



Article

La somministrazione di taurina permette di recuperare i deficit motori e cognitivi in un modello animale con la sindrome di Angelman.

Sara Guzzetti ^{1,†}, Luciano Calzari ^{1,†}, Lucia Buccarello ¹, Valentina Cesari ², Ivan Toschi ², Stefania Cattaldo ³, Alessandro Mauro ^{3,4,5}, Francesca Pregnotato ⁶, Silvia Michela Mazzola ⁷ and Silvia Russo ^{1,*}

¹ Cytogenetics and Molecular Genetics Laboratory, Istituto Auxologico Italiano, IRCCS, 20145 Milano, Italy.

² Department of Agricultural and Environmental Sciences, Università degli Studi di Milano, 20133 Milano, Italy.

³ Laboratory of Clinical Neurobiology, Istituto Auxologico Italiano, IRCCS, 28824 Piancavallo-Verbania, Italy.

⁴ Division of Neurology and Neurorehabilitation, Istituto Auxologico Italiano, IRCCS, 28824 Piancavallo-Verbania, Italy.

⁵ Department of Neurosciences, Università di Torino, 10126 Torino, Italy.

⁶ Experimental Laboratory of Immunological and Rheumatologic Researches, Istituto Auxologico Italiano, IRCCS, 20145 Milano, Italy.

⁷ Department of Veterinary Medicine, Università degli Studi di Milano, 20133 Milano, Italy;

* Correspondence: s.russo@auxologico.it; Tel.: +39-02-619113036; Fax: +39-02-619113033

† These authors contributed equally to this work.

Received: 1 March 2018; Accepted: 30 March 2018; Published: 5 April 2018

Abstract:

La sindrome di Angelman (AS, MIM 105830) è una malattia rara del neurosviluppo che interessa circa 1:10-20000 bambini. I pazienti presentano una disabilità intellettiva di grado variabile da moderato a severo, atassia e assenza di linguaggio. Studi eseguiti su cervelli umani post-mortem di pazienti con AS e studi su modelli murini hanno rivelato che alterazioni a livello dei recettori extrasinaptici dell'acido gamma amino butirrico (GABA) sono implicati nella patogenesi della malattia. La taurina è un aminoacido intracellulare libero contenente un gruppo solfidrico, abbondante nel cervello e considerato un neurotrasmettitore inibitorio con proprietà neuroprotettive. Poiché la taurina agisce come agonista dei recettori del GABA, scopo dello studio era indagare se la taurina potesse migliorare i sintomi della sindrome di Angelman. Abbiamo somministrato taurina disciolta in acqua alla concentrazione di 1mg/kg a topi difettivi di *Ube3a*, a partire dal momento dello svezzamento. Per valutare il miglioramento delle capacità motorie e cognitive del modello abbiamo somministrato a 7, 14, 21 e 30 settimane di vita i tests rotarod, novel object recognition e Open field. Sono stati inoltre eseguiti test biochimici e dosaggio degli aminoacidi, rispettivamente mediante Western Blot e HPLC su cervelli interi congelati. Il trattamento dei topi *Ube3a^{m-/p+}* con la taurina ha migliorato significativamente le loro capacità motorie e cognitive e riportato il valore del marcatore sinaptico PSD95 ed il rapporto pERK1/2-ERK1/2 ai valori presenti negli animali di controllo. Non è stato osservato nessun effetto collaterale dato dalla somministrazione cronica della taurina. Il nostro studio indica la somministrazione della taurina come una potenziale terapia capace di migliorare i deficit motori e le difficoltà di apprendimento nella sindrome di Angelman.

Keywords: sindrome di Angelman, somministrazione orale di taurina, recupero dei deficit motori e di apprendimento della sindrome di Angelman.

1. Introduzione

La sindrome di Angelman (AS, MIM 105830) è una rara malattia del neurosviluppo che interessa 1/10-20.000 bambini. La maggior parte dei pazienti con la sindrome condivide un ritardo dello sviluppo che può essere da moderato a grave, disabilità intellettiva, disturbi del movimento e atassia dell'andatura, linguaggio assente o limitato e un peculiare comportamento caratterizzato da atteggiamento felice, iperecitatilità e stereotipie tipo sfarfallamento delle mani, mentre oltre l'80% dei pazienti presenta una microcefalia relativa, convulsioni e un pattern EEG specificamente alterato con onde a picco lento di ampiezza ampia e disturbi del sonno [1,2]. A supporto del sospetto clinico si osserva una facies peculiare con prognatismo, denti distanziati, pelle e capelli chiari. Nel complesso le manifestazioni cliniche complessive sono altamente eterogenee e parzialmente dipendenti dai difetti molecolari specifici causativi della malattia. La **figura 1** mostra i pazienti con sindrome di Angelman di età diverse e i relativi difetti genetici che evidenziano la facies AS e la sua variabilità.

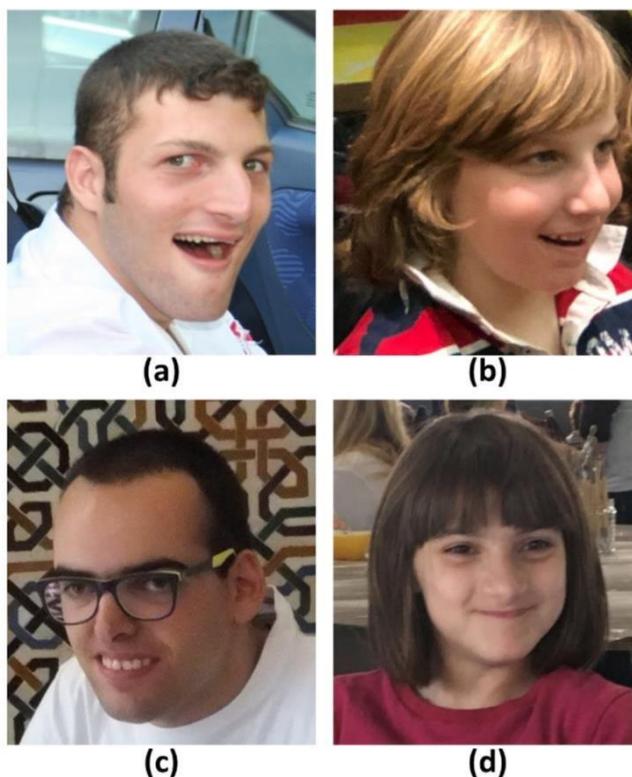


Figura 1. Fotografie di pazienti con sindrome di Angelman rappresentativi dei meccanismi genetici: (a) delezione della regione 15q11–12; (b) disomia uniparentale paterna del cromosoma 15; (c) centro d' imprinting; (d) mutazioni puntiformi del gene *UBE3A*. I genitori dei pazienti hanno firmato il consenso informato.

L'eziologia genetica consiste nella perdita di funzionalità dell'allele materno del gene *UBE3A*, gene situato all'interno della regione cromosomica 15q11.2-q13 sottoposta ad "imprinting" e codificante per un'enzima ubiquitina-proteina ligasi E3 coinvolta nell'ubiquitinazione delle proteine bersaglio per destinarle alla degradazione proteasoma-dipendente. Espresso in multipli compartimenti cellulari, *UBE3A* regola il metabolismo ossidativo nei mitocondri, la trascrizione genica nei domini nucleari ricchi di eucromatina e potrebbe essere coinvolto nella plasticità sinaptica [3]. Nei neuroni, nel midollo spinale e nei nervi periferici, un lungo trascritto antisense neuronale ad espressione paterna impedisce la trascrizione dell'allele paterno *UBE3A*, quindi viene espresso solo l'allele materno *UBE3A* [4]. Quattro classi molecolari di difetti alterano la funzionalità di *UBE3A*: delezioni sull'allele materno

nella regione cromosomica che comprende il gene (70% dei casi), disomia paterna uniparentale del cromosoma 15q (3-5%), alterazione della metilazione nel Centro dell'imprinting (3-5%) e mutazioni puntiformi nella sequenza di UBE3A (fino all'11%). Il modello di topo privo della copia materna del gene *Ube3a* [5] mostra fenotipi correlati alla patologia umana, come ad esempio deficit motori, difficoltà di apprendimento e di memoria, con differenze a seconda del ceppo considerato. Il modello murino ha contribuito notevolmente a comprendere i meccanismi molecolari e cellulari coinvolti nella patofisiologia del disturbo [6]. La potenziale disfunzione del sistema inibitorio GABAergico nella sindrome di Angelman è stata studiata in modelli animali e in cervelli umani postmortem rivelando alterazioni che predicono una compromissione dell'attività GABAergica extrasinaptica corticale, ma non sinaptica [7]. I topi AS mostrano inoltre a livello dell'ippocampo, un aumento delle specie reattive dell'ossigeno mitocondriali che potrebbero contribuire al deficit comportamentale [8-10]. Al momento nessuna terapia efficace è stata sviluppata e il ripristino della funzione neuronale GABAergica appare una delle strategie più dirette per migliorare i disturbi neurologici e l'epilessia [11].

