

Perspectives & Research

Italian Research

Il progetto Alfa6: ruolo delle subunità del recettore nicotinico per l'acetilcolina nella dipendenza da tabacco

The project alpha6: role of nicotinic acetylcholine receptor subunits in tobacco dependence

Michele Zoli, Elena Maestrini, Maria De Paola, Chiara Raimondi, Michela Cainazzo, Stefania Guiducci, Luigi Alberto Pini

Riassunto

Il fumo di sigaretta, la principale causa di morte evitabile nei paesi industrializzati, è una forma di tossicodipendenza, e, più in particolare, di dipendenza dalla nicotina, sostanza presente in alta concentrazione nel fumo di sigaretta. La nicotina attiva i neuroni cerebrali che mediano la ricompensa per gli stimoli naturali (per esempio, cibo) ed i farmaci. Questi neuroni esprimono alti livelli di recettore neuronale per l'acetilcolina nicotinico (nAChR). La nicotina si lega ed attiva nAChR e innesca il processo che porta allo sviluppo della dipendenza da fumo di tabacco. Studi genetici nell'uomo hanno mostrato che polimorfismi nei geni delle subunità del nAChR alterano significativamente la suscettibilità individuale a sviluppare dipendenza dal tabacco e malattie correlate come il cancro polmonare.

L'obiettivo della presente proposta è studiare il ruolo dei sottotipi di nAChR nella dipendenza da nicotina in parallelo nell'uomo e in modelli animali.

Nell'uomo. Recluteremo dai Centri antiFumo della Regione Emilia Romagna, fumatori che si sottopongono a terapia per smettere di fumare. L'obiettivo primario dello studio è quello di indagare la possibile associazione tra geni delle subunità nAChR e altri geni correlati alla funzione dei nAChR, e l'efficacia delle diverse terapie antifumo.

In modelli animali. Proponiamo di studiare il ruolo funzionale di un sottotipo specifico, i nAChR alfa6beta2, che è selettivamente espresso nei circuiti cerebrali della ricompensa, utilizzando nuove tecnologie che portano ad inattivazione genica. Gli animali con

Summary

Cigarette smoking, the major cause of avoidable death in industrialized countries, is a form of drug dependence, and, more specifically, dependence to nicotine, a substance found in high concentration in cigarette smoke. Nicotine activates neurons in the brain systems that mediate reward for both natural stimuli (e.g., food) and for drugs. These neurons express high levels of neuronal nicotinic acetylcholine receptor (nAChR). Nicotine binds and activates nAChRs and triggers the process that leads to the development of addiction to tobacco smoke.

Interestingly, genetic studies in humans have shown polymorphisms in nAChR subunit genes significantly alter the individual susceptibility to develop tobacco dependence and related diseases such as lung cancer.

The objective of the present proposal is to study the role of nAChR subtypes in nicotine addiction in parallel in humans and animal models. In humans: We will recruit from the Smoking Cessation Centres of the Emilia Romagna Region smokers who are undergoing a smoking cessation therapy. The primary aim of the study is to investigate the possible association between nAChR subunit genes and other genes related to nAChR function and the efficacy of different smoking cessation therapies.

In animal models: We propose to study the functional role of a specific subtype, the alpha6beta2 nAChRs, that is selectively expressed in brain reward circuits using new technologies that lead to inactivation of the alpha6beta2 nAChRs. The animals with

Michele Zoli (michele.zoli@unimore.it)
Centro AntiFumo (interdipartimentale),
Azienda Ospedaliero Universitaria Policlinico
di Modena, Modena, Italia
Dipartimento di Scienze Biomediche,
Metaboliche e Neuroscienze, Università
di Modena e Reggio Emilia, Modena, Italia

Maria De Paola, Chiara Raimondi, Michela Cainazzo, Luigi Alberto Pini
Centro AntiFumo (interdipartimentale),
Azienda Ospedaliero Universitaria
Policlinico di Modena, Modena, Italia

Stefania Guiducci
Dipartimento di Scienze Biomediche,
Metaboliche e Neuroscienze, Università
di Modena e Reggio Emilia, Modena,
Italia

Elena Maestrini
Dipartimento di Farmacia
e Biotecnologie, Università
di Bologna, Bologna,
Italia

inattivato il gene $\alpha 6$ saranno studiati in paradigmi sperimentali ben consolidati che modellano le caratteristiche neurochimiche e comportamentali della dipendenza da nicotina.

