

A tutta la mia famiglia

per l'immenso sostegno

lungo tutto questo percorso

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Farmacologia, Chemioterapia e Tossicologia Mediche



Corso di Dottorato di Ricerca in:

Farmacologia, Chemioterapia e Tossicologia Mediche

XXIII Ciclo

Tesi di Dottorato di Ricerca

CARATTERIZZAZIONE FARMACOLOGICA E FUNZIONALE DI
NUOVI LIGANDI DEI RECETTORI COLINERGICI NICOTINICI
NEURONALI CHE MODULANO IL RILASCIO DI DOPAMINA
NELLA VIA MESOSTRIATALE, UNA VIA IMPORTANTE PER GLI
EFFETTI COMPORTAMENTALI DELLA NICOTINA

Docente guida: Dott.ssa C. Gotti

Coordinatore: Chiarissimo Prof. A. Panerai

Tesi di:
Luca Pucci

Anno Accademico 2009-2010

RIASSUNTO

I recettori colinergici nicotinici (nAChR) sono il bersaglio della nicotina, la principale componente psicoattiva del tabacco e il fumo di sigaretta è considerata una delle principali cause di morte al mondo. La nicotina legandosi ai nAChR favorisce il rilascio di dopamina (DA) nello striato. Studi di *imaging* in vivo compiuti su animali anestetizzati hanno dimostrato che a seguito di iniezione di nicotina le aree cerebrali maggiormente attivate sono quelle che compongono la via mesolimbica: mesencefalo, striato e corteccia prefrontale. Questi dati sono stati ulteriormente confermati attraverso studi di tomografia ad emissione di positroni (PET) compiuti su soggetti umani fumatori.

Una caratteristica che contraddistingue la via mesolimbica rispetto agli altri circuiti neuronali è la presenza di un particolare sottotipo di nAChR contenente la subunità $\alpha 6$. In modelli animali è stata dimostrata l'importanza del recettore $\alpha 6\beta 2^*$ sugli effetti neurochimici e comportamentali della nicotina, inoltre studi biochimici e farmacologici hanno evidenziato la riduzione di questo sottotipo recettoriale in patologie neurodegenerative quali le malattie di Alzheimer e Parkinson.

Il recettore $\alpha 6\beta 2^*$ modula il rilascio di DA nello striato ma la mancanza di molecole e farmaci in grado di legare specificamente questo sottotipo rende difficile lo studio in vivo del ruolo fisiologico di questo sottotipo e il suo ruolo nel mediare gli effetti della nicotina

A livello dei terminali dopaminergici nello striato in posizione presinaptica sono presenti, oltre ai nAChR, anche i recettori D2/D3 e questi recettori regolano sia la sintesi che il rilascio della DA

Durante il mio dottorato di ricerca mi sono quindi occupato di due progetti entrambi volti a scoprire nuove molecole in grado di legare con maggiore selettività il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$:

1. Sintesi e caratterizzazione farmacologica di nuove α -conotossine (α -CTx) ibride derivate dalle α -CTx naturali MII e PIA.
2. Caratterizzazione farmacologia e funzionale di ligandi bifunzionali che modulano il rilascio di DA attraverso il legame con i nAChR (sottotipi $\alpha 6\beta 2$ e $\alpha 4\beta 2$) e il recettore dopaminergico D2.

Sintesi e caratterizzazione farmacologica di nuove α -CTx ibride derivate da MII e PIA.

Le α -CTx sono una famiglia di piccoli peptidi prodotti dalle lumache di mare dette *Conus*, questa specie animale produce un veleno all'interno del quale è presente un cocktail di peptidi che viene utilizzato per paralizzare la preda. Esistono molte famiglie di conotossine, oltre 500 specie diverse, che offrono un'ampia gamma di piccole molecole molto interessanti dal punto di vista farmacologico in quanto specifiche per varie famiglie recettoriali.

Alla sottofamiglia delle α -CTx appartengono varie sottospecie che sintetizzano peptidi in grado di legarsi ai nAChR $\alpha 6\beta 2^*$. Finora due sottospecie di α -CTx sono state approfonditamente studiate a livello biologico: PIA isolata da *Conus Purpurascens* e MII isolata da *Conus Magus*. Lo scopo di questo progetto è stato la caratterizzazione sia dal punto di vista farmacologico, che dal punto di vista funzionale, di nuovi peptidi ibridi analoghi di MII in grado di legare con maggiore affinità e selettività il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$.

La caratterizzazione di questi nuovi analoghi peptidici è stato svolto su nAChR $\alpha 6\beta 2^*$ nativi immunoimmobilizzati di ratto. Mediante l'utilizzo di un modello tridimensionale del recettore $\alpha 6\beta 2$ sono state identificate le interazioni tra le α -CTx e il recettore e alla luce di queste interazioni sintetizzati nuovi peptidi mutati con una selettività e affinità superiore rispetto alle α -CTx native. I dati sono stati infine confermati con saggi funzionali su fettine di cervello di ratto tramite esperimenti di rilascio di neurotrasmettitori radioattivi.

Studio di ligandi bifunzionali che modulano il rilascio di DA attraverso il legame con nAChR e il recettore dopaminergico D2.

Recenti studi hanno indicato che il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ a livello presinaptico nei terminali dopaminergici è in grado di interagire fisicamente con il recettore dopaminergico D2. Il recettore D2 appartiene alla categoria di recettori associati a proteine G e a livello presinaptico inibisce il rilascio di DA dal terminale.

Abbiamo quindi deciso di sintetizzare una nuova categoria di molecole, composte da due farmaci (uno in grado di legare i nAChR, e l'altro il recettore D2) uniti tramite una catena di carbonio di lunghezza variabile.

Preliminarmente sono stati eseguiti studi di tipo farmacologico sui recettori $\alpha6\beta2^*$ e $\alpha4\beta2^*$ immunoimmobilizzati per valutarne l'affinità ai nAChR e successivamente mediante esperimenti funzionali condotti sia su fettine di striato di ratto che su sinaptosomi di topi C57BL WT e KO per le subunità nicotiniche $\alpha4$ e $\alpha6$, è stata valutata la capacità di queste nuove molecole di regolare il rilascio di DA agendo su entrambi i recettori, nAChR e D2.

INDICE

	<i>pag</i>
INTRODUZIONE	8
<i>I RECETTORI NICOTINICI</i>	10
<i>I RECETTORI NICOTINICI PRESENTI NEL SISTEMA NERVOSO</i>	14
• <u>Siti di legame per l'Acetilcolina</u>	16
<i>SISTEMA DOPAMINERGICO MESOSTRIATALE</i>	19
• <u>Neuroni dopaminergici del mesencefalo e loro proiezioni</u>	19
• <u>Anatomia e ruolo del sistema dopaminergico mesostriatale</u>	20
• <u>Controllo colinergico della trasmissione dopaminergica</u>	24
<i>EFFETTI DELLA NICOTINA A LIVELLO DEL SNC</i>	26
• <u>Ruolo dei sottotipi di nAChR nel controllo dell'attività dei neuroni della via mesolimbica</u>	28
• <u>Ruolo dell'interazione colinergica e dopaminergica nel controllo degli effetti della nicotina</u>	31
• <u>Ruolo dei recettori $\alpha6\beta2^*$ nella via dopaminergica</u>	33
• <u>Interazione tra nAChR e recettori dopaminergici</u>	34
<i>α-CONOTOSSINE</i>	37
SCOPO DELLA RICERCA	40
MATERIALI E METODI	42
RISULTATI	
• <i>α-CONOTOSSINE</i>	54
• <i>LIGANDI BIVALENTI</i>	62
DISCUSSIONE	92
BIBLIOGRAFIA	100

ABBREVIAZIONI

α -BgTx, α -Bungarotossina
 α -CTx, α -conotossine
Ab/Abs, anticorpo/i
ACh, acetilcolina
AChBP, acetylcholine-binding protein
BCA, acido bicinconinico
BPB, area pigmentata parabrachiale
BSA, albumina serica di bovino
cAMP, adenosina-monofosfato ciclico
CAs, neuroni catecolaminergici
CPP, conditioned place preference
CPu, nucleo caudato putamen
d- β -E, di-idro- β -Eritroidina
DA, dopamina
Epi, epibatidina
GPCR, recettori accoppiati a proteine G
HD, malattia di Huntington
ImI, α -conotossina ImI
IPN, nucleo interpeduncolare
KO, knock out
LBD, ligand binding domain
LDTg, nucleo tegmentale laterodorsale
MII, α -conotossina MII
NA, noradrenalina
NAc, nucleo accumbens
nAChR, recettori nicotinici neuronali per l'acetilcolina
o/n, over night
PD, malattia di Parkinson
PET, tomografia ad emissione di positroni
PFC, corteccia prefrontale
PFR, area retroflessa parafascicolare
PIA, α -conotossina PIA
PN, nucleo paranigrare
PPTg, nucleo tegmentale peduncolopontino
rpm, rivoluzioni per minuto
RT, temperatura ambiente
SN, substantia nigra
SNC, sistema nervoso centrale
Snc, substantia nigra pars compacta
SNP, sistema nervoso periferico
SNPs, polimorfismo di un singolo nucleotide
SNr, substantia nigra pars reticulata
TH, tiroxina idrossilasi
VTA, area tegmentale ventrale
VTT, coda tegmentale ventrale
WT, wilde type

Ogni anno più di cinque milioni di persone nel mondo muoiono per le conseguenze del fumo di sigaretta. Sebbene la maggioranza degli effetti dannosi indotti dal fumo di sigaretta sia dovuta a sostanze additive e a prodotti di combustione del tabacco, è universalmente accettato che lo sviluppo e il mantenimento della dipendenza sono determinati dalla nicotina. Come può una semplice sostanza come la nicotina avere un così grande effetto sul comportamento umano? Rispondere a questa domanda è diventato possibile ora che sono stati chiariti gli effetti a livello molecolare della nicotina, i suoi target biologici e gli effetti fisiologici e comportamentali di questa sostanza. La nicotina infatti, oltre ad agire come agonista dei recettori nicotinici colinergici neuronali (nAChR), è responsabile dei fenomeni di plasticità sinaptica e neuronale, che intervengono nel sistema dopaminergico mesostriatale durante l'instaurarsi ed il protrarsi della dipendenza da fumo di sigaretta.

L'azione della nicotina è mediata dai nAChR, una famiglia eterogenea di sottotipi recettoriali attivati dall'acetilcolina (ACh) e nicotina, ottenuti dalla diversa combinazione di un elevato numero di subunità. Per capire il contributo di ciascun sottotipo allo sviluppo della dipendenza da nicotina, sono state sviluppate nuove strategie di indagine. Queste includono principalmente la creazione e caratterizzazione di animali deleti (Knock-out, KO) di una singola o più subunità nicotiniche (Greenbaum et al., 2009; Picciotto et al., 1999), di animali esprimenti subunità nicotiniche con selettive mutazioni aminoacidiche che ne determinano un'alterazione della funzione (*gain of function*) (Drenan et al., 2008; Tapper et al., 2004) e infine la riespressione, inducibile o tramite vettori virali, dei geni deleti in selettive aree o cellule del sistema nervoso centrale dei topi KO (Avale et al., 2008). In questi modelli animali sono stati quindi caratterizzati gli effetti neurochimici, elettrofisiologici e comportamentali indotti dalla nicotina (Mameli-Engvall et al., 2006; Maubourguet et al., 2008).

Le aree cerebrali coinvolte nella dipendenza da nicotina sono molte e includono i neuroni dopaminergici presenti nell'Area Tegmentale Ventrale (VTA) del mesencefalo che proiettano alla Corteccia Prefrontale (PFC), alle aree limbiche e alle strutture striatali, in particolare il Nucleo Accumbens (NAc); l'amigdala, l'ippocampo e il sistema abenulointerpeduncolare (Davis and Gould, 2009; Govind et al., 2009; Koob and Le Moal, 2008; Salas et al., 2009).

Studi di *imaging* hanno dimostrato che l'iniezione in acuto di nicotina in animali anestetizzati aumenta l'attivazione della corteccia prefrontale, frontale anteriore, e somatosensoriale, il NAc, la VTA, la Substantia Nigra (SN) e il talamo ma non la corteccia motoria e l'amigdala (Suarez et al., 2009), indicando quindi che le aree cerebrali maggiormente attivate sono quelle che compongono la via mesolimbica.

Lo studio dei Neuroni Catecolaminergici (CAs) nel cervello risale al 1960, infatti, grazie all'utilizzo della formaldeide come colorante istologico, Charlson, Falck e Hillarp hanno identificato per primi le due classi fondamentali dei CAs: i neuroni noradrenergici e dopaminergici. Due anni dopo Dahlstrom e Fuxe pubblicarono il primo resoconto dettagliato della distribuzione di questa tipologia di neuroni nel cervello di ratto. Essi identificarono dodici gruppi (denominati gruppi A1-A12) distribuiti dalla medulla oblungata fino all'ipotalamo e successivamente il gruppo di Hokfel ne identificò altri cinque (A13-A17) localizzati nel diencefalo, bulbo olfattorio e retina.

Questa nomenclatura (A1-A17) è tuttora mantenuta e utilizzata per due motivi: primo, perchè nella maggior parte dei casi i CAs non sono ascrivibili ad una sola struttura anatomica cerebrale e, secondo, poichè la distribuzione dei corpi cellulari di questa categoria di neuroni varia a seconda della specie presa in esame, l'uso della nomenclatura A1-A17 permette di comparare dati ottenuti in specie diverse.

Negli anni '70, l'impiego delle tecniche di immunocistochimica per l'identificazione degli enzimi che caratterizzano i CAs (tiroxina idrossilasi, TH) (aminodecarbossilasi aromatica acida, AADC) (dopamina- β -idrossilasi, DBH), ha permesso di mappare dettagliatamente il sistema dei CAs, e operare precise sottodivisioni dei vari gruppi.

La distribuzione dei nove maggiori gruppi di neuroni dopaminergici (esclusa la retina) è stata analizzata tramite immunocistochimica della TH, l'enzima che trasforma la L-tirosina in L-DOPA, intermedio di sintesi della dopamina (DA). Questa tecnica ha permesso di scoprire che, alcuni neuroni dopaminergici presenti nell'ipotalamo basale e nel bulbo olfattorio coesprimevano i neurotrasmettitori DA e acido- γ -aminobutirrico (GABA) e, di definire un quadro anatomico più complesso con i neuroni dopaminergici presenti in tre precise regioni: A-8 (area retrorubrale), A-9 (SN) e A-10 (VTA).

I RECETTORI NICOTINICI

I nAChR appartengono alla superfamiglia genica dei canali ionici attivati da ligando che comprende anche i recettori nicotinici muscolari, i recettori GABA_A, recettori della Glicina e della Serotonina (Karlín et al., 2002).

Molte delle nostre conoscenze riguardo alla struttura e funzione dei nAChR derivano dallo studio del recettore colinergico nicotinico muscolare (Le Novère et al., 2002; Lindström et al., 2000b), e hanno dimostrato che le due classi di recettori, muscolare e neuronale, pur presentando numerose similarità sono chiaramente distinte e diverse.

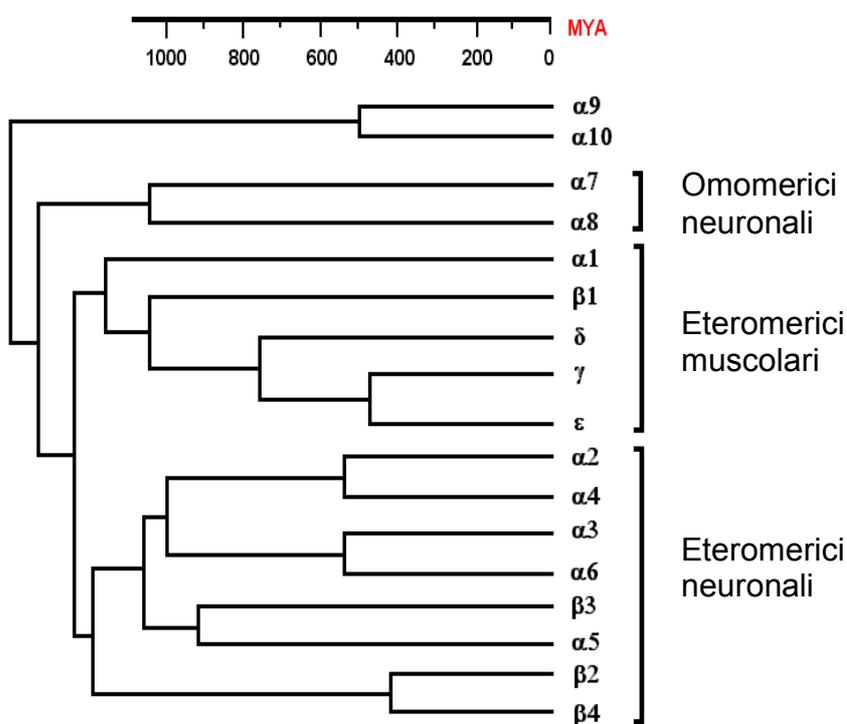


FIG 1: Schema del putativo albero evolutivo delle subunità del recettore nicotinico muscolare e neuronale. MYA (milioni di anni fa).

I nAChR formano una classe eterogenea di recettori pentamerici, le cui proprietà farmacologiche e biochimiche sono determinate dalle caratteristiche delle cinque subunità che si assemblano per delimitare il poro centrale.

Ciascuna delle cinque subunità dei recettori è formata da un unico filamento di aminoacidi caratterizzato da un terminale amminico extracellulare, che inizia un lungo dominio idrofilico di circa 200 aminoacidi, al quale seguono quattro segmenti

idrofobici (M1, M2, M3, e M4) connessi tra loro da brevi anse. La proteina attraversa la membrana plasmatica quattro volte a livello dei quattro segmenti idrofobici. Tra i segmenti M3 e M4 è presente un lungo tratto di sequenza intracellulare e dopo il quarto segmento transmembrana M4 vi è una breve coda extracellulare conclusa dal terminale carbossilico (Corringer et al., 2000).

Le subunità si organizzano in pentameri affiancando i domini M2 che formano un poro selettivamente permeabile ai cationi.

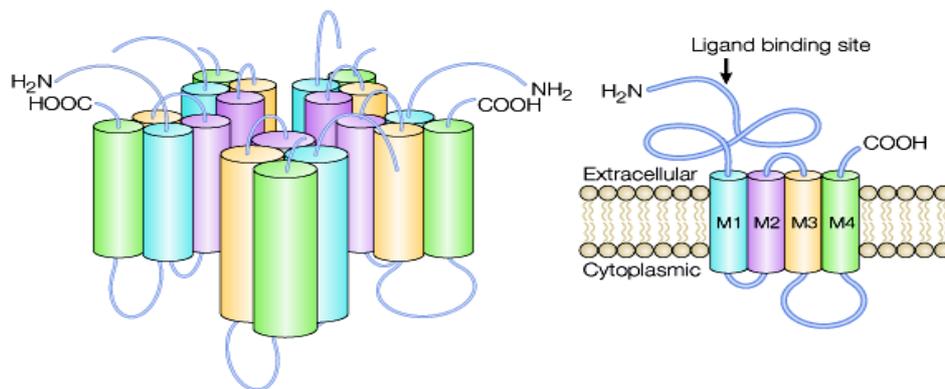


FIG 2: Struttura dei nAChR con rappresentazione schematica della struttura quaternaria del recettore.

Tecniche di clonaggio molecolare hanno portato all'identificazione di dodici geni che codificano per nove subunità α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) e tre subunità β ($\beta 2$ - $\beta 4$), che sono espresse nel sistema nervoso, coclea, e in tessuti non neuronali (Gotti et al., 2009; Gotti et al., 2006; Gotti et al., 2007; Lindstrom et al., 2000a). I recettori sono formati da cinque subunità che sono state classificate in subunità α (o subunità leganti) ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 8$ e $\alpha 9$), se nella regione N-terminale extracellulare contengono il ponte disolfuro tra due cisteine adiacenti (analoghe alle cisteine 192-193 della subunità $\alpha 1$ del sottotipo muscolare), e subunità β (o strutturali) ($\beta 2$, $\beta 3$ e $\beta 4$) se non contengono queste cisteine legate dal ponte disolfuro. Diversi studi hanno dimostrato che entrambi i tipi di subunità contribuiscono alla specificità farmacologica dei sottotipi recettoriali (Corringer et al., 2000).

Studi di espressione in sistemi eterologhi hanno mostrato che le diverse combinazioni di subunità α e β danno luogo a molteplici sottotipi di recettori eteromerici, mentre le subunità $\alpha 7$, $\alpha 8$ e $\alpha 9$ formano da sole un sottotipo omomero di recettore (Xiao et al., 2004). Tuttavia non tutte le combinazioni di subunità possono formare recettori eteromerici e solo la coiniezione delle subunità $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ e $\alpha 6$ con le subunità $\beta 2$ o $\beta 4$, determina l'espressione, sulla superficie degli ovociti, di recettori funzionanti eteromerici, ognuno caratterizzato da un profilo farmacologico e elettrofisiologico specifico, con una comune caratteristica che è quella di essere insensibili all' α -bungarotossina (α -BgTx) (Gotti and Clementi, 2004).

I recettori omomerici formati dalle subunità $\alpha 7$, $\alpha 8$ o $\alpha 9$ sono recettori canale la cui apertura è modulata dagli agonisti e bloccata dall' α -BgTx (Lindstrom et al., 2002).

Le subunità $\alpha 5$ e $\beta 3$ non sono in grado di formare da sole o in associazione con una sola subunità α o una sola subunità β un canale funzionante. Infatti queste subunità, dette accessorie, sono in grado di formare un canale funzionante solo se sono coesprese con altre subunità α e β . La coespressione della subunità $\alpha 5$ con le subunità $\alpha 4$ e $\beta 2$ determina la formazione di un sottotipo $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ con caratteristiche farmacologiche e funzionali diverse da quelle del sottotipo $\alpha 4\beta 2$ (Broadbent et al., 2006).

A differenza dei recettori muscolari, i nAChR neuronali espressi sia in sistemi eterologhi che in situ sui neuroni, hanno un'alta permeabilità al Ca^{2+} che varia nei diversi sottotipi e li rende quindi fondamentali nella regolazione di numerosi processi fisiologici.

Un ulteriore grado di complessità nella struttura dei nAChR in quei sottotipi che presentano la stessa composizione in subunità, è data dalla diversa stechiometria delle subunità. In sistemi eterologhi esperimenti il sottotipo recettoriale $\alpha 4\beta 2$ è stato dimostrato che ad un cambiamento nel rapporto tra le subunità $\alpha 4$ e $\beta 2$ corrisponde una diversa sensibilità all'agonista, che correla con l'andamento bifasico della curva dose-risposta per l'ACh di questo sottotipo recettoriale (Cooper et al., 1991; Moroni and Bermudez, 2006). In particolare le cellule che overesprimono la subunità $\alpha 4$ presentano un'affinità per l'ACh ($\text{EC}_{50} = 100 \mu\text{M}$) minore rispetto a quelle che overesprimono la subunità $\beta 2$ ($\text{EC}_{50} = 1 \mu\text{M}$), inoltre le due differenti stechiometrie presentano una diversa permeabilità al Ca^{2+} .

Dal punto di vista funzionale, i nAChR possono esistere in quattro conformazioni: a riposo, aperto e in due stati chiusi desensitizzati (I o D). Le molecole che legano e stabilizzano lo stato aperto sono agonisti totali o parziali e le molecole che stabilizzano lo stato chiuso sono antagonisti competitivi o non competitivi. I modulatori allosterici positivi o negativi dei nAChR facilitano o rendono più difficile la transizione del recettore dallo stato di riposo a quello aperto indotta dall'interazione con l'agonista.

In assenza di ligando il canale è chiuso e il recettore si trova in uno stato di riposo (R), una breve esposizione a dosi relativamente alte di agonista (ACh, nicotina) induce un riarrangiamento strutturale che causa l'apertura del canale e sposta il recettore nello stato attivo (A), nel giro di millisecondi il canale si chiude nonostante l'agonista sia ancora legato con alta affinità, si dice che il recettore è in uno stato desensitizzato (D) quando questo stato si protrae a lungo termine e il recettore si trova nello stato inattivo (I) (Changeux and Edelstein, 1998). Questi stati funzionali sono interconvertibili ed il passaggio da uno stato all'altro è associato a cambiamenti conformazionali del recettore; le cinetiche che descrivono le transizioni strutturali sono comprese tra millisecondi e minuti e sono strettamente dipendenti dal sottotipo recettoriale o dall'interazione con modulatori allosterici. La transizione tra i diversi stati del recettore può anche essere regolata dalla fosforilazione.

I RECETTORI NICOTINICI PRESENTI NEL SISTEMA NERVOSO

La diversa espressione degli mRNA per le subunità nicotiniche e la colocalizzazione di diversi mRNA nella stessa cellula possono generare una diversa distribuzione e localizzazione delle subunità, che possono quindi assemblarsi e formare sottotipi con variabili proprietà elettriche, farmacologiche e funzionali e con localizzazione diversa nei diversi compartimenti subcellulari.

