa sia nel quadrato centrale che in quello periferico sono

stati monitorati usando il software Ethovision (Noldus Instruments, Wageningen, The Netherlands). La percentuale di attività locomotoria nel centro è stata calcolata in base alla distanza trascorsa nel centro sulla distanza totale percorsa.

7.2 Resident-intruder test

Gli animali sono stati stabulati singolarmente per 7 giorni e quindi l'animale *resident* è stato messo in contatto con l'animale *intruder* (co-specifico, ma di diversa cucciolata) per un periodo di tempo di 5 min. Il comportamento è stato video monitorato, registrato e valutato da un osservatore non a conoscenza del genotipo degli animali. Le misurazioni includono: (i) latenza all'attacco, (ii) durata (totale) dell'attacco, (iii) numero di morsi aggressivi, (iv) attività totale di locomozione, misurata come numero di *crossings* valutati su una griglia posizionata sopra l'immagine del video di ciascuna gabbia. Per valutare il possibile impatto della componente ansiosa sul comportamento aggressivo abbiamo eseguito il test con due differenti livelli di luce ambientale: normale (100 lux) e tenue (10 lux).

7.3 Marble burying

I topi sono stati posti in una gabbia di Makrolon (35 x 28 cm), il cui pavimento è stato ricoperto con uno strato di fine segatura profondo 5 cm. La luce e il rumore di fondo nella stanza sono stati mantenuti a 5 lux e a 70 dB. I topi sono stati messi uno per gabbia per un tempo di 30 min. per l'abituamento. Quindi, dopo aver tolto gli animali dalla gabbia, 20 biglie (1 cm di diametro) sono state posizionate sopra la segatura ad una distanza regolare l'una dall'altra. I topi sono stati rimessi all'interno della gabbia e

lasciati indisturbati per 30 min. Il loro comportamento e il numero di biglie nascoste dagli animali sono state video registrate e monitorate da due osservatori indipendenti non a conoscenza del genotipo. Una biglia è stata considerata nascosta se veniva coperta per due terzi dalla segatura. L'attività locomotoria è stata analizzata contando il *crossing* su una griglia (5 x 4) posizionata sopra l'immagine del video di ciascuna gabbia.

7.4 *Elevated plus-maze*

La struttura usata per tale test è un labirinto costituito da quattro bracci, disposti in modo tale da formare una croce: due bracci (25 x 5 cm), posti uno di fronte all'altro, non possiedono le pareti (bracci aperti), mentre gli altri due (25 x 5 x 5 cm) hanno le pareti (bracci chiusi). I bracci sono connessi tra loro da una piattaforma centrale che costituisce il punto di partenza. L'intero labirinto è stato posto a 65 cm da terra. Il comportamento è stato valutato da un osservatore non a conoscenza del genotipo dell'animale. I topi sono stati posti singolarmente nel centro del labirinto, rivolti verso un braccio aperto e liberi di esplorare il labirinto per 5 min. La luce e il rumore di fondo nella stanza sono stati mantenuti a 10 lux e a 70 dB. Sono stati valutati: a) il tempo trascorso dall'animale all'interno di ciascun braccio e al centro della piattaforma; b) il numero di ingressi nei bracci aperti e chiusi (tutte e quattro le zampe dell'animale devono essere all'interno di ciascun tipo di braccio).

7.5 Water mist-induced grooming

Il test *water mist induced grooming* è stato effettuato secondo la procedura descritta da Hill et al (2007). Brevemente, i topi dopo un periodo di abitramento di 30 min. sono stati sottoposti al test nelle stesse condizioni sperimentali del *murble*. Dopo aver verificato (per 5 min) che i topi non mostrassero alcun *grooming* spontaneo, sono stati quindi sottoposti a due spruzzi di acqua distillata nebulizzata. Gli animali sono stati quindi lasciati indisturbati e il *grooming* è stato registrato e monitorato. La durata complessiva del *grooming* e la frequenza dei principi di *grooming* sono stati poi analizzati indipendentemente da due osservatori non a conoscenza del genotipo degli animali.

7.6 Analisi statistica

La normalità e la omoschedasticità della distribuzione dei dati è stata verificata usando il test di Kolmogorov-Smirnov e Bartlett's. Le analisi parametriche sono state svolte con un ANOVA a una o due vie, a seconda dei casi, seguita dal Tukey's test con correzione Spjotvoll-Stoline per la comparazione post-doc delle medie. Le analisi non parametriche sono state svolte con Kruskal-Wallis test, seguita dal Nemenyi's test per il post-doc. La soglia della significatività è stata settata a 0.05.

Risultati

8 Biochimica

8.1 Il sequenziamento rivela un trascritto chimerico nei topi *Maoa*^{neo}

La RT-PCR ha rivelato nei topi MAO-A^{neo} la presenza di una banda di 210 bp, corrispondente alla cassetta Neo^R (fig. 9B). Il sequenziamento del prodotto della PCR ha permesso di identificare un trascritto chimerico caratterizzato dalla sequenza degli esoni 11 e 12 seguiti dal promotore della PGK1 della cassetta Neo^R. Questa porzione aberrante di mRNA è tradotta in una proteina MAO-A non funzionale, caratterizzata dalla sostituzione di un'arginina con una serina nella posizione 421, seguita da un dominio C-terminale troncato contenente 10 amino acidi tradotti dal promotore PGK1 (Fig.9C). Allo scopo di verificare la natura ipomorfica della mutazione MAO-A^{neo}, sono stati misurati i livelli del mRNA del *Maoa* wild type (Fig. 9D). In tutte le regioni cerebrali analizzate si è vista una significativa riduzione del mRNA WT nei topi MAO-A^{neo} rispetto ai WT (Fig. 9E).

8.2 I topi maschi MAO-A^{neo} presentano una bassa attività enzimatica della MAO-A nella corteccia prefrontale e nell'amigdala

La bassa sensibilità e selettività degli anticorpi murini anti-MAO in esperimenti preliminari di immunoblotting o immunoistochimica, non ha permesso di valutare l'attività enzimatica della MAO nelle diverse aree cerebrali dei MAO-A^{neo}. Pertanto sono

stati valutati i livelli dell'attività enzimatica delle MAO nelle diverse aree cerebrali dei topi MAO-A^{neo}. I topi MAO-A KO non hanno esibito alcuna attività catalitica della MAO-A in nessuna regione cerebrale, mentre i MAO-A^{neo} hanno mostrato una bassa ma rilevabile attività enzimatica nella corteccia prefrontale e nella amigdala. Tale attività è completamente abolita dal trattamento con la clorgilina (10 mg/Kg, i.p., 40 minuti prima del sacrificio), inibitore selettivo della MAO-A (Fig. 13A-B). L'attività della MAO-A si è rilevata al di sotto della soglia di determinazione in ogni altra regione cerebrale dei MAO-A^{neo} (Fig. 13C-E).

Per verificare se le modificazioni rilevate nei topi MAO-A^{neo} sono dovute alla presenza della cassetta Neo^R sono stati confrontati i livelli dell'attività enzimatica dei MAO-A^{neo} con quelli delle progenie delle linee ricombinanti, ottenute dai loro incroci con i topi BALB/c CMV-Cre (che ha un'espressione ubiquitaria della ricombinasi *Cre*). Sono state generate due linee di topi ricombinanti (Fig.11):

- 1) Topi MAO-A^{Δ12} KO, ottenuti dalla ricombinazione della sequenza loxP nell'introne 11 con a valle la sequenza loxP della cassetta Neo^R; questa linea è caratterizzata:
a) dalla perdita sia dell'esone 12 del gene *Maoa* sia della cassetta Neo^R; b) dall'assenza dell'attività della MAO-A in tutte le regioni cerebrali (dati non mostrati);
- 2) Topi MAO-A^{flox}, nei quali la ricombinazione, mediata dal *Cre*, di due sequenze loxP Neo-fiancheggianti, determina la perdita della cassetta di selezione. I livelli dell'attività enzimatica della MAO-A in tutte le aree cerebrali analizzate sono simili a quelli presenti nei topi WT, dimostrando che la ridotta attività della MAO-A nel cervello dei topi MAO-A^{neo} è dovuta dalla presenza della cassetta Neo^R.

Quindi, dal momento che è stato dimostrato che differenti ceppi possono influenzare ampiamente sia i livelli delle monoamine che le risposte emozionali nei roditori, per lo studio neurochimico e comportamentale dei topi MAO-A^{neo}, non è stato possibile

usare come controlli i topi MAO-A^{flox} e MAO-A^{Δ12} KO (portatori di background misto 129S6/SvEvTacS6 – BALB/c).

8.3 I topi maschi MAO-A^{neo} hanno livelli normali di 5-HT nella corteccia prefrontale, nell'amigdala e nello striato

La fig. 13 (F-G) rivela che i livelli di 5-HT nella corteccia prefrontale e nell'amigdala dei topi MAO-A^{neo} sono simili a quelli presenti nei WT e significativamente più bassi ($P < 0.001$, ANOVA; Tukey's test) rispetto a quelli presenti nei MAO-A KO. Nello striato, i livelli di 5-HT sono identici in tutti i genotipi (fig. 13H), mentre sia i MAO-A^{neo} che i MAO-A KO hanno livelli significativamente più alti rispetto ai WT nell'ippocampo (Fig. 13I) ($P < 0.01$, ANOVA) e nel mesencefalo (Fig. 13J) ($P < 0.01$, ANOVA). I livelli di NE nei MAO-A^{neo} e dei MAO-A KO sono significativamente più alti rispetto ai WT in tutte le regioni cerebrali (Fig. 13 K-O). Tuttavia i livelli di NE nell'amigdala dei MAO-A^{neo} sono significativamente più bassi ($P < 0.05$, ANOVA, Tukey's test) rispetto a quelli dei MAO-A KO (Fig. 13L). I livelli di DA sono uguali in tutte le regioni cerebrali dei tre genotipi (dati non mostrati). Infine i livelli di 5-HT, NE e dei metaboliti della DA (5-HIAA e DOPAC) sono significativamente ridotti nei MAO-A^{neo} rispetto ai controlli WT (dati non mostrati).

9 5-HTT Immunohistochimica

Per determinare le possibili differenze delle fibre serotoninergiche tra i topi MAO-A^{neo}, MAO-A KO e WT abbiamo usato anticorpi altamente specifici per il 5-HTT quale markers delle terminazioni 5-HTergiche. Nessuna immunoreattività (IR) è stata osservata quando l'anticorpo primario o l'anticorpo secondario è stato omesso dalla

reazione. Come precedentemente descritto (Miner et al., 2000), le fibre 5-HTT-immunoreattive sono densamente e uniformemente distribuite attraverso tutti gli strati della corteccia prefrontale (PFC) (Cg3 and Cg1). La figura 14 mostra nella Cg1 (14A) e nella Cg3 (14D) dei topi WT le fibre 5-HTT-immunoreattive che si ramificano frequentemente e presentano una morfologia eterogenea che presenta fibre che variano da sottili e non varicose a spesse e varicose. Inoltre, la marcatura 5-HTT mostra una densa IR attraverso il Nac core e la BLA (fig. 15A, 15D) dei topi WT. Come si vede nelle figure 14B, 14C e 14E, 14F la immunoreattività della 5-HTT è più bassa nella Cg1 e nella Cg3 dei topi MAO-A^{neo} e MAO-A KO rispetto ai WT. Inoltre, è stata evidenziata anche una più bassa 5-HTT IR nel NAc core e nella BLA dei topi MAO-A^{neo} (fig. 15B,15E) e dei MAO-A KO (fig. 15C,15F) rispetto ai topi WT.

Le strutture immunoreattive per il 5-HTT sono state quantificate nella PFC (Cg3 e Cg1), nel caudato dorsale (DC), nel NAc core e NAc shell, e nella BLA di tutti e tre i genotipi. In tutte le aree cerebrali analizzate sono state identificate differenze significative tra i gruppi (fig. 16): Cg1; $F(2,16) = 19,74$, $P < 0.0001$; Cg3: $F(2,16) = 33.18$, $P < 0.0001$; CPu: $F(2,16) = 25.29$, $P < 0.0001$; NacC ($F(2,16) = 41.81$, $P < 0.0001$; NAcS ($F(2,16) = 10,32$, $P = 0.0018$; BLA ($F(2,16) = 42.82$, $P < 0.0001$). L'analisi post-hoc ha rivelato che la 5-HTT-IR è significativamente ridotta del 56 % nella Cg1 ($p < 0.001$), 57% nella Cg3 ($p < 0.001$), 55% nella BLA ($p < 0.001$), 51% nel CPu, rispettivamente del 63 % e 65 % nel NAc Core e NAc Shell dei topi MAO-A^{neo} rispetto ai topi WT (fig 16); mentre è stata osservata una riduzione significativa della 5-HTT-IR nei MAO-A KO, solo nella Cg3 (-17%, $p < 0.05$), nel NAc Core (-33%, $p < 0.001$) e nella BLA (-26, $p < 0.01$) rispetto ai WT. Inoltre, l'analisi post-doc ha rilevato anche una significativa diminuzione delle fibre 5-HTT-IR nella Cg3 ($p < 0.001$), nella Cg1($p < 0.01$), nella CPu ($p < 0.001$), nella NAc core($p < 0.001$), nella NAc shell ($p < 0.05$) e nella BLA ($p < 0.05$) dei topi MAO-A^{neo} rispetto ai topi MAO-A KO.

10 Test comportamentali

10.1 I topi MAO-A^{neo} esibiscono risposte ansiose e compulsive ma una bassa aggressività nel *resident intruder test*

Allo scopo di evidenziare i diversi aspetti della reattività emozionali nei topi WT, MAO-A^{neo} e MAO-A KO le loro risposte comportamentali sono state valutate in diversi test. Nel *novel open field*, sia i topi MAO-A^{neo} che i topi MAO-A KO hanno mostrato, durante tutti i tre giorni di esperimento, una significativa riduzione dell'attività locomotoria in confronto agli equivalenti WT (Fig. 17B) ($P < 0.001$, ANOVA), sebbene i MAO-A KO percorrano distanze maggiori rispetto ai MAO-A^{neo} ($P < 0.05$, Tukey's). I MAO-A^{neo} esibiscono rispetto agli altri genotipi, un aumento dei comportamenti ansiosi, come dimostrato dalla riduzione del tempo trascorso nel quadrante centrale ($P < 0.05$) (Fig. 17C) dall'attività motoria ($P < 0.001$) (Fig. 17D) e dal numero di entrata nel quadrante centrale dell'arena ($P < 0.001$). Le performance locomotorie dei MAO-A^{neo} sono caratterizzate da un significativo aumento nella "tortuosità", nel *meandering* e del continuo *counter-clockwise turning* (Fig. 17E,F) rispetto agli animali WT e MAO-A KO.

In contrasto al potenziamento della tigmotassi dimostrata nel paradigma dell'*open-field*, i MAO-A^{neo} non manifestano una significativa alterazione del tempo trascorso e del numero di entrate nei bracci aperti dell'*elevated plus maze* (dati non mostrati), in modo simile ai topi WT e MAO-A KO.