Parole chiave: *recettori nicotinici, polimorfismi genici, dipendenza da nicotina*

Introduzione

Il fumo di sigaretta è la principale causa di morte evitabile in Europa, così come in altri paesi industrializzati, essendo un fattore di rischio per quattro principali cause di morte: le malattie cardiovascolari, tumori, infarto cerebrale, la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO). Nel mondo, più di 6 milioni di persone muoiono ogni anno a causa del fumo, cioè più che a causa di alcool, cocaina, eroina, suicidio, omicidio, incidenti stradali, incendi e AIDS messi insieme. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), la prevalenza del fumo, anche se diminuita, rimane circa il 25% della popolazione adulta in Europa e viene calcolata ammontare a oltre 1 miliardo di persone in tutto il mondo. Nonostante il pericolo del fumo è ben noto nelle popolazioni dei paesi occidentali, solo il 30% dei fumatori cerca di smettere di fumare ogni anno e, di questi, solo il 5% non recidiva entro 1 anno.

Questi dati epidemiologici possono essere spiegati dal fatto che il fumo di sigaretta è una forma di tossicodipendenza, e, più specificamente, la dipendenza da nicotina, una sostanza presente in alta concentrazione nel fumo di sigaretta. L'idea che il fumo sia una forma di tossicodipendenza, psicologicamente e neurobiologicamente simile ad altre forme di dipendenza da droghe, come l'eroina o la cocaina, è ormai ampiamente accettata dalla comunità scientifica. In effetti, il fumo è la forma di tossicodipendenza con le conseguenze più vaste sulla salute nei paesi sviluppati. È quindi chiaro che la ricerca, sulle basi biologiche del fumo e su nuove terapie che aiutino i fumatori a smettere di fumare sigarette, è un obiettivo primario della ricerca biomedica.

Uno dei fatti scientifici fondamentali alla base di questo concetto è la prova che la nicotina, come tutte le droghe di abuso, e solo le sostanze di abuso, ha la caratteristica di attivare uno specifico sistema neuronale chiamato sistema mesolimbico a dopamina (DA). Questo sistema neuronale è il principale mediatore della ricompensa sia per gli stimoli naturali (ad esempio, il cibo) sia per le droghe [1]. Pertanto, la nicotina, come in generale tutte le sostanze di abuso, induce una ricompensa artificiale, che fa sì che a poco a poco neuroadattamenti complessi portino alla tossicodipendenza (tipicamente caratterizzata da sintomi come desiderio incoercibile di assumere droga e sindrome da astinenza).

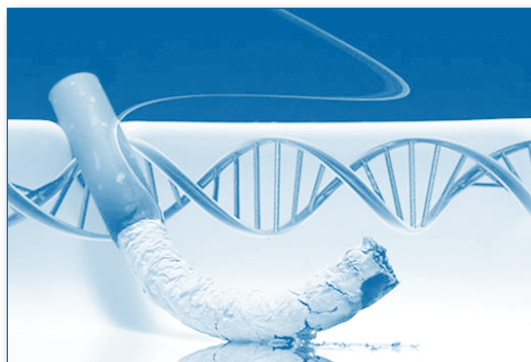
inactivated $\alpha 6$ gene will be studied in well established experimental paradigms that models neurochemical or behavioural features of nicotine dependence.

