

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO
Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari

Dottorato di Ricerca in Scienze Farmacologiche
Ciclo XXVI



TRATTAMENTO CRONICO ED ASTINENZA DA NICOTINA:
EFFETTI *IN VIVO* SULL'ESPRESSIONE DEI RECETTORI COLINERGICI
NICOTINICI E GLUTAMMATERGICI NEL SNC DI RODITORI

Settore disciplinare Bio14

Docente Guida: Dott.ssa Cecilia Gotti

Coordinatore: Chiarissimo Prof. Alberto Panerai

A handwritten signature in black ink, appearing to be "A. Panerai".

Tesi di Dottorato di
Francesco Pistillo
Matricola: R09331

Anno Accademico 2012-2013

A mamma, papà e Federica.

INDICE

1. ABBREVIAZIONI	5
2. RIASSUNTO.....	8
3. INTRODUZIONE	9
4. I RECETTORI COLINERGICI NICOTINICI NEURONALI.....	11
4.1. STRUTTURA ED ULTRASTRUTTURA.....	11
4.2. SITI DI LEGAME E SOTTITIPPI	12
4.3. STECHIOMETRIA.....	14
4.4. BIOGENESI E TRAFFICO	16
4.5. SOTTOTIPI RECETTORIALI NEL SNC	21
5. IL GLUTAMMATO COME NEUROTRASMETTITORE	23
6. I RECETTORI GLUTAMMATERGICI NEURONALI.....	24
6.1. RECETTORI GLUTAMMATERGICI IONOTROPICI (IGLUR).....	25
6.1.1. I RECETTORI SENSIBILI ALL'AMPA (GLUA).....	27
6.1.2. LOCALIZZAZIONE DI AMPAR NEL SNC	29
6.1.3. RECETTORI SENSIBILI ALL'NMDA (GLUN).....	29
6.1.4. LOCALIZZAZIONE DI NMDAR NEL SNC	32
6.1.5. RECETTORI SENSIBILI ALL'ACIDO KAINIKO (GLUK).....	33
6.2. RECETTORI GLUTAMMATERGICI METABOTROPICI	34
6.2.1. STRUTTURA DI MGLUR.....	34
7. PLASTICITA' SINAPTICA	37
7.1. PLASTICITA' MEDIATA DA NMDAR	38
7.2. PLASTICITA' MEDIATA DA MGLUR	41
8. EFFETTI DELLA NICOTINA SUI NACHR	43
8.1. EFFETTI <i>IN VITRO</i>	43
8.2. EFFETTI <i>IN VIVO</i>	44
8.3. MECCANISMI MOLECOLARI COINVOLTI NELLA UP-REGOLAZIONE	45
9. IL SISTEMA MESOCORTICOLIMBICO	47
9.1. RUOLO DEL SISTEMA MESOCORTICOLIMBICO NELL'APPRENDIMENTO CONDIZIONATO	50

9.2. RUOLO DEL SISTEMA MESOCORTICOLIMBICO NELLE DIPENDENZE DA SOSTANZE D'ABUSO	52
9.2.1. TRASMISSIONE GLUTAMMATERGICA.....	53
9.2.2. TRASMISSIONE COLINERGICA	56
10. MATERIALI E METODI.....	58
10.1. PRODUZIONE ANTICORPI POLICLONALI SUBUNITÀ SPECIFICI.....	58
10.1.1. SINTESI PEPTIDI	58
10.1.2. IMMUNIZZAZIONE E PRELIEVO	59
10.1.3. PURIFICAZIONE ANTICORPI.....	59
10.1.4. DETERMINAZIONE DELLA SPECIFICITÀ DEGLI ANTICORPI PRODOTTI... 60	
10.2. ESPERIMENTI <i>IN VIVO</i> SU LINEE MURINE	60
10.2.1. LINEE MURINE	60
10.2.2. SOMMINISTRAZIONE CRONICA DI NICOTINA PER VIA ENDOVENOSA . 60	
10.2.3. ANALISI DEI LIVELLI DI NICOTINA E COTININA PLASMATICA	61
10.2.4. PREPARAZIONE DI OMOGENATI ED ESTRATTI DI TESSUTI NEURONALI62	
10.2.5. PURIFICAZIONE DELLA FRAZIONE SINAPTOSOMALE	62
10.3. ESPERIMENTI BINDING, ANALISI FARMACOLOGICA E BIOCHIMICHE.....	63
10.3.1. ³ H EPIBATIDINA	63
10.3.2. BINDING ALLE MEMBRANE	63
10.3.3. BINDING AI RECETTORI SOLUBILIZZATI.....	64
10.3.4. BINDING DELLA ¹²⁵ I- A BUNGAROTOSSINA.....	64
10.3.5. IMMUNOPRECIPITAZIONE DEGLI ESTRATTI.....	65
10.3.6. DOSAGGIO PROTECO	66
10.3.7. SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING	66
10.3.8. ANALISI DATI	66
11. RISULTATI	68
11.1. SPECIFICITA' ABS	68
11.1.1. ANALISI DELLA SPECIFICITA' DEGLI ANTICORPI MEDIANTE IMMUNOPRECIPITAZIONE.....	68
11.1.2. ANALISI DELLA SPECIFICITA' DEGLI ABSNTICORPI MEDIANTE WESTERN BLOTTING.....	69

11.2. EFFETTI DEL TRATTAMENTO CRONICO CON NICOTINA SULL'ESPRESSIONE DEI RECETTORI COLINERGICI NICOTINICI NEL SNC.....	70
11.2.1. CARATTERIZZAZIONE DEI TOPI WT, HET E KO.....	70
11.2.2. EFFETTO DEL TRATTAMENTO CRONICO CON NICOTINA SULL'ESPRESSIONE DEI NACHR.....	74
11.2.3. EFFETTO DELLA NICOTINA SULLA STECHIOMETRIA DEL RECETTORE $\alpha 4\beta 2$	77
11.2.4. EFFETTO DEL TRATTAMENTO CRONICO E DELL'ASTINENZA DA NICOTINA SULL'ESPRESSIONE DEI NACHR IN STRIATO E VTA.....	78
11.3. EFFETTO DEL TRATTAMENTO CRONICO E DELL'ASTINENZA DA NICOTINA SULL'ESPRESSIONE DEI GLUR	81
11.3.1. CORTECCIA CEREBRALE	81
11.3.2. CORPO STRIATO	83
11.3.3. AREA VENTRALE TEGMENTALE (VTA)	86
12. DISCUSSIONE.....	89
12.1. RUOLO DELLE SUBUNITA' $\alpha 4$ E $\beta 2$ NELL'ASSEMBLAGGIO DEI DIVERSI SOTTOTIPI RECETTORIALI	90
12.2. EFFETTO DEL TRATTAMENTO CRONICO CON NICOTINA SULL'ESPRESSIONE DEI DIVERSI SOTTOTIPI NICOTINICI	92
12.3. EFFETTI DEL TRATTAMENTO CRONICO CON NICOTINA SULL'ESPRESSIONE DEI GLUR E DEI NACHR NELLE AREE DEL SISTEMA MESOCORTICOLIMBICO.....	94
12.4. EFFETTI DELL'ASTINENZA DA NICOTINA SULL'ESPRESSIONE DEI GLUR E DEI NACHR NELLE AREE DEL SISTEMA MESOCORTICOLIMBICO.....	97
13. CONCLUSIONI.....	99
14. BIBLIOGRAFIA.....	101

1. ABBREVIAZIONI

α BgTx (α -Bungarotossina)

Abs/Ab (anticorpi/o)

ABD/LBD (dominio di legame all'agonista/ligando)

AC (adenilato ciclasi)

AChBP (proteina che lega l'acetilcolina)

Amy (amigdala)

BEE (barriera emato-encefalica)

AMP/cAMP (adenosin monofosfato/adenosin monofosfato ciclico)

Cys (cisteina)

CPA (conditioned place aversion)

CPP (conditioned place preference)

CPu (caudato putamen)

CS (collicolo superiore)

CTD (dominio C-terminale)

Ctrl (controllo)

DA (dopamina)

DAG (diacilglicerolo)

DR (recettori della dopamina)

eCB (endocannabinoidi)

epi (epibatidina)

EPSC (correnti eccitatorie postsinaptiche)

Fmol (femtomoli)

fMRI (risonanza magnetica funzionale)

GABAR (recettori del GABA)

GFP (green fluorescent protein)

Glu (Glutammato)

GluR (recettori del Glutammato)

GPCR (recettori accoppiati a proteineG)

Hab (abenula)

Het (eterozigoti)

Hipp (ippocampo)

ICSS (autostimolazione intracranica – intracranial self-stimulation)

IP₃ (inositolo trifosfato)

IPN (nucleo interpeduncolare)

IPSC (correnti inibitorie postsinaptiche)

KO (knock-out)

LDT (nucleo laterodorsale tegmentale)

LTD (depressione a lungo termine - long-term depression)

ms (millisecondi)

MSN (medium spiny neuron)

NAc (nucleus accumbens)

nAChR (recettori colinergici nicotinici)

Nic (nicotina)

NGL (nucleo genicolato laterale)

NTD (dominio N-terminale)

o.d. (densità ottica)

PDI (proteina disulfide isomerasi)

PET (tomografia ad emissione di positroni)

PFC (corteccia prefrontale)

PIP₂ (fosfatidilinositolo bisfosfato)

PKA (protein kinasi cAMP dipendente)

PEI (polietilenimmina)

PKC (protein Kinasi Ca²⁺ dipendente)

PLC (fosfolipasi C)

PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluoride)

PP1 (protein fosfatasi 1)

PPT (nucleo peduncolopontino tegmentale)

PTP (protein tirosin-fosfatasi)

RE (reticolo endoplasmatico)

RER (reticolo endoplasmatico rugoso)
REL (reticolo endoplasmatico liscio)
RMT (nucleo rostromediale tegmentale)
Rpm (rivoluzioni per minuto)
RT (temperatura ambiente)
Ser (serina)
SN (substantia nigra)
SNA (sistema nervoso autonomo)
SNC (Sistema Nervoso Centrale)
STD (depressione a breve termine - short-term depression)
Thr (treonina)
TMD (dominio transmembrana)
Tyr (tirosina)
UPS (sistema ubiquitina proteasoma – ubiquitin-proteasome system)
VTA (Area Ventrale Tegmentale)
WT (wild type)

2. RIASSUNTO

La dipendenza da fumo di sigaretta è un disordine comportamentale causato in prima istanza dall'esposizione cronica alla nicotina, che agendo sui recettori colinergici nicotinici nel SNC, induce una vasta gamma di adattamenti cellulari a carico dei neuroni che compongono il sistema dopaminergico mesocorticolimbico. La riorganizzazione di questo circuito neuronale, media gli effetti di rinforzo associati all'assunzione cronica di nicotina e gli aspetti comportamentali e fisiologici che compaiono durante l'astinenza prolungata, causando in ultima analisi una forma aberrante di apprendimento condizionato, responsabile della dipendenza stessa.

In questo lavoro ci siamo focalizzati sugli effetti molecolari indotti dalla somministrazione cronica e dall'astinenza da nicotina. Questo alcaloide, oltre ad indurre adattamenti neuronali paragonabili a quelli osservati in seguito alla somministrazione di altri psicostimolanti (cocaina, amfetamine) o psicodepressivi (oppioidi, cannabinoidi), esplica la sua azione diretta attivando i recettori colinergici nicotinici neuronali (nAChR) e modulando la trasmissione colinergica e il rilascio di altri neurotrasmettitori, in particolare Dopamina, Glutammato e GABA. Approfondire gli effetti del trattamento cronico e dell'astinenza da nicotina sulla trasmissione colinergica e glutammatergica e chiarire il contributo dei nAChR in questi effetti è l'obiettivo di diversi progetti di ricerca, tra cui quello che verrà descritto in questa tesi di dottorato.

3. INTRODUZIONE

I meccanismi che spingono un essere vivente a ricercare sensazioni “proficue” e ad evitare sensazioni “spiacevoli” sono alla base della perpetuazione della vita e dell’evoluzione delle specie. La ricerca degli ambienti più adatti alla sopravvivenza e la repulsione nei confronti di quelli più ostili, ha infatti permesso alle diverse specie di moltiplicarsi, evolversi ed adattarsi ai cambiamenti esterni. Nel corso dell’evoluzione, lo sviluppo di un sistema nervoso sempre più complesso ha raffinato le capacità di analisi, di integrazione e di risposta agli stimoli ambientali. In animali superiori la capacità di condizionare la risposta ad uno stimolo e di conseguenza l’esistenza di una forma di apprendimento condizionato è stata evidenziata dagli esperimenti condotti da Pavlov nell’ultima decade del 1800. Gli studi condotti negli anni successivi hanno portato all’identificazione di una complessa rete neuronale deputata alla gestione della gratificazione e dei comportamenti ad essa associati: il sistema dopaminergico mesocorticolimbico. Questo circuito nervoso comprende la corteccia prefrontale e l’amigdala, responsabili rispettivamente della risposta razionale ed emotiva ad uno stimolo; lo striato e l’ippocampo coinvolti nell’integrazione della componente motivazionale e delle esperienze pregresse; e l’Area Ventrale Tegmentale, responsabile della modulazione del rilascio di Dopamina e della trasmissione nervosa nelle aree del circuito. Molti studi hanno evidenziato il coinvolgimento di questo sistema neuronale nel processamento e nella risposta a stimoli cruciali per la sopravvivenza, come la ricerca di cibo e l’accoppiamento e nella repulsione verso comportamenti potenzialmente nocivi (Berridge e Kringelbach, 2013).

In questo quadro le sostanze d’abuso assumono una connotazione alquanto particolare. L’esposizione ripetuta a questi composti infatti ne causa un’assunzione compulsiva e sregolata nonostante gli effetti dannosi palesati. Ci si trova quindi di fronte ad una situazione in cui la sensazione piacevole (gratificazione) provocata dall’assunzione di una sostanza d’abuso è talmente forte da rendere marginali gli effetti negativi associati all’assunzione della stessa. Inoltre, l’uso prolungato di questa sostanza può indurre fenomeni di tolleranza che portano ad assumerne quantità sempre maggiori ed infine, durante periodi di astinenza prolungata, si sperimentano sensazioni sia fisiche che psicologiche spiacevoli, che facilitano la ricaduta nel vizio. I

comportamenti compulsivi associati alla ricerca e al consumo di sostanze d'abuso rappresentano diverse sfaccettature di quell'insieme di abitudini che viene comunemente definito dipendenza.

Molti studi sono stati condotti per comprendere le alterazioni molecolari che intervengono nel sistema mesocorticolimbico durante la dipendenza e l'astinenza da una sostanza d'abuso. Sebbene i pareri siano ancora contrastanti, i risultati ottenuti sembrano convergere su un meccanismo d'azione condiviso dalle diverse droghe, supportando l'idea che la dipendenza possa essere considerata come una condizione patologica specifica del SNC (Poerber, 2013; Hyman et al., 2006).

4. I RECETTORI COLINERGICI NICOTINICI NEURONALI

Gli effetti biologici della nicotina sono mediati in primo luogo dalla sua interazione con i recettori colinergici nicotinici neuronali. Questi recettori, strutturalmente simili ai recettori per la Serotonina, per la Glicina e ai recettori GABAA, appartengono alla superfamiglia di recettori canale "CYS-loop" la cui attivazione è mediata dal legame con l'agonista. L'attivazione di questi recettori media la trasmissione sinaptica veloce a livello della placca neuromuscolare e delle terminazioni nervose del SNP, è coinvolta nella modulazione e nell'integrazione di una grande varietà di stimoli a livello del SNC, recenti studi inoltre evidenziano un ruolo di questi recettori nello sviluppo embrionale del SNC, nella risposta infiammatoria e nella carcinogenesi (Gotti et al., 2006; Takarada et al., 2012; Benfante et al., 2011; Campbell et al., 2010).

I nAChR possono ritrovarsi in 4 diversi stati funzionali, in assenza di ligando il canale è chiuso e il recettore si trova in uno stato di riposo (R), in seguito al legame con l'agonista avviene un riarrangiamento strutturale che provoca l'apertura del canale (A) e consente il flusso di cationi monovalenti e/o bivalenti, nell'arco di millisecondi il canale si chiude nonostante l'agonista sia ancora legato con alta affinità, in questo stato il recettore è desensitizzato (D), quando la desensitizzazione si protrae a lungo termine il recettore diventa inattivo (I) (Lena e Changeux, 1998).

4.1. STRUTTURA ED ULTRASTRUTTURA

Da un punto di vista strutturale i nAChRs sono omo- o eteropentameri composti da differenti subunità filogeneticamente correlate. Ad oggi nei vertebrati sono stati clonati 17 geni codificanti per diverse subunità nicotiniche. 5 di queste subunità ($\alpha 1$, $\beta 1$, δ , ϵ , γ) sono espresse nelle cellule muscolari scheletriche e concorrono alla formazione del sottotipo muscolare, le altre 12 risultano essere espresse prevalentemente nei neuroni del SNC ($\alpha 2$ - $\alpha 10$, $\beta 2$ - $\beta 4$) e si assemblano in una grande varietà di sottotipi con caratteristiche biochimiche e farmacologiche peculiari (Corringer et al., 2006). Ogni subunità è composta da un grande dominio N-terminale (NTD) extracellulare che contribuisce alla formazione del sito di legame per l'agonista (LBD), da 4 segmenti transmembrana (TM) e da un dominio C-terminale extracellulare (CTD)(Unwin, 2005). I domini TM2 delimitano le pareti del poro recettoriale e la loro

composizione amminoacidica è responsabile della selettività al passaggio di ioni. In posizione distale, maggiormente esposto ai lipidi di membrana si localizza il dominio TM4. I domini TM1 e TM3 sono collocati in una posizione intermedia tra i precedenti e sono coinvolti nelle interazioni con le altre subunità. Tra il TM3 e il TM4 è presente un dominio intracellulare responsabile della modulazione biochimica e del traffico del recettore (Fig.1)(Millar e Gotti, 2008).

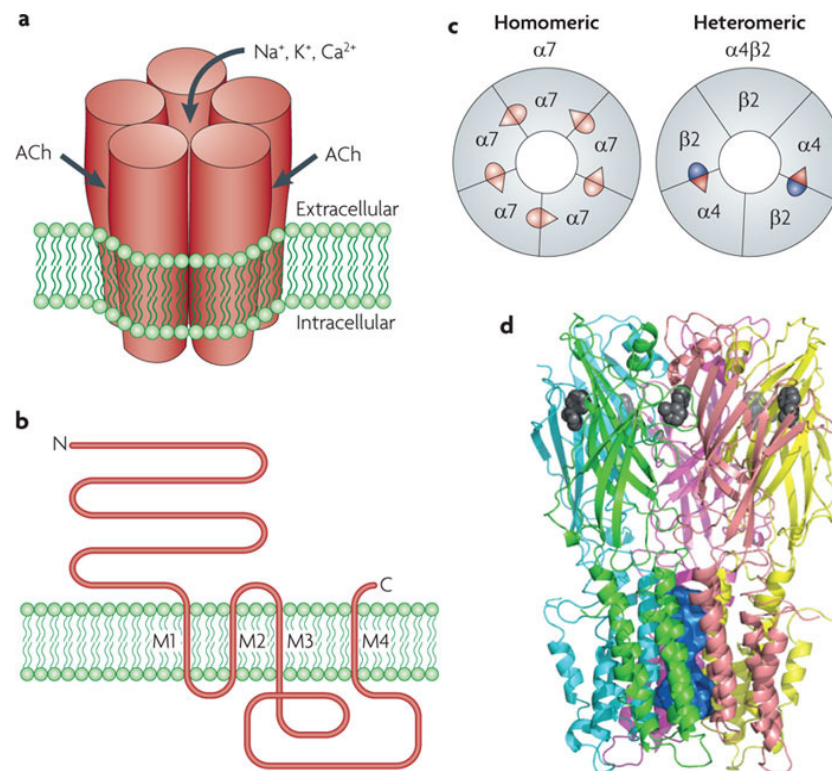


FIGURA 1: Struttura dei nAChR; a) Rappresentazione di un recettore pentamerico ideale; b) Struttura delle subunità dei nAChR, in ordine composta dall'NTD extracellulare, i TMD, il grande loop citoplasmatico tra M3-M4 e il CTD extracellulare. c) Sottotipi recettoriali prevalenti nel SNC; d) Ultrastruttura di un recettore omomero α7, in nero sono mostrate le molecole di nicotina nei siti di legame, in blu scuro è evidenziato il poro-canale. (Changeux et al., 2010)

4.2. SITI DI LEGAME E SOTTOTIPI

I recettori nicotinici neuronali sono stati divisi in due classi in funzione della sensibilità all' α BgTx, nello specifico i recettori omomerici formati dalle subunità $\alpha 7$, $\alpha 9$ e $\alpha 10$ legano la tossina con affinità nM a differenza di quelli eteromerici costituiti da varie combinazioni di subunità α ($\alpha 2$ - $\alpha 6$) e β ($\beta 2$ - $\beta 4$).

Il sito di legame per l'agonista si localizza in tasche idrofobiche situate all'interfaccia tra una subunità α e una β adiacente, che costituiscono rispettivamente la componente primaria (+) e quella complementare (-) del sito di legame. Nei recettori

eteromerici sono stati individuati 2 siti di legame in cui le subunità $\alpha 2$ - $\alpha 4$ o $\alpha 6$ forniscono la componente primaria e le subunità $\beta 2$ - $\beta 4$ quella complementare. Situazione diversa si riscontra per i recettori omomerici in cui le subunità $\alpha 7$, $\alpha 8$ e $\alpha 9$ contribuiscono sia alla componente primaria che a quella complementare, ciascuna di queste subunità si assembla con altre 4 identiche dando origine ad un pentamero che consta di 5 differenti siti di legame (Fig.2)(Gotti et al., 2009). Le subunità che non prendono parte direttamente alla formazione del sito di legame vengono definite accessorie e quando presenti nel recettore ne possono alterare le caratteristiche farmacologiche, la maturazione e la localizzazione subcellulare (Gotti et al., 2007).

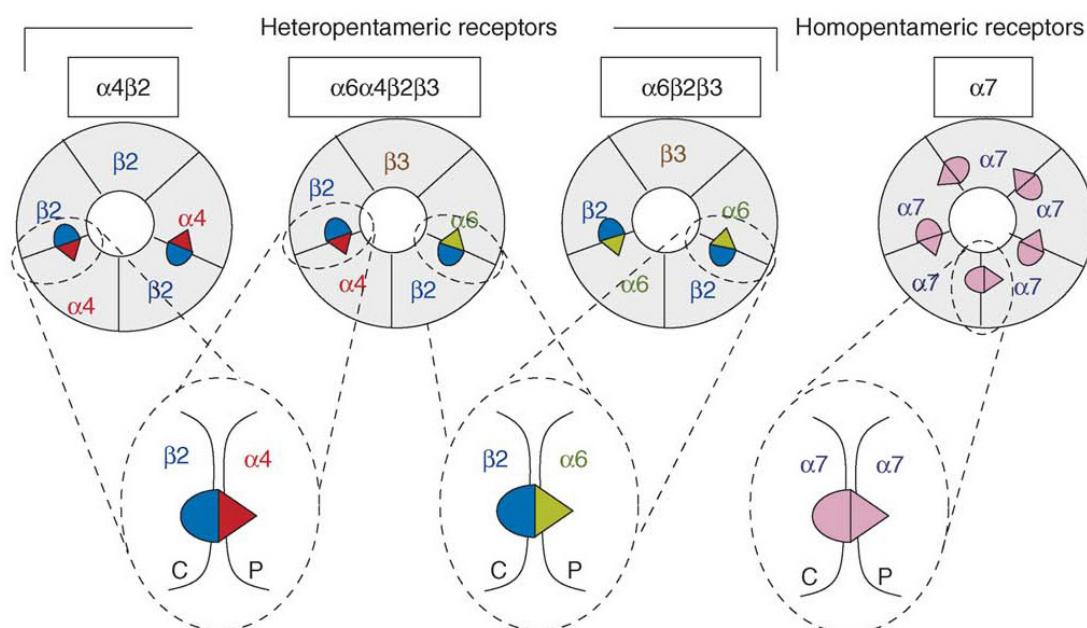


FIGURA 2: Organizzazione dei siti di legame di diversi sottotipi di nAChR; I triangoli rappresentano la componente princilae (P) mentre i semicerchi rappresentano la componente complementare (B); la nomenclatura dei sottotipi dipende dalle subunità che incorporano (Gotti et al., 2006).

Mentre le subunità $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$, e $\beta 2$, $\beta 4$ possono sia partecipare attivamente alla formazione del sito di legame che fungere da subunità accessorie, studi condotti in sistemi eterologhi hanno evidenziato che le subunità $\alpha 5$ e $\beta 3$ formano recettori funzionali solo se coesprese con una subunità primaria ed una complementare, evidenziandone un ruolo esclusivamente accessorio. La funzione di queste ultime è stata studiata sia in linee cellulari HEK stabilmente trasfettate con la subunità $\alpha 5$ o $\beta 3$ che *ex vivo* attraverso studi farmacologici su recettori solubilizzati. I risultati hanno evidenziato che l'incorporazione della subunità $\alpha 5$ nei sottotipi

$(\alpha 4\beta 2)_2\alpha 5$, $(\alpha 3\beta 2)_2\alpha 5$ e $(\alpha 3\beta 4)_2\alpha 5$, ne altera le cinetiche di attivazione e desensitizzazione, ne aumenta la permeabilità al Ca^{2+} e li rende sensibili alla Galantamina, un inibitore delle colinesterasi che è in grado di modulare allostericamente i recettori $\alpha 5^*$ (Kuryatov et al., 2008; Broadbent et al., 2006). La subunità $\beta 3$ *in vitro* viene incorporata in recettori con stechiometrie molto varie, molte delle quali non risultano essere funzionali. Gli studi *ex vivo* evidenziano che fisiologicamente questa subunità si assembla preferenzialmente con la subunità $\alpha 6$ (sottotipo $\alpha 6\beta 2\beta 3^*$), inoltre la ridotta espressione di recettori $\alpha 6^*$ nelle regioni somatodendritiche e nei terminali Dopaminergici di topi $\beta 3\text{KO}$, suggerisce un ruolo di questa subunità nell'assemblaggio, nella maturazione e nella localizzazione dei recettori stessi (Gotti et al., 2009).

E' largamente diffusa l'idea che in sistemi di espressione eterologhi, le subunità coassemblino in combinazioni notevolmente maggiori rispetto a quanto riscontrato in tessuti nativi. Tuttavia lo sviluppo di metodiche sempre più sensibili ha consentito la purificazione di nuovi sottotipi recettoriali, ad esempio è stata osservata l'espressione del sottotipo $\alpha 7\beta 2$ in tessuti cerebrali di roditori, inoltre si suppone che in cellule neoplastiche la subunità $\alpha 7$ possa assemblare con quella $\alpha 5$, se questi dati fossero confermati il sottotipo $\alpha 7\alpha 5$ potrebbe diventare un bersaglio relativamente specifico per le terapie antitumorali (Qiang Liu et al., 2009). Possiamo speculare che molti dei sottotipi recettoriali osservati in sistemi eterologhi, possano essere espressi a bassi livelli anche in tessuti nativi in condizioni fisiologiche o patologiche. Ulteriori studi sono quindi necessari per dimostrare se questi sottotipi "anomali" costituiscano degli artefatti sperimentali, o svolgano una funzione fisiologica in organismi complessi.

4.3. STECHIOMETRIA

Un ulteriore grado di complessità nella struttura dei nAChR si riscontra in quei sottotipi che presentano la stessa composizione in subunità (ad esempio $\alpha 4\beta 2$), ma una diversa stechiometria. Studi condotti in sistemi eterologhi hanno evidenziato che la curva dose-risposta per l'Ach del sottotipo $\alpha 4\beta 2$ presenta un andamento bifasico ad indicare la presenza di due popolazioni recettoriali con diversa sensibilità all'agonista (Cooper et al., 1991; Nelson et al., 2003). In particolare i recettori assemblati esprimendo la subunità $\alpha 4$ a livelli superiori rispetto a quella $\beta 2$, mostrano un'affinità

per l'ACh ($EC_{50} = 100 \mu\text{M}$) minore rispetto ai recettori assemblati esprimendo livelli più alti di subunità $\beta 2$. Questi dati indicano che il sottotipo $\alpha 4\beta 2$ può esistere in due conformazioni alternative $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ o $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ che mostrano proprietà farmacologiche diverse (Fig.3).

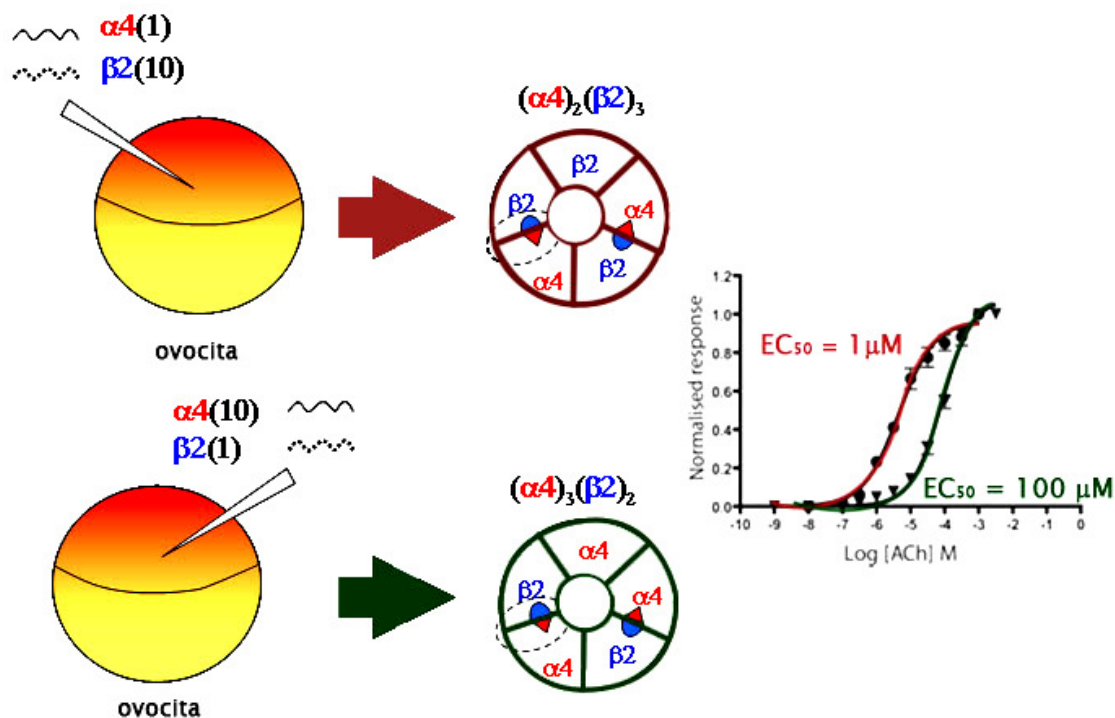


FIGURA 3: Differenti Stechiometrie del sottotipo $\alpha 4\beta 2$, ottenute in oociti di *Xenopus Laevis* trasfettati con cDNA per le subunità $\alpha 4$ e $\beta 2$ in rapporto 1:10 (in rosso) e 10:1 (in verde); a destra è mostrata la curva dose risposta delle stechiometrie $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ (in rosso) e $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ (in verde)

Esperimenti di binding condotti su diverse aree cerebrali di topi $\alpha 4$ e $\beta 2\text{WT}$ o $\alpha 4$ e $\beta 2\text{Het}$ hanno confermato l'espressione delle due stechiometrie anche in tessuti nativi. In condizioni fisiologiche il sottotipo più abbondante nei tessuti neuronali è $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$, ma in condizioni patologiche l'espressione delle due diverse stechiometrie potrebbe essere alterata. Ad esempio studi *in vitro*, hanno dimostrato che il trattamento cronico con nicotina up-regola preferenzialmente il sottotipo $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$, fino ad oggi non è stato possibile replicare questa osservazione in tessuti nativi (Gotti et al., 2008).

Recentemente è stata osservata *in vitro* l'esistenza di due stechiometrie alternative anche per il sottotipo $\alpha 3\beta 4$, il nostro laboratorio è stato in grado di dimostrare che la presenza di nicotina durante l'assemblaggio del recettore favorisce la stechiometria $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$, che appare più stabile e maggiormente traslocata alla membrana plasmatica rispetto alla stechiometria $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$ (Mazzo et al., 2013). Il processo di assemblaggio del recettore pentamerico è un meccanismo molecolare altamente

controllato che necessita di interazioni specifiche tra le subunità e spesso viene facilitato dall'azione di chaperone proteici o molecolari, diverse evidenze sperimentali suggeriscono che la nicotina possa svolgere un ruolo analogo (Lewis et al., 1997; Millar e Harkness, 2008; Kuryatov et al., 2005).

In conclusione, possiamo affermare che l'estrema eterogeneità strutturale e funzionale dei diversi sottotipi nicotinici evidenzia l'importanza e la necessità di un controllo molto raffinato della trasmissione e della risposta colinergica in cellule sia neuronali che non-neuronali.

4.4. BIOGENESI E TRAFFICO

L'assemblaggio dei recettori nicotinici, come quello di molti altri canali ionici, è un processo lento e inefficiente e solo il 30 % delle subunità sintetizzate riesce ad assumere la topologia e le modificazioni post-traduzionali idonee a formare recettori funzionali. La maggior parte delle nostre conoscenze riguardanti la biogenesi dei recettori nicotinici neuronali si basa su studi condotti sul recettore nicotinico muscolare.

Le subunità del recettore nicotinico sono sintetizzate direttamente come proteine transmembrana da polisomi legati alla membrana del reticolo endoplasmatico rugoso (RER). Quindi traslocano nel reticolo endoplasmatico liscio (REL) dove subiscono una N-glicosilazione con oligosaccaridi ad alto contenuto di mannosio, infine cinque subunità interagiscono tra di loro a formare il pentamero. Solo i recettori pentamerici correttamente assemblati, dopo aver mascherato il segnale di ritenzione per il RE e aver esposto particolari segnali di esporto, riescono a lasciare il RE e a raggiungere il Golgi. Nell'apparato di Golgi gli oligosaccaridi legati alle subunità, vengono trasformati in carboidrati complessi prima che il recettore raggiunga la superficie cellulare.

Fattori importanti per l'assemblaggio dei recettori sono la disponibilità di subunità recettoriali e di proteine che favoriscono un corretto folding e promuovono un corretto assemblaggio. Un ruolo molto importante in questo processo è svolto da proteine che sfavoriscono la degradazione via UPS (Ubiquitin-Proteasone System), come ad esempio proteine che impediscono il legame specifico dell'ubiquitina al recettore. L'ubiquitina è una proteina di 76 aminoacidi che regola il turnover di molte

altre proteine cellulari attraverso due meccanismi principali: può venire legata alla proteina di membrana bersaglio (monoubiquitinazione) determinandone l'endocitosi, oppure può venire legata in copie multiple alla proteina bersaglio nel RE (poliubiquitinazione) inducendone la degradazione via proteasoma.

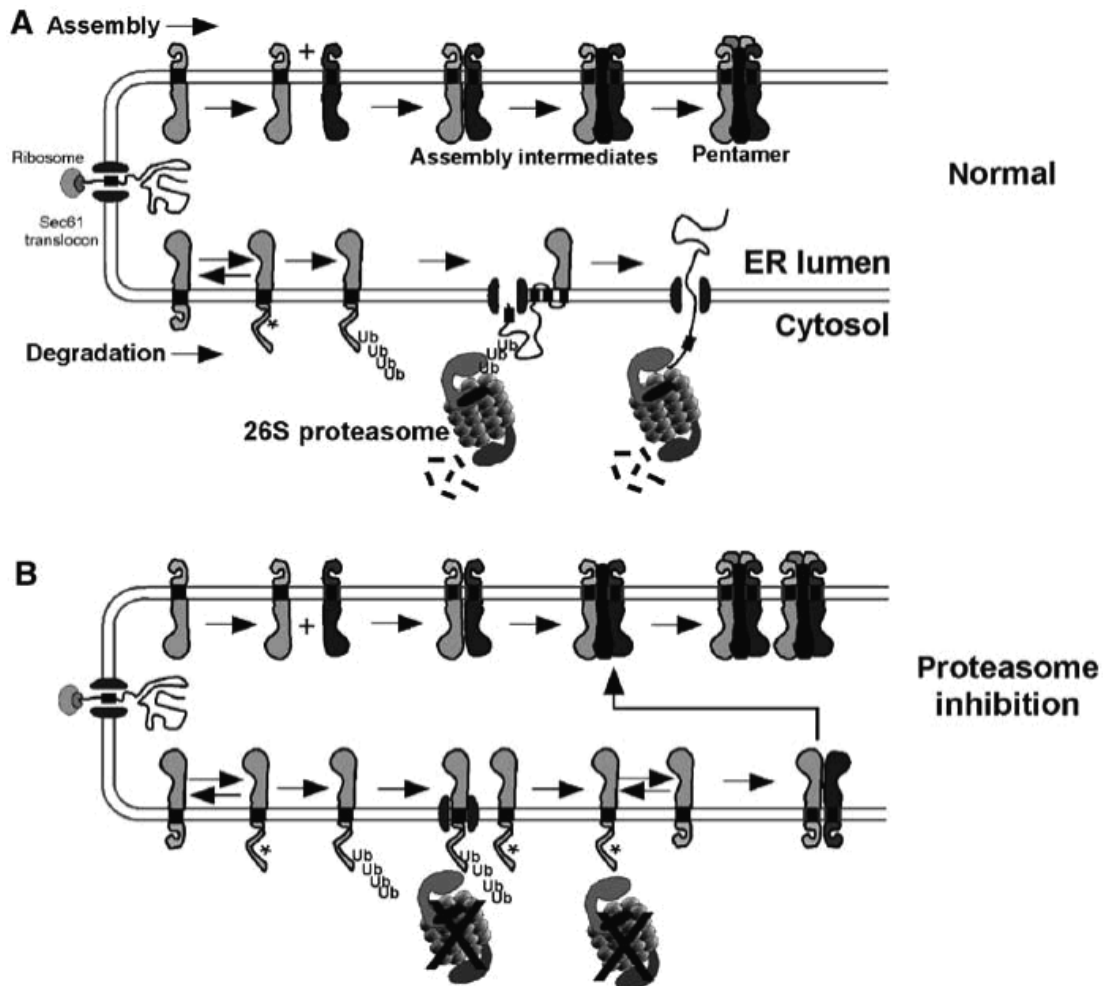


FIGURA 4: Degradazione dei nAChR attraverso la via UPS; (A) modello del processo di assemblaggio (in alto) e della degradazione (in basso) delle subunità recettoriali nel ER, in condizioni fisiologiche solo il 20-40% delle subunità si assembla in un recettore funzionale, le altre vengono traslocate nel citosol e degradate dal sistema UPS; (B) il blocco farmacologico del proteasoma determina l'aumento della concentrazione delle subunità recettoriali disponibili per formare recettori funzionali. (Christianson and Green, 2004)

Come tutte le proteine di membrana presenti sulla superficie cellulare, le subunità del recettore nicotinico sono sintetizzate a livello del RE e poi seguendo la via di esocitosi, passano nell'apparato di Golgi, vengono caricate in vescicole di trasporto e indirizzate verso la membrana plasmatica (Peng et al., 1997; Darsow et al., 2005). La prima tappa di questo trasporto, il passaggio dal RE al Golgi, è soggetta ad una stringente regolazione che consente l'uscita soltanto di proteine o complessi proteici correttamente ripiegati e assemblati. Nel caso in cui una proteina non raggiunga la

conformazione corretta in un certo intervallo di tempo, viene retrotraslocata nel citoplasma, poliubiquitinata e degradata dal proteasoma. Una quota molto elevata di proteine di superficie neosintetizzate, non riesce mai ad uscire dal RE ed è quindi degradata dall'UPS. Studi compiuti su linee cellulari che esprimono recettori nicotinici muscolari hanno evidenziato un ruolo importante dell'UPS nella degradazione e nella regolazione dell'espressione in membrana plasmatica di questi recettori (Fig.4A)(Christianson e Green, 2004). In linee cellulari esprimenti il recettore nicotinico muscolare, è stato infatti osservato un aumento del numero dei recettori presenti sulla superficie cellulare, in seguito a trattamento con farmaci che inibiscono il proteasoma (Fig.4B). Il blocco farmacologico della degradazione provoca l'accumulo di subunità recettoriali, che entrano a far parte del pool intracellulare di subunità e intermedi "competenti" per l'assemblaggio.

L'ubiquilina-1 è una proteina simile all'ubiquitina che interagendo con le subunità degli nAChR, ne modula l'espressione. La coespressione di subunità nicotiniche e di ubiquilina-1 in sistemi eterologhi, riduce notevolmente il numero di recettori espressi sulla membrana plasmatica; questo effetto è stato osservato anche *in vivo*, in neuroni del ganglio cervicale superiore infatti, l'ubiquilina sequestra la subunità $\alpha 3$ riducendo l'assemblaggio e l'espressione in membrana di recettori maturi (Ficklin et al., 2005). Un'altra proteina che regola l'ubiquitinazione delle subunità del recettore nicotinico è UBXD-4. Questa proteina è localizzata nel RE e nel Golgi dove, interagendo con il loop citoplasmatico della subunità $\alpha 3$ ne diminuisce l'ubiquitinazione e la degradazione. L'overespressione di questa proteina in neuroni che esprimono la subunità $\alpha 3$ determina un aumento di nAChR nella membrana plasmatica (Rezvani et al., 2009).

