



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI

DIPARTIMENTO DI NEUROSCIENZE e

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA SPERIMENTALE

Scuola di Dottorato in Neuroscienze e Scienze Morfologiche

Corso di Dottorato in Neuroscienze

**RUOLO DELLE SUBUNITA' DEL RECETTORE
NICOTINICO NELLA DIPENDENZA DA NICOTINA**

Area 05 - Scienze Biologiche - SSD BIO/14 Farmacologia

Coordinatore e Tutor del Dottorato:

Prof. Walter Fratta

Dottorando:

Gregorio Cossu

Direttore della scuola:

Prof. Giovanni Biggio

XX° CICLO (2004 – 2007)

INDICE

INTRODUZIONE	pag. 4
Il recettore nicotinico	pag. 5
Localizzazione anatomica del recettore nicotinico nel cervello	pag. 9
Sottotipi recettoriali nei circuiti centrali di gratificazione	pag. 10
Substrato neuroanatomico della nicotina	pag. 12
Premesse dello studio	pag. 16
Obiettivo dello studio	pag. 19

MATERIALI E METODI

Animali	pag. 20
Sostanze utilizzate	pag. 21
Il vettore lentivirale	pag. 21
Costruzione e produzione del vettore	pag. 24

AUTOSOMMINISTRAZIONE ENDOVENOSA ACUTA DI NICOTINA

Apparato sperimentale	pag. 25
Procedura sperimentale	pag. 27
Analisi statistica	pag. 28

RISULTATI

1) Curva dose-risposta alla nicotina in topi C57BL/6	pag. 29
2) Autosomministrazione di nicotina in topi β 2-KO	pag. 33
3) Autosomministrazione di nicotina in topi α 4-KO	pag. 35
4) Autosomministrazione di nicotina in topi α 6-KO	pag. 37
5) Autosomministrazione di nicotina in topi α 7-KO	pag. 39
6) Autosomministrazione di nicotina in topi β 2-KO con la subunità β 2 ri-espressa selettivamente nella VTA	pag. 41
7) Autosomministrazione di nicotina in topi β 2-KO con la subunità β 2 ri-espressa selettivamente nella SN.....	pag. 43
8) Autosomministrazione di nicotina in topi α 4-KO con la subunità β 2 ri-espressa selettivamente nella VTA	pag. 45

DISCUSSIONE	pag. 47
--------------------------	---------

CONCLUSIONI	pag. 51
--------------------------	---------

BIBLIOGRAFIA	pag. 52
---------------------------	---------

INTRODUZIONE

Il fumo di tabacco è probabilmente la forma di abuso di sostanza più antica e diffusa nel mondo. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha stimato in oltre 5 milioni il numero di morti annuali dovuti alle conseguenze dell'uso di tabacco.

Identificare i meccanismi che stanno alla base delle proprietà rinforzanti della nicotina è quindi una priorità che richiede lo sviluppo di nuovi protocolli sperimentali *in vivo*.

La nicotina, di formula generale $C_{10}H_{14}N_2$, è una sostanza dotata di forte lipofilia e ciò le consente, indipendentemente dalla via di assunzione, di raggiungere rapidamente il Sistema Nervoso Centrale (SNC) a livello del quale esplica le sue funzioni eccitatorie. E' in grado di agire sulla termoregolazione, inducendo ipotermia nell'animale da laboratorio, a livello del sistema cardiocircolatorio aumenta la frequenza cardiaca e la pressione arteriosa con vasocostrizione dei piccoli vasi, induce inoltre dilatazione dei piccoli bronchi, diminuzione della motilità gastrointestinale, rallentamento della sintesi di glicogeno e aumento degli acidi grassi liberi nel sangue. Le vie cataboliche che quest'alcaloide può percorrere sono diverse, con formazione di differenti prodotti intermedi, dotati anch'essi di attività stimolatoria,

come la cotinina. La nicotina agisce stimolando specifici recettori presenti sulla superficie delle cellule, i recettori colinergici, che riconoscono come neurotrasmettitore endogeno l'acetilcolina (ACh). La nicotina, similmente alle altre sostanze comunemente abusate dall'uomo, attiva i circuiti di gratificazione cerebrali mesolimbici, stimolando la trasmissione dopaminergica; ed è ormai definitivamente accertato che la nicotina è una sostanza psicoattiva in grado di dare dipendenza al pari delle altre sostanze d'abuso.

Lo studio della funzionalità delle subunità del recettore nicotinic centrale tramite metodiche farmacologiche comportamentali è lo scopo di questo lavoro.

Il recettore nicotinic

La nicotina esplica i suoi effetti centrali attivando i recettori nicotinici (nACh) ionotropici (*fig. 1*), pentamerici, permeabili agli ioni Ca^{++} , K^+ e Na^+ , il cui ligando endogeno è l'acetilcolina (ACh) (Kandel 1998).

RECCETTORE NICOTINICO

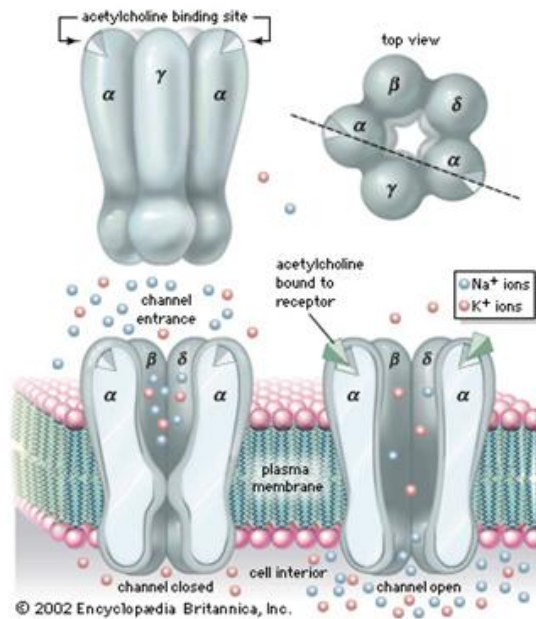


Fig. 1. Il recettore nicotinic

Da: Encyclopædia Britannica online, Inc.

Tali recettori si distinguono in recettori nACh muscolari e neuronali (fig. 2) e sono distribuiti sia a livello periferico, nelle giunzioni neuromuscolari, nei gangli e nelle cellule cromaffini, che nel SNC (Rang et al. 1998).

RECETTORE NICOTINICO NEURONALE

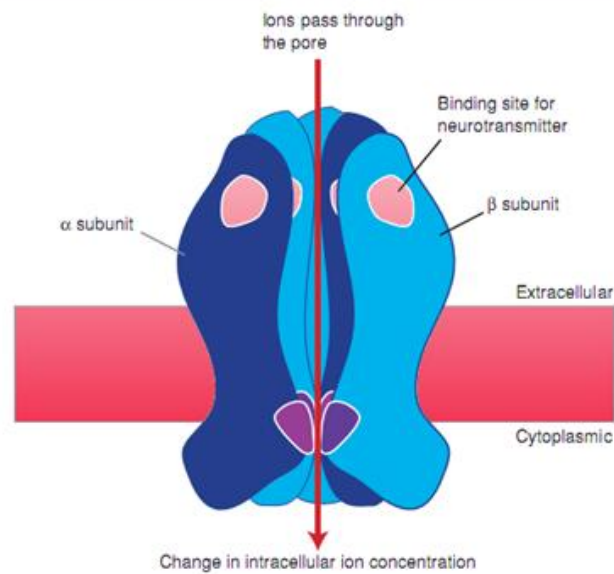


Fig. 2. Recettore nicotinic neuronale

Da: Expert Reviews in Molecular Medicine; Cambridge University Press, 1999

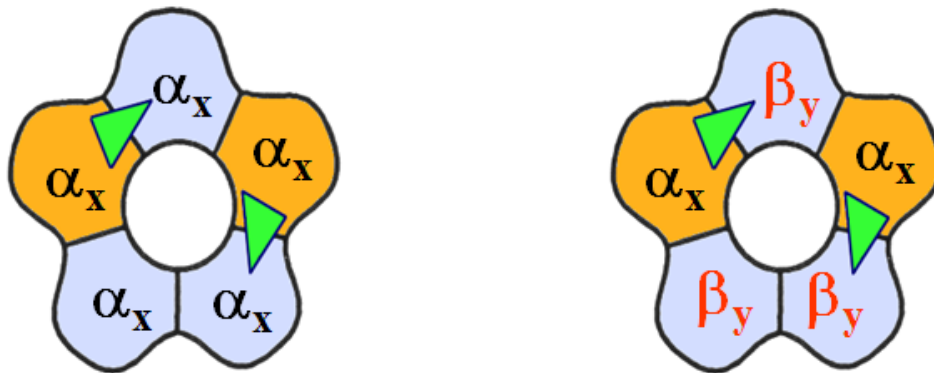
Nel Sistema Nervoso Centrale (SNC) il recettore nACh è costituito dall'assemblamento di 5 subunità: al momento sono state individuate 2 subunità per il recettore nicotinic neuronale, la subunità alfa (α) presente in 9 diverse isoforme (indicate come $\alpha 2$, $\alpha 3$... $\alpha 10$), e la subunità beta (β) con 3 diverse isoforme, da $\beta 2$ a $\beta 4$ (fig. 3).

Le possibili combinazioni tra le diverse isoforme dei due tipi di subunità danno luogo a molteplici tipologie di recettori nicotinici, che possono essere *omologhi* se formati da un solo tipo di subunità, oppure *eterologhi*, se formati dalla combinazione di entrambe. Tuttavia, solo di

recente si è cominciato a delineare il ruolo fisiologico di queste subunità, grazie soprattutto alla creazione di diverse linee di animali transgenici.

RECETTORI NICOTINICI CENTRALI

12 subunità: α_2 - α_{10} e β_2 - β_4



Modello di recettori nACh omologhi ed eterologhi

Fig. 3. Sottotipi del recettore nicotinico centrale

In questi ultimi anni, la ricerca scientifica ha rivolto particolare attenzione agli effetti centrali indotti dalla nicotina e quindi anche al suo potenziale d'abuso. Sono ormai numerosi gli studi che dimostrano la capacità di questa sostanza di fungere da rinforzo positivo sia nell'uomo che nell'animale di laboratorio, e di indurre dipendenza fisica oltre che psicologica (Hughes 1988).

Localizzazione anatomica del recettore nicotinic nel cervello

Il recettore nicotinic è ampiamente rappresentato nelle varie aree del SNC (*fig. 4*), dove media specifici effetti della nicotina. Ad esempio, i recettori nACh nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo sembrano essere coinvolti negli effetti mnemonici della nicotina, mentre quelli presenti nel nucleo magnus del rafe mediano gli effetti antinocicettivi di questa sostanza. I recettori nACh sono ampiamente rappresentati anche sui neuroni dopaminergici localizzati nei circuiti centrali di gratificazione, in quell'insieme cioè di aree cerebrali denominate "sistema mesolimbico" deputate alla mediazione degli effetti di rinforzo positivo, e quindi "gratificanti", della nicotina e della maggior parte delle altre sostanze d'abuso.