Keywords: *nicotinic receptors, gene polymorphisms, nicotine dependence*

Background

Cigarette smoking is the major cause of avoidable death in the EU, as well as in other industrialized countries, being a risk factor for four major causes of death: cardiovascular diseases, tumors, cerebral infarction, chronic pulmonary obstructive disease (COPD). In the world, more than 6 million people die each year because of smoking, that is more than because of alcohol, cocaine, heroin, suicide, homicide, car accidents, fires and AIDS combined. According to the World Health Organization (WHO), the prevalence of smoking, though diminished, remains around 25% of the adult population in the EU and is calculated to amount to more than 1 billion people around the world. Despite the danger of smoking is well known in the populations of Western countries, only about 30% of smokers try to quit smoking each year and, of these, only 5% do not relapse within 1 year.

These epidemiological data can be explained by the fact that cigarette smoking is a form of drug dependence, and, more specifically, dependence to nicotine, a substance found in high concentration in cigarette smoke. The notion that smoking is a form of drug addiction, psychologically and neurobiologically similar to other forms of addiction to drugs, such as heroin or cocaine, is now widely accepted in the scientific community. As a matter of fact, smoking is the form of drug addiction with the widest health consequences in developed countries. It is therefore clear that research on the biological basis of smoking and on new therapies that help smokers to quit cigarette smoking, is a primary goal of biomedical research.



One of the key scientific facts behind this concept is the evidence that nicotine, like all drugs of abuse, and only the substances of abuse, has the characteristic of activating a specific neuronal system called the mesolimbic dopamine (DA) system. This neuronal system is the main mediator of reward for both natural stimuli (e.g., food) and for drugs [1]. Therefore, nicotine, as in general all substances of abuse, induces an artificial reward, which gradually causes complex neuroadaptations that lead to drug dependence (typically characterized by symptoms such as craving for drugs and withdrawal syndrome).

The mesolimbic DA system comprises cell bodies in the ventral tegmental area (VTA) and their projections to the nucleus accumbens (NAc) as well as other telencephalic areas such

Il sistema mesolimbico a DA comprende corpi cellulari nella zona tegmentale ventrale (VTA) e le loro proiezioni al nucleo accumbens (NAc), così come altre aree telencefaliche come l'amigdala e la corteccia prefrontale. Fattore critico per la dipendenza da nicotina è che i neuroni della VTA esprimano livelli molto elevati di recettore nicotinico per l'acetilcolina neuronale (nAChR), una macromolecola che ha la capacità di legare e riconoscere la nicotina (per esempio, la nicotina assunta attraverso il fumo di sigaretta, che raggiunge il cervello attraverso la circolazione sanguigna). La nicotina si lega ed attiva nAChR e provoca l'attivazione dei neuroni a DA che a loro volta innescano il processo che porta allo sviluppo della dipendenza da fumo di tabacco.

Oltre al sistema mesolimbico a DA, il complesso abenulare (Hb) ha recentemente ricevuto molta attenzione come nucleo fondamentale per la mediazione del rinforzo naturale e da droghe. Si compone di una parte mediale (abenula mediale, MHB), composta da neuroni colinergici situati ventralmente e mentre dorsalmente si trovano neuroni a sostanza P (SP), e una parte laterale (abenula laterale, LHb). Il MHB, che anche co-rilascia glutammato (Glu), proietta quasi esclusivamente al nucleo interpeduncolare (IPn) attraverso il fascicolo retroflesso, mentre LHb proietta, direttamente o indirettamente, alle aree del mesencefalo, tra le quali invia un input inibitorio ai neuroni DA della VTA. È stato dimostrato che l'Hb è attivata da ricompensa negativa o omissione di ricompensa positiva [2]. Di grande interesse è il fatto che i sistemi mesolimbico e Hb-IPn esprimono la più alta quantità e varietà di subunità e sottotipi nAChR nel cervello dei mammiferi. La maggior parte delle subunità del nAChR (alfa3-alfa7 e beta2-beta4) e 4 sottotipi principali (alfa4beta2, alfa4alfa5beta2, alfa6beta2beta3 e alfa4alfa6beta2beta3) sono espressi nella VTA [3]. Inoltre, abbiamo stabilito che la Hb e l'IPn contengono una serie di sottotipi nativi peculiari (alfa2beta2, alfa4beta3beta2, alfa3beta3beta4, alfa6beta3beta4), oltre ai più diffusi alfa4beta2, alfa4alfa5beta2 e alfa3beta4 sottotipi [4]. In particolare, la Hb-IPn è l'unico sistema centrale che esprime elevati livelli di subunità alfa3, beta4 e alfa5.