Nel lume del RE sono presenti "proteine residenti", che hanno il compito di assistere il ripiegamento delle proteine neosintetizzate affinché assumano la corretta conformazione spaziale. Tra queste proteine residenti ricordiamo la proteina disulfide isomerasi (PDI), che catalizza l'ossidazione dei gruppi sulfidrilici liberi con la formazione del legame disolfuro (S-S); le proteine BiP/GRP78, ERp57 e la calnexina che interagiscono con le subunità nicotiniche muscolari trattenendole nel RE fino a che non raggiungono la conformazione corretta, e attraverso cicli successivi di associazione-dissociazione, ne regolano il corretto folding ed assemblaggio. In questo modo

incrementano la probabilità che le subunità si ripieghino correttamente e possano quindi formare pentameri maturi. Le proteine residenti del RE conosciute come proteine *chaperone* contribuiscono al mantenimento di un microambiente adatto per il corretto ripiegamento delle subunità del recettore nicotinic. Esperimenti *in vitro* hanno evidenziato che la calnexina, quando cotrasfettata con le subunità del recettore nicotinic muscolare in cellule COS7 e HEK293, ne aumenta il corretto assemblaggio e ne diminuisce la degradazione, inducendo quindi un aumento netto del recettore presente sulla superficie della cellula (Blount e Merlie, 1991; Forsayeth et al., 1992; Gelman et al., 1995; Chang et al., 1997).

Analogamente la proteina citoplasmatica 14-3-3 è uno *chaperone* in grado di legare sia subunità $\alpha 4$ libere che complessi $\alpha 4\beta 2$, aumentandone la stabilità e influenzando il loro livello di espressione sulla superficie cellulare (Jeanclos et al., 2001). E' bene sottolineare che questi recettori $\alpha 4\beta 2$ mostrano una bassa affinità per l'agonista. Questo effetto è mediato dall'interazione della proteina 14-3-3 con uno specifico residuo di serina (sito di fosforilazione per PKA) localizzato nell'ansa citoplasmatica della subunità $\alpha 4$ (Exley et al., 2006).

La maturazione e l'espressione in superficie del recettore omomero $\alpha 7$ è strettamente dipendente dalla presenza di RIC-3, una proteina in grado di interagire con i recettori nicotinici neuronali. Questa proteina viene codificata dal gene *ric-3* ed è stata originariamente identificata in *Caenorabditis Elegans* (resistant to inhibitors of cholinesterase) ma è molto conservata evolutivamente. L'espressione eterologa di RIC-3 aumenta la capacità delle subunità $\alpha 7$ e $\alpha 8$ di assemblarsi in nAChR funzionali in cellule di mammifero altrimenti non permissive e aumenta l'espressione funzionale di alcuni recettori eteromerici ($\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 4\beta 4$) in sistemi *in vitro* (Lansdell et al., 2005). È stato recentemente dimostrato che l'attività di RIC-3 dipende dal suo livello di espressione, in particolare se espressa a bassa concentrazione facilita l'assemblaggio del sottotipo $\alpha 7$, mentre ad alte concentrazioni trattiene le subunità nel RE (Rezvani et al, 2010).

La proteina VILIP-1 è un sensore neuronale del calcio appartenente alla famiglia delle *visinin-like proteins* coinvolto nel traffico dei recettori nicotinici. La coespressione in ovociti di VILIP-1 e del sottotipo recettoriale $\alpha 4\beta 2$, raddoppia la localizzazione sulla

superficie cellulare di questo sottotipo. E' stato osservato che VILIP-1 coimmunoprecipita sia con recettori $\alpha 4\beta 2$ nativi che ricombinanti, inoltre studi di localizzazione hanno dimostrato che questa proteina è presente nell'apparato di Golgi e non nel RE, evidenziando quindi un suo ruolo nel facilitare il trasporto del sottotipo $\alpha 4\beta 2$ dall'apparato di Golgi alla membrana plasmatica. Il loop citosolico tra M3 e M4 delle diverse subunità nicotiniche è molto variabile sia per quanto riguarda la sequenza amminoacidica che per lunghezza ed è coinvolto nel folding, nell'espressione e nel trasporto in membrane dei recettori maturi. In particolare, studi recenti hanno dimostrato che questo loop contiene delle sequenze amminoacidiche (motivi) che favoriscono la ritenzione delle subunità non assemblate o l'esporto dei recettori pentamerici. Se il recettore è correttamente assemblato, vengono mascherate le sequenze di ritenzione, mentre vengono esposti i motivi che favoriscono la concentrazione del recettore in siti di uscita localizzati in zone specifiche del REL denominate "siti di uscita dal reticolo" (*ER-exit sites*) (Wang et al., 2002). Sono state individuate nel loop M3-M4 della subunità $\beta 2$ una sequenza amminoacidica LFM e una sequenza RRQR, che fungono rispettivamente da segnale di esporto e da segnale di ritenzione. Mutazioni nel sito RRQR e inserzioni di ulteriori motivi LFM nella subunità $\beta 2$, portano ad una maggiore espressione del pentamero $\alpha 4\beta 2$ in membrana. Possiamo concludere che quando sono assemblati in modo corretto, i recettori espongono la sequenza di esporto consentendone il legame con la proteina sec24 presente nelle vescicole COPII e vengono quindi trasferiti al Golgi. Nel passaggio attraverso le cisterne dell'apparato di Golgi, gli zuccheri ad alto contenuto di mannosio vengono processati a carboidrati complessi. Successivamente attraverso il trasporto vescicolare lungo la via di esocitosi, i recettori sono trasportati dall'apparato di Golgi alla membrana plasmatica. I recettori di superficie hanno un'emivita di circa 2 settimane che può essere alterata da trattamenti farmacologici o da condizioni patologiche. I nAChR vengono quindi internalizzati in endosomi e riciclati o eventualmente diretti ai lisosomi per la degradazione (Fig.5).

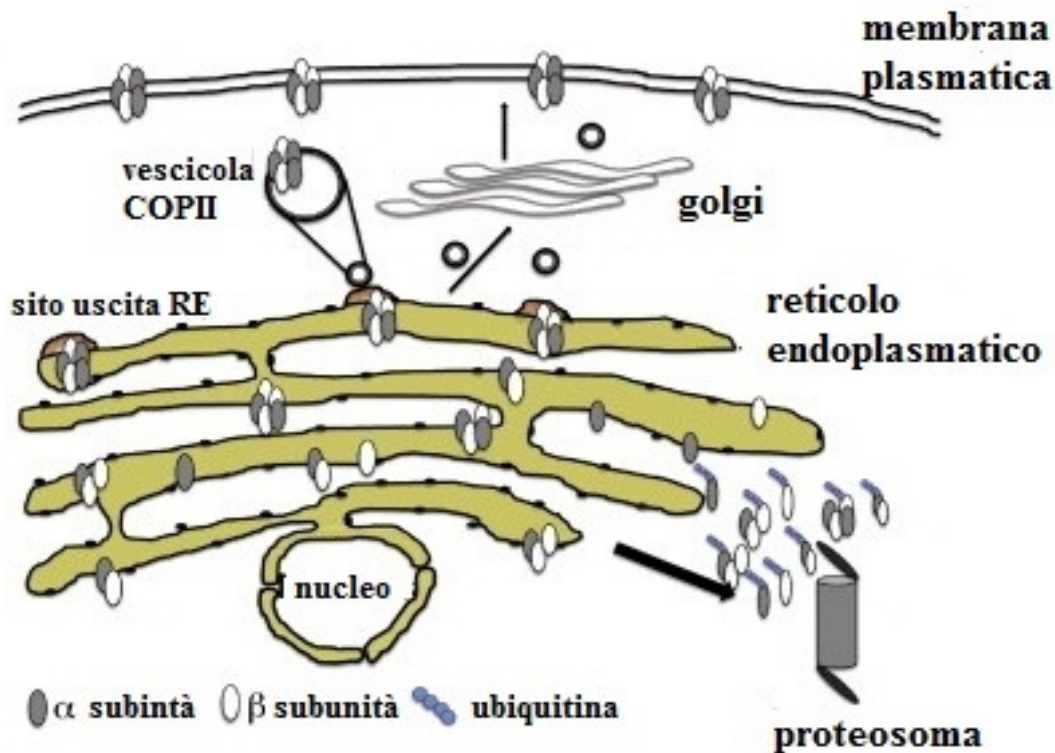


FIGURA 5: Rappresentazione schematica delle vie di assemblaggio trasporto e degradazione dei nAChR neuronali.

Il corretto assemblaggio dei recettori nel RE e il loro trasporto sulla membrana cellulare sono processi essenziali per la funzionalità sinaptica. Quanto detto finora mette in luce un controllo stringente e multifattoriale di questi processi sia durante la sintesi e l'assemblaggio, che durante il traffico lungo la via di esocitosi. Probabilmente la bassa efficienza dei processi di assemblaggio e trasporto è causata dagli stringenti controlli di qualità che la cellula mette in atto per garantire la piena funzionalità dei nAChR che raggiungono la membrana plasmatica (Colombo et al., 2013).

4.5. SOTTOTIPI RECETTORIALI NEL SNC

L'espressione dei diversi sottotipi recettoriali nel SNC è alquanto eterogenea (Fig.6). Applicando tecniche di immunopurificazione, immunoprecipitazione ed immunofluorescenza su cervelli di topi WT, Het, e KO è stato possibile identificare i sottotipi recettoriali presenti nelle diverse aree cerebrali (Fig.6). I dati ottenuti mostrano che i nAChRs maggiormente espressi nel SNC sono il sottotipo omomeroico $\alpha 7$ e il sottotipo eteromeroico $\alpha 4\beta 2^*$ (Picciotto et al., 2001; Gotti et al., 2006). Il primo risulta essere particolarmente espresso nella corteccia, nell'ippocampo nelle regioni limbiche subcorticali e a livelli inferiori nel talamo e nei gangli della base. I recettori $\alpha 7$

possono essere localizzati in presinapsi, dove mediano il rilascio diretto di molti neurotrasmettitori tra cui Glutammato (VTA, Ippocampo e PFCx), DA (NAc, PFCx e VTA), noradrenalina (Ippocampo) e GABA, oppure in postsinapsi e nelle regioni somatodendritiche dove sono coinvolti nella modulazione dell'espressione genica e di diverse vie metaboliche.

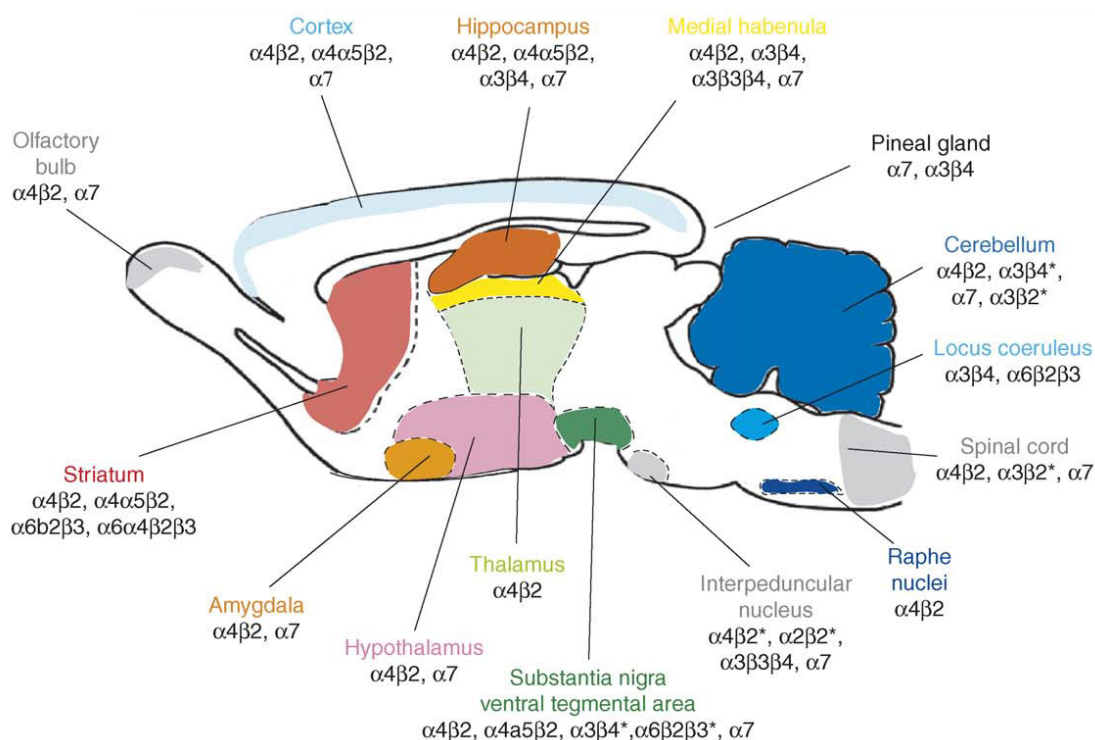


FIGURA 6: Distribuzione dei diversi sottotipi di nAChR neuronali in aree specifiche del SNC murino (Gotti et al., 2006)

I recettori colinergici $\alpha 4\beta 2^*$ sono distribuiti in maniera eterogenea in tutto il cervello di mammiferi e rappresentano circa l'85% dei nAChR eteromerici ad alta affinità nel SNC. Il sottotipo $\alpha 3\beta 4^*$ è predominante nel SNP, nei gangli autonomi e nella porzione midollare del surrene, a livello del SNC questo sottotipo è espresso ad alti livelli nei neuroni della via Abenulo-Interpeduncolare, nella ghiandola pineale e nella retina. Da studi di ibridazione in situ e di immunopurificazione è emerso che il sottotipo $\alpha 2^*$ è espresso ad alti livelli nelle regioni corticali e subcorticali e a livelli inferiori in tutto il cervello di primati, mentre nel cervello di roditori l'espressione è notevolmente ridotta e limitata alla retina e all'IPN (Han et al., 2000; Moretti et al., 2004). I sottotipi $\alpha 6^*$ sono selettivamente espressi nei neuroni dopaminergici, nel locus coeruleus e nei neuroni delle vie ottiche. Grazie all'ausilio di Abs subunità-specifici è stato possibile identificare due sottotipi recettoriali $\alpha 6^*$ nel CS e nel NGL:

$\alpha 6\beta 2\beta 3$ e $\alpha 4\alpha 6\beta 2\beta 3$ (Zoli, 2002; Gotti et al., 2007). Il primo sottotipo presenta due siti identici di legame per l'Ach e mostra un'affinità minore per gli agonisti nicotinici rispetto al secondo sottotipo che presenta due siti di legame differenti. Come detto precedentemente i nAChR $\alpha 6\beta 2^*$ localizzati nelle presinapsi dei terminali dopaminergici della via mesostriatale mediano il rilascio di dopamina nel corpo striato, mentre non è ancora chiarito il ruolo di questi sottotipi nelle presinapsi delle vie ottiche.

5. IL GLUTAMMATO COME NEUROTRASMETTITORE

Il L-Glutammato è un amminoacido polare non essenziale che interviene in una vasta gamma di processi cellulari. Oltre a prendere parte alla sintesi proteica, è noto da tempo il suo coinvolgimento in processi biosintetici come donatore di gruppi amminici (-NH₂) e nel metabolismo cellulare come substrato di enzimi del ciclo di Krebs e del ciclo dell'urea. Le prime speculazioni su un ruolo del Glutammato nel SNC risalgono al 1954, quando Hayashi osservò l'insorgere di convulsioni in seguito all'iniezione intracerebrale e carotidea di glutammato. Nel 1959 Curtis, Phillis e Witkins scoprirono che i neuroni centrali venivano depolarizzati e di conseguenza eccitati dall'applicazione di L-Glutammato, confermandone il ruolo di neurotrasmettitore. Molti studi sono stati condotti negli anni successivi chiarendo il ruolo di questa molecola nella trasmissione neuronale (Watkins e Jane, 2006). Attualmente il glutammato è considerato il principale neurotrasmettitore eccitatorio del SNC ed è stato confermato il suo coinvolgimento in molteplici processi di plasticità sinaptica. Inoltre è stato riportato che una eccessiva stimolazione glutammatergica può indurre citotossicità neuronali attraverso almeno due meccanismi:

- Danno osmotico, causato dall'eccessivo influsso di Na⁺ nella cellula attraverso i canali ionici;
- Danni indotti dall'alterazione dell'omeostasi del Ca²⁺.

Come appena detto, il Glu è il principale neurotrasmettitore eccitatorio nel SNC di mammiferi, ma le sue caratteristiche biochimiche lo rendono impermeabile alla BEE. Per questo motivo viene trasportato nei neuroni centrali come glutamina e convertito in loco ad acido glutammico da una classe di enzimi detti glutamminasi, in alternativa può essere prodotto a partire dal glucosio attraverso il metabolismo

ossidativo e successiva transaminazione. Il primo di questi meccanismi viene messo in atto dalle cellule gliali coinvolte nel reuptake e nel riciclo del Glutammato, la sua rapida rimozione dalla sinapsi è infatti essenziale per evitare gli effetti citotossici appena citati (Watkins, 1972; Curtis e Johnston, 1974).

6. I RECETTORI GLUTAMMATERGICI NEURONALI

Gli effetti centrali del glutammato sono mediati dalla sua interazione con diversi sottotipi recettoriali, che in funzione del meccanismo di trasduzione del segnale sono stati raggruppati in due grandi classi (Fig.7):

- Recettori glutammatergici ionotropici (iGluR), recettori canale tetrameric, la cui attivazione porta all'apertura del poro-canale e all'influsso di cationi mono- e bivalenti;
- Recettori glutammatergici metabotropici (mGluR), recettori associati a proteine-G, la cui attivazione modula molteplici vie metaboliche intracellulari (Hollmann e Heiemann, 1994; Kew e Kemp, 2005).

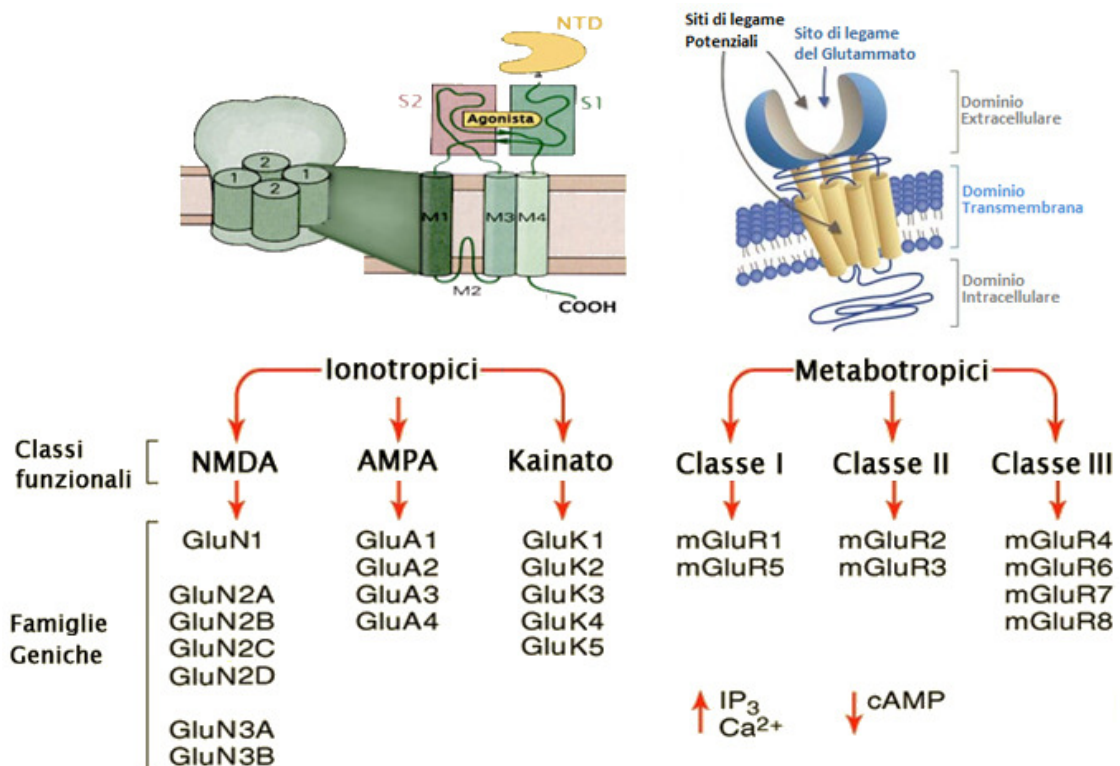


FIGURA 7: Topologia e nomenclatura delle subunità dei GluR ionotropici e metabotropici; struttura schematica di un GluR ionotropico e metabotropico (in alto); famiglie geniche e classi funzionali in cui sono divisi i diversi sottotipi recettoriali.

6.1. RECETTORI GLUTAMMATERGICI IONOTROPICI (IGLUR)

I recettori del glutammato ionotropici sono una famiglia di recettori canale tetramerici permeabili a Na^+ , K^+ , e Ca^{2+} , la cui apertura è mediata dall'interazione con il ligando ortosterico. Sebbene possano essere situati anche nel terminale presinaptico, presentano localizzazione prevalentemente postsinaptica, dove sono coinvolti nella trasmissione eccitatoria veloce e in varie forme di plasticità sinaptica. Il Glutammato rilasciato dal terminale presinaptico interagisce con i relativi recettori evocando una corrente eccitatoria postsinaptica (EPSC) il cui profilo mostra un andamento bifasico. Dopo un iniziale influsso massivo di cationi (pochi ms) mediato dalla repentina

attivazione di AMPAR, questi recettori desensitizzano e contemporaneamente si attivano i NMDAR che sostengono la componente lenta della EPSC. Dopo 50-60ms i NMDAR si chiudono e il flusso di cariche termina.

I recettori del Glutammato sono stati identificati verso la fine degli anni '50, inizialmente furono classificati in funzione della sensibilità al N-metil-D-aspartato (NMDA) in recettori NMDA-sensibili e NMDA-non sensibili (Curtis e Watkins, 1960). Gli studi successivi e la sintesi di diverse molecole dalle caratteristiche farmacologiche peculiari, hanno reso possibile l'identificazione e la classificazione di tre sottoclassi recettoriali:

- NMDAR: recettori sensibili al N-metil-D-aspartato (NMDA)
- AMPAR: recettori sensibili all'acido α -amino-3-idrossi-5-metilisoxazolo-4-propionico (AMPA)
- KAINATO: recettori sensibili all'acido kainico

Ad oggi sono stati clonati 16 geni codificanti per le differenti subunità. L'allineamento delle sequenze geniche clonate ha evidenziato notevoli analogie strutturali, che sostengono la teoria che i diversi sottotipi si siano originati per divergenza evolutiva da un progenitore comune (Seeburg, 1993).

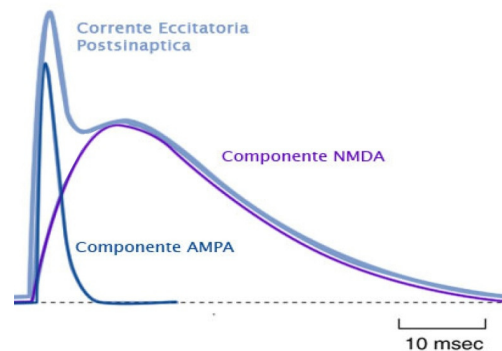


FIGURA 8: Perfil de las Corrientes Excitatorias PostSinápticas (EPSCs) generadas en respuesta al rilascio de Glutammato dal terminale presinaptico (in celeste); in viola e in blu sono mostrate le componenti delle EPSCs mediate rispettivamente da (NMDAR) e (AMPA).

Dal punto di vista strutturale il recettore canale è un tetramero, composto da subunità identiche (omotetramero) o differenti (eterotetramero), che si assemblano in due passaggi successivi. Inizialmente due subunità interagiscono formando un dimeri, successivamente due dimeri si organizzano delimitando il poro centrale e dando origine al recettore maturo. Uno studio recente mirato a chiarire il meccanismo di assemblaggio, ha evidenziato che gli eterotetrameri si assemblano a partire da eterodimeri (Paoletti et al., 2012). Le diverse subunità presentano una struttura modulare condivisa che consiste di un grande dominio N-terminale (NTD) extracellulare che oltre ad essere coinvolto nell'assemblaggio e nella modulazione dei diversi sottotipi, presenta il sito di legame per i modulatori allosterici; un dominio extracellulare di legame per l'agonista (ABD) conosciuto anche come dominio S1-S2; un dominio transmembrana (TMD) composto da 3 α -eliche integrali (M1, M3 e M4) e da una breve loop (M2) che costituisce il filtro di selettività ionica; infine un dominio C-terminale (CTD) di dimensioni variabili che presenta diversi siti di fosforilazione ed è coinvolto nella modulazione, nel traffico e nella localizzazione del recettore (Madden, 2002). La recente cristallizzazione del sottotipo omomero GluA2 di AMPAR ha rappresentato un punto di svolta per la risoluzione della struttura dei recettori ionotropici, in particolare i dati ottenuti mostrano che la regione del poro presenta una struttura molto più compatta e simmetrica rispetto ai domini extracellulari, inoltre le interazioni tra gli NTD delle diverse subunità risultano relativamente limitate rispetto a quanto ipotizzato in precedenza (Sobolevsky et al., 2009).

La grande eterogeneità strutturale e funzionale dei diversi sottotipi recettoriali è sostenuta sia dal gran numero di subunità, che da modificazioni traduzionali e post-trascrizionali. Ad esempio i pre-mRNA di alcune subunità possono andare incontro ad un processo di *editing nucleotidico* che produce l'incorporazione di un Arginina (R) nel recettore maturo mentre il DNA genomico in quel sito codificherebbe per una Glutamina (Q). Il punto in cui avviene l'editing nucleotidico prende il nome di sito Q/R e sembra essere coinvolto nella regolazione dello sviluppo neuronale e nella selettività ionica dei recettori contenenti la subunità GluA2 (Seeburg et al., 1998).

Da un punto di vista farmacologico in assenza di ligando il canale è chiuso e il recettore si trova in uno stato di riposo (R), in seguito al legame dell'agonista il

recettore passa in uno stato attivato (A) e il canale si apre consentendo il flusso di ioni. Dopo un intervallo di 1-100ms in funzione del sottotipo recettoriale, il canale si richiude mentre il sito di legame è ancora occupato, impedendo il legame con un'altra molecola di agonista. In questa condizione il recettore è in uno stato desensitizzato (D) (Talukder et al., 2010)

6.1.1. I RECETTORI SENSIBILI ALL'AMPA (GLUA)

Gli AMPAR sono una famiglia eterogena di omo- o eterotetrameri composti da 4 subunità di circa 100 kDa identificate come GluA1-2-3-4. Come accennato precedentemente questi recettori mostrano una rapida cinetica di attivazione e desensitizzazione che giustifica la componente veloce della EPSC glutammatergica. Le caratteristiche farmacologiche degli AMPAR differiscono notevolmente in funzione dei sottotipi presi in esame e delle modificazioni post-trascrizionali a carico delle diverse subunità. Ad esempio la lunghezza del CTD di alcune subunità è determinata da variazioni nello splicing dei trascritti primari. E' stato dimostrato che la lunghezza del CTD influenza il turnover di AMPAR, nel dettaglio il CTD lungo ne riduce il turnover. Questo meccanismo potrebbe spiegare alcune forme di LTP, mediate dall'espressione in sinapsi di recettori composti da subunità con il CTD più lungo (Sprenger e Seeburg, 1998).

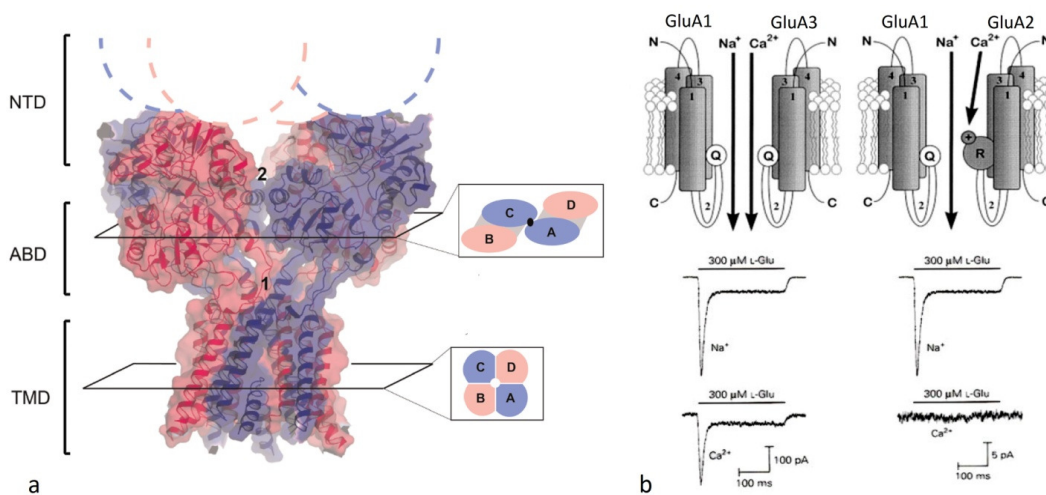


FIGURA 9: Struttura dei AMPAR; a) Ultrastruttura della subunità GluA2 di AMPAR ottenuta attraverso diffrazione dei raggiX su recettore cristallizzato, sono evidenziati i domini funzionali di AMPAR; b) Sottotipo GluA1/GluA3* (sinistra) e GluA1/GluA2 (destra), in basso sono riportate le conduttanze per il Na⁺ e per il Ca²⁺ dei due sottotipi. E' chiaro che l'editing nucleotidico del sito Q/R della subunità GluA2 rende i recettori impermeabili al Ca²⁺ (Hattori et al., 2012; Paoletti et al., 2012).

E' noto che in seguito a splicing alternativo degli esoni 14 e 15 vengono espresse rispettivamente le isoforme "Flip" e "Flop" delle subunità di AMPAR. L'incorporazione nel tetramero della variante "Flip" conferisce al recettore una cinetica di attivazione più rapida e di desensitizzazione più lenta, questi recettori inoltre mostrano un traffico più efficiente verso la membrana plasmatica (Keinanen et al., 2006). Infine durante lo sviluppo l'isoforma "Flip" è più espressa rispetto all'isoforma "Flop", mentre nell'adulto i livelli di espressione delle due varianti di splicing sono relativamente simili. Questa osservazione è stata confermata da evidenze sperimentali che suggeriscono il coinvolgimento dei recettori che contengono subunità "Flip" nella crescita e nella maturazione dei neuroni neocorticali durante il periodo prenatale.

Un livello ulteriore di eterogeneità dei AMPAR è legato all'*editing nucleotidico* dei trascritti primari della subunità GluA2. La deamminazione di una adenosina ad inosina, catalizzata dall'enzima adenosina deamminasi, porta all'espressione di una Arginina nel segmento M2 del recettore maturo, mentre il DNA genomico in quella posizione codificherebbe per una Glutamina. Gli AMPAR che incorporano la subunità editata sono impermeabili al Ca^{2+} e di conseguenza non mediano le risposte metaboliche legate all'omeostasi del Ca^{2+} stesso. Questa proprietà assume un ruolo cruciale durante periodi di sinaptogenesi e di maturazione dell'albero dendritico, l'alterazione dell'*editing* del sito Q/R in età prenatale sembra essere correlata a crisi epilettiche e a deficit nella architettura e nella funzionalità sinaptica (Wahle et al., 2011).

In sede post-traduzionale gli AMPAR sono oggetto di altre modifiche quali N- e O-glicosilazioni e fosforilazioni (Hollmann et al., 1994a). In particolare la fosforilazione della Serina845 della subunità GluA1 regola l'espressione in superficie dei sottotipi GluA1* ed è coinvolta nei meccanismi di plasticità sinaptica che occorrono durante la dipendenza e l'astinenza da cocaina, amfetamine ed eroina (Nicoll e Huganir, 2013; Cai et al., 2013).

Quanto detto finora si riflette in una grande eterogeneità strutturale e funzionale di AMPAR. Le risposte agli agonisti variano tra i diversi sottotipi e tra isoforme diverse di uno stesso sottotipo, questa flessibilità nella risposta farmacologica conferisce agli AMPAR un ruolo importante nel corretto sviluppo del SNC e nei fenomeni di plasticità sinaptica che si instaurano durante l'apprendimento.

6.1.2. LOCALIZZAZIONE DI AMPAR NEL SNC

Studi di binding con ^3H -AMPA hanno evidenziato che questa classe di recettori è distribuita in maniera diffusa nel SNC e che i livelli di espressione variano in funzione delle regioni cerebrali analizzate. I livelli di espressione più alti si osservano nello strato radiato e nel giro dentato dell'ippocampo, in corteccia cerebrale e nello strato molecolare del cervelletto. In particolare il sottotipo prevalente in Ippocampo è l'eterotetramero GluA1/GluA2, mentre i recettori GluA3* sono espressi ad alti livelli solo nel Nucleo Gracile e nel Nucleo Cuneato. La subunità GluA4 è espressa soprattutto nei primi stadi dello sviluppo neuronale e viene sostituita dalla GluA1 nel SNC adulto, suggerendone quindi un ruolo nello sviluppo del SNC. Per quanto concerne la Corteccia Cerebrale, sono stati riportati alti livelli di espressione dei sottotipi GluA1* e GluA2/3* negli interneuroni GABAergici e negli interneuroni eccitatori, mentre i neuroni colinergici esprimono indiscriminatamente le diverse subunità. Va sottolineato che indipendentemente dalla regione cerebrale la maggior parte di AMPAR incorpora la subunità GluA2 e risulta, quindi impermeabili al Ca^{2+} . Ulteriori studi si rivelano necessari per chiarire la stechiometria e la localizzazione subcellulare dei sottotipi di AMPAR nelle diverse aree del SNC (Lu et al., 2009).

6.1.3. RECETTORI SENSIBILI AL NMDA (GLUN)

I NMDAR sono una classe di recettori glutammatergici ionotropici caratterizzati da proprietà farmacologiche e biochimiche peculiari. In primo luogo sono gli unici GluR che necessitano del legame di un agonista e di un coagonista, rispettivamente Glutammato e Glicina, per essere attivati. Inoltre mostrano elevata permeabilità al Ca^{2+} , che attivando la cascata delle PK (protein kinasi) determina il coinvolgimento di questi recettori in molteplici processi cellulari tra cui il differenziamento, la maturazione e la migrazione di cellule nervose, i fenomeni di plasticità sinaptica associati ad alterazioni della conduzione glutammatergica, l'effetto eccitotossico indotto dalla iperattivazione dei GluR e la modulazione della trascrizione di geni coinvolti nell'apprendimento e in generale nel rimodellamento della circuiteria del SNC (Paoletti, 2011; Seeburg, 1993).

Un'altra caratteristica distintiva è il blocco voltaggio dipendente del canale da parte del Mg^{2+} . La presenza di questo ione nel poro, impedisce l'attivazione degli

NMDAR in cellule postsinaptiche non depolarizzate, sincronizzando in questa maniera l'attivazione della pre- e della postsinapsi e fornendo un supporto molecolare alla teoria di Hebb secondo cui l'azione di una sinapsi risulta essere rinforzata dall'attivazione simultanea di neuroni pre- e postsinaptici. Inoltre la lenta cinetica di attivazione e desensitizzazione, consentendo il flusso di cariche per decine di millisecondi, permette l'integrazione degli stimoli afferenti per un lasso di tempo relativamente lungo. E' bene notare che le sinapsi in cui sono espressi solo NMDAR sono funzionalmente inattive e vengono definite silenti. Attraverso meccanismi ancora poco chiari, che probabilmente coinvolgono alterazioni nell'espressione o nella fosforilazione di AMPAR, la stimolazione degli NMDAR espressi dalle sinapsi quiescenti ne può provocare l'attivazione. Questo meccanismo sembra essere alla base dei fenomeni di rimodellamento neuronale, l'attivazione selettiva di un NMDAR sarebbe in grado infatti di riattivare in maniera altamente specifica la sinapsi in cui è espresso, consentendo un controllo accurato delle connessioni sinaptiche (Gray et al., 2011).

Da un punto di vista strutturale gli NMDAR risultano essere degli eterotetrameri alla cui formazione concorrono diverse subunità divise nelle sottoclassi principali GluN1, GluN2, GluN3 (Mori e Mishina, 1995). La prima annovera al suo interno solo la subunità GluN1, di cui però sono state identificate almeno 8 differenti varianti di splicing, con specifiche caratteristiche funzionali e strutturali. Questa subunità è un costituente obbligato di tutti i NMDAR in quanto porta il sito di legame per la Glicina (Johnson e Ascher, 1987; Madden, 2002). L'incorporazione differenziale delle subunità GluN2A-D o GluN3A-B identifica i diversi sottotipi e ne caratterizza le proprietà farmacologiche e biochimiche. Sebbene le subunità GluN2 contengano il sito di legame per il glutammato, esperimenti *in vitro* hanno evidenziato che il loro assemblaggio in omotetrameri da origine a recettori non funzionali. Al contrario gli omotetrameri GluN1 risultano funzionali nonostante mostrino una conduttanza decisamente inferiore rispetto agli eterotetrameri GluN1/GluN2 (Fig.10)(Paoletti, 2011).

L'assemblaggio degli NMDAR avviene in maniera analoga a quanto descritto per gli AMPAR, inizialmente due subunità si assemblano per formare degli eterodimeri, successivamente due eterodimeri interagiscono per dare origine al recettore maturo. Uno studio condotto da Paoletti et al., ha chiarito che le subunità che compongono il

recettore si dispongono in maniera alternata GluN1/2/1/2, e assumono una conformazione sfalsata che porta l'ABD delle subunità GluN1 in posizione prossimale rispetto all'asse centrale del poro, mentre le subunità GluN2 sono localizzate in posizione distale. Il CTD delle diverse subunità presenta numerosi residui di ser/thr (Serina/Treonina) o tyr (Tirosina), la cui fosforilazione influenza il traffico, la localizzazione e la stabilità dei diversi sottotipi recettoriali, mentre le caratteristiche farmacologiche sono regolate prevalentemente dal NTD (Madry et al., 2007).

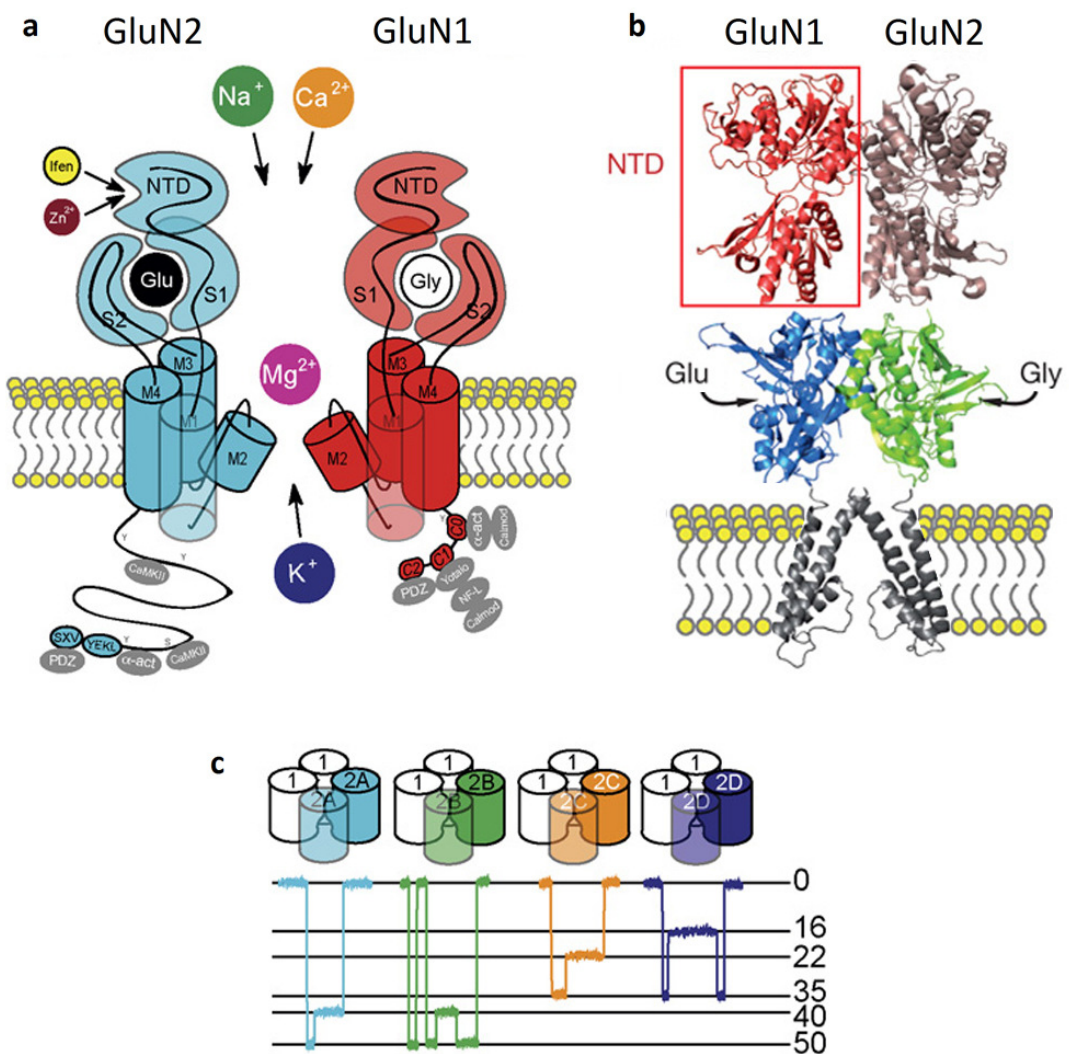


FIGURA 10: Struttura e Funzionalità dei NMDAR; a) Rappresentazione schematica dell'organizzazione strutturale dei NMDAR, sono evidenziati i siti di legame per gli agonisti (S1-S2) e per i modulatori allosterici, l'NTD extracellulare, i TMD e il CTD intracellulare; b) rappresentazione schematica dell'ultrastruttura dei NMDAR, sono evidenziati i siti di legame per gli agonisti, l'NTD e i TMD; c) profili delle correnti eccitatorie postsinaptiche condotte dai diversi sottotipi di NMDAR (Cull-Candi e Leszkiewicz, 2004).