Successivamente abbiamo testato i topi MAO-A^{neo} con il *marble burying* e il *grooming* indotto dal *water-mist*, due validi modelli di comportamenti compulsivi. I MAO-A^{neo} hanno esibito maggiori comportamenti di *marble-burying* (Fig. 17G) e di *digging* (Fig. 17H) rispetto ai WT e ai MAO-A KO ($P < 0.001$). Analogamente, mentre tra i tre genotipi non è stata osservata alcuna differenza nell'attività basale di *grooming*, il *water mist* ha

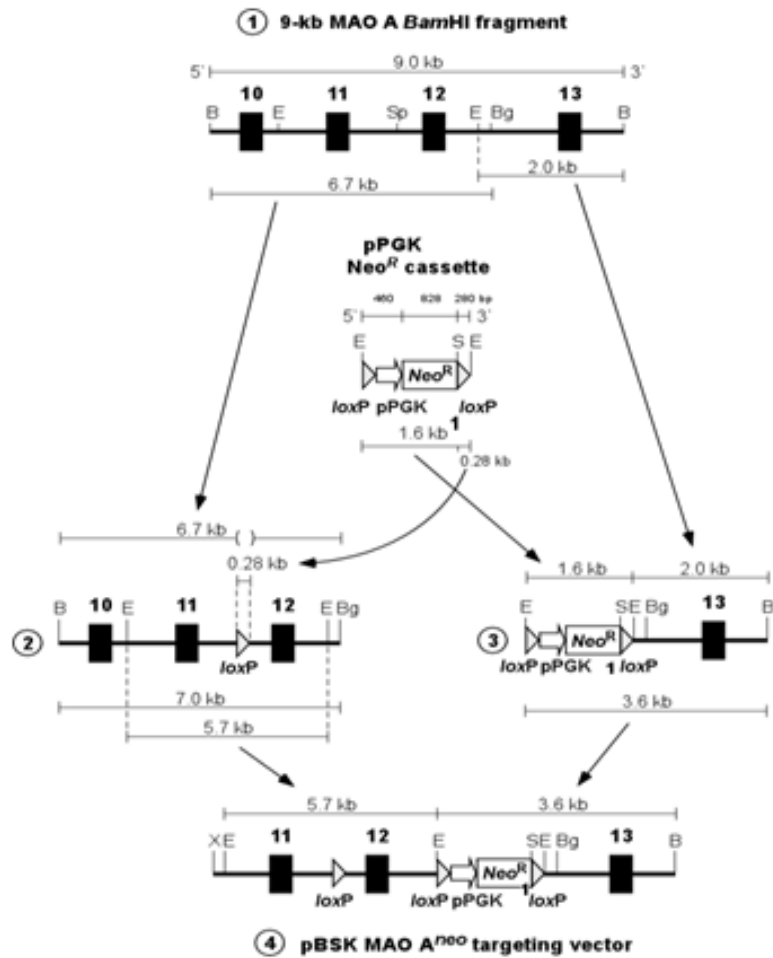
indotto nei MAO-A^{neo} un significativo aumento degli episodi di *grooming bouts* (Fig. 17I) ($P < 0.05$) e della loro durata (Fig. 17J) ($P < 0.01$), rispetto ai topi WT e MAO-A KO.

Nel test del *resident-intruder*, i topi MAO-A^{neo} generalmente, non mostrano nei primi cinque minuti di osservazione un atteggiamento di lotta e hanno un periodo di latenza media di attacco di circa 425.30 ± 60.53 s. In particolare, queste misure sono significativamente più alte rispetto agli altri due genotipi (Fig. 17K) ($P < 0.001$, Kruskal-Wallis). Il post-hoc rivela una significativa differenza tra MAO-A^{neo}, WT ($P < 0.05$, Nemenyi's) e MAO-A KO. Inoltre, i topi MAO-A^{neo} mostrano una significativa più bassa frequenza (Fig. 17L) ($P < 0.001$, ANOVA; Tukey's test) e durata (Fig. 17M) ($P < 0.001$; ANOVA; Tukey's test) dell'atteggiamento di lotta rispetto ai conspecifici. Durante il test non è stata rilevata nessuna differenza sull'attività locomotoria, escludendo così la possibilità di artefatti sperimentali.

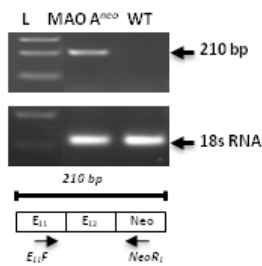
10.2 La fluoxetina migliora l'ansia e i comportamenti compulsivi nei MAO-A^{neo}

L'anormale comportamento dei topi MAO-A^{neo} nell'*open-field* è stata normalizzato dalla fluoxetina, il più comune bloccante del trasportatore 5-HTT comunemente utilizzato nei trattamenti dell'OCD (Fig. 18A). In particolare, la fluoxetina aumenta il tempo e la relativa distanza dal centro nei MAO-A^{neo} ($P < 0.001$ rispetto ai MAO-A^{neo} trattati con salina) (Fig. 18C-D), senza compromettere l'attività motoria (Fig. 18B). Lo stesso trattamento elimina la locomozione "tortuosa" nell'*open-field* ($P < 0.05$, ANOVA) (Fig. 18E), il *marble-burying* e l'attività *digging* ($P < 0.01$, 2 way ANOVA, Turkey's test) (Fig. 18G-I) e il *grooming* indotto dal *water mist* nei MAO-A^{neo} ($p < 0.05$; 2 way ANOVA, Turkey's test) (Fig. 18J-K).

Fig. 9



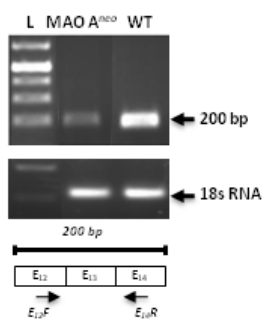
B



C

MAO A exon 11	372 K I C E L Y A K V L G S Q E A L S GG AAA ATC TGT GAG CTG TAT GCC AAA GTT CTG GGA TCT CAA GAA GCT TTA TCT
MAO A exon 12	428 P V H Y E E K N W C E E Q Y S G G C CCC GTC CAT TAT GAA GAG AAG AAC TGG TGT GAG GAG CAG TAC TCC GGG GGC TGC
pPGK1 promoter	A G R D K W K - GCA GGA COT GAC AAA TGG AAG TAG CAC GTC TCA CTA GTC TGG TGC AGA TGG ACA

D



E

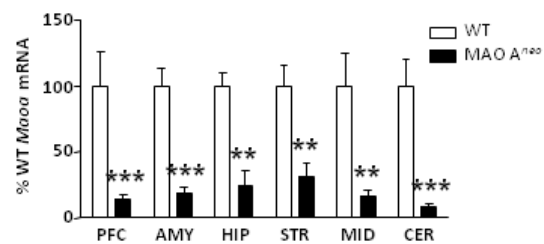


Figura 9. Generazione dei topi MAO A^{neo} e caratterizzazione dei loro trascritti.

(A) Costruzione del vettore *target* per i MAO A^{neo}. **1)** Frammento-Bam HI di 9kb della MAO-A costituito da un frammento BamHI-BglII di 6.7 kb e di un frammento EcoRI-Bam HI di 2.0 kb. I siti unici SphI ed EcoRI, localizzati rispettivamente nell'introne 11 e 12, sono stati usati per l'inserzione delle cassette loxP e Neo^R. **2)** il frammento di 0.28 kb Smal-loxP-EcoRI è stato inserito nel sito SphI del frammento Bam HI-BglII di 6.7 kb. **3)** Una cassetta di 1.6 kb EcoRI floxed Neo^R è stata legata in direzione 5' ad un frammento di 2.0 kb EcoRI contenente l'esone 13. **4)** Un frammento di 5.7kb EcoRI-Bam HI contenente l'esone11-loxP-esone12 è stato clonato in direzione 5' al frammento 3.6kb floxed Neo-esone 13 per completare il vettore *target* **(B)** LA PCR dell'mRNA dei MAO A^{neo} mostra la presenza di un frammento di 210 bp, che contiene l'esone 11,12 e il costrutto PGK1 Neo. Questo frammento è assente nei topi omologhi WT. **(C)** Sequenza del frammento PCR di 210-bp e la sua dedotta sequenza di amino acidi. **(D)** L'uso dei primers Ex12F e Ex14R nei campioni di topo MAO A^{neo} mostrano piccole quantità di prodotti di 200 bp, rappresentanti l'mRNA Maa WT nei topi MAO A^{neo}. **(E)** Quantificazione dei livelli di mRNA Maa WT in differenti aree cerebrali dei topi MAO A^{neo}. I valori sono rappresentati come media ± SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ rispetto ai topi WT. Abbrev: B, BamHI; Bg, Bgl II; E, EcoRI; S, Smal; Sp, Sph I; X, XhoI; PFC, corteccia prefrontale; AMY, amigdala; HIP, ippocampo; STR, striato; MID, mesencefalo; CER, cervelletto.

Fig. 10

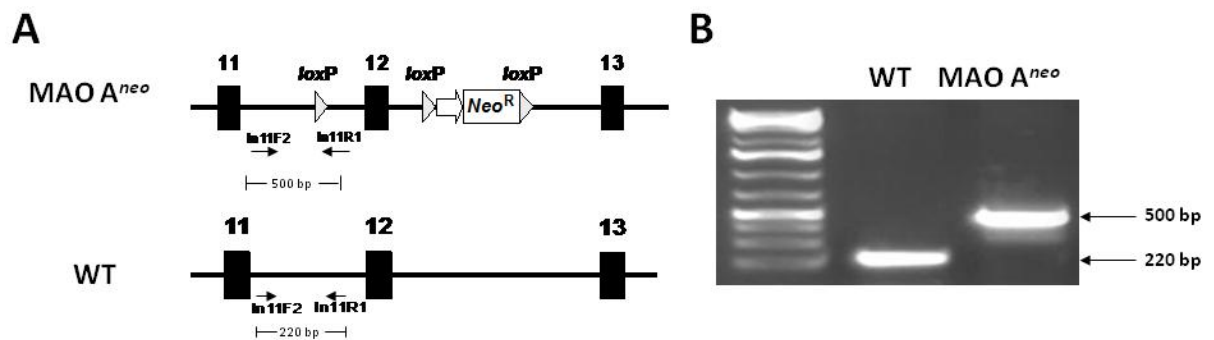


Figura 10. Identificazione della MAO-A contenente i siti loxP nei topi MAO-A^{neo}

Allo scopo di ottenere i topi MAO-A^{neo} i topi maschi chimera MAO-A^{neo} sono stati incrociati con topi femmine wild-type (WT). (A) La verifica della trasmissione dell'omologo ricombinante MAO-A contenente i siti loxP nell'introne 11 è effettuata tramite PCR utilizzando i primers In11F2 e In11R1. Il *template* utilizzato è il DNA genomico della prole della generazione F1. (B) Le bande dei prodotti di PCR sono rispettivamente di 500 bp e 220 bp per i topi WT e MAO-A^{neo}

Fig. 11

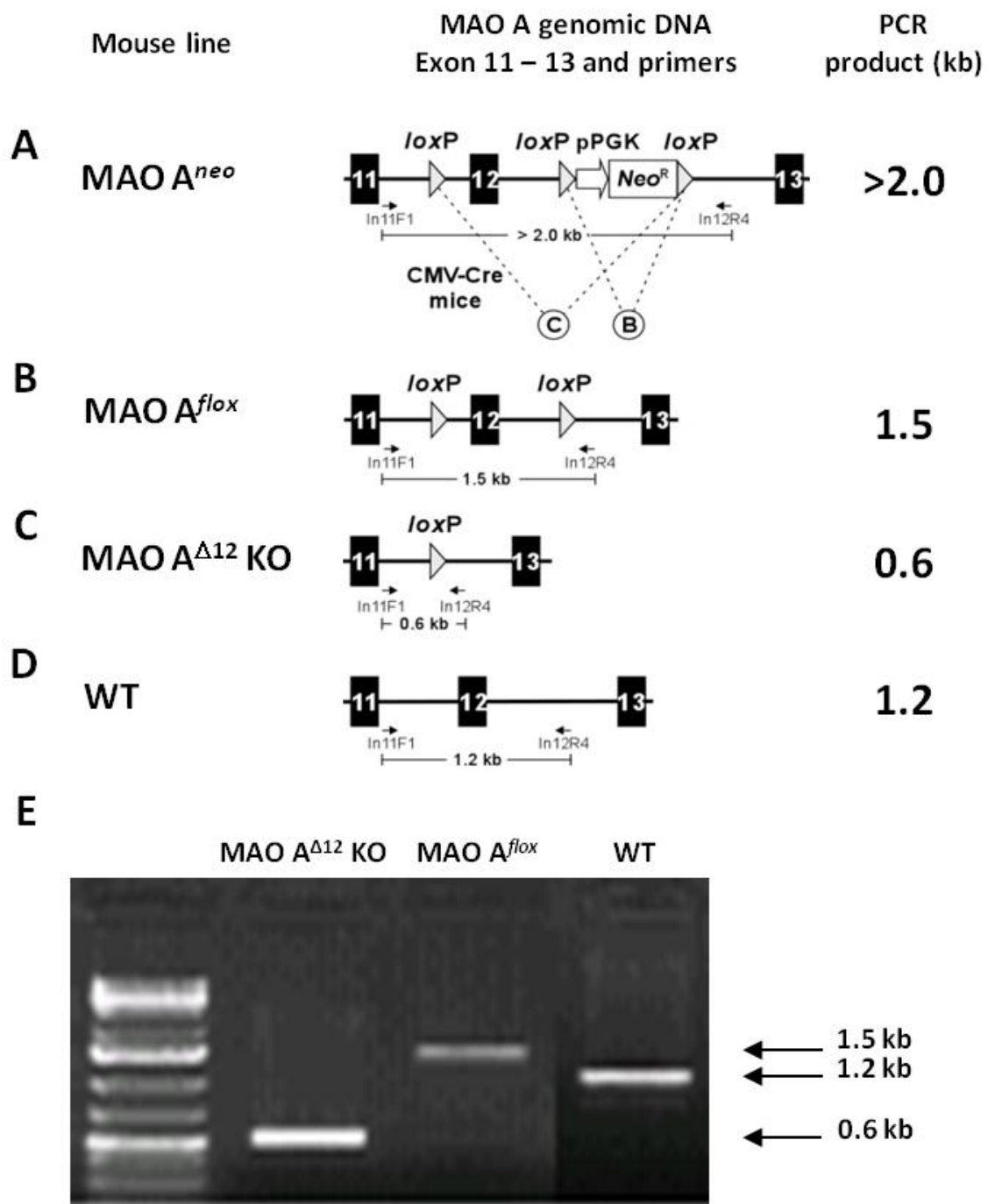


Figura 11. Disegno schematico della generazione dei topi transgenici MAO-A tramite il *breeding* selettivo dei topi MAO-A^{neo} con i topi CMV-Cre.