La somministrazione di un agonista selettivo dei recettori GABA extrasinaptici sembra migliorare la disfunzione motoria nella AS [12].

La taurina (acido 2-β amminoetansulfonico) è un amminoacido intracellulare libero contenente zolfo caratterizzato dalla presenza di un gruppo sulfonato invece di un gruppo carbossilico, non incorporato nelle proteine e che rappresenta il secondo amminoacido più abbondante nel Sistema Nervoso Centrale (SNC) [13]. Nell'uomo, la biosintesi della taurina si verifica principalmente nel fegato ma può essere assunta attraverso la dieta, principalmente con carne e frutti di mare [14]. Nel CNS regola il volume cellulare e la neurotrasmissione. Recentemente, vari studi hanno evidenziato che la taurina svolge un ruolo neuroprotettivo per il SNC [15-17] ed è coinvolta nella neurogenesi [18]. Essenziale per la neuroprotezione è il suo ruolo nell'apertura dei canali anionici inibitori che si realizza mediante l'attivazione dei recettori della glicina e/o dei recettori non-sinaptici del GABA-A [19]. Reyes-Haro e colleghi [20] hanno dimostrato che la taurina agisce come un debole agonista dei recettori GABA-A negli astrociti e in STC-1 (secretin tumor cell line-1), cellule che esprimono varie subunità GABA-A. A partire da queste evidenze nasce questo studio che ha lo scopo di valutare l'efficacia della somministrazione di taurina nei topi *Ube3a^{m-/p+}* nel migliorare la loro disfunzione motoria e di apprendimento. Basandosi su pubblicazioni che dimostrano che la taurina, somministrata cronicamente sia nel cibo [21] che disciolta in acqua [15,22,23] ha migliorato il deficit motorio e/o cognitivo di difetti sindromici, abbiamo somministrato per via orale 1g/kg/giorno di taurina. Un dosaggio simile è già stato dimostrato efficace e non tossico in un modello murino di malattia di Alzheimer [15]. Considerando che il massimo recupero dei deficit neurocognitivi nella sindrome di Angelman è stato ottenuto in un topo inducibile, riattivando UBE3A a 3 settimane [24], abbiamo scelto di iniziare la somministrazione di taurina al 21° giorno di vita degli animali, ossia subito dopo lo svezzamento.

2. Risultati

L'effetto terapeutico della somministrazione orale e cronica di taurina sulle disfunzioni motorie e difficoltà di apprendimento, tipiche della sindrome di Angelman è stato esaminato attraverso l'esecuzione di tre test comportamentali condotti sul topo transgenico *Ube3a^{m-/p+}* in background C57BL/6 e sul relativo controllo (wt). Sono stati considerati otto diversi gruppi sperimentali di animali:

Ube3a^{m-/p+} (AS):

- (1) non trattato maschio
- (2) non trattato femmina
- (3) trattato maschio
- (4) trattato femmina

Wild type (controllo sano):

- (5) non trattato maschio
- (6) non trattato femmina
- (7) trattato maschio
- (8) trattato femmina

2.1 La taurina migliora il coordinamento motorio dei topi $Ube3a^{m-/p+}$ (AS)

Per identificare le differenze nella coordinazione motoria, tutti i gruppi di test sono stati analizzati mediante test rotarod in quattro momenti di sviluppo del topo: rispettivamente a 7, a 14, a 21 e a 30 settimane dopo la nascita. Come mostrato in **Figura 2**, dal confronto multiplo tra gruppi i topi $Ube3a^{m-/p+}$ non trattati rispetto ai topi wt non trattati hanno mostrato un significativo deficit nelle prestazioni (tutti i punti temporali: *** p value<0.001), mentre i topi $Ube3a^{m-/p+}$ (AS) a cui era stata somministrata cronicamente taurina dallo svezzamento hanno manifestato un miglioramento nelle prestazioni, eterogeneo, ma significativo. L'unica eccezione è stata osservata per i topi $Ube3a^{m-/p+}$ di sesso maschile a 30 settimane, per i quali non si osserva un miglioramento significativo. Inoltre non è stato osservato nei controlli dopo il trattamento con taurina alcun effetto significativo (sia in miglioramento, che in peggioramento).

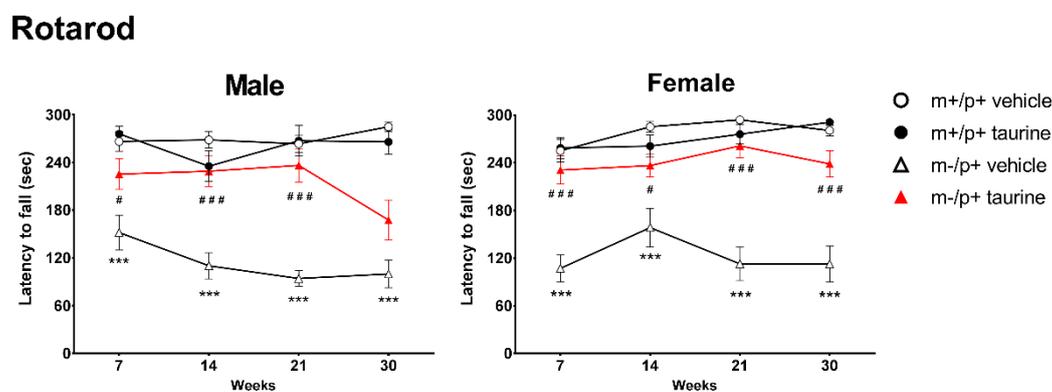


Figura 2. Il trattamento con taurine migliora le prestazioni la coordinazione motoria nei topi AS ($Ube3a^{m-/p+}$). I test Rotarod sono stati condotti a 4 punti temporali (7, 14, 21 e 30 settimane) sui topi wild type (wt) e $Ube3a^{m-/p+}$ (AS) (sia trattati (taurina) e non trattati (vehicle)). Le analisi sono state condotte separando i risultati ottenuti dai due sessi (maschi: pannello di sinistra, femmine: pannello di destra). Animali per gruppo: topi maschi (wt + vehicle = 14, wt + taurina = 12, $Ube3a^{m-/p+}$ + vehicle = 11, $Ube3a^{m-/p+}$ + taurina = 11); topi femmine (wt + vehicle = 15, wt + taurina = 13, $Ube3a^{m-/p+}$ + vehicle = 12, $Ube3a^{m-/p+}$ + taurina = 14). I dati sono mostrati per ogni punto temporale come media \pm SEM. Effetto del genotipo: *** p < 0.001; effetto del trattamento con taurina nel genotipo AS $Ube3a^{m-/p+}$ (# p < 0.05, ### p < 0.001).

2.2 Il test Open Field rivela un miglioramento parziale dopo somministrazione della taurina

Il test in campo aperto (Open Field Test - OFT) è stato utilizzato per valutare l'attività locomotoria, i livelli di ansia e il comportamento esplorativo nei nostri gruppi. Sono stati quindi presi in considerazione come parametri la distanza totale, la distanza percorsa nella zona centrale e il numero di sollevamenti sulle zampe posteriori. L'analisi di questi parametri, ottenuti dal software ANY Maze, ha indicato un deficit comportamentale nei topi $Ube3a^{m-/p+}$ non trattati *versus* i topi wild type non trattati, come rivelato dalla significativa riduzione di tutti i parametri OFT osservati (**Figura 3**). Dalla 14^a settimana, è stata osservata una diminuzione significativa della distanza totale (sia nei maschi che nelle femmine) (**Figura 3a** - pannelli sinistro e destro), sensibilmente più evidente nelle femmine. Allo stesso modo, le differenze significative nella distanza percorsa nell'area centrale e nel numero di sollevamenti sulle zampe posteriori erano più pronunciate nelle femmine sin dalla settimana di vita (**Figura 3b**, pannelli di destra). Il trattamento con taurina ha mostrato un effetto

benefico principalmente nei topi *Ube3a^{m-/p+}* femmina: un significativo aumento dell'attività locomotoria è stato osservato alla 14^a e 21^a settimana (### p <0,001) (Figura 3a-pannello di destra). I maschi *Ube3a^{m-/p+}* trattati con taurina hanno mostrato un recupero parziale ma non significativo delle prestazioni locomotorie (Figura 3a-pannello di sinistra). Allo stesso modo, le differenze tra i genotipi nelle distanze dell'area centrale (Figura 3b-pannello di destra) e numero di sollevamenti sulle zampe posteriori (Figura 3c-pannello di destra) sono state parzialmente ripristinate dalla taurina alla 14^a e 21^a settimana nel gruppo *Ube3a^{m-/p+}* femmina (# p <0,05; ## p <0,01). Un riscontro parziale è stato osservato anche nel gruppo dei maschi, alla settima settimana per la distanza percorsa nel quadrato centrale (Figura 3b-pannello di sinistra) e alla 30^a settimana per il numero di sollevamenti (Figura 3c-pannello di sinistra). Per tutti i parametri non è stato osservato alcun effetto significativo della taurina nei topi wild type. Da un punto di vista longitudinale, è stata osservata una flessione generale dei parametri misurati in quasi tutti i gruppi dal primo tempo (7^a settimana) ad altri punti temporali (14^a e/o 21^a e/o 30^a settimana).