Come accennato in precedenza, gli NMDAR nativi sono sempre degli eterotetrameri in cui le subunità GluN1 e GluN3 portano il sito di legame per la glicina e la subunità GluN2 porta il sito di legame per il glutammato. Le proprietà intrinseche

dei diversi sottotipi recettoriali sono determinate dalla composizione in subunità e dalla stechiometria con cui queste interagiscono, ad esempio i sottotipi GluN1/GluN2C* ed GluN1/GluN2D* risultano meno sensibili al blocco da Mg^{2+} e mostrano una minore conduttanza al Ca^{2+} e in generale a tutti gli ioni inferiore rispetto ai sottotipi GluN1/GluN2A* ed GluN1/GluN2B* (Paoletti, 2011).

6.1.4. LOCALIZZAZIONE DI NMDAR NEL SNC

Gli NMDAR sono espressi in maniera eterogenea nel SNC. In particolare la subunità GluN1, costituente fondamentale dei recettori, è sempre espressa ad alti livelli in tutto il SNC e si ha un controllo regione-specifico delle varianti di splicing (Laurie e Seeburg, 1994). Le diverse subunità GluN2 e GluN3 invece, sono espresse in maniera differente sia nelle diverse aree cerebrali, che durante le fasi dello sviluppo neuronale. Evidenze sperimentali dimostrano che nel periodo prenatale vengono espressi esclusivamente recettori contenenti le subunità GluN2B e GluN2D, col procedere dello sviluppo postnatale si osserva la riduzione del sottotipo GluN1/GluN2B* e la scomparsa quasi completa del sottotipo GluN1/GluN2D*, che vengono sostituiti rispettivamente dai sottotipi GluN1/GluN2A e GluN1/GluN2C (Fig.11)(Akazawa et al., 1994).

In maniera analoga le subunità GluN3A e GluN3B sono espresse in maniera opposta durante le diverse fasi dello sviluppo, e si osserva una graduale sostituzione della subunità GluN3A con quella GluN3B. La differente espressione temporale dei sottotipi riflette il loro ruolo nei processi di plasticità e maturazione sinaptica, infatti molti studi hanno dimostrato un ruolo importante delle subunità GluN2B e GluN3A sia nello sviluppo neuronale che nel rimodellamento sinaptico. Per quanto riguarda la localizzazione cellulare, gli NMDAR sono espressi prevalentemente a livello della postsinapsi, ma sono stati identificati anche in regioni perisinaptiche, extrasinaptiche e presinaptiche. La composizione in subunità varia anche il relazione alla localizzazione subcellulare, ad esempio i recettori NR2B* sono molto espressi in extrasinapsi, tuttavia ad oggi non è stata individuata una regola o una discriminante precisa nella localizzazione subcellulare dei diversi sottotipi (Cull-Candy e Leszkiewicz, 2004; Kohr, 2006).

Recentemente nella glia e negli oligodendrociti è stata osservata l'espressione di sottotipi recettoriali che incorporano le subunità GluN3 e che sembrano coinvolti nella deposizione della mielina (Burzomato et al., 2010).

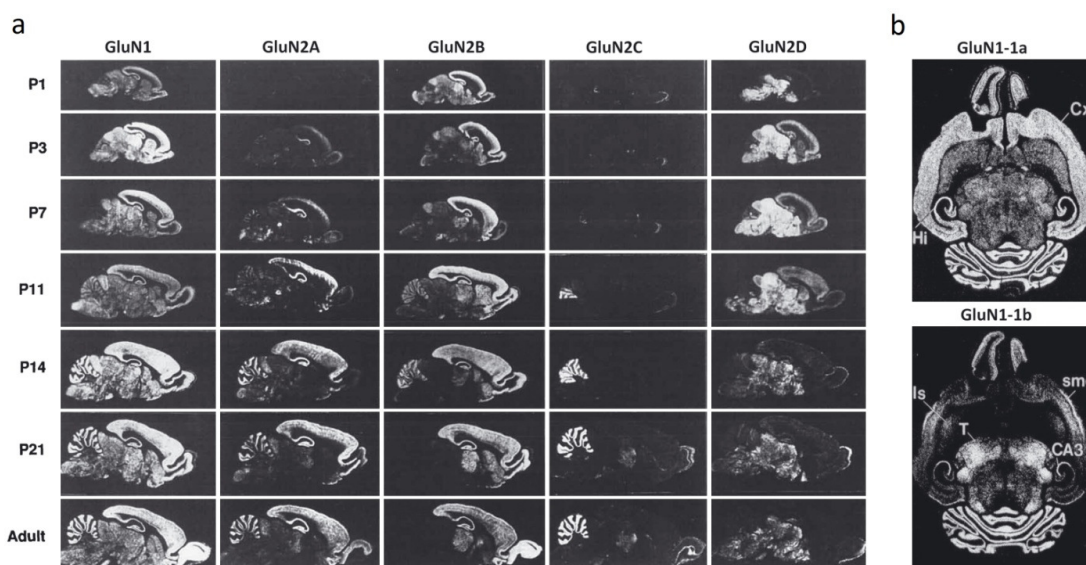


FIGURA 11: Distribuzione degli mRNA per le diverse subunità di NMDAR in cervello di ratto, visualizzata attraverso ibridazione *in situ*; a) alterazioni dell'espressione di GluN1 e GluN2A-D durante lo sviluppo postnatale (Akazawa et al., 1994; b) espressione delle varianti di splicing GluN1a e GluN1b al 12° giorno di sviluppo postnatale (Laurie and Seeburg, 1994).

6.1.5. RECETTORI SENSIBILI ALL'ACIDO KAINICO (GLUK)

Inizialmente identificati come membri appartenenti alla famiglia degli AMPAR, i recettori Kainato ne condividono molti aspetti strutturali e funzionali. Mostrano infatti le stesse caratteristiche per quanto riguarda la struttura generale e la conduttanza per i diversi cationi, ma diverse proprietà cinetiche e farmacologiche. La lenta cinetica di attivazione e desensitizzazione e la localizzazione su neuroni glutammatergici e GABAergici, ne suggerisce un possibile ruolo nel processamento delle informazioni.

I recettori Kainato sono codificati da due famiglie geniche, una che codifica per le subunità GluK1-3 che coassemblano in recettori tetramericici con bassa affinità per l'acido Kainico, l'altra che codifica le subunità GluK4 e GluK5 che hanno alta affinità per l'acido kainico, ma formano recettori funzionali solo se coesprese con le subunità GluK1-3. Analogamente a quanto osservato per gli AMPAR, i pre-mRNA di questi recettori vanno incontro a importanti processi di editing nucleotidico e di splicing alternativo, che producono varianti recettoriali con caratteristiche farmacologiche e biochimiche profondamente diverse (Sprengel e Seeburg, 1998).

Studi autoradiografici con radioligandi selettivi hanno evidenziato che i GluK sono ampiamente espressi nel SNC, in particolare nelle terminazioni delle fibre mieliniche dello strato lucido dell'ippocampo, negli strati profondi della corteccia cerebrale, nel nucleo reticolato del talamo e nello strato granulare del cervelletto, questi dati correlano con quanto osservato per l'espressione degli mRNA nelle diverse aree del SNC. I livelli di espressione delle singole subunità variano durante lo sviluppo neuronale e presentano profili di espressione caratteristici in relazione alla specifica regione presa in esame.

6.2. RECETTORI GLUTAMMATERGICI METABOTROPICI

6.2.1. STRUTTURA DI MGLUR

I recettori metabotropici per il glutammato appartengono alla superfamiglia dei GPCRs (Recettori accoppiati a ProteineG) a sette domini transmembrana. La stimolazione di questi recettori causa una variazione di secondi messaggeri intracellulari (cAMP, IP₃, DAG) e l'attivazione di una serie di risposte metaboliche che modulano la trasmissione sinaptica nel lungo periodo (Conn e Pin, 1997; Gerber et al., 2007).

Ad oggi sono state clonate otto differenti subunità di mGluR (mGluR1-8) che sono state divise in 3 gruppi in base all'omologia di sequenza, alle proprietà farmacologiche e al tipo di proteinaG associata. Il gruppo I, a cui appartengono i sottotipi mGluR1 e mGluR5, è accoppiato alla proteina G_q/G₁₁ ed ha come effettore primario la PLC (fosfolipasiC), un enzima che catalizza l'idrolisi del fosfolipide di membrana PIP₂ (fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato) a DAG (diacilglicerolo) e IP₃ (inositolo 1-4,5 trifosfato), che a loro volta mediano l'attivazione della PKC (protein chinasi Ca²⁺-dipendente). Il gruppo II e il gruppo III includono rispettivamente i sottotipi mGluR2-3 e mGluR4,6-8 e sono associati a proteine G_i/G_o che in seguito all'attivazione del recettore inibiscono l'attività dell'AC (adenilato ciclasi), abbassando la concentrazione cellulare di cAMP. Dal punto di vista strutturale i mGluR sono costituiti da un grande NTD extracellulare bilobato che contiene il sito di legame per l'agonista (domini S1, S2). Segue una regione ricca di cisteine (cys) che precede i 7 domini transmembrana (TMD) caratteristici dei recettori accoppiati a proteineG trimeriche. Infine, localizzato sulla parte intracellulare della membrana plasmatica, troviamo il CTD

che interagendo con TM2 e TM3, forma una tasca idrofobica che accoglie il CTD della subunità α della proteinaG associata al recettore. Inoltre il loop intracellulare del TM2 sembra essere coinvolto nella specificità di legame con le diverse classi di proteineG (Niswender e Conn, 2010). Oltre alla funzione strutturale il CTD gioca un ruolo importante nella modulazione dell'attività del recettore, inoltre media le interazioni con la calmodulina e con proteine strutturali di sinapsi (Homer, PICK1) che sono coinvolte nel targeting del recettore.

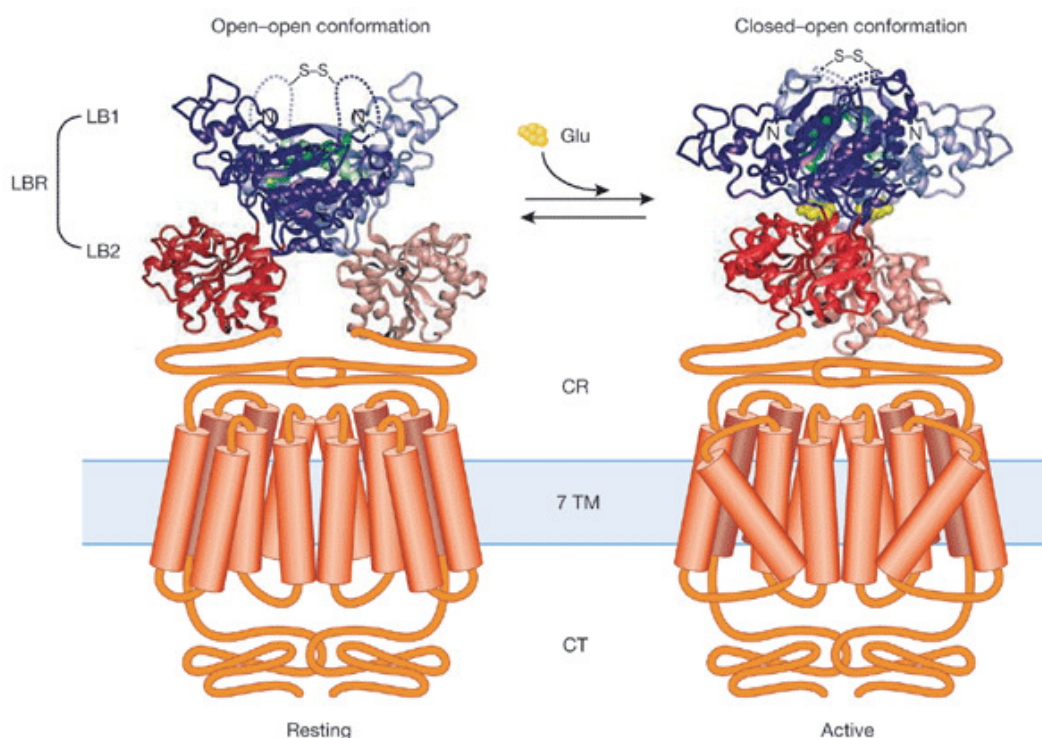


FIGURA 12: Ultrastruttura del sottotipo recettoriale mGluR1, ottenuta dall'analisi della diffrazione di raggiX del recettore cristallizzato. Sono evidenziati i domini di legame per l'agonista (LBR), le regioni ricche in cisteine (CR), i domini transmembrana (TMD) e i domini C-terminali del dimero in stato di riposo o attivo (kunishima et al., 2000).

Si pensa che gli mGluR funzionali siano omodimeri stabilizzati da interazioni idrofobiche e da legami disolfuro tra le subunità, evidenze sperimentali confermano inoltre che due NTD sono in grado di dimerizzare e agire in maniera coordinata. Gli NTD possono trovarsi in tre stati principali, in assenza del ligando entrambi gli NTD presentano una conformazione aperta e sono fisicamente separati, in seguito al legame dell'agonista ad uno o ad entrambi i siti di legame i NTD assumono rispettivamente una conformazione chiuso/aperto o chiuso/chiuso. Gli NTD legano anche cationi bivalenti come Mg^{2+} e Ca^{2+} che modulano l'attività del recettore. Si pensa che il legame dell'agonista causi un riarrangiamento strutturale che viene trasmesso ai TMD attraverso la regione ricca di cisteine. In seguito al legame

dell'agonista quindi i TMD vengono stabilizzati in una conformazione attiva, che attiva la proteina G e le vie di segnale associate. Recentemente è stato dimostrato che il legame dell'agonista ad uno solo dei recettori induce un'attivazione parziale dell'omodimero, mentre è richiesto il legame dell'agonista a entrambi i recettori per l'attivazione completa. In aggiunta i due siti di legame dell'omodimero sembrano esercitare un controllo reciproco negativo sull'affinità per il glutammato (Fig.12)(Conn e Niswender, 2012).

I trascritti primari dei mGluR vanno incontro a processi di maturazione post-trascrizionale, in particolare lo splicing alternativo dei pre-mRNA produce due varianti dalle caratteristiche farmacologiche e metaboliche distinte caratterizzati rispettivamente dal CTD lungo (mGluR1a, mGluR5) o dal CTD corto (mGluR1b-d). Al sottotipo con il CTD corto è associata una minore affinità per l'agonista e una più lenta cinetica di attivazione. Come accennato in precedenza i CTD contengono siti di interazione con proteine strutturali di sinapsi, tra cui la famiglia di proteine Homer. Queste fungono da ponte tra i mGluR e i complessi Shank-PSD95, regolandone quindi la stabilità e la localizzazione cellulare. Durante fenomeni di rimodellamento sinaptico è stata osservata l'alterazione dei livelli di espressione delle diverse isoforme di Homer, che potrebbe essere la causa della rilocalizzazione o dell'internalizzazione dei mGluR (Moutin et al., 2009).

I mGluR sono espressi in maniera eterogenea e diffusa nelle pre- e nelle postsinapsi dei neuroni del SNC, ma sono stati rilevati anche in cellule gliali (Fig.13). L'attivazione di questa classe di recettori produce effetti molto diversi sulla trasmissione sinaptica e sull'eccitabilità neuronale in funzione della classe di recettori attivati. Generalmente i recettori appartenenti al gruppo 1 sono espressi nelle postsinapsi di neuroni eccitatori e inibitori a livello perisinaptico, e la loro attivazione induce depolarizzazione cellulare e aumento dell'eccitabilità neuronale, in contrasto i recettori dei Gruppi 2 e 3 sono spesso localizzati in presinapsi dove inibiscono il rilascio di neurotrasmettitori. Studi condotti sui topi KO per i diversi sottotipi hanno evidenziato un ruolo importante del sottotipo mGluR1 nell'apprendimento associativo e contestuale, probabilmente associato a difetti nell'induzione della LTP (Long Term Potentiation) nelle sinapsi ippocampali di topi mGluR1 KO. Studi successivi hanno

evidenziato anche un ruolo di questo sottotipo nel controllo della corretta innervazione dei neuroni cerebellari. Più in generale topi KO per i mGluR del gruppo I mostrano deficit nella pre-pulse inhibition e sembrano essere meno soggetti allo sviluppo di dipendenze da sostanze d'abuso. Studi analoghi condotti su topi KO per i sottotipi del gruppo II, hanno dimostrato il ruolo di questi recettori nel promuovere LTP e LTD, in particolare nella LTD indotta da stimolazione a bassa-frequenza (Conn e Nicoletti, 2005).

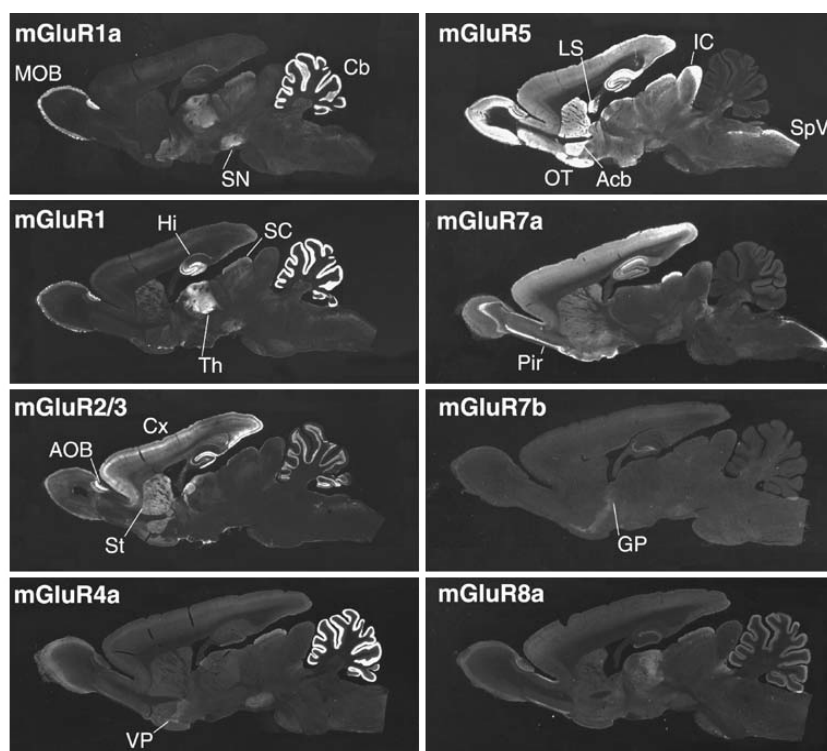


FIGURA 13: Distribuzione di mGluR nel SNC di ratti adulti. Immunoreattività per i diversi sottotipi in sezioni parasagittali di cervelli ottenuti da ratti adulti; Bulbo Olfattorio Accessorio (AOB); Nucleus Accumbens (Acb), Cerebellotto (Cb), Neocorteccia (Cx), Globo Pallido (GP), Ippocampo (Hi), Collicolo Inferiore (IC), Setto Laterale (LS), Bulbo Olfattorio (MOB), Tubercolo olfattivo (OT), Corteccia Piriforme (Pir), Collicolo Superiore (SC), Substantia Nigra (SN), Nucleo SpinoVestibolare (SpV) Striato (St), Talamo (Th), Pallido Ventrale (VP)(Ferraguti, Shigemoto, 2006).

7. PLASTICITA' SINAPTICA

I meccanismi attraverso cui i vari stimoli ambientali e fisiologici alterano la funzionalità delle sinapsi e modulano la riorganizzazione delle connessioni nel SNC, sono definiti meccanismi di plasticità sinaptica. In base al decorso temporale di questi adattamenti, la plasticità viene definita a breve termine o a lungo termine. E' noto che gli adattamenti neuronali a lungo termine sono responsabili di molte forme di apprendimento condizionato, di memoria e a vari aspetti comportamentali delle dipendenze da sostanze d'abuso. Le due principali forme di plasticità sinaptica a lungo

termine sono la LTP (Long-Term Potentiation) e la LTD (Long-Term Depression), che inducono rispettivamente un rafforzamento o un decremento della trasmissione sinaptica in seguito a ripetuti stimoli sopra- o sotto-soglia. Questi tipi di adattamenti della conduzione sinaptica possono essere mediati sia da NMDAR che da mGluR pre- e postsinaptici (Luscher e Malenka, 2012; Gladding et al., 2009; Collingridge e Wang, 2010).

7.1. PLASTICITA' MEDIATA DA NMDAR

La LTP e la LTD mediate da NMDAR, sono indotte da specifici schemi di attivazione sinaptica (Malenka e Bear, 2004). Per quanto riguarda la LTP è necessaria l'attività sincronizzata dei neuroni pre- e postsinaptici. Quando il rilascio di glutammato dai terminali presinaptici e la depolarizzazione della cellula postsinaptica avvengono contemporaneamente infatti, si ha l'attivazione massimale dei recettori NMDAR, in particolare sembra che il sottotipo GluN1/GluN2B rivesta un ruolo centrale nella LTP (Collingridge et al., 1983; Malinow e Miller, 1986). Questi recettori consentono l'influsso massiccio di Ca^{2+} e l'attivazione di vie di segnale intracellulari che sono in ultima analisi responsabili dell'aumento della funzionalità sinaptica (Macdermott et al., 1986). Al contrario, una stimolazione a bassa frequenza del terminale postsinaptico non causa la depolarizzazione della cellula postsinaptica e quindi il passaggio di Ca^{2+} attraverso gli NMDAR è molto ridotto, questo stimolo induce nel neurone una serie di adattamenti metabolici mirati a ridurre la funzionalità della sinapsi. I modelli più recenti proposti per i fenomeni di plasticità sinaptica attribuiscono proprio a queste differenze nell'influsso di Ca^{2+} il ruolo di evocare LTP o LTD (Lynch et al., 1983). Una caratteristica fondamentale dei fenomeni di plasticità sinaptica mediata da NMDAR è che sono sinapsi-specifici, esperimenti condotti *in vitro* hanno infatti evidenziato che si può indurre LTP in una specifica sinapsi senza causare alterazioni nelle sinapsi adiacenti (Engert e Bonhoeffer, 1997). Tuttavia è stato dimostrato che la diffusione intradendritica della forma attiva di Ras da una sinapsi attivata a quelle adiacenti, è in grado di favorire l'induzione di LTP (Harvey et al., 2008). Ci si riferisce a questo tipo di effetto come metaplasticità. Recenti studi suggeriscono che la sincronizzazione della pre- e della postsinapsi possa generare un potenziale d'azione che si propaga ai terminali presinaptici, inducendo un ulteriore rilascio di neurotrasmettitore e quindi

un'ulteriore depolarizzazione della postsinapsi. Se l'attivazione della presinapsi è evocata in maniera ripetuta prima (5ms) della depolarizzazione del neurone postsinaptico ("pre-post") viene indotta LTP. Al contrario quando la depolarizzazione della postsinapsi (e la retropropagazione) precede ripetutamente l'attivazione della presinapsi, viene indotta LTD. Per questo meccanismo di induzione di plasticità risultano quindi essere fondamentali i profili temporali di attivazione dei compartimenti sinaptici (spiking-timing-dependent plasticity)(Dan e Poo, 2006; Caporale e Dan, 2008).

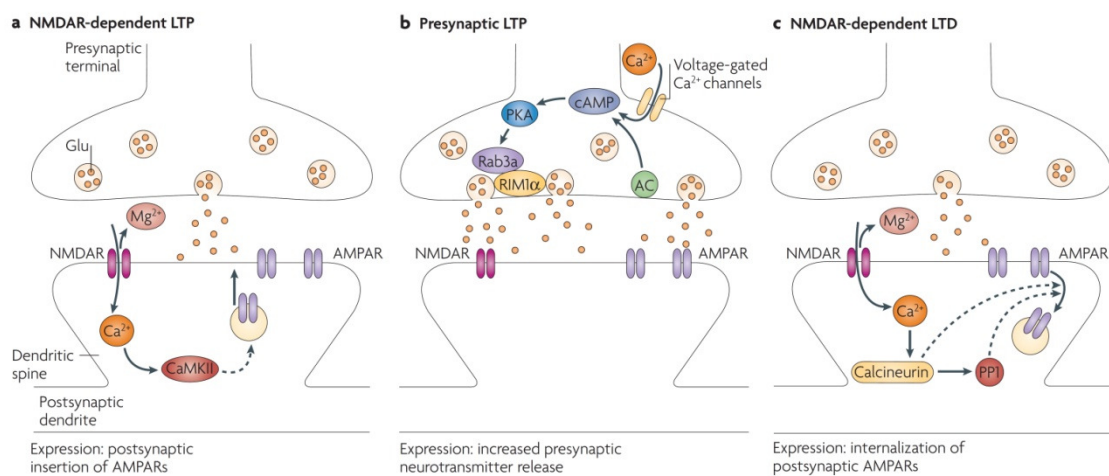


FIGURA 14: Meccanismi di plasticità sinaptica mediata da NMDAR; a) LTP mediata da NMDAR, l'apertura dei canali permette il flusso di Ca^{2+} e l'attivazione della CaMKII, portando in ultima analisi ad un aumento di AMPAR in membrana; b) LTP mediata dal terminale presinaptico conosciuta come spike-timing-dependent plasticity (presente alle sinapsi: CA3-mossy fibers; fibre parallele-cellule di purkinje); c) LTD mediata da NMDAR, quando attivati in maniera submassimale questi recettori permettono un flusso molto ridotto di Ca^{2+} che attiva la PP1. Gli AMPAR sono quindi defosforilati e rimossi dalla membrana plasmatica (Kauer e Malenka, 2007).

Numerosi esperimenti sono stati condotti per chiarire il contributo della pre- e della postsinapsi nell'induzione della plasticità sinaptica. I risultati ottenuti suggeriscono che è molto improbabile che un meccanismo presinaptico (aumento del rilascio o della probabilità di rilascio) sia alla base della LTP, assegnando quindi alla postsinapsi un ruolo preponderante nei fenomeni di plasticità a lungo termine. Inoltre nell'ippocampo di animali giovani sono state identificate sinapsi che contengono esclusivamente NMDAR e non AMPAR e che risultano essere funzionalmente silenti. Applicando protocolli sperimentali che inducono LTP è stato possibile "risvegliare" queste sinapsi, che diventano funzionali in seguito all'inserimento di AMPARs nella membrana postsinaptica (Isaac et al., 1995; Liao et al., 1995). Questi dati evidenziano che i meccanismi di LTP coinvolgono l'inserimento di AMPARs sia in sinapsi attive che in

sinapsi silenti, analogamente la LTD potrebbe coinvolgere l'endocitosi di AMPARs. Questa teoria è sostenuta dalla presenza in sinapsi di un pool di vescicole che esprimono AMPARs e che possono essere rapidamente trafficate alla membrana postsinaptica. Si pensa che l'inserzione e la rimozione di AMPARs durante i fenomeni di plasticità sinaptica sia mediata rispettivamente da proteine SNARE o da Clatrina/Dinamina, inoltre proteine scaffold di sinapsi come PSD controllano la stabilità dei AMPAR in sinapsi contribuendo in questa maniera ai fenomeni di plasticità sinaptica (Jurado et al., 2010; Kennedy e Ehlers, 2011). Recenti evidenze sperimentali suggeriscono che l'endocitosi e l'esocitosi di AMPAR durante la LTD o la LTP avvengano in siti perisinaptici da cui poi i recettori diffondono in sinapsi (Makino e Malinow, 2009). Il potenziamento della conduzione sinaptica viene ottenuto sia attraverso l'inserzione del sottotipo GluA1/GluA2 che attraverso la sostituzione di AMPAR contenenti la subunità GluA2 con recettori che ne sono privi, questi ultimi hanno una conduttanza superiore rispetto agli eterotetrameri e riescono a potenziare la sinapsi anche in assenza di un aumento quantitativo dei recettori (Liu e Zukin, 2007).

Come detto in precedenza il flusso di ioni Ca^{2+} attraverso i NMDAR è il responsabile principale della LTP e LTD mediata da NMDAR. L'aumento della concentrazione sinaptica di Ca^{2+} attiva la CaMKII, che media a sua volta la fosforilazione di diverse proteine tra cui gli stessi AMPAR, aumentandone la conduttanza e la traslocazione in membrana (Malenka e Bear, 2004). I meccanismi molecolari che regolano l'induzione della LTP tuttavia, risultano essere molto complessi e coinvolgono altre protein kinasi come la PKA, PKC, tirosin kinasi e MAPK. In base a quanto detto finora è logico ipotizzare che la LTD mediata da NMDAR coinvolga l'attività di protein fosfatasi, infatti i modelli più accettati prevedono l'attivazione della Calcineurina o della PP1. La calcineurina mostra un'affinità più alta per il Ca^{2+} rispetto alla CaMKII, e questa caratteristica farmacologica consente l'attivazione della fosfatasi in seguito ad un aumento modesto della concentrazione di questo ione. Questi dati sono in accordo con i modelli di induzione di LTD. Queste fosfatasi inoltre influenzano lo stato di fosforilazione di AMPAR, riducendone l'attività e facilitandone la rimozione dalla sinapsi (Lisman et al., 2012; Barria et al., 1997).

Il mantenimento della plasticità sinaptica richiede una serie di adattamenti nella ultrastruttura della sinapsi, infatti l'inserzione di AMPAR in seguito a LTP causa un aumento delle dimensioni della sinapsi spesso accompagnato da un ingrandimento della PSD e delle proteine scaffold che la compongono (Yao et al., 2004). In parallelo si assiste all'aumento della densità e alla riduzione del turnover delle spine. Al contrario durante la LTD si assiste alla riduzione o alla scomparsa delle dimensioni delle spine (Wilbrecht et al., 2010).

Le alterazioni ultrastrutturali indotte durante la LTP prevedono la sintesi di nuove proteine, che viene promossa dall'attivazione di protein kinasi (PKA, CaMKIV, PKM- ζ , ERK), di fattori di trascrizione (CREB, BDNF) e di "immediate early gene" (Arc) (Sacktor, 2008).

Molti degli effetti descritti sono stati osservati anche in sinapsi GABAergiche inibitorie, suggerendo che i recettori NMDAR siano coinvolti nella modulazione a lungo termine sia della trasmissione eccitatoria che di quella inibitoria nel SNC (Castillo et al., 2011).

7.2. PLASTICITA' MEDIATA DA MGLUR

Le prime evidenze di LTD mediata da mGluR sono emerse da studi condotti sulle sinapsi tra le fibre parallele e le cellule di Purkinje nel cervelletto, studi successivi hanno dimostrato che questa forma di LTD avviene anche in altre aree del SNC ed è indipendente dall'attivazione degli NMDAR (Ito e Kano, 1982; Wang e Gean, 1999). Tuttavia va sottolineato che in alcune aree del cervello (Amigdala, Corteccia Peririnale) è necessaria l'attivazione sinergica di NMDAR e mGluR. In generale il meccanismo coinvolge l'aumento di Ca^{2+} intracellulare e l'attivazione di mGluR del gruppo I, in particolare il sottotipo mGluR5 è in grado di convertire la STD (short-term depression) in LTD, indicando che questo sottotipo recettoriale è necessario per mediare le forme a lungo termine di depressione sinaptica (Bortolotto et al., 1994; Bashir e Collingridge, 1994). I meccanismi molecolari che stanno alla base di questo fenomeno sono ancora poco chiari, nonostante sia largamente condivisa l'idea di un coinvolgimento dei PTPs (proteine tirosin-fosfatasi), il ruolo della sintesi proteica, di ERK e della MAPK p38 è ancora da confermare e chiarire (Gallagher et al., 2004; Moulton et al., 2008).

Nel 2001, Fitzjohn et al. hanno osservato fenomeni di LTD dipendente da mGluR in presenza del chelante del calcio BAPTA, suggerendo l'esistenza di un meccanismo Ca^{2+} indipendente. E' stato recentemente dimostrato che nella corteccia peririnale la LTD dipendente da mGluR5 è mediata dall'interazione tra NCS-1 (proteina neuronale sensore del Ca^{2+}) e PICK1 (proteine che interagiscono con la kinasi C). Il complesso NCS1-PICK1 si associa con la PKC, favorendo la fosforilazione della subunità GluA2 e l'endocitosi dei AMPAR (Jo et al., 2008). Molte altre vie intracellulari di trasduzione del segnale (p38MAPK, JNK, ERK, PLA_2 , PLD) risultano implicate nella LTD dipendente da mGluR, in regioni particolari del SNC. L'attivazione dei diversi membri delle MAPK in seguito ad attivazione di mGluR, stimola l'endocitosi mediata da clatrina di AMPAR e la riduzione della componente della trasmissione sinaptica mediata da questo sottotipo recettoriale. Inoltre l'attivazione della cascata delle MAPK media l'attivazione di CREB, e la trascrizione del gene *c-Fos* (Huang et al., 2004; Mao et al., 2005).

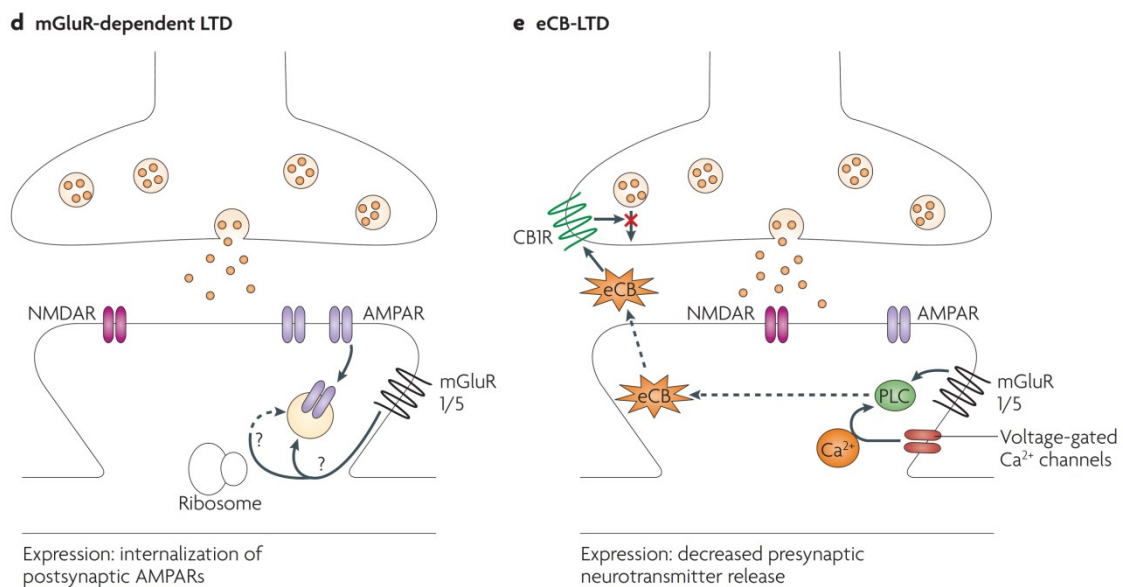


FIGURA 15: Meccanismi di plasticità sinaptica mediati da mGluR; d) LTD dipendente da mGluR del gruppo I. L'attivazione dei recettori mGluR1/5 postsinaptici media l'internalizzazione degli AMPAR; e) LTD mediata da eCB, l'attivazione di mGluR induce la sintesi nel terminale postsinaptico di eCB, che agiscono in maniera retrograda riducendo il rilascio di neurotrasmettitori dal terminale presinaptico (Kauer e Malenka, 2007).

Altre forme di mGluR-LTD e in alcuni casi anche di LTP, possono essere mediate da proteine scaffold come Caveolina1 e Homer (Francesconi et al., 2009). Varianti di splicing di quest'ultima famiglia di proteine sono coinvolte nella localizzazione e nell'interazione del sottotipo mGluR5 con complessi multiproteici che regolano la morfologia e la funzionalità della sinapsi, mentre l'interazione di mGluRI con la

Caveolina-1 regola l'internalizzazione dei sottotipi mGluR1/5, controllando i livelli di espressione in membrana di questi recettori, in aggiunta è stato recentemente proposto che il legame con la CaM stabilizzi l'espressione di mGluR5 in membrana sinaptica (Gladding et al., 2009).

Una forma molto particolare di LTD mediata prevalentemente dai mGluR del gruppo II, prevede il coinvolgimento di eCBs (endocannabinoidi) che agiscono come segnale retrogrado tra postsinapsi e presinapsi. In particolare gli eCBs agendo sui recettori presinaptici CB1 espressi in neuroni ippocampali, corticali, cerebellari e dell'amigdala, riduce la probabilità di rilascio del neurotrasmettitore dal terminale presinaptico (Li et al., 2010; Chevaleyre et al., 2006).

Alterazioni patologiche nei fenomeni di plasticità sinaptica sono state rilevate in diverse forme di demenza, disordini motori, dolore neuropatico, depressione, ansia e durante la dipendenza da sostanze d'abuso (Malenka e Bear, 2004; Koukoui e Chaudhuri, 2007).

8. EFFETTI DELLA NICOTINA SUI NACHR

Come tutte le sostanze d'abuso anche la nicotina oltre agli effetti farmacologici diretti mediati dal legame ai suoi specifici recettori, stimola processi cellulari adattativi, soprattutto in seguito ad esposizioni prolungate.

Per quanto riguarda gli nAChR, l'esposizione a lungo termine alla nicotina causa, sia in sistemi eterologhi, che nel cervello di animali trattati, che in soggetti fumatori, un aumento dei siti di legame ad alta affinità per l'agonista, definito up-regulation. Questo fenomeno è associato ad un potenziamento del rilascio di DA nel Nucleo Accumbens, che a sua volta media gli effetti di gratificazione di molte sostanze d'abuso.

8.1. EFFETTI *IN VITRO*

Diversi studi condotti *in vitro* su cellule trasfettate con i diversi sottotipi nicotinici, hanno mostrato che l'esposizione cronica alla nicotina induce up-regulation sia dei sottotipi eteromerici che dei recettori $\alpha 7$ omomerici, sebbene la cinetica e l'EC50 di questo effetto vari molto fra i diversi sottotipi. In particolare, in cellule trasfettate e trattate cronicamente (1-5 giorni) con concentrazioni crescenti di nicotina

(1-1000 μM), è stata osservata up-regolazione dei recettori omomerici $\alpha 7$ e dei sottotipi eteromerici $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 6\beta 2$ e $\alpha 3\beta 4$ (Walsh et al., 2008; Xiao e Kellar, 2004); il sottotipo $\alpha 4\beta 2$ è up-regolato anche in ovociti trattati con concentrazioni paragonabili a quelle presenti nel sangue dei fumatori (circa 100-300 nM) (Buisson e Bertrand, 2002). L'up-regolazione di $\alpha 4\beta 2$ viene osservata anche in seguito all'esposizione cronica ad altri agonisti quali DMPP, citisina, ABT-418 ed epibatidina (Gopalakrishnan et al., 1997), ad agonisti parziali come CC4 (Riganti et al., 2005) e ad antagonisti come la diidrobetaeritroidina. (Pauly et al., 1996). Come accennato in precedenza la concentrazione di nicotina necessaria per l'up-regolazione varia in funzione dei sottotipi recettoriali, studi compiuti su cellule di neuroblastoma trasfettate con diverse subunità hanno mostrato che i sottotipi $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 3\beta 2$ e $\alpha 7$ per essere up-regolati necessitano di dosi di nicotina maggiori rispetto ai recettori $\alpha 4\beta 2$. Inoltre l'up-regulation è più marcata per il sottotipo $\alpha 3\beta 2$ rispetto al sottotipo $\alpha 3\beta 4$.

8.2. EFFETTI *IN VIVO*

Studi *in vivo* su cervelli di fumatori o di topi sottoposti ad un'esposizione prolungata alla nicotina, hanno confermato che l'up-regolazione dei nAChR avviene anche *in vivo*. Inoltre l'aumento dei recettori non correla con i livelli di mRNA delle subunità $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ o $\beta 2$ che rimangono costanti, indicando quindi che gli effetti della nicotina sono post-trascrizionali (Marks et al., 1992). L'up-regulation varia anche tra le diverse aree cerebrali, infatti è stato dimostrato che la corteccia cerebrale, le aree mesencefaliche e l'ipotalamo di topi trattati per dieci giorni con una minipompa che somministra 4 mg/kg/ora di nicotina, mostrano up-regolazione, ma questo effetto non si osserva nel talamo o nel cervelletto (Nashmi et al., 2007).

Gli studi compiuti su cervelli di animali, hanno dimostrato che il trattamento cronico con nicotina causa prevalentemente up-regolazione del sottotipo $\alpha 4\beta 2$, che è quello maggiormente espresso nel cervello adulto ed è facilmente identificabile per la sua alta affinità per la nicotina; un effetto analogo sul sottotipo $\alpha 4\beta 2$ è stato osservato anche in cervelli post-mortem di uomini fumatori (Gotti et al., 2007).

Oltre alle aree cerebrali anche la composizione del recettore svolge un ruolo importante sull'up-regolazione, infatti in ratti trattati cronicamente con nicotina il sottotipo recettoriale $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ si mostra resistente all'up-regolazione in alcune zone

del cervello come l'ippocampo, striato, corteccia celebrale e talamo (Mao et al., 2008). Questo dato suggerisce che l'incorporazione di alcune subunità nel recettore maturo possa prevenire o alterare l'up-regolazione indotta da nicotina.

8.3. MECCANISMI MOLECOLARI COINVOLTI NELLA UP-REGOLAZIONE

I meccanismi attraverso cui la nicotina determina l'up-regolazione non sono ancora del tutto chiariti e sono tuttora oggetto di studi approfonditi. La nicotina è una sostanza liposolubile che può diffondere passivamente attraverso la membrana plasmatica, per cui la sua azione può essere sia su recettori presenti a livello della membrana plasmatica che su quelli presenti a livello intracellulare nella via di biosintesi.