La scoperta di questa ricca gamma di sottotipi nAChR espressi nei circuiti della ricompensa del cervello è di grande importanza per comprendere la fisiologia nicotinica e la fisiopatologia della dipendenza. Inoltre, i sottotipi espressi selettivamente nei circuiti della ricompensa sono bersagli eccellenti per nuove terapie più selettive per la cessazione del fumo.

Lo studio dei sottotipi nAChR ha recentemente acquisito ulteriore rilevanza per la comprensione della dipen-

as the amygdala and prefrontal cortex. Critical to nicotine addiction is that neurons in the VTA express very high levels of neuronal nicotinic acetylcholine receptor (nAChR), a macromolecule that has the ability to bind and recognize nicotine (e.g., nicotine inhaled through cigarette smoke, that reaches the brain via the bloodstream). Nicotine binds and activates nAChRs and causes the activation of DA neurons that in turn trigger the process that leads to the development of addiction to tobacco smoke.

Besides the mesolimbic DA system, the habenular complex (Hb) has recently received much attention as a key nucleus mediating natural and drug reinforcement. It comprises a medial part (medial habenula, MHB) composed of ventrally located cholinergic neurons and dorsally located substance P (SP) neurons, and a lateral part (lateral habenula, LHb). The MHB, that also co-releases glutamate (Glu), projects almost exclusively to the interpeduncular nucleus (IPn) through the fasciculus retroflexus, whereas the LHb projects directly or indirectly to midbrain areas including an inhibitory input to the VTA DA neurons. The Hb and its inputs and outputs support self-stimulation. Indeed, the Hb is activated by negative reward or omission of positive reward [2].

Interestingly, both the mesolimbic and Hb-IPn systems express the highest amount and variety of nAChR subunits and subtypes in the mammalian brain. Most nAChR subunits (alpha3-alpha7 and beta2-beta4) and 4 major nAChR subtypes (alpha4beta2, alpha4alpha5beta2, alpha6beta2beta3 and alpha4alpha6beta2beta3) are expressed in the rodent VTA [3]. Moreover, we established that the Hb and IPn contain a number of peculiar native subtypes (alpha2beta2, alpha4beta3beta2*, alpha3beta3beta4*, alpha6beta3beta4*), besides the well established alpha4beta2, alpha4alpha5beta2 and alpha3beta4 subtypes. Notably, the Hb-IPn is the only central system expressing high levels of alpha3, beta4 and alpha5 subunits.*

The discovery of these rich array of nAChR subtypes expressed in brain reward circuits is of main importance to understand nicotinic physiology and the pathophysiology of addiction. Indeed, subtypes expressed selectively in reward circuits are excellent targets for new and more selective smoking cessation therapies.