IL RECETTORE NICOTINICO E' AMPIAMENTE RAPPRESENTATO IN VARIE AREE DEL SNC

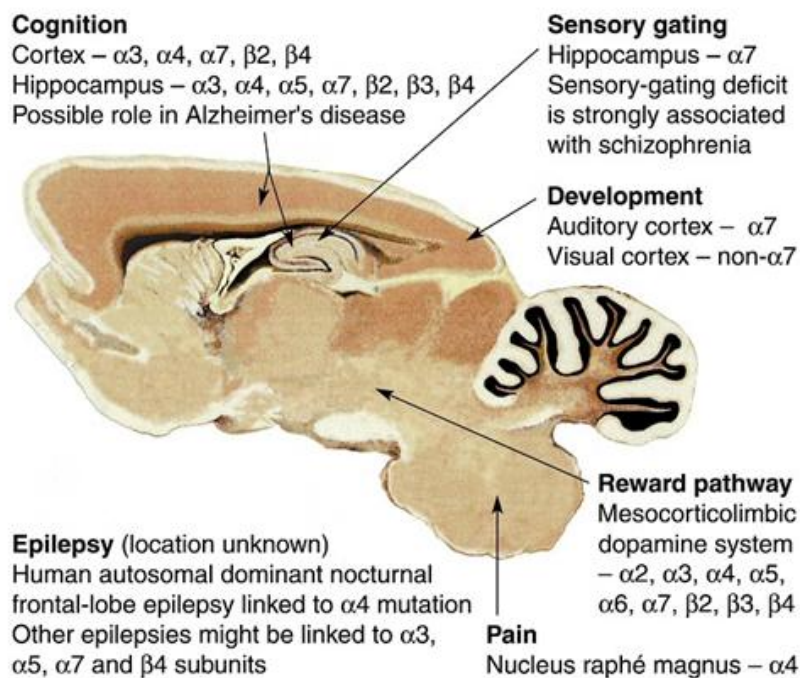


Fig. 4. Localizzazione dei vari sottotipi di recettori nicotinici centrali

Da: Jones et al. 1999 - J Pharmacol Exp Ther 288, 188-97

Sottotipi recettoriali nei circuiti centrali di gratificazione

Sebbene sia stato dimostrato che ciascuna delle subunità $\alpha 2$, $\alpha 3$ o $\alpha 4$ in combinazione con le subunità $\beta 2$ o $\beta 3$ possano formare recettori pentamerici funzionali, da numerose evidenze sperimentali si ipotizza che i recettori nicotinici maggiormente implicati negli effetti gratificanti e nella dipendenza da nicotina siano il recettore eteromero $\alpha 4\beta 2$ (Shoaib et al. 2002) e quello omomero $\alpha 7$ (fig. 5).

IL RECETTORE NICOTINICO ETEROMERO ED OMOMERO



- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Alta affinità (nM)• Si desensibilizza lentamente• Agonisti selettivi: SIB-1765F• Antagonisti selettivi: DHBE | <ul style="list-style-type: none">• Bassa affinità (μM)• Rapida attivazione e desensibilizzazione• Agonisti selettivi: AR-R 17779, DMAC• Antagonisti selettivi: αBTX, MLA |
|---|---|

Fig. 5. Sottotipi recettoriali eteromeri $\alpha_4\beta_2$ ed omomeri α_7

Ciascuno di questi 2 tipi di recettori nicotinici mostra un distinto profilo farmacologico, avendo la nicotina un'affinità nanomolare (nM) per il recettore $\alpha_4\beta_2$, il quale si desensibilizza in tempi relativamente lunghi, ed un'affinità micromolare (μM) invece, per il recettore α_7 , il quale tipicamente si desensibilizza piuttosto rapidamente dopo la sua attivazione (Wooltorton et al. 2003). E' importante notare però come concentrazioni basse di nicotina, come quelle che si ottengono dal fumo di tabacco, non desensibilizzano in maniera significativa il recettore α_7 .

Ulteriori distinzioni possono essere fatte poi in base alle potenze relative degli antagonisti nei confronti dei due tipi di recettori nACh, in quanto la di-idro-beta-eritroidina (DH β E) è ad esempio un antagonista che mostra una selettività 100 volte superiore per il recettore $\alpha_4\beta_2$ piuttosto che per l' α_7 , mentre l'alfa-bungaro-tossina (α BTX) e la metil-licaconitina (MLA) mostrano una spiccata selettività per l' α_7 .

Come si può facilmente immaginare vi è un notevole interesse nell'identificazione dei ruoli funzionali di ciascuna subunità recettoriale dovuta soprattutto all'ampio spettro di effetti che la nicotina esercita sul comportamento.

Substrato neuroanatomico della nicotina

La nicotina agisce con elevata potenza sul suo recettore al quale si lega con grande affinità. Tra i molteplici effetti che la stimolazione del recettore nACh comporta vi è l'attivazione della trasmissione dopaminergica in diverse aree cerebrali (*fig. 6*). Similmente ad altre sostanze comunemente abusate dall'uomo (es. cocaina), infatti, anche la nicotina attiva i circuiti centrali di gratificazione che comprendono varie aree mesolimbiche, quali l'area ventrale del tegmento (VTA) ed il nucleo accumbens (NAc).

SCHEMA DEI CIRCUITI CEREBRALI DI GRATIFICAZIONE

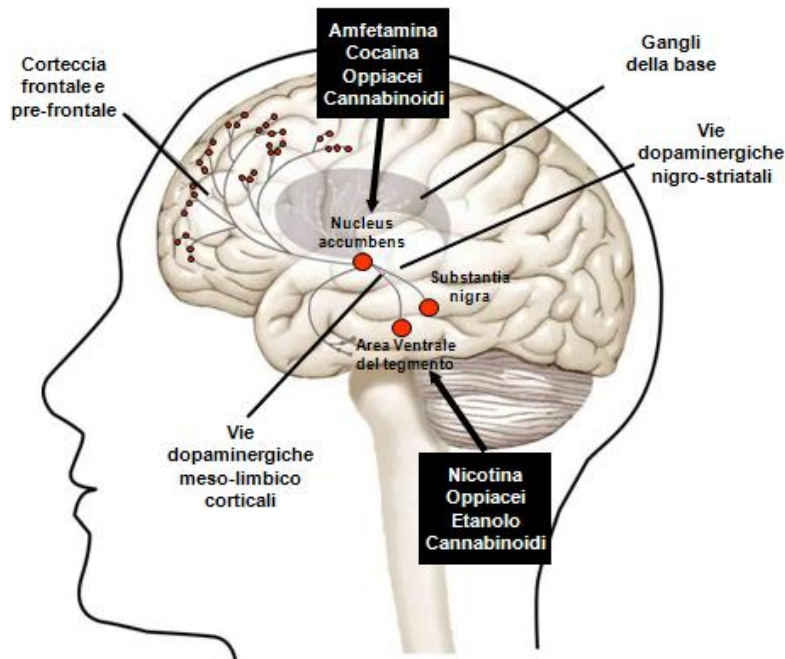


Fig. 6. Schema dei circuiti cerebrali di gratificazione

Nella VTA risiedono i corpi cellulari dei neuroni dopaminergici che proiettano le loro diramazioni verso diverse aree limbiche, quali il NAc, il tubercolo olfattorio, la corteccia prefrontale, l'amigdala ed il setto (Koob 1992). Il NAc funge da interfaccia tra il sistema mesolimbico, deputato all'elaborazione delle informazioni emozionali, ed il sistema motorio extrapiramidale, che gestisce l'attività motoria motivata (Mogenson et al. 1980; Le Moal e Simon 1991). La corteccia, l'amigdala e l'ippocampo assolvono invece funzioni modulatorie sul NAc.

E' ormai universalmente accettato che il meccanismo comune attraverso cui tutte le sostanze d'abuso interferiscono sui circuiti motivazionali sia

l'aumento del rilascio di dopamina (DA) nel NAc: la nicotina è in grado di esercitare quest'effetto sia *in vitro* (Rowel et al. 1987) che *in vivo* (Imperato et al. 1986; Corrigall et al. 1992).

Il coinvolgimento del sistema dopaminergico mesolimbico nell'effetto gratificante indotto dalla nicotina è stato dimostrato anche tramite lesioni del NAc mediante la 6-idrossidopamina. Negli animali lesionati è stata osservata infatti sia una riduzione dell'iperattività motoria (Clarke et al. 1988) che del comportamento di autosomministrazione indotto dalla nicotina nel ratto (Singer et al. 1982).

Inoltre, in soggetti con precedenti esperienze d'abuso di farmaci, l'assunzione di nicotina per via endovenosa induce effetti facilmente confondibili con quelli prodotti dalla cocaina (Henningfield et al. 1983).

L'attivazione del sistema dopaminergico da parte della nicotina coinvolge molteplici aree cerebrali, ciascuna delle quali è deputata ad un specifico ruolo fisiologico. Ad esempio, l'ippocampo dorsale sembra mediare gli effetti discriminativi della nicotina, mentre il nucleo mesopontino del tegmento sarebbe responsabile degli effetti antinocicettivi della nicotina (*fig. 7*). Nello schema sottostante sono illustrati i principali siti d'azione che si ritengono coinvolti nella mediazione dei vari effetti comportamentali indotti dalla nicotina.

PRINCIPALI SITI D'AZIONE DELLA NICOTINA

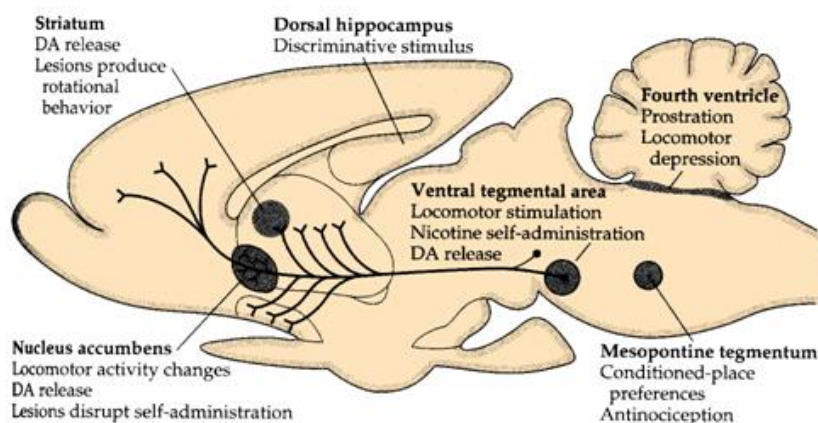


Fig. 7. Principali siti d'azione della nicotina

Da: Stoleman & Shoaib 1991, Trends Pharmacol Sci

Vi è evidenziato il sistema dopaminergico mesolimbico (in cui i neuroni proiettano dalla VTA al NAc ed alla corteccia prefrontale) il quale, così come avviene per le altre sostanze d'abuso, sembra essere il sistema di neurotrasmissione più importante nel mediare gli effetti positivi e gratificanti della nicotina (Pidoplichko et al. 1997; Picciotto e Corrigall 2002).

Le altre strutture indicate non direttamente connesse con il sistema mesolimbico mediano invece altri effetti centrali della nicotina, dalle proprietà discriminative agli effetti antinocicettivi alla modulazione dell'attività motoria.

Premesse dello studio

Recentemente sono state create diverse linee di animali transgenici (Picciotto et al. 1999; Champtiaux et al. 2003) che presentano una totale assenza di specifiche subunità del recettore nicotinic nACh (animali *knockOUT*) oppure presentano specifiche modificazioni di tali subunità.

L'utilizzo di tali animali ha permesso un notevole passo avanti nella identificazione dei specifici sottotipi recettoriali responsabili dei vari effetti della nicotina (*fig. 8*).

RUOLO FISILOGICO DELLE DIVERSE SUBUNITA' DEL RECETTORE NICOTINICO

β_2	β_4	α_4	α_6
Modula l'autosomministrazione endovenosa di nicotina ed il rilascio di DA nel Nac (Picciotto et al. 1999)	Modula la sindrome d'astinenza da nicotina (Salas et al. 2004)	Modula l'attività motoria spontanea (LaBarca et al. 2001)	Modula l'iperattività motoria indotta da nicotina (Le Novere et al. 1999)

Fig. 8. Ipotetico ruolo fisiologico di diverse subunità del recettore nicotinic

Topi privi della subunità β_2 (β_2 -KO), ad esempio, mostrano una ridotta assunzione spontanea di nicotina, così come una ridotta attività motoria e neurochimica.

Ed è stato proprio grazie a questi animali transgenici che si è cominciato a delineare il ruolo fisiologico di ciascuna subunità (Jones et al. 1999; Cordero-Erausquin et al. 2000; Grottick et al. 2000). Per la subunità β_4 si è evidenziato ad esempio un ruolo nella modulazione dei sintomi di astinenza da nicotina, mentre le subunità α_4 e α_6 sembrano essere maggiormente coinvolte negli effetti motori indotti da nicotina.

Recentemente in un lavoro apparso nell'estate 2005 sulla rivista *Nature* (Maskos et al. 2005) è stato dimostrato come la riespressione della subunità β_2 del recettore nACh selettivamente nella VTA di topi β_2 -KO ripristina prontamente le proprietà elettrofisiologiche e neurochimiche dei neuroni dopaminergici nella suddetta area cerebrale (*fig. 9*).

Infatti, in animali β_2 -KO con la sub-unità β_2 selettivamente ri-espressa nella VTA (*VEC*) si osserva un aumento significativo nell'attività di scarica dei neuroni dopaminergici nella VTA ed un aumentato rilascio di DA nel NAc, effetti tipicamente osservati in animali normali e nel ceppo selvatico (WT), ma non in animali β_2 -KO (KO).