Recenti studi hanno analizzato nel dettaglio la sintesi, la maturazione e il traffico dei recettori in particolare del sottotipo $\alpha 4\beta 2$ in sistemi nativi o in diversi modelli di espressione eterologa (cellule trasfettate, oociti di *Xenopus Laevis*) chiarendo in parte il meccanismo d'azione della nicotina. Sono stati proposti diversi meccanismi per spiegare l'up-regolazione dei nAChR, tra cui i più rilevanti sono:

- aumento nell'assemblaggio delle subunità (Kuryatov et al., 2005; Wang et al., 1998);
- cambio della stechiometria del recettore;
- aumento del trasporto dei recettori alla membrana plasmatica attraverso la via secretiva (Harkness e Millar, 2002);
- riduzione della degradazione.

AUMENTO NELL'ASSEMBLAGGIO DELLE SUBUNITA': Nel 2005 Sallette et al. e Kuryatov et al. hanno dimostrato che i recettori $\alpha 4\beta 2$ sono localizzati sia sulla membrana plasmatica che in *pools* intracellulari che colocalizzano con diversi *markers* del RE. Secondo questi autori la nicotina agisce a livello del RE come una sorta di chaperone farmacologico che favorisce l'assemblaggio delle subunità e causa un aumento di 2.5 volte dei siti di legame ad alta affinità, confermando le evidenze che il trattamento con nicotina non altera né l'internalizzazione dei recettori di superficie, né il traffico post-endocitotico, né la degradazione lisosomiale, ma influenza l'assemblaggio e la maturazione dei nAChR lungo la via secretoria dal RE alla membrana (Darsow et al., 2005; Peng et al., 1997). Studi condotti nel nostro laboratorio hanno mostrato che l'aumento dei recettori funzionali che legano la ^3H -

epibatidina è associato ad un aumento nell'espressione delle subunità recettoriali, confermando quanto detto finora. Sempre nel 2005, Vallejo et al. hanno appurato che l'esposizione per 18h a 10 μ M nicotina determina un aumento di 4-6 volte del legame di ¹²⁵I-epibatidina e che questo aumento non si riflette in un aumento significativo nel numero di recettori di superficie. Sulla base dei loro dati, gli autori hanno proposto un meccanismo alternativo per cui l'esposizione alla nicotina lentamente stabilizza i recettori di superficie e quelli intracellulare in uno stato di alta affinità, che è quello misurato attraverso il binding della ¹²⁵I-epibatidina.

CAMBIO DELLA STECHIOMETRIA DEL RECETTORE: Utilizzando subunità coniugate alla proteina fluorescente GFP, è stato dimostrato che la nicotina agendo a livello del RE stabilizza i recettori con la stechiometria ($\alpha 4$)₂($\beta 2$)₃ favorendone l'accumulo nei siti di uscita del RE. Questi risultati sono in accordo con dati di elettrofisiologia che hanno dimostrato che l'esposizione alla nicotina aumenta la localizzazione membrana plasmatica dei recettori $\alpha 4\beta 2$ con la stechiometria ($\alpha 4$)₂($\beta 2$)₃ (Moroni et al., 2006). Recentemente collaborando con la dr.ssa Mazzo, siamo stati in grado di dimostrare che il trattamento con nicotina produce sul sottotipo $\alpha 3\beta 4$ un effetto analogo a quello osservato da Moroni et al. per il sottotipo $\alpha 4\beta 2$. I dati ottenuti e pubblicati a Luglio di quest'anno evidenziano infatti un aumento dose-dipendente del sottotipo $\alpha 3\beta 4$ in seguito al trattamento con nicotina e con ligandi ortosterici permeabili (CC4, citisina). L'effetto non è stato osservato in cellule trattate con mecamilamina (bloccante del poro) e con esametonio (ligando impermeabile), indicando che l'upregolazione è un effetto intracellulare che richiede il legame al sito ortosterico. Un'analisi più approfondita ha mostrato che la stechiometria ($\alpha 3$)₂($\beta 4$)₃ risulta essere quella maggiormente up-regolata sia in omogenati totali che in membrane plasmatiche di cellule trasfettate.

AUMENTO DEL TRASPORTO DEI RECETTORI ALLA MEMBRANA ATTRAVERSO LA VIA SECRETIVA: Come già detto, nei neuroni i recettori funzionalmente importanti sono quelli espressi a livello della membrana plasmatica. Diversi studi hanno dimostrato che l'esposizione alla nicotina (500 nM per 12 ore) determina una up-regolazione dei recettori $\alpha 4\beta 2$ di superficie, anche attraverso un aumentato trasporto attraverso la via secretoria (Darsow et al., 2005). Il nostro laboratorio ha dimostrato che anche il

sottotipo $\alpha 3\beta 4$ viene traslocato più efficientemente alla membrana in seguito al trattamento con diversi agonisti ed antagonisti ortosterici. L'analisi dei dati ci ha permesso di speculare che questo effetto potrebbe essere mediato dal cambio di stechiometria. L'incorporazione di 3 subunità $\beta 4$ nel pentamero maturo aumenterebbe i segnali di esportazione del recettore, favorendone l'accumulo ai siti di uscita del RE e quindi aumentandone il traffico.

DIMINUZIONE DELLA DEGRADAZIONE: Recentemente è stato dimostrato che una concentrazione di nicotina pari a quella trovati nel plasma dei fumatori (400 nM) è in grado di inibire l'attività enzimatica del proteasoma, inducendo *in vivo* una riduzione della degradazione della subunità $\alpha 7$ e l'accumulo della sua forma ubiquitinata, inoltre l'esposizione alla nicotina sembra determinare anche un aumento delle subunità di altri canali ionici e più in generale di altre proteine. Questo dato non è stato confermato dal nostro laboratorio, in cellule trasfettate con la subunità CD3 δ (substrato noto del proteasoma) infatti, il trattamento con nicotina non ne causa un accumulo nella cellula a differenza di quanto osservato in seguito all'inibizione farmacologica del proteasoma con MG132. Questo dato esclude un effetto diretto della nicotina sull'attività del proteasoma.

Inizialmente si era ipotizzato che l'up-regolazione indotta da nicotina fosse causata dalla modulazione di uno solo dei meccanismi appena descritti, tuttavia studi più recenti suggeriscono che la nicotina possa modulare contemporaneamente diversi processi intracellulari, che portano in ultima analisi ad un aumento dell'espressione dei nAChR e del loro traffico in membrana.

9. IL SISTEMA MESOCORTICOLIMBICO

La rete nervosa che interconnette l'Area Ventrale Tegmentale-Substantia Nigra (VTA-SN), lo Striato, la Corteccia Prefrontale (PFC), l'Amigdala (Amy) e l'Ippocampo (Hipp), prende il nome di sistema dopaminergico mesocorticolimbico (Fig.16). E' noto da tempo che questa rete nervosa possa essere coinvolta in molti comportamenti condizionati, in particolare nella componente motivazionale o aversiva di questi comportamenti (Bromberg-Martin et al., 2010; Kenny e Markou, 2004; Mansvelder e McGehee, 2002).

Il fulcro funzionale di questo sistema è rappresentato dai neuroni dopaminergici localizzati in VTA-SN e dalle loro proiezioni allo Striato e alla PFC. La VTA-SN è un'area mesencefalica composta per il 60% dai corpi cellulari dei neuroni dopaminergici, per il 25% da neuroni GABAergici, il restante 15% rappresenta terminazioni glutammatergiche e colinergiche (Swanson, 1982; Margolis et al., 2012; Yamaguchi et al., 2007). Le proiezioni dopaminergiche che partono da questa area sono numerose e innervano diverse regioni cerebrali (Bjorklund e Dunnet, 2007). Nello specifico i neuroni Dopaminergici localizzati nella SN proiettano al Talamo e allo striato dorsale (Caudato Putamen), mentre i neuroni Dopaminergici della VTA proiettano preferenzialmente a PFC, Striato Ventrale (NAc) e Amigdala basolaterale. In seguito ad una ricompensa o ad uno stimolo che ne predice una, i neuroni dopaminergici localizzati in VTA vengono stimolati e si osserva un aumento del rilascio di dopamina nelle aree di proiezione (PFC e NAc). Il Nucleo Accumbens o Striato Ventrale è un'area cerebrale composta per il 95% di interneuroni GABAergici chiamati MSN (medium spiny neurons), questi neuroni sono considerati quiescenti, e la loro attivazione dipende dagli input provenienti dalle regioni corticali e limbiche del SNC (Grueter et al., 2012). E' stato dimostrato che lo striato dorso-laterale controlla i comportamenti abituali e ripetuti, mentre quello dorso-ventrale controlla i comportamenti più flessibili. Evidenze sperimentali suggeriscono inoltre che a livello dello striato l'aumento o la diminuzione dell'attività dei MSNs codifichino rispettivamente uno stimolo aversivo o per una qualche forma di ricompensa, per questo motivo lo striato è considerato l'interfaccia funzionale tra input motivazionali e comportamenti motori atti a soddisfare questi input (Groenewegen et al., 1996). Le proiezioni GABAergiche dei MSNs striatali che proiettano alla VTA sono divise in due vie principali, la via diretta che esprime specificatamente il sottotipo D1 (ruolo eccitatorio) di recettori dopaminergici e fa sinapsi sui neuroni non DA della VTA e la via indiretta che esprime il sottotipo D2 (ruolo inibitorio) e passando per il Globo pallido, proietta secondariamente sia su neuroni DA che su neuroni non DA nella VTA (Gerfen et al., 1990; Lobo, 2009; Smith et al., 2013). In media i MSNs che compongono la via indiretta mostrano un'eccitabilità e una probabilità di rilascio spontaneo maggiore rispetto ai MSNs della via diretta. Per quanto riguarda la PFC, le terminazioni dopaminergiche

provenienti dalla VTA fanno sinapsi sui corpi cellulari dei neuroni piramidali dello strato V, questi neuroni sono essenzialmente glutammatergici e ricevono terminazioni anche dagli interneuroni GABAergici (“fast spiking” e “non-fast spiking”) e colinergici.

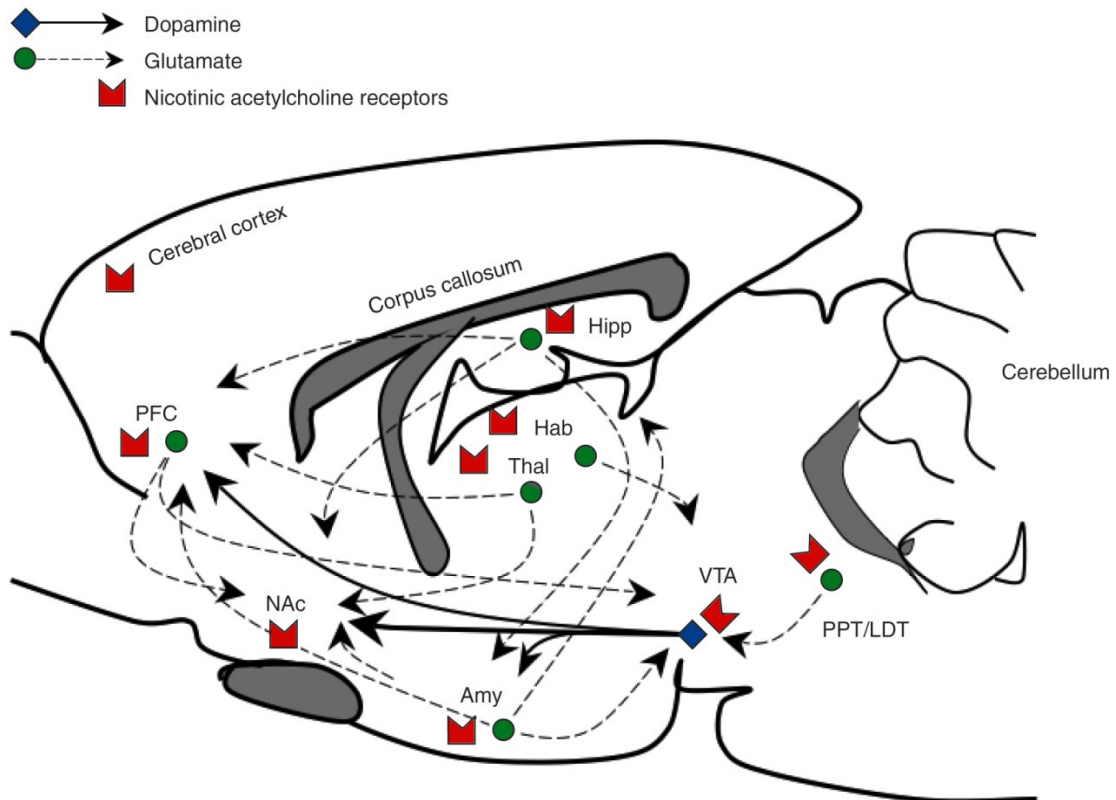


FIGURA 16: Diagramma di una sezione sagittale del cervello di roditori, sono evidenziate le aree del sistema mesocorticolimbico, le connessioni Glutammatergiche e Dopaminergiche e i nAChR; Amygdala (Amy), Abenula (Hab), Ippocampo (Hipp), Nucleo LateroDorsale Tegmentale (LDT), Nucleo Accumbens (NAc), Corteccia PreFrontale (PFC), Nucleo PeduncoloPontino Tegmentale (PPT), Talamo (Thal), Area Ventrale Tegmentale (VTA) (Liechti e Markou, 2008).

Studi approfonditi sulla circuiteria cerebrale hanno evidenziato che gli input glutammatergici provenienti dai neuroni piramidali della PFCx fanno sinapsi sui neuroni dopaminergici della VTA che retroproiettano alla PFCx e non su quelli che proiettano al NAc. Il NAc infatti riceve afferenze glutammatergiche direttamente dalla PFC. Analizzando le EPSCs e dissezionando le componenti AMPAR rispetto a quelle NMDAR, si è osservato che i MSNs del pathway indiretto esprimono livelli più alti di NMDAR rispetto ai neuroni della via diretta. Inoltre mentre i fenomeni di depressione a lungo termine (LTD) mediata dai recettori NMDA sono presenti in entrambe le popolazioni neuronali, la LTD mediata da mGluR5 sembra essere prevalente se non esclusiva delle postsinapsi dei MSNs della via indiretta. Questo tipo di LTD è mediata

dal rilascio di eCBs e induce una riduzione a lungo termine del rilascio di glutammato dalle proiezioni corticali (Wise et al., 2008).

La VTA oltre agli input appena descritti riceve anche proiezioni dal nucleo LDT (Laterodorsale Tegmentale) e dall'Hab (Abenula). I neuroni del nucleo LDT (95% glutammatergici, 7% colinergici) fanno sinapsi sui neuroni dopaminergici della VTA che proiettano al NAc laterale (shell), mentre le proiezioni glutammatergiche provenienti dall'Hab laterale fanno sinapsi sui neuroni DA della VTA che proiettano alla PFC. Inoltre i neuroni glutammatergici dell'Hab proiettano al Nucleo RostroMediale Tegmentale che a sua volta invia proiezioni GABAergiche ai neuroni dopaminergici della VTA che proiettano al NAc. In conferma di ciò è stato osservato che la stimolazione ottica dei terminali dell'abenula laterale induce correnti inibitorie postsinaptiche nei neuroni DAergici che proiettano al NAc laterale, suggerendo un'inibizione tonica di questi neuroni da parte del nucleo RMT e di conseguenza dell'Hab. In uno studio recente è stato dimostrato che la stimolazione optogenetica dei terminali nervosi del nucleo laterodorsale tegmentale è sufficiente ad indurre CPP (Conditioned Place Preference), in contrasto la stimolazione dei terminali provenienti dall'Abenula Laterale (glutammatergici) e dal nucleo RMT (GABAergici) producono CPA (Conditioned Place Aversion) (Lammel et al., 2012).

Questo sistema di controllo molto fine dell'eccitabilità dei neuroni dopaminergici in VTA, riflette efficacemente il ruolo cruciale della dopamina negli organismi superiori.

9.1. RUOLO DEL SISTEMA MESOCORTICOLIMBICO NELL'APPRENDIMENTO CONDIZIONATO

Il sistema mesocorticolimbico è implicato in molteplici forme di apprendimento e memoria, in particolare in quelle associate alla presenza di uno stimolo o di una ricompensa/punizione. Evidenze sperimentali suggeriscono che il coordinamento dell'attività elettrica delle diverse popolazioni neuronali site in VTA sia fondamentale per molti comportamenti condizionati, in particolare l'esposizione ad uno stimolo piacevole o l'aspettativa di una ricompensa promuovono la sincronizzazione del firing dei neuroni dopaminergici in VTA, mentre stimoli aversivi ne riducono la sincronizzazione (Joshua et al., 2009). Analisi dei potenziali di campo in VTA hanno

evidenziato che stimoli visivi o uditivi sono codificati da oscillazioni dei potenziali di azione secondo ritmo theta. Sono state infatti osservate oscillazioni theta durante test di apprendimento condizionato e di working memory (Fujisawa e Buzsaki, 2011; Kim et al., 2012). Possiamo speculare che alterazioni in questo network si riflettano in una fine modulazione del rilascio di DA dai terminali localizzati nel NAc o in PFC. (Berridge e Kringelbach, 2013)

L'inibizione dei MSNs del NAc è stato dimostrato essere coinvolta nel processamento di stimoli positivi o negativi. Tuttavia l'inibizione dei recettori AMPA (con DNQX, in regione caudale del NAc di ratti) è in grado di indurre sia un aumento dell'appetito, che un comportamento difensivo associato a paura. Studi più approfonditi hanno evidenziato che i due diversi tipi di risposte sono associati a stimoli ambientali positivi o negativi, in particolare se i test comportamentali sono effettuati in un ambiente confortevole e familiare, i ratti rispondono con un aumento dell'appetito, al contrario se sono effettuati in un ambiente molto luminoso e rumoroso (stress) si ha una risposta difensiva (Richard et al., 2013; Reynolds e Berridge, 2008). Questo effetto sembra essere associato a cambiamenti nella trasmissione dopaminergica, infatti, studi farmacologici sui recettori D1 o D2 hanno evidenziato che l'aumento dell'appetito è mediato dall'attivazione dei recettori D1, mentre il comportamento difensivo richiede l'attivazione sia dei recettori D1 che dei D2 (Richard e Berridge, 2011). Inoltre le differenti risposte comportamentali indotte dal blocco dei AMPAR nel NAc, suggeriscono che le proiezioni glutammatergiche provenienti dalla PFCx contribuiscano alla modulazione di questo network. Nello specifico l'attivazione della corteccia infralimbica induce una riduzione di entrambi i tipi di risposta, mentre l'attivazione della corteccia orbitofrontale induce un aumento della risposta appetitiva a discapito di quella difensiva, avvalorando l'idea che stimoli ambientali codificati dalla PFC possano modulare la risposta positiva/negativa ad uno stimolo (Richard e Berridge, 2013).

Ricorrendo alla FSCV (fast scan cyclic voltammetry) sono state analizzate le oscillazioni dei transienti DA in situazioni fisiologiche o in seguito alla presentazione di uno stimolo (Bassareo et al., 2002; Budygin et al., 2012). In condizioni fisiologiche il rilascio spontaneo di DA (Transienti) avviene per breve tempo e con bassa probabilità

(Owesson-White et al., 2012). Stimoli associati ad una ricompensa (cibo, sostanze d'abuso e stimoli predittivi di una ricompensa) aumentano la probabilità del rilascio di DA. Stimoli aversivi al contrario riducono la probabilità di questi transienti. Le alterazioni dei transienti DA si riflettono in un'alterata attivazione dei MSNs nel NAc in risposta a stimoli piacevoli o aversivi suggerendo quindi che diverse popolazioni di neuroni nel NAc possano essere coinvolte nel processamento di questi stimoli (McCutcheon et al., 2012; Phillips et al., 2003).

Come detto in precedenza i MSNs striatali, possono essere classificati in due popolazioni in funzione dell'espressione dei recettori D1 o D2. Per quanto riguarda il NAc, i D2-MSNs si comportano in maniera analoga a quelli del CPU, proiettando esclusivamente al Globo pallido Ventrale (VP), mentre i D1-MSNs proiettano sia al pallido ventrale che alla VTA-SN (Smith et al., 2013). Recenti studi evidenziano un ruolo opposto delle due popolazioni di MSNs nella modulazione delle risposte ad uno stimolo, in Particolare i D1-MSN, sembrano essere coinvolti nelle risposte positive, mentre i D2-MSNs in quelle negative. Inoltre è stato evidenziato un ruolo preferenziale dei D1-MSNs negli eventi di plasticità sinaptica associati alla dipendenza da sostanze d'abuso (Lobo et al., 2010; McClung et al., 2004; Robison e Nestler, 2011).

Considerando anche quanto discusso in precedenza, risulta quindi evidente che la modulazione dell'attività di queste due popolazioni neuronali sia fondamentale per la risposta a stimoli piacevoli o aversivi e per la messa in opera di risposte comportamentali idonee a soddisfare questi stimoli.

9.2. RUOLO DEL SISTEMA MESOCORTICOLIMBICO NELLE DIPENDENZE DA SOSTANZE D'ABUSO

La dipendenza è considerato un complesso disturbo comportamentale che opera a livello molecolare, biologico, psicologico e sociale. Grazie all'utilizzo di tecnologie di neuroimaging, quali fMRI (Risonanza Magnetica Funzionale) e PET (Tomografia ad Emissione di Positroni) è stato possibile acquisire informazioni fondamentali sul modo in cui l'esposizione a sostanze d'abuso altera l'attività cerebrale, inducendo disregolazione e compulsione nell'uso e nella ricerca delle droghe. Inoltre tali cambiamenti potrebbero spiegare la difficoltà nell'astinenza dalle

droghe e la frequente ricaduta anche dopo lunghi periodi di astinenza. Le aree cerebrali colpite dalle sostanze d'abuso comprendono:

- Nucleus Accumbens (ricompensa e rinforzo);
- Corteccia OrbitoFrontale e Cingolata (compulsione, desiderio compulsivo e controllo inibitorio);
- Corteccia PreFrontale (danno del controllo esecutivo e danno cognitivo);
- Amigdala, Ippocampo e Striato (memoria, apprendimento e abitudini);
- Insula (pulsioni corporee);
- Asse Surrene-Ipotalamo-Ipofisi (Stress);
- Asse Abenulointerpeduncolare (Aversione);

E' attualmente accettato che l'effetto acuto dell'assunzione di sostanze d'abuso è mediato dall'aumento della trasmissione dopaminergica e quest'ultima a sua volta media gli effetti di rinforzo associati a comportamenti che prevedono una ricompensa. Gli adattamenti a breve e a lungo termine a carico dei neuroni dopaminergici in seguito all'uso ripetuto di droghe forniscono le basi molecolari per l'instaurarsi e il protrarsi della dipendenza stessa (Carter et al., 2009).

9.2.1. TRASMISSIONE GLUTAMMATERGICA

Negli ultimi anni è emerso il ruolo centrale della trasmissione glutammatergica nei vari aspetti comportamentali delle dipendenze. Studi recenti sull'omeostasi del glutammato hanno infatti dimostrato che questo neurotrasmettitore non viene solo rilasciato dalle presinapsi nello spazio intersinaptico, ma può essere anche rilasciato dalle cellule gliali in siti extrasinaptici, dove regola l'attività dei recettori metabotropici. Dati presenti in letteratura mostrano che il trattamento cronico con nicotina ed eroina può alterare l'omeostasi del glutammato extracellulare (Haydon, 2001; Warr et al., 1999). In particolare nel NAc circa il 60% del glutammato extracellulare è rilasciato costitutivamente dallo scambiatore cystina-glutammato espresso soprattutto in cellule gliali. In protocolli di autosomministrazione di nicotina e di cocaina, è stata osservata una riduzione dell'espressione in membrana della subunità di questo trasportatore e come conseguenza i livelli basali di glutammato extracellulare risultano dimezzati, riducendo così la stimolazione dei mGluR perisinaptici. In particolare in condizioni fisiologiche la stimolazione del sottotipo mGluR2 deprime il rilascio presinaptico di

glutammato (Madayag et al., 2007; Miguens et al., 2008). Complessivamente quanto detto suggerisce che il trattamento con cocaina oltre a ridurre la concentrazione basale di glutammato extracellulare, stimola il rilascio di glutammato dai terminali presinaptici. Questo effetto potrebbe spiegare lo stato iperglutammatergico riscontrato nel sistema mesocorticolimbico durante la somministrazione di cocaina e di altri psicostimolanti.

Diversi studi hanno dimostrato che il trattamento cronico con amfetamine, cocaina ed altri psicostimolanti provoca un aumento della densità e alterazioni nella morfologia delle spine dendritiche nel NAc e nella PFC di roditori. Nei MSNs in particolare in quelli della via diretta, l'effetto appena descritto è mediato dalla regolazione epigenetica del fattore di trascrizione Δ FosB e potrebbe coinvolgere la lisina dimetiltransferasi G9a (Maze et al., 2010; Shen et al., 2009). La formazione di nuove sinapsi potrebbe essere preceduta dalla generazione di sinapsi "silenti" contenenti NMDAR ma non AMPAR e questo potrebbe spiegare almeno in parte la riduzione delle correnti AMPA/NMDA osservata nei MSNs del NAc (Kourrich et al., 2007). Va sottolineato che i recettori NMDAR espressi nelle sinapsi silenziose incorporano prevalentemente subunità GluN2B, l'attivazione di CREB sembra svolgere un ruolo in questo meccanismo. Questi risultati supportano la teoria secondo cui le sinapsi silenziose potrebbero fungere da substrato per i processi di plasticità sinaptica (Brown et al., 2011). Il ruolo degli NMDAR è stato confermato attraverso l'induzione di CPP in linee murine in cui era stata effettuata l'ablazione genetica della subunità GluN1 dei NMDAR, selettivamente nei neuroni dopaminergici. Gli esperimenti comportamentali hanno evidenziato che questi topi non mostravano CPP in seguito al trattamento con nicotina, a differenza dei topi *wt* (Wang et al., 2010). Come ulteriore grado di complessità il cambiamento nella stechiometria degli NMDAR potrebbe influenzare i meccanismi di induzione di plasticità sinaptica, come è stato osservato nel NAc di ratti che si autosomministravano nicotina (Kasanetz et al., 2010).

I GluR sono tra le proteine più soggette a modulazione durante la somministrazione cronica di sostanze d'abuso. Nel NAc ad esempio i livelli di espressione di GluA1 risultano aumentati in seguito al trattamento con nicotina, più recentemente avvalendosi di un protocollo di autosomministrazione di cocaina è stato

possibile dimostrare che l'aumento di AMPAR nel NAc è legato all'inserzione in membrana di sottotipi privi della subunità GluA2 (Conrad et al., 2008). Uno studio ha riportato un aumento della fosforilazione di GluA1 in seguito a trattamento acuto con nicotina, dato confermato da un altro studio che in condizioni analoghe ha osservato un aumento dell'espressione in membrana di GluA1. Questi dati sono corroborati dal blocco della ricerca compulsiva di cocaina ed eroina in seguito alla somministrazione intra-NAc di antagonisti degli AMPAR, in topi sottoposti ad un protocollo di reinstatement (Grueter e Malenka, 2013; Gao et al., 2010; Wang et al., 2008). È interessante notare che 24h dopo l'iniezione di cocaina l'espressione di GluA1 in membrana appare ridotta. Questo andamento bifasico dell'espressione di GluA1 è in linea con i dati morfologici che riportano un rapido aumento delle dimensioni delle spine nei 45minuti successivi all'iniezione, seguito da una marcata riduzione delle dimensioni delle stesse a partire da 2h dall'iniezione e potrebbe riflettere meccanismi di eso ed endocitosi di AMPAR. Inoltre esperimenti di elettrofisiologia e biochimica evidenziano in NAc un aumento dell'espressione di AMPAR durante l'astinenza da cocaina, questo processo sembra essere specifico per i MSNs della via diretta e sembra coinvolgere prevalentemente recettori privi della subunità GluA2/3 (Conrad et al., 2008). Quanto osservato ha permesso di speculare che l'attivazione delle sinapsi silenti indotta da cocaina possa essere un adattamento che permane a lungo termine.

Anche i mGluRs sono ridotti in seguito al trattamento cronico con cocaina e all'autosomministrazione di nicotina, nel NAc, infatti, è stata rilevata una riduzione di mGluR2/3, di mGluR1/5 e della proteina scaffold Homer1b/c (Kane et al., 2005). Il coinvolgimento di queste proteine negli effetti biologici indotti dalle sostanze d'abuso è stato dimostrato sia somministrando agonisti o antagonisti specifici, che bloccando geneticamente l'espressione delle stesse proteine. In aggiunta una singola esposizione alla cocaina è sufficiente per modificare i meccanismi di induzione della LTP dipendente da mGluR5 nei MSNs del pathway indiretto e per alterare la trasmissione sinaptica basale dei neuroni dopaminergici della VTA, quest'ultimo effetto sembra essere un requisito necessario per gli adattamenti sinaptici nel NAc (Mameli et al., 2009).

9.2.2. TRASMISSIONE COLINERGICA

Molte sostanze d'abuso provocano alterazioni anche nella trasmissione colinergica, considerando che i nAChR sono il bersaglio diretto della nicotina, è evidente quanto sia rilevante comprendere a pieno il contributo di questi recettori negli aspetti comportamentali della dipendenza dalla nicotina. Un esempio dell'importanza dei nAChR in questi meccanismi è stato evidenziato in topi $\beta 2$ KO, in cui attraverso un protocollo di "foot shock avoidance" sono stati rilevati difetti nel potenziamento della memoria degli stimoli negativi indotto da nicotina (Picciotto et al., 1995; King et al., 2003). Un altro dato interessante viene da studi condotti su linee murine KO per le subunità $\alpha 4$, $\beta 2$ o $\alpha 6$ dei nAChR, in questi topi infatti non è possibile indurre un protocollo di autosomministrazione sistemica di nicotina, mentre la riespressione in VTA delle diverse subunità mediante vettori virali è in grado di ripristinare questo comportamento (Pons et al., 2008). In contrasto la delezione della subunità $\alpha 7$ non influenza l'autosomministrazione sistemica di nicotina. Comparando i dati emersi da questi esperimenti con quelli ottenuti in esperimenti analoghi in cui la nicotina era autosomministrata intra-VTA, si è potuto concludere che i recettori $\alpha 4\beta 2^*$ e $\alpha 6\beta 2^*$ sono necessari e sufficienti per l'autosomministrazione di nicotina (Changeux, 2010). Inoltre esperimenti riportano che i topi $\beta 2$ KO non mostrano CPP in seguito a somministrazione di nicotina, mentre topi che esprimono una subunità $\alpha 4$ iperfunzionale mostrano CPP a dosi di nicotina 50 volte inferiori rispetto ai *wt* (Walters et al., 2006). Diversi studi hanno evidenziato anche un ruolo per le subunità $\alpha 5$ e $\beta 4$ negli effetti di rinforzo della nicotina (Sanders et al., 2009).

Dal punto di vista fisiologico la nicotina modula il rilascio di praticamente tutti i neurotrasmettitori coinvolti nelle dipendenze, tra questi la dopamina esplica un ruolo centrale. Registrazioni da singoli neuroni della VTA hanno rivelato che in condizioni fisiologiche i neuroni dopaminergici scaricano lentamente e in maniera tonica, in seguito alla somministrazione di nicotina i neuroni iniziano a scaricare in maniera fasica (Grace e Bunney, 1984; Kitai et al., 1999). Questo cambio nella trasmissione è stato associato a ricompense e a stimoli che prevedono una ricompensa (Schultz, 2002). Le scariche fasiche dei neuroni dopaminergici non sono presenti in fettine mesencefaliche, indicando che questo tipo di trasmissione richiede afferenze

glutammatergiche dalla PFC e glutammatergiche o colinergiche dai nuclei PPT e LDT (Mansvelder et al., 2003). Inoltre in topi *wt* l'iniezione di nicotina provoca un aumento del firing dei neuroni dopaminergici, questo effetto è stato osservato in topi $\alpha 6$ KO ma non in topi $\alpha 4$ KO, indicando che i recettori $\alpha 4^*$ sono coinvolti nella transizione da firing tonico a firing fasico dei neuroni dopaminergici (Mameli-Engvall et al., 2006). Come discusso in precedenza, il firing fasico dei neuroni dopaminergici provoca un aumento del rilascio di DA nel NAc. Questo effetto non è stato osservato in topi in cui è stata deleta la subunità $\alpha 4$ o $\alpha 6$, indicando un ruolo dei recettori $\alpha 4^*$ e $\alpha 6^*$ nell'aumento indotto da nicotina nel rilascio di dopamina nel NAc.

Sono stati dimostrati anche effetti della nicotina sulla trasmissione GABAergica. Le IPSC (correnti inibitorie postsinaptiche) sono infatti ridotte in seguito al blocco farmacologico dei recettori omomerici $\alpha 7$ e completamente soppresse dal blocco farmacologico dei recettori omomerici, supportando il ruolo del sottotipo $\alpha 4\beta 2$ nel rilascio di GABA (Tolu et al., 2010).

In conclusione gli studi condotti nel corso di questi anni hanno chiarito parte dei meccanismi cerebrali coinvolti nelle dipendenze, le recenti evidenze che una sinapsi possa rilasciare più di un neurotrasmettitore potrebbero complicare il quadro, ma portare alla comprensione di effetti prima inspiegabili. Tuttavia ancora molti anni di studi saranno necessari prima di poter affermare di aver capito come il SNC risponde alle sostanze d'abuso.

10. MATERIALI E METODI

10.1. PRODUZIONE ANTICORPI POLICLONALI SUBUNITÀ SPECIFICI

10.1.1. SINTESI PEPTIDI

Gli Abs policlonali sono stati prodotti contro i peptidi ottenuti dalle sequenze delle subunità nicotiniche clonate di roditori ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$) e dalle sequenze delle subunità glutammatergiche clonate di roditori (GluN2A, GluA1, GluA2/3). Le sequenze scelte come epitopo rappresentano la zona di minore omologia con le altre subunità, individuate comparando al computer le varie sequenze così da evitare fenomeni di cross-reattività. Per sintetizzare i diversi peptidi è stato utilizzato il sintetizzatore di peptidi Applied Biosystem modello 431, secondo la metodica di Merrifield (Vailati et al, 1999), il materiale ottenuto è poi stato purificato con una cromatografia a scambio ionico seguita da una cromatografia liquida in fase inversa semi-preparativa. Per quanto riguarda la maggior parte delle subunità nicotiniche sono stati sintetizzati sia un peptide localizzato nel dominio citoplasmatico posto tra le regioni M3 e M4, che uno localizzato all'estremità carbossilica extracellulare. Per le subunità glutammatergiche i peptidi sintetizzati sono localizzati nella regione N-terminale della subunità GluA1 e GluN2A e in quella C-terminale della subunità GluA2/3 (Fig.17)

Sequenze peptidi per immunizzazioni

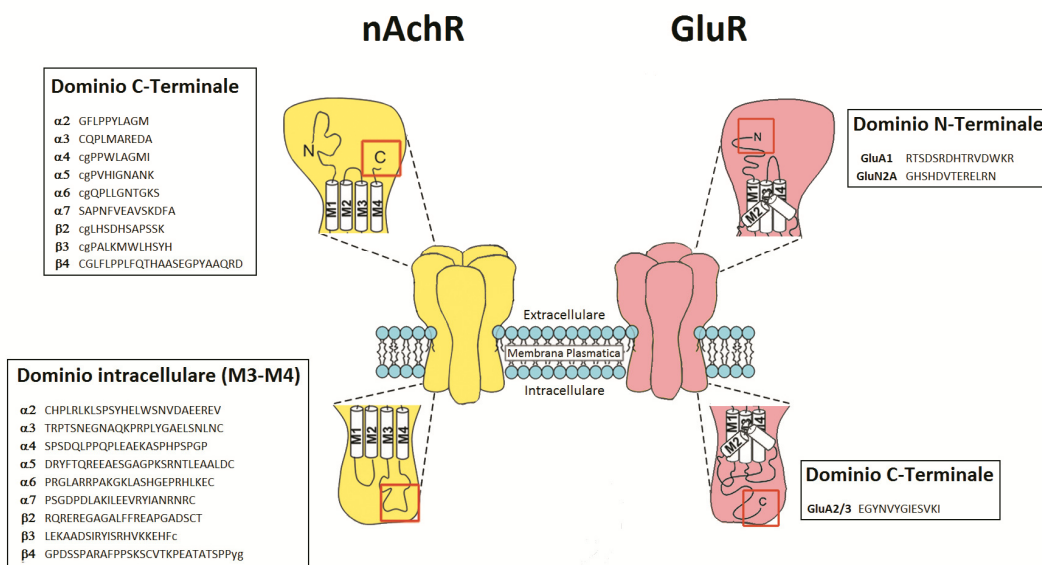


FIGURA 17: Schema contenente le sequenze aminoacidiche dei peptidi delle subunità nicotiniche e glutammatergiche umane e murine contro le quali sono stati prodotti gli Abs policlonali subunità specifici, in coniglio. Per ogni subunità nicotiniche è stato sintetizzato un peptide localizzato nel loop citoplasmatico tra M3 e M4 (cyt) e uno nel COOH terminale della subunità.

Per l'immunizzazione, il peptide purificato è stato legato covalentemente alla proteina carrier ovoalbumina, mediante l'utilizzo di residui di cisteina e del reagente eterobifunzionale sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)cicloesano-1-carbossilato. Per lo screening dell'antisiero il peptide è stato coniugato via cisteina, all'albumina sierica di coniglio. La procedura di purificazione è descritta in letteratura. Il peptide non coniugato viene separato mediante cromatografia in gel permeazione su colonna Sephacryl H-100 (Pharmacia).

10.1.2. IMMUNIZZAZIONE E PRELIEVO

Gli anticorpi policlonali sono stati ottenuti immunizzando conigli maschi (peso 2,8-3,2Kg) con il peptide designato. Prima dell'immunizzazione a ciascun coniglio è stato effettuato un prelievo per ottenere il siero preimmune. Per le prime due immunizzazioni eseguite a tempo 0 (T0) e dopo 15 giorni, i peptidi purificati legati all'ovoalbumina vengono diluiti in 500µl acqua (concentrazione finale 0,5 mg/ml) ed emulsionati con un volume equivalente di adiuvante completo di Freund. La terza immunizzazione viene fatta dopo 30 giorni (T30) e da questo momento si procede con un richiamo trimestrale. Per l'immunizzazione a 30 giorni e per quelle successive il peptide viene emulsionato con adiuvante incompleto. Le emulsioni vengono iniettate sottocute con la formazione di sei centri di reazione. Dopo 15 giorni dal T30 e ogni due settimane successive, viene effettuato un prelievo dalla vena marginale dell'orecchio del coniglio. Il sangue prelevato (in media 50 ml) viene incubato per un'ora a 37°C e poi centrifugato a 4°C a 2000 rpm per 45 minuti. Il siero ottenuto viene recuperato ed ulteriormente centrifugato con la stessa modalità. Il siero chiarificato, ottenuto dopo la seconda centrifugata viene raccolto in una provetta da 50 ml e congelato.

10.1.3. PURIFICAZIONE ANTICORPI

Gli Abs prodotti sono stati purificati dal siero attraverso cromatografia d'affinità, utilizzando resine di Sefarosio 4B CNBr-attivate (GE Healthcare) coniugate al peptide libero (1mg di peptide/1ml di resina). Il siero viene incubato con la resina (in rapporto 5:1) per 2h a temperatura ambiente in agitazione su ruota. La resina viene poi lavata con PBS (0,14M NaCl; 2,6mM KCl; 8,1mM Na₂HPO₄; 1,5mM KH₂PO₄) e gli anticorpi legati vengono eluiti con glicina 0,2M pH 2,2 in frazioni da circa 1 ml e

tamponati con TRIS 1M. La concentrazione di Abs nelle frazioni viene determinata attraverso lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 280nm.

10.1.4. DETERMINAZIONE DELLA SPECIFICITÀ DEGLI ANTICORPI PRODOTTI

La validità di questi studi dipende dalla specificità degli Abs prodotti, che viene accuratamente e costantemente verificata. A tale scopo vengono condotti esperimenti di immunoprecipitazione su recettori estratti o purificati da diverse aree del SNC. I valori vengono espressi come:

- percentuale di immunoprecipitazione, indice della frazione di recettori precipitati dall'Ab utilizzato, considerando come 100% la quantità di recettori presenti nell'estratto prima dell'immunoprecipitazione
- femtomoli di recettore legante la ³H-Epibatidina immunoprecipitate dall'anticorpo per mg di proteine presenti.

La determinazione della percentuale di immunoprecipitazione ha permesso di confrontare la capacità immunoprecipitante dei diversi Abs e quantificarla in valori compresi tra l'80-90%. La specificità è stata controllata confrontando le fmol di recettore immunoprecipitato dall'anticorpo diretto una determinata subunità in tessuti WT o KO per quella specifica subunità.

La specificità degli anticorpi è stata ulteriormente verificata attraverso esperimenti di western blotting condotti alternativamente su estratti ottenuti da tessuti neuronali di topi KO, Het o WT.

10.2. ESPERIMENTI *IN VIVO* SU LINEE MURINE

10.2.1. LINEE MURINE

I modelli animali usati in questo progetto di ricerca sono topi C57BL/6J. Gli esperimenti sono stati condotti seguendo protocolli conformi alle direttive europee e nazionali in materia di sperimentazione animale. Questi topi sono stati stabulati in un ambiente mantenuto a 22°C in cui la luce era presente dalle 7 del mattino fino alle 7 di sera e l'accesso al cibo e all'acqua era libero.