Open field

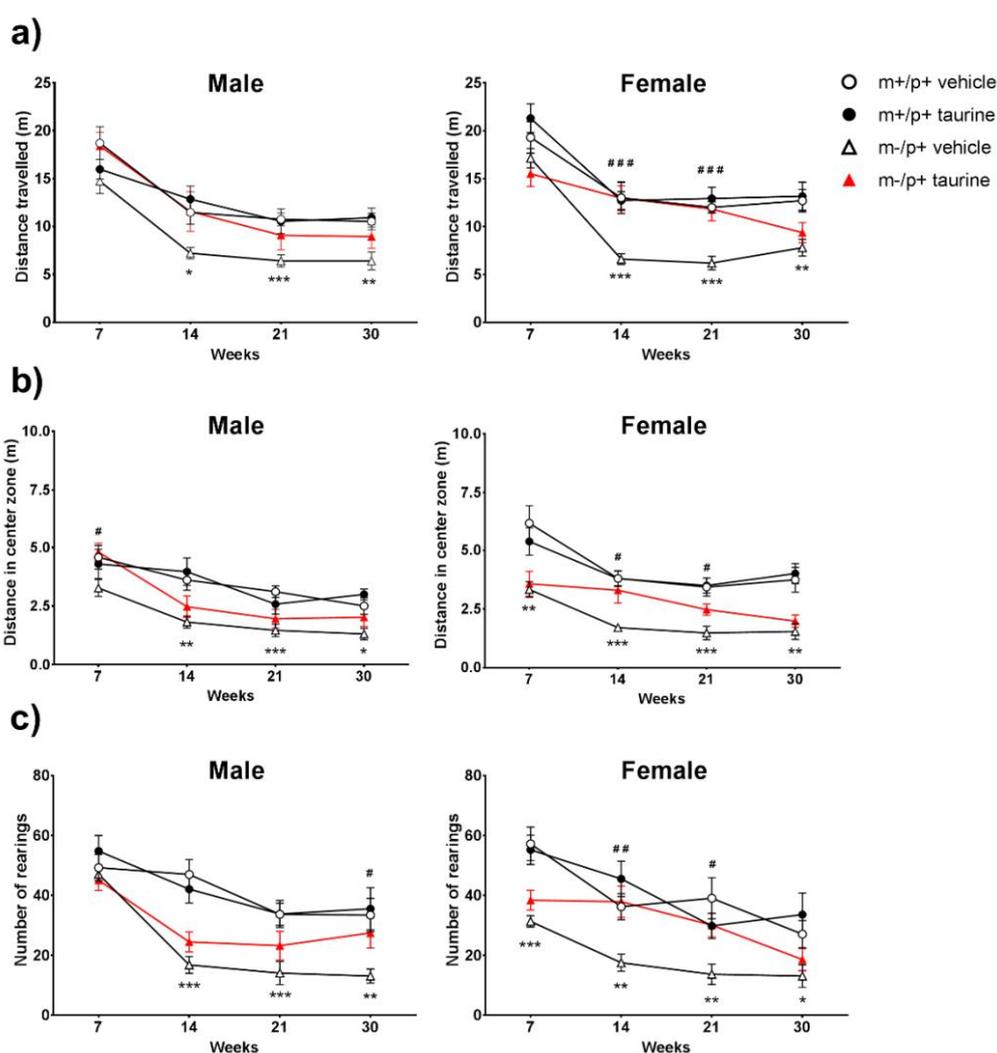


Figura 3. Il trattamento con taurina migliora parzialmente le attività locomotorie, l'ansia e l'esplorazione nei topi AS femmina (*Ube3a^{m-/p+}*). Il test open field è stato condotto condotti a 4 punti temporali (7, 14, 21 e 30 settimane) sui topi wild type (wt) e *Ube3a^{m-/p+}* (AS) (sia trattati (taurina) e non trattati (vehicle)) misurando (a) la distanza totale percorsa (m); (b) la distanza percorsa nel quadrato centrale (m) e (c) il numero di sollevamenti sulle zampe posteriori. Le analisi sono state condotte separando i risultati ottenuti dai due sessi (maschi: pannello di sinistra, femmine: pannello di destra).

Numero di animali per gruppo: topi maschi (wt + vehicle = 13, wt + taurina = 12, $Ube3a^{m-/p+}$ + vehicle = 11, $Ube3a^{m-/p+}$ + taurina = 12); topi femmine (wt + vehicle = 13, wt + taurina = 13, $Ube3a^{m-/p+}$ + vehicle = 11, $Ube3a^{m-/p+}$ + taurina = 13). I dati sono mostrati per ogni punto temporale come media \pm SEM. Effetto del genotipo: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; effetto del trattamento della taurina sul genotipo AS $Ube3a^{m-/p+}$: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

2.3 I deficit di apprendimento e di memoria migliorano nei topi $Ube3a^{m-/p+}$ dopo la somministrazione di taurina

Il test di riconoscimento del nuovo oggetto (Novel Object Recognition - NORT) è stato utilizzato per misurare i livelli di memoria nel riconoscimento visivo degli oggetti e di ansia nei topi Angelman $Ube3a^{m-/p+}$ insieme ai controlli wild type $Ube3a^{m+/p+}$. I topi mostrano un'innata e naturale capacità di esplorare oggetti sconosciuti: bassi livelli di esplorazione possono essere correlati con uno stato di ansia. L'attività locomotoria deve essere attentamente monitorata, ma non rappresenta un elemento critico che può invalidare l'efficacia del NORT [25]. Topi iperattivi e non interagenti sono stati scartati o rianalizzati. La valutazione dell'indice di riconoscimento (RI) (Figura 4) ha rivelato un forte effetto del genotipo ($Ube3a^{m-/p+}$ vs wild type) che evidenzia, sia per i maschi che le femmine, in ciascun punto temporale, un'abilità molto limitata nell'esplorazione dell'oggetto nuovo o non familiare (*** p value < 0,001). I topi $Ube3a^{m-/p+}$ trattati con taurina hanno migliorato la loro propensione all'esplorazione: topi maschi $Ube3a^{m-/p+}$ alla 21^a e alla 30^a settimana (### p value < 0,001); $Ube3a^{m-/p+}$ topi femmine alla 7^a (# $p < 0,05$), 21^a (### p value < 0,001) e 30^a (# p value < 0,01) settimana. Sorprendentemente, alla 30^a settimana i topi wild type femmine hanno manifestato una leggera e borderline diminuzione della preferenza verso gli oggetti nuovi. L'analisi longitudinale ha evidenziato, per entrambi i sessi, il massimo miglioramento nella 30^a settimana.

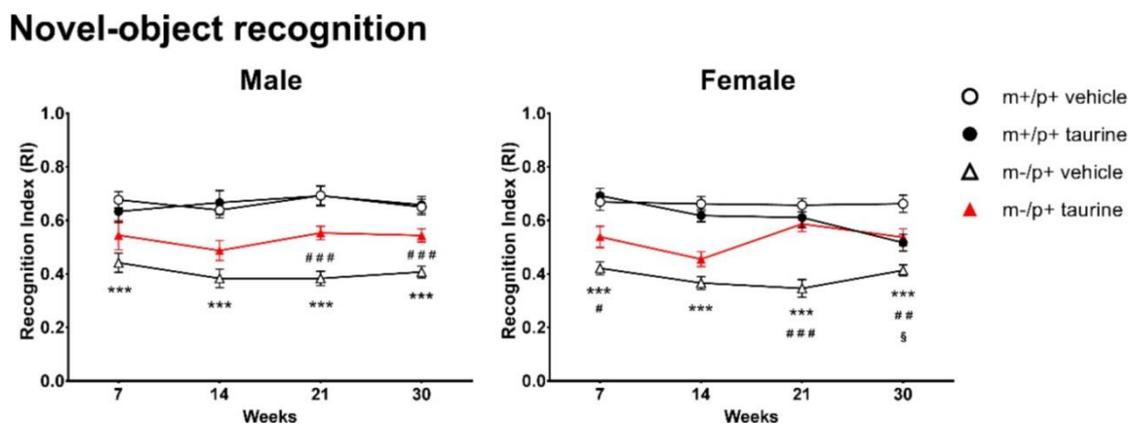


Figura 4. Il trattamento con taurina ha migliorato l'apprendimento e la memoria nei topi AS ($Ube3a^{m-/p+}$). Il test NOR è stato condotto condotti a 4 punti temporali (7, 14, 21 e 30 settimane) sui topi wild type (wt) e $Ube3a^{m-/p+}$ (AS) (sia trattati (taurina) e non trattati (vehicle)). Le analisi sono state condotte separando i risultati ottenuti dai due sessi (maschi: pannello di sinistra, femmine: pannello di destra). Numero di animali per gruppo: topi maschi (wt + vehicle = 14, wt + taurina = 11, $Ube3a^{m-/p+}$ + vehicle = 14, $Ube3a^{m-/p+}$ + taurina = 13); topi femmine (wt + vehicle = 12, wt + taurina = 14, $Ube3a^{m-/p+}$ + vehicle = 12, $Ube3a^{m-/p+}$ + taurina = 14). I dati sono mostrati per ogni punto temporale come media \pm SEM. Effetto del genotipo: *** p value < 0.001; effetto del trattamento della taurina sul genotipo $Ube3a^{m+/p+}$: § p value < 0.05; effetto del trattamento della taurina sul genotipo AS $Ube3a^{m-/p+}$: # $p < 0.05$, ## p value < 0.01, ### value < 0.001.