(A) Il *breeding* selettivo dei topi MAO-A^{neo} con i topi CMV-Cre determina la delezione della cassetta Neo^R e la generazione di due linee mutanti dovuta alla ricombinazione random dei tre siti loxP. (A) topi MAO-A^{neo}, (B) MAO-A^{flox} (C) MAO-A^{Δ12} KO. I MAO-A^{flox} e i MAO-A^{Δ12} KO sono identificati tramite PCR utilizzando come *template* il DNA genomico ottenuto dalla coda e i primers In11F1 e In12R4. (E) I prodotti di PCR di 1.5 kb e 0.6 kb sono stati identificati rispettivamente per i MAO-A^{flox} e i MAO-A^{Δ12} KO. Il frammento di 1.2 kb ottenuto dai topi WT è utilizzato come controllo.

Fig. 12

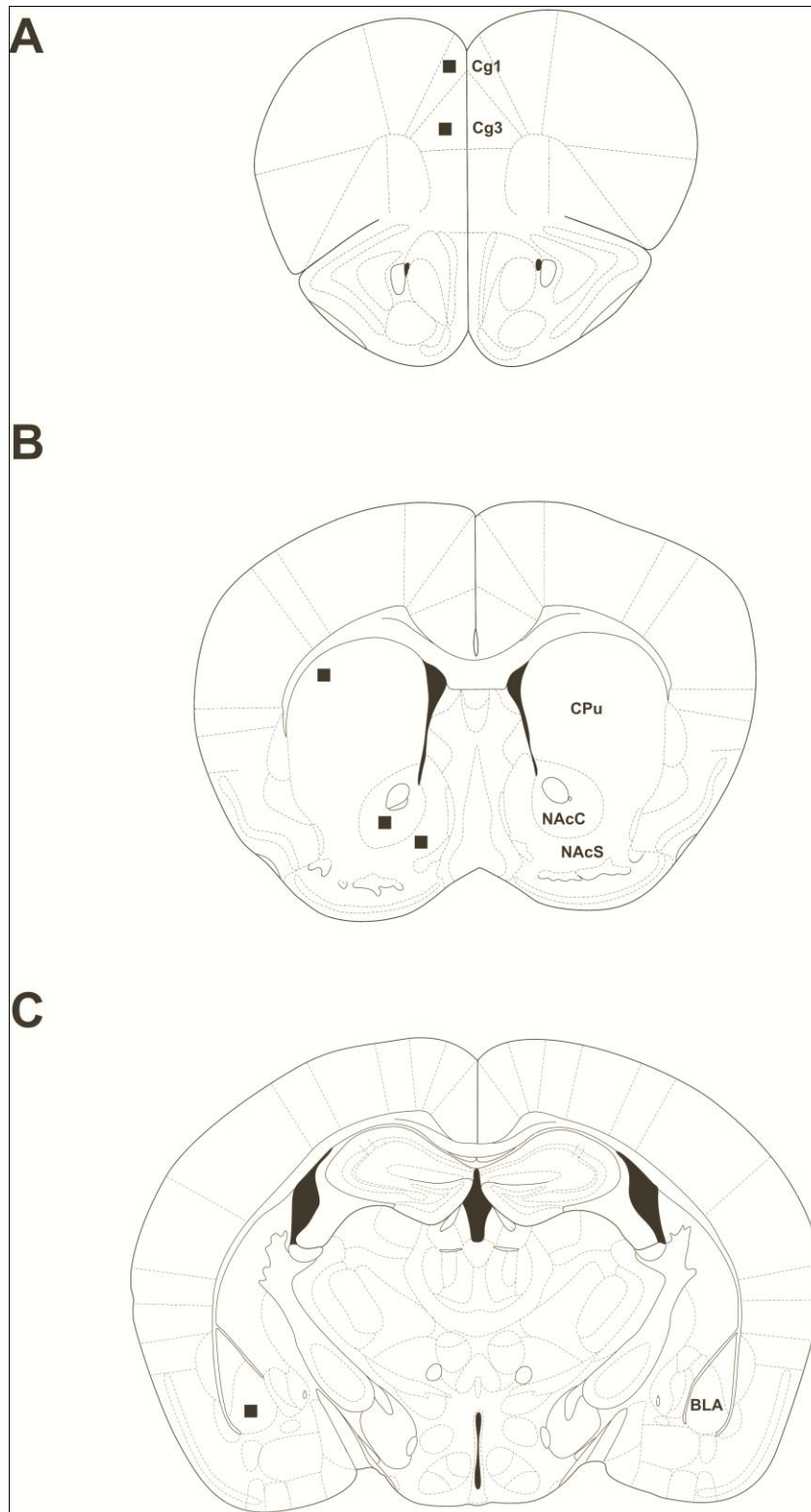


Figura 12. Rappresentazione schematica (Paxinos and Watson, 1997) della corteccia prefrontale (PFC) A), del caudato putamen B), e dell'ippocampo (Hipp) C). I riquadri indicano l'area analizzata per l'immunolocalizzazione dell SERT. Cg3 e Cg1: area 3 e 1 della corteccia cingolata (AP+3.2); CPu: caudato putamen, NAc:nucleo accumbens; NAcC: core; NAcS: shell (AP+1); le regioni CA1, CA2, CA3: regioni 1, 2 e 3 del Corno di Ammone; DG: giro dentato dell'ippocampo; BLA: nucleo amigdaloido basolaterale (AP-2.8).

Fig. 13

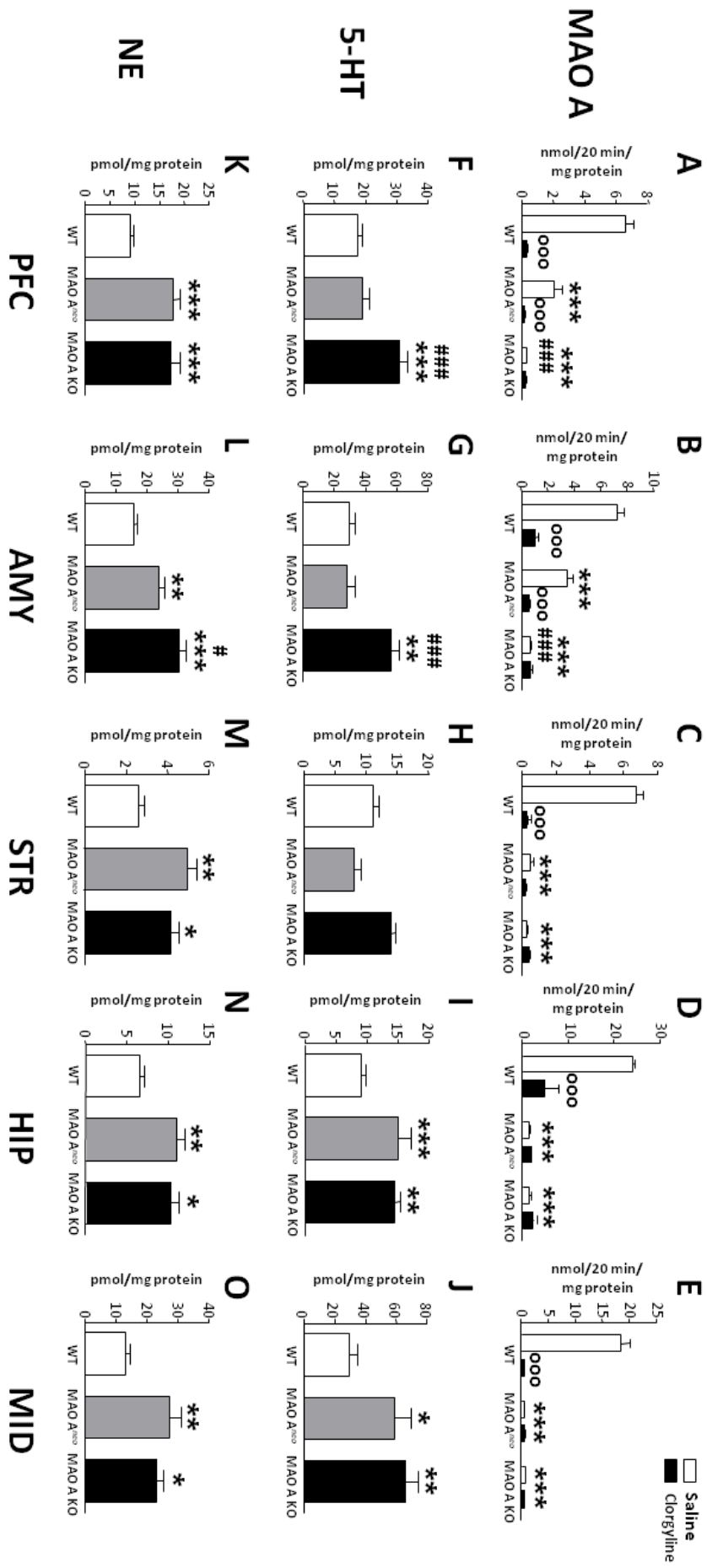


Figura 13. Livelli dell' attività della MAO-A, della 5-HT e della NE nelle diverse aree cerebrali dei topi WT, MAO A^{neo} e MAO A KO. (A-E) I MAO A^{neo} mostrano una diminuzione dei livelli della MAO-A in tutte le regioni cerebrali analizzate, ma livelli più alti rispetto a quelli dei MAO-A KO nella corteccia prefrontale e nell'amigdala. La clorgilina (10 mg/kg, i.p.) riduce l'attività MAO-A in tutte le regioni cerebrali (F-J) I topi MAO A^{neo} esibiscono livelli di 5-HT simili a quelli presenti nella corteccia prefrontale, nell'amigdala e nello striato dei WT, ma livelli maggiori nell'ippocampo e nel mesencefalo. (K-O) Livelli della NE nei tre genotipi. I valori rappresentano la media \pm SEM. n=6-7. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ rispetto ai WT. °°°, $P < 0.001$ rispetto ai topi trattati con salina; # $p < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $p < 0.001$ rispetto ai topi MAO A^{neo}. Abbrev: 5-HT, serotonina; NE, norepinefrina; PFC, corteccia prefrontale AMY, amigdala; HIP, ippocampo; STR, striato; MID, mesencefalo; SAL, salina; CLO, clorgyline.

Fig. 14

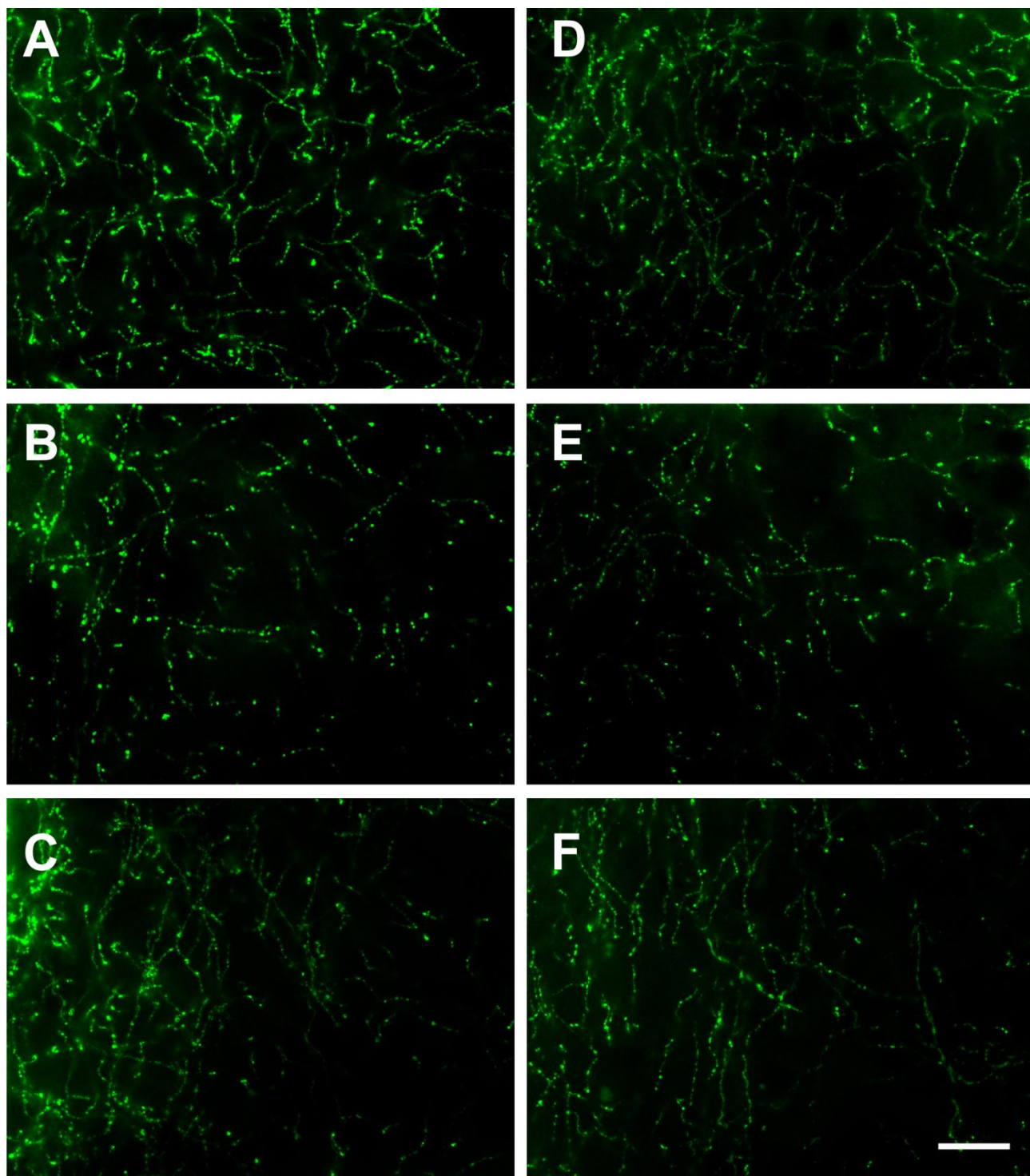


Figura 14. 5-HTT immunofluorescenza nella Cg3 e Cg1 dei topi wild-type, MAO A^{neo} e MAO-A KO.

A,D: 5-HTT-immunoreattività (IR) delle aree Cg1 e Cg3 che esibiscono il tipico pattern delle fibre serotonergiche nei topi wild-type. Notare la diminuzione della 5-HTT-IR nella Cg1 (**B**) e Cg3 (**E**) dei topi MAO A^{neo} rispetto ai topi wild-type. Nella Cg1 (**C**) e nella Cg3 dei MAO-A KO (**F**) si osserva una significativa riduzione dell'IR-5-HTT rispetto ai MAO A^{neo} (**B**) e ai wild-type (**A**). Scale bar: 20 μ m.