10.2.2. SOMMINISTRAZIONE CRONICA DI NICOTINA PER VIA ENDOVENOSA

I tessuti cerebrali oggetto degli esperimenti di questo progetto di dottorato sono stati forniti dal laboratorio del Dr. Michael Marks (Institute for Behavioral

Genetics, University of Colorado, Boulder, Colorado, USA). I topi anestetizzati per via intraperitoneale (pentobarbital 55mg/Kg; Idrato di Cloralio 110mg/Kg) hanno subito un intervento in cui è stata fatta una piccola incisione in modo da rendere visibile la vena giugulare destra in cui è stata inserita una cannula di silastic riempita di soluzione salina sterile + 0,3% Acido citrico (anticoagulante). I topi vengono lasciati recuperare dall'intervento chirurgico e successivamente trasferiti in una camera individuale d'infusione (lunghezza 15cm, larghezza 15cm, altezza 25cm). Nella camera d'infusione la canula viene attaccata ad una pompa ad infusione (Harvard Infusion Pump) mediante la quale viene infusa per due giorni una soluzione salina sterile ad un tasso di 35µl/ora. Dopo due giorni i topi sono stati divisi in 4 gruppi di trattamento ed hanno ricevuto diverse dosi di nicotina: 0 (controllo), 0,25, 1,0, 2,0 o 4mg/kg/h. Dopo 14 giorni di trattamento con nicotina ai topi è stata staccata la pompa di infusione e dopo due ore sono stati sacrificati. Le due ore sono necessarie per consentire la quasi totale metabolizzazione della nicotina. Per ogni trattamento i topi sacrificati sono stati 8, rispettivamente 4 per il genotipo $\alpha 4$ e 4 per genotipo $\beta 2$. Una seconda serie di esperimenti sono stati condotti sulle cortecce cerebrali di topi trattati cronicamente per 14 giorni con nicotina (4mg/kg/ora) come descritto sopra, e successivamente sacrificati a tempi diversi: tempo0 (fine trattamento), dopo un giorno, dopo 4 giorni, dopo 14 giorni.

10.2.3. ANALISI DEI LIVELLI DI NICOTINA E COTININA PLASMATICA

La concentrazione di nicotina e di cotinina nel plasma viene determinata attraverso gas cromatografia/spettrometria di massa, adattando la procedura descritta da Jacob et al (1991). Il volume plasmatico totale viene misurato con una pipetta elettronica digitale (Rainin LTS-20) e trasferito in provette. Le rette di taratura per il dosaggio della nicotina e della cotinina, sono ottenute aggiungendo ai campioni di plasma rispettivamente 20 ng di 3',4',5'-¹³C(±)nicotina o 100 ng di metil-D₃-cotinina. I campioni vengono basificati con l'aggiunta di 200µl di NaOH (2N), si aggiungono 2 ml di una soluzione toluene:butanolo (70:30) e si procede con una centrifugata a 2000g per 1'. La frazione organica viene trasferita in provette contenenti 300µl di H₂SO₄ 0,5N, miscelata e separata per centrifugazione. La fase acquosa viene recuperata e trasferita in provette per concentrazione contenenti 200µl di K₂CO₃ 4N in NH₄OH 0,2N + 30µl di

Toluene:Butanolo (90:10). I campioni così preparati vengono miscelati, centrifugati e la fase organica viene recuperata e conservata a -70°C. Si procede successivamente all'estrazione dei campioni e al loro caricamento in un autocampionatore (Hewlett Packard 7673). Un volume (2 µl) di campione viene sottoposto a gas cromatografia (HP5890GC). Seguita da spettrometria di massa (HP5971). I valori ottenuti sono compresi nell'intervallo di linearità della metodica (3-400ng/ml).

10.2.4. PREPARAZIONE DI OMOGENATI ED ESTRATTI DI TESSUTI NEURONALI

I tessuti neuronali utilizzati vengono pesati e lavati per centrifugazione in tampone B (Na~P pH7,4, 1M NaCl, 50mM Na₂HPO₄, 2mM EDTA, 2mM EGTA), successivamente vengono omogenizzati con Ultraturrax e centrifugati per 1h a 15000 rpm. Il pellet ottenuto viene quindi risospeso nello stesso tampone in presenza di inibitori delle proteasi (bestatina, pepstatina, leupeptina e aprotinina) alla concentrazione di 10 µg/ml.

L'estrazione del recettore avviene successivamente mediante aggiunta di TRITON X-100 alla concentrazione finale del 2%. Le membrane vengono lasciate ad estrarre in agitazione per 2h a 4°C e poi centrifugate a 15000 rpm per 1h30'. Il surnatante (frazione solubilizzata) viene recuperato e congelato a -20°C.

10.2.5. PURIFICAZIONE DELLA FRAZIONE SINAPTOSOMALE

I tessuti neuronali vengono lavati abbondantemente in tampone saccarosio (10mM TRIS; 0,32M Saccarosio) e risospesi in un volume appropriato dello stesso tampone. I campioni vengono quindi omogenati mediante un potter elettrico e centrifugati a 1000g per 5'. Dopo la centrifugata si ottengono un surnatante (S1) contenente le membrane cellulari e un pellet (P1) di nuclei e detriti cellulari. Il surnatante viene recuperato e ulteriormente centrifugato a 12000g per 20'. Dopo questa centrifugata si ottiene un surnatante (S2) contenente la frazione non sinaptosomale e un pellet (P2) di sinaptosomi. Il pellet viene risospeso in un volume appropriato di tampone citisina + inibitori delle proteasi + PMSF 2mM. I campioni così preparati vengono aliquotati e conservati a -20°C.

10.3. ESPERIMENTI BINDING, ANALISI FARMACOLOGICA E BIOCHIMICHE.

10.3.1. ³H EPIBATIDINA

L'epibatidina è un alcaloide estratto dalla pelle di una rana dell'Ecuador, la *Epipedobates tricolor*. Tale sostanza, isolata per la prima volta da John Daly al NIH, presenta proprietà analgesiche duecento volte superiori a quelle della morfina, mediate però non dai recettori μ -oppioidi ma dai recettori nicotinici eteromerici ed omomerici del SNC, con affinità (Kd) diverse a seconda del sottotipo. Studi precedenti condotti dal nostro laboratorio hanno determinato che la ³H-Epibatidina (Perkin Elmer Life Sciences; attività specifica 56-66 Ci/mmol) oltre a legare con alta affinità i recettori contenenti le subunità $\beta 2$ e $\beta 4$ è in grado di legare i recettori contenenti la subunità $\alpha 7$ con affinità variabile. Per evitare che i sottotipi contenenti le subunità $\alpha 7$ contribuissero al legame della ³H-Epibatidina, tutti gli esperimenti di binding e di immunoprecipitazione sono stati condotti in presenza di 2 μ M α -Bgtx.

10.3.2. BINDING ALLE MEMBRANE

In esperimenti preliminari abbiamo determinato la Kd del binding della ³H-Epibatidina ai recettori nicotinici presenti in omogenati di tessuti neuronali. Per determinare la Kd aliquote di membrane diluite in tampone citisina (Tris HCl 50mM pH7, NaCl 120mM, KCl 5mM, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 2,5mM) sono state incubate con concentrazioni comprese tra 25pM e 2nM di ³H-Epibatidina per tutta la notte (O/N) a 4°C o per 3h a RT. In parallelo, per ogni concentrazione di ³H-Epibatidina è stato determinato il binding aspecifico, incubando nelle stesse condizioni le membrane in presenza di Epibatidina non radioattiva (RBI) alla concentrazione di 250 nM. Dopo l'incubazione le membrane sono state separate per filtrazione su filtri GF-C (Whatmann) idratati con PEI (polietilenimmina), lavate con un tampone di lavaggio (50mM Na⁺P, pH 7.4) e la radioattività emessa contata al β -counter con 5 ml di liquido di scintillazione Filter-count (Perkin Elmer). Attraverso questi esperimenti è stata determinata la concentrazione saturante di ³H-Epibatidina (1-2nM), che sarà utilizzata nel corso degli esperimenti successivi.

10.3.3. BINDING AI RECETTORI SOLUBILIZZATI

Per il binding ai recettori solubilizzati è stata utilizzata una resina a scambio ionico DE52 (Whatmann) o DEAE-Sepharose Fast flow (GE Healthcare) sedimentata in colonnine e lavata con 10 ml di tampone di lavaggio (diluito 1:4 in acqua). Aliquote di 100 μ l di estratto ottenuto da tessuti neuronali vengono incubate con $^3\text{H-Epi}$ 2 nM per 3 ore a RT oppure O/N a 4°C, l'estratto viene messo in contatto con la resina e lasciato assorbire per 5 min. La resina viene quindi lavata con 10 ml di wash buffer (diluito 1:4 in acqua + 0.1% TRITON), i recettori sono eluiti con 3 ml di NaOH 1N e la radioattività rilevata dal β -counter dopo l'aggiunta di 10 ml di liquido di scintillazione. Il binding aspecifico della $^3\text{H-Epi}$ è stato determinato in parallelo incubando l'estratto marcato in presenza di Epibatidina non radioattiva (250 nM). Ogni estratto ottenuto è stato marcato con concentrazione di $^3\text{H-Epi}$ 1nM per tutta la notte a 4°C; in parallelo ad una aliquota di estratto è stata anche aggiunta l'Epi non marcata alla concentrazione di 150nM per poter determinare il legame aspecifico della $^3\text{H-Epi}$ all'estratto cellulare. Gli estratti sono stati incubati tutta la notte e il giorno successivo aliquote (50-100 μ l) degli estratti sono diluiti con H₂O fino a 200 μ l e applicati ad una colonnina contenente 500 μ l di resina a scambio ionico DE52 (Whatmann) o 200 μ l della resina DEAE –Sepharose Fast flow (GE Healthcare) e lasciati assorbire per 5 min .

La resina viene lavata con 10 ml di tampone wash buffer diluito 1:4 + TRITON X-100 per rimuovere la $^3\text{H-Epi}$ non legata. Il recettore legato alla resina viene eluito con 3 ml di 1N NaOH e contato mediante aggiunta di 10 ml di liquido di scintillazione Filter-count (Perkin Elmer) al β -counter.

10.3.4. BINDING DELLA ^{125}I - A BUNGAROTOSSINA

Per determinare il legame della ^{125}I - αBgtx , ad ogni campione vengono aggiunti 2mg/ml di BSA. Le aliquote delle membrane vengono incubate con una concentrazione 2-4 nM di ^{125}I - αBgTx (Amersham, attività specifica 200-214 Ci/mmol). Parallelamente è stato determinato il legame aspecifico incubando per tutta la notte le membrane nelle condizioni appena descritte in presenza di $\alpha\text{-Bgtx}$ non radioattiva (Sigma) alla concentrazione 1 μ M. Le membrane vengono separate per filtrazione su filtri GF-C idratati con PEI e la radioattività viene contata nel γ -counter.

10.3.5. IMMUNOPRECIPITAZIONE DEGLI ESTRATTI

LEGAME DELLA PROTEINA A AGLI ANTICORPI PURIFICATI

La proteinaA viene lasciata idratare tutta notte in una provetta da 15 ml con il PBS, la mattina successiva viene lavata con PBS e viene aggiunto l'anticorpo (2mg/500µl di proteinaA). Il legame dell'anticorpo alla proteinaA avviene in agitazione su ruota per un'ora a RT. Dopo l'incubazione le provette vengono centrifugate e il surnatante letto allo spettrofotometro per verificare il legame dell'anticorpo alla proteinaA. La proteinaA viene quindi lavata con sodio borato (0,2M; pH7), si aggiunge il composto cross-linkante DimetilPiMelimidato (20mM) (DMP, Thermo scientific) e si lascia incubare su ruota per 30' a RT. La proteina con legato l'Ab viene quindi recuperata e lavata con etanolamina (0,2M; pH 8) per 1h, rilavata con PBS e infine conservata in PBS + NaN₃ (0.05%).

IMMUNOPRECIPITAZIONE DEGLI ESTRATTI

Le concentrazioni di ³H-Epi e di ¹²⁵I-αBgtx utilizzate per marcare l'estratto sono state calcolate precedentemente attraverso curve di saturazione e di binding. Gli estratti preparati marcati con ³H-Epi 1 nM vengono incubati per tutta la notte con 20µl di proteina A-Ab (2mg Ab/500µl proteinaA) in agitazione su ruota in camera fredda.

La mattina successiva i campioni vengono centrifugati e viene eliminato il surnatante. Si procede con due lavaggi con il tampone di lavaggio + 0.1%Triton X-100. Alle resine con immunoimmobilizzati i recettori marcati con ³H-Epi vengono poi aggiunti 200 µl di NaOH 1N. I campioni eluiti vengono trasferiti in vials, e la radioattività emessa rilevata al β-counter dopo l'aggiunta di 10ml di scintillante.

Per quantificare il recettore contenete la subunità α7, gli estratti vengono marcati con ¹²⁵I-αBgTx 2-4 nM e incubati per una notte con la proteinaA con legati gli anticorpi anti-α7. Il giorno successivo le resine vengono lavate due volte mediante centrifugazione e successivamente contate direttamente nel γ-counter. Il binding dell'immunoprecipitato è stato espresso come fmol di recettori marcati con ³H-Epi o ¹²⁵I-αBgTx precipitati per mg di proteine o come percentuali di immunoprecipitazione.

10.3.6. DOSAGGIO PROTEICO

Il dosaggio del contenuto proteico dei campioni viene effettuato attraverso il BCA protein assay kit della Euroclone. Questo kit contiene due soluzioni, reagente A e reagente B, che vanno mescolati prima dell'uso in un rapporto 1:50 ottenendo così una miscela di reattivo. A volumi noti di ogni nostro campione viene quindi aggiunto 1 ml di questa miscela e si lascia incubare per 30 minuti in un bagnetto termostato a 37°C. Al termine dell'incubazione i campioni vengono letti allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 562nm. Nel caso del dosaggio delle proteine di omogenati, i campioni vengono denaturati in NaOH 1N. In parallelo per ogni dosaggio è stata costruita una retta di taratura con concentrazioni note di BSA da usare come standard di riferimento.

10.3.7. SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING

Basandosi sul dosaggio proteico precedentemente descritto vengono preparati campioni contenenti una quantità costante di proteine totali. Volumi costanti dei diversi campioni, vengono caricati su un gel di acrilamide (7,5 o 9%) e separati elettroforeticamente (100 Volt costanti). Le proteine vengono quindi trasferite su una membrana di nitrocellulosa (100 Volt costanti per 1h30').

I blot ottenuti vengono incubati O/N in TBS (20mM TRIS, 150mM HCl, pH 7,5) 4% latte per bloccare il legame aspecifico degli anticorpi e successivamente incubati con anticorpi subunità specifici diluiti all'appropriata concentrazione per 2h a RT (anti-GluN1 BD Bioscience; anti-GluN2B, anti-SAP102, anti-PSD95 NeuroMab Antibodies Incorporated; anti-mGluR5 Millipore; anti-mGluR2 AbCam; gli altri Abs utilizzati sono autoprodotti come precedentemente descritto). Dopo ripetuti lavaggi, le membrane vengono incubate con gli abs secondari opportuni per 1h a RT (anti-rabbit Ly-Cor IRDye800RD; anti-mouse Ly-Cor IRDye680RD). Il segnale emesso viene rilevato da uno scanner ad infrarosso (Odyssey CLx - Infrared Imaging System).

10.3.8. ANALISI DATI

I dati ottenuti dallo scanner ad infrarosso sono stati analizzati mediante il software iStudio in dotazione allo strumento. Per l'analisi statistica dei dati di WB è stato

utilizzato il test Kruskal-Wallis seguito da post-hoc Dunn's multiple comparison utilizzando il software GraphPad PRISM.

I dati di binding e di immunoprecipitazione sono stati analizzati con il test statistico ANOVA (one way analysis of variance) seguita da post-hoc Bonferroni test per dati parametrici e dal test Kruskal-Wallis seguito da post hoc Dunn's multiple comparison test per i dati non parametrici utilizzando il software GraphPad PRISM.

La significatività dei dati è espressa con il valore:

- $P > 0.05$ = non significativo;
- $0.01 < P < 0.05$ (*) = significativo;
- $0.001 < P < 0.01$ (**) = molto significativo;
- $P < 0.001$ (***) = estremamente significativo;

11. RISULTATI

Questo progetto si prefigge, in primo luogo di chiarire gli effetti del trattamento cronico con nicotina sull'espressione delle diverse subunità di nAChR nel SNC di roditori, con particolare attenzione agli effetti sottotipo- e area-specifici. In secondo luogo si vuole analizzare l'espressione dei nAChR e dei GluR nelle aree del circuito mesocorticolimbico al termine del trattamento cronico con nicotina e durante l'astinenza. A tale scopo sono state applicate sia tecniche di binding con ligandi radioattivi sottotipo-specifici, che metodiche biochimiche e immunologiche.

11.1. SPECIFICITA' ABS

L'identificazione e la caratterizzazione dei diversi sottotipi recettoriali è stata effettuata mediante Abs policlonali sub-unità specifici prodotti in coniglio. Per verificarne la specificità, gli Abs purificati sono stati testati in esperimenti di immunoprecipitazione e di WB su tessuti cerebrali di topi WT e KO, o su cellule trasfettate o non trasfettate con la proteina di interesse.

11.1.1. ANALISI DELLA SPECIFICITA' DEGLI ANTICORPI MEDIANTE IMMUNOPRECIPITAZIONE

Gli Abs purificati sono stati testati in esperimenti di immunoprecipitazione quantitativa eseguiti su estratti di tessuti neuronali prelevati da diverse aree cerebrali di topi adulti (8-10 settimane). Gli estratti sono stati marcati con ^3H -Epibatidina 1nM, un ligando ad alta affinità per i nAChR omomerici ed eteromerici. Per identificare i diversi sottotipi recettoriali, gli estratti sono stati preincubati con αBgTx 1 μM che blocca i siti di legame dei recettori omomerici, in questa maniera la ^3H -Epibatidina lega selettivamente i recettori eteromerici. Dopo la marcatura col ligando radioattivo, gli estratti vengono incubati con concentrazioni saturanti di Abs (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) diretti contro le subunità $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$. I complessi Abs-recettore vengono quindi recuperati mediante filtrazione su resina coniugata ad Abs di capra diretti contro le IgG di coniglio. La quantificazione dei recettori immunoprecipitati viene effettuata mediante lettura al β -counter.

I valori ottenuti sono stati espressi come percentuali di immunoprecipitazione e rappresentano la frazione di recettore immunoprecipitato dall'Ab specifico,

considerando come 100% la quantità di recettori presenti nell'estratto prima dell'immunoprecipitazione. In alternativa i valori vengono espressi come fmol di recettore immunoprecipitato per mg di proteine totali dell'estratto. La quantificazione ha permesso di confrontare la capacità immunoprecipitante di diversi anticorpi, che è risultata generalmente del 80-90%.

Come ulteriore controllo della specificità degli Abs gli esperimenti di immunoprecipitazione appena descritti sono stati ripetuti su aree cerebrali di topi KO per le singole sub unità di nAChR (α 4KO, α 5KO, α 6KO, α 7KO, β 2KO, β 3KO). Per quanto riguarda gli Abs diretti contro le subunità α 2, α 3 e β 4 gli esperimenti di immunoprecipitazione sono stati condotti su estratti di cellule HEK trasfettate o non trasfettate con il sottotipo α 3 β 4 o α 2 β 4. I risultati ottenuti confermano che gli Abs immunoprecipitano il recettore solubilizzato esclusivamente nei tessuti cerebrali o nelle linee cellulari in cui il recettore stesso è espresso, escludendo quindi fenomeni di cross reattività tra gli Abs (Grady et al., 2009).

11.1.2. ANALISI DELLA SPECIFICITA' DEGLI ANTICORPI MEDIANTE WESTERN BLOTTING

La specificità degli Abs è stata verificata anche attraverso esperimenti di SDS-PAGE e Western Blotting, condotti su estratti di corteccia cerebrale di topi WT, Het o KO per le subunità α 4 e β 2. I risultati mostrano chiaramente che gli Abs anti- α 4 e anti- β 2 sono altamente specifici in quanto riconoscono le subunità recettoriali nei topi WT e Het ma non nei KO (Fig.18).

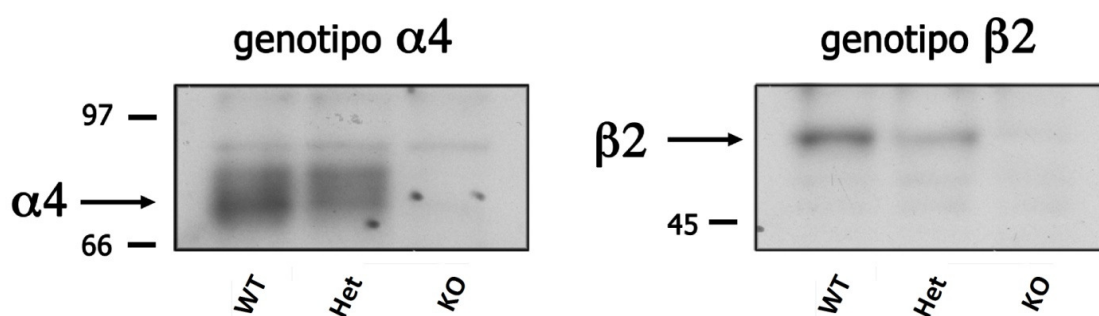


FIGURA 18: Quantificazione dell'espressione della subunità α 4 e della subunità β 2 mediante anticorpi policlonali subunità specifici in estratti ottenuti da cervello in toto di topi WT, Het e KO sia per la subunità α 4 (genotipo α 4) che per la subunità β 2 (genotipo β 2).

11.2. EFFETTI DEL TRATTAMENTO CRONICO CON NICOTINA SULL'ESPRESSIONE DEI RECETTORI COLINERGICI NICOTINICI NEL SNC

Nella prima fase di questo studio, in collaborazione con il Dr. M. Marks, topi WT, Het e KO per le subunità $\alpha 4$ e $\beta 2$, sono stati divisi in 4 gruppi e ognuno di questi è stato trattato per 2 settimane con una dose predefinita di nicotina (0,25; 1; 4 mg/Kg/ora) o con una soluzione salina come controllo (0 mg/Kg/ora) (Fig.19). I topi trattati presentano una concentrazione rispettivamente 60, 250 e 1300 nM di nicotina nel sangue. Al termine del trattamento sono stati condotti studi di binding, di immunoprecipitazione e di Western blotting su estratti preparati dai cervelli *in toto* degli animali appartenenti ai diversi gruppi sperimentali.

Protocollo di trattamento

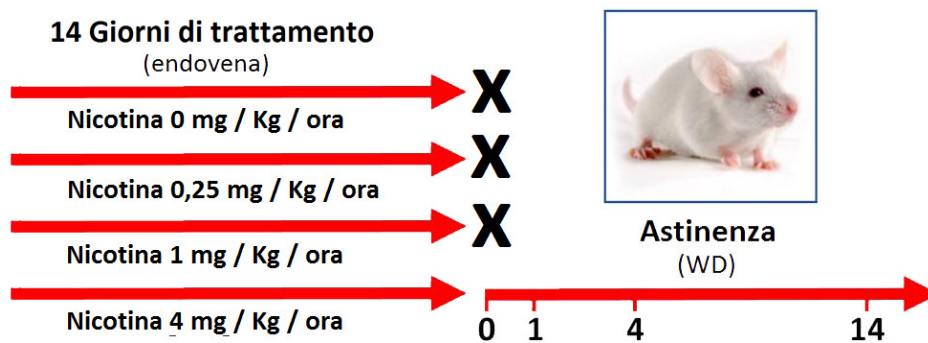


FIGURA 19: Protocollo sperimentale per il trattamento cronico con nicotina di topi $\alpha 4$ o $\beta 2$ WT, Het, KO. I topi sono stati trattati per via endovenosa con le dosi indicate di nicotina, al termine del trattamento il gruppo sperimentale trattato con la dose maggiore di nicotina è stato esposto a 1, 4 o 14 giorni di astinenza.

11.2.1. CARATTERIZZAZIONE DEI TOPI WT, HET E KO

In una fase preliminare dello studio sono stati analizzati i livelli basali di espressione nei nAChR nel SNC delle diverse linee di topi transgenici. I dati ottenuti evidenziano una netta riduzione dei siti di legame per la ^3H -Epibatidina nei topi Het rispetto a quelli WT, la condizione di eterozigosi per la subunità $\alpha 4$ infatti causa la perdita del 46% dei siti di legame per la ^3H -epibatidina ($\alpha 4$ WT:92,63 $\alpha 4$ Het:49,93 fmol recettore/mg proteine)(Fig.20A), risultati analoghi sono stati ottenuti anche nei topi eterozigoti per la subunità $\beta 2$ ($\beta 2$ WT:90,29 $\beta 2$ Het:49,20 fmol recettore/mg proteine)(Fig.20B).

Come atteso i livelli di espressione dei nAChR nel cervello di topi $\alpha 4$ WT e $\beta 2$ WT sono sovrapponibili (Fig.20D), più interessante è l'evidenza che i nAChR sono espressi a livelli simili anche nel cervello di topi $\alpha 4$ Het e $\beta 2$ Het (Fig.20E). La delezione di una sola delle due subunità è quindi condizione sufficiente per la perdita di circa la metà dei siti di legame per la ^3H -Epibatidina nel cervello di un topo adulto. Studi analoghi sono stati condotti anche su topi $\alpha 4$ KO e $\beta 2$ KO, in entrambe queste linee si è assistito alla riduzione di circa il 95% dei siti di binding per la ^3H -Epibatidina (Fig.20F), il segnale residuo rilevato è da attribuire a sottotipi recettoriali privi delle subunità $\alpha 4$ o $\beta 2$.

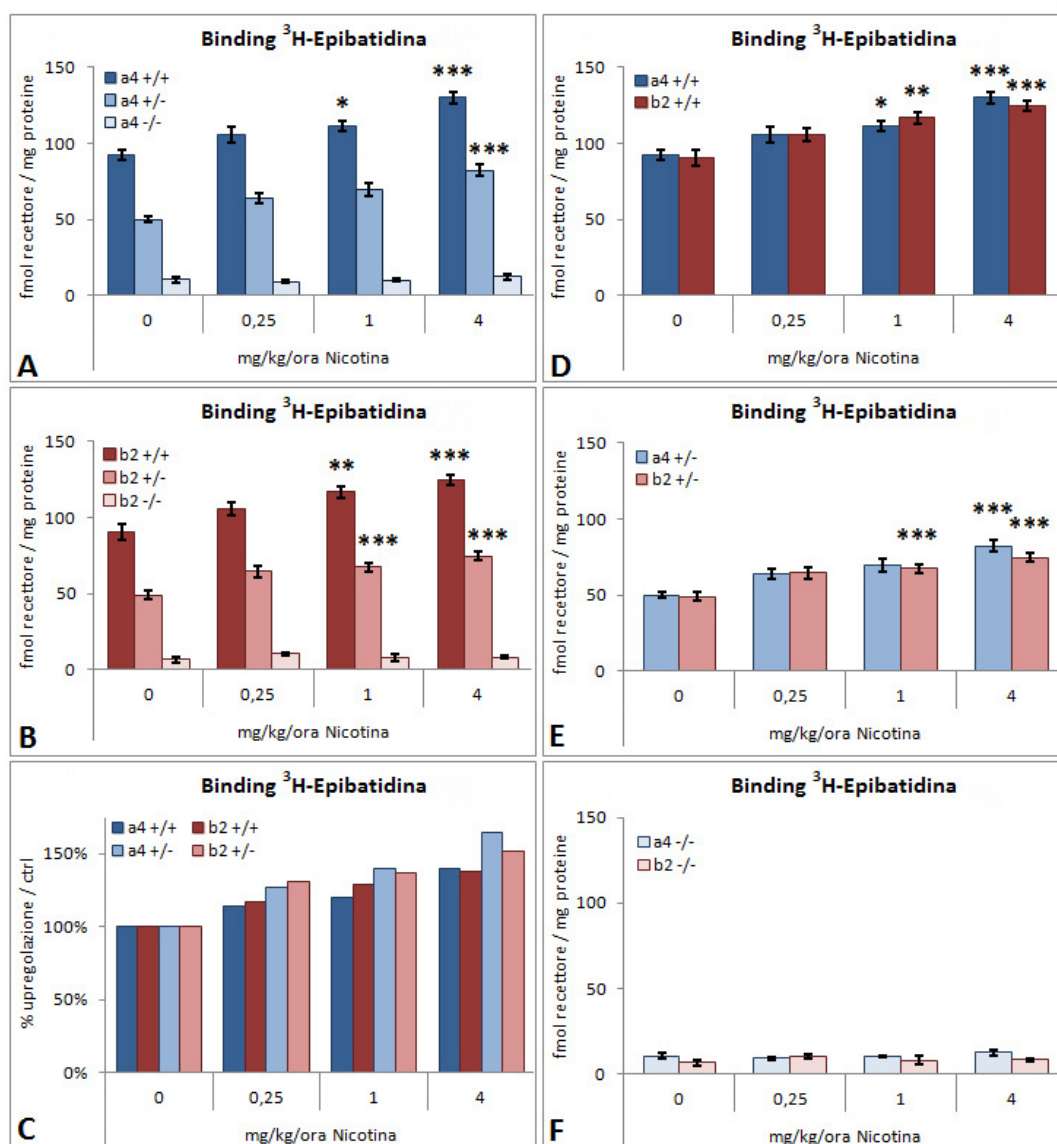


FIGURA 20: Analisi comparata dell'espressione dei nAChR nel cervello *in toto* di topi trattati con le dosi indicate di nicotina. Confronto dei dati di binding per la ^3H -Epibatidina ottenuti dai topi con genotipo $\alpha 4$ (A) o $\beta 2$ (B). Confronto dei dati di binding per la ^3H -epibatidina tra topi $\alpha 4$ WT e $\beta 2$ WT (D), $\alpha 4$ Het e $\beta 2$ Het (E), $\alpha 4$ KO e $\beta 2$ KO (F). Incremento percentuale dei siti di binding per la ^3H -Epibatidina nelle diverse linee murine trattate con dosi crescenti di nicotina (C). I valori riportati sono ottenuti dalla media \pm SEM di 8-10 esperimenti indipendenti e sono espressi come fmol recettore/mg proteine o come percentuale di incremento rispetto al controllo.

Questi dati nel complesso confermano che il sottotipo $\alpha 4\beta 2$ rappresenta il 90% dei nAChR eteromerici espressi nel SNC e che ci sia interdipendenza dell'espressione delle subunità $\alpha 4$ e $\beta 2$ per formare il sottotipo $\alpha 4\beta 2$.

Avvalendoci della specificità di legame della ^{125}I - αBgTx per i recettori nicotinici omomerici, abbiamo analizzato l'espressione nel SNC del sottotipo recettoriale $\alpha 7^*$, che non appare influenzato in modo significativo dalla delezione parziale o completa delle subunità $\alpha 4$ o $\beta 2$ (Fig.21).

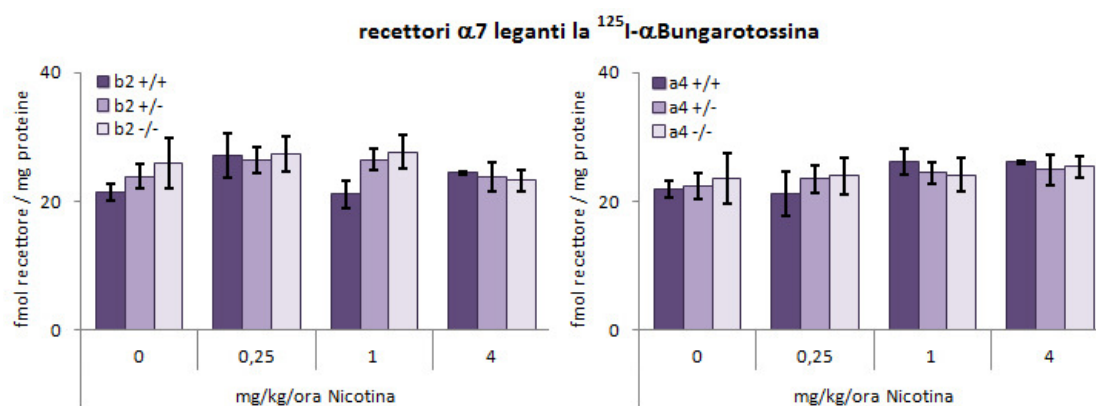


FIGURA 21: Analisi dell'espressione dei nAChR omomerici dopo trattamento cronico con nicotina alle dosi indicate. Legame della ^{125}I - αBgTx su cervelli in toto di topi WT, Het o KO per la subunità $\beta 2$ o $\alpha 4$. I valori riportati solo la media \pm SEM di 3-5 esperimenti indipendenti e sono espressi come fmol recettore/mg proteine.

Successivamente sono stati effettuati esperimenti di immunoprecipitazione con anticorpi diretti contro le diverse subunità nicotiniche. I dati ottenuti confermano che il sottotipo $\alpha 4\beta 2$ è quello maggiormente espresso nel SNC, rappresentando circa l'80% dei siti di legame per la ^3H -Epibatidina sia in topi WT che nei topi $\alpha 4\text{Het}$ e $\beta 2\text{Het}$. L'analisi quantitativa mostra che l'espressione di questo sottotipo è quasi la metà nelle linee di topi eterozigoti e quasi del tutto assente nei topi KO, confermando che il sottotipo recettoriale $\alpha 4\beta 2$ possa essere quello maggiormente influenzato dalla delezione delle due subunità (Fig.22A). E' bene evidenziare che mentre nei topi $\beta 2\text{KO}$ gli abs diretti contro la subunità $\alpha 4$ non sono in grado di immunoprecipitare alcun recettore, in quelli $\alpha 4\text{KO}$ è ancora possibile immunoprecipitare recettori contenenti la subunità $\beta 2$ sebbene i livelli di espressione risultino molto bassi (5-6% rispetto ai WT). Questa serie di esperimenti ci ha permesso inoltre di valutare l'effetto della delezione delle subunità $\alpha 4$ e $\beta 2$ sull'espressione degli altri sottotipi nicotinici. In particolare nei cervelli dei topi $\beta 2\text{Het}$ c'è una diminuzione statisticamente significativa dei recettori

contenenti le subunità $\alpha 5$, $\alpha 6$ e $\beta 3$ mentre nell'eterozigote $\alpha 4$ c'è una diminuzione di tutte e tre le subunità che non è statisticamente significativa. Per quanto riguarda i topi $\alpha 4$ KO, sono stati osservati bassi livelli di espressione dei sottotipi contenenti le subunità $\alpha 6$ e $\beta 3$ (rispettivamente -78% e -70% rispetto al WT), e la completa assenza quelli contenenti la subunità $\alpha 5^*$ (Fig.22B-D). I dati indicano che quest'ultima subunità concorre alla formazione del sottotipo $\alpha 4\beta 2\alpha 5^*$, mentre le subunità $\alpha 6$ e $\beta 3$ interagiscono con quella $\beta 2$ per formare il sottotipo $\alpha 6\beta 2\beta 3^*$.

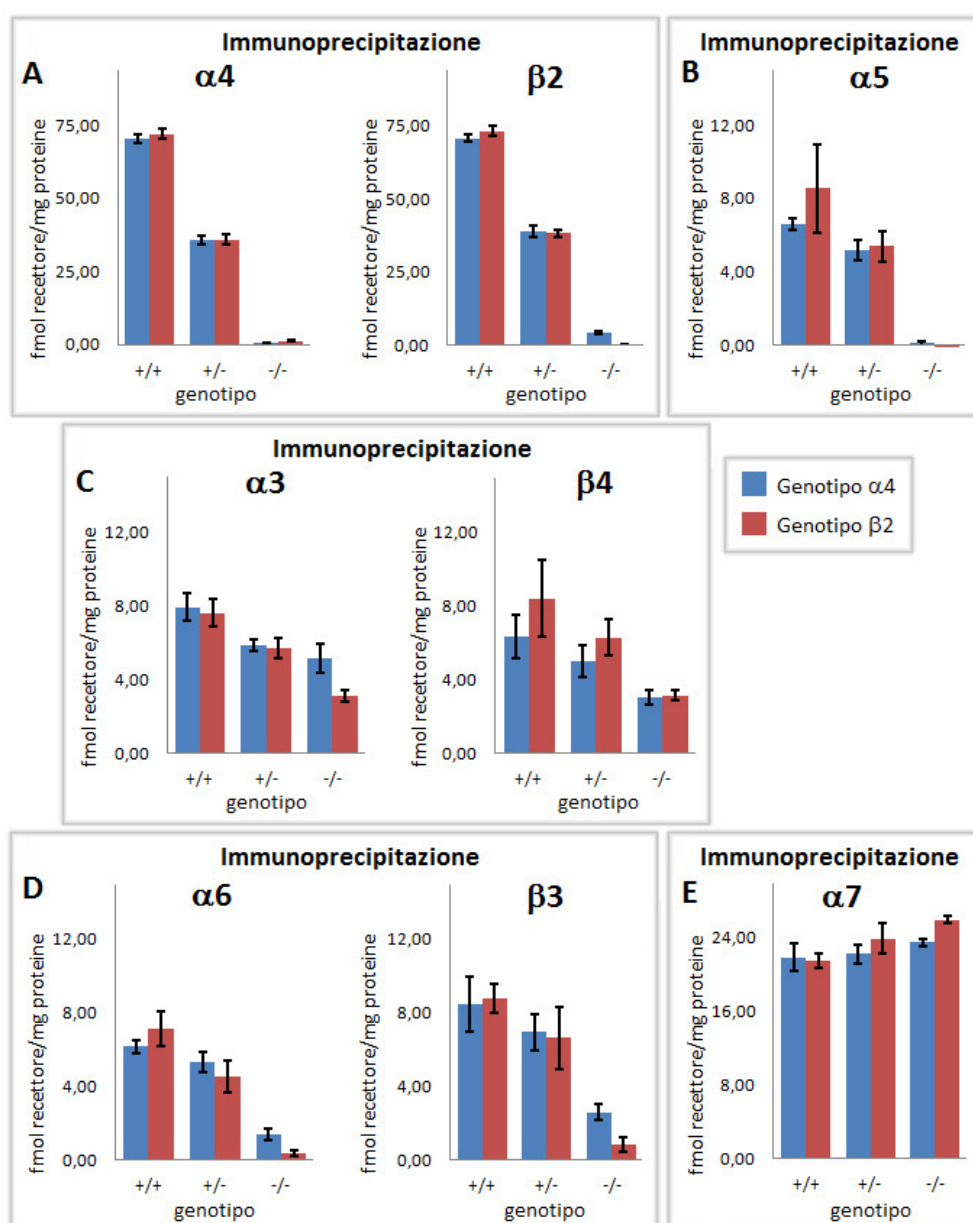


FIGURA 22: Caratterizzazione dei sottotipi recettoriali nicotinici espressi in topi $\alpha 4$ o $\beta 2$ WT, Het e KO. Immunoprecipitazione dei recettori leganti la ^3H -Epibatidina da parte di anticorpi diretti contro le subunità $\alpha 4$, $\beta 2$ (A), $\alpha 5$ (B), $\alpha 3$, $\beta 4$ (C), $\alpha 6$, $\beta 3$ (D) e $\alpha 7$ (E). I valori riportati sono ottenuti dalla media \pm SEM di 7-10 esperimenti indipendenti e sono espressi come fmol di recettore immunoprecipitato/mg proteine

Per quanto riguarda le subunità $\alpha 3$ e $\beta 4$ i risultati indicano che la delezione della subunità $\alpha 4$ o $\beta 2$ influenza solo parzialmente i livelli di espressione dei nAChR $\alpha 3^*$ e $\beta 4^*$, che risultano essere sensibilmente alterati solo nei topi KO. Anche in queste linee comunque, non si assiste mai alla completa scomparsa dei siti di legame per la ^3H -epibatidina immunoprecipitati dagli abs anti- $\alpha 3$ o anti- $\beta 4$. Inoltre i topi $\beta 2\text{KO}$ mostrano livelli di espressione dei recettori contenenti la subunità $\alpha 3$ inferiori rispetto ai topi $\alpha 4\text{KO}$ ($\alpha 4\text{KO}$: 5,13 $\beta 2\text{KO}$: 3,14 fmol recettore/mg proteine) (Fig.22C) indicando quindi che nei topi $\alpha 4\text{KO}$ sono presenti una quota di recettori $\alpha 3\beta 2$ che sono scomparsi nel topo $\beta 2\text{KO}$. Questi dati nel complesso indicano interazione tra le subunità $\alpha 3$ e $\beta 4$ per formare i sottotipi $\alpha 3\beta 4$ e $\alpha 3\beta 4\beta 3$ e suggeriscono la presenza di altri sottotipi recettoriali tra cui il sottotipo $\alpha 3\beta 2$.

11.2.2. EFFETTO DEL TRATTAMENTO CRONICO CON NICOTINA SULL'ESPRESSIONE DEI NACHR

Dopo aver analizzato il profilo di espressione dei diversi sottotipi recettoriali nel SNC dei topi WT, Het e KO, sono stati valutati mediante esperimenti di binding e di immunoprecipitazione, l'effetto del trattamento con diverse dosi di nicotina sull'espressione dei recettori stessi.

I dati di binding mostrano un aumento dose-dipendente (up-regulation) dei siti di legame per la ^3H -epibatidina nei cervelli sia di topi WT che Het, ma non di topi KO. Le diverse dosi di nicotina somministrate 0.25, 1, 4 mg/Kg/ora inducono rispettivamente un aumento del 16%, 25% e 39% dei siti di binding per la ^3H -epibatidina nei topi WT e del 27%-31%, 40%-37%, 58%-53% nei topi $\alpha 4\text{Het}$ - $\beta 2\text{Het}$ (Fig.20C-D-E). Le percentuali di up-regulation risultano essere molto simili nelle diverse linee murine analizzate e i topi Het mostrano livelli di espressione dei nAChR dimezzati rispetto ai WT anche al termine dei diversi trattamenti (Fig.20A-B). Inoltre gli esperimenti di Western Blotting condotti sui medesimi campioni evidenziano un aumento dose-dipendente delle subunità $\alpha 4$ e $\beta 2$ sia in topi WT (Fig.23A-B) che Het (Fig.23C-D). Per quanto riguarda i recettori omomerici $\alpha 7$ i dati di binding non evidenziano effetti significativi genotipo-specifici legati alla somministrazione cronica di nicotina (Fig.21).