The study of nAChR subtypes has recently acquired further relevance for the understanding of tobacco dependence and related diseases. In April 2008, three independent consortia [5-7] published their findings on Whole Genome Association Studies (WGAS) implicating gene polymorphisms in a locus on human chromosome 15q25 in the susceptibility to lung cancer and smoking behavior. Gene polymorphisms consist of mutations (often punctiform, i.e., a single base) that are relatively frequent in the population and are not necessary cause of illness. They may, instead, be predisposing causes



denza dal tabacco e malattie correlate. Nel mese di aprile 2008, tre consorzi indipendenti [5-7] hanno pubblicato i loro risultati di Whole Genome Association Study (WGAS) che implicano polimorfismi genici del locus cromosomico 15q25 umano nella suscettibilità al tumore polmonare e l'abitudine al fumo. I polimorfismi genici consistono in mutazioni puntiformi (cioè, di una singola base) che sono relativamente frequenti nella popolazione e non sono causa necessaria di malattia. Possono, invece, essere cause predisponenti di una condizione patologica, cioè rendere la persona che ne è portatrice più suscettibile di sviluppare una malattia. Il locus 15q25 comprende tre geni per subunità del nAChR, che codificano per le subunità alfa3, alfa5 e beta4, designati, rispettivamente, CHRNA3, CHRNA5 e CHRNB4. Studi successivi hanno mostrato un'associazione significativa tra fumo e un secondo locus che comprende i geni che codificano per le subunità alfa6 e beta3. Nel complesso, questi studi hanno dimostrato che polimorfismi in geni di subunità nAChR alterano significativamente la suscettibilità individuale a sviluppare dipendenza dal tabacco e malattie correlate, come cancro polmonare e BPCO.

Obiettivo del progetto

L'obiettivo del presente progetto è studiare il ruolo dei sottotipi di nAChR in dipendenza da nicotina in parallelo negli esseri umani e modelli animali. Più in particolare:

Negli esseri umani: Vogliamo studiare polimorfismi genici delle subunità dei nAChR in una popolazione selezionata umana, vale a dire, i fumatori che sono sottoposti a una terapia per smettere di fumare. Con questo scopo, i fumatori verranno reclutati dai Centri anti-Fumo della Regione Emilia Romagna. Inoltre, questi soggetti saranno sottoposti a una serie di test psicometrici per definire il loro profilo psicologico per quanto riguarda personalità e motivazione a smettere di fumare. L'obiettivo primario dello studio è quello di indagare la possibile associazione tra geni delle subunità dei nAChR e altri geni correlati alla funzione dei nAChR, e l'efficacia delle diverse terapie per smettere di fumare. L'obiettivo secondario dello studio è quello di indagare la possibile associazione tra gli stessi geni e i tratti psicologici del fumatore.

In modelli animali: Si propone di studiare il ruolo funzionale di un sottotipo specifico, i nAChR alfa6beta2, che viene selettivamente espressa nel sistema mesolimbico a DA, utilizzando nuove tecnologie che portano alla inattivazione selettiva o iper-espressione del recettore alfa6beta2 in neuroni a DA. Gli animali che hanno il gene alfa6 inattivato o iper-espresso saranno studiati in paradigmi sperimentali ben consolidati che modellano le caratteristiche neurochimiche e comportamentali della dipendenza da nicotina.

Lo studio combinato di esseri umani e modelli animali di malattia facilita la traduzione delle conoscenze sui meccanismi biologici nella fisiopatologia umana e apre la possibilità di sviluppare strumenti diagnostici innovativi e interventi terapeutici più efficaci.

of a pathological condition, or make the person who carries them more susceptible to developing a disease. The 15q25 locus encompasses three genes for subunits of the nAChR, the subunits coding for alpha3, alpha5 and beta4, designated CHRNA3, CHRNA5 and CHRNB4, respectively. Subsequent studies also showed significant association between smoking and a second locus that comprises the genes coding for alpha6 and beta2 subunits. Overall, these studies have demonstrated that polymorphisms in nAChR subunit genes significantly alter the individual susceptibility to develop tobacco dependence and related diseases such as lung cancer and COPD.