Fig. 15

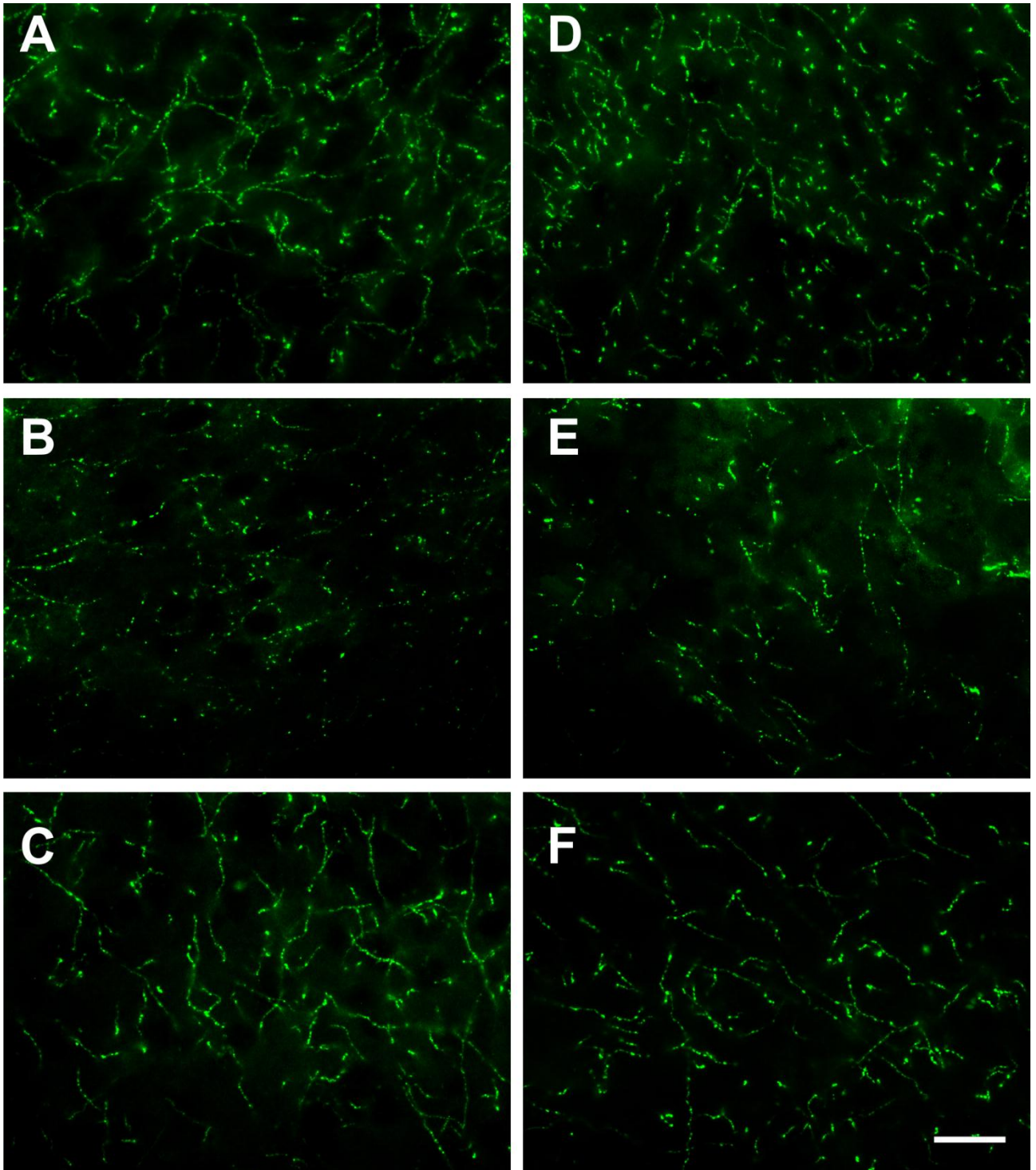


Figura 15. 5-HTT immunofluorescenza nel nucleus accumbens core (NAc Core) e nei nuclei dell'amigdala basolaterale (BLA) dei topi MAO-A^{neo}, MAO-A KO e wild-type.

A, D: Il NAc Core e la BLA esibiscono una densa 5-HTT-immunoreattività nei topi wild-type. Una diminuzione significativa dell'immunofluorescenza si osserva nel Nac Core e nella BLA dei MAO A^{neo} (**B,E**) e MAO-A KO (**C,F**) rispetto ai topi wild-type. Inoltre i MAO^{neo} mostrano una ridotta 5-HTT-IR nel Nac Core e nella BLA rispetto ai MAO-A KO. Scale bar: 20 μ m.

Fig. 16

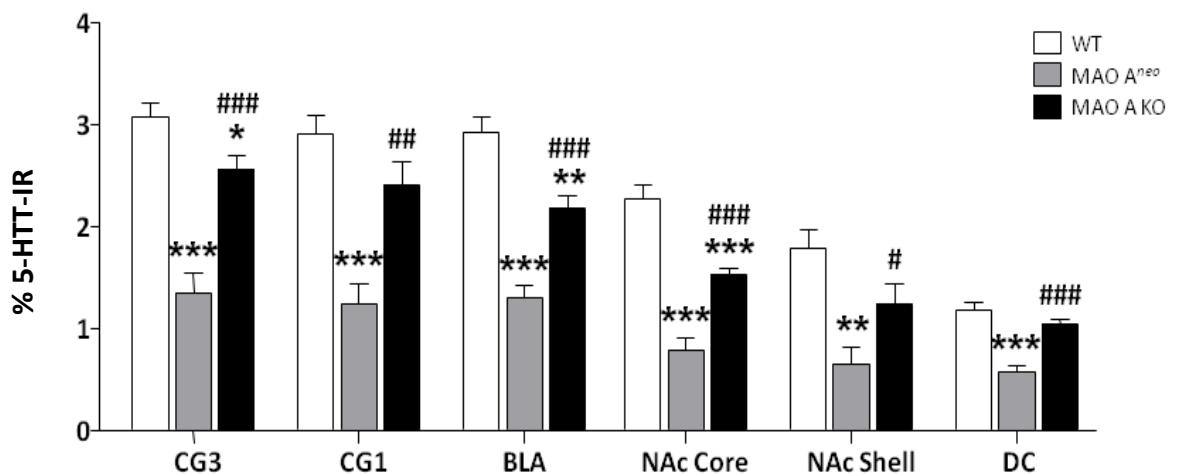


Figura 16. I topi MAO A^{neo} mostrano una ridotta immunoreattività (IR) della 5-HTT in diverse aree cerebrali.

Percentuale delle fibre 5-HTT IR nell'area Cingolata 3 (Cg3), nell'area Cingolata 1 (Cg1), nell'amigdala basolaterale (BLA), nel Nucleo Accumbens (NAc) core e shell e nel caudato dorsale (DC) nei topi WT, MAO A^{neo} e MAO-A KO. I valori rappresentano la media \pm SEM delle densità ottiche (sei immagini non sovrapposte per ciascuna regione per ciascun animale) espresse come percentuale dell'area ricoperta dalle fibre 5-HTT immunoreattive (animali, n= 6-7). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 comparati ai topi WT e #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001 comparati ai topi MAO A^{neo}.

Fig. 17

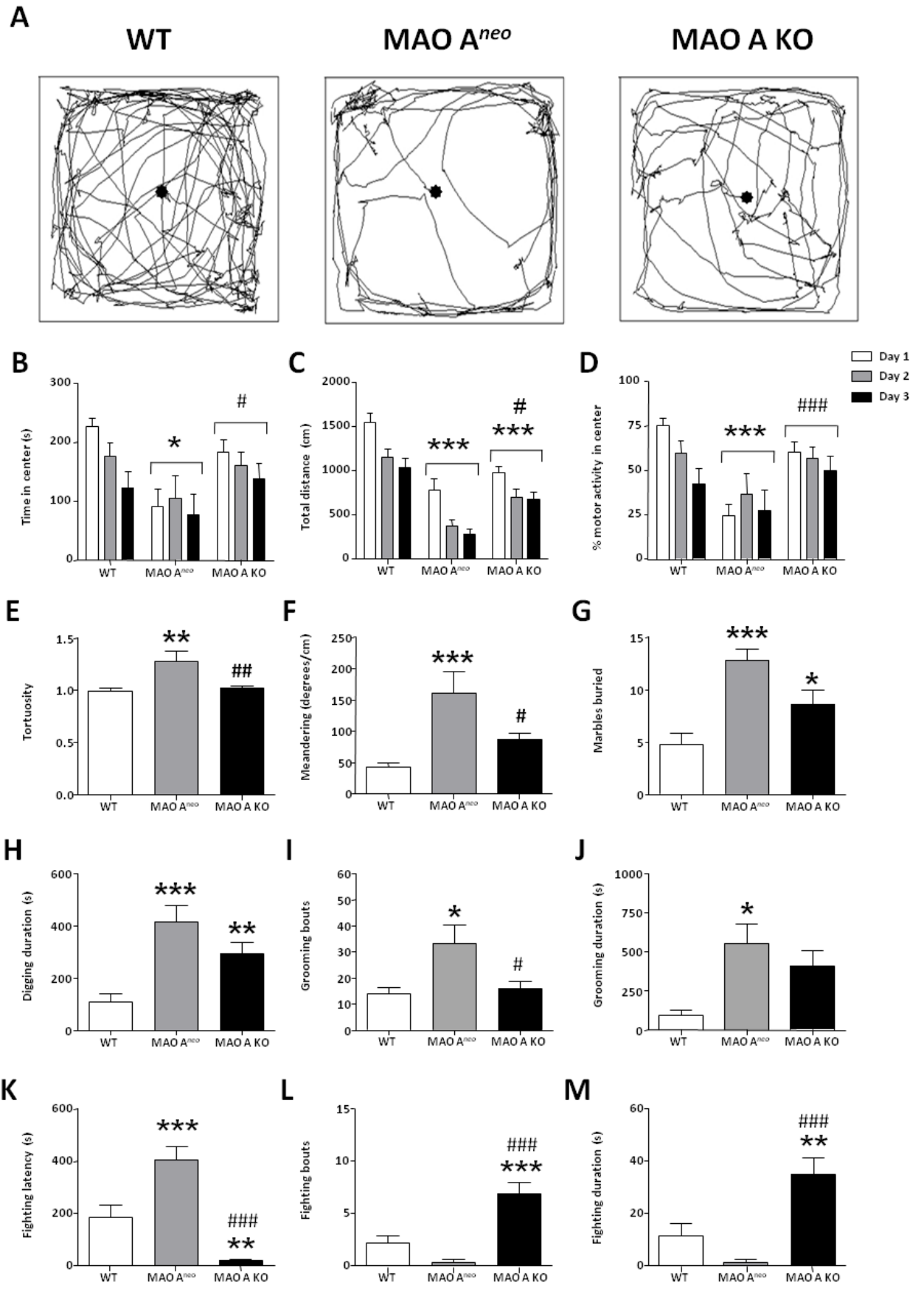


Figura 17. I topi MAO A^{neo} mostrano uno spettro unico di alterazioni emozionali. (A) *Pathway* percorso dai topi WT, MAO-A^{neo}, e MAO-A KO nell'*open field*. (B) I topi MAO A^{neo} trascorrono rispetto ai WT e ai MAO-A KO un tempo minore nel quadrante centrale dell'*open field* (C) Sebbene i MAO-A^{neo} come si vede nel pannello (D) mostrino una significativa riduzione dell'attività locomotoria, questa diminuzione non influisce sul comportamento timotassico; infatti la percentuale di attività locomotoria nella zona centrale è significativamente ridotta nei topi MAO-A^{neo} rispetto ai loro omologhi. Inoltre, i topi MAO A^{neo} mostrano nell' *open field* un significativo aumento nella tortuosità (E) e nel (F) *meandering*. Inoltre i MAO-A^{neo} rispetto agli altri due genotipi esibiscono una maggior attività di *marble-burying* (G), di digging (H), così come un'aumento del grooming (I-J) nel *water mist*. I topi MAO-A^{neo} mostrano un significativo aumento del tempo di latenza di attacco verso l'intruso (K) rispetto ai WT e ai MAO-A KO. Inoltre, i topi MAO A^{neo} manifestano una significativa riduzione degli attacchi e della durata dei suddetti attacchi rispetto ai MAO-A KO. I valori rappresentano la media \pm SEM. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 comparati ai topi WT e #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001 rispetto ai topi MAO-A^{neo}

Fig. 18

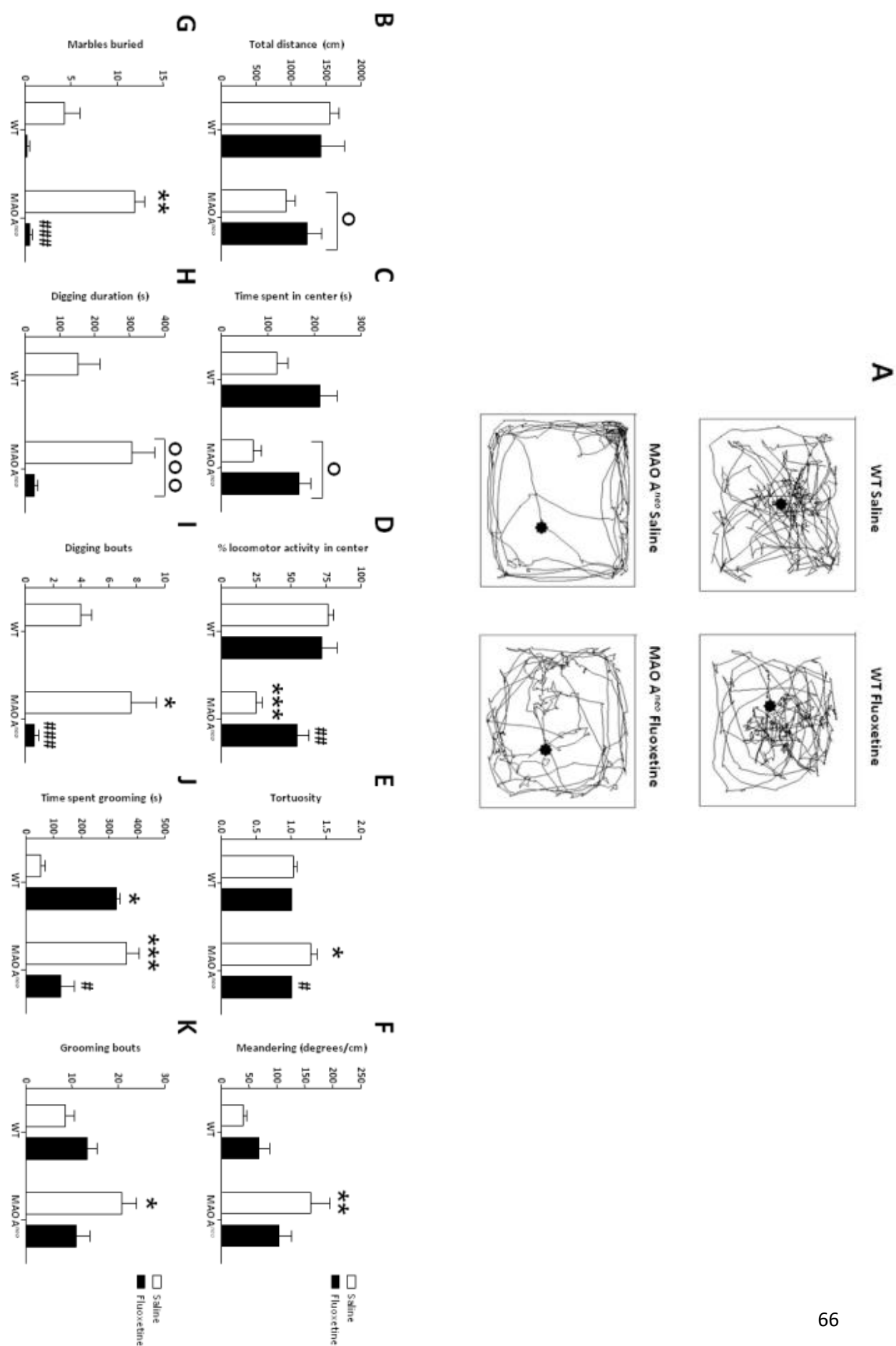


Figura 18. I tratti OCD-simili nei MAO-A^{neo} sono attenuati dal trattamento con la fluoxetina. **A)** *Patterns* locomotori nell'*open field* in seguito alla somministrazione della fluoxetina. Sebbene in entrambi i genotipi **(B)** l'attività locomotoria rimanga inalterata dal trattamento con la fluoxetina, i topi MAO-A^{neo} rispetto ai WT presentano una riduzione significativa della locomozione e del tempo **(C)** trascorso al centro. Al contrario, il trattamento con la fluoxetina aumenta significativamente **(D)** la percentuale di attività locomotoria nel centro e attenua il comportamento stereotipato della timotassi **(E)**, ma non del *meandering* **(F)** nei MAO-A^{neo}. Il blocco del 5-HTT riduce significativamente i comportamenti perseverativi di marble burying di **(G)**, **(H-I)** *digging* **(H-I)**, e *grooming* **(J-K)** nei topi MAO A^{neo}. I valori rappresentano la media ± SEM. °*P*<0.05 e °°°*P*<0.001 rispetto ai WT (effetto principale per genotipo). **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 rispetto ai WT e #*P*<0.05, ##*P*<0.01, ###*P*<0.001 rispetto ai MAO-A^{neo}.