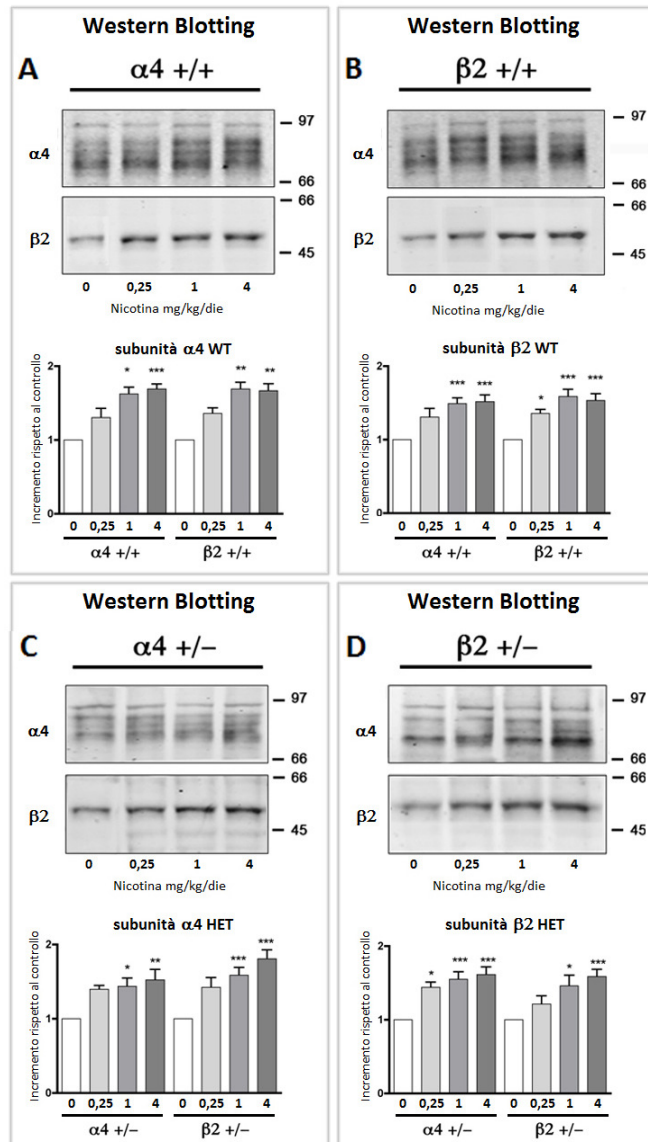


FIGURA 23: Analisi dei livelli di espressione delle subunità $\alpha 4$ e $\beta 2$ in estratti di cervelli in toto di topi $\alpha 4$ WT (A) o $\alpha 4$ Het (C) e $\beta 2$ WT (B) o $\beta 2$ Het (D), dopo trattamento cronico con dosi crescenti di nicotina. In ogni pannello sono riportati in alto WB rappresentativi e in basso le relative quantificazioni. I valori riportati sono ottenuti dalla media \pm SEM di 10 esperimenti e sono espressi come incremento rispetto al controllo.

Per meglio comprendere l'effetto del trattamento cronico con nicotina sull'espressione dei diversi sottotipi recettoriali, gli estratti ottenuti dai cervelli di topi appartenenti ai diversi gruppi sperimentali sono stati analizzati per immunoprecipitazione con anticorpi subunità-specifici. I dati mostrano un aumento dose-dipendente dei siti di legame per la ^3H -Epibatidina immunoprecipitati dagli anticorpi anti- $\alpha 4$ e anti- $\beta 2$ in topi WT e Het, l'entità di questo aumento è paragonabile tra i diversi genotipi murini ed è in linea con quanto osservato negli esperimenti di binding (Fig.24A). Risultati analoghi sono stati ottenuti immunoprecipitando i recettori contenenti la subunità $\alpha 3$, che

risultano essere significativamente aumentati al termine del trattamento sia in topi WT che Het, ma non nei topi KO (in particolar modo nei $\beta 2$ KO) (Fig.24C). Per quanto riguarda le subunità $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 3$ e $\beta 4$ l'effetto indotto dal trattamento cronico con nicotina non raggiunge una significatività statistica (Fig.24B-C-D).

Come atteso gli esperimenti di immunoprecipitazione confermano che l'espressione dei recettori omomerici $\alpha 7$ non viene influenzata dalla somministrazione cronica di nicotina.

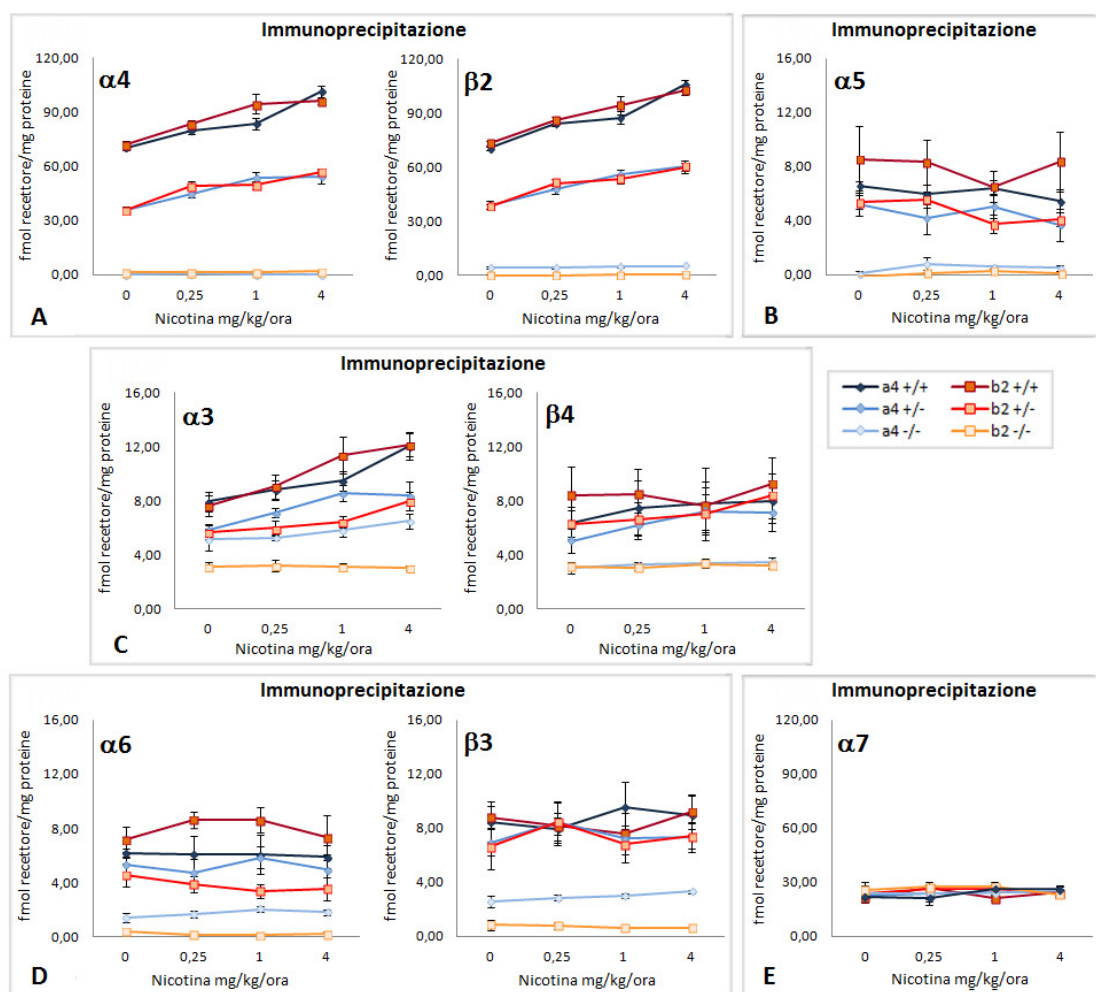


FIGURA 24: Analisi comparata degli effetti del trattamento cronico con nicotina sull'espressione dei diversi sottotipi nicotinici in cervelli *in toto* di topi $\alpha 4$ o $\beta 2$ WT, Het e KO. Immunoprecipitazione dei recettori leganti la ^3H -Epibatidina da parte di anticorpi diretti contro le subunità $\alpha 4$, $\beta 2$ (A), $\alpha 5$ (B), $\alpha 3$, $\beta 4$ (C), $\alpha 6$, $\beta 3$ (D) e $\alpha 7$ (E). I valori riportati sono ottenuti dalla media di 7-10 esperimenti indipendenti e sono espressi come fmol di recettore immunoprecipitato/mg proteine

Questi risultati evidenziano che:

- il sottotipo recettoriale $\alpha 4\beta 2$ è quello più soggetto all'up-regulation indotta da nicotina e la cinetica di tale effetto non è influenzata dalla delezione parziale delle

subunità $\alpha 4$ o $\beta 2$. I dati di western blotting indicano che l'aumento dei siti di binding è associato all'aumento delle subunità stesse;

- Il trattamento cronico con nicotina non ha un effetto apprezzabile sui livelli di espressione delle popolazioni di recettori contenenti le subunità $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 3$ e $\beta 4$;
- La subunità $\alpha 3$ è up-regolata solo se incorporate in sottotipi recettoriali complessi contenenti anche le subunità $\beta 2$ o $\alpha 4$, in particolare i dati sui topi $\beta 2$ KO suggeriscono che l'up-regulation è a carico del sottotipo $\alpha 3\beta 2$

E' bene sottolineare che i risultati appena mostrati sono stati ottenuti da analisi su cervelli *in toto*, non è possibile escludere quindi che la nicotina moduli l'espressione di determinati sottotipi recettoriali in aree specifiche del SNC.

11.2.3. EFFETTO DELLA NICOTINA SULLA STECHIOMETRIA DEL RECETTORE $\alpha 4\beta 2$

Dati riportati in letteratura dimostrano che il trattamento con nicotina induce *in vitro* il cambiamento di stechiometria del sottotipo $\alpha 4\beta 2$, favorendo la stechiometria $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$. E' interessante quindi comprendere se la nicotina provochi questo cambiamento anche in modelli *in vivo*.

A tale scopo abbiamo analizzato mediante western blotting i livelli di espressione delle subunità $\alpha 4$ e $\beta 2$ nella Corteccia Cerebrale di topi WT al termine del trattamento cronico con nicotina (4mg/kg/ora) e dopo 1, 4 o 14 giorni di astinenza. Ci siamo focalizzati su quest'area del SNC in quanto è quella in cui l'effetto della nicotina si rivela più marcato, come controllo abbiamo analizzato anche il Talamo, un'area nota per avere un basso livello di up-regulation. Come atteso, al termine del trattamento i siti di legame per la ^3H -epibatidina risultano aumentati del 46% in corteccia e del 26% nel talamo. Inoltre, mentre nel Talamo l'espressione dei nAChR eteromerici ritorna a livelli basali al termine della somministrazione di nicotina, in Corteccia si mantiene alta anche dopo il primo giorno di astinenza (+45%) e diminuisce gradualmente fino a tornare a livelli basali 4 giorni dopo il termine del trattamento. Attraverso esperimenti di western blotting è stato esaminato il livello di espressione delle subunità $\alpha 4$ e $\beta 2$ nelle aree prese in esame, il rapporto β/α ottenuto per i diversi gruppi sperimentali è poi stato paragonato a quello ottenuto nei topi trattati con salina. Questi studi ci hanno permesso di concludere che in corteccia il trattamento con nicotina aumenta il rapporto β/α (Ctrl: 1; Nic: 1,33), che resta alto durante il primo giorno di astinenza

(WD1: 1,28) e ritorna a livelli basali dopo il quarto giorno di astinenza (WD4: 0,99; WD14: 1,06) (Fig.25A-B).

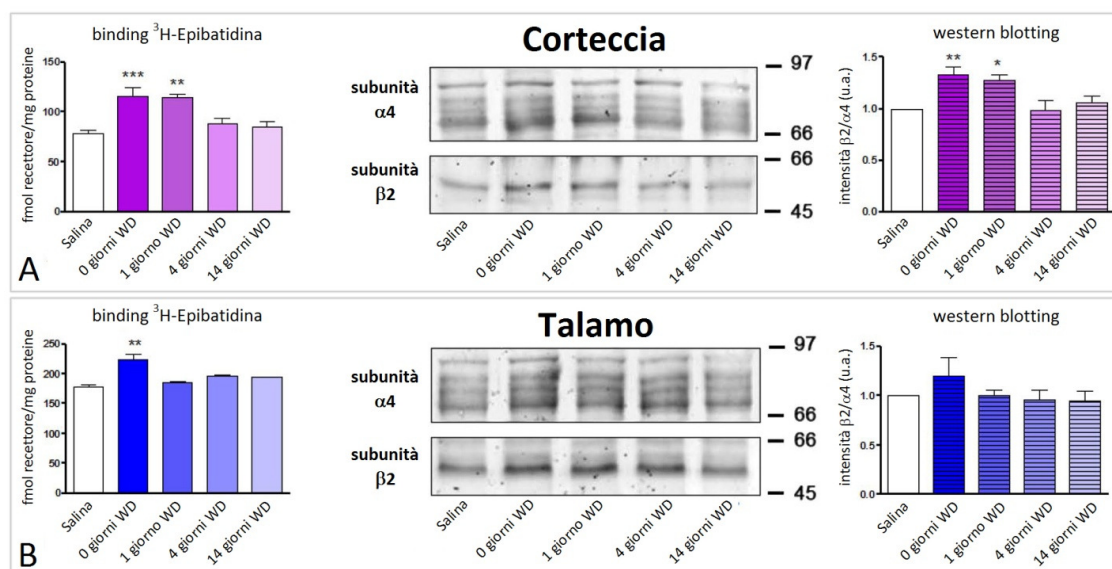


FIGURA 25: Analisi dell'espressione relativa delle subunità $\alpha 4$ e $\beta 2$ dopo trattamento e durante l'astinenza da nicotina in due diverse aree del sistema nervoso centrale, Corteccia (A) e Talamo (B). Dati di binding con ^3H -Epibatidina a sinistra, WB rappresentativi al centro, quantificazione dei rapporti relativi delle o.d. della subunita $\beta /$ o.d. della subunita α a destra.

I dati ottenuti suggeriscono che la nicotina favorisce la stechiometria $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ selettivamente in corteccia cerebrale, nel talamo infatti il rapporto β / α ottenuto nei diversi gruppi di trattamento è sempre paragonabile al controllo. In un precedente lavoro pubblicato dal nostro laboratorio è stata dimostrata l'espressione in tessuti nativi delle due differenti stechiometrie $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ e $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$. Dopo anni di studi per la prima volta è stato dimostrato *in vivo* che la nicotina favorisce la stechiometria $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$.

11.2.4. EFFETTO DEL TRATTAMENTO CRONICO E DELL'ASTINENZA DA NICOTINA SULL'ESPRESSIONE DEI NACHR IN STRIATO E VTA

Gli esperimenti condotti su Corteccia cerebrale e Talamo evidenziano che i recettori nicotinici eteromerici sono influenzati in maniera differente dal trattamento cronico e dall'astinenza da nicotina in relazione all'area in cui sono espressi. E' fondamentale capire in che modo l'esposizione e l'astinenza da nicotina modulino l'espressione di questi recettori nelle aree coinvolte nei fenomeni di dipendenza, in particolare ci siamo concentrati su due aree del sistema dopaminergico mesocorticolimbico, il Corpo Striato e la VTA.

Attraverso esperimenti di binding abbiamo monitorato l'espressione dei nAChR in omogenati totali, membrane totali (S1) e sinaptosomi (P2) preparati da Striato e VTA di topi trattati per 14 giorni con nicotina (4mg/kg/ora) seguiti da 1, 4 o 14 giorni di astinenza.

I risultati ottenuti dagli omogenati totali di striato mostrano un aumento dei siti di binding per la ^3H -Epibatidina (+35%) al termine del trattamento. L'espressione dei nAChR resta alta durante il primo giorno di astinenza (striato: +33%) e decresce gradualmente fino a ritornare a livelli basali dopo il quarto giorno di astinenza (Fig.26A). Risultati sovrapponibili sono stati ottenuti dall'analisi dei sinaptosomi, in cui si osserva un aumento dei siti di legame al termine del trattamento (+42%) e dopo il primo giorno di astinenza (+39%) seguito da un graduale ritorno a livelli basali (Fig.26C). Dati controversi sono emersi dall'analisi delle membrane totali (S1) dello striato. In particolare, in questa frazione non siamo stati in grado di rilevare l'aumento dei siti di binding osservato nell'omogenato totale e nei sinaptosomi al termine del trattamento (Fig.26B). La procedura di purificazione dei sinaptosomi (descritta in materiali e metodi) prevede una serie di centrifugate successive da cui vengono recuperate nell'ordine le frazioni Omogenato -> S1 -> P2. I dati quantitativi mostrano un arricchimento del 30-60% dei nAChR nella frazione sinaptosomale a sostenere la bontà della metodica di purificazione adoperata, inoltre l'aumento dei siti di binding è presente sia nell'omogenato totale che nel P2, ad escludere la perdita di materiale durante la procedura stessa. Non siamo quindi in grado di spiegare questa alterazione. L'espressione della subunità $\beta 2$ nelle frazioni S1 e P2 al termine del trattamento e durante l'astinenza è stata valutata attraverso esperimenti di western blotting. In entrambe le frazioni analizzate abbiamo osservato un aumento dell'espressione della subunità al termine del trattamento (S1:+50%; P2:+34%) e durante il primo giorno di astinenza (S1:+34%; P2:+17%) (Fig.26B-C).

Siamo passati quindi all'analisi della VTA, a causa delle ridotte dimensioni di questa area ci siamo focalizzati solo sulle frazioni S1 e P2. In questa regione mesencefalica il trattamento cronico con nicotina induce un aumento molto marcato dei siti di legame per la ^3H -epibatidina, che risultano essere quasi raddoppiati al termine del trattamento (S1:+100%; P2:+88%). Anche in questo caso l'up-regulation

permane durante il primo giorno di astinenza (S1:+49%; P2:+59%) e si perde gradualmente durante i giorni successivi. L'espressione della subunità $\beta 2$ in VTA, valutata attraverso western blotting, ricalca quanto osservato negli esperimenti di binding (Fig.26D-E).

In conclusione possiamo affermare che la somministrazione cronica di nicotina aumenta l'espressione dei nAChR nelle aree del sistema dopaminergico mesostriatale e che l'astinenza prolungata ne causa una graduale riduzione. Ciò suggerisce un ruolo diretto dei recettori colinergici nella dipendenza da questa sostanza.

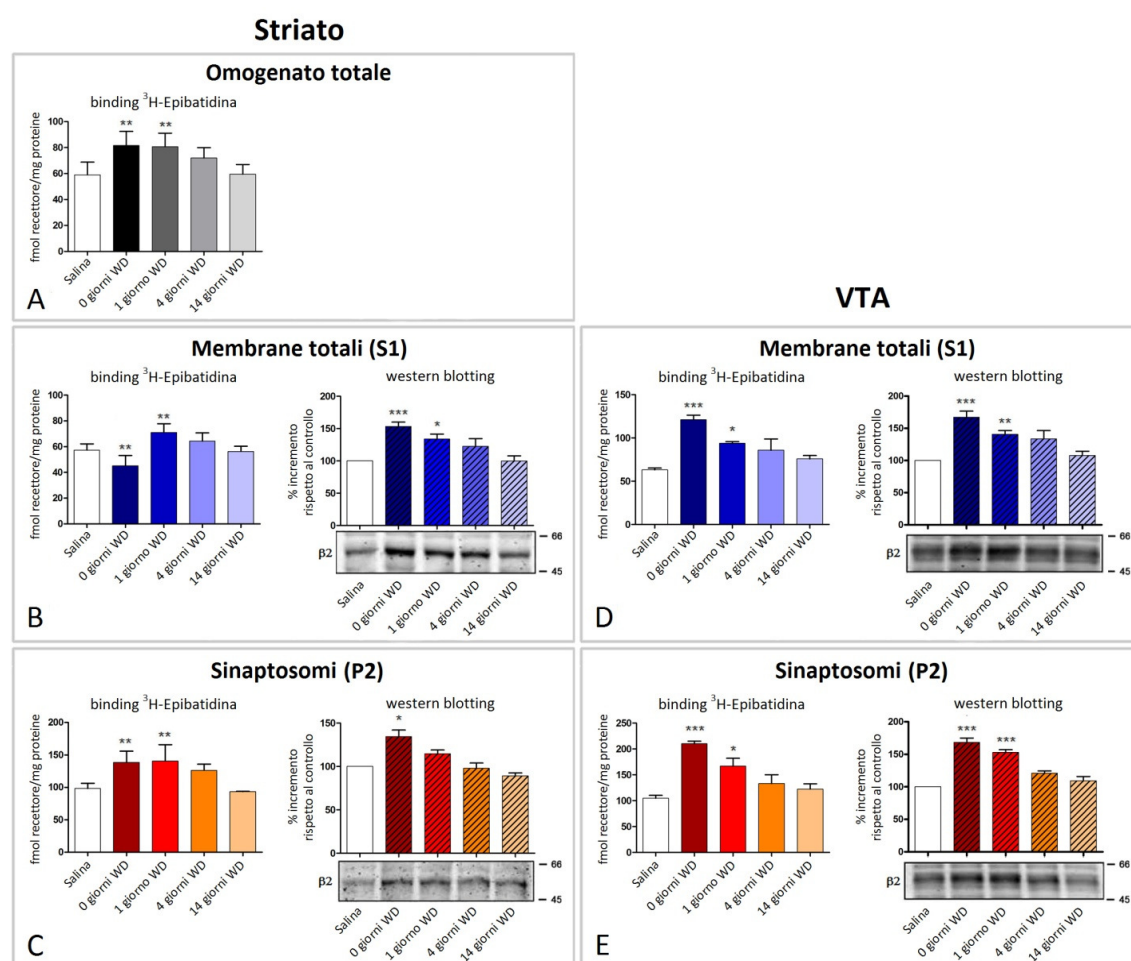


FIGURA 26: Analisi dell'espressione dei nAChR nelle aree del sistema dopaminergico mesostriatale dopo trattamento e durante l'astinenza da nicotina. Studi di binding con ^3H -Epibatidina ed esperimenti di western blotting condotti su Omogenati totali (A) Membrane Totali (B) e Sinaptosomi (C) di striato e su Membrane totali (D) e sinaptosomi (E) di VTA. I valori degli esperimenti di binding riportati sono ottenuti dalla media \pm SEM di 2-3 esperimenti indipendenti. Le quantificazioni dei WB derivano dalla media \pm SEM di 10-11 esperimenti.

11.3. EFFETTO DEL TRATTAMENTO CRONICO E DELL'ASTINENZA DA NICOTINA SULL'ESPRESSIONE DEI GLUR

Nell'ultimo decennio sono stati condotti diversi studi sul SNC finalizzati a comprendere gli adattamenti neuronali che intervengono durante la dipendenza da diverse sostanze d'abuso, appare ormai chiaro che parte degli effetti comportamentali è da imputare all'azione indiretta delle droghe sull'espressione dei recettori del Glutammato. E' stato osservato infatti un aumento nella trasmissione glutammatergica durante il consumo e nelle prime fasi di astinenza da vari psicostimolanti, tra cui la nicotina.

Con lo scopo di comprendere gli effetti indiretti della somministrazione di nicotina sull'espressione dei GluR, abbiamo deciso di analizzare mediante western blotting i livelli di espressione delle principali subunità dei recettori AMPA (GluA1; GluA2/3), NMDA (GluN1, GluN2A; GluN2B) e metabotropici (mGluR2; mGluR5) e delle proteine scaffold di sinapsi PSD95 e SAP102, nei campioni di Corteccia Cerebrale, Striato e VTA analizzati precedentemente.

11.3.1. CORTECCIA CEREBRALE

Gli esperimenti condotti su omogenati totali di corteccia cerebrale hanno evidenziato una riduzione statisticamente significativa delle subunità GluN1 (-25%) e GluN2A (-27%) e della subunità GluA1 (-29%) al termine del trattamento cronico con nicotina, l'espressione di queste subunità ritorna a livelli basali subito dopo il termine del trattamento e non sembra essere alterata nel corso delle prime due settimane di astinenza (Fig.27A-B). Andamento opposto si osserva per la subunità GluA2/3, i cui livelli non sono alterati dal trattamento, ma diminuiscono a partire dal quarto giorno (-60%) e nella settimana successiva di astinenza (-60%)(Fig.27B). La riduzione di questa subunità è accompagnata dalla riduzione della proteina scaffold di sinapsi PSD95 che risulta statisticamente significativa dopo due settimane dal termine del trattamento (-45%)(Fig.27D). Le altre subunità analizzate e la proteina SAP102 non mostrano alterazioni significative in seguito al trattamento o alla deprivazione da nicotina. In conclusione questi dati evidenziano che in corteccia cerebrale il trattamento cronico con nicotina riduce l'espressione del sottotipo GluN1/GluN2A (NMDAR) e dei AMPAR contenenti la subunità GluA1. La riduzione della proteina scaffold PSD95 durante

l'astinenza potrebbe essere associata a fenomeni di rimodellamento sinaptico, in particolare alla riduzione del numero o della dimensione delle sinapsi che esprimono gli AMPAR in cui è presente la subunità GluA2/3.

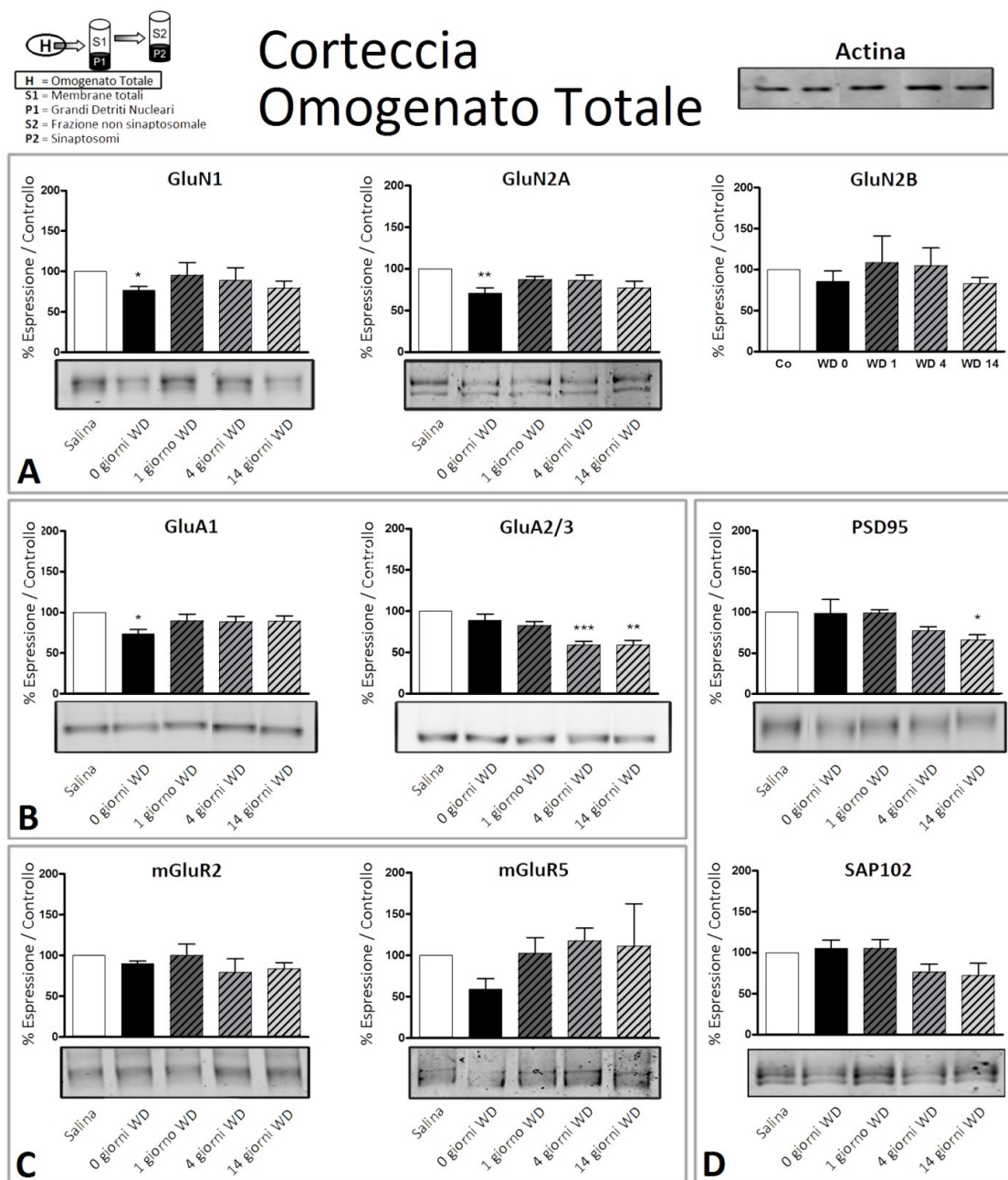
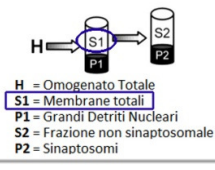


FIGURA 27: Analisi dei livelli di espressione dei principali sottotipi di GluR espressi in omogenati totali di corteccia al termine del trattamento cronico e durante l'astinenza da nicotina. Quantificazione dell'espressione dei recettori NMDA (A), AMPA (B), metabotropici (C) e di proteine scaffold di sinapsi (D). I valori riportati sono ottenuti dalla media \pm SEM di 4-6 esperimenti e sono mostrati come percentuale di espressione rispetto al controllo.

11.3.2. CORPO STRIATO

Gli esperimenti effettuati sulle membrane totali (S1) di striato mostrano la riduzione della subunità GluN1 (-37%) al termine del trattamento (Fig.28A) e un aumento del recettore mGluR2 (+46%)(Fig.28C) il giorno successivo alla sospensione del trattamento stesso. Si osserva inoltre la tendenza all'aumento dell'espressione del recettore mGluR5 durante l'astinenza, ma i risultati non raggiungono significatività statistica. Per quanto riguarda la frazione sinaptosomale, emerge una riduzione generale dei recettori glutammatergici al termine del quarto giorno di astinenza. Più precisamente l'espressione delle subunità GluA1 e GluA2/3 è ridotta rispettivamente del 40% e del 38% (Fig.29B) e quella delle subunità GluN1 e GluN2A risulta ridotta del 44% e del 42% (Fig.29A). La subunità GluN2B mostra un andamento analogo, ma essendo espressa a livelli molto bassi nello striato di topi adulti, non è stato possibile ottenere significatività statistica. Nei sinaptosomi inoltre i livelli della subunità GluA2/3 risultano diminuiti del 25-30% al termine del trattamento e durante il periodo di astinenza (Fig.29B).

Possiamo concludere quindi che nello striato il trattamento cronico con nicotina modula l'espressione dei GluR in modo differente in base al sub-compartimento cellulare preso in esame. Gli effetti maggiori sono a carico del compartimento sinaptico, in cui si osserva la riduzione della subunità GluA2/3 al termine del trattamento e durante le due settimane di astinenza. Inoltre al termine del quarto giorno di astinenza da nicotina si verifica una riduzione generale dell'espressione in sinapsi dei recettori AMPA e NMDA. E' bene sottolineare che la riduzione dei GluR avviene in concomitanza con il ritorno ai livelli basali dei nAChR. Alterazioni nella trasmissione colinergica potrebbero indurre il rimodellamento delle sinapsi glutammatergiche nello striato.



Striato Membrane Totali

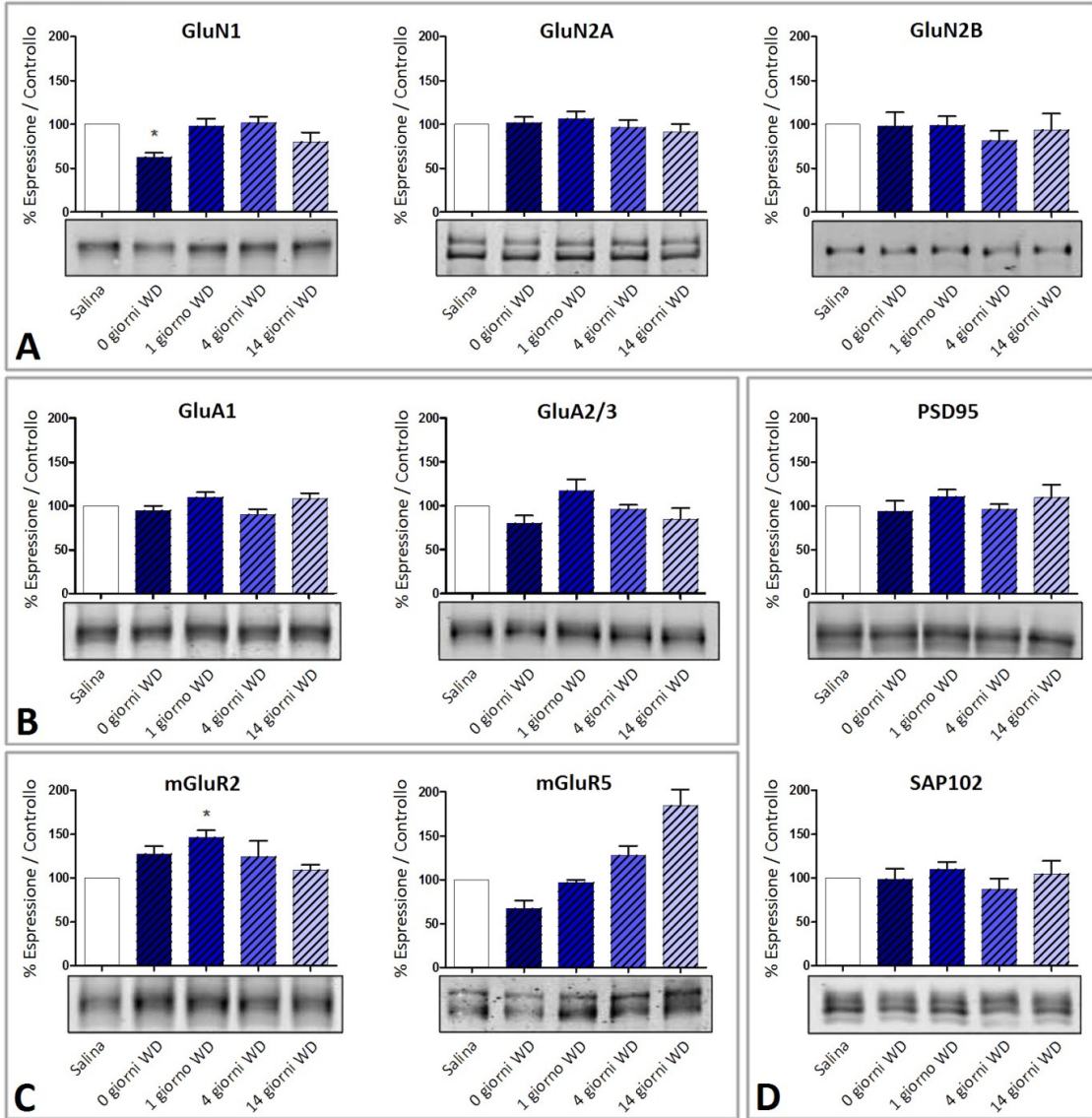
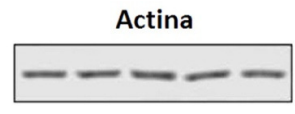
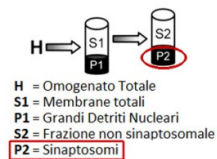


FIGURA 28: Analisi dei livelli di espressione dei principali sottotipi di GluR espressi in membrane totali di Striato al termine del trattamento cronico e durante l'astinenza da nicotina. Quantificazione dell'espressione dei recettori NMDA (A), AMPA (B), metabotropici (C) e di proteine scaffold di sinapsi (D). I valori riportati sono ottenuti dalla media \pm SEM di 5-7 esperimenti e sono mostrati come percentuale di espressione rispetto al controllo.



Striato Sinaptosomi

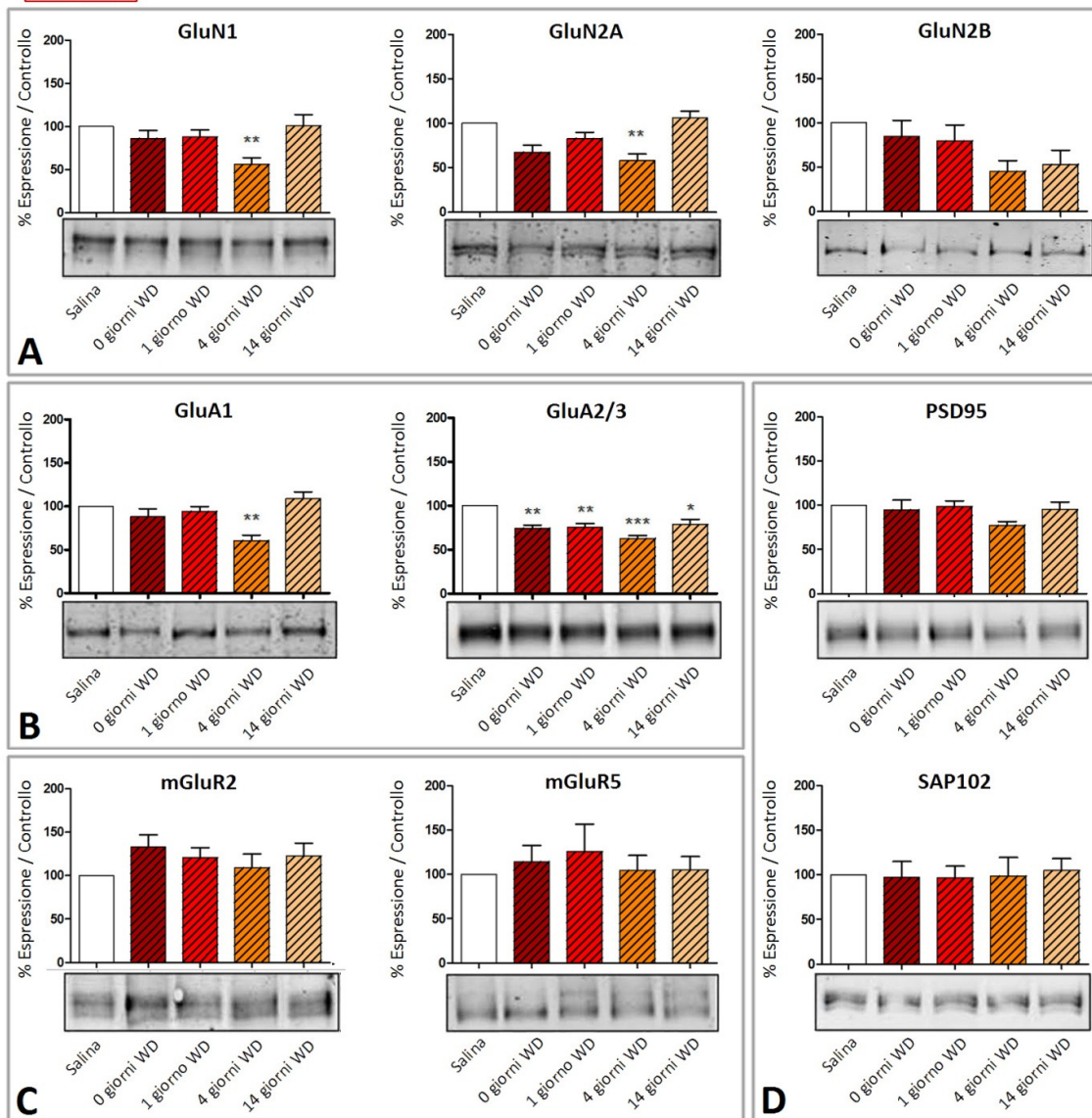
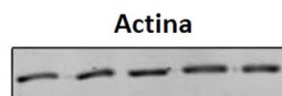


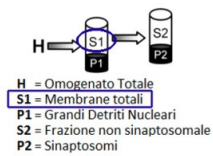
FIGURA 29: Analisi dei livelli di espressione dei principali sottotipi di GluR espressi in sinaptosomi di Striato al termine del trattamento cronico e durante l'astinenza da nicotina. Quantificazione dell'espressione dei recettori NMDA (A), AMPA (B), metabotropici (C) e di proteine scaffold di sinapsi (D). I valori riportati sono ottenuti dalla media \pm SEM di 5-7 esperimenti e sono mostrati come percentuale di espressione rispetto al controllo.

11.3.3. AREA VENTRALE TEGMENTALE (VTA)

In VTA le alterazioni osservate a carico dei GluR sono molto più articolate di quelle osservate in corteccia e in striato, ciò potrebbe essere un riflesso della complessità della rete neuronale mesencefalica.