Gli studi di autoradiografia, legame recettoriale, immunistochemica, ibridazione in situ e biochimica hanno dimostrato che i sottotipi maggiormente espressi a livello del SNC sono i sottotipi $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 7$. Il primo risulta essere particolarmente espresso nella corteccia, nell'ippocampo, nelle regioni limbiche subcorticali e a bassi livelli nel talamo e nei gangli della base. I nAChR $\alpha 4\beta 2^*$ (l'asterisco indica la presenza di altre subunità nel recettore pentamerico) rappresentano il 90% dei nAChR ad alta affinità per gli agonisti. Il sottotipo $\alpha 3\beta 4$ risulta essere quello predominante nel sistema nervoso periferico (SNP), nei gangli autonomici e nella midollare del surrene, ed è presente in popolazioni neuronali dell'abenula mediale, del Nucleo Interpeduncolare (IPN), della ghiandola pineale e della retina. Da studi di ibridazione in situ è emerso che il sottotipo $\alpha 2\beta 2$ è espresso in molte regioni del cervello di primati, mentre nei roditori risulta essere limitato alla retina e all'IPN (Han et al., 2000; Moretti et al., 2004).

La disponibilità dei tessuti neuronali ottenuti da aree diverse del SNC di topi WT e KO hanno permesso la caratterizzazione biochimica e farmacologica nella via mesostriatale e nella via abenulo-interpeduncolare, di sottotipi con una composizione in subunità più complessa, con recettori eteromerici contenenti fino a quattro diverse subunità ($\alpha 6\alpha 4\beta 2\beta 3$, $\alpha 4\alpha 5\beta 2$, $\alpha 3\beta 3\beta 4$) (Gotti et al., 2009; Gotti et al., 2005).

I nAChR omomerici $\alpha 7$ sono distribuiti in modo eterogeneo nelle diverse aree cerebrali e possono avere localizzazione presinaptica dove mediano il rilascio diretto di glutammato dall'ippocampo e dalla VTA e di aminoacidi eccitatori nella PFC e il rilascio indiretto di DA nel corpo striato e nella PFC e di noradrenalina (NA) dall'ippocampo, oppure possono localizzarsi nella postsinapsi e nelle regioni somatodendritiche dove producono effetti a lungo termine sull'espressione genica e sulle vie metaboliche.

Gli studi di ibridizzazione in situ, immunolocalizzazione e biochimica, accanto agli studi di elettrofisiologia in neuroni isolati o su fettine di cervello, hanno permesso di identificare nello stesso neurone la presenza contemporanea di più sottotipi recettoriali.

I meccanismi cellulari e molecolari che controllano questa eterogeneità recettoriale non sono ancora chiari e si pensa che questa complessità e diversità sia uno degli strumenti attraverso i quali le cellule nervose possano modulare l'eccitabilità e l'intensità delle risposte in funzione degli stimoli a cui sono esposte.

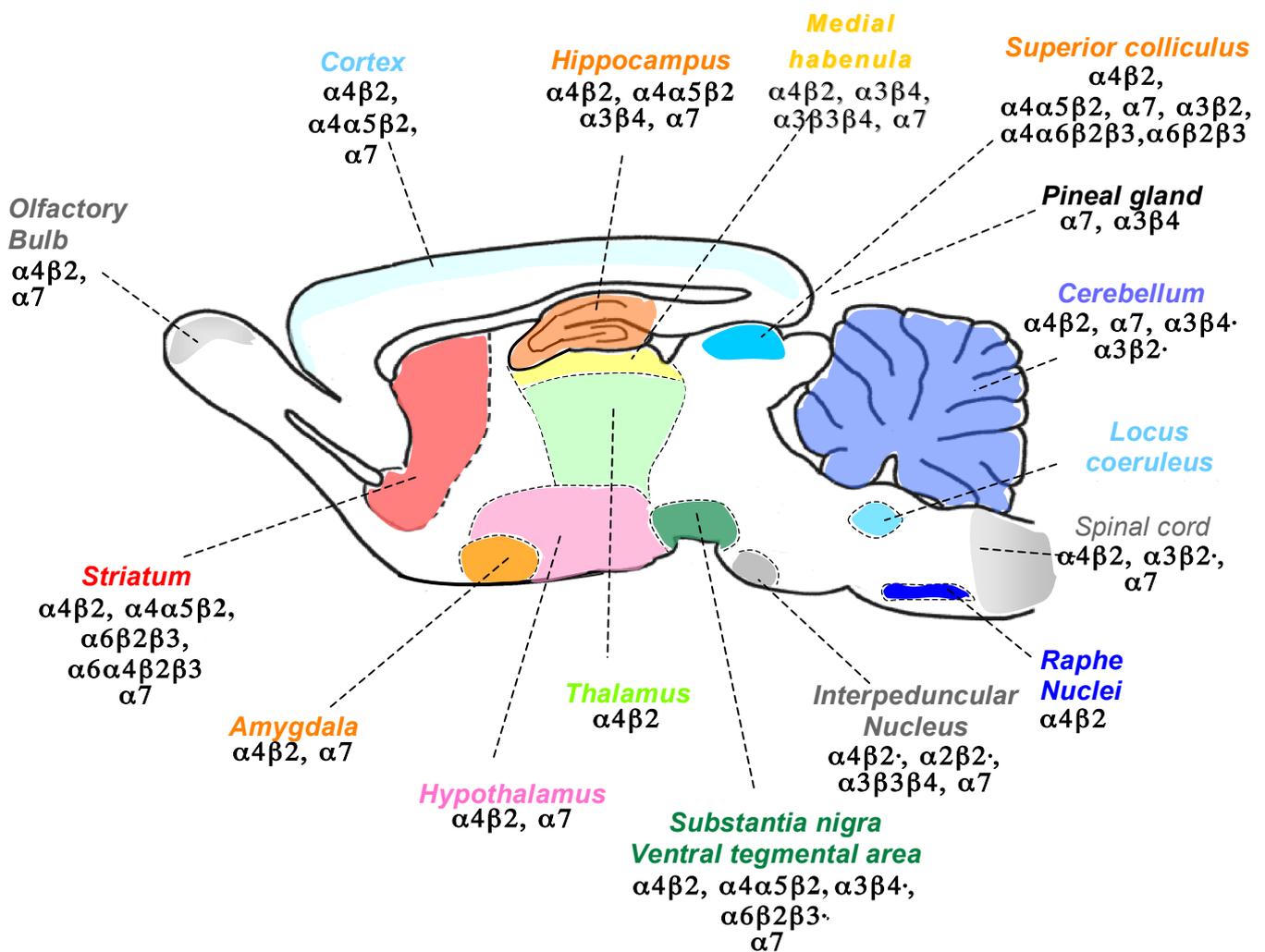


FIG 3: Distribuzione regionale dei principali sottotipi recettoriali nel SNC di roditore

- **Siti di legame per l'Acetilcolina**

Il sito di legame per l'agonista si localizza in tasche idrofobiche situate all'interfaccia tra una subunità α ed una subunità adiacente che contribuiscono rispettivamente alla componente primaria e a quella complementare del sito di legame. Nei recettori eteromerici insensibili all' α -BgTx sono presenti due siti di legame in cui le subunità $\alpha 2$ - $\alpha 4$ e $\alpha 6$ forniscono la componente primaria e le subunità $\beta 2$ e $\beta 4$ quella complementare, in quelli sensibili all' α -BgTx sono le subunità $\alpha 7$ e $\alpha 9$ a fornire la componente primaria e la complementare è portata rispettivamente dalle subunità $\alpha 8$ e $\alpha 10$. Una situazione diversa si riscontra nei recettori omomerici in cui su domini opposti delle singole subunità $\alpha 7$, $\alpha 8$ o $\alpha 9$ si trovano sia la componente primaria sia quella complementare, che si assemblano a formare i cinque siti di legame.

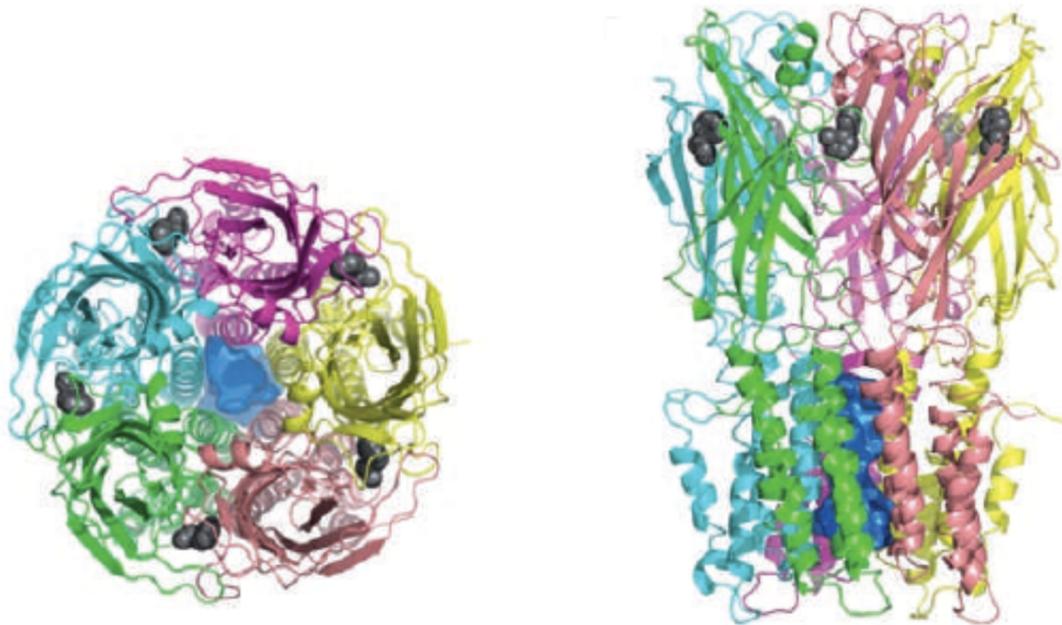


FIG 4: *Acetylcholine-binding protein (AChBP)*

Struttura pentamerica dell'AChBP vista (sinistra) dall'alto e (destra) perpendicolarmente all'asse di simmetria; sono anche raffigurati i siti di legame dell'ACh (Taly et al., 2009).

I siti di legame per l'ACh sono localizzati nella porzione recettoriale che protrude dal lato sinaptico, formata dai domini N-terminale di ogni subunità e contiene domini specializzati per il legame dell'ACh noti come *ligand binding domains* (LBD); il LBD è formato da 210 aminoacidi e contiene siti di legame sia per agonisti che per antagonisti competitivi.

La conoscenza della struttura dei domini extracellulari si è avvalsa soprattutto degli studi fatti sulla *Acetylcholine-binding protein* (AChBP), una proteina secreta dalla lumaca marina *Limnaea Stagnalis*, e dalla determinazione della sua struttura ad una risoluzione di 2.7° A (Taly et al., 2009).

L'allineamento delle sequenze aminoacidiche di AChBP e dei LBD di alcuni membri di canali ionici attivati da ligando mostra una buona omologia di sequenza (15-20%) con i recettori GABA, Glicina e Serotonina e la più alta con i nAChR (25%). Quasi tutti i residui conservati tra i membri della famiglia di nAChR sono presenti in AChBP, inclusi quelli rilevanti per il legame dei ligandi; inoltre AChBP lega alcuni agonisti ed antagonisti nicotinici come la nicotina, l'ACh, la d-tubocurarina e l' α -BgTx e mostra le stesse proprietà farmacologiche del sottotipo $\alpha 7$ (Celie et al., 2004). Molti residui aminoacidici contribuiscono al sito di legame dell'ACh. Essi sono raggruppati in corte sequenza che formano le anse (loop) A, B e C (nella componente principale) e D, E ed F (nella componente complementare). All'interno della struttura compatta dell'AChBP, al centro dell'interfaccia del LBD le anse A, B, D ed F formano una tasca idrofobica ricoperta dall'ansa C.

Lo studio dei co-cristalli dell'AChBP con i ligandi nicotinici ha stabilito che i residui conservati del sito di legame sono gli aminoacidi aromatici : tirosina (Y) 93 (ansa A), triptofano (W) 149 e Y151 (ansa B), Y190 e Y198 (ansa C), W55 e W57 (ansa D) (la numerazione si riferisce agli aminoacidi presenti nel recettore muscolare presente nella Torpedo) e il ponte disolfuro tra le cisteine (C) 192 e 193. I residui aromatici e il ponte disolfuro del sito di legame hanno un carattere elettronegativo, che neutralizza la carica positiva portata dalla maggior parte dei ligandi nicotinici. Il legame dell'ACh determina quindi un'interazione non covalente tra il catione e il sistema π ricco di elettroni del residuo di W presente nell'ansa B. In generale l'ammonio terziario o quaternario dei ligandi nicotinici si lega quindi al centro della tasca aromatica idrofobica costituita dai residui delle anse A, B, C e D.

Studi ai raggi X della AChBP in presenza di agonisti o antagonisti hanno dimostrato che in assenza di agonista o in presenza dell'antagonista, l'ansa C non ricopre la tasca idrofobica mentre in presenza dell'agonista il sito di legame assume una conformazione chiusa con il *loop* C che ricopre la tasca idrofobica.

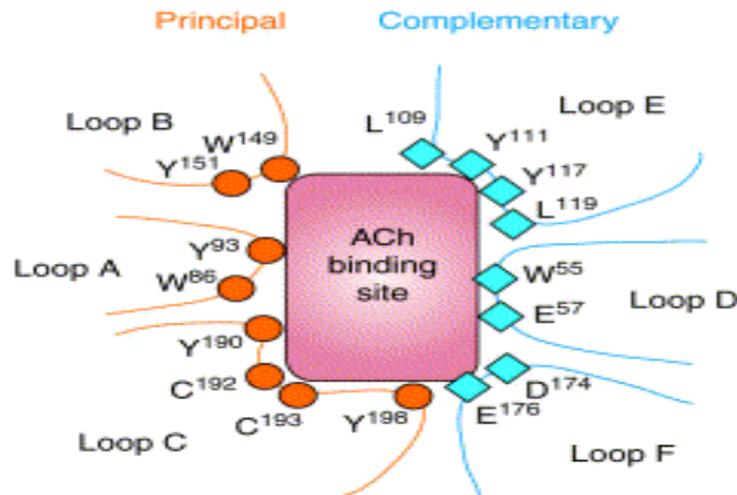


FIGURA 5:

Le due componenti del sito di legame dell'ACh nei nAChR : la componente principale nella subunità α è formata dai *loops* A, B e C, la componente complementare dai *loops* E, D e F.

Anche nel caso dei recettori eteromerici, come il sottotipo $\alpha 4\beta 2$, è stato dimostrato che il sito di legame per l'ACh è in una piccola tasca formata tra la subunità $\alpha 4$ e quella adiacente $\beta 2$. Quindi entrambe le subunità α e β contribuiscono alla farmacologia dei due siti di legame che vengono a formarsi sullo stesso recettore. Nei recettori omomerici, come per esempio $\alpha 7$, il sito di legame si trova all'interfaccia tra due regioni diverse di subunità uguali adiacenti per un totale di cinque siti di legame sullo stesso recettore.

L'identificazione degli aminoacidi importanti per la selettività dei sottotipi ha mostrato che, nel caso dei sottotipi $\alpha 7$ o $\alpha 4\beta 2$, i residui variabili che contribuiscono al sito di legame non sono inclusi nella tasca aromatica idrofobica e si possono trovare sia nella subunità principale che in quella complementare (Taly et al 2009).

SISTEMA DOPAMINERGICO MESOSTRIATALE

La conoscenza dell'organizzazione e delle proprietà dinamiche del sistema dopaminergico sono essenziali per la comprensione del ruolo della DA nel controllo di un'ampia gamma di funzioni come l'attività locomotoria, la postura, la coordinazione dei movimenti e il tono muscolare, le funzioni cognitive, l'affettività, l'attenzione, le risposte allo stress e i meccanismi di gratificazione e rinforzo che stanno alla base dell'instaurarsi dei fenomeni di dipendenza dalle sostanze d'abuso come la nicotina.

Il fenomeno della dipendenza viene visto come punto finale di tutta una serie di transizioni che sono caratterizzate da una ricerca e assunzione volontaria dovuta agli effetti rinforzanti della sostanza di abuso; questo porta ad una perdita di controllo nell'assunzione che diventa abituale ed infine compulsiva. Quando viene impedita l'assunzione della sostanza emergono sintomi negativi che si manifestano in effetti somatici e affettivi. Quindi la dipendenza risulta essere una malattia cronica recidivante del cervello (Koob et al., 2008).

La nicotina è la seconda sostanza più abusata nel mondo, e la sua dipendenza si differenzia da quella di altre sostanze di abuso, come alcool e oppioidi, per il minore numero di effetti negativi associati.

- **Neuroni dopaminergici del mesencefalo e loro proiezioni.**

Per molto tempo la composizione dei neuroni dopaminergici del mesencefalo è risultata semplificata poichè si riteneva che esistessero due gruppi principali di neuroni dopaminergici: quelli del gruppo A-9 presenti nella SN che proiettano allo striato, lungo la via nigrostriatale e quelli del gruppo A-10 presenti nella VTA, che proiettano alle aree limbiche e corticali attraverso la via mesolimbica e la via mesocorticale. Ora però è stato dimostrato che la SN non contiene solo neuroni che proiettano allo striato, ma anche neuroni che innervano le aree limbiche e corticali e che i neuroni dopaminergici della VTA proiettano allo striato ventrale e al Caudato Putamen (CPu).

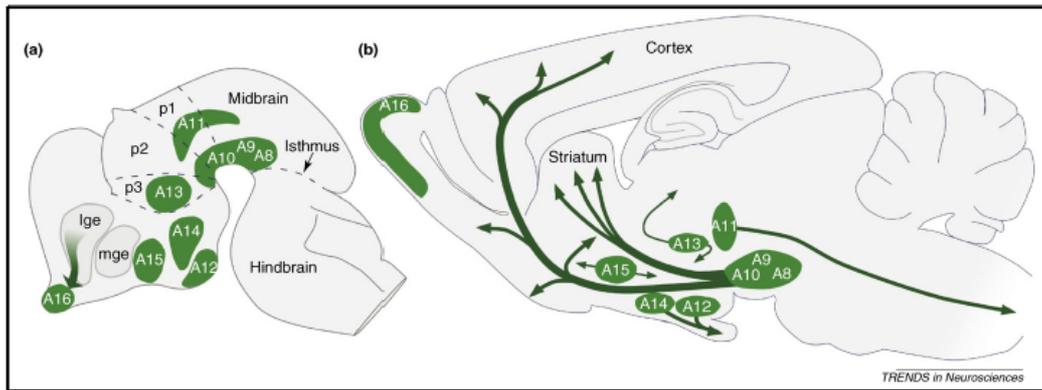


FIG 6: Distribuzione dei gruppi di neuroni dopaminergici durante lo sviluppo del cervello di roditore. (A) Cervello in fase di sviluppo. (B) Cervello adulto.

Nella via dopaminergica mesostriatale le connessioni neuronali aumentano in numero e complessità nell'uomo. Infatti mentre il numero totale di cellule TH positive in tutti e tre i gruppi (A-8, A-9 e A-10) sono nel topo circa 20000-30000, e nel ratto 40000-45000, di cui circa la metà localizzate nella SN, questo numero aumenta fino a 160000-320000 nella scimmia e 400000-600000 nell'uomo, e di questi il 70% è localizzato nella SN. L'aumento progressivo del numero di neuroni TH positivi nelle varie specie è anche presente nella neocorteccia che è innervata dalle afferenze dopaminergiche. Questo aumento del numero dei neuroni dopaminergici è accompagnato da una maggiore complessità delle interconnessioni con gli altri tipi cellulari.

- **Anatomia e ruolo del sistema dopaminergico mesostriatale**

I neuroni del sistema dopaminergico hanno origine dalla SN (A-9) e dalla VTA (A-10) e proiettano ai nuclei della base, all'ipotalamo, al sistema limbico, e varie aree corticali.

La SN è un nucleo laminare situato in posizione intermedia tra il mesencefalo e il diencefalo. Questa zona contiene abbondante melanina, un pigmento che la fa apparire di color bruno intenso o nero in sezioni di cervello non colorate; da qui il suo nome. La SN si compone di due porzioni, distinte lungo il piano frontale: la pars compacta (dorsale) (SNc) e la pars reticulata (ventrale) (SNr). All'interno di queste due aree morfologicamente distinte si trovano i corpi cellulari dei neuroni

dopaminergici che proiettano i loro assoni al CPU formando la via nigrostriatale, via che regola il movimento e la postura.

La SNc riceve afferenze da numerose aree del cervello, tra cui il Nucleo Tegmentale Peduncolopontino (PPTg) e la porzione laterale dell'abenula. Inoltre riceve afferenze dal globo pallido e dal nucleo centrale dell'amigdala. I neuroni che formano questa parte della SN hanno un albero dendritico molto sviluppato, che affonda fino a raggiungere i neuroni della SNr, e assoni molto lunghi che terminano allo striato.

La SNr riceve principalmente afferenze dallo striato, che arrivano tramite due vie distinte: direttamente tramite gli assoni dei *medium spiny neurons* e indirettamente dagli assoni del globo pallido. La SNr ha importanti proiezioni verso il talamo (nucleo ventrale laterale e ventrale anteriore), oltre a vie efferenti che raggiungono il collicolo superiore. A differenza dei neuroni della SNc i neuroni della SNr sono più piccoli, meno numerosi e sintetizzano il neurotrasmettitore GABA.

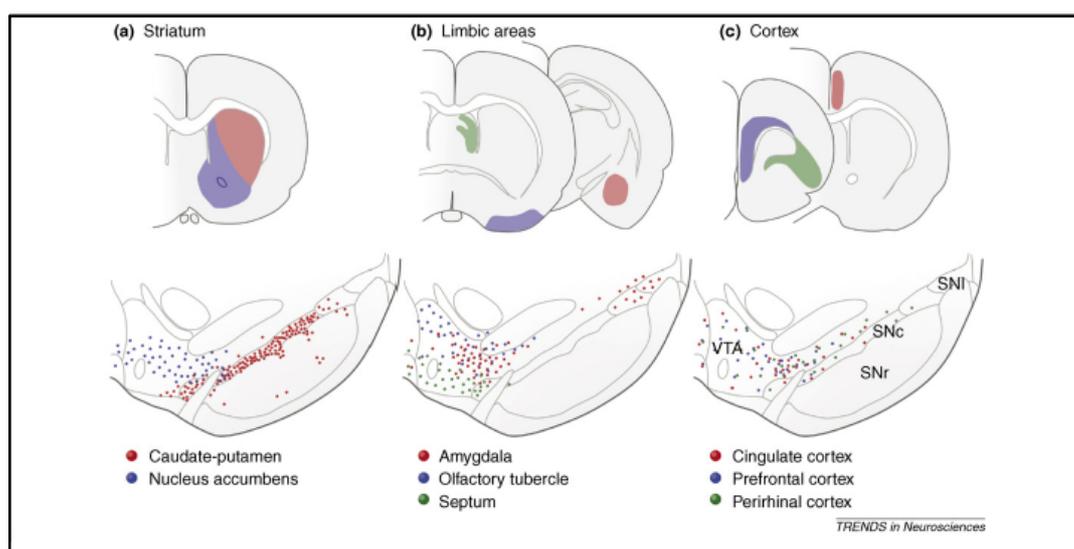


FIG 7: Sezioni coronali di cervello di roditore dove vengono evidenziate le sedi di origine e proiezioni dei neuroni dopaminergici che formano la via mesostriatale (A), mesolimbica (B) e mesocorticale (C).

La VTA è formata da un gruppo di neuroni situati accanto alla linea mediana del pavimento del mesencefalo. Il 50/60% dei neuroni presenti nella VTA sono dopaminergici e proiettano i loro assoni verso il NAc dello striato formando la via mesolimbica. Inoltre i neuroni della VTA mandano afferenze direttamente alla PFC formando la via mesocorticale che coordina le funzioni esecutive superiori.

La VTA è suddivisa in quattro zone chiamate Nucleo Paranigrale (NP), Area Pigmentata Parabrachiale (PBP), Area Retroflessa Parafascicolare (PFR) e Coda Tegmentale Ventrale (VTT). NP e PBP sono aree ricche di neuroni dopaminergici mentre PFR e VTT hanno un'alta densità di neuroni gabaergici.

Molte aree cerebrali come il setto, l'ippocampo, l'amigdala e la PFC ricevono afferenze dalla VTA e, a loro volta, proiettano nuovamente su di essa.