2.4 Effetto della taurina sui marcatori sinaptici

Per indagare se la somministrazione di taurina potesse ripristinare le deregolazioni sinaptiche evidenziate da studi su pazienti con sindrome di Angelman [26-28], il livello di PSD-95 e il

rapporto tra pERK1/2 e ERK1/2 totale sono stati studiati mediante Western blot in cervelli interi di animali sacrificati alla 30^a settimana. Come mostrato nelle **Figure 5a** e **5b**, è stato rilevato un leggero aumento della PSD-95 totale (barra nera) e l'attivazione del rapporto pERK1/2-ERK1/2 (barra nera) nei topi transgenici Angelman. La somministrazione di taurina ai topi transgenici ha ripristinato i valori a livelli rilevati nei controlli (barra rossa). Di conseguenza, è stata saggiata la JNK (c-Jun N-terminale chinasi) un altro membro della segnalazione MAPK che trasduce gli stimoli extracellulari nella cascata intracellulare, i cui livelli però appaiono essere normali o paragonabili ai controlli nei cervelli interi *Ube3a^{m-/p+}*.

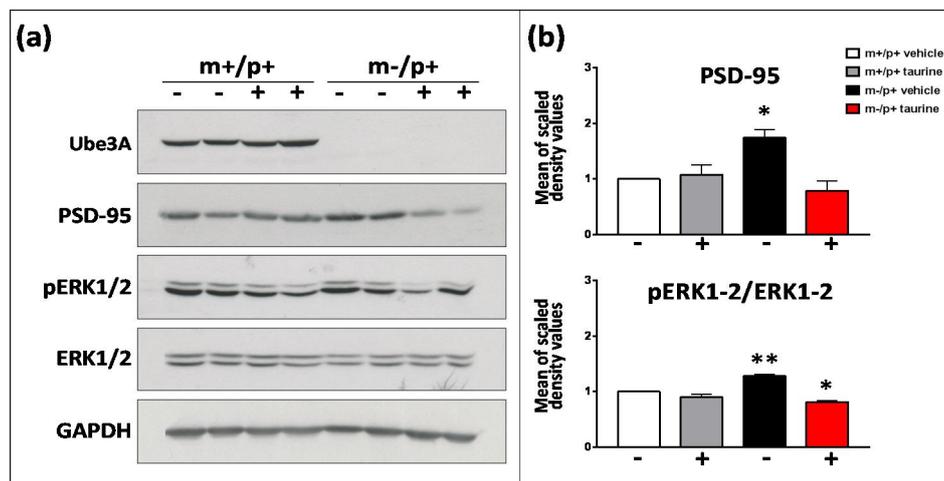


Figura 5. I livelli alterati dei segnali relativi a pERK1/2-ERK1/2 e PSD-95 sono ripristinati dopo somministrazione di taurina. Pannello (a) Western blots rappresentativi ottenuti da omogenati di cervelli interi di topi femmine che mostrano l'espressione delle proteine UBE3A (blot superiore), PSD-95, ERK1/2 fosforilata e totale, normalizzate mediante GAPDH. I simboli *m-/p+* (per *Ube3a^{m-/p+}*) and *m+/p+* (per *Ube3a^{m+/p+}*) indicano i relativi genotipi; I segni sotto a queste scritte indicano il trattamento: + per taurine e - per il veicolo. Pannello (b): media dei valori di densità media (scalati sui controlli) ottenuta da tre esperimenti indipendenti. Le differenze significative tra i gruppi sono marcate con gli asterischi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

2.5 Contenuto di taurina nel cervello e nel siero

Abbiamo verificato se il consumo giornaliero di taurina in acqua alterasse il contenuto di taurina nel siero e nel cervello intero. Come mostrato nella **Figura 6** non sono state identificate differenze nel livello di taurina tra topi transgenici e wild type non trattati. Un aumento significativo è stato osservato nel siero, dove i topi trattati, indipendentemente dal genotipo, hanno mostrato una concentrazione di taurina 4-6 volte superiore (**Figura 6a**). Al contrario, le misurazioni della taurina nel cervello sono risultate simili in tutti i gruppi testati (**Figura 6b**). Questo risultato è in accordo con quanto riportato dalla letteratura, secondo cui la concentrazione di taurina nel cervello sarebbe regolata da un trasportatore TauT attivo [16,29]. La quantificazione dei neurotrasmettitori aggiuntivi come l'acido glutammico, il GABA e la glutammina non ha evidenziato differenze significative (**Appendice A, Figura A1**).

Taurine dosage (HPLC)

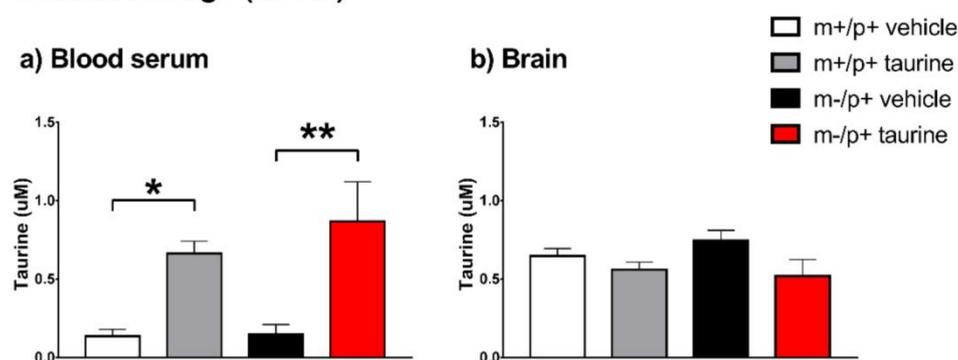


Figura 6. L'analisi del contenuto di taurina nel siero da sangue (Pannello (a)) e nel cervello totale Panel (b) ha evidenziato un diverso accumulo nei due tessuti. Le misure sono state effettuate mediante HPLC (high performance liquid chromatography). Gli asterischi indicano le differenze significative (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Numero di sieri analizzati: wt + vehicle = 8, wt + taurina = 10, *Ube3a*^{m-/p+} + vehicle = 6, *Ube3a*^{m-/p+} + taurina = 6. Numero di cervelli analizzati: wt + vehicle = 13, wt + taurina = 8, *Ube3a*^{m-/p+} + vehicle = 7, *Ube3a*^{m-/p+} + taurina = 9.

3. Discussione

La sindrome di Angelman è una malattia rara che colpisce gravemente la qualità di vita dei probandi e dei genitori. Compromissione cognitiva, andatura atassica, assenza di linguaggio e insorgenza di convulsioni sono le caratteristiche principali della sindrome per le quali non esiste ancora una terapia. Il nostro studio riporta che la taurina disciolta nell'acqua può ripristinare il deficit motorio e l'apprendimento di un topo Angelman *Ube3a*^{m-/p+} in background C57BL/6J quando somministrata quotidianamente, e lo stesso trattamento non ha alcun effetto sul comportamento motorio e cognitivo di un topo *Ube3a*^{m+/p+} wild type. Poiché il periodo migliore per avviare una strategia di recupero dei deficit comportamentali nel modello AS sembra essere il periodo postnatale [24], abbiamo iniziato il trattamento nel periodo giovanile (tre settimane) non appena i cuccioli sono stati in grado di nutrirsi da soli. Durante la valutazione statistica, i sessi sono stati considerati separatamente per garantire una migliore omogeneità nei gruppi sperimentali e il miglioramento è apparso sostanzialmente sovrapponibile, ad eccezione del test Open Field.

Il recupero del deficit di coordinazione motoria dimostrato dal saggio rotarod si è reso evidente sin dal primo set di test, alla 7^a settimana, suggerendo un forte effetto della taurina su queste abilità; questo punto è supportato dalle prestazioni nel test Open Field in termini di distanza totale percorsa, che rappresenta una misura dell'attenuazione dell'atassia, con un significativo miglioramento nel gruppo femminile e una tendenza al miglioramento nei maschi. Una lieve diminuzione delle prestazioni femminili all'ultimo punto temporale (30^a settimana) può suggerire che il dosaggio potrebbe aver bisogno di essere aggiustato durante un così lungo trattamento cronico. Le variazioni tra il sesso potrebbero essere dovute ad alcuni fattori ambientali, come riportato da Kovacs [30] nei topi C57BL/6J.