RIESPRIMENDO LA SUBUNITA β_2 IN VTA VIENE RIPRISTINATA LA RISPOSTA ELETTROFISIOLOGICA E NEUROCHIMICA ALLA NICOTINA

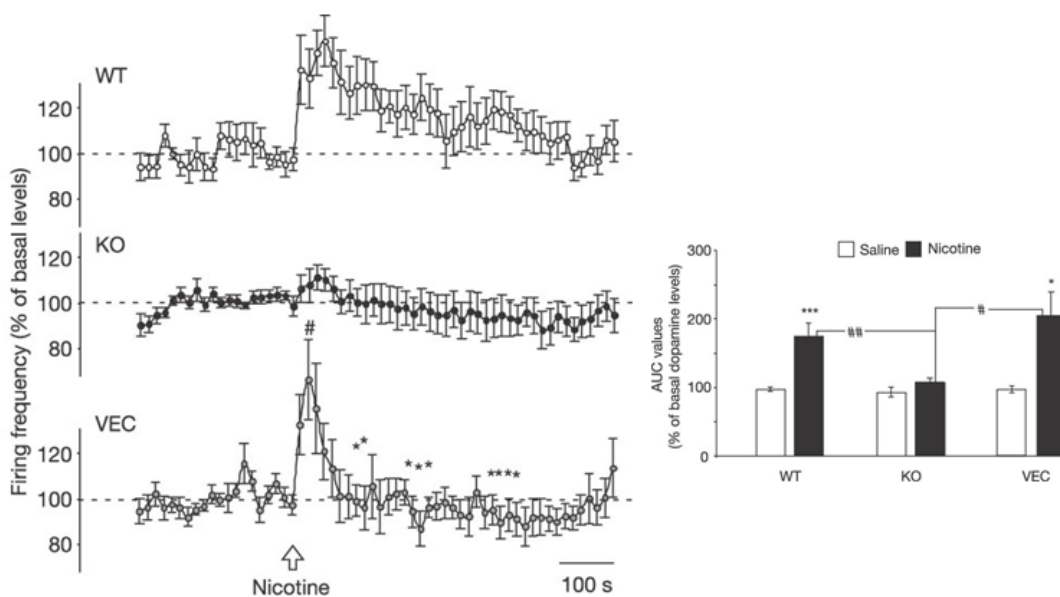


Fig. 9. La riespressione della subunità β_2 del recettore nACh selettivamente nella VTA di topi β_2 -KO ripristina prontamente le proprietà elettrofisiologiche e neurochimiche dei neuroni dopaminergici nella suddetta area cerebrale

Da: Maskos et al., Nature 2005

Obiettivo dello studio

Scopo del presente studio è stato quindi quello di fornire un correlato comportamentale agli studi elettrofisiologici e neurochimici in questi animali transgenici, al fine di individuare il ruolo delle singole subunità e le aree cerebrali coinvolte nel comportamento di autosomministrazione endovenosa acuta in animali che entrano per la prima volta in contatto con la nicotina.

A tale scopo abbiamo intrapreso una collaborazione scientifica con il gruppo francese del Prof. Changeux dell'Institut Pasteur di Parigi (Unité Récepteurs et Cognition, CNRS URA 2182) per la fornitura degli animali transgenici knockout per ciascuna delle subunità investigate, e rispettivi ceppi selvatici, e animali β_2 -KO e α_4 -KO in cui successivamente la subunità mancante è stata riespressa, mediante vettore lentivirale, in VTA o SN.

MATERIALI E METODI

Animali

Negli esperimenti di autosomministrazione endovenosa acuta abbiamo utilizzato topi maschi del ceppo C57BL/6 (Charles River, Italia) come ceppo selvatico di controllo (wild-type, WT) e topi selezionati per l'assenza totale di subunità β_2 , α_4 , α_6 , α_7 del recettore nicotinic centrale (topi β_2 -KO; α_4 -KO; α_6 -KO; α_7 -KO) del peso di 24-28 gr. Gli animali sono stati stabulati ad un ciclo di 12 ore luce/buio invertito (luce alle 07:00 p.m.) in numero di 8 per gabbia, con temperatura di 21 ± 1 °C, con un'umidità relativa del 60-65%, libero accesso a cibo ed acqua, e lasciati indisturbati per almeno 10 giorni prima dell'inizio degli esperimenti.

Come terzo gruppo sperimentale abbiamo utilizzato animali β_2 -KO e α_4 -KO mantenuti nelle medesime condizioni ambientali, in cui però tale subunità è stata successivamente ri-espressa mediante iniezione stereotassica di un vettore lentivirale nella VTA o nella SN. Dal momento del loro arrivo in stabulario, quest'ultimo gruppo di animali è stato lasciato acclimatare per almeno 2 settimane prima dell'iniezione del lentivirus per la ri-espressione delle subunità β_2 e α_4 e sono stati utilizzati sette settimane dopo la chirurgia stereotassica quando

l'espressione indotta delle subunità ha raggiunto il suo massimo livello (Maskos et al. 2005).

Tutti gli esperimenti sono stati condotti nella fase buia del ciclo, tra le 9:00 e le 12:00, nel pieno rispetto delle direttive CE per la regolamentazione dell'uso degli animali in laboratorio (n° 86/609).

Sostanze utilizzate

Negli esperimenti di autosomministrazione acuta abbiamo utilizzato la nicotina come sale bitartrato (Sigma, Milano), disciolta in soluzione fisiologica eparinata (1%). Le dosi sono espresse in mg/kg/inf per un volume d'infusione di 1 µl.

Il vettore lentivirale

I Lentivirus sono tra i virus maggiormente utilizzati come vettori per la terapia genica, ed appartengono alla grande famiglia dei Retrovirus (*Retroviridae*) il cui genoma è alternativamente costituito da RNA (nel virione completo, e quindi nella fase extracellulare) e da DNA (nella fase intracellulare). I Retrovirus si replicano attraverso un complesso ciclo riproduttivo la cui fase saliente è rappresentata dalla sintesi del genoma del virus intracellulare, a partire dall'RNA del genoma del virus infettante (*trascrizione inversa*, o retrotrascrizione), ad

opera di una DNA-polimerasi RNA-dipendente (*trascriptasi inversa*) virus-specifica.

I sistemi basati sull'espressione di Lentivirus presentano diversi vantaggi rispetto agli altri approcci di espressione transgenica *in vivo*. Innanzitutto, come tutti gli altri Retrovirus, i Lentivirus sono capaci di integrarsi stabilmente all'interno del genoma della cellula ospite. Rispetto ai sistemi di trasferimento genico non virali, quindi, hanno un'efficienza nettamente maggiore, facilitando il potenziale per l'espressione transgenica stabile a lungo tempo. Inoltre, una volta che il transgene virale si è integrato stabilmente, non si ha più l'espressione di proteine virali, che avrebbero potuto scatenare risposte immunologiche distruttive.

Ma la loro caratteristica più importante è che i Lenti-retrovirus possono infettare anche cellule non replicanti, sono in grado cioè di integrarsi all'interno del genoma di cellule che non vanno incontro a divisione cellulare: questo li rende candidati per modificare l'espressione delle cellule a differenziazione terminale (cioè all'ultimo stadio di differenziazione), come le cellule del cuore e del sistema nervoso centrale.

I vettori per l'espressione dei Lentivirus usati nel nostro studio derivano da vettori di espressione pHR' descritti per la prima volta dal

gruppo di Naldini (Naldini et al. 1996a,b), al quale sono state poi apportate alcune modificazioni. Per proteggere il vettore d'espressione è stata eliminata la regione U3 delle terminazioni lunghe ripetute le 3' o LTR (Sirven et al. 2001) rendendo così il DNA virale integrato incapace di replicazione.

Inoltre, l'abolizione dell'abilità di promoter delle terminazioni lunghe ripetute 3' LTR previene la possibile interferenza del promoter con il promoter del transgene ed aumenta l'espressione del transgene (Miyoshi et al. 1998). E' stato poi aggiunto il tratto centrale polipurinico (cPPT) e la sequenza di terminazione centrale o CTS (Charneau et al. 1992, 1994) del ceppo selvatico HIV-1, creando così il "flap" di DNA centrale di 99 paia di basi (Zennou et al. 2000).

Questa caratteristica, unica ai Lentivirus, aumenta verosimilmente l'infezione di cellule che non si dividono (es. neuroni) facilitando il trasporto del complesso di pre-integrazione attraverso i pori della membrana nucleare (piuttosto che comportare la distruzione della membrana nucleare durante la mitosi) ed aumenta in maniera significativa la trasduzione cellulare mediata dal vettore HIV di differenti tipi di cellule cerebrali (Zennou et al. 2001).

Infine, è stato aggiunto l'elemento di regolazione post-trascrizionale del virus dell'epatite B (Girones et al. 1989) per aumentare la stabilità dell'RNA e l'espressione del transgene (Zufferey et al. 1999).

Costruzione e produzione del vettore

I vettori sono stati progettati e costruiti dalla Dott.ssa Stephaniè Pons presso l'Istituto Pasteur di Parigi (Unité Récepteurs et Cognition) basandosi sul protocollo descritto da Sirven et al. (2001). L'elemento virale è stato generato tramite co-transfezione di cellule HEK-293T mediante un plasmide vettore, come descritto in precedenza da Zennou et al. (2001).

Nel seguente schema è illustrato il diagramma del vettore lentivirale transgene compreso tra le regioni LTR (*fig. 10*).

VETTORE LENTIVIRALE

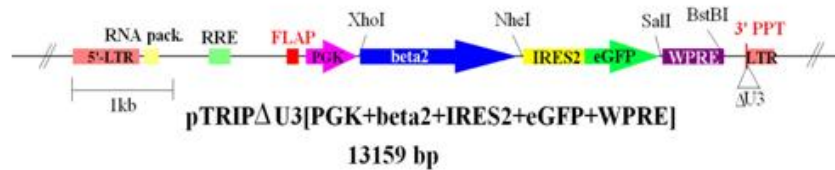


Fig. 10 Mappa del vettore di trasmissione

LTR, terminazioni lunghe ripetute; **RNA pack**, segnale di aggregazione di RNA genomico; **RRE**, elemento di risposta rev; **FLAP**, sequenza comprendente il tratto polipurinico centrale, e la sequenza di terminazione centrale; **PGK**, promoter del gene per la fosfoglicerasi chinasi del topo; **beta2**, cDNA per la subunità beta2 del recettore nicotinici del topo wild-type; **IRES2**, sequenza di ingresso ribosomiale; **eGFP**, proteina di aumentata fluorescenza verde; **WPRE**, elemento regolatore post-trascrizionale del virus dell'epatite B; **3'PPT**, tratto polipurinico 3'; **ΔU3**, delezione della porzione U3 del 3'LTR.

AUTOSOMMINISTRAZIONE ENDOVENOSA ACUTA DI NICOTINA

Apparato Sperimentale

I topi sono stati testati in coppia in identiche gabbie sperimentali (8x8x8 cm), ciascuna munita di un foro frontale provvisto di un sensore ad infrarossi. Non appena il topo interrompe il raggio introducendo il

naso nel foro, compie cioè quello che viene definito un *nose-poke* (NP), attiva una pompa ad infusione (Life Science Instruments, USA) collegata al sistema venoso dell'animale attraverso una delle vene laterali della coda. Ogni infusione immette nel circolo venoso 1 μ l di soluzione. Una fessura verticale sull'apposita parete posteriore permette di fissare all'esterno la coda dell'animale su una superficie orizzontale lasciando libero accesso alle vene laterali della coda dove viene inserito una ago a farfalla 27G, connesso attraverso un tubo di teflon ad una siringa posta nella pompa ad infusione (*fig. 11*).