Lo striato è un nucleo sottocorticale che riceve afferenze dopaminergiche da SN e da VTA. E' una struttura coinvolta nella coordinazione motoria, nelle funzioni cognitive e la sua compromissione porta allo sviluppo di varie malattie psichiatriche e neurologiche come schizofrenia, malattia di Huntington (HD) e malattia di Parkinson (PD). Funzionalmente viene suddiviso in una porzione ventrale (NAc) e una dorsale (CPu), che mostrano però caratteristiche morfologiche simili con la presenza in entrambe soprattutto dei Neuroni Spinosi (*spiny neurons*) Gabaergici (95%), interneuroni colinergici (3-5%) ed afferenze sia dopaminergiche che glutammatergiche. Le differenze emergono quando si analizzano le afferenze e le efferenze all'interno delle due parti: lo striato dorsale riceve la maggior parte delle afferenze glutammatergiche dalle aree corticali (aree corticali motorie), le afferenze dopaminergiche soprattutto dalla SNc e in misura minore dalla VTA; lo striato ventrale invece riceve afferenze eccitatorie dalla PFC, dall'ippocampo, dall'amigdala e riceve le afferenze dopaminergiche principalmente dalla VTA.

Si pensa che il NAc sia l'interfaccia di connessione tra la componente motoria e la componente motivazionale del sistema dopaminergico.

Un'altra differenza che contraddistingue il NAc da CPu è dovuta all'effetto che le sostanze d'abuso hanno su di essi. Studi di microdialisi in vivo hanno dimostrato che le diverse sostanze d'abuso, tra cui anche la nicotina, stimolano il rilascio di DA preferenzialmente nel NAc (Zhang et al., 2009).

La somministrazione di nicotina è in grado di eccitare i neuroni dopaminergici che arrivano in tutto lo striato, questo effetto è mediato dai nAChR che sono densamente distribuiti in tutte le componenti dopaminergiche di questa area e ne regolano l'eccitabilità e il rilascio di DA.

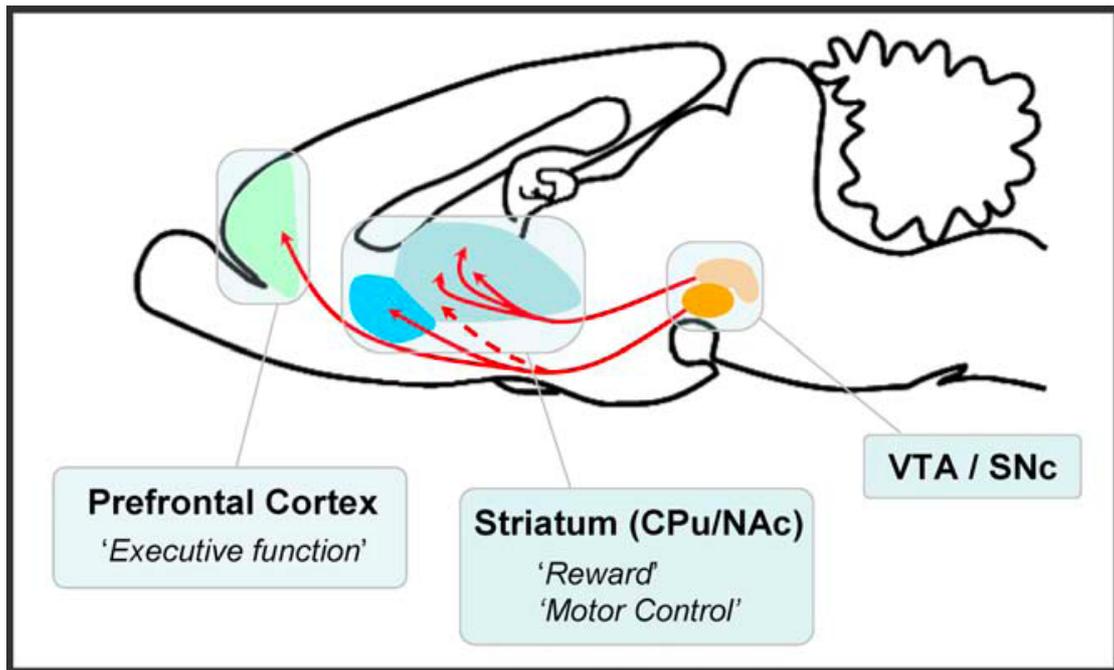


FIG 8: Immagine rappresentativa di sezione sagittale del cervello di roditore con evidenziati i nuclei dopaminergici del mesencefalo e rispettive proiezioni allo striato e PFC.

- **Controllo colinergico della trasmissione dopaminergica**

Il Tegmento Mesopontino nei mammiferi contiene due nuclei colinergici, il nucleo PPTg e il nucleo Tegmentale Laterodorsale (LDTg). Questo sistema utilizza come neurotransmittitore endogeno l'ACh che agisce sia sui recettori metabotropici muscarinici che sui recettori ionotropici nicotinici.

Studi compiuti mediante l'impiego di doppi ligandi fluorescenti hanno dimostrato che i neuroni del LDTg proiettano i propri assoni prevalentemente a livello della VTA, mentre quelli del PPTg maggiormente verso la SN ma anche verso i neuroni dopaminergici della VTA (Oakman et al., 1999).

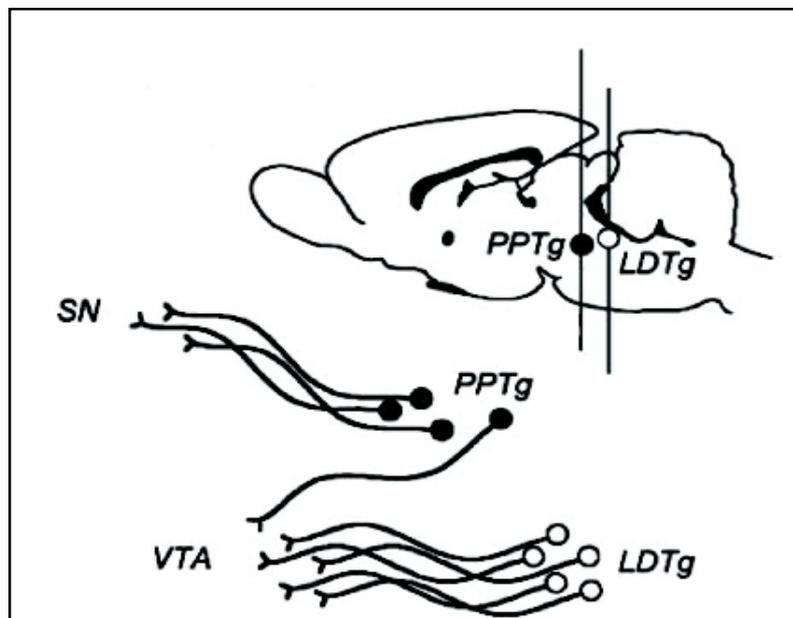


FIG 9: Immagine rappresentativa di sezione sagittale di cervello di rodente con evidenziati i nuclei colinergici PPTg e LDTg e rispettive proiezioni verso il mesencefalo.

A questa distinzione anatomica corrisponde anche una diversa funzione. Attraverso l'utilizzo di metodologie farmacologiche o di lesione in grado di attivare singolarmente i due nuclei colinergici è stato dimostrato che il nucleo PPTg, che proietta alla VTA, è responsabile solo del rilascio di ACh in questa area, mentre il nucleo LDTg agisce come interruttore in grado di attivare le connessioni del nucleo PPTg (Floresco et al., 2003; Grace et al., 2006; Grace et al., 2007).

L'importanza dei nuclei colinergici sugli effetti rinforzanti e gratificanti della nicotina è stata dimostrata in modelli animali lesi nei due diversi nuclei, questi animali infatti non sono più in grado di autosomministrarsi nicotina (Laviolette et al., 2002).

L'iniezione nel nucleo PPTg sia dell'antagonista dei nAChR $\beta 2$ di-idro- β -eritroidina, che quella di antagonisti dei recettori GABAergici determina una riduzione dell'autosomministrazione di nicotina nei ratti (Alderson et al., 2006) dimostrando quindi il ruolo importante di entrambe queste due classi di recettori (Laviolette and van der Kooy, 2004).

Il nucleo LTDg, avendo come maggior bersaglio la SN, è coinvolto nei fenomeni di regolazione motoria, infatti, a seguito di iniezione di nicotina gli animali con lesioni di questo nucleo non mostrano un aumento della locomozione che, invece avviene negli animali non lesionati (Alderson et al., 2005).

La modulazione colinergica dei neuroni dopaminergici avviene anche a livello dello striato. In questa area sono infatti presenti gli interneuroni colinergici, che rappresentano circa 2-5% del totale dei neuroni presenti nello striato e sono caratterizzati da un'ampia arborizzazione degli assoni che penetrano sia a livello del NAc che del CPU. La maggior parte delle varicosità degli interneuroni colinergici (circa 90%) non forma sinapsi indicando quindi che l'ACh rilasciata è in grado di modulare le funzioni striatali attraverso una trasmissione extrasinaptica (*volume transmission*) (Descarries et al., 1997).

EFFETTI DELLA NICOTINA A LIVELLO DEL SNC

Il consumo di tabacco può essere considerato uno tra i maggiori problemi sanitari mondiali. Con l'identificazione della nicotina come principale componente psicoattiva del fumo di sigaretta, molti sforzi sono stati fatti per capire le basi neurofarmacologiche, anatomiche e comportamentali dei suoi effetti.

Gli effetti rinforzanti della nicotina sono stati dimostrati utilizzando test di autosomministrazione in animali tramite sia iniezione sistemica (Corrigall et al., 1992; Pons et al., 2008), che locale direttamente nella VTA (David et al., 2006; Maskos et al., 2005). Inoltre, gli studi comportamentali in topi WT e KO per la subunità $\beta 2$ hanno mostrato che la sostituzione della cocaina con la nicotina in topi che si autosomministrano la cocaina, determina autosomministrazione di nicotina nei topi WT ma non negli animali KO, indicando quindi il ruolo fondamentale dei recettori contenenti la subunità $\beta 2$ nel determinare le proprietà rinforzanti della nicotina (Picciotto et al., 1998).

I topi KO per le subunità $\beta 2$, $\alpha 4$ e $\alpha 6$ non sono più in grado di autosomministrarsi nicotina per via sistemica ma la riespressione, tramite vettori virali, delle rispettive subunità nella VTA ripristina l'autosomministrazione di nicotina (Pons et al., 2008). La delezione della subunità $\alpha 7$, invece non interferisce con il meccanismo di autosomministrazione di nicotina.

Quindi i sottotipi $\alpha 4\beta 2^*$ e $\alpha 6\beta 2^*$ (ma non gli $\alpha 7$) sono necessari e sufficienti per gli effetti di rinforzo della nicotina; nei paradigmi di autosomministrazione intracranica la subunità $\beta 2$ ha un'importanza fondamentale se espressa con $\alpha 4$ nel determinare i livelli di nicotina autosomministrata.

La delezione della subunità $\alpha 5$ o la sovraespressione della subunità $\beta 4$ aumentano i livelli di nicotina assunti (Jackson et al., 2010), suggerendo un ruolo modulatorio di queste subunità nei circuiti della dipendenza da nicotina. Il ruolo della subunità $\alpha 5$ potrebbe essere dovuto alla sua presenza nel sottotipo $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ nei terminali dopaminergici dello striato o glutammatergici della via abenulo-interpeduncolare dove partecipa al rilascio dei neurotrasmettitori (Klink et al., 2001).

Recenti studi hanno identificato polimorfismi di un singolo nucleotide (SNPs) nel cluster genico $\alpha 3\text{-}\alpha 5\text{-}\beta 4$ localizzato sul cromosoma 15 che sembrano correlati all'assunzione di nicotina. In particolare uno SNP nel dominio citoplasmatico della

subunità $\alpha 5$ rende i recettori $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ meno funzionali rispetto a quelli WT senza però alterarne l'affinità per l'agonista.

Essendo questo sottotipo recettoriale presente sia nelle terminazioni GABAergiche che su quelle dopaminergiche del CPU, soggetti portatori di questa mutazione presenterebbero da un lato una forte riduzione del rilascio di GABA che come discusso dopo causa un aumento del rilascio di DA, dall'altro la necessità di una maggiore quantità di nicotina per evocare il rilascio di DA.

Studi di *genome-wide association* hanno anche mostrato che i geni che codificano per le subunità $\alpha 3$ e $\beta 4$ formano un cluster genico che è stato associato al cancro al polmone mentre i geni per le subunità $\beta 3$ e $\alpha 6$ formano un cluster genico associato alla dipendenza da nicotina (Improgo et al., 2010).

Gli effetti gratificanti della nicotina sono stati valutati anche utilizzando test comportamentali come il test *conditioned place preference* (CPP), dove la nicotina viene associata ad un ambiente particolare in cui si trova l'animale al momento dell'iniezione. Topi mancanti della subunità $\beta 2$ non mostrano valori di CPP elevati, mentre i topi $\alpha 7$ KO prediligono gli ambienti associati alla nicotina dimostrando un effetto piacevole della sostanza (Stolerman et al., 2004; Walters et al., 2006). I topi transgenici che esprimono una subunità $\alpha 6^{L9S}$ mutata, che rende il recettore maggiormente sensibile alla nicotina, mostrano invece valori significativi di CPP con dosi di nicotina molto minori rispetto agli animali WT (Jackson et al., 2009).

Quindi le subunità $\alpha 4$, $\beta 2$, e in qualche misura $\alpha 5$, $\alpha 6$ e $\beta 4$ mediano gli effetti gratificanti della nicotina mentre il ruolo dei recettori $\alpha 7$ è meno chiaro.

- **Ruolo dei sottotipi di nAChR nel controllo dell'attività dei neuroni della via mesolimbica**

I sottotipi di nAChR sono espressi nella VTA, sugli interneuroni GABAergici, sulle afferenze accitatorie ed inibitorie e sui neuroni dopaminergici. Nei singoli neuroni dopaminergici della VTA coesistono diverse subunità che possono formare una popolazione eterogenea di sottotipi con specifiche localizzazioni.

Studi di elettrofisiologia compiuti registrando singoli neuroni dopaminergici della VTA hanno dimostrato che in queste cellule sono presenti due tipologie di trasmissione dell'impulso nervoso una lenta e regolare, detta tonica, ed una veloce ad alta frequenza, detta fasica (Kitai et al., 1999).

L'impulso fasico causa fundamentalmente un maggior rilascio di DA nello striato rispetto all'impulso tonico. Il passaggio da tonico a fasico è associato al ricevimento previsto o non previsto di uno stimolo gratificante (Schultz et al., 2002).

Esperimenti di elettrofisiologia condotti su fettine isolate di mesencefalo hanno mostrato che in questi neuroni dopaminergici l'impulso fasico non è presente, indicando quindi che per la trasmissione fasica sono fondamentali le afferenze glutammatergiche provenienti dalla PFC, le afferenze colinergiche derivanti dal nucleo PPTg e le afferenze glutammatergiche del nucleo LDTg (Floresco et al., 2003; Lodge and Grace, 2006).

Un'analisi più approfondita della modalità di trasmissione degli impulsi nelle cellule dopaminergiche della VTA ha mostrato la presenza di almeno quattro diverse modalità: 1) Impulsi tonici regolari a bassa frequenza senza la presenza di una componente fasica; 2) Impulsi tonici a bassa frequenza con la presenza di numerosi eventi fasici; 3) Impulsi tonici ad alta frequenza con pochi eventi fasici; 4) Impulsi tonici ad alta frequenza e numerosi eventi fasici. Il contributo dei diversi sottotipi alle varie modalità di trasmissione è stata valutata in tessuti ottenuti da topi WT e KO. Nei neuroni dopaminergici dei topi $\beta 2$ KO rimane solamente la componente tonica a bassa frequenza con pochi eventi fasici mentre, nei topi $\alpha 7$ KO rimane la componente tonica ad alta frequenza con numerosi eventi fasici. Questo indica che è necessaria la presenza della subunità $\beta 2$ per avere una componente tonica ad alta frequenza e per la transizione ad un impulso fasico rilevante. A seguito di iniezione periferica di nicotina, in topi WT si ha una transizione da una modalità tonica ad una fasica molto sostenuta (fino a 10 minuti) e questa risposta è completamente assente negli animali

$\beta 2$ KO. La riespressione della subunità $\beta 2$ nella VTA, ripristina la risposta anche se in misura ridotta (fino a 2 minuti) indicando quindi un ruolo importante nel controllo dell'eccitabilità dei neuroni dopaminergici dei recettori contenenti la subunità $\beta 2$ presenti sulle afferenze glutammatergiche e colinergiche provenienti dalla PFC e LDTg (Maskos et al., 2005). In animali $\alpha 7$ KO, a seguito dell'iniezione di nicotina, si assiste ad un veloce e notevole aumento della componente fasica seguita da una rapida e persistente componente tonica. Questo suggerisce che la mancanza dell'impulso eccitatorio, dovuto ai recettori $\alpha 7$ presenti sui terminali glutammatergici, smaschera un effetto inibitorio dei neuroni GABAergici. E' quindi necessaria la presenza di entrambi le classi di recettori recettori ($\beta 2^*$ e $\alpha 7$) per far si che la trasmissione nei neuroni dopaminergici avvenga in maniera corretta.

A livello della VTA la nicotina agisce sui nAChR presenti sia sui neuroni dopaminergici che sui neuroni GABAergici ma non è chiaro quale delle due componenti sia più importante per determinare l'aumento del rilascio di DA a livello del NAc. Studi condotti su fettine di VTA hanno evidenziato che le concentrazioni di nicotina rinvenute nel cervello di fumatori (circa $0,5 \mu\text{M}$) desensitizzano preferenzialmente il sottotipo $\alpha 4\beta 2^*$ e solo in grado molto minore il sottotipo $\alpha 7$, ciò causa rispettivamente una riduzione nel rilascio di GABA e un aumento del rilascio di glutammato e di conseguenza una diminuzione degli stimoli inibitori ma non di quelli eccitatori inviati ai neuroni dopaminergici. Si ottiene quindi una eccitazione a lungo termine del sistema dopaminergico che induce l'aumento del rilascio di DA e la conseguente sensazione di piacere (Picciotto et al., 2008).

Queste ipotesi sono sostenute anche dall'evidenza che la somministrazione di nicotina induce un aumento dei livelli di glutammato nella VTA e questo effetto è bloccato dalla metilcaconitina, un antagonista relativamente selettivo per il sottotipo $\alpha 7$ espresso sui terminali glutammatergici provenienti dalla corteccia (Schilstrom et al., 1998). Il blocco di $\alpha 7$ nella VTA riduce quindi l'entità di DA rilasciata dal sistema mesolimbico in risposta all'assunzione di nicotina.

Un ruolo primario dei recettori $\beta 2^*$ espressi dalle cellule dopaminergiche nell'instaurarsi del fenomeno di dipendenza della nicotina è stato inoltre recentemente dimostrato con due approcci sperimentali diversi: 1) Mediante la riespressione della subunità $\beta 2$ solo nei neuroni dopaminergici della VTA in topi $\beta 2$ KO è stato possibile reinstaurare l'autosomministrazione di nicotina (Tolu et al., 2010). 2) Mediante la

somministrazione in VTA della α -conotossina MII (MII), un'antagonista selettivo (vedi paragrafo che segue) dei recettori $\alpha6\beta2^*$ espressi solo dai neuroni dopaminergici della VTA, è stato possibile dimostrare sia, una riduzione di rilascio di DA nel NAc indotta da nicotina sistemica, che di autosomministrazione di nicotina.

Infine, il ruolo preciso che giocano i sottotipi contenenti le subunità $\alpha4$ e $\alpha6$ sugli effetti di rinforzo della nicotina sembra dipendere anche dalla localizzazione cellulare di queste subunità (soma verso terminali dopaminergici nel NAc) e questo aspetto è ancora oggetto di intenso studio.

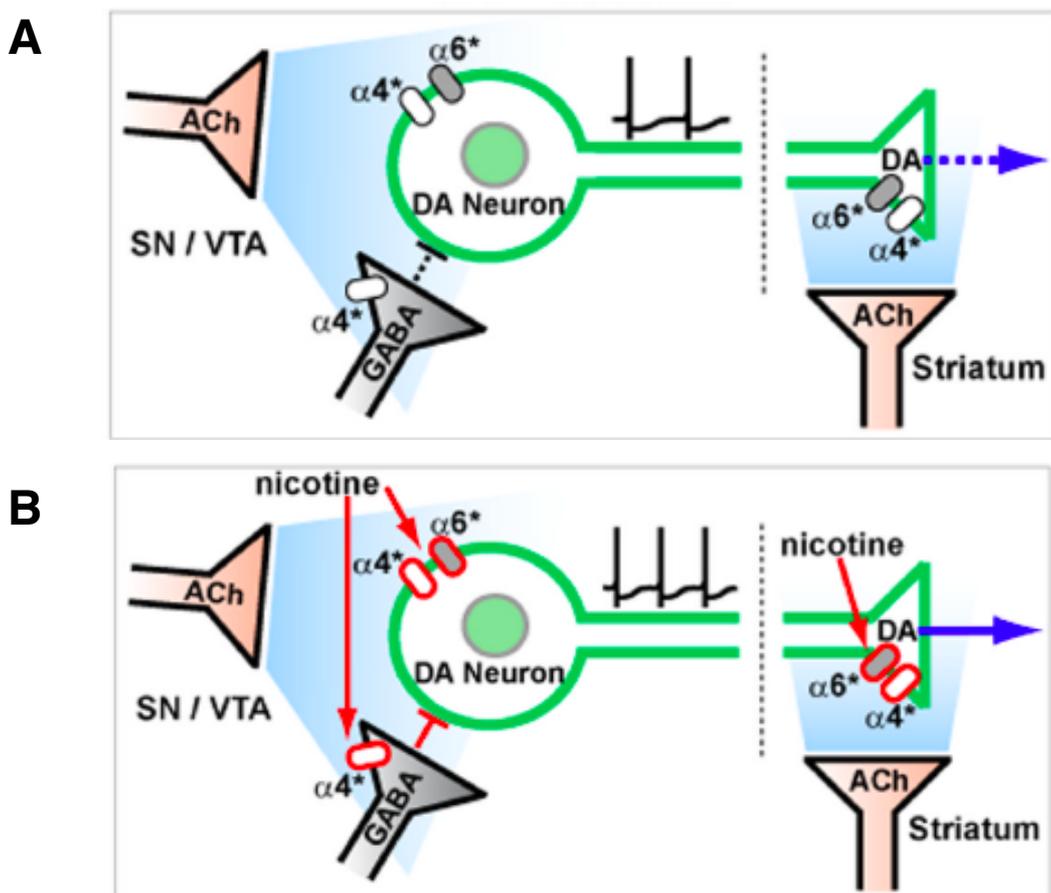


FIG 10: Schema rappresentativo del circuito dopaminergico in condizioni basali (A) e in seguito all'attivazione indotta da nicotina (B).

- **Ruolo dell'interazione colinergica e dopaminergica nel controllo degli effetti della nicotina**

L'interazione tra il sistema colinergico e dopaminergico che avviene a livello dello striato è fondamentale per il corretto funzionamento della trasmissione dopaminergica, infatti il bilancio dell'azione tra ACh e DA è al centro di un'ipotesi che da molti anni vede contrapposte due teorie. La prima sostiene che tra i due sistemi esiste una forma di antagonismo funzionale in cui, quando viene a mancare una delle due componenti, come per esempio nella malattia di Parkinson, dove si ha la perdita dei neuroni dopaminergici, l'altra prende il sopravvento causando un corto circuito del sistema; la seconda ipotesi sostiene che tra i due sistemi ci sia sinergia nel controllo del rilascio di DA.

Il rilascio di DA nello striato è controllato principalmente dall'attività dei neuroni dopaminergici, ma a livello presinaptico esiste anche un controllo dovuto all'attività dei nAChR e dall'attività modulatoria degli interneuroni colinergici. Il rilascio di DA quindi non dipende linearmente dall'attività dei neuroni dopaminergici ma, sia per i fenomeni di plasticità neuronale, che per l'azione di DA e ACh su autorecettori presenti sui terminali dopaminergici, risulta essere un evento finemente controllato. In seguito ad un impulso depolarizzante il rilascio di DA nei terminali striatali è seguito da un fenomeno di depressione dello stesso, detto *short-term depression*, per cui uno stimolo successivo non è più in grado di evocare il rilascio di neurotrasmettitore. Questo è dovuto alla presenza dell'ACh rilasciata spontaneamente dagli interneuroni colinergici dello striato che all'arrivo del primo impulso depolarizzante agendo sui nAChR β_2^* presenti nei terminali favorisce il rilascio di DA (Rice and Cragg, 2004) e successivamente desensibilizzando gli stessi inibisce il rilascio dovuto ad un secondo stimolo. Il blocco dell'azione dell'ACh con antagonisti competitivi riduce il rilascio di DA dovuto al primo stimolo e inibisce la *short-term depression* favorendo il rilascio del neurotrasmettitore dovuto allo stimolo successivo (Rice and Cragg, 2004).