Le abilità di memoria e di apprendimento, come mostrato da NORT, hanno riportato le performance del modello sindromico a risultati paragonabili a quelli ottenuti degli animali di controllo, soprattutto nelle ultime due serie di valutazioni, indicando la necessità di un trattamento più lungo per ottenere un miglioramento visibile della disabilità dell'apprendimento. Apparentemente, la somministrazione prolungata di 1g/ Kg/giorno di taurina non ha rivelato alcuna tossicità [15]. La taurina è ben nota per aumentare la neurogenesi delle cellule staminali neurali

dell'adulto [18,31] e per promuovere la neuroprotezione prevenendo (i) l'eccitotossicità indotta da glutammato attraverso la modulazione dell'omeostasi del calcio intracellulare [32], (ii) la disfunzione mitocondriale, esercitando un'attività antiossidante e (iii) l'apoptosi, regolando negativamente molecole che determinano eventi apoptotici [16,17,33,34]. Alcune pubblicazioni riportano i potenziali effetti benefici della taurina nei disturbi cerebrali, come la malattia di Alzheimer [15], la schizofrenia [16] e il neurosviluppo come la sindrome X fragile [23,35]. Tra le molteplici funzioni attribuite alla taurina nei mammiferi, una delle principali è la modulazione della neurotrasmissione del GABA. È stato ipotizzato che il difetto nell'inibizione costitutiva GABAergica caratteristica e condivisa dalle sindromi dell'X Fragile e Angelman può contribuire all'espressione del fenotipo della malattia [11], suggerendo, la possibilità di utilizzare gli agonisti dei recettori GABA come strategia vincente per ripristinare la diminuzione dell'inibizione GABAergica [12]. È interessante notare che la taurina è considerata un ligando endogeno dei recettori extra-sinaptici GABA [36]. Il nostro studio ha dimostrato, per la prima volta, l'effetto benefico della taurina nel migliorare le caratteristiche Angelman dei topi *Ube3a^{m-/p+}* supportando il concetto che la strategia di agonista del recettore GABA può essere efficace. I deficit neurologici nella sindrome di Angelman sono stati associati ad un aumento del livello della proteina Arc (proteina associata al citoscheletro regolato dall'attività) che ha la conseguenza di compromettere il Potenzamento a Lungo Termine (LTP) e alterare il reclutamento della proteina scaffold PSD-95 (postsynaptic density protein 95), un marker di disfunzione sinaptica [26]. Inoltre, l'assenza di UBE3A attiva la via di segnalazione ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinases) [27], che svolge un ruolo rilevante in diversi processi biologici inclusa l'attività sinaptica con un effetto stimolatorio sulla proliferazione delle cellule staminali neurali piuttosto che nella seguente differenziazione [37]. Le nostre analisi biochimiche hanno confermato l'attivazione della via ERK1/2 e un'espressione aumentata della proteina sinaptica PSD-95 come conseguenza del deficit di UBE3A nei topi *Ube3a^{m-/p+}* ed hanno dimostrato che la taurina può ripristinare una normale attività di entrambi i marcatori. Potremmo ipotizzare che l'effetto terapeutico della taurina nel modello Angelman sia in parte conseguente ad un ripristino dell'attività GABAergica extrasinaptica, in quanto la taurina agisce come agonista del recettore GABA ed in parte per via sinaptica come mostrato dai nostri dati sull'attività di ERK1/2 e PSD-95. Il dosaggio di taurina nel cervello intero è rimasto lo stesso negli animali trattati e non trattati, mentre nel siero abbiamo osservato un aumento di 4-6 volte. Questo risultato non è del tutto inaspettato considerando il verificarsi del trasporto attivo di taurina nel cervello, mediato da uno specifico trasportatore saturante di TauT [16]. Sved D.W. et al. [29] hanno studiato nei ratti l'assorbimento e la distribuzione tissutale della taurina in seguito a somministrazione per via orale usando taurina ¹⁴C ed hanno osservato che alcuni tessuti come cervello, cuore, muscoli mostravano un lento aumento della taurina ¹⁴C durante le prime 24 ore e una piccola diminuzione durante le successive 168 h senza modificare la quantità totale di taurina cerebrale. Gli autori hanno ipotizzato che dopo aver superato la barriera emato-encefalica (Blood-Brain-Barrier - BBB), la taurina diventasse parte di un pool endogeno regolato da un trasporto Na⁺/Cl⁻ saturabile all'interno delle cellule cerebrali, il che rende la concentrazione di taurina nel cervello non proporzionale alla concentrazione plasmatica. La stessa evidenza è stata dimostrata in articolo relativo a un modello murino di distrofia di Duchenne [38], nel quale, nonostante il dosaggio molto elevato di taurina somministrato, l'analisi HPLC abbia rivelato per i muscoli una concentrazione costante mentre nel siero e nel fegato appare essere a concentrazione sensibilmente superiore

4. Materiali e metodi

4.1 Animali

Tutti i soggetti in analisi erano topi eterozigoti con deficienza di Ube3a sull'allele materno ($Ube3a^{m-/p+}$) e wild type ($Ube3a^{m+/p+}$) in background C57BL/6J. I topi, sviluppati dal laboratorio Beaudet [39], sono stati acquisiti dai laboratori Charles River. Le femmine $Ube3a^{m-/p+}$ eterozigoti sono state incrociate con maschi di tipo wild type ($Ube3a^{m+/p+}$) per generare topi $Ube3a^{m-/p+}$ e topi wild type. Il 21° giorno dopo la nascita, gli animali sono stati svezzati e genotipizzati mediante PCR (dai tessuti della coda), come descritto in [39]. Gli animali sono stati allevati con un regolare ciclo luce/buio di 12:12 ore (luci alle 07:00), a una temperatura ambiente costante di 22 ± 2 ° C e umidità relativa di circa il 55 ± 10%. Gli animali sono stati alloggiati (n = 4 per gruppo) in gabbie standard. Tutti i topi sono stati riforniti con materiale da lettiera (trucioli di legno duro), cibo ad libitum (Global Diet 2018S, Harlan Italia) e acqua. Tutte le procedure che coinvolgono animali e le loro cure sono state condotte nel rigoroso rispetto delle leggi e delle politiche nazionali e internazionali e approvate dall'Università di Studi di Milano per la cura e l'uso degli animali (IACUC) (Numero di approvazione: 95/14; Data di approvazione: 27 marzo 2014).

4.2 Raccolta di tessuti

Dopo i test comportamentali, i topi della settima e della trentesima settimana sono stati sottoposti ad eutanasia mediante dislocazione cervicale e il cervello è stato immediatamente congelato in ghiaccio secco e conservato a -80 ° C prima del trattamento biochimico e immunostochimico.

4.3 Somministrazione della taurina

La taurina è stata somministrata per via orale mediante acqua potabile a un livello di dose di 1000 mg/kg/giorno dallo svezzamento alle 30 settimane di età. La soluzione a base di taurina è stata preparata fresca due volte a settimana, regolando i volumi e la quantità di taurina disciolta per le variazioni di peso corporeo e l'assunzione di acqua. I pesi corporei sono stati monitorati due volte a settimana per tutti i gruppi trattati. Per garantire che i topi ricevessero la giusta dose richiesta dal protocollo, la quantità effettiva di assunzione di taurina è stata ispezionata ogni giorno per ciascuna gabbia. Gli animali non hanno sospeso la somministrazione di taurina prima dei test, a parte il tempo in cui sono stati addestrati o testati.

4.4 Gruppi sperimentali sottoposti a test

Quattro gruppi sono stati considerati per i test. Gruppo 1: $Ube3a^{m+/p+}$ ha ricevuto solo acqua potabile (controllo); Gruppo 2: $Ube3a^{m+/p+}$ ha ricevuto acqua+taurina; Gruppo 3: $Ube3a^{m-/p+}$ ha ricevuto solo acqua potabile; Gruppo 4: $Ube3a^{m-/p+}$ ha ricevuto acqua+taurina. I maschi e le femmine sono stati analizzati statisticamente separatamente.

4.5 Test comportamentali

I test sono stati eseguiti alla 7^a, 14^a, 21^a e 30^a settimana di vita. L'attrezzatura (ad esempio, l'arena del campo aperto) e tutti gli oggetti che interagiscono direttamente con gli animali sono stati puliti usando alcool etilico al 70% per eliminare gli stimoli olfattivi che potrebbero distrarre/confondere

4.5.1 Rotarod

I topi sono stati testati per l'equilibrio e la coordinazione motoria utilizzando un apparecchio acceleratore Rotarod (modello Ugo Basile 7650). Gli animali sono stati inizialmente addestrati per 4 sessioni a una velocità costante di 4 rpm: se correttamente addestrati sono stati testati due volte (un

test di 5 min) su un rotarod gradualmente accelerato (aumento di 0.3 rpm/s da 3 a 300 rpm) misurando la latenza cadere dalla barra (secondi). Il punteggio finale è stato determinato come la media di 2 prove.