I dati di western blotting sulla frazione S1 mostrano un aumento della subunità GluA1 (+30%) al termine del trattamento e a partire dal quarto giorno di astinenza (+20%) mentre non si osservano variazioni durante il primo giorno di astinenza (Fig.30B). La subunità GluN2B (+58%) è maggiormente espressa al termine della somministrazione di nicotina e torna a livelli basali durante l'astinenza, al contrario le subunità GluN1 e GluN2A aumentano a partire dal quarto giorno successivo alla fine del trattamento (rispettivamente +30% e + 29%) (Fig.30A). Sono state riportate anche alterazioni dei recettori metabotropici in particolare di mGluR5 (+65%) nelle fasi tardive dell'astinenza (Fig.30C). Infine al termine del trattamento l'espressione della proteina SAP102 risulta aumentata, questo potrebbe essere correlato all'aumento dell'espressione della subunità GluN2B, è noto infatti che la proteina SAP102 è coinvolta nel traffico di questa subunità (Fig.30D). Per quanto riguarda la frazione sinaptosomale, le alterazioni più evidenti sono a carico dei recettori AMPA. In particolare al termine del trattamento cronico con nicotina si apprezza un aumento della subunità GluA2/3 (+41%) e di PSD95 (+31%), che ritornano a livelli basali nel corso della prima settimana di astinenza, la subunità GluA1 al contrario risulta aumentata solo durante l'astinenza, in particolare al termine delle due settimane previste dal protocollo sperimentale (+44%)(Fig.31B-D). Questi dati suggeriscono un cambio nei sottotipi di recettori AMPA espressi in sinapsi durante il trattamento (GluA2/3*) o durante l'astinenza (GluA1*). L'aumento della proteina scaffold PSD95 potrebbe riflettere un riarrangiamento del compartimento sinaptico, nello specifico un aumento della dimensione o del numero delle sinapsi al termine del trattamento e durante il primo giorno di astinenza.

Un'analisi più accurata dei risultati ottenuti sarà fornita durante la discussione.



VTA Membrane Totali

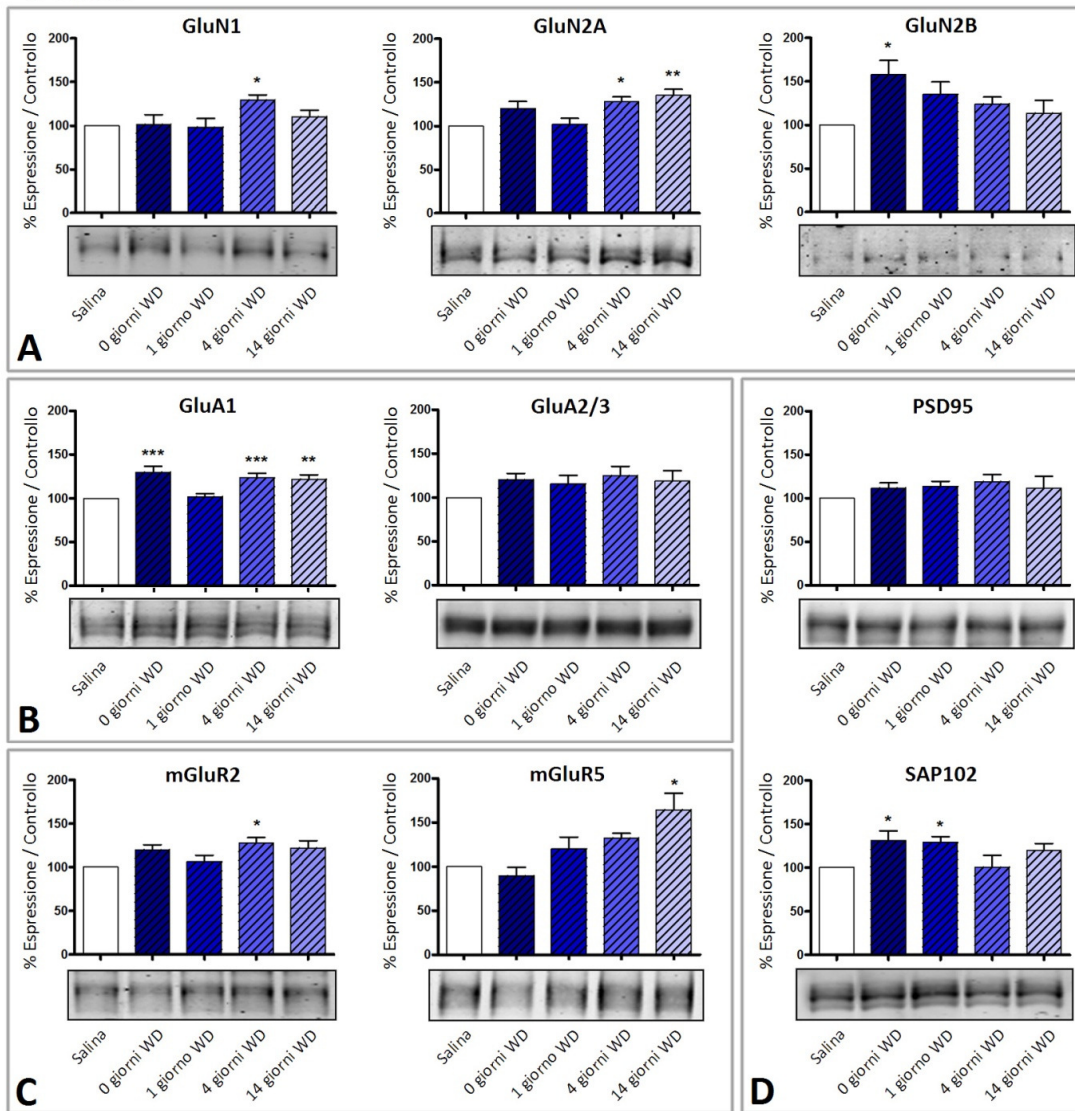
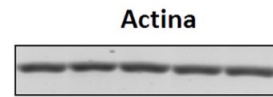


FIGURA 30: Analisi dei livelli di espressione dei principali sottotipi di GluR espressi in sinaptosomi di VTA al termine del trattamento cronico e durante l'astinenza da nicotina. Quantificazione dell'espressione dei recettori NMDA (A), AMPA (B), metabotropici (C) e di proteine scaffold di sinapsi (D). I valori riportati sono ottenuti dalla media \pm SEM di 5-7 esperimenti e sono mostrati come percentuale di espressione rispetto al controllo.

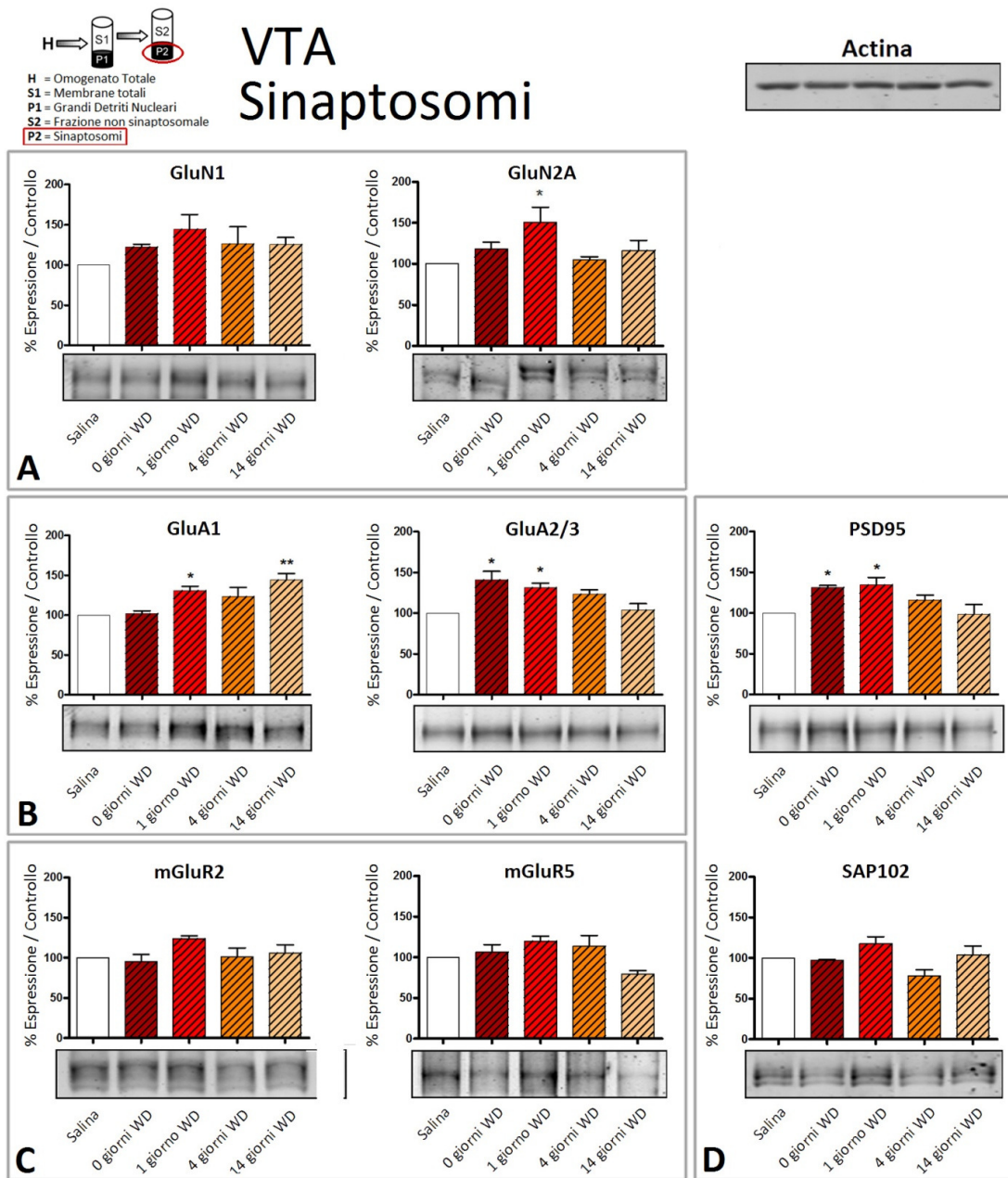


FIGURA 31: Analisi dei livelli di espressione dei principali sottotipi di GluR espressi in sinaptosomi di VTA al termine del trattamento cronico e durante l'astinenza da nicotina. Quantificazione dell'espressione dei recettori NMDA (A), AMPA (B), metabotropici (C) e di proteine scaffold di sinapsi (D). I valori riportati sono ottenuti dalla media \pm SEM di 5-7 esperimenti e sono mostrati come percentuale di espressione rispetto al controllo.

12. DISCUSSIONE

I recettori colinergici nicotinici neuronali svolgono un ruolo fondamentale nel controllo della trasmissione nervosa nel SNC. Come discusso nell'introduzione, questi recettori sono largamente espressi in tutto il SNC (Baddick e Marks, 2011; Zoli et al., 2007) e sono responsabili sia della trasmissione veloce a livello delle sinapsi colinergiche, sia della modulazione del rilascio di praticamente tutti i neurotrasmettitori (Dajas-Bailador e Wonnacott, 2004; Hurst et al., 2013). Gli studi condotti sui nAChR nel corso degli anni sono numerosi ed hanno chiarito molti aspetti della farmacologia, della biosintesi, dell'assemblaggio, del traffico e dell'espressione differenziale di questa famiglia di recettori (Colombo et al., 2013; Millar e Gotti, 2009; Albuquerque et al., 2009). Tuttavia diversi aspetti della biologia e della biochimica di questi recettori sono ancora oscuri e richiedono studi più approfonditi per essere chiariti. Ad esempio non è ancora stato possibile cristallizzare il recettore pentamerico maturo, infatti tutti gli studi di ultrastruttura si basano su omologhi recettoriali espressi in batteri (GLIC, ELIC), sulla Acetylcholin Binding Protein (AChBP) o su modelli molecolari virtuali. Inoltre, negli ultimi anni è stata evidenziata l'espressione fisiologica di sottotipi recettoriali di cui è ancora poco chiara la stechiometria e la funzione (Liu et al., 2009; Fornasari et al., 2011) e sono stati evidenziati nuovi ruoli per sottotipi recettoriali già noti e ben caratterizzati (Takarada et al., 2012).

Un altro aspetto su cui si sono focalizzate molteplici linee di ricerca, concerne il ruolo dei nAChR nella dipendenza da nicotina e gli effetti di questa sostanza sul metabolismo dei recettori nicotinici (Colombo et al., 2013; Penton e Lester, 2009; Changeux, 2010). È noto che l'esposizione cronica alla nicotina induce un aumento dei siti di legame dei nAChR, che questo aumento è legato a meccanismi post-traduzionali e che dipende dai sottotipi recettoriali presi in esame (Gotti et al., 2007; Marks et al., 2011). Inoltre anche lo stesso sottotipo recettoriale può essere regolato in maniera differente in funzione dell'area cerebrale in cui è espresso ed in funzione del protocollo di somministrazione della nicotina (Moretti et al., 2010). In aggiunta, gli studi condotti per chiarire il ruolo dei nAChR negli effetti comportamentali della nicotina, hanno svelato un controllo indiretto di questa sostanza sull'espressione dei GluR ed hanno suggerito un ruolo della trasmissione glutammatergica nei fenomeni di dipendenza ed

astinenza da nicotina (D'Souza, 2011; Kalivas, 2009; Kenny et al., 2009; Wang et al., 2010).

In questo scenario si inserisce il progetto di dottorato di cui questa tesi è oggetto. Ricorrendo a tecniche di binding con radioligandi selettivi associate ad immunoprecipitazione con anticorpi subunità-specifici e a tecniche di immunorilevazione mediante western blotting, ci siamo riproposti di analizzare l'espressione dei diversi sottotipi di nAChR nel SNC di topi WT, Het o KO per le subunità $\alpha 4$ e $\beta 2$ sia in condizioni fisiologiche, che dopo trattamento cronico (15giorni) con dosi crescenti di nicotina (0,25/1/4mg/Kg/ora). Particolare attenzione è stata riservata ad un eventuale effetto del trattamento sulla stechiometria del sottotipo recettoriale $\alpha 4\beta 2$. Successivamente è stato analizzato l'effetto del trattamento cronico con nicotina (4mg/Kg/ora per 15giorni) e dell'astinenza (1, 4 o 14 giorni), sull'espressione delle principali subunità di GluR ionotropici e metabotropici in omogenati totali o in frazioni sinaptosomali ottenute da diverse aree del sistema dopaminergico mesocorticolimbico di topi WT.

12.1. RUOLO DELLE SUBUNITA' $\alpha 4$ E $\beta 2$ NELL'ASSEMBLAGGIO DEI DIVERSI SOTTOTIPI RECETTORIALI

Gli esperimenti di binding condotti sui cervelli *in toto* di topi WT, Het e KO per le subunità $\alpha 4$ e $\beta 2$ hanno evidenziato il ruolo fondamentale di queste subunità nell'espressione dei nAChR, infatti la delezione parziale o completa degli alleli codificanti per le subunità $\alpha 4$ o $\beta 2$, provoca rispettivamente la perdita del 50% o la scomparsa pressoché completa dei siti di legame per la ^3H -Epibatidina. Gli esperimenti di immunoprecipitazione con anticorpi subunità-specifici inoltre, evidenziano che i sottotipi $\alpha 4\beta 2^*$ sono quelli più influenzati dalle ablazioni genetiche, mentre i sottotipi $\alpha 5^*$, $\alpha 6^*$ e $\beta 3^*$ risultano essere sensibilmente diminuiti solo nei topi KO. Un'analisi più approfondita evidenzia che in topi b2KO l'espressione dei sottotipi $\alpha 6^*$ e $\beta 3^*$ è virtualmente soppressa, mentre in topi $\alpha 4$ KO si osserva ancora l'espressione di questi sottotipi, seppur a livelli molto bassi. Possiamo speculare quindi che la subunità $\beta 2$ prenda parte alla formazione di tutti i recettori $\beta 3^*$ o $\alpha 6^*$, mentre la subunità $\alpha 4$ sia contenuta in una frazione di questi sottotipi recettoriali. Infine, in entrambe le linee di

topi KO si osserva solo una riduzione parziale dell'espressione dei sottotipi $\alpha 3^*$ e $\beta 4^*$, a confermare che queste due subunità interagiscono prevalentemente tra di loro per formare il sottotipo $\alpha 3\beta 4$. Nei topi $\beta 2$ KO si osserva una riduzione più marcata dei sottotipi $\alpha 3^*$, confermando l'esistenza di una popolazione recettoriale $\alpha 3\beta 2$. Come atteso, gli esperimenti di immunoprecipitazione non hanno mostrato alterazioni statisticamente significative nell'espressione del sottotipo omomero $\alpha 7$, questo dato è in linea con quanto osservato negli esperimenti di binding con ^{125}I - αBgTx . L'analisi quantitativa dei dati, conferma che il sottotipo $\alpha 4\beta 2$ rappresenta circa il 90% dei siti di legame ad alta affinità per la ^3H -Epibatidina in cervelli adulti di roditori (Gotti et al., 2007) ed evidenzia che la delezione parziale o completa di una sola delle subunità $\alpha 4$ o $\beta 2$ è sufficiente a ridurre drasticamente l'espressione dei nAChR nel SNC. Inoltre i dati ottenuti dagli esperimenti di binding con ^{125}I - αBgtx e di immunoprecipitazione con Abs-anti $\alpha 7$, indicando che l'espressione delle subunità $\alpha 4$ e $\beta 2$ è necessaria per l'espressione dei sottotipi eteromerici, ma non di quello $\alpha 7$ omomero. Studi comportamentali condotti da altri gruppi su linee di topi transgenici, hanno evidenziato alterazioni statisticamente significative della memoria spaziale, delle relazioni sociali e dell'esplorazione in campo aperto, in topi $\beta 2$ KO e in minor grado anche nei topi $\alpha 4$ KO (Granon et al., 2003; Avale et al., 2008). Comparando i dati ottenuti nel nostro laboratorio con quelli comportamentali presenti in letteratura, si può affermare che i nAChR eteromerici $\beta 2^*$ e $\alpha 4^*$ giocano un ruolo fondamentale nei comportamenti esecutivi e sociali dei topi, che risultano essere sensibilmente alterati dalla scomparsa di questi sottotipi recettoriali. Tuttavia, livelli di espressione dimezzati dei recettori $\beta 2^*$ e $\alpha 4^*$ rispetto alle condizioni fisiologiche, sono sufficienti per sostenere comportamenti normali paragonabili ai WT. E' noto che le subunità $\alpha 6$ e $\beta 3$ coassemblano con quelle $\alpha 4$ e $\beta 2$, per dare origine ad una grande varietà di sottotipi recettoriali, che risultano essere espressi ad alti livelli solo nei neuroni dopaminergici e nel collicolo superiore (Gotti et al., 2010). Studi comportamentali condotti su topi $\beta 3$ KO e $\alpha 6$ KO hanno evidenziato alterazioni nell'attività locomotoria di questi topi sia in condizioni basali, che in seguito alla somministrazione acuta di nicotina (Cui et al., 2003; Le Novère et al., 1999). I dati ottenuti dagli esperimenti di immunoprecipitazione, evidenziano una drastica riduzione dei sottotipi $\alpha 6^*$ e $\beta 3^*$ e

questo potrebbe spiegare perché alcune alterazioni locomotorie osservate in topi $\beta 3\text{KO}$ o $\alpha 6\text{KO}$, ricalchino quelle osservate in topi $\beta 2\text{KO}$ o $\alpha 4\text{KO}$.

Infine, in topi $\alpha 3\text{KO}$ e $\beta 2/\beta 4\text{KO}$ (topi KO per entrambe le subunità β) è stato riportato un alto rischio di mortalità perinatale, mentre la delezione delle subunità $\alpha 4$, $\beta 2$ o $\beta 4$ non sembra influire sulla salute dei neonati. I nostri dati suggeriscono che questo effetto sia da attribuire alla scomparsa completa dei recettori $\alpha 3^*$ e che l'espressione di almeno uno dei sottotipi $\alpha 3\beta 2$ o $\alpha 3\beta 4$ sia necessaria per la sopravvivenza dei topi (Xu et al., 1999). E' interessante notare che modelli murini di distrofia muscolare di Duchenne presentano una ridotta espressione dei sottotipi $\alpha 3\beta 2$ o $\alpha 3\beta 4$, confermando il ruolo fondamentale di questi sottotipi recettoriali in meccanismi fisiologici necessari per la vita (Di Angelantonio et al., 2011).

12.2. EFFETTO DEL TRATTAMENTO CRONICO CON NICOTINA SULL'ESPRESSIONE DEI DIVERSI SOTTOTIPI NICOTINICI

Gli esperimenti di binding hanno evidenziato un aumento dose dipendente dei siti di legame per la ^3H -Epibatidina in topi WT ed Het trattati cronicamente con nicotina, ma non in topi KO, evidenziando che le subunità $\alpha 4$ e $\beta 2$ sono necessarie per l'upregolazione dei recettori indotta da nicotina. Immunoprecipitando i recettori con anticorpi subunità specifici, è stato possibile identificare quali fossero i sottotipi soggetti all'upregolazione. In primo luogo è stato evidenziato un aumento dose dipendente del sottotipo $\alpha 4\beta 2$ in topi WT ed Het, come è stato discusso in precedenza i topi $\alpha 4\text{KO}$ e $\beta 2\text{KO}$ non esprimono questo sottotipo recettoriale e di conseguenza non è stato possibile osservare alcuna up-regolazione. Esperimenti di Western Blotting condotti in parallelo hanno confermato che l'aumento dei siti di binding è legato ad un aumento delle proteine delle subunità $\alpha 4$ e $\beta 2$. Questo incremento è stato osservato sia in topi WT che Het, ad indicare che l'espressione delle subunità e la presenza di nicotina sono condizione necessaria e sufficiente per l'upregolazione. In entrambe le linee di topi Het inoltre si osserva un incremento dei siti di legame lievemente maggiore rispetto ai relativi WT, ciò potrebbe essere causato dalla variabilità sperimentale, ma potrebbe anche indicare un effetto maggiore della nicotina in queste linee murine. Inoltre In tutte le linee murine ad esclusione dei $\beta 2\text{KO}$ è stato rilevato un

aumento dose dipendente dei recettori $\alpha 3^*$, ad indicare un effetto della nicotina anche sull'espressione sottotipo $\alpha 3\beta 2$, ma non del sottotipo $\alpha 3\beta 4$. Questo dato è supportato dagli esperimenti di immunoprecipitazione con Abs-anti $\beta 4$, che non hanno evidenziato upregolazione dei recettori $\beta 4^*$. Studi condotti *in vitro* tuttavia suggeriscono che anche il sottotipo $\alpha 3\beta 4$ sia soggetto all'upregolazione indotta da nicotina, le dosi a necessarie per ottenere questo effetto sono però più alte rispetto a quanto osservato per i sottotipi $\alpha 3\beta 2$ ed $\alpha 4\beta 2$. Possiamo speculare che la concentrazione di nicotina nel SNC delle diverse linee di topi, sia sufficiente per upregolare i sottotipi $\alpha 3\beta 2$ ed $\alpha 4\beta 2$, ma non per upregolare il sottotipo $\alpha 3\beta 4$.

Infine i diversi trattamenti effettuati non hanno alterato in maniera statisticamente significativa l'espressione dei sottotipi recettoriali $\alpha 6^*$, $\beta 3^*$ e $\alpha 5^*$, suggerendo che anche questi sottotipi recettoriali sono resistenti all'upregolazione indotta da nicotina. Va sottolineato che i dati appena descritti sono stati ottenuti su cervelli *in toto* di topi, le discrepanze con i risultati riportati in letteratura possono quindi essere attribuite alla differente modulazione dei sottotipi di nAChR in aree specifiche del SNC (Moretti et al., 2010; Nashmi e Renda, 2012; Gaimarri et al., 2007).

Studi condotti *in vitro* hanno dimostrato che la nicotina, agendo come chaperone molecolare a livello del reticolo endoplasmatico, media l'up-regolazione di diversi sottotipi recettoriali (Kuryatov et al., 2005; Sallette et al., 2004). Inoltre recenti evidenze sperimentali suggeriscono che la nicotina favorisca l'assemblaggio di recettori con stechiometria $2\alpha 3\beta$, e che questa conformazione sia più trafficata verso la membrana plasmatica e sia meno prona alla degradazione via UPS (Srinivasan et al., 2011; Mazzo et al., 2013). Il laboratorio in cui ho svolto il dottorato ha contribuito a dimostrare l'espressione *in vivo* di due diverse stechiometrie del sottotipo $\alpha 4\beta 2$ caratterizzate da specifiche proprietà farmacologiche, nello specifico la stechiometria $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ mostra affinità minore per l'ACh rispetto a quella $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$. In questo studio abbiamo confrontato l'espressione relativa delle subunità $\alpha 4$ e $\beta 2$ in Corteccia Cerebrale e nel Talamo, due aree del sistema nervoso centrale note per mostrare rispettivamente una forte ed una debole upregolazione del sottotipo $\alpha 4\beta 2$, in questo modo siamo stati in grado di dimostrare che in corteccia cerebrale l'upregolazione del sottotipo $\alpha 4\beta 2$ indotta da nicotina è a carico prevalentemente della stechiometria

$(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ a più alta affinità. Nel Talamo infatti, l'up-regolazione dei nAChR è molto leggera e l'espressione relativa delle subunità $\alpha 4$ e $\beta 2$ non mostra alterazioni statisticamente significative. Inoltre i dati di binding evidenziano che durante l'astinenza, l'espressione dei recettori nicotinici ritorna a livelli basali, contemporaneamente ritorna a livelli basali anche l'espressione relativa delle subunità $\alpha 4$ e $\beta 2$, supportando l'idea che l'incremento dei siti di legame ad alta affinità sia a carico della stechiometria $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$. Questi dati suggeriscono un ruolo fondamentale per questo sottotipo recettoriale nei fenomeni di dipendenza da nicotina. Come discusso nell'introduzione, le due stechiometrie presentano caratteristiche farmacologiche particolari, in funzione della subunità accessoria incorporata. Possiamo speculare che l'incorporazione della subunità $\alpha 5$ possa prevenire l'incorporazione di quella $\beta 2$ nel sito accessorio del recettore maturo, rendendo questi recettori resistenti all'upregolazione. Questo effetto sarebbe in linea con quanto osservato negli esperimenti di immunoprecipitazione, che non hanno evidenziato un aumento dei recettori $\alpha 5^*$ nel SNC di topo. I dati in letteratura tuttavia sono contrastanti, infatti studi condotti nel nostro laboratorio hanno evidenziato un aumento dei recettori $\alpha 5^*$ nella Corteccia Caudale di ratti trattati cronicamente con nicotina via minipompa (Moretti et al., 2010). D'altra parte nel 2007 Mao et al. hanno evidenziato che il trattamento cronico con nicotina non ha nessun effetto sull'espressione dei recettori contenenti la subunità $\alpha 5$. Possiamo speculare che il sottotipo recettoriale $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ venga regolato diversamente in specifiche aree del SNC, questo attribuirebbe alla subunità $\alpha 5$ un ruolo modulatore fondamentale per gli effetti comportamentali della nicotina. Sicuramente ulteriori studi sono necessari per chiarire gli effetti della nicotina sui recettori che incorporano questa subunità e più in generale sui diversi sottotipi nicotinici.

12.3. EFFETTI DEL TRATTAMENTO CRONICO CON NICOTINA SULL'ESPRESSIONE DEI GLUR E DEI NACHR NELLE AREE DEL SISTEMA MESOCORTICOLIMBICO

La nicotina agendo sui differenti sottotipi di recettori nicotinici induce uno sbilanciamento della trasmissione eccitatoria ed inibitoria, in favore della prima. Questo effetto provoca una overstimolazione dei neuroni dopaminergici in VTA e un aumento del rilascio di dopamina dalle terminazioni sinaptiche nel NAc. E' noto che

l'upregolazione dei nAChR indotta dall'esposizione cronica alla nicotina gioca un ruolo fondamentale nella dipendenza da fumo di sigaretta. Gli studi di binding e di Western Blotting condotti in questo studio hanno evidenziato che l'iniezione intragiugulare di nicotina induce una forte upregolazione dei nAChR nello Striato, nella VTA e in Corteccia Cerebrale, e solo un aumento molto più blando nel Talamo. È importante sottolineare che le aree che mostrano l'upregolazione più forte fanno parte del sistema dopaminergico mesocorticolimbico, una rete neurale coinvolta nella dipendenza da molte sostanze d'abuso. Inoltre in VTA si osserva l'upregolazione maggiore dei nAChR sia in omogenati totali, che nelle frazioni sinaptosomali, gli esperimenti di WB inoltre suggeriscono che i sottotipi soggetti ad upregolazione contengono la subunità $\beta 2$. Risultati analoghi sono stati ottenuti anche analizzando omogenati totali e frazioni sinaptosomali di NAc e omogenati totali di Corteccia Cerebrale di topi trattati cronicamente con nicotina (4mg/Kg/ora per 14 giorni). I dati ottenuti sono in linea con quanto riportato in letteratura.

La overstimolazione dei neuroni dopaminergici in VTA è ottenuta prevalentemente in seguito al rilascio di glutammato dalle terminazioni sinaptiche provenienti dalla PFC. È stato dimostrato che uno stimolo di reward induce un aumento di rilascio di glutammato nella VTA (You et al., 2001). In parallelo a livello delle sinapsi glutammatergiche in VTA è stato rilevato un aumento delle correnti AMPA/NMDA postsinaptiche, che risulta essere il maggiore responsabile dell'iperattivazione dei neuroni dopaminergici e della CPP indotta da nicotina e da altri psicostimolanti (Lammel et al., 2012). I dati ottenuti nel corso di questo lavoro evidenziano un aumento dell'espressione della subunità GluA2/3 nelle sinapsi che potrebbe essere associato a fenomeni di rimodellamento sinaptico, come suggerisce l'aumento della proteina scaffold PSD95 e come evidenziato da studi *in vitro* su coculture di neuroni di VTA e corticali trattate con cocaina (Gao e Wolf, 2007). Differenti studi hanno dimostrato che il blocco farmacologico o l'ablazione genetica dei NMDAR è sufficiente per abbassare la ICSS (soglia di autostimolazione intracranica) e per bloccare l'autosomministrazione di nicotina (Kenny et al., 2009; Wang et al., 2010). In questo studio abbiamo rilevato un aumento della subunità GluN2B dei NMDAR in membrane totali di VTA, parallelamente risultano essere aumentati anche i livelli della

proteina SAP102. E' noto che questa proteina sia coinvolta nel traffico del sottotipo GluN2B* verso la sinapsi (Chen et al., 2012). Questi dati ci permettono di speculare che lo stato iperglutammatergico riscontrato in VTA in seguito all'esposizione cronica alla nicotina, potrebbe essere mediato dai recettori GluN2B* e da fenomeni di rimodellamento delle sinapsi glutammatergiche che coinvolgono l'inserzione in membrana di AMPAR contenenti la subunità GluR2/3.

Come detto precedentemente l'ipereccitazione dei neuroni dopaminergici della VTA induce un aumento del rilascio di Dopamina nello Striato e nella Corteccia, e l'attivazione di una serie di risposte cellulari a breve ed a lungo termine, che sono coinvolte in molti aspetti comportamentali della dipendenza da nicotina e da altre sostanze d'abuso. Gli esperimenti condotti in questo studio hanno evidenziato una riduzione del sottotipo GluN1/GluN2A e del sottotipo GluA1* in seguito a somministrazione cronica di nicotina. Effetti analoghi sono stati osservati in PFC di topi che si autosomministravano nicotina (Kenny et al., 2009).

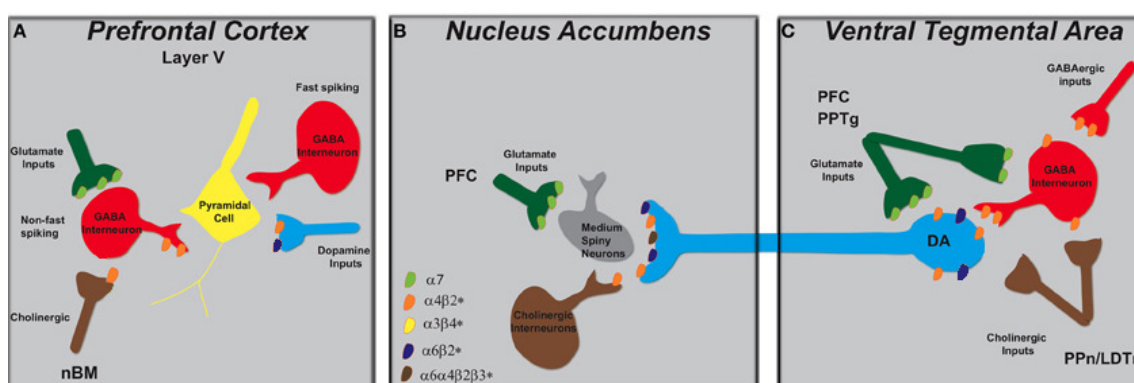


FIGURA 32: Rappresentazione schematica delle terminazioni sinaptiche nelle aree del sistema mesocorticolimbico e dei sottotipi nicotinici espressi in queste aree. A) sono mostrate le sinapsi glutammatergiche (verde), GABAergiche (rosso) e colinergiche (marrone) sui neuroni piramidali della PFC; B) sono mostrate le sinapsi dopaminergiche (Blu), glutammatergiche (verde) e colinergiche (marrone) sui MSN GABAergici del NAc; C) sono mostrate le sinapsi glutammatergiche (verde), GABAergiche (rosso) e colinergiche (marrone) sui neuroni dopaminergici della VTA.

Per quanto riguarda lo striato, i risultati ottenuti sono in contrasto con quelli presenti in letteratura. Diversi gruppi hanno osservato un aumento dei recettori AMPA, in particolare di quelli contenenti la subunità GluA1, nel NAc di topi trattati cronicamente con nicotina e con altri psicostimolanti (Kenny et al., 2009; Mameli et al., 2009) e in coculture di neuroni striatali e corticali trattate cronicamente con cocaina (Sun et al., 2008). I nostri esperimenti hanno invece evidenziato una riduzione dei recettori GluA2/3* in seguito a trattamento cronico con nicotina. Questa differenza potrebbe

essere imputabile sia alla differente via di somministrazione della nicotina, sia all'area presa in esame. Nel nostro studio infatti è stato analizzato lo striato totale, mentre negli altri studi citati è stata analizzata specificatamente la parte ventrale dello striato (NAc).

12.4. EFFETTI DELL'ASTINENZA DA NICOTINA SULL'ESPRESSIONE DEI GLUR E DEI NACHR NELLE AREE DEL SISTEMA MESOCORTICOLIMBICO

Gli esperimenti di binding e di Western Blotting hanno evidenziato in tutte le aree analizzate, un graduale ritorno a livelli di espressione basali dei nAChR durante l'astinenza da nicotina. Questo dato potrebbe spiegare il perché sia possibile indurre una sindrome simile a quella d'astinenza, attraverso la somministrazione di antagonisti nicotinici.

Durante l'astinenza da nicotina, nelle sinapsi della VTA si assiste ad un cambiamento graduale della stechiometria dei AMPAR a favore di recettori GLUA1*, risultati analoghi sono stati ottenuti anche dall'analisi della Corteccia Cerebrale e dello striato. Mentre in VTA il cambio di stechiometria è ottenuto prevalentemente attraverso l'aumento dell'espressione di recettori GluA1*, in corteccia e nello striato è ottenuto soprattutto attraverso una riduzione dei recettori GluA2/3*. Inoltre in corteccia la rimozione dei recettori GluA2/3* dopo due settimane di astinenza, sembra essere associata ad una riduzione del numero o delle dimensioni delle sinapsi, come indicato dalla riduzione della proteina PSD95. Nello Striato si assiste ad una riduzione duratura dei recettori AMPA che incorporano la subunità GluA2/3, inoltre in quest'area si ha una riduzione generale dell'espressione dei recettori glutammatergici ionotropici durante il quarto giorno di astinenza da nicotina. E' interessante notare che questa finestra temporale coincide con il ritorno dei recettori nicotinici a livelli di espressione basali. Possiamo speculare quindi che il ripristino di una conduzione colinergica "fisiologica" possa in qualche modo deprimere la trasmissione glutammatergica nello striato. In particolare l'aumento del recettore mGluR, potrebbe essere coinvolto in questa forma di depressione sinaptica. In letteratura sono presenti pochi studi focalizzati sull'espressione dei GluR durante l'astinenza da nicotina e da altre sostanze d'abuso ed i risultati ottenuti sono contrastanti, in generale sembra che alterazioni nell'espressione dei AMPAR in particolare di quelli contenenti la subunità

GluA1 siano responsabili degli aspetti comportamentali dell'astinenza (Conrad et al., 2008; Ghasemzadeh et al., 2009; Wang et al., 2008).

13. CONCLUSIONI

I dati ottenuti in questo progetto di ricerca, contribuiscono da un lato a chiarire molti aspetti della biologia dei nAChR e dall'altro a comprendere come i nAChR e i GluR vengano modulati dall'esposizione cronica e dall'astinenza da nicotina.

In primo luogo è stato dimostrato il ruolo fondamentale delle subunità $\alpha 4$ e $\beta 2$ per l'espressione di diversi sottotipi di nAChR neuronali eteromerici. Nello specifico queste due subunità oltre ad assemblarsi per formare il sottotipo $\alpha 4\beta 2$, sembrano essere incorporate nella maggior parte dei recettori che contengono una subunità $\alpha 5$, $\alpha 6$ e $\beta 3$. Il sottotipo recettoriale $\alpha 4\beta 2$ è sicuramente quello più influenzato dalla delezione sia parziale che completa delle subunità, tuttavia la condizione di eterozigosi per una delle due subunità sembra non avere effetti sull'up-regolazione indotta da nicotina di questo sottotipo. Un'analisi più approfondita ha evidenziato che la stechiometria $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ è maggiormente up-regolata rispetto alla stechiometria $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$, a suggerire un effetto della nicotina sulle stechiometrie recettoriali espresse nel SNC.

In secondo luogo siamo andati a valutare l'espressione dei recettori nicotinici e glutammatergici nelle aree del sistema mesocorticolimbico in seguito ad esposizione cronica e durante l'astinenza da nicotina. Tutte le aree analizzate di questo circuito neurale mostrano up-regolazione dei nAChR eteromerici, un effetto che termina entro il quarto giorno di astinenza da nicotina. È noto che l'up-regolazione dei nAChR in VTA causa il potenziamento della conduzione glutammatergica a scapito di quella GABAergica. I nostri dati ci permettono di speculare che, a livello molecolare, questo sbilanciamento possa indurre fenomeni di plasticità sinaptica che portano ad un aumento dei AMPAR espressi nei terminali nervosi, attraverso un meccanismo mediato probabilmente dai recettori GluN2B*. Il potenziamento della trasmissione glutammatergica causa l'iperattivazione dei neuroni dopaminergici della VTA e come conseguenza l'aumento del rilascio di DA nello striato e nella PFC, le nostre osservazioni potrebbero indicare un effetto depressivo di questo neurotrasmettitore sulla trasmissione striatale e corticale. Inoltre le alterazioni osservate nelle aree mesocorticali permangono anche dopo lunghi periodi di astinenza da nicotina, sono più durature delle alterazioni sulla trasmissione colinergica e potrebbero coinvolgere il cambiamento della stechiometria dei AMPAR, confermando un ruolo chiave dei GluR

nella dipendenza dal fumo di sigaretta. Molti altri studi sono necessari per comprendere a pieno le proprietà biologiche dei recettori nicotinici ed il loro ruolo nella dipendenza da nicotina, ma il quadro inizia ad essere sempre più chiaro e coerente.

14. BIBLIOGRAFIA

- Akazawa C, Shigemoto R, Bessho Y, Nakanishi S and Mizuno N (1994) Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *The Journal of comparative neurology* **347**(1): 150-160.
- Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M and Rogers SW (2009) Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiological reviews* **89**(1): 73-120.
- Avale ME, Faure P, Pons S, Robledo P, Deltheil T, David DJ, Gardier AM, Maldonado R, Granon S, Changeux JP and Maskos U (2008) Interplay of beta2* nicotinic receptors and dopamine pathways in the control of spontaneous locomotion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(41): 15991-15996.
- Baddick CG and Marks MJ (2011) An autoradiographic survey of mouse brain nicotinic acetylcholine receptors defined by null mutants. *Biochemical pharmacology* **82**(8): 828-841.
- Barria A, Muller D, Derkach V, Griffith LC and Soderling TR (1997) Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science* **276**(5321): 2042-2045.
- Bashir ZI and Collingridge GL (1994) An investigation of depotentiation of long-term potentiation in the CA1 region of the hippocampus. *Experimental brain research Experimentelle Hirnforschung Experimentation cerebrale* **100**(3): 437-443.
- Bassareo V, De Luca MA and Di Chiara G (2002) Differential Expression of Motivational Stimulus Properties by Dopamine in Nucleus Accumbens Shell versus Core and Prefrontal Cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**(11): 4709-4719.
- Benfante R, Antonini RA, De Pizzol M, Gotti C, Clementi F, Locati M and Fornasari D (2011) Expression of the alpha7 nAChR subunit duplicate form (CHRFAM7A) is down-regulated in the monocytic cell line THP-1 on treatment with LPS. *Journal of neuroimmunology* **230**(1-2): 74-84.