Discussione e conclusioni

Nel presente lavoro è stata prodotta e studiata una nuova linea di topi transgenici, caratterizzati da una variante ipomorfica della MAO-A (MAO-A^{neo}), che presenta un ampio spettro di manifestazioni comportamentali e di alterazioni neurochimiche, riconducibili a quelle presenti in pazienti affetti da OCD, ma perfettamente distinguibili da quelle osservate nei topi MAO-A KO. I topi MAO-A^{neo} esibiscono un insieme unico di anormali comportamenti perseverativi ed emozionali presenti in modelli animali ben validati dell' OCD. L'isomorfismo di questi disturbi, la presenza dei sintomi patognomici dell' OCD e la loro sensibilità alla fluoxetina, terapia di elezione per tale disturbo, fornisce un convincente criterio di *face e predictive validity*, a favore dei topi MAO-A^{neo}, quale modello animale attendibile dell' OCD. I topi MAO-A^{neo} esibiscono, rispetto ai MAO-A KO, una riduzione delle reazioni aggressive nel paradigma del *resident-intruder*.

Le alterazioni comportamentali dei topi MAO-A^{neo} sono accompagnate da modificazioni neurochimiche quali: bassi livelli del mRNA *Maoa wild type* e di attività enzimatica della MAO-A nel cervello, livelli normali di 5-HT e ridotta espressione del trasportatore della 5-HT (5-HTT) nell'amigdala e nella corteccia prefrontale. Al contrario, hanno un profilo biochimico simile ai MAO-A KO nell'ippocampo e nel mesencefalo.

Nel loro insieme questi risultati convalidano e complementano precedenti evidenze cliniche che indicano una possibile associazione tra le varianti polimorfiche della MAO-A, una bassa attività della MAO-A, e lo svilupparsi dell'OCD (Camarena, 2001; Kim, 2006). Inoltre, i nostri risultati suggeriscono che gli effetti indotti dai bassi livelli di MAO-A nella fisiopatologia dell'OCD potrebbero essere mediati da un alterata regolazione

della neurotrasmissione 5-HTergica e del *reuptake* della 5-HT in specifiche aree del proencefalo. E' peraltro noto che modificazioni della trasmissione 5-HTergica possano essere implicate nelle manifestazioni dei sintomi dell'OCD (Reimold, 2007; Meerson, 2010).

In linea con precedenti evidenze sperimentali (Barrow, 1996; Lewandoski, 2001; Manley, 2001; Rucker, 2000), la presenza di una cassetta NEO^R nell'introne del gene *Maoa* induce un'alterazione dello *splicing* del mRNA e ridotti livelli di trascritti funzionali. In particolare, il sequenziamento suggerisce che la presenza del promotore PGK1 nella cassetta Neo^R possa interagire con lo spliceosoma, interferendo con il riconoscimento dell'esatta sequenza che intercorre tra l'esone 12 e l'introne 12 del gene *Maoa*. Questa alterazione post-trascrizionale produce una variante MAO-A chimerica non funzionale, con una sequenza C-terminale tronca che la rende così incapace di ancorarsi alla membrana esterna dei mitocondri (Rebrin, 2001). Tuttavia, quantità minime di trascritti *Maoa*, non vanno incontro allo *splicing* aberrante, inducendo in tutto il cervello una bassa espressione di trascritti funzionali. Sebbene la scarsa selettività e sensibilità degli anticorpi anti-mouse MAO-A disponibili non abbia permesso di valutare nelle varie aree cerebrali, l'espressione della proteina, una bassa attività enzimatica della MAO-A è stata rivelata nell'amigdala e nella corteccia prefrontale degli animali MAO-A^{neo}. La discrepanza tra la presenza del mRNA della MAO-A e l'assenza di attività dell'enzima nelle altre regioni cerebrali dei topi MAO-A^{neo} probabilmente riflette la possibilità che i livelli dell'enzima siano al di sotto della soglia di rilevamento della metodica utilizzata. La diversa presenza di trascritti MAO-A e di attività dell'enzima nelle differenti regioni cerebrali sembra inoltre indicare la differente abilità di ciascuna area cerebrale di modulare i processi di *splicing* e trascrizione, probabilmente modulati dallo specifico ambiente neurochimico (Battaglia, 2005; Meshorer, 2005). Quest'ultima ipotesi è

particolarmente intrigante, in considerazione del ruolo svolto dagli stress ambientali nella modulazione funzionale dell'amigdala e della corteccia prefrontale.

L'espressione di una modesta quantità di enzimi MAO-A funzionali nell'amigdala e in minor misura nella corteccia prefrontale induce la produzione di livelli normali di 5-HT in entrambe le aree cerebrali.

Inoltre, i livelli di NE nell'amigdala, benché significativamente più alti rispetto ai topi WT, sono più bassi rispetto a quelli dei topi MAO-A KO. L'impatto che piccole quantità di MAO-A esercitano sulla NE è probabilmente più limitato rispetto a quello esercitato sulla 5-HT, sia per la più bassa affinità della NE per la MAO-A, sia per l'importante ruolo delle COMT nella degradazione della NE.

E' interessante notare che i MAO-A^{neo} hanno una marcata *down-regulation* del 5-HTT, trasportatore della 5-HT, nelle stesse aree cerebrali (amigdala, corteccia prefrontale e striato) nelle quali i livelli di 5-HT sono simili a quelli presenti nei topi WT. Inoltre, in linea con precedenti lavori (Evrard, 2002), i MAO-A KO hanno bassi livelli del 5-HTT in specifici compartimenti di ciascuna area cerebrale. La ridotta espressione del 5-HTT potrebbe riflettere un meccanismo omeostatico che si instaura allo scopo di evitare un accumulo della 5-HT, secondario alla diminuita attività della MAO-A nelle terminazioni presinaptiche. I nostri dati non sono in grado di spiegare completamente la maggior diminuzione del 5-HTT nei MAO-A^{neo} rispetto ai MAO-A KO; tuttavia, i presenti dati suggeriscono una maggiore abilità dei MAO-A^{neo} di attivare dei processi compensatori mirati alla modulazione delle concentrazioni della 5-HT a livello delle sinapsi. Alternativamente, la ridotta espressione del 5-HTT presente nei topi MAO-A^{neo} potrebbe rappresentare una diminuzione delle fibre 5-HT; quest'ultima possibilità è peraltro parzialmente messa in discussione dalla normale espressione della triptofano-idrossilasi nei nuclei del raphe dorsale dei tre genotipi (dati non mostrati).

I cambiamenti neurochimici presenti nei topi MAO-A^{neo} sono accompagnati da un insieme di alterazioni comportamentali, ben distinte da quelle che caratterizzano il fenotipo dei MAO-A KO. Nell'*open field* i topi MAO-A^{neo} mostrano una riduzione dell'attività locomotoria e un potenziamento della tigmotassi (indicata da una diminuzione del tempo e della percentuale di attività locomotoria trascorsa nel centro dell'area). Questo comportamento è generalmente interpretato come una rappresentazione di alti livelli di ansia dell'animale (Belzung, 1999; Prut, 2003). Tuttavia questa possibilità nei topi MAO-A^{neo} è parzialmente messa in discussione dalla mancata risposta "ansiogena" nell'*elevated plus maze* (quale la riduzione della durata del tempo trascorso nei bracci aperti e la minore percentuale di ingressi nei medesimi bracci). Alternativamente, il comportamento di *wall-hugging* (tenersi molto vicino alle pareti) osservato in questo genotipo potrebbe parzialmente riflettere un'alterazione generalizzata della loro strategia esplorativa, influenzata probabilmente dalla tendenza ad attuare risposte ripetitive, come dimostrato dalla presenza in questi animali di comportamenti di *meandering* e di *path-tortuosity*. In particolare, è importante sottolineare che le anormali risposte comportamentali dei MAO-A^{neo} nell'*open field* sono simili a quelle notate in altri ben validati modelli murini di OCD (Kalueff, 2010; McGrath, 1999).

Inoltre, i nostri risultati evidenziano livelli divergenti di aggressività tra i topi MAO-A^{neo} e MAO-A KO. Infatti, i MAO-A^{neo} esibiscono una significativa riduzione della durata dei comportamenti offensivi rispetto ai MAO-A KO e un maggiore tempo di latenza agli episodi d'attacco verso i topi *intruders* rispetto ai topi MAO-A KO e WT.

Questa nostra scoperta rappresenta una rilevante eccezione rispetto alle ben documentate associazioni esistenti tra una bassa (o assente) attività della MAO-A e comportamenti antisociali. I presenti dati estendono inoltre i nostri precedenti risultati

che dimostrano come il ripristino della MAO-A nelle regioni proencefaliche normalizzi i livelli locali di monoamine e riduca le aggressioni nei topi MAO-A KO (Chen, 2007).

I topi MAO-A^{neo} manifestano un significativo aumento delle risposte compulsive nel *marble-burying* e nel *water-mist-induced grooming*, due validati modelli comportamentali delle manifestazioni patognomiche legate all'OCD (gesti rituali di *hoarding* e di pulizia) (Hill, 2007; Thomas, 2009). Le anomalie comportamentali osservate nell'*open field* e le risposte perseveranti sono eliminate dalla fluoxetina, evidenziando la validità predittiva dei MAO-A^{neo} quale modello animale di OCD. In accordo con i nostri dati, precedenti studi hanno evidenziato in diversi gruppi di pazienti un'associazione tra bassa attività enzimatica delle varianti polimorfiche MAO-A e l'OCD, riportando anche bassi livelli di espressione del 5-HTT in diverse aree cerebrali di individui affetti da OCD (Camarena, 2001; Kim, 2006; Karayiogou, 1999).

Sebbene la riduzione dei livelli del trasportatore serotoninergico sembri giocare un ruolo nelle anomalie comportamentali osservate nei topi MAO-A^{neo}, gli esatti meccanismi attraverso i quali esso agisce sono elusivi, dal momento che in questi animali il blocco del 5-HTT tramite la fluoxetina inverte gli atteggiamenti OCD-simili. Precedenti dati clinici suggeriscono che la *down regulation* del 5-HTT nei pazienti affetti da OCD potrebbe non essere un principale fattore patologico in questo disturbo, ma piuttosto un fenomeno compensatorio finalizzato ad attenuare l'alterata regolazione dei meccanismi 5-HTergici nell'OCD (Hesse, 2005).

Le alterazioni emozionali e i comportamenti compulsivi evidenziati nei topi MAO-A^{neo} potrebbero essere supportati da modificazioni, specifiche per ciascun area cerebrale, della neurotrasmissione monoaminergica.

In particolare, noi abbiamo dimostrato che l'aumento delle catecolamine non è associato ad un proporzionato incremento dei livelli di 5-HT nella corteccia prefrontale, nell'amigdala e nello striato. Tale squilibrio potrebbe indurre quella serie unica di anomalie comportamentali osservate nei topi MAO-A^{neo}; in maniera concorde, precedenti studi hanno dimostrato che l'OCD è associato ad un alterata interazione tra il sistema 5-HTergico e catecolaminergico nel circuito cortico- limbico.

In alternativa, le alterate risposte dei topi MAO-A^{neo} agli stimoli ambientali ansiogenici potrebbero riflettere selettivi meccanismi regione-specifici. Infatti, sebbene numerosi studi documentino un ruolo predominante della corteccia prefrontale, dello striato e dell'amigdala nella fisiopatologia dell'OCD, altre regioni, quali l'ippocampo ventrale o i nuclei mesencefalici, sembrano svolgere funzioni cruciali nelle risposte ansiose ed emozionali. Infine, le variazioni nella penetranza e nell'espressione della mutazione ipomorfa potrebbero dipendere da numerosi fattori, incluso componenti evolutive ed ambientali; i.e., il trascritto *Maoa*^{neo} chimerico (o la proteina), sebbene non funzionale, potrebbe avere altre funzioni modulatorie, interagendo con altri *targets* molecolari, e modificare il fenotipo indotto dalla deficienza della MAO.

In conclusione, a prescindere dal meccanismo d'azione, il nostro studio fornisce una convincente evidenza a supporto di un collegamento tra bassi valori di MAO-A, compulsività e altre manifestazioni connesse all'OCD. Inoltre, i nostri risultati evidenziano il valore dei topi MAO-A^{neo} quale modello affidabile di OCD. Una descrizione in questo modello dei diversi ruoli, regione-specifici, della MAO-A nella regolazione delle risposte comportamentali potrebbe essere critica nel chiarire il coinvolgimento della MAO-A nell'OCD e in altre malattie correlate, quali la sindrome di Tourette e i disturbi nell'autismo.

Bibliografia

1. Abbruzzese M., Bellodi L., Ferri S., Scarone S. (1995) Frontal lobe dysfunction in schizophrenia and obsessive-compulsive disorder: a neuropsychological study. *Brain Cogn*; 27(2): 202-212.
2. Agatsuma S., Lee M., Zhu H., Chen K., Shih J.C., Seif I. and Hiroi N. (2006) Monoamine oxidase A knockout mice exhibit impaired nicotine preference but normal responses to novel stimuli. *Hum. Mol. Genet.*, 15 : 2721 – 2731.
3. Aghajanian G.K., Graham A.W. and Sheard M.H. (1970) Serotonin-containing neurons in brain: depression of firing by monoamine oxidase inhibitors. *Science*, 169 : 1100 – 1102.
4. Akhondzadeh S., Tavakolian R., Davari-Ashtiani R., Arabgol F., Amini H. (2003) Selegiline in the treatment of attention deficit hyperactivity disorder in children: a double blind and randomized trial. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*;27:841–845.
5. Alia-Klein N., Goldstein R.Z., Kriplani A., Logan J., Tomasi D., Williams B., Telang, F., Shumay, E., Biegan, A., Craig, I.W., Henn, F., Wang, G.J., Volkow, N.D. and Fowler, J.S. (2008) Brain monoamine oxidase A activity predicts trait aggression. *J. Neurosci.* , 28 : 5099 – 5104.
6. Althini S., Bengtsson H., Usoskin D., Soderstrom S., Kylberg A., Lindqvist E. *et al.* (2003) Normal nigrostriatal innervation but dopamine dysfunction in mice carrying hypomorphic tyrosine hydroxylase alleles. *J Neurosci Res*; 72(4): 444-453.