4.5.2 Open Field (OF) e attività locomotoria spontanea

Il test a campo aperto valuta l'attività generale di locomozione, il comportamento esplorativo e il livello di ansia esponendo i topi ad un inesplorato spazio aperto [40]. Abbiamo usato un'arena grigia di 40 cm × 40 cm × 40 cm divisa in 25 caselle uguali con linee nere. Durante il test, rumori e illuminazione sono stati costantemente attenuati per non creare stress artificiale/esterno sui topi. I topi sono stati posizionati al centro del pavimento definito come "punto di partenza" e permesso di esplorare per 5 minuti. I test sono stati video-registrati da un apparecchio video. I parametri del test sono stati ottenuti tramite il software ANY-maze Behavior Tracking automatizzato (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA). Sono stati presi in considerazione la distanza totale percorsa, la distanza percorsa nel quadrato centrale e il numero di sollevamenti sulle zampe posteriori.

4.5.3 Novel-Object Recognition Test (NORT)

Il test di riconoscimento di oggetti nuovi (NORT) è un test di memoria basato sul comportamento spontaneo degli animali [41,42] volto a sfruttare gli atteggiamenti di esplorazione naturale dei topi. Nel presente studio i test sono stati condotti in un'arena a campo aperto (40 cm × 40 cm) divisa in 25 caselle uguali per linee nere. Il primo giorno (giorno 1), gli animali sono stati abituati per cinque minuti in un'arena pulita e vuota: i loro movimenti sono stati registrati come il numero di attraversamenti di linea, che ha fornito un'indicazione di attività motorie sia di tipo selvatico che di topi transgenici. Nel giorno successivo (giorno 2), i topi sono stati riposizionati nella stessa arena contenente due oggetti identici (fase di familiarizzazione), selezionati casualmente da un gruppo di oggetti specifici (un cilindro di gomma rossa (4 cm × 5 cm), una plastica fiala con una tazza bianca (3 cm × 6 cm) e un cubo di plastica (3 cm × 5 cm)) per evitare distorsioni tra gli animali e tra i gruppi. L'esplorazione è stata registrata in un processo di 10 minuti da un investigatore in cieco al genotipo e al trattamento. Nella fase di familiarizzazione, il tempo trascorso esplorando i due oggetti identici (ad esempio, annusando, toccando e stirandosi - ad una distanza minima di 2 cm) è stato registrato e valutato come indagine su oggetto. Il giorno del test (giorno 3), i topi sono stati ancora posizionati nell'arena ed esposti per 5 minuti a due diversi oggetti: uno esibito durante la fase di familiarizzazione, mentre il secondo nuovo e non familiare. Come descritto sopra, il tempo trascorso interagendo con entrambi gli oggetti è stato registrato e valutato. Un limite di 6 secondi è stato applicato al tempo totale di esplorazione (sia durante le fasi di familiarizzazione che di test): i test che non raggiungevano la soglia minima sono stati scartati. L'indice di riconoscimento (RI), espresso come tempo trascorso esplorando il romanzo oggetto (TN) rispetto al tempo totale trascorso esplorando entrambi gli oggetti (TN + TF) è stato stimato.

4.6 Western-blotting

Circa 200 mg di tessuto cerebrale, sono stati rapidamente omogeneizzati in tampone di lisi ghiacciato (Sucrose 0,32 M, Hepes 10 mM pH 7,4, PMSF 0,1 mM, NaHCO₃ 1 mM, in presenza di inibitori della proteinasi e fosfatasi, Complete Mini e PhosSTOP-Roche, Basilea, Svizzera) utilizzando un omogeneizzatore meccanico (Euro Turrax T20b, Ika Labor Technik, Staufen im Breisgau, Germania) a 27.000 giri/min per 1 minuto, tenendo il campione su ghiaccio. Gli omogenati totali sono stati chiarificati mediante centrifugazione a 1000 × g per 5 min a 4 °C per rimuovere il materiale nucleare grezzo (P1). Il supernatante (S1) è stato dosato per il contenuto proteico totale utilizzando un kit di analisi proteica commerciale in base al protocollo del produttore (kit per la determinazione delle proteine DC-BioRad, Hercules, CA, USA). Campioni contenenti 30 µg di proteine sono stati risolti in

sodio dodecil solfato-poliacrilammide all'8% gel in condizioni riducenti e trasferito su membrane di nitrocellulosa (iBlot Gel Transfer Stacks Nitrocellulose-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Le membrane sono state bloccate per 1 ora a temperatura ambiente in soluzione di latte al 5%, TBS (Tris-NaCl, pH 7,5) e tween allo 0,1% (TBT-T) e quindi incubate con anticorpi primari UBE3A (1: 500; policlonale; Proteintech Group, Rosemont, IL, USA), PSD-95 (1: 1000; monoclonale; Millipore, Burlington, MA, USA), p44/42 MAPK (Erk1/2) (1: 2000; policlonale; Cell Signing Technology, Danvers, MA, USA), Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (1: 2000; monoclonale; Cell Signalling Technology), SAPK/JNK (1: 1000; policlonale; Cell signaling Tecnologia), Phospho-SAPK/JNK (1: 1000; policlonale; Cell Signaling Technology) e GAPDH (1: 1500; policlonale; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) a 4 °C durante la notte con il 5% di latte TBS-T soluzione. Successivamente, le membrane sono state lavate e incubate per 1 ora a temperatura ambiente in latte al 5%, soluzione di TBS-T con immunoglobulina G (Millipore) coniugata con perossidasi coniugata o anti-topo come reagenti secondari. Dopo il lavaggio con TBS-T, le membrane sono state trattate con ECL (Novex ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit, Invitrogen). Le pellicole radiografiche sono state esposte in un intervallo lineare. Le bande sono state quantificate utilizzando ImageJ software 1.8.0 (disponibile online: rsb.info.nih.gov/ij/). Il valore di densità di ciascuna banda è stato normalizzato contro la proteina housekeeper GAPDH. I fold change (rispetto al gruppo di controllo) sono stati calcolati come il rapporto tra la media delle densità normalizzate di ciascun gruppo (n per gruppo = 2) e la media dei controlli. Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

4.7 Metodo HPLC

4.7.1 Prodotti chimici e reagenti

Tutti i prodotti chimici e i solventi erano di grado analitico-reagente e usati senza ulteriore purificazione. Il grado di metanolo HPLC proveniva da VWR International, sodio acetato e 2-O-phthaldialdehyde era di Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

4.7.2 Preparazione dei campioni

I cervelli sono stati conservati a -80 ° C fino all'analisi. I tessuti sono stati omogeneizzati in 5 volumi (w/v) di metanolo: 0,1 M Acido perclorico 1: 1 e quindi centrifugati per 5 minuti a 3000 × g a 4 ° C. 40 ml di surnatanti sono stati quindi utilizzati per la procedura di derivatizzazione.

4.7.3 Procedura di derivatizzazione

Gli standard o i campioni erano precolonna derivatizzata con soluzione di reagente 2-O-phthaldialdehyde (OPA). Il reagente di derivatizzazione è stato preparato ogni settimana e protetto dalla luce esposizione, come descritto da Perucho in uno studio precedente [43]. Dopo la derivatizzazione, 35 µl della miscela sono stati iniettati nel sistema analitico.

4.7.4 Sistema cromatografico

Per questo studio è stato utilizzato un sistema HPLC Agilent serie 1100 (Santa Clara, CA, USA) dotato di un rivelatore a fluorescenza (volume della cella di flusso di 8 µL). Le lunghezze d'onda di eccitazione e emissione del rivelatore sono state impostate rispettivamente a 240 e 450 nm. La colonna analitica Synergi Hydro-RP (80 Å, 150 mm × 2 mm × 4 µm) è stata utilizzata come fase stazionaria a temperatura ambiente [44]. I gradienti sono stati preparati con due miscele di solventi degassate. Il solvente A era 0,05 M di tampone di acetato di sodio, pH 5,88 e metanolo (95: 5), e il solvente B era metanolo e acqua bidistillata (70:30). Il programma di gradiente è stato impostato come segue: condizioni iniziali 25% B, passaggio lineare al 25% B da 0,1 a 3 min, gradiente graduale al 33% B in 6,5 min, gradiente graduale al 60% B per 2,5 min di durata, salto al 25% B in 0,1 min; portata di 0,5 ml/min. La concentrazione di taurina è stata calcolata confrontando la soluzione standard esterna calibrata (1 µM).

4.8 Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando l'ambiente di calcolo R e i relativi "pacchetti" specifici. I grafici e istogrammi sono stati generati utilizzando il software GraphPad Prism (V.7). I valori sono presentati come media \pm SEM. Per tutti gli approcci statistici, un valore $p < 0,05$ è stato considerato significativo.