APPARATO PER L'AUTOSOMMINISTRAZIONE ENDOVENOSA ACUTA NEL TOPO

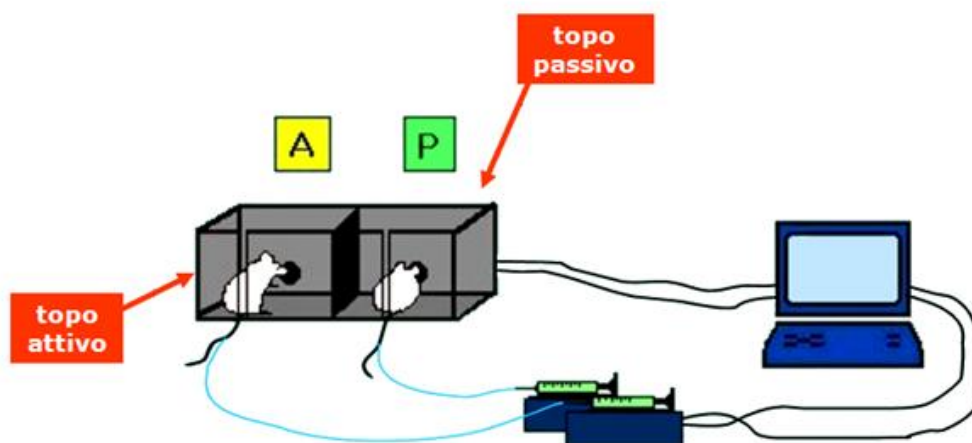


Fig. 11. Apparato per l'autosomministrazione endovenosa acuta nel topo

Procedura sperimentale

Inizialmente i topi vengono posti nelle gabbiette per un periodo di 10 minuti con la coda fissata, ma non incannulata, per valutare l'attività basale di *nose-poking* e creare così delle coppie di animali aventi un numero di NPs basale simile. Ogni coppia consta quindi di un topo attivo (A), i cui NPs azionano la pompa ad infusione inviando la nicotina nel sistema venoso di entrambi i topi, ed uno passivo (P) i cui NPs non hanno alcuna conseguenza sulla pompa. Entrambi gli animali ricevono così la stessa quantità di nicotina negli stessi intervalli di tempo, ma solo il topo attivo (A) può collegare l'infusione di nicotina alla sua attività di *nose-poking*. Il topo passivo (P) che invece riceve la nicotina indipendentemente dalla sua attività all'interno della gabbietta, viene invece utilizzato come animale di controllo in quanto consente di riscontrare eventuali effetti aspecifici del farmaco, quali ipermotilità o sedazione. Il periodo di time-out (cioè di disattivazione della risposta NP successivo ad ogni infusione) è stato fissato a 2 secondi. Le sessioni di autosomministrazione hanno durata di 30 minuti, durante i quali un apposito software (progettato e realizzato dal Sig. Pompeo Fischetti) registra il numero di NPs di entrambi i topi.

In questo modello di autosomministrazione endovenosa acuta, le eventuali proprietà gratificanti del farmaco sperimentato si valutano in

base al rapporto R ($R=A/P$) tra il numero di NPs del topo attivo (A) e quelli del topo passivo (P) per cui:

- a) se $R=1$ il farmaco non possiede effetti gratificanti o avversivi
- b) se $R>1$ il farmaco funge da rinforzo positivo
- c) se $R<1$ il farmaco possiede proprietà avversive.

Analisi statistica

La significatività statistica dei dati è stata determinata con l'Analisi della Varianza ad una via (ANOVA), seguita dal test di Newman-Keuls per una comparazione *post-hoc*.

I dati registrati nei 30 minuti di autosomministrazione nel topo sono espressi come numero totale dei NPs dei topi attivi e dei topi passivi.

Per ogni coppia è stato poi calcolato anche il valore R, dato dal rapporto tra il numero medio di NPs di ciascun topo attivo ed il numero medio di NPs del corrispondente topo passivo ad esso appaiato.

In tutti gli esperimenti, il livello di significatività è stato fissato a $p<0.05$.

RISULTATI

Ogni figura è composta da 2 parti.

In ALTO: ciascuna colonna rappresenta la media (\pm SEM) dei *nose-pokes* dei topi attivi (colonne nere) e dei topi passivi di controllo (colonne bianche) nell'arco dei 30 min di sessione sperimentale.

In BASSO ciascuna colonna rappresenta il rapporto tra i *nose-pokes* dei topi attivi e dei topi passivi nell'arco dei 30 min di sessione sperimentale.

La dose della sostanza è espressa in mg/kg per infusione.

** $p < 0.01$ o * $p < 0.05$ vs rispettivi gruppi di controllo. ANOVA seguita dal test di Newman-Keuls ($n = 10-18$ coppie di animali per gruppo).

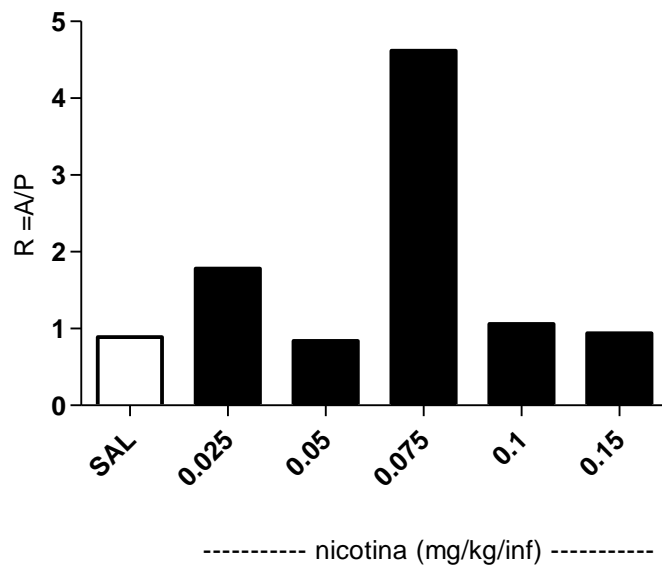
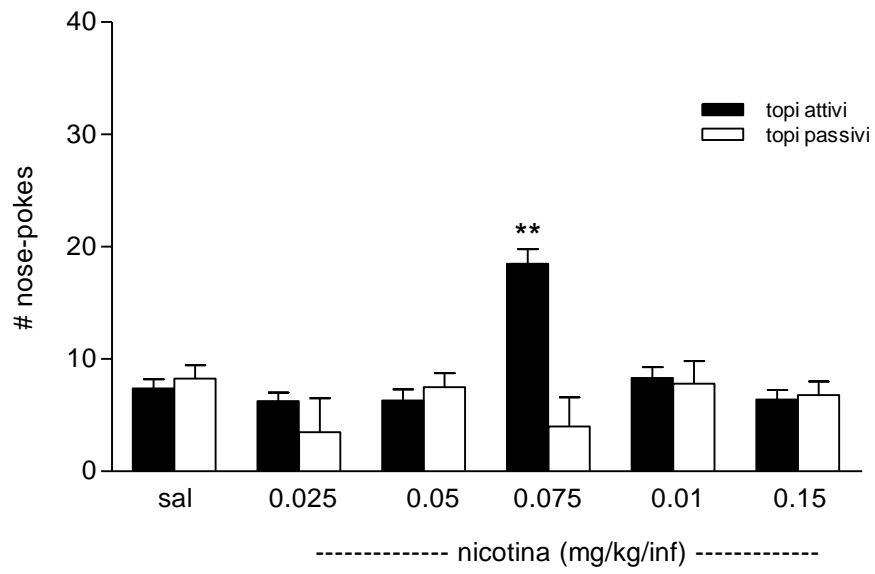
Fig. 11 Curva dose-risposta dell'auto-somministrazione di nicotina in topi C57BL/6

Come mostrato in *Figura 11*, non si osservano differenze statisticamente significative nella media delle richieste dei topi C57BL/6 attivi e passivi quando viene dato loro libero accesso alla soluzione fisiologica (sal), cosicché il valore di R non si discosta significativamente dall'unità. Al contrario, la concentrazione di nicotina di 0.075 mg/kg/inf aumenta significativamente il numero delle richieste

esclusivamente nei topi attivi mentre non viene modificato il numero medio dei NPs negli animali passivi.

L'Analisi della Varianza (ANOVA) ha rilevato differenze significative nell'attività di *nose-poking* tra i gruppi sperimentali ($p < 0.01$). Specificatamente, si ha un incremento nei numeri delle richieste di nicotina nei topi attivi rispetto sia alle richieste dei topi passivi che alle richieste del gruppo di controllo.

C57BL/6



L'incremento del valore di R decisamente sopra l'unità (BASSO) per la dose di nicotina di 0.075 mg/kg/inf, indica un comportamento operante dei topi finalizzato all'autosomministrazione di nicotina. Le altre concentrazioni di nicotina sperimentate non modificano invece il valore di R dall'unità non avendo effetti significativamente diversi sul numero di richieste dei topi attivi e passivi.

Questo primo esperimento dimostra che la nicotina impiegata esercita effetti di rinforzo nei topi C57BL/6 drug-naïve in maniera dose-dipendente, originando una curva dose-risposta a campana, come già osservato precedentemente in questo modello sperimentale con altre sostanze d'abuso (Martellotta et al. 1998a,b; Ledent et al. 1999; Cossu et al. 2001) e con la stessa nicotina in altri ceppi di topi (Martellotta et al. 1995; Fattore et al. 2002).

Poiché la dose di 0.075 mg/kg/inf di nicotina, tra quelle da noi sperimentate, è stata quella che ha sostenuto un più robusto comportamento di autosomministrazione endovenosa, tale dose è stata selezionata per gli esperimenti successivi negli animali riespressi.

Fig. 12. Autosomministrazione endovenosa acuta di nicotina in topi β_2 KO

La *Figura 12* illustra l'autosomministrazione intravenosa di nicotina in topi resi geneticamente privi della subunità β_2 del recettore nicotinico (topi β_2 -KO). Nessuna differenza statisticamente significativa si riscontra nel numero medio di NPs fra i topi attivi e passivi quando questi hanno a disposizione soluzione fisiologica (sal).

Differentemente dai topi C57BL/6 (*Fig. 11*) e dai topi WT, dando ad animali β_2 -KO libero accesso alla nicotina a varie dosi, i topi attivi non aumentano le loro risposte rispetto agli animali ad essi appaiati che ricevono passivamente infusioni di nicotina, né rispetto agli animali di controllo che ricevono infusioni di soluzione salina. Nessuna dose sperimentata è capace di sostenere un comportamento di autosomministrazione acuta nei topi KO e il numero cumulativo medio delle risposte di NPs dei topi attivi è molto simile a quello dei topi passivi, cosicché R non è significativamente differente da 1.