In presenza di nicotina i nAChR desensitizzati assumono quindi un ruolo importante di filtro poichè sono in grado di inibire il rilascio di DA dovuto allo stimolo tonico e contemporaneamente facilitano quello dovuto allo stimolo fasico (Cragg et al., 2006). Questi dati suggeriscono quindi che l'inibizione transiente del tono colinergico a livello dello striato è in grado di amplificare il segnale dopaminergico della componente fasica associata agli stimoli gratificanti e sincronizzando questi eventi

promuove la sensibilità delle sinapsi dopaminergiche all'attività elettrica dei neuroni stessi. L'attività dei nAChR presinaptici sulla trasmissione dopaminergica può quindi avere effetti opposti a seconda della presenza o assenza della trasmissione colinergica. I nAChR sono recettori in grado di desensitizzare e inattivarsi temporaneamente a seguito di stimolazione con agonisti nicotinici tra cui la nicotina (Quik and Kulak, 2002). Applicazioni di nicotina a concentrazioni simili a quelle presenti nel cervello dei fumatori determina una rapida desensitizzazione dei nAChR $\beta 2^*$ nella VTA e nello striato (Mansvelder et al., 2002) mentre non ha effetto sui nAChR $\alpha 7$ (Quick and Kulak., 2002). Come discusso precedentemente, in presenza di nicotina nella VTA, la desensitizzazione dei recettori $\beta 2^*$ rispetto agli $\alpha 7$ fa sì che l'eccitazione del tono colinergico nei confronti dei neuroni dopaminergici venga a mancare, ma allo stesso tempo questo blocca l'inibizione GABAergica sugli stessi neuroni con un risultato netto di aumentata depolarizzazione dei neuroni dopaminergici (Mansvelder et al., 2002). Nello striato dove il potenziale d'azione è sotto il controllo dei recettori $\beta 2^*$ e non $\alpha 7$, la desensitizzazione dei recettori $\beta 2^*$ dovuta alla nicotina causa un'iniziale inibizione del rilascio tonico e successivamente un'amplificazione del rilascio fasico con un aumentato rilascio di DA a livello dello striato. Questi risultati evidenziano quindi un importante meccanismo di regolazione non solo a livello del soma dei neuroni dopaminergici ma anche direttamente nel sito di rilascio della DA.

- **Ruolo dei recettori $\alpha 6\beta 2^*$ nella via dopaminergica**

I recettori nicotinici $\alpha 6\beta 2^*$ sono espressi selettivamente nei neuroni dopaminergici, e nella via visiva (Azam et al., 2007; Champiaux et al., 2002; Gotti et al., 2005). Questi recettori sono selettivamente inibiti dalle α -conotossine (α -CTx), peptidi prodotti da alcune lumache marine.

Studi di immunoprecipitazione e studi di legame con MII hanno dimostrato che i pentameri $\alpha 6\beta 2\beta 3$ e $\alpha 6\alpha 4\beta 2\beta 3$ compongono i due sottotipi predominanti di recettori $\alpha 6\beta 2^*$ responsabili del 50% del rilascio di DA nello striato. Studi di rilascio di DA da sinaptosomi ottenuti dallo striato di topi WT e KO per le subunità nicotiniche $\alpha 4$, $\alpha 6$ e $\beta 3$ hanno mostrato che il sottotipo $\alpha 6\alpha 4\beta 2\beta 3$ ha il più alto livello di sensibilità alla nicotina con un'EC₅₀ di 230 nM molto più alta di quella del sottotipo $\alpha 4\beta 2$ che ha un'EC₅₀ di 1,6 μ M (Salminen et al., 2007). Dopo il fumo di una sigaretta la concentrazione di nicotina presente nel cervello è di circa di 100-500 nM, concentrazione che sicuramente attiva il sottotipo $\alpha 6\alpha 4\beta 2\beta 3$.

Il coinvolgimento dei recettori $\alpha 6\beta 2^*$ negli effetti della nicotina è stato ulteriormente dimostrato da studi compiuti su animali transgenici che esprimono una subunità $\alpha 6^{L9S}$ mutata. In questi topi nella regione M2 della subunità $\alpha 6$ l'amminoacido leucina (L) è stato sostituito da una serina (S) e questa mutazione rende i recettori contenenti la subunità $\alpha 6$ ipersensibili verso l'ACh e la nicotina.

Studi comportamentali hanno mostrato che in questi animali la nicotina, a concentrazioni molto più basse che nei topi WT, induce un'iperattività locomotoria determinata da un'aumentato rilascio di DA nello striato (Drenan et al., 2008). Successivi studi comportamentali, biochimici ed elettrofisiologici compiuti sul topo ottenuto incrociando il topo $\alpha 6^{L9S}$ con il topo KO per la subunità $\alpha 4$ hanno definitivamente dimostrato che nella via dopaminergica il sottotipo $\alpha 6\alpha 4\beta 2\beta 3$ è il recettore con maggior sensibilità alla nicotina ed il principale responsabile degli effetti locomotori e di rilascio di DA (Drenan et al., 2010).

Studi in modelli animali che mimano la situazione patologica della malattia di Parkinson hanno dimostrato che in questi animali c'è una perdita precoce e selettiva del sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ a livello dello striato, indicando quindi come lo sviluppo di molecole ad attività agonistica verso il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ possa essere di primaria importanza per il trattamento delle fasi precoci della malattia di Parkinson (Quirk et al., 2005).

- **Interazione tra nAChR e recettori dopaminergici**

Un ruolo centrale nella regolazione delle risposte neuronali alla DA è svolto dai recettori dopaminergici. Si tratta di cinque diversi sottotipi recettoriali classificati in recettori del tipo D1 (recettori D1 e D5) e recettori del tipo D2 (recettori D2, D3 e D4) (Missale et al., 1998) che appartengono alla famiglia dei recettori accoppiati a proteine G (GPCR) che, con circa 600 membri potenziali nel genoma umano, costituisce la famiglia più numerosa di recettori di membrana coinvolti nella determinazione dei segnali intracellulari e negli effetti terapeutici di circa il 60% dei farmaci in commercio.

A livello dei terminali dopaminergici nello striato in posizione presinaptica sono presenti, oltre ai nAChR, anche i recettori D2/D3 e questi recettori regolano sia la sintesi che il rilascio della DA .

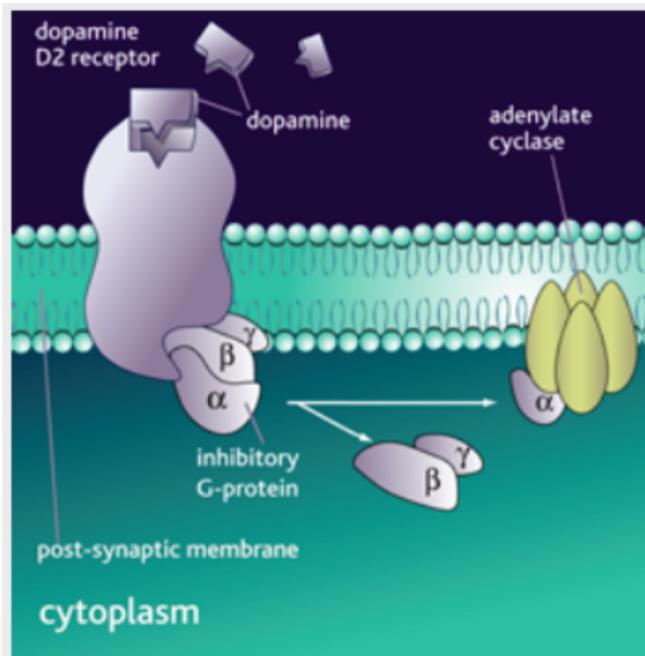


FIG 11: Rappresentazione schematica della struttura del recettore dopaminergico D2/D3 e della proteina G inibitoria associata al recettore

Il recettore D2 presenta i sette domini transmembrana tipici dei GPCR, all'estremità N-terminale ha tre siti di glicosilazione, all'estremità C-terminale ha una cisteina (C) per il legame con l'acido palmitico e nel terzo *loop* intracellulare ha un sito di fosforilazione per una chinasi cAMP-dipendente. Esso è presente in due diverse

varianti chiamate D2long e D2short derivate per splicing alternativo dello stesso gene. Le due varianti differiscono per la presenza o meno di una sequenza di 29 aminoacidi nel terzo *loop* intracellulare. Studi compiuti su animali deleti delle singole isoforme hanno dimostrato una prevalente localizzazione presinapica del recettore D2short rispetto alla isoforma D2long.

Il recettore D2 è maggiormente localizzato nel CPU e nel NAc, dove è accoppiato alla proteina G_i che inibisce la formazione di cAMP che causa apertura di canali del potassio e chiusura di quelli del calcio con conseguente iperpolarizzazione della membrana plasmatica e inibizione del rilascio di DA, fenomeno che ha portato alla denominazione di questo recettore come autorecettore dopaminergico D2.

Classicamente i GPCR sono stati considerati entità monomeriche la cui stimolazione coinvolge l'attivazione sequenziale delle proteine G e di specifici effettori intracellulari. Tuttavia, studi compiuti in questi ultimi dieci anni hanno mostrato che questo modello è troppo semplicistico per spiegare la flessibilità funzionale di questi recettori. La visione più moderna dell'organizzazione dei GPCR implica infatti che questi recettori facciano parte di complessi molecolari altamente organizzati dove diverse proteine concorrono a modularne in modo preciso e accurato l'attività (Missale et al., 2010). Il modello classico dell'organizzazione monomerica di questi recettori è stato quindi rivoluzionato sia dal concetto di dimerizzazione che di oligomerizzazione recettoriale che prevede che i GPCR possano interagire sia con membri della stessa famiglia che con recettori strutturalmente e funzionalmente divergenti come i canali ionici a livello della membrana plasmatica e che questa interazione moduli sia l'affinità di legame che la trasduzione del segnale.

La formazione di eterodimeri recettoriali, può essere costitutiva o dipendente dagli agonisti e funzionalmente questi complessi recettoriali eteromerici hanno proprietà farmacologiche, di trasduzione del segnale e di traffico cellulare diverse da quelle dei singoli recettori che li costituiscono.

Numerose evidenze sperimentali di tipo biofisico e biochimico indicano che anche il recettore D2 sia in grado di formare complessi omomerici ed eteromerici. In particolare recenti studi neurochimici e biochimici hanno dimostrato che il recettore D2, localizzato a livello presinaptico nei terminali dopaminergici sia in grado di interagire fisicamente con i nAChR eteromerici e che l'interazione di queste due classi di recettori modula il rilascio di DA nel NAc (Quarta et al., 2007; Quarta et al., 2009).

Se da una parte l'omodimerizzazione dei recettori della DA apre nuove questioni sui meccanismi molecolari coinvolti nella trasduzione del segnale, la presenza di eterodimeri potrebbe portare alla formazione di nuove complessi recettoriali con un profilo funzionale e farmacologico diverso, il cui contributo alla regolazione del rilascio di DA è ancora da studiare e capire.

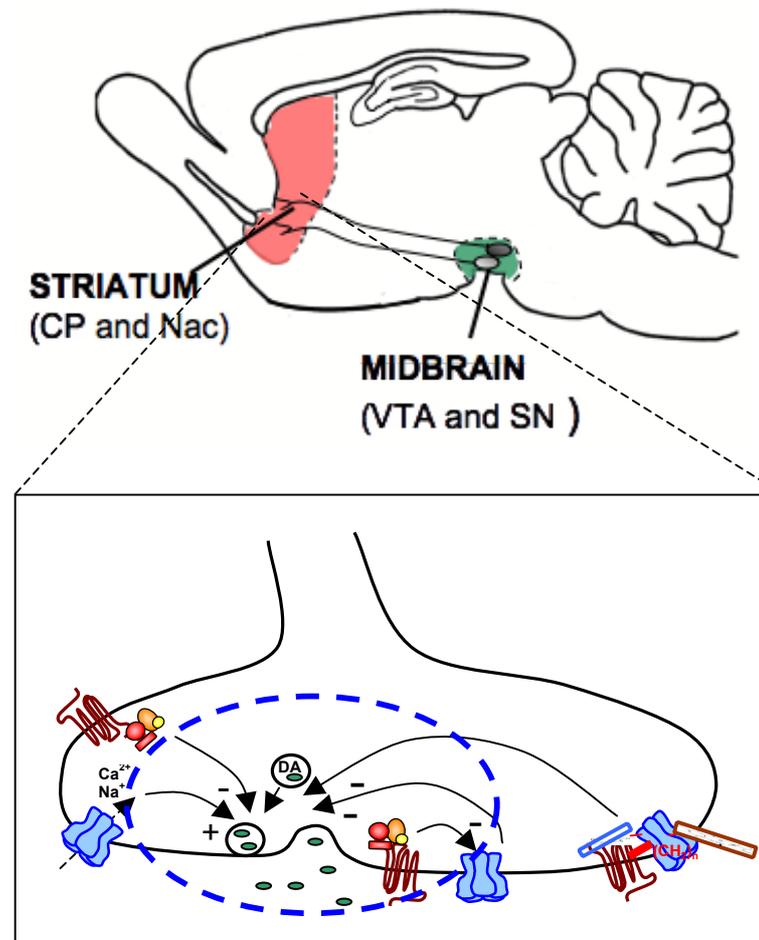


FIG 12: Immagine rappresentativa di sezione sagittale di cervello di rodente con evidenziato nell'ingrandimento un ipotetico terminale presinaptico dopaminergico dove recettori a canale ionico e recettori associati a proteine G interagiscono nel modulare il rilascio di DA.

α -CONOTOSSINE

Le conotossine sono un eterogeneo gruppo di piccoli peptidi, ricchi in cisteine, presenti nel veleno di alcune specie di lumache marine chiamate *Conus*. Questi peptidi costituiti da 10 a 30 aminoacidi hanno uno o più ponti di solfuro tra le diverse cisteine presenti nei peptidi. Le conotossine legano bersagli farmacologici diversi con una grande varietà di meccanismi di azione, la maggior parte dei quali non sono stati ancora chiariti. Sulla base della loro specificità farmacologica e dei loro target farmacologici le conotossine sono state classificate in cinque classi chiamate α , δ , κ , μ e ω .

Diverse conotossine e/o conopeptidi sono entrati in trials clinici per il trattamento di diverse patologie neurologiche e recentemente la ω -conotossina conosciuta come Ziconotide è stata introdotta come farmaco per la terapia del dolore cronico, indicando quindi come la conoscenza dell'interazione delle conotossine con i propri target farmacologici sia di grande interesse terapeutico.

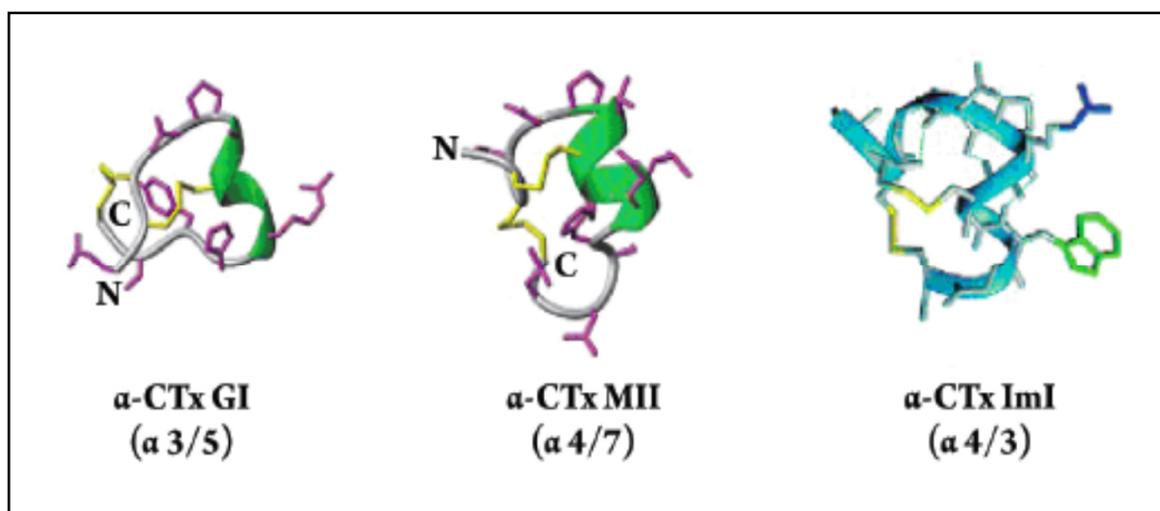


FIG 13: Struttura dello scheletro di sottofamiglie di α -CTx

Le α -CTx sono una sottofamiglia di conotossine costituita da peptidi lunghi 12-19 aminoacidi che legano specificamente i diversi sottotipi di nAChR. Le α -CTx sono caratterizzate dalla presenza di almeno quattro cisteine (di cui le cisteine 1 e 2 sono adiacenti) che formano due ponti disolfuro, uno tra le cisteine 1 e 3 e l'altro tra le

cisteine 2 e 4. Un altro modo per classificare le α -CTx è basato sul numero di aminoacidi presenti nei due domini localizzati tra le cisteine 2 e 3 (1° dominio) e tra le cisteine 3 e 4 (2° dominio). Le α -CTx3/5, che hanno tre aminoacidi nel 1° dominio e cinque aminoacidi nel 2° dominio, sono bloccanti selettivi per i nAChR muscolare; mentre le sottofamiglie α -CTx4/7, α -CTx4/4 e α -CTx4/3 sono antagonisti selettivi per diversi sottotipi di nAChR neuronale.

Le α -Ctx che legano i nAChR neuronali sono numerose e hanno una rilevante selettività per i vari sottotipi del nAChR. La prima ad essere scoperta è stata l' α -CTxImI (ImI) dal veleno di *Conus Imperialis*. Questa α -CTx quando iniettata intraperitonealmente non mostra alcun effetto, mentre causa attacchi epilettici e morte quando iniettata intracerebralmente (McIntosh et al., 1994). La caratterizzazione farmacologica di questa tossina in sottotipi espressi in sistemi eterologhi hanno dimostrato la selettività di ImI verso il sottotipo α 7. Negli ultimi anni si è cercato di migliorare la stabilità di queste piccole molecole cercando di proteggere l'integrità dei ponti disolfuro dai fenomeni di ossidazione presenti quando le molecole vengono esposte ad ambienti extracellulari come per esempio il sangue. In uno di questi studi sono state sostituite le cisteine con selenocisteine e queste nuove molecole sono risultate essere più stabili in ambienti ossidanti (Armishaw and Alewood, 2005).

Alla sottofamiglia di α -CTx4/7 appartiene MII, isolata da *Conus Magus*. MII blocca il sottotipo α 3 β 2 con una potenza maggiore rispetto agli altri sottotipi neuronali. Studi di *binding* su tessuti derivanti da animali KO hanno dimostrato che questa α -CTx lega con alta affinità il recettore contenente la subunità α 6 (Zoli et al., 2002).

L'utilizzo di MII è stato di fondamentale importanza per l'individuazione dei sottotipi coinvolti nel rilascio di DA nello striato di ratto, topo e scimmia (Lai et al., 2004; Meyer et al., 2008; Perez et al., 2008) e studi diversi hanno dimostrato che i sottotipi α 4 β 2* e α 4 α 6 β 2* sono i principali modulatori del rilascio di DA nello striato. L'impiego di questa tossina ha anche permesso di dimostrare che i sottotipi coinvolti nel rilascio di neurotrasmettitori possono essere specie-specifici. Infatti, nel ratto il rilascio di noradrenalina triziata (3 H-NA) dall'ippocampo è insensibile a MII mentre nel topo il rilascio dello stesso neurotrasmettitore è sensibile a MII, indicando quindi che nel topo il sottotipo contenente la subunità α 6 è coinvolto nel rilascio di 3 H-NA (Azam et al., 2008).

La 125 I-MII ha permesso la localizzazione dei siti di legame per le α -CTx nel cervello di diverse specie animali, e la loro diminuzione in modelli di lesione della via mesostriatale (Quik et al., 2001), diminuzione confermata anche dall'impiego di analoghi fluorescenti di MII (Vishwanath and McIntosh, 2006).

In questi ultimi anni sono stati inoltre compiuti studi per cercare di ottenere una MII maggiormente lipofila e protetta dalla proteolisi da impiegare per gli studi *in vivo* in previsione di un possibile utilizzo clinico (Clark et al., 2005).

L' α -CTxPIA (PIA) è stata isolata dal veleno di *Conus Purpureus* tramite esperimenti di PCR, la tossina, blocca il sottotipo $\alpha 3\beta 4$ di ratto con una IC_{50} di 750 nM mentre blocca il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ di ratto con una IC_{50} di 32 nM. Studi compiuti su sistemi eterologhi hanno mostrato un'affinità 70 volte superiore per il sottotipo chimerico $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ rispetto al sottotipo $\alpha 3\beta 2$ (Dowell et al., 2003).

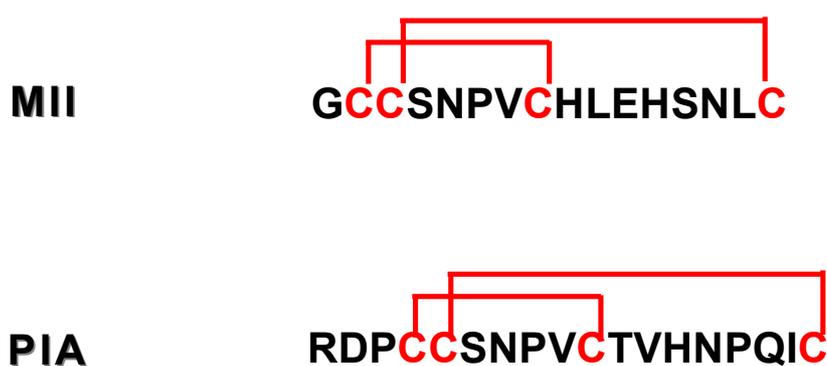


FIG 14: Schema delle sequenze aminoacidiche di MII e PIA con evidenziati (in rosso) i ponti disolfuro tra le diverse cisteine

SCOPO DELLA RICERCA

I nAChR neuronali sono una famiglia di molecole chiave nel funzionamento del SNC, e sono coinvolti in molte funzioni importanti del sistema nervoso quali l'apprendimento, la memoria, il controllo dell'attività motoria e la nocicezione. Essi sono anche il bersaglio di molte patologie degenerative del SNC che portano allo sviluppo di svariate malattie neurologiche e neuropsichiatriche. I nAChR sono una famiglia molto eterogenea di recettori, infatti possono essere formati dalla combinazione di 9 subunità differenti ($\alpha 2$ - $\alpha 7$ e $\beta 2$ - $\beta 4$) e ciascun sottotipo ha caratteristiche farmacologiche ed elettrofisiologiche differenti oltre ad una localizzazione specifica all'interno del SNC. Infine i nAChR giocano un ruolo molto importante nei meccanismi alla base dell'instaurazione delle dipendenze da sostanze di abuso.

I nAChR sono il bersaglio della nicotina, la principale componente psicoattiva del tabacco e il fumo di sigaretta è considerata una delle principali cause di morte al mondo. La nicotina legandosi ai nAChR favorisce il rilascio di DA nello striato. Studi di *imaging* in vivo compiuti su animali anestetizzati hanno dimostrato che a seguito di iniezione di nicotina le aree cerebrali maggiormente attivate sono quelle che compongono la via mesolimbica: mesencefalo, striato e PFC. Questi dati sono stati ulteriormente confermati attraverso studi di tomografia ad emissione di positroni (PET) compiuti su soggetti umani fumatori.

Una caratteristica che contraddistingue la via mesolimbica rispetto agli altri circuiti neuronali è la presenza di un particolare sottotipo di nAChR contenente la subunità $\alpha 6$. In modelli animali è stata dimostrata l'importanza del recettore $\alpha 6\beta 2^*$ nel determinare gli effetti neurochimici e comportamentali della nicotina, inoltre studi biochimici e farmacologici hanno evidenziato la riduzione di questo sottotipo recettoriale in patologie neurodegenerative quali le malattie di Alzheimer e Parkinson.

Nel loro insieme queste osservazioni mettono in luce due quesiti a cui questo progetto avrebbe voluto dare una risposta:

- 1) Identificare e caratterizzare nuovi ligandi selettivi per il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$.
- 2) Caratterizzare attraverso l'impiego di composti bivalenti l'interazione tra i nAChR (ed in particolare il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$) e i recettori dopaminergici D2 ed identificare

possibili meccanismi recettoriali di controllo del rilascio di DA a livello della via mesolimbica. Rispondere a quest'ultimo quesito è cruciale per poter sviluppare nuove strategie terapeutiche innovative per le patologie dove il controllo del rilascio di DA è importante per l'instaurarsi e il progredire delle patologie come nel caso della malattia di Parkinson e nella dipendenza da nicotina.