Objective of the proposal

The objective of the present proposal is to study the role of nAChR subtypes in nicotine addiction in parallel in humans and animal models. More specifically:

In humans: We wish to study nAChR subunit gene polymorphisms in a selected human population, i.e., smokers who are undergoing a smoking cessation therapy. With this purpose, smokers will be recruited by the Smoking Cessation Centres of the Emilia Romagna Region. Moreover, these subjects will undergo a battery of psychometric tests to define their psychological profile as regards personality and motivation to quit smoking. The primary aim of the study is to investigate the possible association between nAChR subunit genes and other genes related to nAChR function and the efficacy of different smoking cessation therapies. The secondary aim of the study is to investigate the possible association between the same genes and smoker's psychological traits.



In animal models: We propose to study the functional role of a specific subtype, the alpha6beta2 nAChRs, that is selectively expressed in the DA mesolimbic system using new technologies that lead to inactivation or selective hyper-expression of the alpha6beta2 receptor in DA neurons. The animals that have an inactivated or hyper-expressed alpha6 gene will be studied in well established experimental paradigms that models neurochemical or behavioural features of nicotine dependence.

The combined study of humans and animal models of disease facilitates the translation of the knowledge from biological mechanisms to human pathophysiology and opens up the

Contenuto dettagliato del progetto

Il progetto consiste di due parti complementari, una su esseri umani e l'altra su modelli animali.

1. Studi sull'uomo

1500 fumatori dai Centri anti-Fumo dell'Emilia Romagna e 500 non fumatori saranno reclutati per lo studio. In aggiunta alle procedure diagnostiche e terapeutiche standard dei Centri anti-Fumo, ai soggetti sperimentali sarà somministrata una batteria di test psicologici e sarà prelevato sangue, per l'estrazione del DNA, e urine, per verificare i livelli di cotinina. I test psicologici includono il test IPIP per la valutazione della personalità, il test di Fagerstrom per valutare il grado di dipendenza dal fumo, il Brief Wisconsin Inventory of Smoking Dependence Motives per la valutazione della motivazione a smettere di fumare.

Considereremo i seguenti cinque gruppi sperimentali di fumatori divisi sulla base del consumo giornaliero di sigarette e del trattamento ricevuto:

- i fumatori leggeri (≤ 10 sigarette / die) con terapia psicologica (counseling) (Gruppo I),
- i fumatori moderati (> 10 e < 22 sigarette / die), con terapia psicologica e terapia sostitutiva con nicotina (gruppo II),
- i fumatori moderati (> 10 e < 22 sigarette / die), con terapia psicologica e vareniclina (gruppo III),
- I fumatori forti (≥ 22 sigarette / die), con terapia psicologica e terapia sostitutiva con nicotina
- (gruppo IV),
- I fumatori forti (≥ 22 sigarette / die), con terapia psicologica e vareniclina (gruppo V).

Il DNA dei soggetti sarà estratto da un campione di sangue, utilizzando il DNA Blood Maxi Kit della Qiagen e quantificati con PicoGreen.

Verranno studiati polimorfismi nei geni che codificano per le subunità dei nAChR neuronali (alfa2-10 e beta2-beta4), e in geni espressi dai sistemi bersaglio della nicotina, tra cui i trasportatori e recettori della serotonina, dopamina e noradrenalina, gli enzimi per la biosintesi e catabolismo delle catecolamine, e gli enzimi per il catabolismo della nicotina (citocromo P450).

Polimorfismi a singolo nucleotide verranno ricercati in tutto il campione di casi e controlli per l'analisi di associazione [8]. La genotipizzazione verrà effettuata con il sistema IPLEX Mass Extend Gold (Sequenom).

Oltre al follow-up di routine eseguito presso i Centri anti-Fumo, i pazienti arruolati nello studio saranno riesaminate 6 mesi dopo l'inizio della terapia per verificare la permanenza di astinenza dal fumo.

possibility of developing innovative diagnostic tools and more effective therapeutic interventions.

Detailed content of the proposal

The project consists of two complementary parts, one on humans and the other on animal models.