$\beta 2$

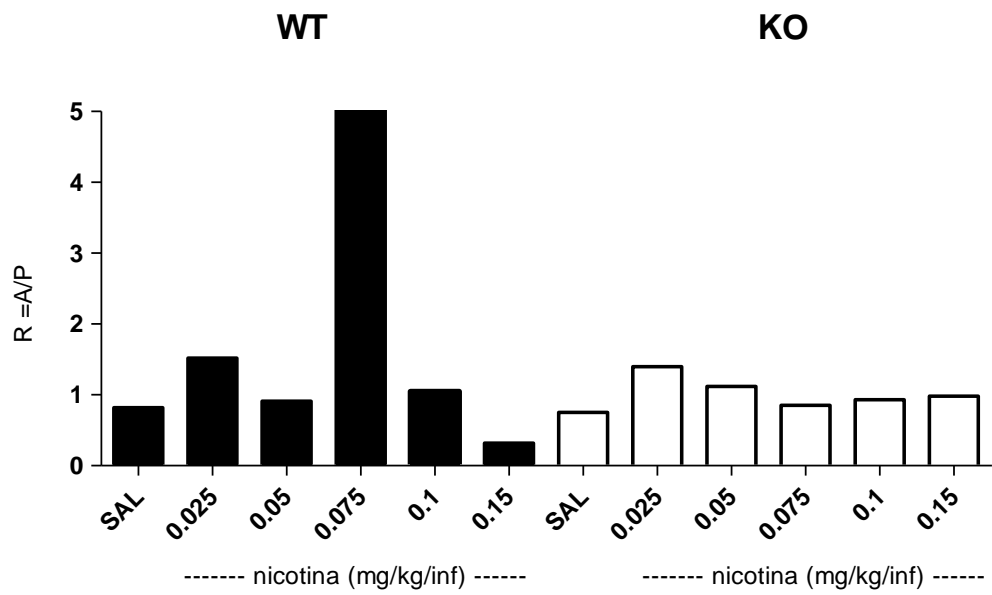
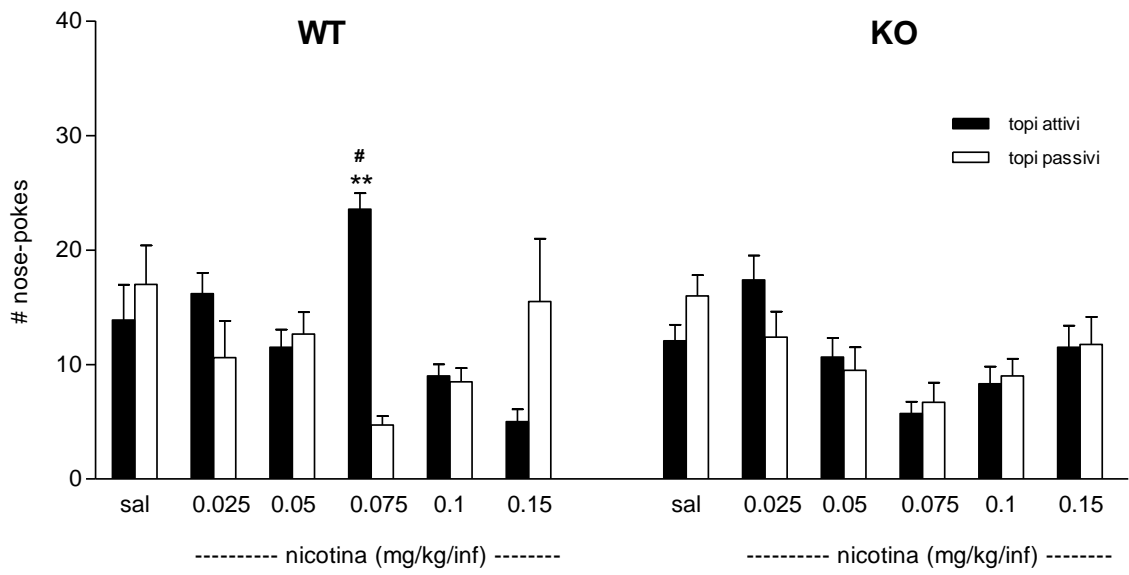


Fig. 13. Autosomministrazione endovenosa acuta di nicotina in topi α_4 KO

La *Figura 13* illustra l'autosomministrazione intravenosa di nicotina in topi resi geneticamente privi della subunità α_4 del recettore nicotinico (topi α_4 -KO). Nessuna differenza statisticamente significativa si riscontra nel numero medio di NPs fra i topi attivi e passivi quando questi hanno a disposizione soluzione salina (sal).

Differentemente dai topi C57BL/6 (*Fig. 11*) e dai topi WT, dando ad animali α_4 -KO libero accesso alla nicotina a varie dosi, i topi attivi non aumentano le loro risposte rispetto agli animali ad essi appaiati che ricevono passivamente infusioni di nicotina, né rispetto agli animali di controllo che ricevono infusioni di soluzione salina.

Il numero cumulativo medio delle risposte di NPs dei topi attivi è molto simile a quello dei topi passivi, cosicché R non è significativamente differente da 1.

$\alpha 4$

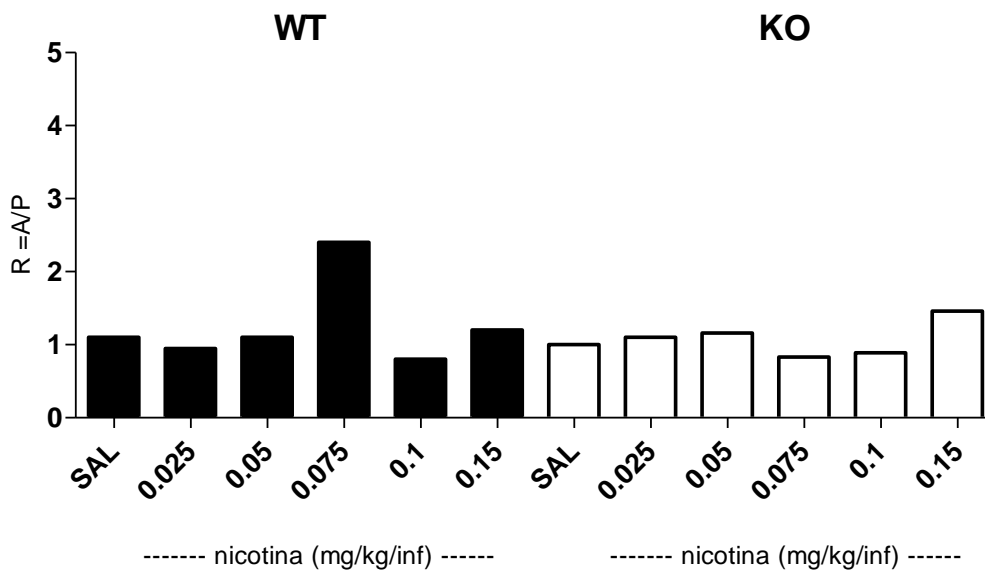
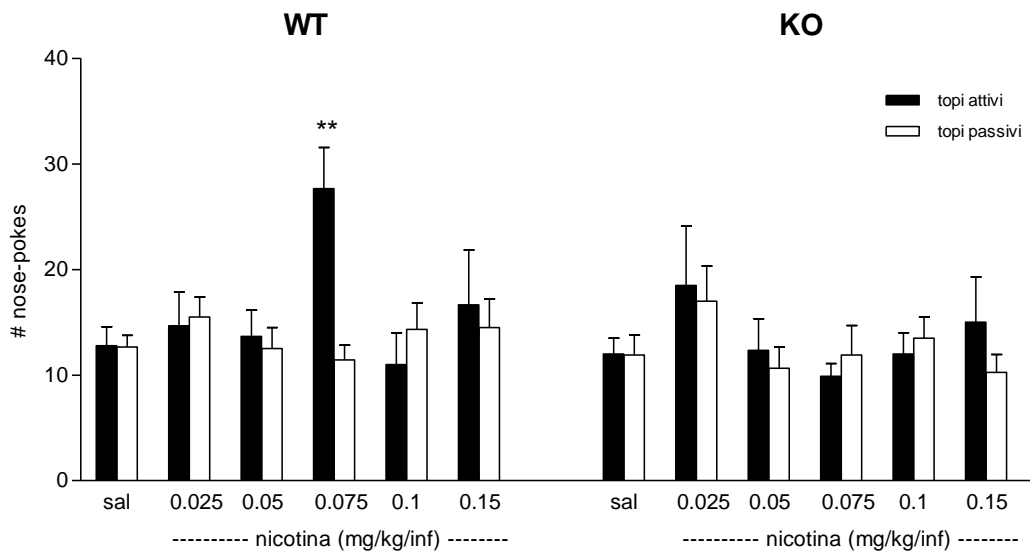
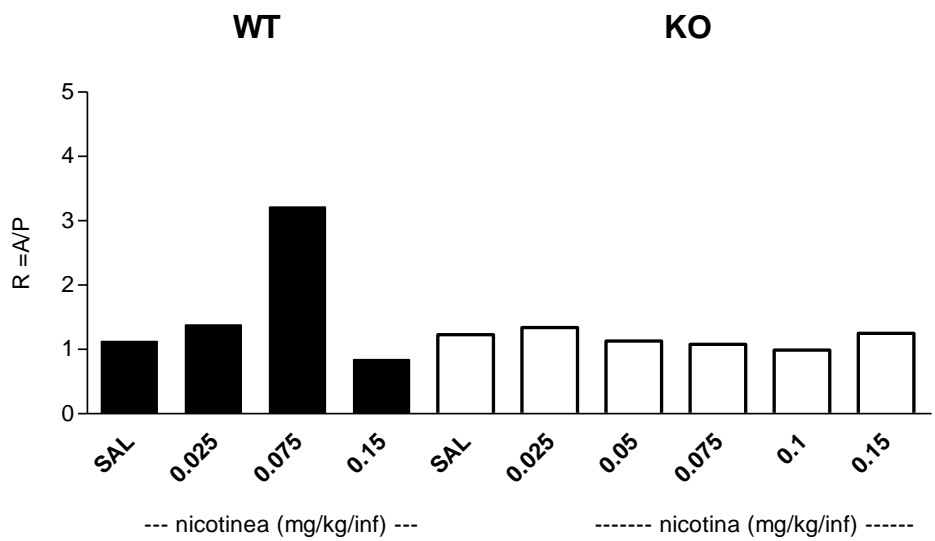
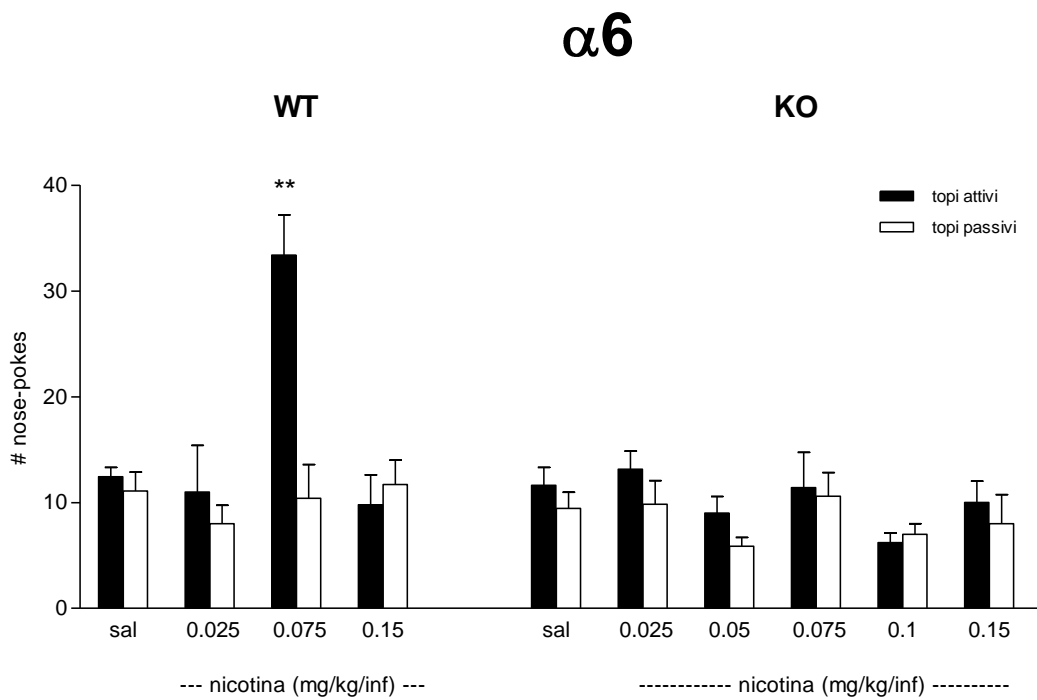