- Berridge KC and Kringelbach ML (2013) Neuroscience of affect: brain mechanisms of pleasure and displeasure. *Current opinion in neurobiology* **23**(3): 294-303.
- Bjorklund A and Dunnett SB (2007) Fifty years of dopamine research. *Trends in neurosciences* **30**(5): 185-187.
- Blount P and Merlie JP (1991) BIP associates with newly synthesized subunits of the mouse muscle nicotinic receptor. *The Journal of cell biology* **113**(5): 1125-1132.
- Bortolotto ZA, Bashir ZI, Davies CH and Collingridge GL (1994) A molecular switch activated by metabotropic glutamate receptors regulates induction of long-term potentiation. *Nature* **368**(6473): 740-743.
- Broadbent S, Groot-Kormelink PJ, Krashia PA, Harkness PC, Millar NS, Beato M and Sivilotti LG (2006) Incorporation of the beta3 subunit has a dominant-negative effect on the function of recombinant central-type neuronal nicotinic receptors. *Molecular pharmacology* **70**(4): 1350-1357.
- Bromberg-Martin ES, Matsumoto M and Hikosaka O (2010) Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron* **68**(5): 815-834.
- Brown TE, Lee BR, Mu P, Ferguson D, Dietz D, Ohnishi YN, Lin Y, Suska A, Ishikawa M, Huang YH, Shen H, Kalivas PW, Sorg BA, Zukin RS, Nestler EJ, Dong Y and Schluter OM (2011) A silent synapse-based mechanism for cocaine-induced locomotor sensitization. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**(22): 8163-8174.
- Budygin EA, Park J, Bass CE, Grinevich VP, Bonin KD and Wightman RM (2012) Aversive stimulus differentially triggers subsecond dopamine release in reward regions. *Neuroscience* **201**: 331-337.
- Buisson B and Bertrand D (2002) Nicotine addiction: the possible role of functional upregulation. *Trends in pharmacological sciences* **23**(3): 130-136.
- Burzomato V, Frugier G, Perez-Otano I, Kittler JT and Attwell D (2010) The receptor subunits generating NMDA receptor mediated currents in oligodendrocytes. *The Journal of physiology* **588**(Pt 18): 3403-3414.
- Cai YQ, Wang W, Hou YY, Zhang Z, Xie J and Pan ZZ (2013) Central amygdala GluA1 facilitates associative learning of opioid reward. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **33**(4): 1577-1588.

- Campbell NR, Fernandes CC, Halff AW and Berg DK (2010) Endogenous signaling through alpha7-containing nicotinic receptors promotes maturation and integration of adult-born neurons in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**(26): 8734-8744.
- Caporale N and Dan Y (2008) Spike timing-dependent plasticity: a Hebbian learning rule. *Annual review of neuroscience* **31**: 25-46.
- Carter A, Hall, W., Nutt, D., (2009) The neurobiology of addiction, in *Addiction neurobiology: ethical and social implications EMCDDA Monograph* (Carter A, Hall, W., Nutt, D., ed) pp 29-50, Cambridge University Press, Lisbon.
- Castillo PE, Chiu CQ and Carroll RC (2011) Long-term plasticity at inhibitory synapses. *Current opinion in neurobiology* **21**(2): 328-338.
- Chang W, Gelman MS and Prives JM (1997) Calnexin-dependent enhancement of nicotinic acetylcholine receptor assembly and surface expression. *The Journal of biological chemistry* **272**(46): 28925-28932.
- Changeux JP (2010) Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. *Nature reviews Neuroscience* **11**(6): 389-401.
- Chen BS, Gray JA, Sanz-Clemente A, Wei Z, Thomas EV, Nicoll RA and Roche KW (2012) SAP102 mediates synaptic clearance of NMDA receptors. *Cell reports* **2**(5): 1120-1128.
- Chevalleyre V, Takahashi KA and Castillo PE (2006) Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annual review of neuroscience* **29**: 37-76.
- Christianson JC and Green WN (2004) Regulation of nicotinic receptor expression by the ubiquitin-proteasome system. *The EMBO journal* **23**(21): 4156-4165.
- Coleman SK, Moykkynen T, Cai C, von Ossowski L, Kuismanen E, Korpi ER and Keinanen K (2006) Isoform-specific early trafficking of AMPA receptor flip and flop variants. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**(43): 11220-11229.
- Collingridge GL, Kehl SJ and McLennan H (1983a) The antagonism of amino acid-induced excitations of rat hippocampal CA1 neurones *in vitro*. *The Journal of physiology* **334**: 19-31.

- Collingridge GL, Kehl SJ and McLennan H (1983b) Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *The Journal of physiology* **334**: 33-46.
- Collingridge GL, Peineau S, Howland JG and Wang YT (2010) Long-term depression in the CNS. *Nature reviews Neuroscience* **11**(7): 459-473.
- Colombo SF, Mazzo F, Pistillo F and Gotti C (2013) Biogenesis, trafficking and up-regulation of nicotinic ACh receptors. *Biochemical pharmacology* **86**(8): 1063-1073.
- Conn PJ, Battaglia G, Marino MJ and Nicoletti F (2005) Metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit. *Nature reviews Neuroscience* **6**(10): 787-798.
- Conn PJ and Pin JP (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology* **37**: 205-237.
- Conrad KL, Tseng KY, Uejima JL, Reimers JM, Heng LJ, Shaham Y, Marinelli M and Wolf ME (2008) Formation of accumbens GluR2-lacking AMPA receptors mediates incubation of cocaine craving. *Nature* **454**(7200): 118-121.
- Cooper E, Couturier S and Ballivet M (1991) Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature* **350**(6315): 235-238.
- Corringer PJ, Sallette J and Changeux JP (2006) Nicotine enhances intracellular nicotinic receptor maturation: a novel mechanism of neural plasticity? *Journal of physiology, Paris* **99**(2-3): 162-171.
- Cui C, Booker TK, Allen RS, Grady SR, Whiteaker P, Marks MJ, Salminen O, Tritto T, Butt CM, Allen WR, Stitzel JA, McIntosh JM, Boulter J, Collins AC and Heinemann SF (2003) The beta3 nicotinic receptor subunit: a component of alpha-conotoxin MII-binding nicotinic acetylcholine receptors that modulate dopamine release and related behaviors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**(35): 11045-11053.
- Cull-Candy SG and Leszkiewicz DN (2004) Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2004**(255): re16.

- Curtis DR and Johnston GA (1974) Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system. *Ergebnisse der Physiologie, biologischen Chemie und experimentellen Pharmakologie* **69**(0): 97-188.
- Curtis DR and Watkins JC (1960) The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. *Journal of neurochemistry* **6**: 117-141.
- D'Souza MS, Liechti ME, Ramirez-Nino AM, Kuczenski R and Markou A (2011) The metabotropic glutamate 2/3 receptor agonist LY379268 blocked nicotine-induced increases in nucleus accumbens shell dopamine only in the presence of a nicotine-associated context in rats. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **36**(10): 2111-2124.
- Dajas-Bailador F and Wonnacott S (2004) Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends in pharmacological sciences* **25**(6): 317-324.
- Dan Y and Poo MM (2006) Spike timing-dependent plasticity: from synapse to perception. *Physiological reviews* **86**(3): 1033-1048.
- Darsow T, Booker TK, Pina-Crespo JC and Heinemann SF (2005) Exocytic trafficking is required for nicotine-induced up-regulation of alpha 4 beta 2 nicotinic acetylcholine receptors. *The Journal of biological chemistry* **280**(18): 18311-18320.
- Di Angelantonio S, De Stefano ME, Piccioni A, Lombardi L, Gotti C and Paggi P (2011) Lack of dystrophin functionally affects alpha3beta2/beta4-nicotinic acetylcholine receptors in sympathetic neurons of dystrophic mdx mice. *Neurobiology of disease* **41**(2): 528-537.
- Engert F and Bonhoeffer T (1997) Synapse specificity of long-term potentiation breaks down at short distances. *Nature* **388**(6639): 279-284.
- Exley R, Moroni M, Sasdelli F, Houlihan LM, Lukas RJ, Sher E, Zwart R and Bermudez I (2006) Chaperone protein 14-3-3 and protein kinase A increase the relative abundance of low agonist sensitivity human alpha 4 beta 2 nicotinic acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *Journal of neurochemistry* **98**(3): 876-885.
- Ferraguti F and Shigemoto R (2006) Metabotropic glutamate receptors. *Cell and tissue research* **326**(2): 483-504.

- Ficklin MB, Zhao S and Feng G (2005) Ubiquitin-1 regulates nicotine-induced up-regulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *The Journal of biological chemistry* **280**(40): 34088-34095.
- Forsayeth JR, Gu Y and Hall ZW (1992) BiP forms stable complexes with unassembled subunits of the acetylcholine receptor in transfected COS cells and in C2 muscle cells. *The Journal of cell biology* **117**(4): 841-847.
- Francesconi A, Kumari R and Zukin RS (2009) Regulation of group I metabotropic glutamate receptor trafficking and signaling by the caveolar/lipid raft pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**(11): 3590-3602.
- Fujisawa S and Buzsaki G (2011) A 4 Hz oscillation adaptively synchronizes prefrontal, VTA, and hippocampal activities. *Neuron* **72**(1): 153-165.
- Gaimarri A, Moretti M, Riganti L, Zanardi A, Clementi F and Gotti C (2007) Regulation of neuronal nicotinic receptor traffic and expression. *Brain research reviews* **55**(1): 134-143.
- Gallagher SM, Daly CA, Bear MF and Huber KM (2004) Extracellular signal-regulated protein kinase activation is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression in hippocampal area CA1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**(20): 4859-4864.
- Gao C and Wolf ME (2007) Dopamine alters AMPA receptor synaptic expression and subunit composition in dopamine neurons of the ventral tegmental area cultured with prefrontal cortex neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**(52): 14275-14285.
- Gao M, Jin Y, Yang K, Zhang D, Lukas RJ and Wu J (2010) Mechanisms involved in systemic nicotine-induced glutamatergic synaptic plasticity on dopamine neurons in the ventral tegmental area. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**(41): 13814-13825.
- Geisler S and Wise RA (2008) Functional implications of glutamatergic projections to the ventral tegmental area. *Reviews in the neurosciences* **19**(4-5): 227-244.

- Gelman MS, Chang W, Thomas DY, Bergeron JJ and Prives JM (1995) Role of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin in subunit folding and assembly of nicotinic acetylcholine receptors. *The Journal of biological chemistry* **270**(25): 15085-15092.
- Gerber U, Gee CE and Benquet P (2007) Metabotropic glutamate receptors: intracellular signaling pathways. *Current opinion in pharmacology* **7**(1): 56-61.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Jr. and Sibley DR (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* **250**(4986): 1429-1432.
- Ghasemzadeh MB, Vasudevan P, Mueller C, Seubert C and Mantsch JR (2009) Region specific alterations in glutamate receptor expression and subcellular distribution following extinction of cocaine self-administration. *Brain research*.
- Gipson CD, Reissner KJ, Kupchik YM, Smith AC, Stankeviciute N, Hensley-Simon ME and Kalivas PW (2013) Reinstatement of nicotine seeking is mediated by glutamatergic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**(22): 9124-9129.
- Gladding CM, Fitzjohn SM and Molnar E (2009) Metabotropic glutamate receptor-mediated long-term depression: molecular mechanisms. *Pharmacological reviews* **61**(4): 395-412.
- Gopalakrishnan M, Molinari EJ and Sullivan JP (1997) Regulation of human alpha4beta2 neuronal nicotinic acetylcholine receptors by cholinergic channel ligands and second messenger pathways. *Molecular pharmacology* **52**(3): 524-534.
- Gotti C, Clementi F, Fornari A, Gaimarri A, Guiducci S, Manfredi I, Moretti M, Pedrazzi P, Pucci L and Zoli M (2009) Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochemical pharmacology* **78**(7): 703-711.
- Gotti C, Guiducci S, Tedesco V, Corbioli S, Zanetti L, Moretti M, Zanardi A, Rimondini R, Mugnaini M, Clementi F, Chiamulera C and Zoli M (2010) Nicotinic acetylcholine receptors in the mesolimbic pathway: primary role of ventral tegmental area alpha6beta2* receptors in mediating systemic nicotine effects on dopamine release, locomotion, and reinforcement. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**(15): 5311-5325.

- Gotti C, Moretti M, Gaimarri A, Zanardi A, Clementi F and Zoli M (2007) Heterogeneity and complexity of native brain nicotinic receptors. *Biochemical pharmacology* **74**(8): 1102-1111.
- Gotti C, Moretti M, Meinerz NM, Clementi F, Gaimarri A, Collins AC and Marks MJ (2008) Partial deletion of the nicotinic cholinergic receptor alpha 4 or beta 2 subunit genes changes the acetylcholine sensitivity of receptor-mediated 86Rb+ efflux in cortex and thalamus and alters relative expression of alpha 4 and beta 2 subunits. *Molecular pharmacology* **73**(6): 1796-1807.
- Gotti C, Zoli M and Clementi F (2006) Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends in pharmacological sciences* **27**(9): 482-491.
- Grace AA and Bunney BS (1984a) The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **4**(11): 2877-2890.
- Grace AA and Bunney BS (1984b) The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **4**(11): 2866-2876.
- Grady SR, Moretti M, Zoli M, Marks MJ, Zanardi A, Pucci L, Clementi F and Gotti C (2009) Rodent habenulo-interpeduncular pathway expresses a large variety of uncommon nAChR subtypes, but only the alpha3beta4* and alpha3beta3beta4* subtypes mediate acetylcholine release. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**(7): 2272-2282.
- Granon S, Faure P and Changeux JP (2003) Executive and social behaviors under nicotinic receptor regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(16): 9596-9601.
- Gray JA, Shi Y, Usui H, During MJ, Sakimura K and Nicoll RA (2011) Distinct modes of AMPA receptor suppression at developing synapses by GluN2A and GluN2B: single-cell NMDA receptor subunit deletion *in vivo*. *Neuron* **71**(6): 1085-1101.
- Groenewegen HJ, Wright CI and Beijer AV (1996) The nucleus accumbens: gateway for limbic structures to reach the motor system? *Progress in brain research* **107**: 485-511.

- Grueter BA, Rothwell PE and Malenka RC (2012) Integrating synaptic plasticity and striatal circuit function in addiction. *Current opinion in neurobiology* **22**(3): 545-551.
- Hamad MI, Ma-Hogemeier ZL, Riedel C, Conrads C, Veitinger T, Habijan T, Schulz JN, Krause M, Wirth MJ, Hollmann M and Wahle P (2011) Cell class-specific regulation of neocortical dendrite and spine growth by AMPA receptor splice and editing variants. *Development* **138**(19): 4301-4313.
- Han ZY, Le Novere N, Zoli M, Hill JA, Jr., Champtiaux N and Changeux JP (2000) Localization of nAChR subunit mRNAs in the brain of *Macaca mulatta*. *The European journal of neuroscience* **12**(10): 3664-3674.
- Harkness PC and Millar NS (2002) Changes in conformation and subcellular distribution of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors revealed by chronic nicotine treatment and expression of subunit chimeras. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**(23): 10172-10181.
- Harvey CD, Yasuda R, Zhong H and Svoboda K (2008) The spread of Ras activity triggered by activation of a single dendritic spine. *Science* **321**(5885): 136-140.
- Hattori M, Hibbs RE and Gouaux E (2012) A fluorescence-detection size-exclusion chromatography-based thermostability assay for membrane protein precrystallization screening. *Structure* **20**(8): 1293-1299.
- Haydon PG (2001) GLIA: listening and talking to the synapse. *Nature reviews Neuroscience* **2**(3): 185-193.
- Hollmann M and Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annual review of neuroscience* **17**: 31-108.
- Hollmann M, Maron C and Heinemann S (1994) N-glycosylation site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GluR1. *Neuron* **13**(6): 1331-1343.
- Huang CC, You JL, Wu MY and Hsu KS (2004) Rap1-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation facilitates AMPA receptor trafficking via the GDI.Rab5 complex. Potential role in (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine-induced long term depression. *The Journal of biological chemistry* **279**(13): 12286-12292.

- Huganir RL and Nicoll RA (2013) AMPARs and Synaptic Plasticity: The Last 25 Years. *Neuron* **80**(3): 704-717.
- Hurst R, Rollema H and Bertrand D (2013) Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics. *Pharmacology & therapeutics* **137**(1): 22-54.
- Hyman SE, Malenka RC and Nestler EJ (2006) Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annual review of neuroscience* **29**: 565-598.
- Isaac JT, Nicoll RA and Malenka RC (1995) Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron* **15**(2): 427-434.
- Ito M and Kano M (1982) Long-lasting depression of parallel fiber-Purkinje cell transmission induced by conjunctive stimulation of parallel fibers and climbing fibers in the cerebellar cortex. *Neuroscience letters* **33**(3): 253-258.
- Jo J, Heon S, Kim MJ, Son GH, Park Y, Henley JM, Weiss JL, Sheng M, Collingridge GL and Cho K (2008) Metabotropic glutamate receptor-mediated LTD involves two interacting Ca(2+) sensors, NCS-1 and PICK1. *Neuron* **60**(6): 1095-1111.
- Johnson JW and Ascher P (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* **325**(6104): 529-531.
- Joshua M, Adler A, Prut Y, Vaadia E, Wickens JR and Bergman H (2009) Synchronization of midbrain dopaminergic neurons is enhanced by rewarding events. *Neuron* **62**(5): 695-704.
- Jurado S, Biou V and Malenka RC (2010) A calcineurin/AKAP complex is required for NMDA receptor-dependent long-term depression. *Nature neuroscience* **13**(9): 1053-1055.
- Kalivas PW (2009) The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nature reviews Neuroscience* **10**(8): 561-572.
- Kane JK, Hwang Y, Konu O, Loughlin SE, Leslie FM and Li MD (2005) Regulation of Homer and group I metabotropic glutamate receptors by nicotine. *The European journal of neuroscience* **21**(5): 1145-1154.
- Kasanetz F, Deroche-Gamonet V, Berson N, Balado E, Lafourcade M, Manzoni O and Piazza PV (2010) Transition to addiction is associated with a persistent impairment in synaptic plasticity. *Science* **328**(5986): 1709-1712.

- Kauer JA and Malenka RC (2007) Synaptic plasticity and addiction. *Nature reviews Neuroscience* **8**(11): 844-858.
- Kennedy MJ and Ehlers MD (2011) Mechanisms and function of dendritic exocytosis. *Neuron* **69**(5): 856-875.
- Kenny PJ, Chartoff E, Roberto M, Carlezon WA, Jr. and Markou A (2009) NMDA receptors regulate nicotine-enhanced brain reward function and intravenous nicotine self-administration: role of the ventral tegmental area and central nucleus of the amygdala. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **34**(2): 266-281.
- Kenny PJ and Markou A (2004) The ups and downs of addiction: role of metabotropic glutamate receptors. *Trends in pharmacological sciences* **25**(5): 265-272.
- Kew JN and Kemp JA (2005) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology* **179**(1): 4-29.
- Kim E, Howes OD, Turkheimer FE, Kim BH, Jeong JM, Kim JW, Lee JS, Jang IJ, Shin SG, Kapur S and Kwon JS (2013) The relationship between antipsychotic D2 occupancy and change in frontal metabolism and working memory : A dual [(11)C]raclopride and [(18) F]FDG imaging study with aripiprazole. *Psychopharmacology* **227**(2): 221-229.
- King SL, Marks MJ, Grady SR, Caldarone BJ, Koren AO, Mukhin AG, Collins AC and Picciotto MR (2003) Conditional expression in corticothalamic efferents reveals a developmental role for nicotinic acetylcholine receptors in modulation of passive avoidance behavior. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**(9): 3837-3843.
- Kitai ST, Shepard PD, Callaway JC and Scroggs R (1999) Afferent modulation of dopamine neuron firing patterns. *Current opinion in neurobiology* **9**(6): 690-697.
- Kohr G (2006) NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell and tissue research* **326**(2): 439-446.
- Koukoui SD and Chaudhuri A (2007) Neuroanatomical, molecular genetic, and behavioral correlates of fragile X syndrome. *Brain research reviews* **53**(1): 27-38.
- Kourrich S, Rothwell PE, Klug JR and Thomas MJ (2007) Cocaine experience controls bidirectional synaptic plasticity in the nucleus accumbens. *The Journal of*

neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **27**(30): 7921-7928.

Kunishima N, Shimada Y, Tsuji Y, Sato T, Yamamoto M, Kumasaka T, Nakanishi S, Jingami H and Morikawa K (2000) Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* **407**(6807): 971-977.

Kuryatov A, Luo J, Cooper J and Lindstrom J (2005) Nicotine acts as a pharmacological chaperone to up-regulate human alpha4beta2 acetylcholine receptors. *Molecular pharmacology* **68**(6): 1839-1851.

Kuryatov A, Onksen J and Lindstrom J (2008) Roles of accessory subunits in alpha4beta2(*) nicotinic receptors. *Molecular pharmacology* **74**(1): 132-143.

Lammel S, Lim BK, Ran C, Huang KW, Betley MJ, Tye KM, Deisseroth K and Malenka RC (2012) Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature* **491**(7423): 212-217.

Lansdell SJ, Gee VJ, Harkness PC, Doward AI, Baker ER, Gibb AJ and Millar NS (2005) RIC-3 enhances functional expression of multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes in mammalian cells. *Molecular pharmacology* **68**(5): 1431-1438.

le Novere N, Zoli M, Lena C, Ferrari R, Picciotto MR, Merlo-Pich E and Changeux JP (1999) Involvement of alpha6 nicotinic receptor subunit in nicotine-elicited locomotion, demonstrated by *in vivo* antisense oligonucleotide infusion. *Neuroreport* **10**(12): 2497-2501.

Lena C and Changeux JP (1998) Allosteric nicotinic receptors, human pathologies. *Journal of physiology, Paris* **92**(2): 63-74.

Lewis TM, Harkness PC, Sivilotti LG, Colquhoun D and Millar NS (1997) The ion channel properties of a rat recombinant neuronal nicotinic receptor are dependent on the host cell type. *The Journal of physiology* **505 (Pt 2)**: 299-306.

Li Q, Yan H, Wilson WA and Swartzwelder HS (2010) Modulation of NMDA and AMPA-mediated synaptic transmission by CB1 receptors in frontal cortical pyramidal cells. *Brain research* **1342**: 127-137.

Liao D, Hessler NA and Malinow R (1995) Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* **375**(6530): 400-404.

- Liechti ME and Markou A (2008) Role of the glutamatergic system in nicotine dependence : implications for the discovery and development of new pharmacological smoking cessation therapies. *CNS drugs* **22**(9): 705-724.
- Lisman J, Yasuda R and Raghavachari S (2012) Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nature reviews Neuroscience* **13**(3): 169-182.
- Liu Q, Huang Y, Xue F, Simard A, DeChon J, Li G, Zhang J, Lucero L, Wang M, Sierks M, Hu G, Chang Y, Lukas RJ and Wu J (2009) A novel nicotinic acetylcholine receptor subtype in basal forebrain cholinergic neurons with high sensitivity to amyloid peptides. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**(4): 918-929.
- Liu SJ and Zukin RS (2007) Ca²⁺-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. *Trends in neurosciences* **30**(3): 126-134.
- Lobo DS, Souza RP, Tong RP, Casey DM, Hodgins DC, Smith GJ, Williams RJ, Schopflocher DP, Wood RT, el-Guebaly N and Kennedy JL (2010) Association of functional variants in the dopamine D2-like receptors with risk for gambling behaviour in healthy Caucasian subjects. *Biological psychology* **85**(1): 33-37.
- Lobo MK (2009) Molecular profiling of striatonigral and striatopallidal medium spiny neurons past, present, and future. *International review of neurobiology* **89**: 1-35.
- Long D, Marshall CB, Bouvignies G, Mazhab-Jafari MT, Smith MJ, Ikura M and Kay LE (2013) A Comparative CEST NMR Study of Slow Conformational Dynamics of Small GTPases Complexed with GTP and GTP Analogues. *Angewandte Chemie*.
- Lu W, Shi Y, Jackson AC, Bjorgan K, During MJ, Sprengel R, Seeburg PH and Nicoll RA (2009) Subunit composition of synaptic AMPA receptors revealed by a single-cell genetic approach. *Neuron* **62**(2): 254-268.
- Luscher C and Malenka RC (2012) NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**(6).
- Lynch G, Kessler M, Halpain S and Baudry M (1983) Biochemical effects of high-frequency synaptic activity studied with *in vitro* slices. *Federation proceedings* **42**(12): 2886-2890.

- MacDermott AB, Mayer ML, Westbrook GL, Smith SJ and Barker JL (1986) NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature* **321**(6069): 519-522.
- Madayag A, Lobner D, Kau KS, Mantsch JR, Abdulhameed O, Hearing M, Grier MD and Baker DA (2007) Repeated N-acetylcysteine administration alters plasticity-dependent effects of cocaine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**(51): 13968-13976.
- Madden DR (2002) The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nature reviews Neuroscience* **3**(2): 91-101.
- Madry C, Mesic I, Betz H and Laube B (2007) The N-terminal domains of both NR1 and NR2 subunits determine allosteric Zn²⁺ inhibition and glycine affinity of N-methyl-D-aspartate receptors. *Molecular pharmacology* **72**(6): 1535-1544.
- Makino H and Malinow R (2009) AMPA receptor incorporation into synapses during LTP: the role of lateral movement and exocytosis. *Neuron* **64**(3): 381-390.
- Malenka RC and Bear MF (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* **44**(1): 5-21.
- Malinow R and Miller JP (1986) Postsynaptic hyperpolarization during conditioning reversibly blocks induction of long-term potentiation. *Nature* **320**(6062): 529-530.
- Mameli M, Halbout B, Creton C, Engblom D, Parkitna JR, Spanagel R and Luscher C (2009) Cocaine-evoked synaptic plasticity: persistence in the VTA triggers adaptations in the NAc. *Nature neuroscience* **12**(8): 1036-1041.
- Mameli-Engvall M, Evrard A, Pons S, Maskos U, Svensson TH, Changeux JP and Faure P (2006) Hierarchical control of dopamine neuron-firing patterns by nicotinic receptors. *Neuron* **50**(6): 911-921.
- Mansvelder HD, De Rover M, McGehee DS and Brussaard AB (2003) Cholinergic modulation of dopaminergic reward areas: upstream and downstream targets of nicotine addiction. *European journal of pharmacology* **480**(1-3): 117-123.
- Mansvelder HD and McGehee DS (2002) Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction. *Journal of neurobiology* **53**(4): 606-617.

- Mao D, Perry DC, Yasuda RP, Wolfe BB and Kellar KJ (2008) The alpha4beta2alpha5 nicotinic cholinergic receptor in rat brain is resistant to up-regulation by nicotine *in vivo*. *Journal of neurochemistry* **104**(2): 446-456.
- Mao L, Yang L, Tang Q, Samdani S, Zhang G and Wang JQ (2005) The scaffold protein Homer1b/c links metabotropic glutamate receptor 5 to extracellular signal-regulated protein kinase cascades in neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**(10): 2741-2752.
- Margolis EB, Toy B, Himmels P, Morales M and Fields HL (2012) Identification of rat ventral tegmental area GABAergic neurons. *PloS one* **7**(7): e42365.
- Marks MJ, McClure-Begley TD, Whiteaker P, Salminen O, Brown RW, Cooper J, Collins AC and Lindstrom JM (2011) Increased nicotinic acetylcholine receptor protein underlies chronic nicotine-induced up-regulation of nicotinic agonist binding sites in mouse brain. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **337**(1): 187-200.
- Marks MJ, Pauly JR, Gross SD, Deneris ES, Hermans-Borgmeyer I, Heinemann SF and Collins AC (1992) Nicotine binding and nicotinic receptor subunit RNA after chronic nicotine treatment. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **12**(7): 2765-2784.
- Maze I, Covington HE, 3rd, Dietz DM, LaPlant Q, Renthal W, Russo SJ, Mechanic M, Mouzon E, Neve RL, Haggarty SJ, Ren Y, Sampath SC, Hurd YL, Greengard P, Tarakhovskiy A, Schaefer A and Nestler EJ (2010) Essential role of the histone methyltransferase G9a in cocaine-induced plasticity. *Science* **327**(5962): 213-216.
- Mazzo F, Pistillo F, Grazioso G, Clementi F, Borgese N, Gotti C and Colombo SF (2013) Nicotine-modulated subunit stoichiometry affects stability and trafficking of alpha3beta4 nicotinic receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **33**(30): 12316-12328.
- McClung CA, Ulery PG, Perrotti LI, Zachariou V, Berton O and Nestler EJ (2004) DeltaFosB: a molecular switch for long-term adaptation in the brain. *Brain research Molecular brain research* **132**(2): 146-154.
- McCutcheon JE, Ebner SR, Loriaux AL and Roitman MF (2012) Encoding of aversion by dopamine and the nucleus accumbens. *Frontiers in neuroscience* **6**: 137.

- Miguens M, Del Olmo N, Higuera-Matas A, Torres I, Garcia-Lecumberri C and Ambrosio E (2008) Glutamate and aspartate levels in the nucleus accumbens during cocaine self-administration and extinction: a time course microdialysis study. *Psychopharmacology* **196**(2): 303-313.
- Millar NS and Gotti C (2009) Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* **56**(1): 237-246.
- Millar NS and Harkness PC (2008) Assembly and trafficking of nicotinic acetylcholine receptors (Review). *Molecular membrane biology* **25**(4): 279-292.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B and Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* **12**(3): 529-540.
- Moretti M, Mugnaini M, Tessari M, Zoli M, Gaimarri A, Manfredi I, Pistillo F, Clementi F and Gotti C (2010) A comparative study of the effects of the intravenous self-administration or subcutaneous minipump infusion of nicotine on the expression of brain neuronal nicotinic receptor subtypes. *Molecular pharmacology* **78**(2): 287-296.
- Moretti M, Vailati S, Zoli M, Lippi G, Riganti L, Longhi R, Viegi A, Clementi F and Gotti C (2004) Nicotinic acetylcholine receptor subtypes expression during rat retina development and their regulation by visual experience. *Molecular pharmacology* **66**(1): 85-96.
- Mori H and Mishina M (1995) Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology* **34**(10): 1219-1237.
- Moroni M and Bermudez I (2006) Stoichiometry and pharmacology of two human alpha4beta2 nicotinic receptor types. *Journal of molecular neuroscience : MN* **30**(1-2): 95-96.
- Moult PR, Correa SA, Collingridge GL, Fitzjohn SM and Bashir ZI (2008) Co-activation of p38 mitogen-activated protein kinase and protein tyrosine phosphatase underlies metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *The Journal of physiology* **586**(10): 2499-2510.
- Moutin E, Raynaud F, Roger J, Pellegrino E, Homburger V, Bertaso F, Ollendorff V, Bockaert J, Fagni L and Perroy J (2012) Dynamic remodeling of scaffold

- interactions in dendritic spines controls synaptic excitability. *The Journal of cell biology* **198**(2): 251-263.
- Nashmi R, Xiao C, Deshpande P, McKinney S, Grady SR, Whiteaker P, Huang Q, McClure-Begley T, Lindstrom JM, Labarca C, Collins AC, Marks MJ and Lester HA (2007) Chronic nicotine cell specifically upregulates functional alpha 4* nicotinic receptors: basis for both tolerance in midbrain and enhanced long-term potentiation in perforant path. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**(31): 8202-8218.
- Nelson ME, Kuryatov A, Choi CH, Zhou Y and Lindstrom J (2003) Alternate stoichiometries of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors. *Molecular pharmacology* **63**(2): 332-341.
- Niswender CM and Conn PJ (2010) Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annual review of pharmacology and toxicology* **50**: 295-322.
- Owesson-White CA, Roitman MF, Sombers LA, Belle AM, Keithley RB, Peele JL, Carelli RM and Wightman RM (2012) Sources contributing to the average extracellular concentration of dopamine in the nucleus accumbens. *Journal of neurochemistry* **121**(2): 252-262.
- Paoletti P (2011) Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *The European journal of neuroscience* **33**(8): 1351-1365.
- Pauly JR, Marks MJ, Robinson SF, van de Kamp JL and Collins AC (1996) Chronic nicotine and mecamylamine treatment increase brain nicotinic receptor binding without changing alpha 4 or beta 2 mRNA levels. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **278**(1): 361-369.
- Peng X, Gerzanich V, Anand R, Wang F and Lindstrom J (1997) Chronic nicotine treatment up-regulates alpha3 and alpha7 acetylcholine receptor subtypes expressed by the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Molecular pharmacology* **51**(5): 776-784.
- Penton RE and Lester RA (2009) Cellular events in nicotine addiction. *Seminars in cell & developmental biology* **20**(4): 418-431.

- Phillips AG, Ahn S and Howland JG (2003) Amygdalar control of the mesocorticolimbic dopamine system: parallel pathways to motivated behavior. *Neuroscience and biobehavioral reviews* **27**(6): 543-554.
- Picciotto MR, Caldarone BJ, Brunzell DH, Zachariou V, Stevens TR and King SL (2001) Neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit knockout mice: physiological and behavioral phenotypes and possible clinical implications. *Pharmacology & therapeutics* **92**(2-3): 89-108.
- Picciotto MR, Zoli M, Lena C, Bessis A, Lallemant Y, Le Novere N, Vincent P, Pich EM, Brulet P and Changeux JP (1995) Abnormal avoidance learning in mice lacking functional high-affinity nicotine receptor in the brain. *Nature* **374**(6517): 65-67.
- Pober JM (2013) Addiction is Not a Natural Kind. *Frontiers in psychiatry* **4**: 123.
- Pons S, Fattore L, Cossu G, Tolu S, Porcu E, McIntosh JM, Changeux JP, Maskos U and Fratta W (2008) Crucial role of alpha4 and alpha6 nicotinic acetylcholine receptor subunits from ventral tegmental area in systemic nicotine self-administration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**(47): 12318-12327.
- Pons S, Sallette J, Bourgeois JP, Taly A, Changeux JP and Devillers-Thiery A (2004) Critical role of the C-terminal segment in the maturation and export to the cell surface of the homopentameric alpha 7-5HT3A receptor. *The European journal of neuroscience* **20**(8): 2022-2030.
- Renda A and Nashmi R (2012) Spectral confocal imaging of fluorescently tagged nicotinic receptors in knock-in mice with chronic nicotine administration. *Journal of visualized experiments : JoVE*(60).
- Reynolds SM and Berridge KC (2008) Emotional environments retune the valence of appetitive versus fearful functions in nucleus accumbens. *Nature neuroscience* **11**(4): 423-425.
- Rezvani K, Teng Y and De Biasi M (2010) The ubiquitin-proteasome system regulates the stability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of molecular neuroscience : MN* **40**(1-2): 177-184.
- Rezvani K, Teng Y, Pan Y, Dani JA, Lindstrom J, Garcia Gras EA, McIntosh JM and De Biasi M (2009) UBXD4, a UBX-containing protein, regulates the cell surface number

- and stability of alpha3-containing nicotinic acetylcholine receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**(21): 6883-6896.
- Richard GR, Titiz A, Tyler A, Holmes GL, Scott RC and Lenck-Santini PP (2013) Speed modulation of hippocampal theta frequency correlates with spatial memory performance. *Hippocampus* **23**(12): 1269-1279.
- Richard JM and Berridge KC (2011) Nucleus accumbens dopamine/glutamate interaction switches modes to generate desire versus dread: D(1) alone for appetitive eating but D(1) and D(2) together for fear. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**(36): 12866-12879.
- Richard JM and Berridge KC (2013) Prefrontal cortex modulates desire and dread generated by nucleus accumbens glutamate disruption. *Biological psychiatry* **73**(4): 360-370.
- Riganti L, Matteoni C, Di Angelantonio S, Nistri A, Gaimarri A, Sparatore F, Canu-Boido C, Clementi F and Gotti C (2005) Long-term exposure to the new nicotinic antagonist 1,2-bisN-cytisinylethane upregulates nicotinic receptor subtypes of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *British journal of pharmacology* **146**(8): 1096-1109.
- Riou M, Stroebel D, Edwardson JM and Paoletti P (2012) An alternating GluN1-2-1-2 subunit arrangement in mature NMDA receptors. *PloS one* **7**(4): e35134.
- Robison AJ and Nestler EJ (2011) Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nature reviews Neuroscience* **12**(11): 623-637.
- Sacktor TC (2008) PKMzeta, LTP maintenance, and the dynamic molecular biology of memory storage. *Progress in brain research* **169**: 27-40.
- Sallete J, Bohler S, Benoit P, Soudant M, Pons S, Le Novere N, Changeux JP and Corringer PJ (2004) An extracellular protein microdomain controls up-regulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by nicotine. *The Journal of biological chemistry* **279**(18): 18767-18775.
- Sanders D, Simkiss D, Braddy D, Baccus S, Morton T, Cannady R, Weaver N, Rose JE and Levin ED (2010) Nicotinic receptors in the habenula: importance for memory. *Neuroscience* **166**(2): 386-390.

- Schultz W (2002) Getting formal with dopamine and reward. *Neuron* **36**(2): 241-263.
- Seeburg PH (1993) The TINS/TIPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends in neurosciences* **16**(9): 359-365.
- Seeburg PH, Higuchi M and Sprengel R (1998) RNA editing of brain glutamate receptor channels: mechanism and physiology. *Brain research Brain research reviews* **26**(2-3): 217-229.
- Shen HW, Toda S, Moussawi K, Bouknight A, Zahm DS and Kalivas PW (2009) Altered dendritic spine plasticity in cocaine-withdrawn rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**(9): 2876-2884.
- Smith Y, Wichmann T and DeLong MR (2013) Corticostriatal and mesocortical dopamine systems: do species differences matter? *Nature reviews Neuroscience*.
- Sobolevsky AI, Rosconi MP and Gouaux E (2009) X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* **462**(7274): 745-756.
- Srinivasan R, Pantoja R, Moss FJ, Mackey ED, Son CD, Miwa J and Lester HA (2011) Nicotine up-regulates alpha4beta2 nicotinic receptors and ER exit sites via stoichiometry-dependent chaperoning. *The Journal of general physiology* **137**(1): 59-79.
- Sun X, Milovanovic M, Zhao Y and Wolf ME (2008) Acute and chronic dopamine receptor stimulation modulates AMPA receptor trafficking in nucleus accumbens neurons cocultured with prefrontal cortex neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**(16): 4216-4230.
- Swanson LW (1982) The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain research bulletin* **9**(1-6): 321-353.
- Takarada T, Nakamichi N, Kitajima S, Fukumori R, Nakazato R, Le NQ, Kim YH, Fujikawa K, Kou M and Yoneda Y (2012) Promoted neuronal differentiation after activation of alpha4/beta2 nicotinic acetylcholine receptors in undifferentiated neural progenitors. *PloS one* **7**(10): e46177.
- Talukder I, Borker P and Wollmuth LP (2010) Specific sites within the ligand-binding domain and ion channel linkers modulate NMDA receptor gating. *The Journal of*

- neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**(35): 11792-11804.
- Tolu S, Avale ME, Nakatani H, Pons S, Parnaudeau S, Tronche F, Vogt A, Monyer H, Vogel R, de Chaumont F, Olivo-Marin JC, Changeux JP and Maskos U (2010) A versatile system for the neuronal subtype specific expression of lentiviral vectors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **24**(3): 723-730.
- Unwin N (2005) Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4A resolution. *Journal of molecular biology* **346**(4): 967-989.
- Walsh H, Govind AP, Mastro R, Hoda JC, Bertrand D, Vallejo Y and Green WN (2008) Up-regulation of nicotinic receptors by nicotine varies with receptor subtype. *The Journal of biological chemistry* **283**(10): 6022-6032.
- Walters CL, Brown S, Changeux JP, Martin B and Damaj MI (2006) The beta2 but not alpha7 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor is required for nicotine-conditioned place preference in mice. *Psychopharmacology* **184**(3-4): 339-344.
- Wang F, Chen H and Sharp BM (2008) Neuroadaptive changes in the mesocortical glutamatergic system during chronic nicotine self-administration and after extinction in rats. *Journal of neurochemistry* **106**(2): 943-956.
- Wang F, Nelson ME, Kuryatov A, Olale F, Cooper J, Keyser K and Lindstrom J (1998) Chronic nicotine treatment up-regulates human alpha3 beta2 but not alpha3 beta4 acetylcholine receptors stably transfected in human embryonic kidney cells. *The Journal of biological chemistry* **273**(44): 28721-28732.
- Wang JM, Zhang L, Yao Y, Viroonchatapan N, Rothe E and Wang ZZ (2002) A transmembrane motif governs the surface trafficking of nicotinic acetylcholine receptors. *Nature neuroscience* **5**(10): 963-970.
- Wang LP, Li F, Shen X and Tsien JZ (2010) Conditional knockout of NMDA receptors in dopamine neurons prevents nicotine-conditioned place preference. *PloS one* **5**(1): e8616.
- Wang SJ and Gean PW (1999) Long-term depression of excitatory synaptic transmission in the rat amygdala. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**(24): 10656-10663.

- Warr O, Takahashi M and Attwell D (1999) Modulation of extracellular glutamate concentration in rat brain slices by cystine-glutamate exchange. *The Journal of physiology* **514 (Pt 3)**: 783-793.
- Watkins JC (1972) Metabolic regulation in the release and action of excitatory and inhibitory amino acids in the central nervous system. *Biochemical Society symposium*(36): 33-47.
- Watkins JC and Jane DE (2006) The glutamate story. *British journal of pharmacology* **147 Suppl 1**: S100-108.
- Wilbrecht L, Holtmaat A, Wright N, Fox K and Svoboda K (2010) Structural plasticity underlies experience-dependent functional plasticity of cortical circuits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**(14): 4927-4932.
- Xiao Y and Kellar KJ (2004) The comparative pharmacology and up-regulation of rat neuronal nicotinic receptor subtype binding sites stably expressed in transfected mammalian cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **310**(1): 98-107.
- Xu W, Orr-Urtreger A, Nigro F, Gelber S, Sutcliffe CB, Armstrong D, Patrick JW, Role LW, Beaudet AL and De Biasi M (1999) Multiorgan autonomic dysfunction in mice lacking the beta2 and the beta4 subunits of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**(21): 9298-9305.
- Yamaguchi T, Sheen W and Morales M (2007) Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area. *The European journal of neuroscience* **25**(1): 106-118.
- Yao WD, Gainetdinov RR, Arbuckle MI, Sotnikova TD, Cyr M, Beaulieu JM, Torres GE, Grant SG and Caron MG (2004) Identification of PSD-95 as a regulator of dopamine-mediated synaptic and behavioral plasticity. *Neuron* **41**(4): 625-638.
- Zoli M, Moretti M, Zanardi A, McIntosh JM, Clementi F and Gotti C (2002) Identification of the nicotinic receptor subtypes expressed on dopaminergic terminals in the rat striatum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**(20): 8785-8789.