7. Anderson M.C., Hasan F., McCrodden J.M. and Tipton K.F. (1993) Monoamine oxidase inhibitors and the cheese effect . *Neurochem. Res.*, 18 : 1145 – 1149.
8. Andrés A.M., Soldevila M., Navarro A., Kidd K.K., Oliva B . and Bertranpetit J. (2004) Positive selection in MAOA gene is human exclusive: determination of the putative amino acid change selected in the human lineage. *Hum. Genet.*, 115 : 377 – 386.
9. Arai R., Karasawa N., Kurokawa K., Kanai H., Horiike K. and Ito A. (2002) Differential subcellular location of mitochondria in rat serotonergic neurons depends on the presence and the absence of monoamine oxidase type B. *Neuroscience*, 114 : 825 – 835.
10. Asberg M., Traskman L. and Thoren P. (1976) 5-HIAA in the cerebrospinal fluid. A biochemical suicide predictor? *Arch. Gen. Psychiatry*, 33 : 1193 – 1197.
11. Bach A.W.J., Lan N.C., Johnson D.L. , Abell C.W., Bembenek M.E., Kwan S.W. , Seeburg P.H. and Shih J.C. (1988) cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 85 : 4934 – 4938 .
12. Balciuniene J., Emilson L., Oreland L., Pettersson U. and Jazin E.E. (2002) Investigation of the functional effect of monoamine oxidase polymorphisms in human brain . *Hum. Genet.*, 110 : 1 – 7.
13. Barrow J.R., Capecchi M.R. (1996) Targeted disruption of the Hoxb-2 locus in mice interferes with expression of Hoxb-1 and Hoxb-4. *Development*, 122(12): 3817-3828.

14. Battaglia M., Ogliari A.. (2005) Anxiety and panic: from human studies to animal research and back. *Neurosci Biobehav Rev*; 29(1): 169-179.
15. Baxter L.R., Jr., Schwartz J.M., Mazziotta J.C., Phelps M.E., Pahl J.J., Guze B.H. *et al.* (1988) Cerebral glucose metabolic rates in nondepressed patients with obsessive-compulsive disorder. *Am J Psychiatry*; 145(12): 1560-1563.
16. Belzung C. (1999) *Handbook of Molecular Genetic Techniques for Brain and Behavior Research*. Elsevier: Amsterdam,.
17. Birks J., Flicker L.. (2003) Selegiline for alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst. Rev* ;1:CD000442.
18. Black G.C., Chen Z.Y., Craig I.W. and Powell J.F. (1991) Dinucleotide repeat polymorphism at the MAOA locus. *Nucleic Acids Res.*, 19 : 689.
19. Blier P. and de Montigny C. (1985) Serotonergic but not noradrenergic neurons in rat central nervous system adapt to long-term treatment with monoamine oxidase inhibitors. *Neuroscience*, 16 : 949 – 955.
20. Bortolato M., Chen K. and Shih J.C. (2008) Monoamine oxidase inactivation: from pathophysiology to therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 60: 1527 – 1533.
21. Bortolato M., Frau R., Bini V., Luesu W., Loriga R., Collu M. *et al.* (2010) Methamphetamine neurotoxicity increases brain expression and alters behavioral functions of CB(1) cannabinoid receptors. *J Psychiatr Res*.
22. Bortolato M., Frau R., Piras A.P., Luesu W., Bini V., Diaz G. *et al.* (2009) Methamphetamine induces long-term alterations in reactivity to environmental stimuli: correlation with dopaminergic and serotonergic toxicity. *Neurotox Res*; 15(3): 232-245.

23. Bortolato M., Godar S.C., Davarian S., Chen K., Shih J.C. (2009) Behavioral disinhibition and reduced anxiety-like behaviors in monoamine oxidase B-deficient mice. *Neuropsychopharmacology*; 34(13): 2746-2757.
24. Bou-Flores C., Lajard A.M., Monteau R., De Maeyer E., Seif I., Lanoir J. and Hilaire G. (2000) Abnormal phrenic motoneuron activity and morphology in neonatal monoamine oxidase A-deficient transgenic mice: possible role of a serotonin excess. *J. Neurosci.*, 20 : 4646 – 4656.
25. Boylan C.B., Bennett-Clarke C.A., Crissman R.S., Mooney R.D. and Rhoades R.W. (2000) Clorgyline treatment elevates cortical serotonin and temporarily disrupts the vibrissarelated pattern in rat somatosensory cortex. *J. Comp. Neurol.*, 427 : 139 – 149.
26. Brummett B.H., Boyle S.H., Siegler I.C., Kuhn C.M., Surwit R.S., Garrett M.E. *et al.* (2008) HPA axis function in male caregivers: effect of the monoamine oxidase-A gene promoter (MAOA-uVNTR). *Biol Psychol*; 79(2): 250-255.
27. Brunner H.G., Nelen M., Breakefield X.O., Ropers H.H., van Oost B.A. (1993a) Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science*; 262(5133): 578-580.
28. Brunner H.G., Nelen M.R., van Zandvoort P., Abeling N.G., Van Gennip A.H., Wolters E.C., Kuiper M.A., Ropers H.H. and Van Oost B.A. (1993b) X-linked borderline mental retardation with prominent behavioral disturbance: phenotype, genetic localization, and evidence for disturbed monoamine metabolism. *Am. J. Hum. Genet.*, 52 : 1032 – 1039.
29. Buckholtz J.W., Meyer-Lindenberg A. (2008) MAOA and the neurogenetic architecture of human aggression. *Trends Neurosci*; 31(3): 120-129.

30. Burchett S.A. and Hicks T.P. (2006) The mysterious trace amines: protean neuromodulators of synaptic transmission in mammalian brain . *Prog. Neurobiol.*, 79 : 223 – 246.
31. Camarena B., Rinetti G., Cruz C., Gomez A., de La Fuente J.R., Nicolini H. (2001) Additional evidence that genetic variation of MAO-A gene supports a gender subtype in obsessive-compulsive disorder. *Am J Med Genet*, 105(3): 279-282.
32. Cannistraro P.A., Wright C.I., Wedig M.M., Martis B., Shin L.M., Wilhelm S. *et al* (2004) Amygdala responses to human faces in obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry*, 56(12): 916-920.
33. Carlsson M.L. (2001) On the role of prefrontal cortex glutamate for the antithetical phenomenology of obsessive compulsive disorder and attention deficit hyperactivity disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 25(1): 5-26.
34. Carruba M.O., Cuzzolaro M., Riva L., Bosello O., Liberti S., Castra R., Dalle Grave, R., Santonastaso, P., Garosi, V. and Nisoli, E. (2001). Efficacy and tolerability of moclobemide in bulimia nervosa: a placebo-controlled trial. *Intl. Clin. Psychopharmacol.*, 16 : 27 – 32.
35. Cases O., Seif I., Grimsby J., Gaspar P., Chen K., Pournin S., Muller U., Aguet M., Babinet C. and Shih J.C. (1995). Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science*, 268 : 1763 – 1766.

36. Caspi A., McClay J., Moffitt T.E., Mill J., Martin J., Craig I.W. *et al.* (2002) Role of genotype in the cycle of violence in maltreated children. *Science*; 297(5582): 851-854.
37. Cazalets J.R., Gardette M. and Hilaire G. (2000) Locomotor network maturation is transiently delayed in the MAOA-deficient mouse. *J. Neurophysiol.*, 83 : 2468 – 2470.
38. Chen K. (2004) Organization of MAO A and MAO B promoters and regulation of gene expression . *Neurotoxicology* , 25 : 31 – 36.
39. Chen K., Cases O., Rebrin I., Wu W., Gallaher T.K., Seif I. *et al.* (2007) Forebrain-specific expression of monoamine oxidase A reduces neurotransmitter levels, restores the brain structure, and rescues aggressive behavior in monoamine oxidase A-deficient mice. *J Biol Chem*; 282(1): 115-123.
40. Chen K., Holschneider D.P., Wu W., Rebrin I. and Shih J.C. (2004) A spontaneous point mutation produces monoamine oxidase A/B knockout mice with greatly elevated monoamines and anxiety-like behavior. *J. Biol. Chem.*, 279 : 39645 – 39652.
41. Chen K., Ou X.-M., Chen G., Choi S.H. and Shih J.C. (2005) R1, a novel repressor of the human monoamine oxidase A. *J. Biol. Chem.*, 280: 11552–11559.
42. Chen L., He M., Sibille E., Thompson A., Sarnyai Z., Baker H., Shippenberg T., Toth M. (1999) Adaptive changes in postsynaptic dopamine receptors despite unaltered dopamine dynamics in mice lacking monoamine oxidase B. *J. Neurochem*;73:647–655.

43. Chen Z.Y., Denney R.M. and Breakefield X.O. (1995) Norrie disease and MAO genes: nearest neighbors . *Hum. Mol. Genet.*, 4 Spec No : 1729 – 1737.
44. Collins F.A. , Murphy D.L., Reiss A.L., Sims K.B., Lewis J.G., Freund L., Karoum F., Zhu D., Maumenee I.H. and Antonarakis S.E. (1992) Clinical, biochemical, and neuropsychiatric evaluation of a patient with a contiguous gene syndrome due to a microdeletion Xp11.3 including the Norrie disease locus and monoamine oxidase (MAOA and MAOB) genes. *Am. J. Med. Genet.*, 42 : 127 – 134.
45. Consalvi V., Mardh G. and Vallee B.L. (1986) Human alcohol dehydrogenases and serotonin metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 139: 1009 – 1016.
46. Cyr M. and Farrar M.K. (2000) Treatment for posttraumatic stress disorder . *Ann. Pharmacother*, 34 : 366 – 376.
47. Daszuta A., Faudon M. and Hery F. (1984a) In vitro 3Hserotonin (5-HT) synthesis and release in BALBc and C57BL mice. II. Cell body areas. *Brain Res.Bull.*, 12 : 565 – 570.
48. Daszuta A., Hery F. and Faudon M. (1984b) In vitro 3Hserotonin (5-HT) synthesis and release in BALBc and C57BL mice.I. Terminal areas. *Brain Res.Bull.*, 12 : 559 – 563.
49. De Colibus L., Li M., Binda C., Lustig A., Edmondson D.E. and Mattevi A. (2005) Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO A): relation to the structures of rat MAO A and human MAO B . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 12684 – 12689.
50. Denney R.M., Koch H. and Craig I.W. (1999) Association between monoamine oxidase A activity in human male skin fibroblasts and genotype of the MAO-A

- promoter-associated variable number tandem repeat. *Hum. Genet.*, 105:542 – 551.
51. Denys D., van der Wee N., Janssen J., De Geus F., Westenberg H.G. (2004) Low level of dopaminergic D2 receptor binding in obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry*; 55(10): 1041-1045.
 52. Denys D., van der Wee N., van Megen H.J., Westenberg H.G. (2003) A double blind comparison of venlafaxine and paroxetine in obsessive-compulsive disorder. *J Clin Psychopharmacol*; 23(6): 568-575.
 53. Despopoulos A. and Weissbach H. (1957) Renal metabolism of 5-hydroxyindolacetic acid . *Am. J. Physiol.*, 189 : 548 – 550.
 54. Donnelly C.H. and Murphy D.L. (1977) Substrate and inhibitor-related characteristics of human platelet. *Biochem. Pharmacol.*, 26 : 853 – 858.
 55. Dubrovina , N.I. and Zinov'ev , D.R. (2007) [Contribution of GABA receptors in extinction of memory trace in norm and depressive-like state] . *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova* , 93 : 1285 – 1291 .
 56. Edmondson D.E. , Binda C. and Mattevi A. (2007) Structural insights into the mechanism of amine oxidation by monoamine oxidases A and B. *Arch. Biochem. Biophys.*, 464 : 269 – 276 .
 57. Edmondson D.E., Bhattacharyya A.K. and Walker M.C. (1993) Spectral and kinetic studies of imine product formation in the oxidation of p-(N,N-dimethylamino)benzylamine analogues by monoamine oxidase B. *Biochemistry*, 32 : 5196 – 5202.
 58. Erspamer V. Cellule enterocromaffini e cellule argentofile nel pancreas dell'uomo e dei mammiferi. *Z. Ant. Entwickl. Gesh.* (1937) 107 , p. 574.

59. Erzurumlu , R.S. and Jhaveri , S. (1990) Thalamic axons confer a blueprint of the sensory periphery onto the developing rat somatosensory cortex . Brain Res. Dev. Brain Res. , 56 : 229 – 234 .
60. Erzurumlu R.S. and Jhaveri S. (1990) Thalamic axons confer a blueprint of the sensory periphery onto the developing rat somatosensory cortex . Brain Res. Dev. Brain Res., 56 : 229 – 234.
61. Evrard A., Malagie I., Laporte A.M., Boni C., Hanoun N., Trillat A.C. *et al.* (2002) Altered regulation of the 5-HT system in the brain of MAO-A knock-out mice. *Eur J Neurosci*; 15(5): 841-851.
62. Feldstein A. and Williamson O. (1968) 5-Hydroxytryptamine metabolism in rat brain and liver homogenates . Br. J.Pharmacol., 34 : 38 – 42.
63. Filipenko M.L., Beilina A.G., Alekseyenko O.V., Dolgov V.V. and Kudryavtseva N.N. (2002) Repeated experience of social defeats increases serotonin transporter and monoamine oxidase A mRNA levels in raphe nuclei of male mice. *Neurosci. Lett.*, 321 : 25 – 28.
64. Fineberg N.A., Potenza M.N., Chamberlain S.R., Berlin H.A., Menzies L., Bechara A. *et al.* (2010) Probing compulsive and impulsive behaviors, from animal models to endophenotypes: a narrative review. *Neuropsychopharmacology*; 35(3): 591-604.
65. Fornai F., Chen K., Giorgi F.S., Gesi M., Alessandri M.G. and Shih J.C. (1999) Striatal dopamine metabolism in monoamine oxidase B-deficient mice: a brain dialysis study. *J. Neurochem.*, 73 : 2434 – 2440 .
66. Fox H.H. and Gibas J.T. (1953) Synthetic tuberculostats. V. Alkylidene derivatives of isonicotinylhydrazine. *J. Org. Chem.*, 18 : 983 – 989.