Durante il mio dottorato di ricerca mi sono quindi occupato di due progetti volti a scoprire nuove molecole in grado di legare con maggiore selettività il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$, per poterne meglio caratterizzare il ruolo fisiologico in vivo:

3. Sintesi e caratterizzazione farmacologica di nuove α -CTx ibride derivate dalle α -CTx naturali MII e PIA.
4. Caratterizzazione farmacologica e funzionale di ligandi bifunzionali che modulano il rilascio di DA attraverso il legame con nAChR e il recettore dopaminergico D2.

MATERIALI E METODI

PRODUZIONE DI ANTICORPI SUBUNITA'-SPECIFICI

Produzione di peptidi

Gli anticorpi (Abs) policlonali sono stati prodotti contro peptidi ottenuti dalle sequenze delle subunità umane clonate ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\beta 2$, $\beta 3$, e $\beta 4$), contro peptidi ottenuti dalle subunità di ratto ($\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 3$ e $\beta 4$) come riportato nella tabella supplementare in Grady et al (2009). Le sequenze usate come epitopo per la sintesi dei peptidi rappresentano sequenze con la minore omologia con le altre subunità, individuate comparando al computer le varie sequenze in modo da evitare fenomeni di cross-reattività. I diversi peptidi sono stati sintetizzati usando il sintetizzatore di peptidi Applied Biosystem modello 431, secondo la metodica di Merrieffield (Zoli et al 2002); il materiale ottenuto è poi stato purificato con una cromatografia a scambio ionico seguita da una cromatografia liquida in fase inversa semi-preparativa. Per la maggior parte delle subunità sono stati sintetizzati sia un peptide localizzato nel *loop* citoplasmatico posto tra le regioni M3 e M4, che uno localizzato all'estremità carbossilica extracellulare.

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 e 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 è stato separato mediante cromatografia in gel permeazione su colonna Sephacryl H-100 (Pharmacia).

Immunizzazione

I peptidi legati all'ovoalbumina sono stati emulsionati con una sospensione di adiuvante completo di Freund per le prime due immunizzazioni fatte al tempo zero e dopo 15 giorni; la terza immunizzazione, fatta utilizzando il peptide emulsionato in adiuvante incompleto, è stata eseguita dopo 30 giorni. Per ogni immunizzazione 250 μ l di peptide, diluiti in 500 μ l di PBS, sono stati emulsionati con 500 μ l di adiuvante.

Sono stati immunizzati due conigli per ogni peptide mediante iniezione sottocutanea, con la formazione di circa sei centri di reazione. Prima dell'immunizzazione, per ottenere il siero preimmune, e dopo il ciclo di immunizzazioni, gli animali sono stati prelevati e i sieri ottenuti immediatamente aliquotati e congelati.

Purificazione degli anticorpi

Gli anticorpi sono stati purificati mediante cromatografia d'affinità, usando resine di sefarosio 4B CNBr-attivate (Pharmacia), coniugate al peptide libero ad una concentrazione 1 mg/ml. Dopo incubazione del siero con la resina per 2 ore a temperatura ambiente (RT) in agitazione su ruota (con un opportuno rapporto di 1 ml di resina per 5 ml di siero) e dopo il successivo lavaggio con PBS per eliminare tutto ciò che non si è legato, gli Abs vengono eluiti con glicina 0.2 M pH 2.2.

Il contenuto di Abs è determinato mediante lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 280 nm, successivamente gli Abs sono stati estesamente dializzati contro un tampone di dialisi Na~P 50 mM pH 7.5, aliquotati e stoccati a -20°C.

Determinazione della specificità degli anticorpi prodotti

La validità di questi studi dipende dalla specificità degli Abs e per questo la loro specificità è stata caratterizzata con particolare cura. Mediante esperimenti di immunoprecipitazione è stata determinata sia su estratti ottenuti da aree diverse del sistema nervoso centrale di ratto che sui recettori purificati ottenuti dagli stessi tessuti la specificità e la capacità immunoprecipitante degli Abs.

I valori, sono stati espressi come percentuale di immunoprecipitazione, che indica la frazione di recettori precipitati dall'Ab utilizzato, considerando come 100% il numero di recettori presenti nell'estratto prima dell'immunoprecipitazione o come femtomoli (fmol) di recettore legante l'Epibatidina triziata (³H-Epi) immunoprecipitati per mg di proteine presenti.

La determinazione della percentuale di immunoprecipitazione ha permesso di confrontare la capacità immunoprecipitante dei diversi Abs e di stabilire che per la grande maggioranza degli Abs era compresa tra l'80 e il 90 % .

La specificità degli Abs è stata ricontrollata su estratti ottenuti dal cervello di animali KO con studi di Western blot.

Questi tessuti sono stati ottenuti su base collaborativa dal gruppo del Prof. Changeux dell'Institute Pasteur di Parigi (cervelli degli animali controllo e deleti delle specifiche subunità nicotiniche $\alpha 4$, $\alpha 6$ e $\beta 2$), dalla Prof.ssa DeBlasi del Baylor College di Huston (cervelli degli animali controllo e deleti delle subunità $\alpha 5$ e $\alpha 7$) e dal Dott. Marks dell'Università del Colorado i cervelli dei topi controllo e deleti della subunità $\beta 3$. Sono stati misurati i livelli delle due classi di recettori presenti nelle membrane ottenute dai cervelli di questi animali e verificato per immunoprecipitazione la composizione in subunità dei recettori presenti.

SINTESI E FOLDING DELLE α -CTX E PEPTIDI ANALOGHI

I peptidi sono stati prodotti utilizzando il sintetizzatore Applied Biosystem modello 433A (Foster City, CA, USA) attraverso passaggio su resina in fase solida con metodo Fmoc utilizzando la resina Fmoc-Rink-Amide MBHA da Novabiochem (Laufelfingen, CH). Gli aminoacidi Fmoc utilizzati per la sintesi hanno i seguenti gruppi di protezione delle catene laterali: trifenilmetano e acetamidometile per l'aminoacido cisteina; trifenilmetano per asparagina, glutammina, e istidina; antiossidante fenolico tetra-butile per acido aspartico, acido glutammico, serina e treonina; tetra-butossicarbonile per lisina e 2,2,4,6,7,-pentametil-diidrobenzofurano-5-sulfonile per arginina. Dopo l'assemblaggio completo, il peptide deprotetto legato alla resina viene eluito e incubato con soluzione K (80% acido trifluoroacetico, 5% acqua, 5% fenolo, 5% tianisolo, 2,5% etanditiolo 2,5% triisopropilsilano) a RT per 2 ore. Successivamente la resina viene filtrata e la soluzione contenente il peptide viene fatta sgocciolare in soluzione fredda di tetra-butiletere-petrolio e etere (1:1) per precipitare il peptide carbossiamidato. Successivamente dopo tre lavaggi e tre centrifugazioni con la soluzione di tetra-butiletere-petrolio e etere (1:1), il peptide viene sciolto in eluenti per HPLC: eluente A 0.3% TFA in acqua/acetonitrile (97:3); eluente B 0.3% TFA in acqua/acetonitrile (30:70) (1:1) ed infine purificato.

Attraverso il sistema Tri Rotar-VI HPLC, fornito di un detector multicanale MD-190 per finalità analitiche o un detector Uvidec-100-VI (JASKO, Tokyo, Giappone) per finalità preparative, il peptide viene purificato tramite RP-HPLC (*Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*). Per la purificazione dei peptidi vengono

utilizzate colonne Jupiter 5u C18 300A (160 x 4.6 mm) per la valutazione analitica e colonne Jupiter 10 μ Proteo 90A (250 x 21.2 mm) (Phenomenex, Torrence CA, USA) per la purificazione.

Le soluzioni di peptidi purificati derivanti dalle colonne semipreparative vengono diluite in acqua ad una concentrazione finale di peptide di 100 μ M e con 2M di NaOH viene neutralizzato l'acido trifluoroacetico. Alla soluzione contenente il peptide viene aggiunto 1M Tris HCl (pH 8) alla concentrazione finale 20 mM e due volumi di perossido di idrogeno e infine lasciato in agitazione. Il folding ossidativo viene monitorato tramite RP-HPLC analitica. Quando il folding è completato (30-60 min) e non sono rilevabili gruppi sulfidrilici liberi (tramite Ellman test), la soluzione con il peptide viene portata a pH 2.2 con acido fosforico, caricata tramite pompa cromatografica su colonna semipreparativa e purificata dal materiale polimerico contaminante. La soluzione di peptide purificato che si ottiene dalla colonna viene diluita in acqua/metanolo (1:1) ad una concentrazione finale del peptide di 150 μ M. Successivamente viene aggiunto iodio (5 volumi) e lasciato in agitazione. Il folding viene monitorato tramite RP-HPLC analitica. Quando il folding è completato (60-120 min) l'eccesso di iodio viene eliminato con acido ascorbico (1M in acqua), e il solvente evaporato sotto vuoto, il residuo solido viene sciolto in eluente A e purificato tramite RP-HPLC semipreparativa.

ESPERIMENTI DI BINDING E DI FARMACOLOGIA

Curve di saturazione

- **³H-EPIBATIDINA**

Per determinare la costante di dissociazione (K_d) del legame dei ligandi radioattivi alle membrane ottenute dalla corteccia di ratto sono stati compiuti esperimenti preliminari di binding alle membrane. Aliquote da 100 μ l di membrane diluite in tampone Citisina (50 mM Tris HCl, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2.5 mM CaCl₂, pH 7) sono state incubate con concentrazioni comprese tra 25 pM e 5 nM di ³H-epibatidina (Epi) (PerkinElmer Life Sciences) a 4°C per tutta la notte (O/N). Studi precedenti compiuti nel nostro laboratorio avevano determinato che l'³H-Epi, oltre a legare con

alta affinità i recettori contenenti le subunità $\beta 2$ e $\beta 4$, lega anche i recettori $\alpha 7$ e $\alpha 8$ con affinità variabile. Per impedire che i sottotipi contenenti la subunità $\alpha 7$ contribuiscano al binding della $^3\text{H-Epi}$, tutti gli esperimenti di binding e di immunoprecipitazione sono stati condotti su campioni preincubati per 3 ore con $\alpha\text{-BgTx}$ (Sigma) 1 μM . Parallelamente è stato determinato il binding aspecifico incubando, nelle stesse condizioni, le membrane con Epi non radioattiva alle concentrazioni di 0.1, 0.25, 1 e 10 μM , in presenza della stessa concentrazione di $^3\text{H-Epi}$. Le membrane sono poi state separate con la metodica di filtrazione su filtri GF-C (Whatmann), lavate con il tampone wash buffer (50 mM Na~P, pH 7.4) e la radioattività contata al β -contatore con 5 ml di liquido di scintillazione Filter-count (PerkinElmer Life Sciences).

- **$^{125}\text{I-}\alpha\text{BUNGAROTOSSINA}$**

Per determinare la K_d del legame della $^{125}\text{I-}\alpha\text{Bungarotossina}$ ($^{125}\text{I-}\alpha\text{BgTx}$) alle membrane di corteccia, gli esperimenti di binding alle membrane sono stati compiuti su aliquote di 85 μl di membrane, diluite in tampone Citisina, incubate O/N a 4°C con concentrazioni comprese tra 100 pM e 10 nM di $^{125}\text{I-}\alpha\text{BgTx}$ (PerkinElmer Life Sciences). Parallelamente è stato determinato il binding aspecifico incubando, nelle stesse condizioni, in presenza della stessa concentrazione di $^{125}\text{I-}\alpha\text{BgTx}$ le membrane con $\alpha\text{-BgTx}$ non radioattiva (Sigma) alle concentrazioni di 0.1, 0.5, 1 e 2 μM . Le membrane sono state poi separate con la metodica di separazione su filtri GF-C, lavate con il tampone wash buffer e la radioattività contata al γ -contatore.

Preparazione delle membrane da tessuti neuronali

I tessuti neuronali di corteccia, collicolo superiore, NAc e CPu sono prelevati dai ratti di 21-40 giorni, immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80°C . Non si sono riscontrate differenze in termini di legame dei ligandi radioattivi tra il tessuto fresco e congelato

Per ogni esperimento i tessuti sono stati omogenati in tampone B (50 mM NaP, 120 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , pH 7), centrifugate per 60 minuti a 15000 rpm in una centrifuga Sorvall, riomogenati in tampone Citisina e centrifugati.

Il pellet è stato infine risospeso nello stesso tampone in presenza di inibitori delle proteasi (aprotinina, leupeptina, bestatina e pepstatina A, alla concentrazione di 10 µg/ml).

Preparazione degli estratti da tessuti neuronali e determinazione del contenuto in recettore

I recettori vengono successivamente estratti dalle membrane mediante aggiunta di Triton X-100, alla concentrazione finale del 2%. Le membrane sono state lasciate ad estrarre mediante agitazione per 120 minuti a 4°C e poi centrifugate per 90 minuti a 15000 rpm.

Il contenuto in recettore presente negli estratti è stato determinato utilizzando 500 µl di resina a scambio ionico DE52 (Whatman) sedimentata in colonnine e lavata con 10 ml di wash buffer 1:4 senza Triton X-100. Aliquote di 100 µl di estratto ottenuto dai tessuti sono state incubate con ³H-Epi 2 nM per 3 ore a RT oppure O/N a 4°C, diluite con H₂O fino a 200 µl, applicate alla colonna contenente la resina e lasciate assorbire per 5 min. La resina è stata quindi lavata con 10 ml di wash buffer 1:4+0.1% Triton X-100, i recettori eluiti con 3 ml di NaOH 1 N e la radioattività contata in un β-contatore dopo l'aggiunta di 10 ml di liquido di scintillazione.

Il binding aspecifico dell'³H-Epi è stato determinato in parallelo coincubando l'estratto con ³H-Epi 2 nM e 250 nM Epi fredda.

Immunoimmobilizzazione dei sottotipi mediante Abs subunità-specifici

Gli Abs anti-α6 o anti-β2 sono stati legati a pozzetti di plastica (Maxi-Sorp Nunc) mediante incubazione, per due giorni a 4°C, alla concentrazione di 10 µg/ml in 50 mM tampone fosfato pH 7,5. Successivamente i pozzetti sono stati lavati per rimuovere l'eccesso di Ab non legato e poi incubati per 2/3 giorni a 4°C con 200 µl di estratto di tessuto ottenuto con 2% Triton X-100 (diluito 1:2 in tampone citisina). Nei pozzetti ricoperti con l'Ab anti-α6 è stato aggiunto l'estratto totale contenente tutti i recettori, mentre nei pozzetti ricoperti dal Ab anti-β2 è stato aggiunto l'estratto ottenuto dalla corteccia di ratto contenente il sottotipo α4β2. Dopo 2 giorni di incubazione i pozzetti

sono stati lavati e la presenza del recettore immobilizzato è stata rivelata mediante esperimenti di binding con ^3H -Epi e con ^{125}I -Epibatidina (^{125}I -Epi).

I sottotipi immunoimmobilizzati dai corrispondenti Abs (anti- $\alpha 6$ nel caso del sottotipo $(\alpha 4)\alpha 6\beta 2$ e anti- $\beta 2$ nel caso del sottotipo $\alpha 4\beta 2$ sono stati incubati per tutta la notte a 4°C con $250\ \mu\text{l}$ di ^3H -Epi con una concentrazione finale che variava da 0.005 a $5\ \text{nM}$. L' ^3H -Epi è stata sciolta in un tampone di incubazione contenente $50\ \text{mM}$ TRIS, $120\ \text{mM}$ NaCl, $1\ \text{mM}$ MgCl_2 , $5\ \text{mM}$ KCl, $2.5\ \text{mM}$ CaCl_2 , pH 7, $2\ \text{mg/ml}$ BSA e 0.05% Tween 20. Il binding specifico è stato determinato come legame totale meno il legame in presenza di $100\ \text{nM}$ Epi fredda.

L'inibizione del legame dell' ^3H -Epi ai sottotipi immobilizzati, da parte dei ligandi nicotinici o dei peptidi è stata misurata mediante incubazione di concentrazioni crescenti dei ligandi o dei peptidi in presenza di $0,1\ \text{nM}$ ^3H -Epi (una concentrazione corrispondente alla K_d del legame della ^3H -Epi) O/N a 4°C .

Dopo l'incubazione i pozzetti sono stati lavati sette volte con $50\ \text{mM}$ NaP pH 7.5 freddo contenente 0.05% Tween 20 e la radioattività è stata recuperata mediante incubazione dei pozzetti con $200\ \mu\text{l}$ di 2N NaOH per due ore e dopo aggiunta del liquido scintillante contata in un β counter.

ANALISI DEI DATI

I dati sperimentali ottenuti dagli esperimenti di legame (sia da curve di saturazione che da curve di competizioni) sono stati analizzati per mezzo di un programma LIGAND come descritto da Balestra et al (2000). La scelta del modello migliore di *fitting* e del calcolo statistico è basato sul F-test (Gotti et al., 1998).

I parametri che definiscono l'affinità del legame (K_d) della ^3H -Epi o dell'affinità dei peptidi e dei ligandi colinergici (K_i) sono stati ottenuti dal *fitting* di almeno tre esperimenti indipendenti entrambi costituiti da una curva di saturazione e da una curva di inibizione. Il valore di legame è espresso come parte del recettore legato sul totale del ligando (B/T) contro il logaritmo della concentrazione totale. La concentrazione totale è data dalla somma del ligando "freddo" e quello radioattivo. Tutte le curve sono state generate dal computer.

L'analisi statistica dei dati è stata fatta applicando il t test del programma GraphPad PRISM™. La significatività è espressa con il valore P:

- (*) P<0.05
- (**) P<0.001
- (***) P<0.0001

Espressione eterologa dei recettori $\alpha 3\beta 2$ in cellule HEK 293

Cellule HEK 293 sono state cresciute in medium Dulbecco supplementato con siero bovino fetale al 10%, L-Glutamina 1%, penicillina G 100 unità/ml e streptomina 100 µg/ml in incubatore 37°C con 10% CO₂. I cDNA per le subunità $\alpha 3$ (Dott. Fornasari) e $\beta 2$ (Dott. Lindstrom) sono state trasfettate in cellule HEK 293 al 30% di confluenza. La trasfezione viene fatta in petri da 10 cm usando 30 µL di JetPEI™ (Polypus, France) (1 mg/ml, pH 7.2) e 10 µg di cDNA. Dopo 48 ore di trasfezione le cellule vengono raccolte, lavate in PBS tramite centrifugazione e utilizzate per studi di binding.

RILASCIO DEI NEUROTRASMETTITORI RADIOMARCATI

Rilascio da fettine di tessuto

I tessuti sono stati dissezionati da ratti Sprague Dawley (Charles River) maschi, messi in tampone KREBS buffer (KB)(118 mM NaCl, 2.4 mM KCl, 2.4 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 10 mM d-Glucosio, 1 mM acido ascorbico e 10µM Pargilina) e fettine di 150 µm preparate mediante l'impiego di un chopper. Le fettine vengono lavate 5 volte con 5 ml di KB mediante decantazione delle fettine in incubatore (37°C e 5% CO₂). Le fettine di tessuto vengono quindi caricate con 100 nM del neurotrasmettitore radioattivo, ³H-Noradrenalina (³H-NA) per l'ippocampo e ³H-Dopamina (³H-DA) per lo striato, mediante incubazione a 37°C per 30 minuti. Dopo l'incubazione le fettine di tessuto vengono lavate per 5 volte con 5 ml di KB a cui è stata aggiunta la nomifensina (0.5 µM) per inibire il reuptake dei neurotrasmettitori, e successivamente risospese nel volume scelto.

Vengono dispensati 100 μ l di fettine di tessuto con pipetta multicanale nelle piastre per il rilascio (Multiscreen Millipore 96p modello MABVN 1250)(figura 15A in basso). Viene aspirato il tampone in eccesso tramite una pompa (figura B in basso) e poi le fettine di tessuto vengono stimulate con agonisti e antagonisti sciolti in KB pi \dot{u} nomifensina.

Vengono raccolte le frazioni contenente il rilascio basale e stimolato, contate nel β -contatore mediante aggiunta di 250 μ l di liquido di scintillazione (Ultima-Gold) oppure mediante l'aggiunta del liquido scintillante microscint e contate nel Microbeta.

La percentuale di rilascio del neurotrasmettitore ottenuta mediante stimolazione con agonisti nicotinici o per depolarizzazione con 40 mM KCL viene calcolata come percentuale del totale della radioattivit \grave{a} presente (ottenuta sommando la radioattivit \grave{a} rilasciata alla radioattivit \grave{a} che rimane nelle fettine dopo la stimolazione).

Anche in questo caso la radioattivit \grave{a} viene raccolta e contata al β contatore o nel microbeta

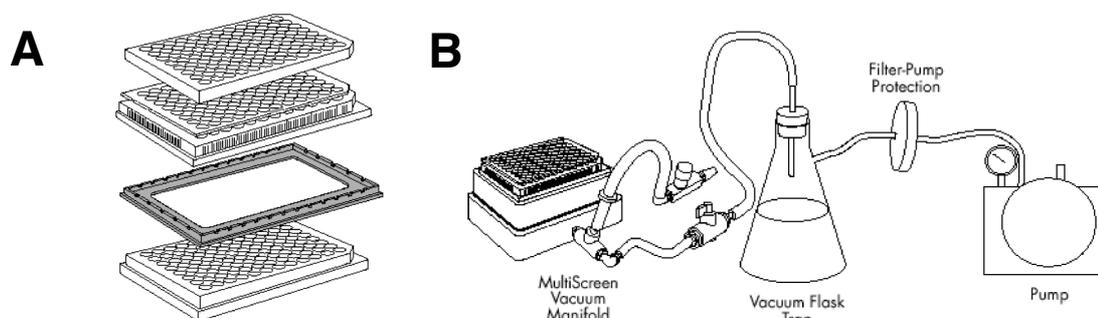


FIGURA 15:
(A) Piastre Multiscreen Millipore 96p modello MABVN 1250.
(B) Sistema a pompa per piastre Multiscreen.

Rilascio da sinaptosomi

I tessuti sono stati dissezionati da topi C57BL (Charles River) oppure topi KO per le subunità $\alpha 6$ e $\alpha 4$ maschi e messi in tampone Saccarosio 0.32 mM, 5 mM HEPES a pH 7.5. I tessuti vengono omogeneizzati mediante potter elettrico e lavati con 0.8 ml di tampone e centrifugati a 2500 rpm per 5 minuti a 4°C e il surnatante viene quindi centrifugato a 9200 rpm per 20 minuti a 4°C. Il pellet di sinaptosomi è quindi risospeso in 1.8 ml di buffer di perfusione (128 mM NaCl, 2.4 mM KCl, 3.2 mM CaCl₂, 1.2mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 25mM HEPES, 10mM Glucose, pH 7.5) e incubato a 37°C per 30 minuti con 250 nM ³H-DA. Vengono successivamente aggiunti 10 ml di tampone di perfusione (più 0.1% BSA, nomifensina 1 μ M) e aliquote di 100 μ l di sinaptosomi dispensate su piastre filtranti (Multiscreen Millipore 96p modello MABWN).

I sinaptosomi vengono lavati 3 volte con il tampone per rimuovere l'eccesso di radioligando e vengono poi raccolte le frazioni di rilascio basale e quelle di rilascio stimolato con agonisti, antagonisti e 40 mM KCL. Alle frazioni vengono aggiunti 250 μ l di liquido di scintillazione (Ultima-Gold) e la radioattività viene contata al micro- β contatore.

Per calcolare la percentuale di rilascio sul totale della radioattività presente vengono contate anche le membrane rimanenti adese ai filtri dopo la stimolazione con i farmaci.

Caratterizzazione elettrofisiologica dei recettori $\alpha 3\beta 2$ espresso in ovociti

Ovociti di *Xenopus laevis* vengono iniettati con 2 ng di cDNA codificanti le subunità $\alpha 3$ e $\beta 2$. 2/3 giorni dopo l'iniezione vengono fatte registrazioni elettrofisiologiche in voltage-clamp con la metodica a 2 elettrodi. Durante le registrazioni gli ovociti sono perfusi con tampone OR2 contenente 82.5 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2.5 mM CaCl₂, 5 mM HEPES e 20 μ g/ml BSA, pH 7.4 contenente Atropina (0.5 μ M) per bloccare l'attività dei recettori muscarinici endogeni. Appena prima dell'utilizzo, l'ACh e gli altri peptidi vengono sciolti nel tampone O2R. Gli ovociti vengono bloccati al voltaggio di - 100 mV, e tutti i dati vengono analizzati off-line con MATLAB (Mathworks, Natick MA).

La risposta basale viene registrata prima dell'esposizione con i peptidi che vengono poi incubati per circa 3-5 minuti prima della registrazione. L'ampiezza del picco data

dalla corrente viene tracciato in funzione della concentrazione del peptide in scala semilogaritmica.

La curva d'inibizione del peptide viene fittata secondo l'equazione $Y = 1 / (1 + ([peptide] / IC_{50})^n)$, dove Y= è la risposta normalizzata, [peptide] è la concentrazione del peptide e n è il coefficiente di Hill. La concentrazione di ACh è nel range del valore di EC₅₀ dell'ACh.