1. Humans

1500 smokers from the Smoking Cessation Centers of Emilia Romagna and 500 non-smokers will be recruited. In addition to the standard diagnostic and therapeutic procedures of the Smoking Cessation Centers, the experimental subjects will be administered a battery of psychological tests. Blood, for the extraction of DNA, and urine, to check the levels of cotinine, will be collected. Psychological testing includes the IPIP personality assessment test, the Fagerstrom test for assessing the degree of smoking dependence, the Brief Wisconsin Inventory of Smoking Dependence Motives for the evaluation of the reasoning smoking cessation.

We will consider the following five experimental groups of smokers divided on the basis of the daily consumption of cigarettes and the treatment received:

- *Light smokers (≤ 10 cigarettes / day) with psychological therapy (counseling) (Group I),*
- *Moderate smokers (> 10 and < 22 cigarettes / day), psychological therapy and nicotine replacement (group II),*
- *Moderate smokers (> 10 and < 22 cigarettes / day), psychological therapy and varenicline (group III),*
- *Heavy smokers (≥ 22 cigarettes / day), psychological therapy and nicotine replacement (group IV),*
- *Heavy smokers (≥ 22 cigarettes / day), psychological therapy and varenicline (group V).*

The DNA of the subjects will be extracted from a sample of blood (~ 5 ml), using the DNA Blood Maxi Kit Qiagen kit and quantified with PicoGreen.

Polymorphisms in genes coding for the subunits of neuronal nAChRs (alpha2-10 and beta2-beta4), and genes expressed by nicotine target systems will be studied, including serotonin, dopamine and norepinephrine transporters and receptors, enzymes for catecholamine biosynthesis and catabolism, enzymes for nicotine catabolism (cytochrome P450).

Single nucleotide polymorphisms are typed in the entire sample of cases and controls for the analysis of association [8]. Genotyping will be performed with the system IPLEX Mass Extend Gold (Sequenom).

In addition to routine follow-up carried out by Smoking Cessation Centers, patients enrolled in the study will be reviewed in 6 months after initiation of therapy to ensure the permanence of abstinence from smoking.



2. Studi sugli animali

Ci si propone di studiare il ruolo funzionale di nAChR alfa6beta2 utilizzando nuove tecnologie che portano alla inattivazione selettiva o iper-espressione del recettore alfa6beta2 nei neuroni a DA. Abbiamo sviluppato vettori virali (virus adeno-associati-2, AAV2), che contengono un transgene o un RNA interferente per la subunità alfa6. Il processo di interferenza dell'RNA consiste nel silenziamento post-trascrizionale di un gene causato dalla degradazione sequenza-specifica del suo mRNA [9]. Vettori virali, microiniettati nel mesencefalo ventrale, permettono di infettare i neuroni a DA e incrementare (transgene) o reprimere (siRNA) l'espressione della subunità alfa6 e quindi di nAChR alfa6beta2. L'efficacia del trattamento sarà testata attraverso lo studio dei livelli di alfa6 in cellule a DA utilizzando la tecnica di ibridazione in situ (mRNA) e autoradiografia del recettore (livelli di recettore alfa6beta2) [10]. Gli animali trattati vengono poi studiati in classici modelli animali neurochimici e comportamentali per lo studio della dipendenza da nicotina.

- Come modelli animali di dipendenza da nicotina studieremo:
- Rilascio di DA dai terminali del NAc anteromediale (sub-regione Shell) indotto da nicotina, determinato con microdialisi intracerebrale [11-12].
- Attività locomotoria indotta da nicotina. L'aumento dell'attività locomotoria, analogo agli effetti psicostimolanti nell'uomo, è un comportamento legato alle proprietà rinforzanti di farmaci e dipende in parte dall'attivazione del sistema a DA [12].
- Autosomministrazione di nicotina. Questo è il modello che meglio riproduce il consumo di sigarette negli esseri umani, poiché l'animale viene posto in una gabbia in cui, premendo una leva, può attivamente autosomministrarsi nicotina, esattamente come gli uomini si auto-somministrano nicotina fumando una sigaretta [12]. Inoltre, questo metodo permette lo studio delle diverse fasi della dipendenza da nicotina, compresa la fase di mantenimento e la fase di ricaduta. ■

2. Animal studies

We propose to study the functional role of alpha6beta2 nAChRs using new technologies that lead to inactivation or selective hyper-expression of the alpha6beta2 receptor in DA neurons. We have developed viral vectors (adeno-associated virus-2, AAV2), which contain a transgene or an interfering RNA for the subunit alpha6.