67. Gattoni R., Mahe D., Mahl P., Fischer N., Mattei M.G., Stevenin J. *et al.* (1996) The human hnRNP-M proteins: structure and relation with early heat shock-induced splicing arrest and chromosome mapping. *Nucleic Acids Res*; 24(13): 2535-2542.
68. Greenawalt J.W. and Schnaitman C. (1970) An appraisal of the use of monoamine oxidase as an enzyme marker for the outer membrane of rat liver mitochondria . *J. Cell Biol.* , 46 : 173 – 179 .
69. Grimsby J, Chen K, Wang LJ, Lan NC, Shih JC. (1991) Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 1;88(9):3637-41.
70. Grimsby J., Chen K., Wang L.J., Lan N.C. and Shih J.C. (1991) Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon– intron organization . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 88 : 3637 – 3641 .
71. Grimsby J., Toth M., Chen K., Kumazawa T., Klaidman L., Adams J.D. *et al.* (1997) Increased stress response and beta-phenylethylamine in MAOB-deficient mice. *Nat Genet*; 17(2): 206-210.
72. Hare, M.L. (1928) Tyramine oxidase: a new enzyme system in liver . *Biochem. J.*, 22 : 968 – 979.
73. Hasegawa H. ,Nakamura K. (2010).Tryptophan Hydroxylase and Serotonin Synthesis Regulation. *Handbook of the behavioral neurobiology of serotonin*, Elsevier.
74. Hasselbalch S.G., Hansen E.S., Jakobsen T.B., Pinborg L.H., Lonborg J.H., Bolwig T.G. (2007) Reduced midbrain-pons serotonin transporter binding in patients with obsessive-compulsive disorder. *Acta Psychiatr Scand*; 115(5): 388-394.

75. Hesse S., Muller U., Lincke T., Barthel H., Villmann T., Angermeyer M.C. *et al.* (2005) Serotonin and dopamine transporter imaging in patients with obsessive-compulsive disorder. *Psychiatry Res*; 140(1): 63-72.
76. Hill R.A., McInnes K.J., Gong E.C., Jones M.E., Simpson E.R., Boon W.C. (2007) Estrogen deficient male mice develop compulsive behavior. *Biol Psychiatry*; 61(3): 359-366.
77. Hinds H.L., Hendriks R.W., Craig I.W. and Chen Z.Y. (1992) haracterization of a highly polymorphic region near the first exon of the human MAOA gene containing a GT dinucleotide and a novel VNTR motif . *Genomics* , 13 : 896 – 897 .
78. Hollenbeck P.J. and Saxton W.M. (2005) The axonal transport of mitochondria . *J. Cell Sci.* , 118 : 5411 – 5419 .
79. Hotamisligil G.S. and Breakefield X.O. (1991) Human monoamine oxidase A gene determines levels of enzyme activity . *Am. J. Hum. Genet.* , 49 : 383 – 392 .
80. Hsu Y.P., Weyler W., Chen S., Sims K.B., Rinehart W.B., Utterback M.C., Powell J.F. and Breakefield X.O. (1988) Structural features of human monoamine oxidase A elucidated from cDNA and peptide sequences . *J. Neurochem.* , 51 : 1321 – 1324.
81. Huang Y.Y., Cate S.P., Battistuzzi C., Oquendo M.A., Brent D. and Mann J.J. (2004) An association between a functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter, impulsive traits and early abuse experiences . *Neuropsychopharmacology* , 29 : 1498 – 1505.

82. Hubalek F., Binda C., Khalil A., Li M., Mattevi A., Castagnoli N. and Edmondson D.E. (2005) Demonstration of isoleucine 199 as a structural determinant for the selective inhibition of human monoamine oxidase B by specific reversible inhibitors . *J. Biol. Chem.* , 280 : 15761 – 15766 .
83. Ito A. , Kuwahara T. , Inadome S. and Sagara Y. (1988) Molecular cloning of a cDNA for rat liver monoamine oxidase B . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 157 : 970 – 976 .
84. Jacob C.P., Muller J., Schmidt M., Hohenberger K., Gutknecht L., Reif A. *et al.* (2005) Cluster B personality disorders are associated with allelic variation of monoamine oxidase A activity. *Neuropsychopharmacology*; 30(9): 1711-1718.
85. Jacobs B.L. and Azmitia E.C. (1992) Structure and function of the brain serotonin system . *Physiol. Rev.* , 72 : 165 – 229 .
86. Jacobs B.L. and Muller C.P. (2010) Handbook of the behavioral neurobiology of serotonin. Elsevier.
87. Jahng J.W., Houpt T.A., Wessel T.C., Chen K., Shih J.C. and Joh T.H. (1997) Localization of monoamine oxidase A and B mRNA in the rat brain by in situ hybridization . *Synapse*, 25 : 30 – 36.
88. Janssen P.A., Leysen J.E., Megens A.A., Awouters F.H. (1999) Does phenylethylamine act as an endogenous amphetamine in some patients? *Int. J. Neuropsychopharmacol*;2:229–240.
89. Jenike M.A. , Surman O.S. , Cassem N.H. , Zusky P. and Anderson W.H. (1983) Monoamine oxidase inhibitors in obsessive-compulsive disorder. *J. Clin. Psychiatry* , 44 : 131 – 132 .
90. Jimerson D.C.B.W. (1985) Cerebrospinal fluid amine metabolite studies in depression: research update. In: Beckman, H. and Riederer, P. (Eds.),

Pathochemical Markers in Major Psychosis . Springer Verlag , Berlin , pp. 128 – 143 .

91. Johnston J.P. (1968) Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue . *Biochem. Pharmacol.*, 17 : 1285 – 1297 .
92. Jonsson E.G., Norton N., Gustavsson J.P., Orelund L., Owen M.J. and Sedvall, G.C. (2000) A promoter polymorphism in the monoamine oxidase A gene and its relationships to monoamine metabolite concentrations in CSF of healthy volunteers . *J. Psychiatr Res.* , 34 : 239 – 244 .
93. Kalueff A.V., Olivier J.D., Nonkes L.J., Homberg J.R. (2010) Conserved role for the serotonin transporter gene in rat and mouse neurobehavioral endophenotypes. *Neurosci Biobehav Rev*; 34(3): 373-386.
94. Karayiorgou M., Sobin C., Blundell M.L., Galke B.L., Malinova L., Goldberg P. *et al.* (1999) Family-based association studies support a sexually dimorphic effect of COMT and MAOA on genetic susceptibility to obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry*; 45(9): 1178-1189.
95. Kim J.J., Shih J.C., Chen K., Chen L., Bao S. , Maren S., Anagnostaras S.G., Fanselow M.S., De Maeyer E., Seif I. and Thompson R.F. (1997) Selective enhancement of emotional, but not motor, learning in monoamine oxidase A deficient mice . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 94 : 5929 – 5933.
96. Kim S.J, Kim C.H. (2006) The genetic studies of obsessive-compulsive disorder and its future directions. *Yonsei Med J*; 47(4): 443-454.
97. Knoll J. and Magyar K. (1972) Some puzzling pharmacological effects of monoamine oxidase inhibitors . *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* , 5 : 393 – 408.

98. Kontis D., Boulougouris V., Papakosta V.M., Kalogerakou S., Papadopoulos S., Pouloupoulou C *et al.* (2008) Dopaminergic and serotonergic modulation of persistent behaviour in the reinforced spatial alternation model of obsessive-compulsive disorder. *Psychopharmacology (Berl)*; 200(4): 597-610.
99. Kuwahara T., Takamoto S. and Ito A. (1990) Primary structure of rat monoamine oxidase A deduced from cDNA and its expression in rat tissues . *Agric. Biol. Chem.* , 54 : 253 – 257 .
100. Kvetnoy I.M. (1999) Extrapineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system . *Histochem. J.* , 31 : 1 – 12.
101. Lai G.J., McCobb D.P. (2006) Regulation of alternative splicing of Slo K⁺ channels in adrenal and pituitary during the stress-hyporesponsive period of rat development. *Endocrinology*; 147(8): 3961-3967.
102. Lajard A.M. , Bou C. , Monteau R. and Hilaire G. (1999) Serotonin levels are abnormally elevated in the fetus of the monoamine oxidase-A-deficient transgenic mouse . *Neurosci. Lett.* , 261 : 41 – 44 .
103. Lan N.C., Heinzmann C., Gal A. , Klisak I., Orth U., Lai E. , Grimsby J., Sparkes , R.S., Mohandas T. and Shih J.C. (1989b) Human monoamine oxidase A and B genes map to Xp 11.23 and are deleted in a patient with Norrie disease. *Genomics* , 4 : 552 – 559 .
104. Lanoir J. , Hilaire G. and Seif I. (2006) Reduced density of functional 5-HT_{1A} receptors in the brain, medulla and spinal cord of monoamine oxidase-A knockout mouse neonates . *J. Comp. Neurol.* , 495 : 607 – 623 .
105. Lebrand C., Gaspar P., Nicolas D. and Hornung J.P. (2006) Transitory uptake of serotonin in the developing sensory pathways of the common marmoset. *J. Comp. Neurol.* , 499 : 677 – 689.

106. Lee M., Chen K., Shih J.C., Hiroi N. (2004) MAO-B knockout mice exhibit deficient habituation of locomotor activity but normal nicotine intake. *Genes Brain Behav*;3:216–227.
107. Lesch K.P. (2001) Serotonergic gene expression and depression: implications for developing novel antidepressants . *J. Affect. Disord.* , 62 : 57 – 76 .
108. Levitt P., Pintar J.E. and Breakefield X.O. (1982) Immunocytochemical demonstration of monoamine oxidase B in brain astrocytes and serotonergic neurons . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 79 : 6385 – 6389 .
109. Lewandoski M. (2001) Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet*; 2(10): 743-755.
110. Lieske V., Bennett-Clarke C.A. and Rhoades R.W. (1999) Effects of serotonin on neurite outgrowth from thalamic neurons in vitro . *Neuroscience* , 90 : 964 – 967 .
111. Lotto B., Upton L., Price D.J. and Gaspar P. (1999) Serotonin receptor activation enhances neurite outgrowth of thalamic neurones in rodents. *Neurosci. Lett.*, 269: 87 – 90 .
112. Lucki I. (1998) The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol. Psychiatry*;44:151–162.
113. Luque J.M., Kwan S.W., Abell C.W., Da Prada M. and Richards J.G. (1995) Cellular expression of mRNAs encoding monoamine oxidases A and B in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* , 363 : 665 – 680.
114. Maas J.W. Neurochemical differences between two strains of mice. *Science* (1962); 137: 621-622.

115. Mallajosyula J.K., Kaur D., Chinta S.J., Rajagopalan S., Rane A., Nicholls D.G., di Monte D.A., Macarthur H., Andersen JK. (2008) MAO-B elevation in mouse brain astrocytes results in parkinson's pathology. *PLoS ONE*;3:e1616.
116. Manley N.R., Barrow J.R., Zhang T., Capecchi M.R. (2001) Hoxb2 and hoxb4 act together to specify ventral body wall formation. *Dev Biol*; 237(1): 130-144.
117. Manuck S.B., Flory J.D., Ferrell R.E., Mann J.J., Muldoon M.F. (2000) A regulatory polymorphism of the monoamine oxidase-A gene may be associated with variability in aggression, impulsivity, and central nervous system serotonergic responsivity. *Psychiatry Res*; 95(1): 9-23.
118. McGrath M.J., Campbell K.M., Veldman M.B., Burton F.H. (1999) Anxiety in a transgenic mouse model of cortical-limbic neuro-potentiated compulsive behavior. *Behav Pharmacol*; 10(5): 435-443.
119. Meerson A., Cacheaux L., Goosens K.A., Sapolsky R.M., Soreq H., Kaufman D. (2010) Changes in brain MicroRNAs contribute to cholinergic stress reactions. *J Mol Neurosci*; 40(1-2): 47-55.
120. Mehlman P.T., Higley J.D., Faucher I., Lilly A.A., Taub D.M., Vickers J., Suomi S.J. and Linnoila M. (1994) Low CSF 5-HIAA concentrations and severe aggression and impaired impulse control in nonhuman primates . *Am. J. Psychiatry* , 151 : 1485 – 1491 .
121. Mejia J.M., Ervin F.R., Baker G.B. and Palmour R.M. (2002) Monoamine oxidase inhibition during brain development induces pathological aggressive behavior in mice . *Biol. Psychiatry* , 52 : 811 – 821 .

122. Meshorer E., Bryk B., Toiber D., Cohen J., Podoly E., Dori A. *et al.* (2005) SC35 promotes sustainable stress-induced alternative splicing of neuronal acetylcholinesterase mRNA. *Mol Psychiatry*; 10(11): 985-997.
123. Meyer-Lindenberg A., Buckholtz J.W., Kolachana B.R., Hariri A.R., Pezawas L., Blasi G., Wabnitz A. , Honea R. , Verchinski B. , Callicott J.H., Egan M., Matty V. and Weinberger D.R. (2006) Neural mechanisms of genetic risk for impulsivity and violence in humans . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 103 : 6269 – 6274 .
124. Micallef J., Blin O. (2001) Neurobiology and clinical pharmacology of obsessive-compulsive disorder. *Clin Neuropharmacol*; 24(4): 191-207.
125. Miller J.R. and Edmondson D.E. (1999) Influence of flavin analogue structure on the catalytic activities and flavinylation reactions of recombinant human liver monoamine oxidases A and B . *J. Biol. Chem.* , 274 : 23515 – 23525 .
126. Moens C.B., Auerbach A.B., Conlon R.A., Joyner A.L., Rossant J. (1992) A targeted mutation reveals a role for N-myc in branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. *Genes Dev*; 6(5): 691-704.
127. Mohammad-Zadeh L.F., Moses L. and Gwaltney-Brant S.M. (2008) Serotonin: a review . *J. Vet. Pharmacol. Ther.* , 31 : 187 – 199 .
128. Mohn A.R., Gainetdinov R.R., Caron M.G., Koller B.H. (1999) Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell*; 98(4): 427-436.
129. Murphy D.L., Sims K.B., Karoum F., de la Chapelle A, Norio R., Sankila E.M. and Breakefield X.O. (1990) Marked amine and amine metabolite changes in

- Norrie disease patients with an X-chromosomal deletion affecting monoamine oxidase . *J. Neurochem.*, 54 : 242 – 247.
130. Nagy A., Moens C., Ivanyi E., Pawling J., Gertsenstein M., Hadjantonakis A.K. *et al.* (1998) Dissecting the role of N-myc in development using a single targeting vector to generate a series of alleles. *Curr Biol*; 8(11): 661-664.
 131. Nakajima K., Matsuyama K. and Mori S. (1998) Prenatal administration of para-chlorophenylalanine results in suppression of serotonergic system and disturbance of swimming movements in newborn rats. *Neurosci. Res.* , 31 : 155 -169.
 132. Neckers L.M. (1982) Serotonin turnover and regulation. In: Osborne, N.N. (Ed.), *Biology of Serotonergic Transmission*. Wiley , New York, NY , pp. 139 – 158.
 133. Nierenberg A.A., Alpert J.E., Pava J., Rosenbaum J.F., Fava M. (1998) Course and treatment of atypical depression. *J. Clin. Psychiatry*;59:5–9.
 134. Oreland L., Nilsson K., Damberg M., Hallman J. (2007) Monoamine oxidases: activities, genotypes and the shaping of behaviour. *J Neural Transm*; 114(6): 817-822.
 135. Ou X.-M., Chen K. and Shih J.C. (2006) Glucocorticoid and androgen activation of monoamine oxidase A are regulated differently by R1 and Sp1 . *J. Biol. Chem.*, 281 : 21512 – 21525.
 136. Ozelius L., Hsu Y.P., Bruns G , Powell J.F., Chen S., Weyler W., Utterback M., Zucker, D., Haines, J., Trofatter, J.A. *et al.* (1988) Human monoamine oxidase gene (MAOA): chromosome position (Xp21-p11) and DNA polymorphism . *Genomics* , 3 : 53 – 58.