Modellistica e dinamica molecolare

Utilizzando come strutture di riferimento le coordinate cristallografiche di AChBP di *Aplysia Californica* cocristallizzata con l' α -CTx PnIA[A10L-D14K] è stato costruito il modello omologo del dominio extracellulare del recettore nicotinic $\alpha 6\beta 2$. Le sequenze aminoacidiche delle subunità $\alpha 6$ e $\beta 2$ sono state scaricate dalle banche di database SWISS-PROT (codice P43143 e P12390), allineate alla sequenza del modello per mezzo del server Clustal W e l'accuratezza dell'allineamento è stata valutata attraverso la matrice di calcolo BLOSUM.

Vari modelli di interazione dei peptidi sintetizzati sono stati generati attraverso il software modeller8v2.

Abbreviazione degli aminoacidi:

Le abbreviazioni utilizzate sono quelle a singola lettera maiuscola e sono rispettivamente:

A (alanina), C (cisteina), D (acido aspartico), E (acido glutammico), F (fenilalanina), G (glicina), H (istidina), I (isoleucina), K (lisina), L (leucina), M (metionina), N (asparagina), P (prolina), Q (glutamina), R (arginina), S (serina), T (treonina), V (valina), W (triptofano), Y (tirosina).

MATERIALI

L' α -BgTx liofilizzata, gli inibitori delle proteasi, i ligandi colinergici, il Triton X-100, diidro- β -eritroidina, mecamilamina, nicotina, PMSF, glucosio, NaCl, KCl, MgSO₄, CaCl₂, KH₂PO₄, NaHCO₃, acido ascorbico, pargilina, nomifensina, gli antisieri anti-coniglio e anti-ratto sono stati acquistati dalla ditta Sigma-Aldrich, USA; l'Epi non radioattiva dalla ditta RBI; il sefarosioCnBr-attivato 4BCL dalla ditta Pharmacia, Svezia; ¹²⁵I- α BgTx, ¹²⁵I-Epi, ³H-Epi, ³H-DA e ³H-NA da PerkinElmer Life Sciences.

I filtri GF/C dalla ditta Whatman; le colonnine LISO-PHASE immuno assorbenti anti- γ -globuline di coniglio legate a Spharose CL-4C dalla Tecno-genetics; il liquido scintillante Filter-count e Ultima-Gold dalla Perkin Elmer; tutti i reagenti utilizzati ultrapuri dalla Merck e Sigma.

I ratti utilizzati per gli esperimenti sono Sprague Dawley dalla Charles River.

I topi C57BL utilizzati per gli esperimenti sono stati acquistati dalla Charles River.

I topi C57BL KO per α 4 e α 6 sono stati gentilmente donati dal gruppo del Dott. Uve Maskos (Parigi).

RISULTATI

α -CONOTOSSINE

Caratterizzazione farmacologica della α -CTxPIA e dei suoi analoghi peptidici verso i nAChR nativi

La struttura tridimensionale di PIA determinata tramite NMR mostra come questa α -CTx possieda una topologia detta “ ω -shaped” che l’accomuna agli altri membri della sottofamiglia di α -CTx4/7. Una caratteristica fondamentale delle conotossine è la presenza di ponti disolfuro all’interno della sequenza peptidica tra i residui di cisteina (C). PIA presenta due ponti disolfuro: il primo tra i residui C4 e C10 (ponte disolfuro corto) e il secondo tra i residui C5 e C18 (ponte disolfuro lungo). Per capire il ruolo della presenza dei ponti disolfuro nel determinare l’affinità dei peptidi verso i recettori nativi $\alpha 6\beta 2^*$ sono stati sintetizzati peptidi con delezione di diversi aminoacidi o in cui le cisteine sono state sostituite da alanine. L’eliminazione di anche uno solo dei ponti disolfuro ha determinato la completa perdita di affinità del peptide verso il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ (dati non mostrati).

Studi di immunopurificazione e di binding recettoriale (Zoli et al., 2002, Champiaux et al., 2003) hanno mostrato che nello striato e nel collicolo superiore sono presenti almeno due sottotipi $\alpha 6\beta 2^*$: $\alpha 6\beta 3\beta 2$ e $\alpha 6\alpha 4\beta 3\beta 2$. La caratterizzazione farmacologica del sottotipo $\alpha 6\alpha 4\beta 3\beta 2$ presente nello striato, mostra che questo sottotipo possiede due siti di legame non equivalenti uno all’interfaccia $\alpha 6/\beta 2$ e uno all’interfaccia $\alpha 4/\beta 2$. Gli studi di competizione da parte di PIA del binding della 125 I-Epi al sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ immunoimmobilizzato da noi compiuti, hanno confermato la presenza in questo sottotipo di due diversi siti, caratterizzati da un sito ad alta affinità localizzato all’interfaccia tra le subunità $\alpha 6/\beta 2$ ($K_i = 32$ nM) e un sito a bassa affinità, corrispondente all’interfaccia tra le subunità $\alpha 4/\beta 2$ ($K_i = 35$ μ M).

La presenza di un tripeptide formato da arginina (R), acido aspartico (D) e prolina (P) nella porzione N-terminale è una caratteristica che distingue PIA dagli altri membri della sottofamiglia. Per cercare di capire il ruolo che svolge il tripeptide RDP nel legame di PIA al sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ abbiamo sintetizzato nuovi peptidi analoghi alle α -CTx mancanti progressivamente degli aminoacidi all’N-terminale e determinato la loro affinità verso il recettore $\alpha 6\beta 2^*$ nativo di ratto.

Come mostrato nella tab. 1 se a PIA viene tolta l'arginina in posizione 1 (ΔR -PIA) si ottiene un nuovo peptide con una affinità circa 140 volte inferiore ($K_i = 4.7 \mu M$). La successiva delezione dell'acido aspartico in posizione 2 (ΔDP -PIA) e della prolina in posizione 3 (ΔRDP -PIA) determina un'ulteriore riduzione dell'affinità dei peptidi verso il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ con una diminuzione dell'affinità rispettivamente di 220 volte ($K_i = 7.2 \mu M$) e circa 500 volte ($K_i = 15.9 \mu M$) (fig. 16).

Dimostrata l'importanza di R1 all'N-terminale di PIA si è cercato di capire il ruolo della carica di questo aminoacido sostituendolo o con l'aminoacido basico lisina (R1K), o con un aminoacido apolare, leucina (R1L), e infine con un aminoacido acido glutammico (R1E). I tre peptidi ottenuti in cui è stata sostituita la R1 sono risultati molto meno affini al sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ con una diminuzione dell'affinità rispettivamente di 56, 100 e 500 volte (tab. 1).

La sostituzione di R con con l'aminoacido basico K (R1K), determinava una forte riduzione nell'affinità del peptide indicando quindi che era la presenza della carica fortemente basica del gruppo guanidinico dell'R1, importante per indirizzare in maniera corretta il legame della tossina al recettore e quindi essenziale per determinare l'alta affinità. Abbiamo quindi sintetizzato un nuovo peptide dove R1 è stata sostituita da dimetil-arginina (R[diMe]), che maschera il gruppo guanidico. L'affinità di questo peptide decresce di 168 volte ($K_i = 5.4 \mu M$) con un valore di affinità molto simile alla α -CTx troncata ΔR -PIA determinando quindi che, il tripeptide RDP presente all'N-terminale, e in particolare il gruppo guanidinico di R1, è responsabile dell'alta affinità di PIA verso il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$.

L'affinità delle α -CTx native e dei peptidi derivati è stata valutata anche verso il sottotipo immunoimmobilizzato $\alpha 4\beta 2$ ottenuto da estratti di corteccia di ratto. I risultati ottenuti mostrano che sia la tossina nativa che i peptidi analoghi hanno bassa affinità verso questo sottotipo ($>30 \mu M$) senza variazioni significative di affinità.

Studi funzionali delle α -CTx native e modificate

E' noto che la nicotina e gli agonisti nicotinici sono in grado di stimolare il rilascio di 3H -DA da sinaptosomi e fettine di striato (Grady et al., 2007) interagendo con i nAChR presinaptici presenti in questa area cerebrale. Mediante l'impiego di una metodica di rilascio del neurotrasmettitore basata su una piastra a 96 pozzetti filtranti (vedi materiali e metodi) abbiamo valutato funzionalmente l'effetto di PIA e ΔR -PIA

sul rilascio di $^3\text{H-DA}$ da fettine di striato di ratto. Sia la nicotina (0.01-100 μM) che l'agonista nicotinico $\beta 2$ A-85380 (0.1-1000 nM) sono in grado di rilasciare $^3\text{H-DA}$ in modo dose-dipendente con valori di EC_{50} rispettivamente di 0.2 μM e 2.8 nM (fig. 17A e 17B). Questo rilascio è selettivamente bloccato da antagonisti nicotinici come di-idro- β -eritroidina ($\text{IC}_{50} = 2.7\mu\text{M}$) e mecamilamina ($\text{IC}_{50} = 530$ nM) (fig. 17C).

La potenza di PIA e $\Delta\text{R-PIA}$ è stata testata sul rilascio di $^3\text{H-DA}$ evocato da nicotina 10 μM (considerato come 100%) in presenza di concentrazioni crescenti di PIA e $\Delta\text{R-PIA}$. PIA è in grado di bloccare il 50% del rilascio di $^3\text{H-DA}$ con una IC_{50} di 33 nM, mentre $\Delta\text{R-PIA}$ inibisce solo una piccola percentuale del rilascio a concentrazioni molto alte ($\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$)(fig. 18). Quindi si può concludere che l'Arginina R1 presente all'N-terminale oltre ad essere fondamentale per il legame di PIA con il recettore è anche importante per determinare la potenza con cui PIA inibisce il rilascio di DA ottenuta per stimolazione del sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$.

Modello molecolare di interazione di PIA con il recettore $\alpha 6\beta 2$

Poiché non era disponibile un modello tridimensionale della struttura del recettore $\alpha 6\beta 2^*$ in collaborazione con il Dr Grazioso dell'Università di Milano è stato creato un modello per studiare l'interazione delle α -CTx con il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$. La modellizzazione per omologia del dominio extracellulare del recettore $\alpha 6\beta 2$ è stato generato utilizzando come template l'*Acetylcholine Binding Protein* (Ac-AChBP), cocristallizzata con la α -CTxPnIA[A10L/D14K] come precedentemente riportato da Celie et al (2005) (fig. 19).

Le modalità di associazione delle α -CTx non sono state recuperate dalla simulazione del docking, ma sono state ottenute copiando la conformazione di PnIA[A10L, D14K] co-cristallizzata nell'Ac-AChBP.

I complessi così ottenuti sono stati sottoposti ad una simulazione MD dove i livelli energetici sono stati minimizzati per avere una stabilità geometrica e termica, e i siti di interazione sono stati analizzati visivamente singolarmente per confermare la corretta disposizione spaziale tra la molecola e il recettore. Ciò ha garantito la stabilità della rete dei legami a idrogeno e la natura complementare di interazione delle regioni idrofobiche e idrofiliche delle α -CTx con il sito di legame del recettore.

L'analisi nel nostro modello tridimensionale delle interazioni di PIA con i residui presenti nel sito di legame di $\alpha 6\beta 2$ mostra che la principale interazione avviene tra il

gruppo guanidinico di R1 di PIA e il residuo carico negativamente dell'acido aspartico (D)167 presente sulla subunità $\beta 2$ ($\beta 2$ -D167) (fig. 20). I restanti aminoacidi di PIA interagiscono efficientemente con alcuni residui all'interno dell'ansa C del sito di legame della subunità $\alpha 6$. L'aminoacido PIA-D2 forma un ponte ad idrogeno con la catena laterale di $\alpha 6$ -asparagina (N)187; il residuo PIA-istidina (H)13 crea un doppio ponte ad idrogeno con le catene laterali di $\alpha 6$ -tirosina (Y)186 e $\alpha 6$ -T146. Inoltre il gruppo carbonilico di $\alpha 6$ -cisteina (C)188 crea un ponte a idrogeno con la catena laterale di PIA-N14 e la porzione idrofobica di PIA formata dai residui valina (V)12 e P8, interagisce con la catena laterale di $\beta 2$ -leucina (L)107, $\beta 2$ - fenilalanina (F)105 e $\alpha 6$ - acido glutammico (E)146.

Caratterizzazione del profilo farmacologico di MII e dei suoi derivati peptidici verso i sottotipi nativi $\alpha 6\beta 2^*$, $\alpha 4\beta 2^*$ e $\alpha 3\beta 2^*$

MIl è una tossina composta da 16 aminoacidi che appartiene alla stessa sottofamiglia di α -CTx4/7, anche MII ha un doppio sito di legame verso il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ con un sito ad alta affinità corrispondente al legame all'interfaccia $\alpha 6/\beta 2$ ($K_i = 5.6\text{nM}$), e un altro sito di bassa affinità dovuto al legame all'interfaccia $\alpha 4/\beta 2$ ($K_i = 8 \mu\text{M}$). A differenza di PIA, MII è in grado di legare anche il sottotipo $\alpha 3\beta 2^*$.

Dopo aver identificato il ruolo chiave del tripeptide RDP di PIA nel determinare la sua affinità al sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ abbiamo valutato l'ipotesi che l'aggiunta del tripeptide RDP ad un'altra α -CTx della stessa famiglia ne potesse modificarne l'affinità e la potenza. A tal fine è stato aggiunto il tripeptide RDP all'N-terminale di MII mancante o non della glicina (G) in posizione 1 (fig. 21) ottenendo quindi due peptidi ibridi analoghi alla α -CTx MII.

Studi preliminari hanno dimostrato che la presenza della glicina in posizione 1 non influenzava l'affinità dei peptidi ibridi verso il sottotipo immunoimmobilizzato $\alpha 6\beta 2^*$ per cui abbiamo successivamente caratterizzato l'affinità del peptide ibrido con RDP all'N-terminale di MII mancante della glicina in posizione 1 da noi ora definita RDP-MII.

Come mostrato in tab. 2 anche nel caso della peptide ibrido RDP-MII i dati di binding mostrano un fitting migliore per il modello a doppio sito con rispettivi valori di K_i 0.43 nM e 23 μM . Quindi l'ibrido RDP-MII mostra un'affinità 10 volte superiore rispetto a MII nativa (K_i 0.43 vs 5.6 nM) e la sostituzione dell'arginina con dimetil-

arginina (R[diME]DP-MII) riporta l'affinità di RDP-MII a valori sovrapponibili a quelli di MII nativa ($K_i = 4.5 \text{ nM}$). Questi risultati di binding indicano che l'aggiunta di RDP aumenta l'affinità di MII di 10 volte, un effetto quantitativamente molto minore rispetto a quello presente in PIA, confermando quindi che, come già precedentemente indicato, gli aminoacidi maggiormente responsabili dell'alta affinità di MII sono presenti all'interno di MII.

E' stata inoltre valutata la potenza di MII e RDP-MII nel saggio funzionale di rilascio di $^3\text{H-DA}$ da fettine di striato. In accordo con i dati riportati in letteratura abbiamo determinato che MII è in grado di bloccare il 50% del rilascio di $^3\text{H-DA}$ e il peptide ibrido RDP-MII mostra risultati comparabili. Tuttavia, la potenza dei due peptidi è diversa: il valore di IC_{50} per MII è di 39.1 nM ($\text{pIC}_{50} = 7.40 \pm 0.11$, $n=4$) mentre per RDP-MII è 7.3 nM ($\text{pIC}_{50} = 8.13 \pm 0.11$, $n=4$) (fig. 22A). Lo spostamento verso sinistra della curva di inibizione del rilascio rispecchia l'aumentata potenza di RDP-MII rispetto ad MII e la comparazione delle due curve di inibizione mostra una differenza statisticamente significativa nel valore di $\log \text{IC}_{50}$, con un valore P di 0.0009.

I risultati di caratterizzazione funzionale di MII e RDP-MII riflettono i valori di affinità delle stesse verso i recettori $\alpha 6\beta 2^*$ e dimostrano quindi che l'aggiunta di RDP a MII ottimizza l'interazione del peptide con il recettore.

Successivamente è stata valutata la selettività delle α -CTx native e ibride mediante lo studio del loro effetto sul rilascio di $^3\text{H-NA}$ da fettine di ippocampo. Nel ratto il rilascio di $^3\text{H-NA}$ dall'ippocampo è mediato solo dal sottotipo nicotinico $\alpha 3\beta 4^*$ ed entrambe le α -CTx (MII e RDP-MII) anche a concentrazioni superiori a $20 \mu\text{M}$ non sono in grado di inibire il rilascio di questo neurotrasmettitore confermandone quindi la loro selettività verso il solo sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ (fig. 22B).

Modello molecolare di interazione di MII e RDP-MII con il recettore $\alpha 6\beta 2^*$

I dati di affinità ottenuti dagli esperimenti di binding sono stati analizzati con il modello ottenuto per omologia del recettore $\alpha 6\beta 2$.

Come indicato anche dagli studi di NMR, MII risulta avere una faccia polare ed una idrofobica e nel nostro modello computazionale di $\alpha 6\beta 2$ sono stati individuati una rete di legami ad idrogeno che indirizza opportunamente queste due facce di MII ai siti secondari del recettore.

La porzione idrofilica di MII è legata al recettore attraverso un ponte a idrogeno tra il carbonile del residuo MII-L15 e il gruppo idrossilico della catena laterale di treonina della subunità $\beta 2$ ($\beta 2$ -T59). Inoltre l'anello di imidazolo dell'istidina 9 (MII-H9) forma un legame a idrogeno con la catena laterale di $\beta 2$ -T59; il residuo MII-E11 è legato alla catena laterale di lisina in posizione 75(K75) di $\beta 2$; il residuo MII-G1 crea un doppio legame ad idrogeno con il gruppo ammidico del residuo $\alpha 6$ -N187; infine la catena laterale del residuo MII-N5 interagisce con $\alpha 6$ mediante l'aminoacido Y186 (fig. 23).

La controparte idrofobica della tossina MII formata dai residui MII-P6, MII-V7 e MII-L10 lega le subunità del recettore sui residui $\beta 2$ -L107, $\beta 2$ -F115, $\beta 2$ -L117, $\alpha 6$ -T146, $\alpha 6$ -W145 e $\alpha 6$ -Y193.

Nel modello $\alpha 6\beta 2$ la modalità di inserimento e associazione del peptide ibrido RDP-MII risulta essere molto simile a MII. Tuttavia, come nel caso di PIA, la presenza di RDP all'N-terminale determina una maggiore interazione di R1 con la zona ad alta carica negativa presente sui residui $\beta 2$ -D166-D167. Sia le due ulteriori interazioni ioniche tra R1 e D166-D167 che la mancanza del legame a idrogeno che coinvolge G1 (che è stata deleta), possono spiegare l'aumento dell'affinità di RDP-MII MII verso il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$.

Progettazione, sintesi e analisi farmacologica dei peptidi MII[E11R] e RDP-MII[E11R]

Nel nostro modello la proiezione delle cariche elettrostatiche degli aminoacidi presenti sulla superficie del sito di legame del recettore $\alpha 6\beta 2^*$ mostra che il residuo E11 di MII si lega alla subunità $\alpha 6$ in un'area particolarmente ricca di cariche negative delimitata dai residui E19, D148, E151 e E191 della subunità stessa (fig. 24). Allineando le sequenze delle subunità $\alpha 3$ e $\alpha 6$ (fig. 25) si nota che i residui D148 e E191 sono conservati tra le subunità mentre i residui E19 e E151 della subunità $\alpha 6$ sono sostituiti nella subunità $\alpha 3$ rispettivamente da A19 e K151. Questa sostituzione conferisce al sottosito di legame della subunità $\alpha 3$ una carica meno negativa rispetto allo stesso sottotipo presente nella subunità $\alpha 6$. E' stato quindi ipotizzato che la mutazione dell'aminoacido E11 di MII, con R potesse portare una carica positiva nella tossina che avrebbe potuto rafforzare il legame con il sottosito della subunità $\alpha 6$

portante le cariche negative E19 e E151 e sfavorire il legame dello stesso peptide alla subunità $\alpha 3$.

L'importante ruolo del residuo $\alpha 6$ -E151 nel definire l'alta affinità verso il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ è stato anche suggerito dal lavoro del gruppo di Azam et al (2008) che lo ha dimostrato mediante studi di mutagenesi recettoriale.

Per questi motivi è stato deciso di sintetizzare due nuovi peptidi dove l'E11 è stato sostituito da R11 sia nei peptidi MII che in RDP-MII ottenendo i peptidi mutati MII[E11R] e RDP-MII[E11R].

Entrambi questi peptidi sono stati analizzati mediante esperimenti di binding a recettori nativi $\alpha 6\beta 2^*$ e $\alpha 3\beta 2^*$, testati funzionalmente per la loro capacità di inibire il rilascio di ^3H -DA da fettine di striato e infine caratterizzati in esperimenti di elettrofisiologia per determinare la loro potenza nel bloccare in ovociti esperimenti il sottotipo $\alpha 3\beta 2^*$ di ratto la corrente indotta da ACh.

I valori di K_i di legame per MII[E11R] e RDP-MII[E11R] al recettore immunoimmobilizzato $\alpha 6\beta 2^*$ per il sito ad alta affinità sono rispettivamente 5 nM e 0.9 nM (tab. 2), che sono valori molto simili a quelli trovati per MII ($K_i = 5.6$ nM) e RDP-MII ($K_i = 0.43$ nM). Quindi la sostituzione dell'acido glutammico in arginina nelle sequenze di MII e RDP-MII non altera l'affinità dei peptidi mutati rispetto ai peptidi parentali. Gli studi di binding al sottotipo nativo $\alpha 3\beta 2^*$ di ratto umano hanno invece dimostrato che MII[E11R] e RDP-MII[E11R] legano con meno affinità questo sottotipo (tab. 3). Infatti i valori di K_i sono rispettivamente 68 e 88 volte minori rispetto alle tossine MII e RDP-MII. Quindi si può concludere che il residuo E in posizione 11 è fondamentale per il riconoscimento del sottotipo $\alpha 3\beta 2^*$ mentre ha un ruolo trascurabile nel legame al sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$.

Gli studi di binding di MII[E11R] e RDP-MII[E11R] evidenziano quindi un forte guadagno in termini selettività (misurato come rapporto di affinità $\alpha 3\beta 2^*/\alpha 6\beta 2^*$) verso il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ a discapito di $\alpha 3\beta 2^*$ (rispettivamente di 846 e 4900 volte), questo aumento di selettività è molto più alto di quello ottenuto con RDP-MII e MII (rispettivamente 116 e 11 volte)(fig. 26).

Abbiamo anche determinato la specie-specificità dei peptidi MII[E11R] e RDP-MII[E11R] valutando la loro affinità verso il sottotipo $\alpha 3\beta 2^*$ umano trasfettato e abbiamo determinato una diminuzione di affinità simile a quella valutata verso il sottotipo di ratto indicando quindi che non sono specie-specifici (tab. 3 e fig. 26).

In parallelo agli esperimenti di binding si è valutata anche la potenza dei peptidi MII[E11R] e RDP-MII[E11R] nell'inibire il rilascio di $^3\text{H-DA}$ stimolato da nicotina e determinato valori di IC_{50} rispettivamente di 44.0 ± 0.10 nM ($\text{pIC}_{50} = 7.35 \pm 0.11$, $n=4$) e 9.1 ± 0.10 nM ($\text{pIC}_{50} = 8.04 \pm 0.08$ $n=4$) (fig. 27). I valori ottenuti sono molto simili a quelli ottenuti per MII e RDP-MII (39.1 e 7.3 nM) confermando che la sostituzione E11R non influisce sulla capacità antagonista dei peptidi verso il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$.

Poichè in vivo non è possibile misurare nessuna attività funzionale mediata dal sottotipo $\alpha 3\beta 2^*$, abbiamo studiato con tecniche di elettrofisiologia gli effetti dei peptidi MII[E11R] e RDP-MII[E11R] nell'inibire la corrente stimolata dall'ACh nei sottotipi $\alpha 3\beta 2^*$ di ratto e umano espressi in ovociti.

Nella figura 28 sono riportati i tracciati di inibizione delle correnti al picco dell'ACh ottenuti con concentrazioni crescenti dei peptidi MII(A), RDP-MII (B) MII[E11R] (C) e RDP-MII[E11R] (D).

Nella tab. 3 sono riportati i valori di IC_{50} ricavati dalle curve di inibizione di MII e RDP-MII di 3.0 e 9.7 nM mentre per i peptidi MII[E11R] e RDP-MII[E11R] sono stati calcolati dei valori di IC_{50} rispettivamente di 64 e 33.5 nM. I risultati ottenuti esprimendo il sottotipo $\alpha 3\beta 2$ umano sono qualitativamente e quantitativamente simili. Questi risultati indicano quindi che la sostituzione E11R all'interno della sequenza MII e RDP-MII non modifica l'affinità e la potenza dei peptidi per il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$, ma determina una riduzione di affinità e potenza verso il sottotipo $\alpha 3\beta 2^*$.