4.8.1 Test comportamentali

I dati sono stati analizzati utilizzando le Equazioni di stima generalizzate Equations (GEE) [45] utilizzando la funzione "geeglm" (libreria "geepack") con una struttura di correlazione di Ordine 1 (AR1) AutoRegressive e link = "identità". Sono stati condotti test χ^2 di Wald per valutare l'effetto del genotipo, del trattamento e del punto temporale (settimana) e delle loro interazioni. Per ciascun punto temporale, le medie di ogni gruppo sono state quindi confrontate usando il metodo di Tukey per regolare i p-value. Per tutti i test comportamentali solo i topi con misurazioni in almeno tre punti temporali sono stati inclusi nelle analisi.

4.8.2 Dosaggio Neurotrasmettitori

Per valutare le differenze nei livelli di neurotrasmettitori (taurina, acido glutammico, glutamina e GABA) nel cervello e nel siero dei topi (solo per taurina), i confronti inter-gruppo sono stati effettuati utilizzando l'ANOVA a due vie, seguito dal test post hoc TukeyHSD.

4.8.3 Western-blot

Sono state analizzate le differenze di cambiamento di piegatura rispetto al gruppo wild type non trattato utilizzando un ANOVA a una via seguito dal test post hoc TukeyHSD.

5. Conclusioni

Questo studio esplora e prova l'effetto terapeutico dell'aminoacido sulfonato taurina, neurotrasmettitore agonista della trasmissione GABAergica coinvolto nella neurogenesi e nella neuroprotezione, in grado di migliorare il deficit motorio e di apprendimento in un modello murino della sindrome di Angelman. L'indagine dei meccanismi coinvolti ha indicato il ripristino dell'attivazione della via ERK e dell'inibizione GABAergica extrasinaptica. Il ruolo ben noto della taurina nel prevenire lo stress ossidativo mitocondriale e l'inibizione dell'apoptosi, nonché il provato potenziamento delle cellule staminali neurali dell'adulto, potrebbero giocare un ruolo nel miglioramento dei deficit comportamentali del modello Angelman.

Ringraziamenti: Vorremmo ringraziare le famiglie di pazienti Angelman per il loro sostegno. Lo studio è stato sostenuto da un Grant O.R.S.A (ORGanizzazione Sindrome di Angelman) all'Istituto Auxologico Italiano e da un grant MOH all'Istituto Auxologico Italiano (08C002).

Contributi degli autori: Silvia Russo e Silvia Michela Mazzola hanno concepito il progetto e progettato gli esperimenti; Sara Guzzetti ha eseguito gli esperimenti di genotipizzazione e western-blot; Lucia Buccarello, Valentina Cesari e Ivan Toschi hanno allevato animali, somministrato la taurina, espanso la colonia e raccolto cervelli; Lucia Buccarello e Valentina Cesari hanno eseguito i test comportamentali; Stefania Cattaldo e Alessandro Mauro hanno eseguito esperimenti HPLC; Silvia Michela Mazzola ha analizzato i video OFT mediante software Any Maze; Luciano Calzari e Francesca Pregnolato, con l'aiuto di Sara Guzzetti e Silvia Michela Mazzola, hanno effettuato le analisi statistiche; Luciano Calzari e Sara Guzzetti hanno preparato tutte le figure e i grafici; Silvia Russo ha raccolto, rivisto e discusso con tutti gli Autori i dati; Silvia Russo ha scritto il manoscritto con l'aiuto di Luciano Calzari, Sara Guzzetti e Lucia Buccarello. Tutti gli autori hanno revisionato il manoscritto.

Conflitti di interesse: gli autori dichiarano di non avere conflitti di interesse.

Abbreviazioni

AS	Angelman Syndrome
UBE3A	Ubiquitin-protein ligase E3A
GABA	Gamma aminobutyric acid
CNS	Central nervous system
OFT	Open field test
NORT	Novel object recognition test
PSD-95	PostSynaptic Density-95
pERK1/2	Phospho-extracellular signal-regulated Kinase
ERK1/2	Total-extracellular signal-regulated Kinase
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HPLC	High performance liquid chromatography

AppendiceA

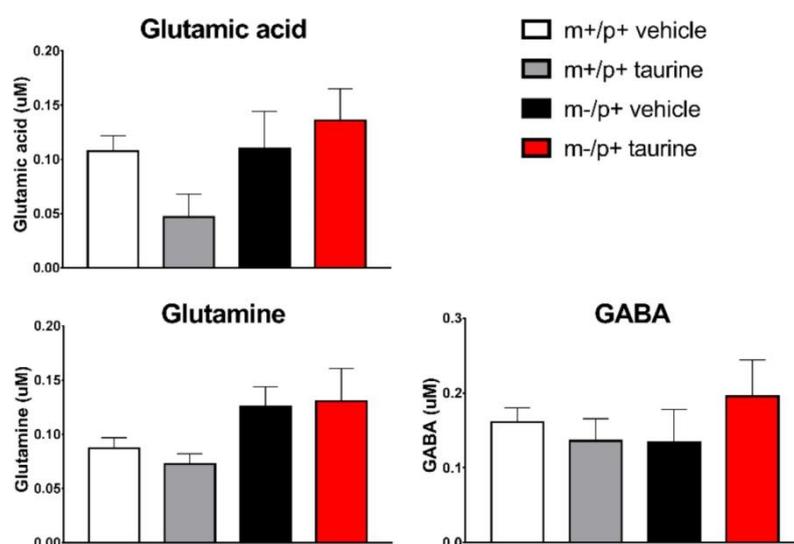


Figure A1. Le misurazioni dei neurotrasmettitori nei cervelli totali non hanno evidenziato differenze statisticamente significative tra I gruppi. Gli esperimenti HPLC sui cervelli totali sono stati condotti per quantificare i livelli di acido Glutammico, Glutamina e acido Gamma-ammino-butirrico (GABA). Numero di cervelli raccolti: wt + vehicle = 13, wt + taurina = 3, *Ube3a*^{m-/p+} + vehicle = 5, *Ube3a*^{m-/p+} + taurina = 6.