The process of RNA interference consists in the post-transcriptional silencing of a gene due to sequence-specific degradation of its mRNA (by using small-interfering RNA, siRNA) [9]. Viral vectors, microinjected in the ventral midbrain, allow to infect DA neurons and increase (transgene) or repress (siRNA) the expression of the receptor subunit alpha6 and then of alpha6beta2 nAChR. The efficacy of the treatment will be tested through the study of the levels of alpha6 in DA cells using in situ hybridization technique (mRNA levels) and receptor autoradiography (alpha6beta2 receptor levels) [10]. The treated animals are then studied in classical neurochemical and behavioral animal models for the study of nicotine dependence.

As animal models of nicotine dependence we will study:

- *Nicotine-induced release of DA from terminals in antero-medial Nac (Shell sub-region) as determined by intracerebral microdialysis [11,12].*
- *Locomotor activity induced by nicotine. The increase in locomotor activity, similar to the effects of psychostimulants in humans, is a behavior related to the reinforcing properties of drugs and is partly dependent on the activation of DA system [12].*
- *Self-administration of nicotine. This is the model that most closely reproduces the cigarette consumption in humans, as the animal is placed in a cage in which, by pressing a bar, can actively self-administer nicotine, just as men are self-administering nicotine when smoking a cigarette [12]. Indeed, this method allows the study of different phases of nicotine addiction, including the maintenance and relapse phases. ■*

Disclosure: gli autori dichiarano l'assenza di conflitto d'interessi.

BIBLIOGRAFIA

1. Di Chiara G (2000) Role of dopamine in the behavioural actions of nicotine related to addiction. *Eur J Pharmacol* 393:295-314
2. Picciotto MR, Kenny PJ (2013) [Molecular mechanisms underlying behaviors related to nicotine addiction](#). *Cold Spring Harb Perspect Med* 3(1):a012112.
3. Zoli M, Moretti M, Zanardi A, McIntosh MJ, Clementi F, Gotti C (2002) Identification of the nicotinic receptor subtypes expressed on dopaminergic terminals in the rat striatum. *J Neurosci* 22:8785-9.
4. Grady SR, Moretti M, Zoli M et al (2009) [Rodent habenulo-interpeduncular pathway expresses a large variety of uncommon nAChR subtypes, but only the alpha3beta4* and alpha3beta3beta4* subtypes mediate acetylcholine release](#). *J Neurosci* 29:2272-82.

5. Amos, C. I. et al. Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. *Nat Genet* 40, 616-622 (2008).
6. Hung, R. J. et al. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature* 452, 633-637 (2008).
7. Thorgeirsson, T. E. et al. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature* 452, 638-642 (2008).
8. Zondervan KT, Cardon LR (2007) Designing candidate gene and genome-wide case-control association studies. *Nat Protoc.* 4:743-52.
9. Ziviani E et al (2010) Long-term nicotine signalling mediated by Ca2+/CREB-dependent

upregulation of type 2 ryanodine receptors. submitted.

10. Champtiaux N et al (2002) Distribution and pharmacology of alpha6-containing nicotinic acetylcholine receptors analysed with mutant mice. *J Neurosci* 22: 1208-17.
11. Picciotto MR, Zoli M et al (1998) Acetylcholine receptors containing beta2 subunits are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature*, 391, 173-177.
12. Gotti C et al (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. *J Neurosci* 30(15):5311-25.