I LIGANDI BIVALENTI

Caratterizzazione farmacologia dei composti bivalenti

Per cercare di comprendere meglio in ruolo dei nAChR presenti a livello presinaptico sui terminali dopaminergici e soprattutto per cercare di chiarire se e come questi recettori in associazione con i recettori dopaminergici D2 partecipano al rilascio di DA nello striato, è stata progettata e sintetizzata una nuova classe di composti in grado di legare sia i nAChR che i recettori dopaminergici D2, anch'essi presenti sugli stessi terminali. Queste nuove molecole, chiamate anche composti bifunzionali, sono state sintetizzate in collaborazione con il professore De Amici dell'Università di Milano e caratterizzate per il loro profilo farmacologico e funzionale verso i nAChR e ne stiamo ora valutando il profilo farmacologico verso i recettori dopaminergici.

In particolare ci siamo concentrati sulla caratterizzazione di una classe particolare di composti bifunzionali costituiti da un farmaco antagonista nicotinic (per i sottotipi recettoriali $\alpha 6\beta 2^*$ e $\alpha 4\beta 2^*$) e un farmaco agonista D2/D3 uniti da uno spaziatore con una catena metilenica di diversa lunghezza. Il farmaco agonista D2/D3, il farmaco antagonista nicotinic sintetizzato con gli spaziatori di 5, 6, 8, 10, 12 CH₂ (denominati rispettivamente Nan1, Nan2, Nan3, Nan4, Nan5) e i 5 composti bifunzionali corrispondenti (Bif1, Bif2, Bif3, Bif4, Bif5) (fig. 29) sono stati caratterizzati per il loro profilo farmacologico verso i sottotipi nicotinic $\alpha 6\beta 2^*$ e $\alpha 4\beta 2^*$ e $\alpha 7$.

I valori di K_i sia dei composti Nan1, Nan2, Nan3, Nan4, Nan5 che dei rispettivi composti bivalenti determinati verso i sottotipi eteromeric immunoimmobilizzati $\alpha 6\beta 2^*$ e $\alpha 4\beta 2^*$ e verso i recettori omomeric $\alpha 7$ sono mostrati nella tab. 4.

Come risulta dalla tab. 4 la diversa lunghezza degli spaziatori è risultata essere importante nel determinare l'affinità sia dei composti Nan1-5 che Bif1-5 verso i sottotipi $\alpha 4\beta 2^*$ e $\alpha 6\beta 2^*$ mentre non influenza la bassa affinità verso il sottotipo $\alpha 7$. In particolare per il composto Bif 2 è stato determinato un valore di K_i di 250 nM e 93 nM rispettivamente verso i sottotipi $\alpha 6\beta 2^*$ e $\alpha 4\beta 2^*$, mentre il corrispondente antagonista nicotinic con legato lo spaziatore di 6 CH₂ (Nan 2) ha valori di K_i di 7,6 μ M per il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ e K_i di 4.1 μ M per il sottotipo $\alpha 4\beta 2^*$. Quindi il composto bifunzionale Bif 2 ha valori di affinità 30 e 44 volte superiori rispetto a Nan 2 ed entrambi mostrano una relativa bassa affinità per il sottotipo omomeric $\alpha 7$ (Bif 2 K_i = 13 μ M e Nan 2 K_i >100 μ M).

Anche il composto Nan 3 e il rispettivo bifunzionale Bif 3 mostrano una relativa alta affinità, con valori di K_i rispettivamente di 107 nM e 394 nM per il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ e 59 nM e 183 nM per il sottotipo $\alpha 4\beta 2^*$, mentre per il sottotipo omomero $\alpha 7$ hanno rispettivamente valori di K_i di 56 μ M e 80 μ M. In questo caso non vi è una significativa differenza di affinità tra il composto bivalente e la rispettiva componente nicotinic.

Analisi degli effetti funzionali dei composti bivalenti sul rilascio di $^3\text{H-DA}$ da fettine di striato

Recentemente è stata riportata un'interazione fisica a livello dei terminali striatali tra il recettore dopaminergico D2 e il sottotipo $\alpha 4\beta 2$, ma rimane ancora da chiarire il meccanismo d'interazione funzionale tra i recettori.

L'obiettivo del nostro lavoro è stato quindi la sintesi di composti bivalenti formati da un agonista dopaminergico D2 e un antagonista nicotinic con la speranza di ottenere un composto in grado di modulare il rilascio di DA dai terminali dopaminergici.

Mediante esperimenti di rilascio di $^3\text{H-DA}$ da fettine di striato di ratto è stato prima determinato se i farmaci bifunzionali modificano il rilascio basale di DA e poi se, mantenendo la loro proprietà antagonista riescono a bloccare il rilascio di DA indotto dalla stimolazione con nicotina 10 μ M. Come mostrato nella fig. 30 circa la metà delle molecole prese in esame non influenzano il rilascio basale di $^3\text{H-DA}$ neppure alla concentrazione di 100 μ M, comportamento atteso trattandosi di antagonisti. Invece le molecole Nan 4, Bif 4, Nan 5 e Bif 5 a concentrazioni >50 μ M aumentano il rilascio basale di DA. Questo effetto che è presente solo ad alte concentrazioni dei composti è probabilmente ascrivibile a interazioni aspecifiche dei composti con altri componenti del circuito. Sorprendentemente il composto Bif 3 anche a basse dosi (circa 200 nM) è in grado di indurre il rilascio di $^3\text{H-DA}$ e questo effetto ha un andamento a U invertito poichè scompare ad alte concentrazioni (circa 100 μ M).

Per meglio capire se gli effetti di rilascio $^3\text{H-DA}$ osservati nelle fettine di striato potessero essere dovuti a qualche meccanismo aspecifico abbiamo voluto analizzare i composti Nan e Bif in esperimenti di rilascio di $^3\text{H-NA}$ da fettine di ippocampo. In questa area cerebrale i sottotipi di nAChR responsabili del rilascio di NA sono diversi rispetto ai sottotipi striatali, e il sottotipo coinvolto dopo attivazione da nicotina nel mediare il rilascio di $^3\text{H-NA}$ è il sottotipo $\alpha 3\beta 4$.

Come mostrato nella fig. 31 nessuno dei composti è in grado di indurre rilascio basale di $^3\text{H-NA}$ indicando quindi che rilascio basale indotto dai composti, in particolare da Bif 3 è un fenomeno che avviene solo a livello dello striato.

Tutti i composti Nan e Bif sono stati anche analizzati per la loro attività antagonista valutata come capacità di inibire il rilascio di $^3\text{H-DA}$ indotto da nicotina.

I risultati ottenuti sono mostrati nella fig. 32: i composti Nan 1 e Nan 2 sono in grado di bloccare il rilascio solo ad alte dosi (oltre 10 μM); i composti Bif 2, Nan 3 e Bif 4 sono in grado di bloccare solo transitoriamente il rilascio di $^3\text{H-DA}$ indotto da nicotina poichè ad alte concentrazioni dei composti il rilascio si ristabilisce a valori intorno al 100%. I composti Nan 4, Nan 5 e Bif 5 a nessuna concentrazione sono in grado di bloccare il rilascio di $^3\text{H-DA}$ e ad alte dosi stimolano un ulteriore rilascio che supera il valore ottenuto con nicotina 10 μM . Questo effetto è simile a quello ottenuto dagli stessi composti a livello del rilascio basale di $^3\text{H-DA}$.

Il composto Bif 3, che è stato visto essere in grado di far rilasciare $^3\text{H-DA}$ a livello basale, blocca completamente il rilascio di $^3\text{H-DA}$ indotto da nicotina con IC_{50} di 3.7 μM (fig. 33A).

Analisi farmacologica del rilascio di $^3\text{H-DA}$ indotto da Bif 3

Per approfondire e capire meglio l'effetto che Bif 3 svolge sul rilascio basale di $^3\text{H-DA}$ abbiamo compiuto esperimenti di rilascio costruendo curve dose-risposta con concentrazioni crescenti del composto. Come si può vedere in fig. 33B il composto bivalente Bif 3 si comporta quasi come un agonista con un aumento rispetto al basale del $89 \pm 9\%$ e un $\text{EC}_{50} = 102 \pm 10 \text{ nM}$, quest'ultimo valore molto simile ai valori di K_i ottenuti con i saggi di legame (394 nM per il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ e 183 nM per il sottotipo $\alpha 4\beta 2^*$).

Successivamente abbiamo valutato il rilascio di $^3\text{H-DA}$ stimolato da una concentrazione di 10 μM di Bif 3 e determinato che il rilascio indotto è completamente inibito (98%) dall'antagonista nicotinico di-idro- β -eritroidina e parzialmente inibito (53%) dall'antagonista selettivo $\alpha 6\beta 2^*$ MII (fig. 33C), dimostrando che l'effetto finale di rilascio di $^3\text{H-DA}$ a livello dei terminali dopaminergici dovuto a Bif 3 implica il coinvolgimento dei sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ e $\alpha 4\beta 2^*$.

Analisi elettrofisiologica dei composti Nan 3 e Bif 3 su cellule HEK293 transfettate con le subunità umane $\alpha 4\beta 2$

In collaborazione con il Dott. Fucile dell'Università di Roma "La Sapienza" sono stati condotti esperimenti di elettrofisiologia su cellule HEK293 transfettate con le subunità umane $\alpha 4\beta 2$ per determinare su questo sottotipo le proprietà agoniste e antagoniste dei composti Nan 3 e Bif 3.

Come mostrato nella fig. 34 sia Nan 3(A) che Bif 3(B) inducono una minima risposta dovuta all'attivazione del sottotipo $\alpha 4\beta 2$ (Nan 3 $R_{max} = 3.8 \pm 0.6 \%$; Bif 3 $R_{max} = 4.0 \pm 2\%$).

Quando analizzato per la sua attività antagonista il composto Bif 3 risulta mantenere la sua caratteristica farmacologica, infatti è in grado di bloccare completamente la risposta evocata da ACh 40 μM con una IC_{50} di 8.5 μM (fig.34C). Quindi i risultati degli esperimenti di elettrofisiologia svolti su cellule HEK293 transfettate con le subunità umane $\alpha 4\beta 2$ mostrano che Bif 3 ha mantenuto il suo carattere antagonista e non ha acquisito un'attività agonistica significativa verso il sottotipo $\alpha 4\beta 2$.

Poiché il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ non si esprime in sistemi eterologhi non è stato possibile determinare con tecniche elettrofisiologiche l'effetto di Bif 3 sul sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$.

Analisi funzionale del composto Bif 3 tramite esperimenti di rilascio di 3H -DA da sinaptosomi di topo C57BL

Per cercare di capire il meccanismo d'azione attraverso cui il composto Bif 3 è in grado di far rilasciare DA è stata utilizzata una metodica diversa per valutare il rilascio del neurotrasmettitore DA. Poiché con le fettine di tessuto si preserva l'intero circuito presente nello striato, è stato deciso di studiare il rilascio di DA dai sinaptosomi, un sistema acellulare dove tutti i circuiti sono stati distrutti e dove il rilascio di DA è dovuto solo ai recettori o canali presenti sulla membrana dei sinaptosomi. A tal fine sono stati preparati i sinaptosomi dallo striato di topi C57BL mediante centrifugazioni differenziali che permettono di isolare solamente la porzione presinaptica dello striato.

Come mostrato nella fig. 35A concentrazioni crescenti di Bif 3 sono in grado di far rilasciare DA con una $EC_{50} = 282 \pm 41.0$ nM e con un effetto massimo di aumento del $45 \pm 4.0\%$ rispetto al valore basale. I valori di EC_{50} determinati sono in accordo con i risultati ottenuti sulle fettine ($EC_{50} = 102 \pm 10$ nM) e nei sinaptosomi il composto Bif

3 è risultato avere un aumento del $45 \pm 4.0\%$ rispetto al rilascio basale, valore inferiore rispetto a quanto ottenuto nelle fettine dove l'aumento è dell' $89 \pm 6.0\%$.

Successivamente si è analizzata l'inibizione da parte di antagonisti competitivi e non competitivi nicotinici del rilascio di $^3\text{H-DA}$ stimolata dal composto Bif 3 alla concentrazione $10 \mu\text{M}$. L'antagonista competitivo di-idro- β -eritroidina è in grado di inibire di rilascio di $^3\text{H-DA}$ indotto da Bif 3 con una inibizione massima (I_{max}) dell' $85.0 \pm 7.5\%$, mentre l'antagonista non competitivo mecamilamina non inibisce il rilascio ($I_{\text{max}} = 9.0 \pm 5.0\%$)(fig. 35B). Per confermare ulteriormente che l'antagonista non competitivo mecamilamina non è in grado di bloccare il rilascio di DA è stato determinato il rilascio ottenuto con concentrazioni crescenti di Bif 3 in presenza dell'antagonista mecamilamina alla concentrazione di $10 \mu\text{M}$. Come mostrato nella fig. 35C anche in questo caso il composto Bif 3 è in grado di rilasciare DA con $\text{EC}_{50} = 284 \pm 31 \text{ nM}$ e con un aumento rispetto al basale del $56.0 \pm 13.0\%$, valore molto simile a quello ottenuto senza l'antagonista mecamilamina. Questo risultato insieme ai dati precedenti ci porta a concludere che il composto Bif 3 con la porzione nicotinica della molecola si lega al nAChR, infatti l'effetto viene abolito utilizzando un antagonista competitivo, però l'effetto finale di rilascio di DA è dovuto all'interazione della molecola con la componente dopaminergica (recettore D2 e/o trasportatore DAT), infatti l'effetto persiste anche in presenza del blocco del canale del nAChR con l'antagonista non competitivo mecamilamina. Per confermare ulteriormente questa ipotesi è stato comparato l'effetto che si ottiene utilizzando dosi crescenti del composto Bif 3 rispetto all'effetto ottenuto utilizzando dosi equimolari crescenti delle singole componenti della molecola Bif 3 (Nan 3 + D2A). Come mostrato in fig. 36A il composto Nan 3 da solo non da nessun effetto mentre l'effetto dell'agonista D2A è massimo ma non è diverso in presenza di concentrazioni equimolari di Nan 3.

Come mostrato nella Figura 36A l'effetto sia quantitativo che qualitativo sul rilascio di $^3\text{H-DA}$ di concentrazioni equimolari di Nan 3 e D2A è completamente diverso da quello ottenuto con le stesse concentrazioni di BiF 3.

Effetti del composto Bif 3 sul rilascio di ³H-DA da sinaptosomi di topi WT e KO per le subunità $\alpha 6$ e $\alpha 4$ del nAChR

Per capire ulteriormente il ruolo dei nAChR nel determinare gli effetti di Bif 3 sono stati fatti saggi funzionali di rilascio di ³H-DA da sinaptosomi di topi C57BL WT e deleti delle subunità $\alpha 6$ e $\alpha 4$ (gentile dono del Dott. Uve Maskos).

Come mostrato in fig 36B il farmaco Bif 3 è in grado di evocare a basse dosi il rilascio di DA da tessuti provenienti da topi WT mentre questo effetto alle stesse dosi non è presente nei sinaptosomi preparati da topi KO. All'aumentare della dose di Bif 3 si ha il raggiungimento di un plateau di rilascio nei sinaptosomi ottenuti dai topi WT mentre a dosi alte di Bif 3 si ha un progressivo aumento di rilascio nei sinaptosomi dei topi KO.

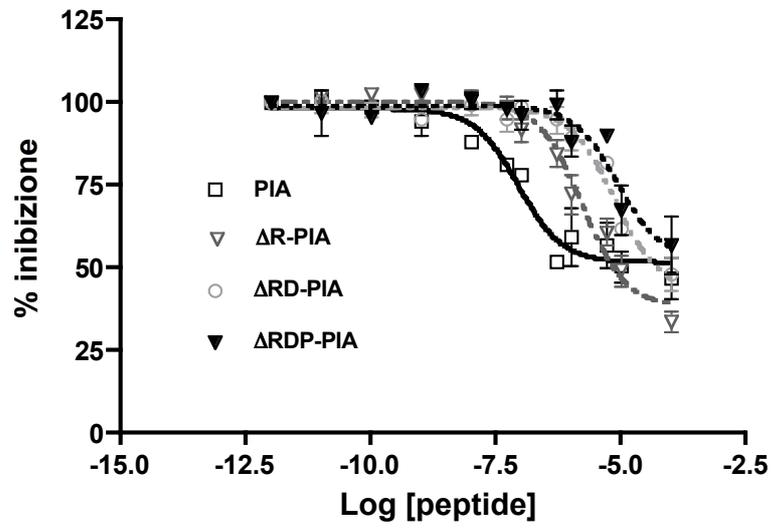


FIGURA 16: Curve di inibizione del legame di ^{125}I -Epi al recettore immunoimmobilizzato $\alpha 6\beta 2^*$ di striato da parte di concentrazioni crescenti di PIA, $\Delta\text{R-PIA}$, $\Delta\text{RD-PIA}$ e $\Delta\text{RDP-PIA}$.

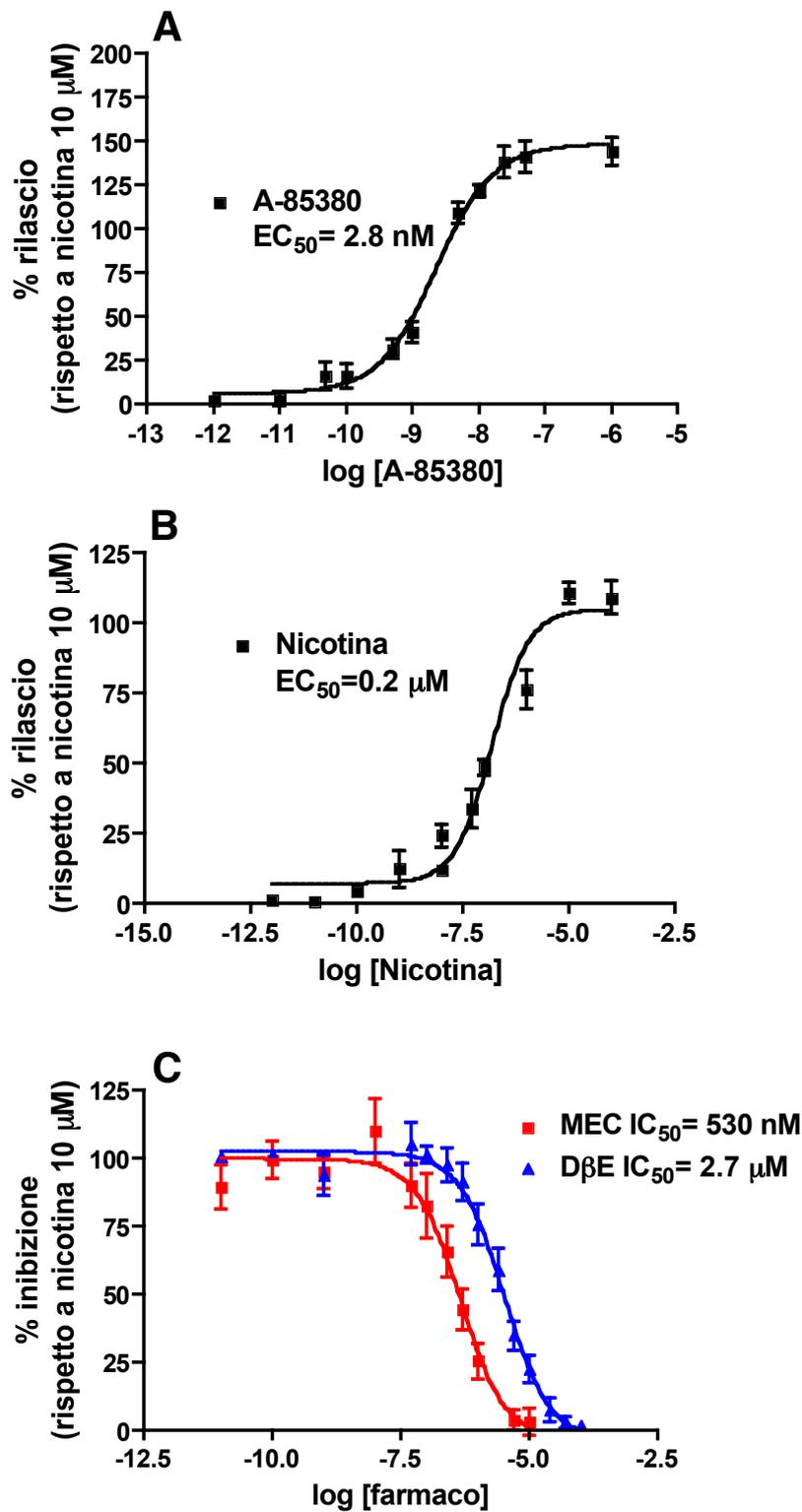


FIGURA 17: Caratterizzazione del rilascio di 3 H-DA da fettine di striato di ratto. A) Curva di rilascio ottenuta con concentrazioni crescenti di A-85380. B) Curva di rilascio ottenuta con concentrazioni crescenti di nicotina. C) Curve di inibizione del rilascio ottenute con concentrazioni crescenti di mecamilamina (MEC) e diidro- β -eritroidina (D- β -E) considerando il 100% di rilascio quello ottenuto con 10 μ M nicotina.

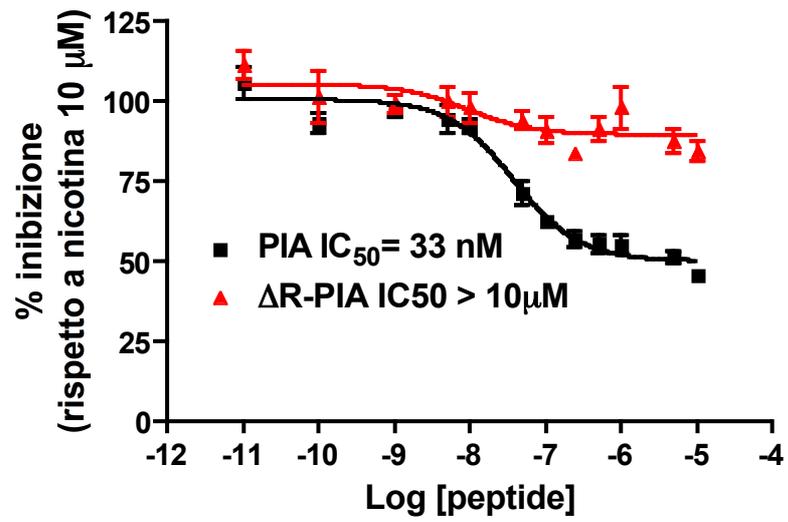


FIGURA 18: Curve di rilascio di $^3\text{H-DA}$ stimolato con nicotina $10 \mu\text{M}$ (considerato il 100%) e inibito da concentrazioni crescenti di PIA e $\Delta R\text{-PIA}$.

A

		1						10								
		.						.								
PnIA [A10LD14K]	. . G	C	C	S	L	P	P	C	A	L	N	N	P	K	Y	C
PIA	R D P	C	C	S	N	P	V	C	T	V	H	N	P	Q	I	C
MII	. . G	C	C	S	N	P	V	C	H	L	E	H	S	N	L	C

B

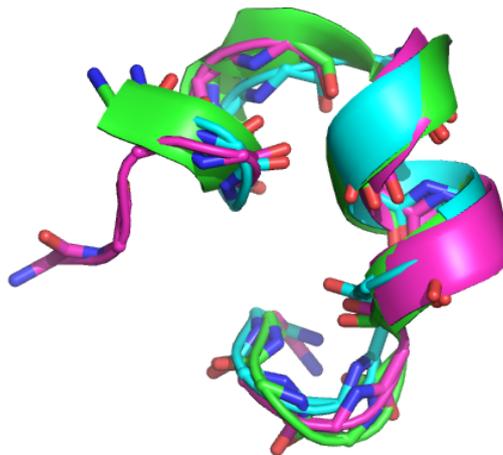


FIGURA 19: A) Allineamento delle sequenze aminoacidiche delle α -CTxPnIA[A10LD14K], PIA e MII, i residui conservati sono evidenziati in rosso.
 B) Confronto delle strutture tridimensionali ottenute con studi di NMR di PIA (magenta), MII (verde) e dal cristallo di PnIa[A10LD14K].