Referenze

- Williams, C.A.; Angelman, H.; Clayton-Smith, J.; Driscoll, D.J.; Hendrickson, J.E.; Knoll, J.H.; Magenis, R.E.; Schinzel, A.; Wagstaff, J.; Whidden, E.M.; et al. Angelman syndrome: Consensus for diagnostic criteria. Angelman Syndrome Foundation. *Am. J. Med. Genet.* **1995**, *56*, 237–238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Williams, C.A.; Beaudet, A.L.; Clayton-Smith, J.; Knoll, J.H.; Kyllerman, M.; Laan, L.A.; Magenis, R.E.; Moncla, A.; Schinzel, A.A.; Summers, J.A.; et al. Angelman syndrome 2005: Updated consensus for diagnostic criteria. *Am. J. Med. Genet. Part A* **2006**, *140*, 413–418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Burette, A.C.; Judson, M.C.; Burette, S.; Phend, K.D.; Philpot, B.D.; Weinberg, R.J. Subcellular organization of UBE3A in neurons. *J. Comp. Neurol.* **2017**, *525*, 233–251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Grier, M.D.; Carson, R.P.; Lagrange, A.H. Toward a broader view of Ube3a in a mouse model of Angelman syndrome: Expression in brain, spinal cord, sciatic nerve and glial cells. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0124649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Dagli, A.I.; Mueller, J.; Williams, C.A. Angelman syndrome. In *GeneReviews*(*r*); Adam, M.P., Ardinger, H.H., Pagon, R.A., Wallace, S.E., Bean, L.J.H., Stephens, K., Amemiya, A., Eds.; University of Washington: Seattle, WA, USA, 1993.
6. Margolis, S.S.; Sell, G.L.; Zbinden, M.A.; Bird, L.M. Angelman syndrome. *Neurotherapeutics* **2015**, *12*, 641–650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Roden, W.H.; Peugh, L.D.; Jansen, L.A. Altered GABA(A) receptor subunit expression and pharmacology in human Angelman syndrome cortex. *Neurosci. Lett.* **2010**, *483*, 167–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Santini, E.; Turner, K.L.; Ramaraj, A.B.; Murphy, M.P.; Klann, E.; Kaphzan, H. Mitochondrial superoxide contributes to hippocampal synaptic dysfunction and memory deficits in angelman syndrome model mice. *J. Neurosci.* **2015**, *35*, 16213–16220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Llewellyn, K.J.; Nalbandian, A.; Gomez, A.; Wei, D.; Walker, N.; Kimonis, V.E. Administration of coq10 analogue ameliorates dysfunction of the mitochondrial respiratory chain in a mouse model of angelman syndrome. *Neurobiol. Dis.* **2015**, *76*, 77–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Berkowitz, B.A.; Lenning, J.; Khetarpal, N.; Tran, C.; Wu, J.Y.; Berri, A.M.; Dernay, K.; Haacke, E.M.; Shafie-Khorassani, F.; Podolsky, R.H.; et al. In vivo imaging of prodromal hippocampus ca1 subfield oxidative stress in models of alzheimer disease and angelman syndrome. *FASEB J.* **2017**, *31*, 4179–4186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Judson, M.C.; Wallace, M.L.; Sidorov, M.S.; Burette, A.C.; Gu, B.; van Woerden, G.M.; King, I.F.; Han, J.E.; Zylka, M.J.; Elgersma, Y.; et al. GABAergic neuron-specific loss of Ube3a causes Angelman syndrome-like EEG abnormalities and enhances seizure susceptibility. *Neuron* **2016**, *90*, 56–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Egawa, K.; Kitagawa, K.; Inoue, K.; Takayama, M.; Takayama, C.; Saitoh, S.; Kishino, T.; Kitagawa, M.; Fukuda, A. Decreased tonic inhibition in cerebellar granule cells causes motor dysfunction in a mouse model of Angelman syndrome. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Benitez-Diaz, P.; Miranda-Contreras, L.; Mendoza-Briceno, R.V.; Pena-Contreras, Z.; Palacios-Pru, E. Prenatal and postnatal contents of amino acid neurotransmitters in mouse parietal cortex. *Dev. Neurosci.* **2003**, *25*, 366–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Adedara, I.A.; Abolaji, A.O.; Idris, U.F.; Olabiyi, B.F.; Onibiyo, E.M.; Ojuade, T.D.; Farombi, E.O. Neuroprotective influence of taurine on fluoride-induced biochemical and behavioral deficits in rats. *Chem. Biol. Interact.* **2017**, *261*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Kim, H.Y.; Kim, H.V.; Yoon, J.H.; Kang, B.R.; Cho, S.M.; Lee, S.; Kim, J.Y.; Kim, J.W.; Cho, Y.; Woo, J.; et al. Taurine in drinking water recovers learning and memory in the adult APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 7467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Mezzomo, N.J.; Fontana, B.D.; Kalueff, A.V.; Barcellos, L.J.G.; Rosenberg, D.B. Understanding taurine CNS activity using alternative zebrafish models. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2017**, *83*, 525–539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Leon, R.; Wu, H.; Jin, Y.; Wei, J.; Buddhala, C.; Prentice, H.; Wu, J.Y. Protective function of taurine in glutamate-induced apoptosis in cultured neurons. *J. Neurosci. Res.* **2009**, *87*, 1185–1194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Gebara, E.; Udry, F.; Sultan, S.; Toni, N. Taurine increases hippocampal neurogenesis in aging mice. *Stem Cell Res.* **2015**, *14*, 369–379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Chesnoy-Marchais, D. Persistent GABAA/C responses to gabazine, taurine and β -alanine in rat hypoglossal motoneurons. *Neuroscience* **2016**, *330*, 191–204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Reyes-Haro, D.; Cabrera-Ruiz, E.; Estrada-Mondragon, A.; Miledi, R.; Martinez-Torres, A. Modulation of GABA-A receptors of astrocytes and STC-1 cells by taurine structural analogs. *Amino Acids* **2014**, *46*, 2587–2593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Toyoda, A.; Iio, W. Antidepressant-like effect of chronic taurine administration and its hippocampal signal transduction in rats. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2013**, *775*, 29–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Terrill, J.R.; Pinniger, G.J.; Graves, J.A.; Grounds, M.D.; Arthur, P.G. Increasing taurine intake and taurine synthesis improves skeletal muscle function in the mdx mouse model for Duchenne Muscular Dystrophy. *J. Physiol.* **2016**, *594*, 3095–3110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

23. Neuwirth, L.S.; Volpe, N.P.; Ng, S.; Marsillo, A.; Corwin, C.; Madan, N.; Ferraro, A.M.; El Idrissi, A. Taurine recovers mice emotional learning and memory disruptions associated with fragile X syndrome in context fear and auditory cued-conditioning. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2015**, *803*, 425–438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Silva-Santos, S.; van Woerden, G.M.; Bruinsma, C.F.; Mientjes, E.; Jolfaei, M.A.; Distel, B.; Kushner, S.A.; Elgersma, Y. Ube3a reinstatement identifies distinct developmental windows in a murine Angelman syndrome model. *J. Clin. Investig.* **2015**, *125*, 2069–2076. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Godavarthi, S.K.; Dey, P.; Maheshwari, M.; Jana, N.R. Defective glucocorticoid hormone receptor signaling leads to increased stress and anxiety in a mouse model of Angelman syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *21*, 1824–1834. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Cao, C.; Rioult-Pedotti, M.S.; Migani, P.; Yu, C.J.; Tiwari, R.; Parang, K.; Spaller, M.R.; Goebel, D.J.; Marshall, J. Impairment of TrkB-PSD-95 signaling in Angelman syndrome. *PLoS Biol.* **2013**, *11*, e1001478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Aguilar-Martinez, E.; Morrisroe, C.; Sharrocks, A.D. The ubiquitin ligase UBE3A dampens ERK pathway signalling in HPV E6 transformed HeLa cells. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0119366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Stornetta, R.L.; Zhu, J.J. Ras and Rap signaling in synaptic plasticity and mental disorders. *Neuroscientist* **2011**, *17*, 54–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Sved, D.W.; Godsey, J.L.; Ledyard, S.L.; Mahoney, A.P.; Stetson, P.L.; Ho, S.; Myers, N.R.; Resnis, P.; Renwick, A.G. Absorption, tissue distribution, metabolism and elimination of taurine given orally to rats. *Amino Acids* **2007**, *32*, 459–466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Kovacs, A.D.; Pearce, D.A. Location- and sex-specific differences in weight and motor coordination in two commonly used mouse strains. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 2116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Hernandez-Benitez, R.; Ramos-Mandujano, G.; Pasantes-Morales, H. Taurine stimulates proliferation and promotes neurogenesis of mouse adult cultured neural stem/progenitor cells. *Stem Cell Res.* **2012**, *9*, 24–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. El Idrissi, A. Taurine increases mitochondrial buffering of calcium: Role in neuroprotection. *Amino Acids* **2008**, *34*, 321–328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Prentice, H.; Pan, C.; Gharibani, P.M.; Ma, Z.; Price, A.L.; Giraldo, G.S.; Retz, H.M.; Gupta, A.; Chen, P.C.; Chiu, H.; et al. Analysis of neuroprotection by taurine and taurine combinations in primary neuronal cultures and in neuronal cell lines exposed to glutamate excitotoxicity and to hypoxia/re-oxygenation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2017**, *975*, 207–216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Wu, J.Y.; Wu, H.; Jin, Y.; Wei, J.; Sha, D.; Prentice, H.; Lee, H.H.; Lin, C.H.; Lee, Y.H.; Yang, L.L. Mechanism of neuroprotective function of taurine. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2009**, *643*, 169–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. El Idrissi, A.; Neuwirth, L.S.; L'Amoreaux, W. Taurine regulation of short term synaptic plasticity in fragile X mice. *J. Biomed. Sci.* **2010**, *17*, S15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Kilb, W.; Kirischuk, S.; Luhmann, H.J. Role of tonic GABAergic currents during pre- and early postnatal rodent development. *Front. Neural Circuits* **2013**, *7*, 139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Wang, B.; Gao, Y.; Xiao, Z.; Chen, B.; Han, J.; Zhang, J.; Wang, X.; Dai, J. Erk1/2 promotes proliferation and inhibits neuronal differentiation of neural stem cells. *Neurosci. Lett.* **2009**, *461*, 252–257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Terrill, J.R.; Pinniger, G.J.; Nair, K.V.; Grounds, M.D.; Arthur, P.G. Beneficial effects of high dose taurine treatment in juvenile dystrophic mdx mice are offset by growth restriction. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0187317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Jiang, Y.H.; Armstrong, D.; Albrecht, U.; Atkins, C.M.; Noebels, J.L.; Eichele, G.; Sweatt, J.D.; Beaudet, A.L. Mutation of the Angelman ubiquitin ligase in mice causes increased cytoplasmic p53 and deficits of contextual learning and long-term potentiation. *Neuron* **1998**, *21*, 799–811. [[CrossRef](#)]
40. Seibenhener, M.L.; Wooten, M.C. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J. Vis. Exp.* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Ennaceur, A.; Delacour, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav. Brain Res.* **1988**, *31*, 47–59. [[CrossRef](#)]

42. Antunes, M.; Biala, G. The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn. Process.* **2012**, *13*, 93–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Perucho, J.; Gonzalo-Gobernado, R.; Bazan, E.; Casarejos, M.J.; Jimenez-Escrig, A.; Asensio, M.J.; Herranz, A.S. Optimal excitation and emission wavelengths to analyze amino acids and optimize neurotransmitters quantification using precolumn opa-derivatization by hplc. *Amino Acids* **2015**, *47*, 963–973. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Sanli, N.; Tague, S.E.; Lunte, C. Analysis of amino acid neurotransmitters from rat and mouse spinal cords by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, *107*, 217–222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Zeger, S.L.; Liang, K.Y.; Albert, P.S. Models for longitudinal data: A generalized estimating equation approach. *Biometrics* **1988**, *44*, 1049–1060. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).