Fig. 14. Autosomministrazione endovenosa acuta di nicotina in topi

α_6 KO



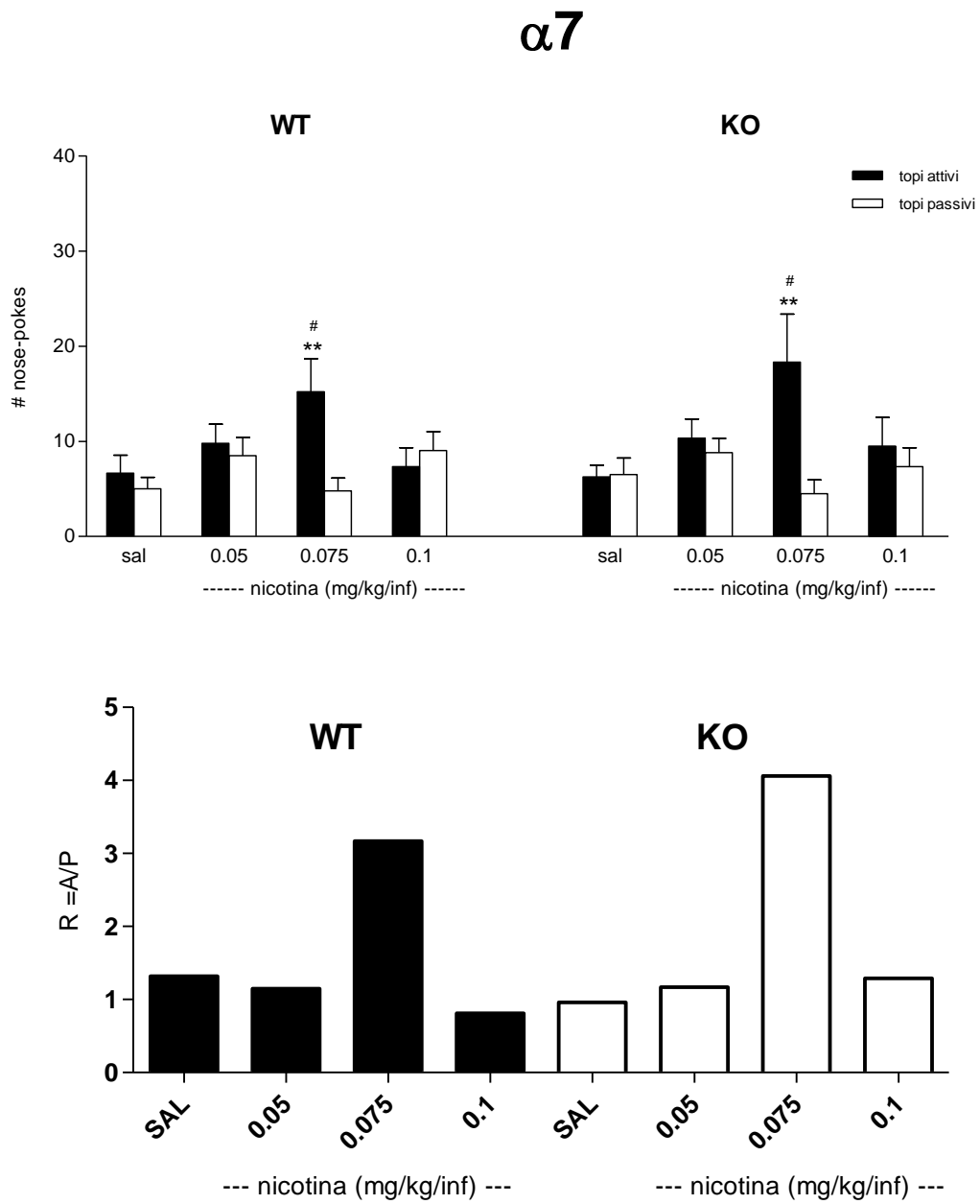
La *Figura 14* illustra l'autosomministrazione intravenosa di nicotina in topi resi geneticamente privi della subunità α_6 del recettore nicotinico (topi α_6 -KO). Nessuna differenza statisticamente significativa si riscontra nel numero medio di NPs fra i topi attivi e passivi quando questi hanno a disposizione soluzione salina (sal).

Differentemente dai topi C57BL/6 (*Fig. 11*) e dai topi WT, dando ad animali α_6 -KO libero accesso alla nicotina a varie dosi, i topi attivi non aumentano le loro risposte rispetto agli animali ad essi appaiati che ricevono passivamente infusioni di nicotina, né rispetto agli animali di controllo che ricevono infusioni di soluzione salina.

Il numero cumulativo medio delle risposte di NPs dei topi attivi è molto simile a quello dei topi passivi, cosicché R non è significativamente differente da 1.

Fig. 15 Autosomministrazione endovenosa acuta di nicotina in topi

α_7 KO

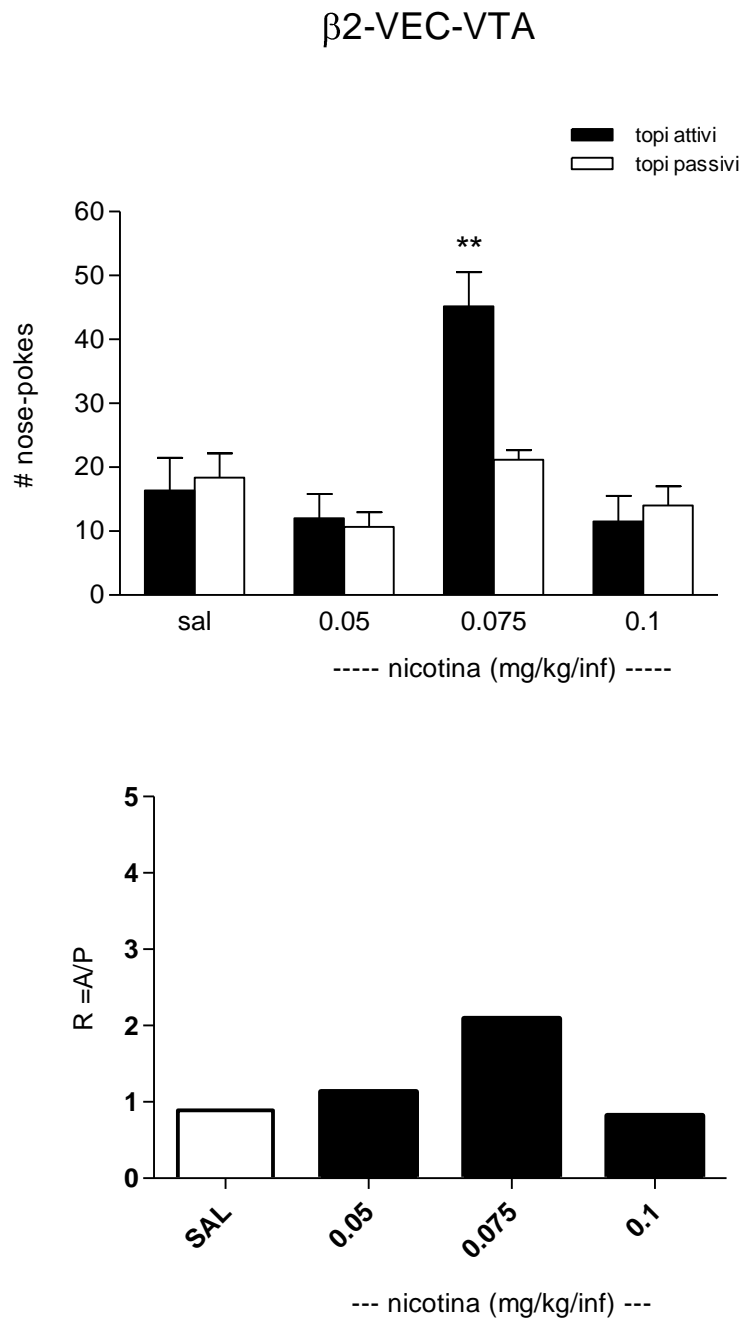


La *Figura 15* illustra l'autosomministrazione intravenosa di nicotina in topi resi geneticamente privi della subunità α_7 del recettore nicotinico (topi α_7 -KO). Nessuna differenza statisticamente significativa si riscontra nel numero medio di NPs fra i topi attivi e passivi quando questi hanno a disposizione soluzione salina (sal).

Similmente ai topi C57BL/6 (*Fig. 11*) e ai topi WT, dando ad animali α_7 -KO libero accesso alla nicotina alla dose di 0.075 mg/kg/inf, i topi attivi aumentano le loro risposte rispetto agli animali ad essi appaiati che ricevono passivamente infusioni di nicotina, e anche agli animali di controllo che ricevono infusioni di soluzione salina.

Il numero cumulativo medio delle risposte di NPs dei topi attivi è maggiore a quello dei topi passivi, cosicché R è significativamente differente da 1.

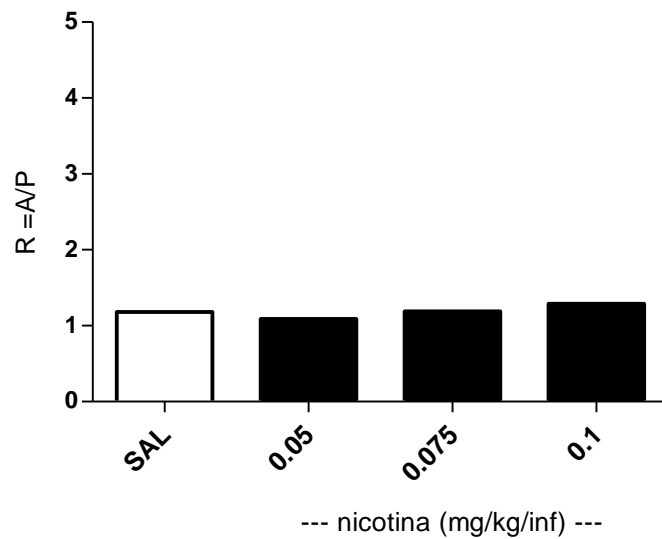
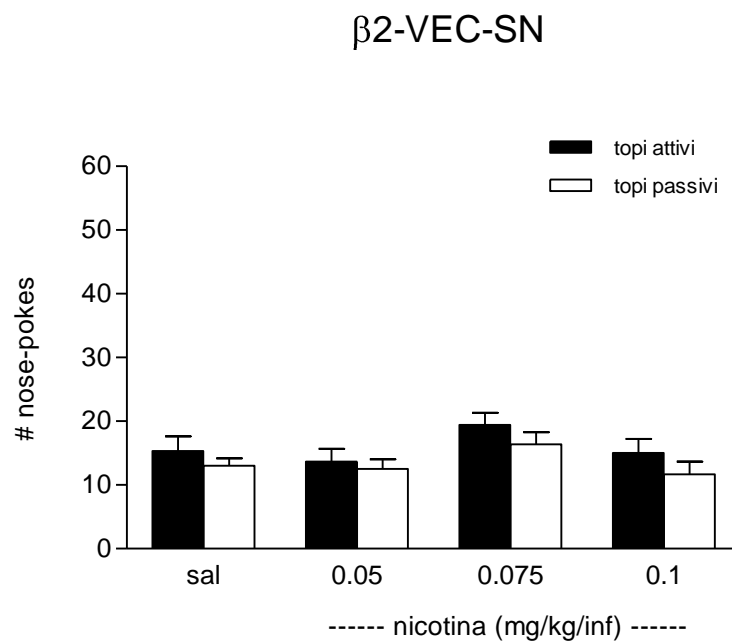
Fig. 16 Autosomministrazione endovenosa acuta di nicotina in topi β_2 -KO con la subunità β_2 riespressa selettivamente nella VTA



Quando agli animali con la subunità β_2 ri-espressa selettivamente in VTA è stato permesso di autosomministrarsi per via endovenosa la nicotina a 0.075 mg/kg/inf, i topi attivi hanno aumentato significativamente la loro attività di *nose-poking* rispetto sia ai topi passivi ad essi appaiati che ai topi di controllo in autosomministrazione di salina.

Il rapporto R è significativamente maggiore di 1, dimostrando gli effetti di rinforzo positivo indotti dalla nicotina in questi topi nei quali sostiene un comportamento di autosomministrazione endovenosa.

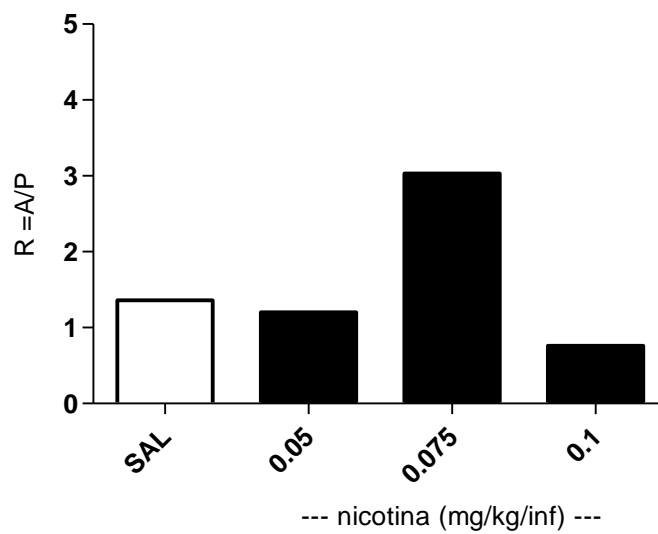
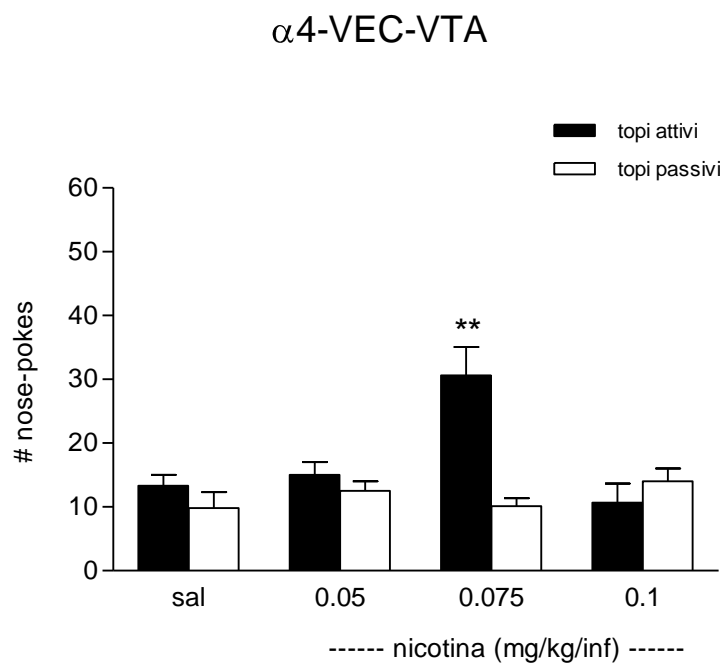
Fig. 17 Autosomministrazione endovenosa acuta di nicotina in topi β_2 -KO con la subunità β_2 riespressa selettivamente nella SN



Quando agli animali con la subunità β_2 ri-espressa selettivamente in SN è stato permesso di autosomministrarsi per via endovenosa la nicotina a varie dosi, i topi non attivi hanno aumentato significativamente la loro attività di *nose-poking* rispetto sia ai topi passivi ad essi appaiati che ai topi di controllo in autosomministrazione di salina.