137. Pintar J.E., Barbosa J., Francke U., Castiglione C.M., Hawkins M. Jr. and Breakfield X.O. (1981) Gene for monoamine oxidase type A assigned to the human X chromosome. *J. Neurosci.*, 1 : 166 – 175.
138. Pivac N., Muck-Seler D. and Diksic M. (2003) Effects of desipramine on regional serotonin synthesis in the rat brain: acute and chronic autoradiographic studies. *Neurochem. Intl.*, 43 : 611 – 619.
139. Popova N.K., Maslova L.N, Morosova E.A., Bulygina V.V. and Seif I. (2006) MAO A knockout attenuates adrenocortical response to various kinds of stress. *Psychoneuroendocrinology*, 31 : 179 – 186.
140. Popova N.K., Skrinskaya Y.A., Amstislavskaya T.G., Vishnivetskaya G.B., Seif I. and de Meier E. (2001) Behavioral characteristics of mice with genetic knockout of monoamine oxidase type A. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 31 : 597 – 602.
141. Powell J.F., Hsu Y.P., Weyler W., Chen S.A., Salach J., Andrikopoulos K., Mallet J. and Breakefield X.O. (1989) The primary structure of bovine monoamine oxidase type A. Comparison with peptide sequences of bovine monoamine oxidase type B and other flavoenzymes. *Biochem. J.*, 259 : 407 – 413.
142. Prut L., Belzung C. (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*; 463(1-3): 3-33.
143. Rebrin I., Geha R.M., Chen K., Shih J.C. (2001) Effects of carboxyl-terminal truncations on the activity and solubility of human monoamine oxidase B. *J. Biol. Chem*; 276:29499–29506.

144. Reimold M., Smolka M.N., Zimmer A., Batra A., Knobel A., Solbach C. *et al.* (2007) Reduced availability of serotonin transporters in obsessive-compulsive disorder correlates with symptom severity - a [¹¹C]DASB PET study. *J Neural Transm*; 114(12): 1603-1609.
145. Roise D. and Schatz G. (1988) Mitochondrial presequences. *J. Biol. Chem.*, 263: 4509 – 4511.
146. Rowe R.P., Bloom B.M., Pan S.Y. and Finger K.F. (1959) Pharmacological studies with nialamide, a new antidepressant agent. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 101 : 832 – 836.
147. Rubinstein S., Malone M.A., Roberts W., Logan W.J. (2006) Placebo-controlled study examining effects of selegiline in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol*;16:404–415.
148. Rucker E.B., 3rd, Dierisseau P., Wagner K.U., Garrett L., Wynshaw-Boris A., Flaws J.A. *et al.* (2000) Bcl-x and Bax regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during embryogenesis. *Mol Endocrinol*; 14(7): 1038-1052.
149. Sabol S.Z., Hu S. and Hamer D. (1998) A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Hum. Genet.* , 103 : 273 – 279.
150. Sagara Y. and Ito A. (1982) In vitro synthesis of monoamine oxidase of rat liver outer mitochondrial membrane . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 109 : 1102 – 1107.
151. Salichon , N. , Gaspar , P. , Upton , A.L. , Picaud , S. , Hanoun , N. , Hamon, M. , De Maeyer , E. , Murphy , D.L. , Mössner , R. , Lesh , K.P. , Hen , R. and Seif , I. (2001) Excessive activation of serotonin (5-HT) 1B receptors disrupts

the formation of sensory maps in monoamine oxidase A and 5-HT transporter knockout mice . J. Neurosci. , 21 : 884 – 896 .

152. Salichon N., Gaspar P., Upton A.L., Picaud S., Hanoun N., Hamon M., De Maeyer E., Murphy D.L., Mossner R., Lesch K.P., Hen R. and Seif I. (2001) Excessive activation of serotonin (5-HT) 1B receptors disrupts the formation of sensory maps in monoamine oxidase A and 5-HT transporter knockout mice. J. Neurosci., 21 : 884 – 896.
153. Saunders J.C., Roukema R.W., Kline N.S. and Bailey S.D. (1959) Clinical results with phenelzine . Am. J. Psychiatry, 116 : 71 – 72.
154. Saura J., Richards J.G. and Mahy N. (1994) Age-related changes on MAO in Bl/C57 mouse tissues: a quantitative radio autographic study J. Neural. Transm. Suppl., 41 : 89 – 94.
155. Schneider R., Hoffmann H.J., Schicknick H., Moutier R. (1992) Genetic analysis of isolation-induced aggression. I. Comparison between closely related inbred mouse strains. *Behav Neural Biol*; 57(3): 198-204.
156. Scott A.L., Bortolato M., Chen K., Shih J.C. (2008) Novel monoamine oxidase A knock out mice with human-like spontaneous mutation. *Neuroreport*; 19(7): 739-743.
157. Sharp T., Gartside S.E. and Umbers V. (1997) Effects of co-administration of a monoamine oxidase inhibitor and a 5-HT_{1A} receptor antagonist on 5-hydroxytryptamine cell firing and release. Eur. J. Pharmacol., 320 : 15 – 19.
158. Shih J.C. and Chen K. (1999) MAO-A and -B gene knockout mice exhibit distinctly different behavior . *Neurobiology (Bp)*, 7 : 235 – 246.

159. Shih J.C. and Chen K. (2004) Regulation of MAO-A and MAO-B gene expression . *Curr. Med. Chem.*, 11 : 1995 – 2005.
160. Shih J.C., Chen K., Ridd M.J. (1999) Monoamine oxidase: from genes to behavior. *Annu. Rev. Neurosci*;22:197–217.
161. Shih J.C., Chen K., Ridd M.J. and Seif I. (2000) Ginkgo biloba abolishes aggression in mice lacking MAO A . *Antioxid. Redox. Signal.*, 2 : 467 – 471.
162. Shih J.C., Grimsby J., Chen K. (1990). The expression of human MAO-A and B genes. *J Neural Transm Suppl.*;32:41-7.
163. Sims K.B. , Ozelius L., Corey T., Rinehart W.B., Liberfarb R. , Haines J., Chen W.J., Norio R. , Sankila E. , de la Chapelle A. et al. (1989) Norrie disease gene is distinct from the monoamine oxidase genes . *Am. J. Hum. Genet.*, 45 : 424 – 434 .
164. Sotelo C., Cholley B., El Mestikawy S , Gozlan H. and Hamon M. (1990) Direct immunohistochemical evidence of the existence of 5-HT_{1A} autoreceptors on serotonergic neurons in the midbrain raphe nuclei. *Eur. J. Neurosci.*, 2 : 1144 – 1154.
165. Squires R.F. (1968) Additional evidence for the existence of several forms of mitochondrial monoamine oxidase in the mouse. *Biochem. Pharmacol.*, 17: 1401– 1409.
166. Stengler-Wenzke K., Muller U., Angermeyer M.C., Sabri O., Hesse S. (2004)Reduced serotonin transporter-availability in obsessive-compulsive disorder (OCD). *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*; 254(4): 252-255.
167. Strolin Benedetti M., Boucher T., Fowler C.J. (1983) The deamination of noradrenaline and 5-hydroxytryptamine by rat brain and heart monoamine

- oxidase and their inhibition by cimoxatone, toloxatone and MD 770222. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*; 323(4): 315-320.
168. Svensson S., Some M., Lundsjo A., Helander A., Cronholm T. and Hoog J.O. (1999) Activities of human alcohol dehydrogenases in the metabolic pathways of ethanol and serotonin. *Eur. J. Biochem.*, 262 : 324 – 329.
169. Swedo S.E., Schapiro M.B., Grady C.L., Cheslow D.L., Leonard H.L., Kumar A. *et al.* (1989) Cerebral glucose metabolism in childhood-onset obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry*; 46(6): 518-523.
170. Szeszko P.R., MacMillan S., McMeniman M., Lorch E., Madden R., Ivey J. *et al.* (2004) Amygdala volume reductions in pediatric patients with obsessive-compulsive disorder treated with paroxetine: preliminary findings. *Neuropsychopharmacology*; 29(4): 826-832.
171. Szeszko P.R., Robinson D., Alvir J.M., Bilder R.M., Lencz T., Ashtari M. *et al.* (1999) Orbital frontal and amygdala volume reductions in obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry*; 56(10): 913-919.
172. Thase M.E., Frank E., Mallinger A.G., Hamer T. and Kupfer D.J. (1992) Treatment of imipramine-resistant recurrent depression, III: Efficacy of monoamine oxidase inhibitors. *J. Clin. Psychiatry*, 53 : 5 – 11.
173. Thomas A., Burant A., Bui N., Graham D., Yuva-Paylor L.A., Paylor R. (2009) Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*; 204(2): 361-373.
174. Thompson A.M. (2008) Serotonin immunoreactivity in auditory brainstem neurons of the postnatal monoamine oxidase-A knockout mouse. *Brain Res.*, 1228 : 58 – 67.

175. Trullas R., Skolnick P. Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl)* (1993); 111(3): 323-331.
176. Udenfriend S., Titus E., Weissbach H. and Peterson R.E. (1956) Logogenesis and metabolism of 5-hydroxyindole compounds . *J. Biol. Chem.* , 219 : 335 – 344.
177. Upton A.L., Salichon N., Lebrand C., Ravary A., Blakely R., Seif I. and Gaspar P. (1999) Excess of serotonin (5-HT) alters the segregation of ipsilateral and contralateral retinal projections in monoamine oxidase A knockout mice: possible role of 5-HT uptake in retinal ganglion cells during development. *J. Neurosci.*, 19 : 7007 – 7024.
178. Vallejo J., Gasto C., Catalan R. and Salamero M. (1987) Double-blind study of imipramine versus phenelzine in melancholias and dysthymic disorders. *Br. J. Psychiatry*, 151 : 639 – 642.
179. Van den Heuvel O.A., Veltman D.J., Groenewegen H.J., Dolan R.J., Cath D.C., Boellaard R. *et al.* (2004) Amygdala activity in obsessive-compulsive disorder with contamination fear: a study with oxygen-15 water positron emission tomography. *Psychiatry Res*; 132(3): 225-237.
180. Van Dijk A., Klompmakers A., Denys D. (2010) The serotonergic system in obsessive-compulsive disorder. In: Muller CP, Jacobs, B.L. (ed). *Handbook of the behavioral neurobiology of serotonin*. Academic Press: London, UK, , pp 547-563.
181. Vanyukov M.M., Moss H.B., Yu L.M., Tarter R.E. and Deka R. (1995) Preliminary evidence for an association of a dinucleotide repeat polymorphism at the MAOA gene with early onset alcoholism/substance abuse. *Am. J. Med. Genet.*, 60 : 122– 126.

182. Veenstra-VanderWeele J., Anderson G.M. and Cook E.H.Jr. (2000) Pharmacogenetics and the serotonin system: initial studies and future directions . *Eur. J. Pharmacol.*, 410 :165 – 181.
183. Verge D., Daval G., Marcinkiewicz M., Patey A., El Mestikawy S., Gozlan H. and Hamon M. (1986) Quantitative autoradiography of multiple 5-HT₁ receptor subtypes in the brain of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *J. Neurosci.*, 6 : 3474 – 3482.
184. Virkkunen M., Goldman D., Nielsen D.A. and Linnoila M. (1995) Low brain serotonin turnover rate (low CSF 5-HIAA) and impulsive violence. *J. Psychiatry Neurosci.*, 20 : 271 – 275.
185. Vitalis T. and Parnavelas J.G. (2003) The role of serotonin in early cortical development . *Dev. Neurosci.*, 25 : 245 – 256.
186. Voyiaziakis E., Evgrafov O., Li D., Yoon H.J., Tabares P., Samuels J. *et al.* (2009) Association of SLC6A4 variants with obsessive-compulsive disorder in a large multicenter US family study. *Mol Psychiatry*.
187. Warburg M. (1975) Norrie's disease – differential diagnosis and treatment . *Acta Ophthalmol. (Copenh.)*, 53 : 217 – 236.
188. Westlund K.N., Denney R.M., Rose R.M. and Abell C.W. (1988) Localization of distinct monoamine oxidase A and monoamine oxidase B cell populations in human brainstem . *Neuroscience*, 25 : 439 – 456.
189. Wolinsky T.D., Swanson C.J., Smith K.E., Zhong H., Borowsky B., Seeman P., Branchek T., Gerald C.P. (2007) The trace amine 1 receptor knockout mouse: an animal model with relevance to schizophrenia. *Genes Brain Behav*;6:628–639.

190. Wong W.K., Chen K. and Shih J.C. (2001) Regulation of human monoamine oxidase B gene by Sp1 and Sp3. *Mol. Pharmacol.*, 59 : 852 – 859.
191. Wong W.K., Chen K. and Shih J.C. (2003) Decreased methylation and transcription repressor Sp3 up-regulated human monoamine oxidase (MAO) B expression during Caco-2 differentiation. *J. Biol. Chem.* , 278 : 36227 – 36235.
192. Wong W.K., Ou X.M., Chen K. and Shih J.C. (2002) Activation of human monoamine oxidase B gene expression by a protein kinase C/ MAPK signal transduction pathway involves c-Jun and Egr-1. *J. Biol. Chem.*, 277: 22222 – 22230.
193. Wu H, Liu X, Jaenisch R. (1994) Double replacement: strategy for efficient introduction of subtle mutations into the murine Col1a-1 gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 91(7): 2819-2823.
194. Yin H.S., Chen K, Kalpana S, Shih J.C. (2006) Differential effects of chronic amphetamine and baclofen administration on camp levels and phosphorylation of CREB in distinct brain regions of wild type and monoamine oxidase B-deficient mice. *Synapse*;60:573–584.
195. Zeller E.A. (1938) Ueber den enzymatischen Abbau von Histamin and Diaminen. *Helv. Chem. Acta*, 21 : 881 – 890.
196. Zeller E.A. and Barsky J. (1952) In vivo inhibition of liver and brain monoamine oxidase by 1-isonicotinyl-2-isopropyl hydrazine. *Proc. Soc. Exp. Biol. NY* , 81 : 459 – 461 .
197. Zhu Q.S., Chen K., and Shih J.C. (1994). Bidirectional promoter of human monoamine oxidase A (MAO-A) controlled by transcription factor Sp1. *J. Neurosci.*, 14 : 7393 – 7403.

198. Zhu Q.S., Grimsby J, Chen K, Shih J.C. (1992). Promoter organization and activity of human monoamine oxidase (MAO) A and B genes. *J Neurosci.* Nov;12(11):4437-46.
199. Zhuang Z., Hogan M. and McCauley R. (1988) The in vitro insertion of monoamine oxidase B into mitochondrial outer membranes. *FEBS Lett.*, 238 : 185 – 190.
200. Zhuang Z.P., Marks B. and McCauley R.B. (1992) The insertion of monoamine oxidase A into the outer membrane of rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* , 267 : 591 – 596 .