Il rapporto R non è significativamente maggiore di 1, dimostrando l'assenza degli effetti di rinforzo positivo indotti dalla nicotina in questi topi nei quali non riesce a sostenere un comportamento di autosomministrazione endovenosa.

Fig. 18 Autosomministrazione endovenosa acuta di nicotina in topi α_4 -KO con la subunità α_4 riespressa selettivamente nella VTA



Quando agli animali con la subunità α_4 ri-espressa selettivamente in VTA è stato permesso di autosomministrarsi per via endovenosa la nicotina a 0.075 mg/kg/inf, i topi attivi hanno aumentato significativamente la loro attività di *nose-poking* rispetto sia ai topi passivi ad essi appaiati che ai topi di controllo in autosomministrazione di salina.

Il rapporto R è significativamente maggiore di 1, dimostrando gli effetti di rinforzo positivo indotti dalla nicotina in questi topi nei quali sostiene un comportamento di autosomministrazione endovenosa.

DISCUSSIONE

Il presente studio si è posto l'obiettivo di analizzare da un punto di vista comportamentale il ruolo delle subunità β_2 , α_4 , α_6 e α_7 , nell'espressione delle proprietà di rinforzo positivo della nicotina.

E' stata valutata in primo luogo l'autosomministrazione endovenosa acuta di nicotina in topi che difettano delle unità β_2 , α_4 , α_6 α_7 del recettore nACh ed in animali del ceppo C57BL/6 da cui i KO sono stati selezionati dopo 19 generazioni (Maskos et al. 2005).

I risultati mostrano che i topi β_2 , α_4 , e α_6 KO non si autosomministrano per via endovenosa la nicotina, mostrandosi così insensibili ai suoi effetti gratificanti della nicotina, mentre i topi C57BL/6 e gli α_7 KO rispondono prontamente alla nicotina, in linea con studi precedenti che riportano questo ceppo di animali come particolarmente sensibili agli effetti di rinforzo di questa sostanza (Robinson et al. 1996; Stolerman et al. 1999), Nei topi C57BL/6 si è infatti osservata una curva dose-risposta ad U rovesciata, come tipicamente osservato in questo modello sperimentale in risposta alle stesse dosi di nicotina endovenosa in altri ceppi di topi (Martellotta et al. 1995; Fattore et al. 2001) ma anche in risposta ad altre sostanze d'abuso, quali i cannabinoidi o l'acido gamma-idrossibutirrico (Martellotta et al. 1998a,b; Fattore et al. 2000).

Quando però le subunità β_2 e α_4 del recettore nACh vengono riespresse nella VTA, ma non in SN, di animali β_2 -KO e α_4 -KO, l'autosomministrazione endovenosa di nicotina viene prontamente ripristinata, dimostrando così come la presenza dei recettori β_2 e α_4 nella VTA sia necessaria e sufficiente a sostenere il comportamento endovenoso di autosomministrazione di nicotina nei topi.

L'osservazione che la selettiva riespressione della subunità β_2 nella SN di animali β_2 -KO non ripristini il comportamento di autosomministrazione di nicotina, conferma ulteriormente il ruolo specifico e fondamentale svolto da questa subunità nella VTA.

Complessivamente, i risultati ottenuti comportano diversi importanti aspetti. Il primo è la conferma che la presenza dell'unità β_2 del recettore nACh è necessaria per l'autosomministrazione endovenosa di nicotina, un comportamento ritenuto principalmente mediato dal circuito dopaminergico mesolimbico (Rose e Corrigall 1997). Ciò è in accordo con diverse evidenze sperimentali secondo le quali la subunità β_2 è cruciale per l'espressione degli effetti elettrofisiologici e neurochimici della nicotina sui neuroni dopaminergici (Picciotto et al. 1998; Markos et al. 2005) così come sull'attività locomotoria dopamina-dipendente nei topi (King et al. 2004). L'unità β_2 del recettore nACh è fondamentale anche per l'aumento nicotina-dipendente del rinforzo condizionato (Brunzell et al. 2005) e per lo sviluppo della *conditioned place*

preference (preferenza ambientale condizionata) nei topi (Walters et al. 2006).

Secondariamente, abbiamo identificato la VTA come il substrato neuronale sufficiente di per se a mediare il comportamento di autosomministrazione acuta di nicotina, in quanto gli animali con le subunità β_2 e α_4 ri-espresse esclusivamente in questa area si autosomministrano prontamente per via endovenosa la droga. L'idea che la VTA sia una regione del cervello cruciale per l'espressione degli effetti gratificanti della nicotina è avvalorata dall'osservazione che in quest'area la nicotina aumenta l'attività di scarica dei neuroni dopaminergici (Grenhoff et al. 1986; Pidoplichko et al. 2004), riduce l'autostimolazione elettrica (Ivanova e Greenshaw 1997) ed aumenta in maniera dose-dipendente il rilascio di DA (Tizabi et al. 2002; Rahman et al. 2004). Inoltre, infusioni dell'antagonista nicotinico mecammilamina in VTA riducono significativamente l'autosomministrazione endovenosa di nicotina (Corrigall et al. 1994).

In realtà, anche altre strutture cerebrali si pensa possano mediare gli effetti di rinforzo positivo della nicotina, quale il nucleo centrale del rafe, in posizione postero-dorsale rispetto alla VTA, ed il nucleo sopramammillare dell'ipotalamo, posizionato postero-anteriormente alla VTA (Ikemoto et al. 2006). Insieme alla parte posteriore della VTA, queste due regioni sostengono un comportamento di auto-

somministrazione intracranica di nicotina nei ratti, in accordo con altri studi che indicano la VTA come la regione del cervello principalmente addetta alla modulazione del comportamento operativo (Laviolette e van der Kooy 2003) e dei processi di condizionamento indotto da nicotina (Museo e Wise 1994).

Il presente studio identifica in maniera inequivocabile nella presenza delle subunità β_2 e α_4 del recettore nACh all'interno della VTA la condizione essenziale per l'autosomministrazione endovenosa di nicotina in animali drug-naive, al contrario la subunità α_7 non è implicata nei meccanismi coinvolti nell'autosomministrazione acuta di nicotina nel topo.

CONCLUSIONI

Questi risultati illustrano un nuovo approccio sperimentale per un'analisi genetica approfondita e dettagliata del rinforzo e della dipendenza da nicotina nel topo.

Dal momento che i ratti non si prestano facilmente a manipolazioni genetiche, questo modello di comportamento di autosomministrazione endovenosa può essere applicato ad altre linee di topi knockout per ciascuna delle diverse subunità del recettore nACh (Orr-reger et al. 1997; Marubio et al. 1999; Xu et al. 1999; Champtiaux et al. 2002; Wang et al. 2002, 2003; Cui et al. 2003; Salas et al. 2003a,b; Kedmi et al. 2004; Wu et al. 2004) al fine di delineare i meccanismi molecolari che contribuiscono al rinforzo ed alla dipendenza da nicotina.

La ri-espressione del ceppo selvatico (Tapper et al. 2004) e delle unità secondarie mutate o chimeriche (Salette et al. 2004, 2005) del recettore nACh specificamente nella VTA, mediante il sistema di infusione locale di lentivirus, consentiranno di verificare le diverse ipotesi circa il contributo di ciascuna subunità nella modulazione degli effetti gratificanti indotti dalla nicotina.

BIBLIOGRAFIA

Araki H, Suemaru K, Gomita Y (2002) Neuronal nicotinic receptor and psychiatric disorders: functional and behavioral effects of nicotine. *Jpn J Pharmacol* 88:133-138.

Brunzell DH, Chang JR, Schneider B, Olausson P, Taylor JR, Picciotto MR (2005) beta2-Subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors are involved in nicotine-induced increases in conditioned reinforcement but not progressive ratio responding for food in C57BL/6 mice. *Psychopharmacology* 13:1-11.

Champtiaux N, Han ZY, Bessis A, Rossi FM, Zoli M, Marubio L, McIntosh JM, Changeux JP (2002) Distribution and pharmacology of alpha 6-containing nicotinic acetylcholine receptors analyzed with mutant mice. *J Neurosci* 22:1208-1217.

Champtiaux N, Gotti C, Cordero-Erausquin M, David DJ, Przybylski C, Lena C, Clementi F, Moretti M, Rossi FM, Le Novere N, McIntosh JM, Gardier AM, Changeux JP (2003) Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. *J Neurosci* 23:7820-7829.

- Charneau P, Alizon M, Clavel F (1992) A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *J Virol* 66:2814-2820.
- Charneau P, Mirambeau G, Roux P, Paulous S, Buc H, Clavel F (1994) HIV-1 reverse transcription. A termination step at the center of the genome. *J Mol Biol* 241:651-662.
- Clarke PBS, Fu DS, Jakubovic A, Fibiger HC (1988) Evidence that mesolimbic dopaminergic activation underlies the locomotor stimulant action of nicotine in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 246:701-708.
- Cordero-Erausquin M, Marubio LM, Klink R, Changeux JP (2000) Nicotinic receptor function: new perspectives from knockout mice. *Trends Pharmacol Sci* 21:211-217.
- Corrigall WA, Franklin KB, Coen KM, Clarke PB (1992) The mesolimbic dopaminergic system is implicated in the reinforcing effects of nicotine. *Psychopharmacology* 107:285-289.
- Corrigall WA, Coen KM, Adamson KL (1994) Self-administered nicotine activates the mesolimbic dopamine system through the ventral tegmental area. *Brain Res* 653:278-284.

- Cossu G, Ledent C, Fattore L, Imperato A, Bohme GA, Parmentier M, Fratta W (2001) Cannabinoid CB1 receptor knockout mice fail to self-administer morphine but not other drugs of abuse. *Behav Brain Res* 118:61-65.
- 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, 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. *J Neurosci* 23:11045-11053.
- Fattore L, Martellotta MC, Cossu G, Fratta W (2000) Gamma-hydroxybutyric acid: an evaluation of its rewarding properties in rats and mice. *Alcohol* 20:247-256.
- Fattore L, Cossu G, Martellotta MC, Deiana S, Fratta W (2001) Baclofen antagonises intravenous self-administration of gamma-hydroxybutyric acid in mice. *Neuroreport* 12:2243-2246.
- Fattore L, Cossu G, Martellotta MC, Fratta W (2002) Baclofen antagonizes intravenous self-administration of nicotine in mice and rats. *Alcohol* 37:495-498.

- Girones R, Cote PJ, Hornbuckle WE, Tennant BC, Gerin JL, Purcell RH, Miller RH (1989) Complete nucleotide sequence of a molecular clone of woodchuck hepatitis virus that is infectious in the natural host. *Proc Natl Acad Sci* 86:1846-1849.
- Goodman A, Gilman H (1997). *Le basi farmacologiche della terapia*. Ed. 1, pp. 554.
- Grenhoff J, Aston-Jones G, Svensson TH (1986) Nicotinic effects on the firing pattern of midbrain dopamine neurons. *Acta Physiol Scand* 128:351-358.
- Grottick AJ, Trube G, Corrigall WA, Huwyler J, Malherbe P, Wyler R, Higgins GA (2000) Evidence that nicotinic alpha(7) receptors are not involved in the hyperlocomotor and rewarding effects of nicotine. *J Pharmacol Exp Ther* 294:1112-1119.
- Henningfield JE, Miyasato K, Jasinski DR (1983) Cigarette smokers self-administer intravenous nicotine. *Pharmacol Biochem Behav* 19:887-890.
- Henningfield JE, Nemeth-Coslett R (1988) Nicotine dependence. Interface between tobacco and tobacco-related disease. *Chest* 93:37S-55S.

- Hughes JR(1988) Dependence potential and abuse liability of nicotine replacement therapies *Prog Clin Biol Res* 261:261-77.
- Ikemoto S, Qin M, Liu ZH (2006) Primary reinforcing effects of nicotine are triggered from multiple regions both inside and outside the ventral tegmental area. *J Neurosci* 26:723-730.
- Imperato A, Mulas A, Di Chiara G (1986) Nicotine preferentially stimulates dopamine release in the limbic system of freely moving rats. *Eur J Pharmacol* 132:337-338.
- Kandel ER (1998) *Principi di Neuroscienze*. pp. 150-154.
- Kauer JA (2005) Neuroscience: a home for the nicotine habit. *Nature* 436:31-32.
- Kedmi M, Beaudet AL, Orr-Urtreger A (2004) Mice lacking neuronal nicotinic acetylcholine receptor beta4-subunit and mice lacking both alpha5- and beta4-subunits are highly resistant to nicotine-induced seizures. *Physiol Genomics* 17:221-229.
- King SL, Caldarone BJ, Picciotto MR (2004) Beta2-subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors are critical for dopamine-dependent locomotor activation following repeated nicotine administration. *Neuropharmacology* 47:132-139.

Koob GF (1992) Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *TiPS* 13:177-184.

Ivanova S, Greenshaw AJ (1997) Nicotine-induced decreases in VTA electrical self-stimulation thresholds: blockade by haloperidol and mecamylamine but not scopolamine or ondansetron. *Psychopharmacology* 134:187-192.

Jones S, Sudweeks S, Yakel JL (1999) Nicotinic receptors in the brain: correlating physiology with function. *Trends Neurosci* 22:555-561.

Laviolette SR, van der Kooy D (2003a) Blockade of mesolimbic dopamine transmission dramatically increases sensitivity to the rewarding effects of nicotine in the ventral tegmental area. *Mol Psychiatry* 8:50-59.

Laviolette SR, van der Kooy D (2003b) The motivational valence of nicotine in the rat ventral tegmental area is switched from rewarding to aversive following blockade of the $\alpha 7$ -subunit-containing nicotinic acetylcholine receptor. *Psychopharmacology* 166:306-313.

Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitet F, Aubert J, Beslot F, Bohme G, Imperato A, Pedrazzini T, Roques B, Vassart G, Fratta W,

Parmentier M (1999) Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 283:401-404.

Le Moal M, Simon H (1991) Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles *Physiol Rev* 71:155-234.

Levin ED, Rezvani AH (2002) Nicotinic treatment for cognitive dysfunction. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 1:423-431.

Levin ED, McClernon FJ, Rezvani AH (2005) Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. *Psychopharmacology* 12:1-17.

Martellotta MC, Kuzmin A., Zvartau E., Cossu G, Gessa GL, Fratta W (1995) Isradipine inhibits nicotine intravenous self-administration in drug-naive mice. *Pharmacol Biochem Behav* 52:271-274.

Martellotta MC, Cossu G, Fattore L, Gessa GL, Fratta W (1998a) Intravenous self-administration of gamma-hydroxybutyric acid in drug-naive mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 8:293-296.

Martellotta MC, Cossu G, Fattore L, Gessa GL, Fratta W (1998b) Self-administration of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 in drug-naive mice. *Neuroscience* 85:327-330.

Marubio LM, del Mar Arroyo-Jimenez M, Cordero-Erausquin M, Lena C, Le Novere N, de Kerchove d'Exaerde A, Huchet M, Damaj MI, Changeux JP (1999) Reduced antinociception in mice lacking neuronal nicotinic receptor subunits. *Nature* 398:805-810.

Maskos U, Molles BE, Pons S, Besson M, Guiard BP, Guilloux JP, Evrard A, Cazala P, Cormier A, Mameli-Engvall M, Dufour N, Cloez-Tayarani I, Bemelmans AP, Mallet J, Gardier AM, David V, Faure P, Granon S, Changeux JP (2005) Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature* 436:103-107.

Miyoshi H, Blomer U, Takahashi M., Gage FH, Verma IM (1998) Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* 72:8150-8157.

Museo E, Wise RA (1994) Place preference conditioning with ventral tegmental injections of cytosine. *Life Sci* 55:1179-1186.

Mogenson GJ, Jones DL, Yim CY (1980) From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system.. *Neurobiol* 14:69-97.

Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM (1996a) Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the

transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci* 93:11382-11388.

Naldini L, Blomer U, Gally P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D (1996b) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272:263-267.

Newhouse PA, Potter A, Singh A (2004) Effects of nicotinic stimulation on cognitive performance. *Curr Opin Pharmacol* 4:36-46.

Orr-Urtreger A, Goldner FM, Saeki M, Lorenzo I, Goldberg L, De Biasi M, Dani JA, Patrick JW, Beaudet AL (1997) Mice deficient in the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor lack alpha-bungarotoxin binding sites and hippocampal fast nicotinic currents. *J Neurosci* 17:9165-9171.

Panagis G, Kastellakis A, Spyraiki C, Nomikos G (2000) Effects of methyllycaconitine (MLA), an alpha 7 nicotinic receptor antagonist, on nicotine- and cocaine-induced potentiation of brain stimulation reward. *Psychopharmacology* 149:388-396.

Parker SL, Fu Y, McAllen K, Luo J, McIntosh JM, Lindstrom JM, Sharp BM (2004) Up-regulation of brain nicotinic acetylcholine receptors in the rat during long-term self-administration of

nicotine: disproportionate increase of the alpha6 subunit. *Mol Pharmacol* 65:611-622.

Picciotto MR, Zoli M, Rimondini R, Lena C, Marubio LM, Pich EM, Fuxe K, Changeux JP (1998) Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature* 391:173-177.

Picciotto MR, Zoli M, Changeux JP (1999) Use of knock-out mice to determine the molecular basis for the actions of nicotine. *Nicotine Tob Res* 1:S121-5.

Picciotto MR, Corrigall WA (2002) Neuronal systems underlying behaviors related to nicotine addiction: neural circuits and molecular genetics. *J Neurosci* 22:3338-3341.

Pidoplichko VI, DeBiasi M, Williams JT, Dani JA (1997) Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature* 390:401-404.

Pidoplichko VI, Noguchi J, Areola OO, Liang Y, Peterson J, Zhang T, Dani JA (2004) Nicotinic cholinergic synaptic mechanisms in the ventral tegmental area contribute to nicotine addiction. *Learn Mem* 11:60-69.

Rahman S, Zhang J, Corrigan WA (2004) Local perfusion of nicotine differentially modulates somatodendritic dopamine release in the rat ventral tegmental area after nicotine preexposure. *Neurochem Res* 29:1687-1693.

Rang HP, Dale MM e Ritter J. *Farmacologia* 127; 1998.

Robinson SF, Marks MJ, Collins AC (1996) Inbred mouse strains vary in oral self-selection of nicotine. *Psychopharmacology* 124:332-339.

Rose JE, Corrigan WA (1997) Nicotine self-administration in animals and humans: similarities and differences. *Psychopharmacology* 130:28-40.

Rowel PP, Carr LA, Garner AC (1987) Stimulation of [³H]dopamine release by nicotine in rat nucleus accumbens. *J Neurochem* 49:1449-1454.

Salas R, Orr-Urtreger A, Broide RS, Beaudet A, Paylor R, De Biasi M (2003a) The nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha 5 mediates short-term effects of nicotine in vivo. *Mol Pharmacol* 63:1059-1066.

- Salas R, Pieri F, Fung B, Dani JA, De Biasi M (2003b) Altered anxiety-related responses in mutant mice lacking the beta4 subunit of the nicotinic receptor. *J Neurosci* 23:6255-6263.
- Salette J, Bohler S, Benoit P, Soudant M, Pons S, Le Novere N, Changeux JP, Corringer PJ (2004) An extracellular protein microdomain controls up-regulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by nicotine. *J Biol Chem* 279:18767-18775.
- Salette J, Pons S, Devillers-Thiery A, Soudant M, Prado de Carvalho L, Changeux JP, Corringer PJ (2005) Nicotine upregulates its own receptors through enhanced intracellular maturation. *Neuron* 46:595-607.
- Shoaib M, Gommans J, Morley A, Stolerman IP, Grailhe R, Changeux JP (2002) The role of nicotinic receptor beta-2 subunits in nicotine discrimination and conditioned taste aversion. *Neuropharmacology* 42:530-539.
- Singer G, Wallace M, Hall R (1982) Effects of dopaminergic nucleus accumbens lesions on the acquisition of schedule induced self injection of nicotine in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 17:579-581.

Sirven A, Ravet E, Charneau P, Zennou V, Coulombel L, Guetard D, Pflumio F, Dubart-Kupperschmitt A. (2001) Enhanced transgene expression in cord blood CD34(+)-derived hematopoietic cells, including developing T cells and NOD/SCID mouse repopulating cells, following transduction with modified trip lentiviral vectors. *Mol Ther* 438-448.

Stolerman IP, Naylor C, Elmer GI, Goldberg SR (1999) Discrimination and self-administration of nicotine by inbred strains of mice. *Psychopharmacology* 141:297-306.

Tapper AR, McKinney SL, Nashmi R, Schwarz J, Deshpande P, Labarca C, Whiteaker P, Marks MJ, Collins AC, Lester HA (2004) Nicotine activation of alpha4* receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization. *Science* 306:1029-1032.

Tizabi Y, Copeland RL Jr, Louis VA, Taylor RE (2002) Effects of combined systemic alcohol and central nicotine administration into ventral tegmental area on dopamine release in the nucleus accumbens. *Alcohol Clin Exp Res* 26:394-399.

Walters CL, Brown S, Changeux JP, Martin B, Damaj MI (2006) The beta2 but not alpha7 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor

is required for nicotine-conditioned place preference in mice.
Psychopharmacology 14:1-6.

Wang N, Orr-Urtreger A, Chapman J, Rabinowitz R, Nachman R, Korczyn AD (2002) Autonomic function in mice lacking alpha5 neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit. *J Physiol* 542:347-354.

Wang N, Orr-Urtreger A, Chapman J, Rabinowitz R, Korczyn AD (2003) Deficiency of nicotinic acetylcholine receptor beta 4 subunit causes autonomic cardiac and intestinal dysfunction. *Mol Pharmacol* 63:574-580.

Wooltorton JR, Pidoplichko VI, Broide RS, Dani JA (2003) Differential desensitization and distribution of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in midbrain dopamine areas. *J Neurosci* 23:3176-3185.

Wu J, George AA, Schroeder KM, Xu L, Marxer-Miller S, Lucero L, Lukas RJ (2004) Electrophysiological, pharmacological, and molecular evidence for alpha7-nicotinic acetylcholine receptors in rat midbrain dopamine neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 311:80-91.

Xu W, Gelber S, Orr-Urtreger A, Armstrong D, Lewis RA, Ou CN, Patrick J, Role L, De Biasi M, Beaudet AL (1999) Megacystis, mydriasis, and ion channel defect in mice lacking the alpha3

neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci* 96:5746-5751.

Zennou V, Petit C, Guetard D, Nerhbass U, Montagnier L, Charneau P (2000) HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 101:173-185.

Zennou V, Serguera C, Sarkis C, Colin P, Perret E, Mallet J, Charneau P. (2001) The HIV-1 DNA flap stimulates HIV vector-mediated cell transduction in the brain. *Nat Biotechnol* 19:446-450.

Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ (1999) Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73:2886-2892.