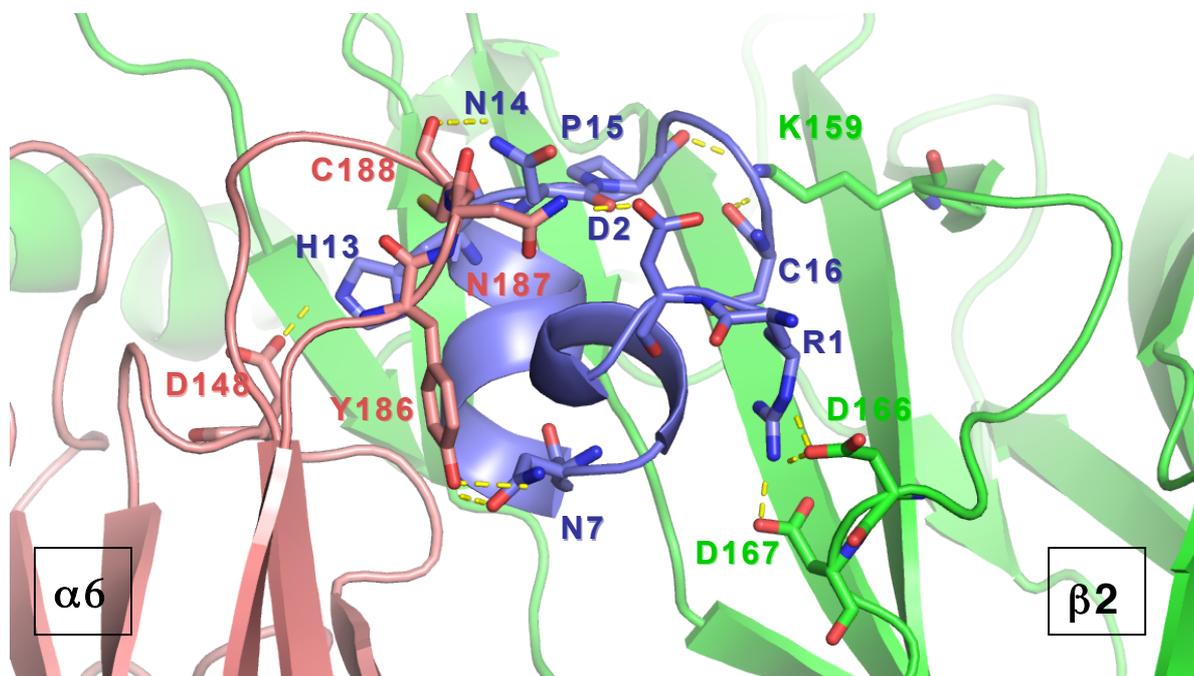


FIGURA 20: Ricostruzione tridimensionale, nel modello ottenuto per omologia, di PIA (blu) presente all'interfaccia tra la subunità $\alpha 6$ (rosa) e $\beta 2$ (verde). Gli aminoacidi coinvolti nei legami ad idrogeno sono uniti dal tratteggio giallo.

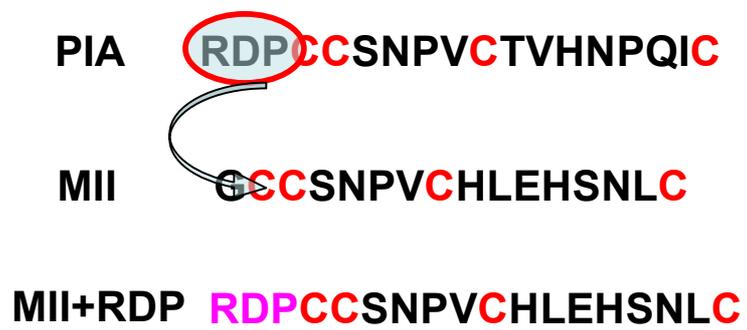


FIGURA 21: Sequenza aminoacidica di RDP-MII ottenuta dopo delezione della glicina in posizione 1 di MII e aggiunta del tripeptide iniziale (RDP) di PIA all' N-terminale di MII.

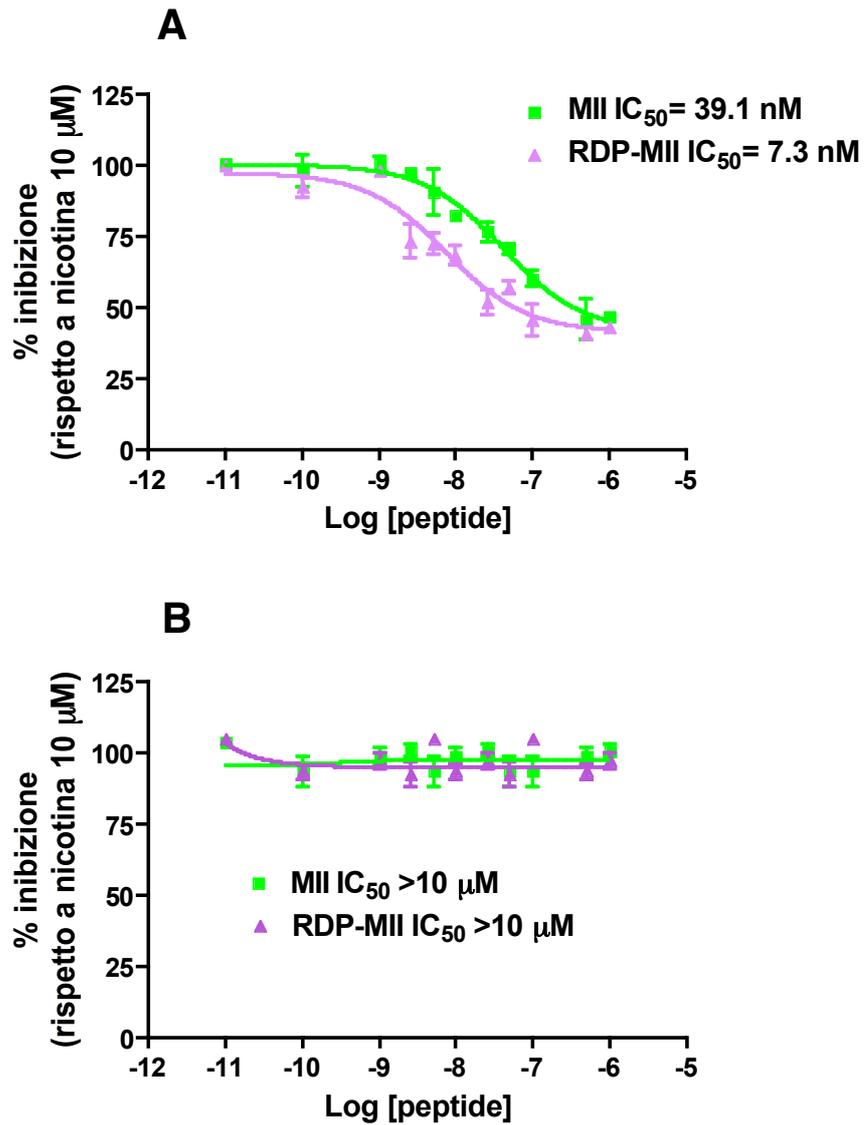


FIGURA 22: A) Curve di inibizione, ottenute con concentrazioni crescenti di MII e RDP-MII, del rilascio di ^3H -DA da fettine di striato di ratto indotto da nicotina $10 \mu\text{M}$. B) Curve di inibizione del rilascio di ^3H -NA da fettine di ippocampo di ratto, indotto da nicotina $100 \mu\text{M}$, ottenute con concentrazioni crescenti di MII e RDP-MII.

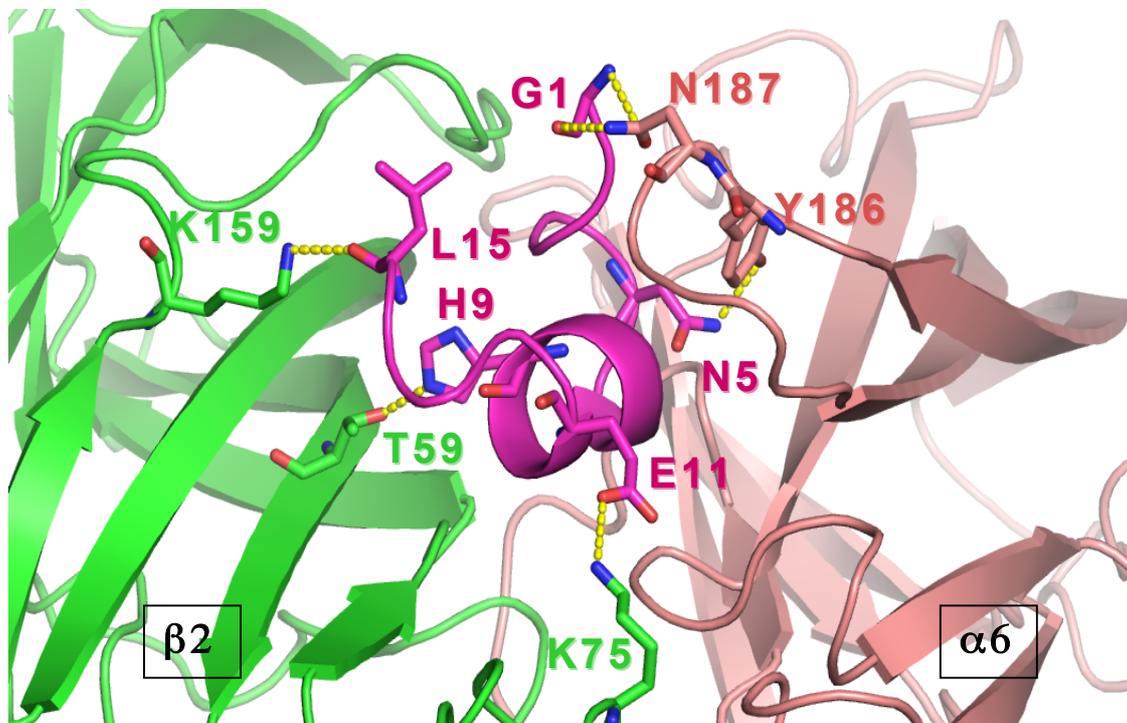


FIGURA 23: Ricostruzione tridimensionale, nel modello di $\alpha 6\beta 2$ ottenuto per omologia, di MII (magenta) presente all'interfaccia tra la subunità $\alpha 6$ (rosa) e $\beta 2$ (verde). Gli aminoacidi coinvolti nei legami ad idrogeno sono uniti dal tratteggio giallo.

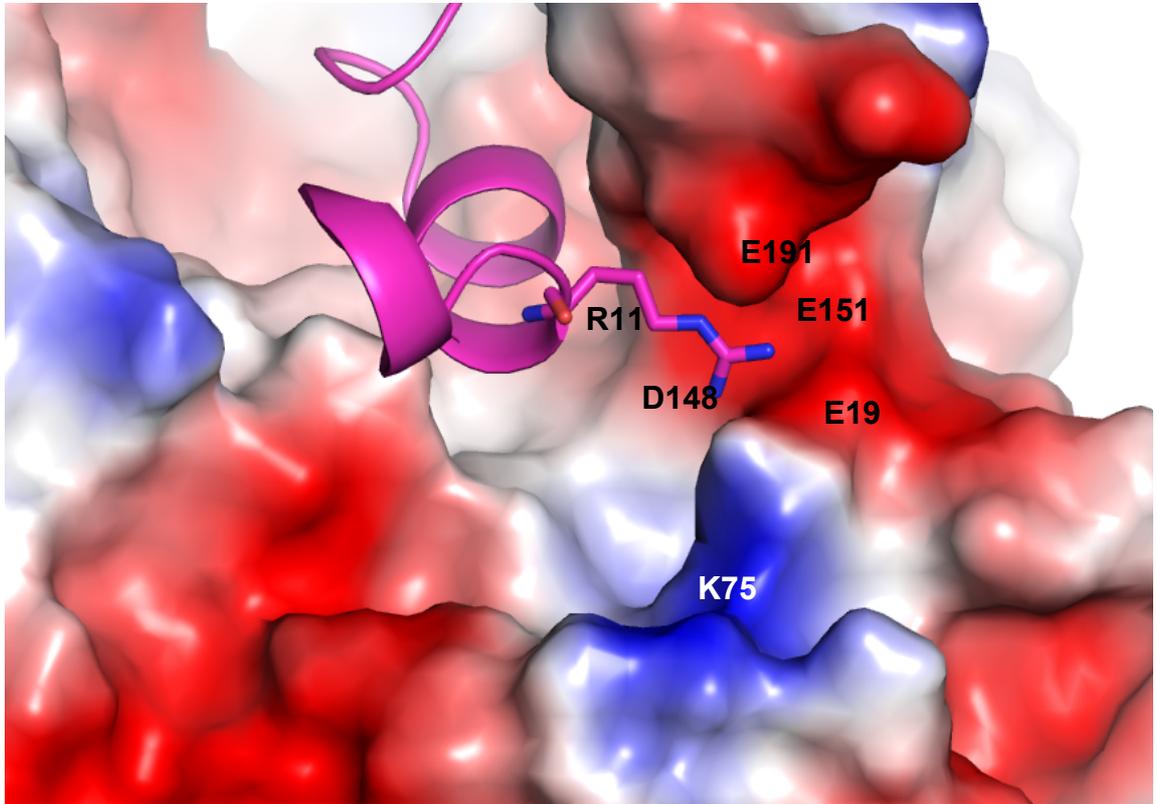


FIGURA 24: Vista dall'alto della ricostruzione tridimensionale dell'ipotetico legame di MII[E11R] (magenta) all'interfaccia $\alpha 6$ - $\beta 2$. La superficie del recettore è rappresentata dalla proiezione delle cariche elettrostatiche degli aminoacidi, in blu sono le cariche positive e in rosso le cariche negative.

```

1      10      20      30      40      50      60
rat_a6 TERLFHKLFSH. YNQFIRPVENVSDFVTVHFEVAITQLANVDEVNQIMETNLWLRHIWNDYKLRWDPM
rat_a3 AEHRLFQYLFED. YNEIIRPVANVSHPVIIQFEVSMSQLVKVDEVNQIMETNLWLKQIWNDYKLKWKPS
rat_b2 TEERLVEHLLDPSRYNKLIRPATNGSELVTVQLMVSLAQLISVHEREQIMETNVWLTQEWEDYRLTWKPE
rat_b4 AEKLMDDLLNKTRYNNLIRPATSSQLISIRLELSLSQLISVHEREQIMETSIWLKQEWTDYRLAWNSS

70     80     90     100    110     120     130
rat_a6 EYDGIETLRVPADKIWKPDIVLYNNAVGDFQVEGKTKALLKYNGMITWTPPATFKSSCPMDITFFPFDHQ
rat_a3 DYQGVEFMRVPAEKIWKPDIVLYNNADGDFQVDDKTKALLKYTGEVTWIPPATFKSSCKIDVTYFPFDYQ
rat_b2 DFDNMKKVRLPSKHIWLPDVVLYNNADGMYEVSFYSNAVVSYDGSIFWLPPATYKSACKIEVKHFPFDQQ
rat_b4 CYEGVNILRIPAKRVWLPDEVLYNNADGTYEVSVYTNVIVRSNGSIQWLPPATYKSACKIEVKYFPFDQQ

140    150    160    170    180    190    200
rat_a6 NCSLKFGSWTYDKAEIDLLIIGSKVDMNDFWENSEWEIIDASGYKHDIKYNCCEIYTDITYSFYIRRL.
rat_a3 NCTMKFGSWSYDKAKIDLVLIGSSMNLKDYWESGEWAIIKAPGYKHEIKYNCCEEIYQDITYSLYIRRL.
rat_b2 NCTMKFRSWTYDRTEIDLVLKSDVASLDDFTPSGEWDIIALPGRRNENPD...DSTYVDITYDFIIRRKP
rat_b4 NCTLKFRSWTYDHTEIDMVLKSPTAIMDDFTPSGEWDIVALPGRRTVNPQ...DPSYVDVTYDFIIKRKP

```

FIG 25: Allineamento delle sequenze all’N-terminale della regione di legame delle subunità $\alpha 6$, $\alpha 3$, $\beta 2$ e $\beta 4$ dei nAChR di ratto. In rosso vengono evidenziati i residui identici, con rettangoli con lettere rosse i residui conservati e in nero i residui variabili.

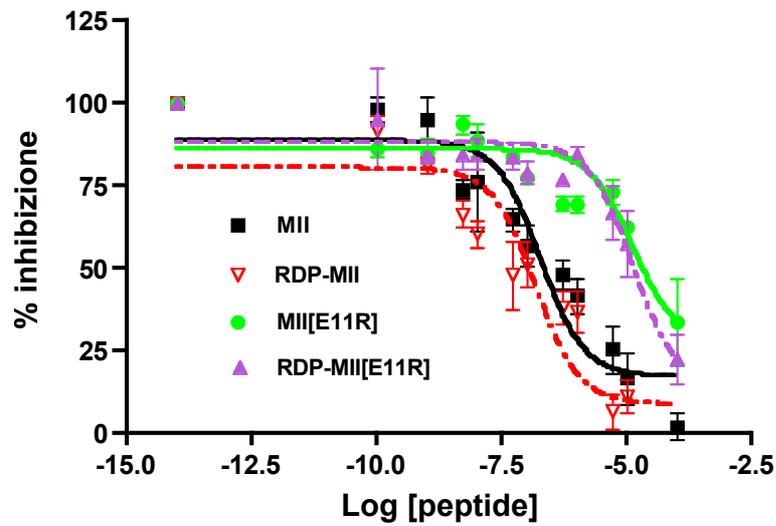


FIGURA 26: Curve di competizione con concentrazioni crescenti di MII, RDP-MII, MII[E11R] e RDP-MII[E11R] del legame di ^{125}I -Epi al recettore immunoimmobilizzato $\alpha 3\beta 2^*$ ottenuto dal collicolo superiore.

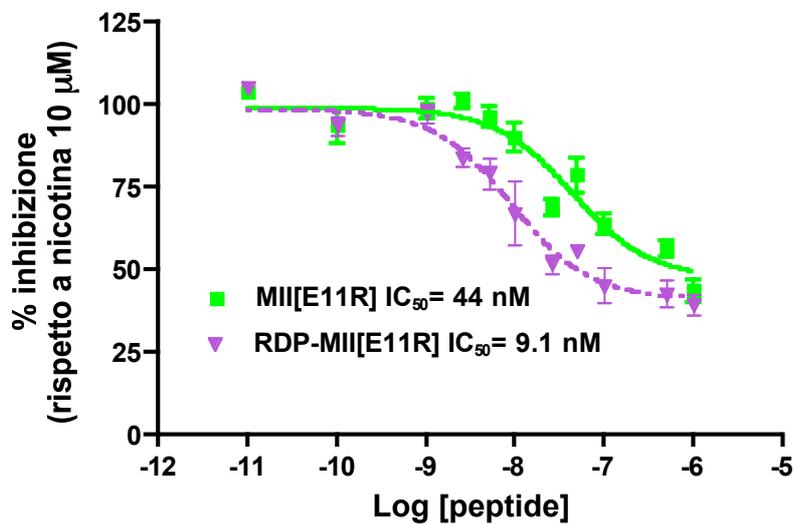


FIGURA 27: Curve di inibizione del rilascio di ^3H -DA, in fettine di striato di ratto, indotto da $10\ \mu\text{M}$ nicotina, ottenute con concentrazioni crescenti di MII[E11R] e RDP-MII[E11R].

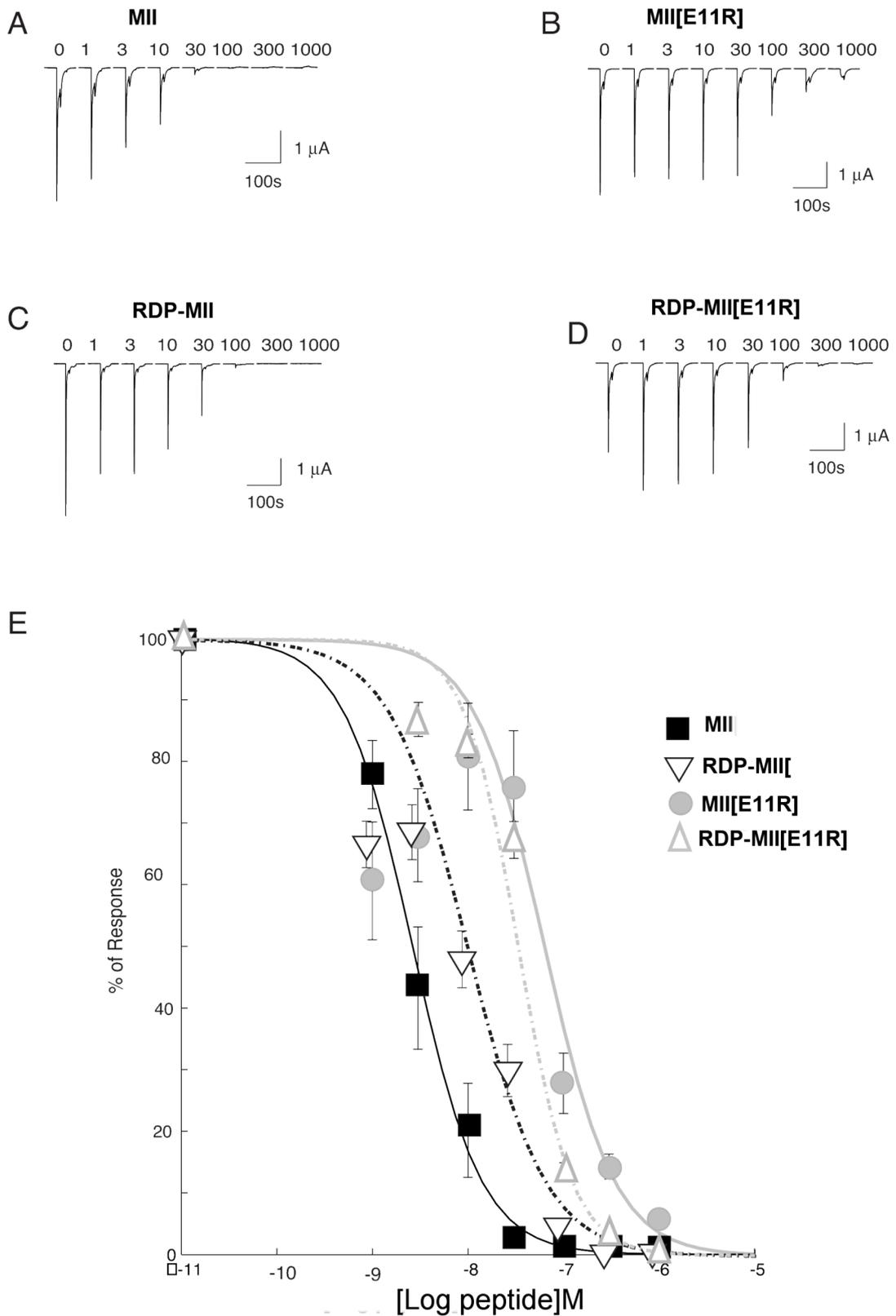
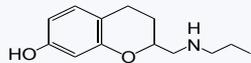
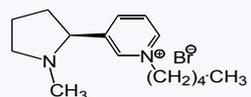


FIGURA 28: Curve di inibizione da parte di concentrazioni crescenti di MII, RDP-MII, MII[E11R] e RDP-MII[E11R] del picco di corrente indotto da ACh 50 μ M in oociti esprimenti il sottotipo $\alpha 3\beta 2$ di ratto.

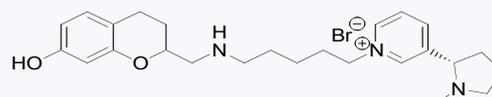
D2A (AGONISTA DOPAMINERGICO D2)



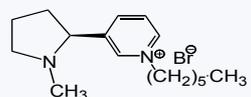
Nan 1



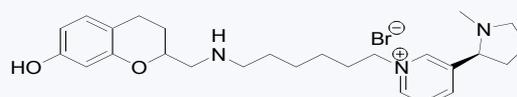
Bif 1



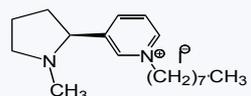
Nan 2



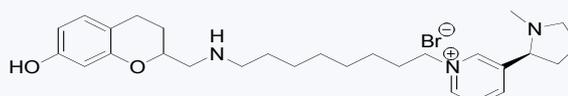
Bif 2



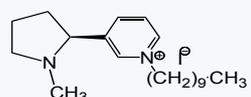
Nan 3



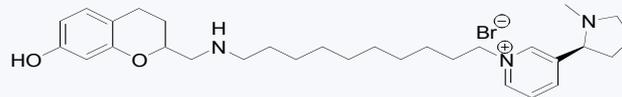
Bif 3



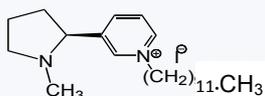
Nan 4



Bif 4



Nan 5



Bif 5

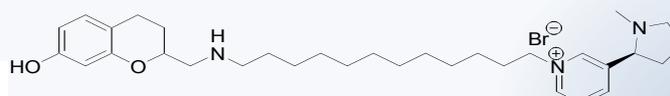


FIGURA 29: Elenco delle strutture chimiche dei composti bifunzionali (Bif 1-Bif 5), degli antagonisti nicotinici (Nan 1-Nan 5) e dell'agonista dopaminergico D2 (D2A)

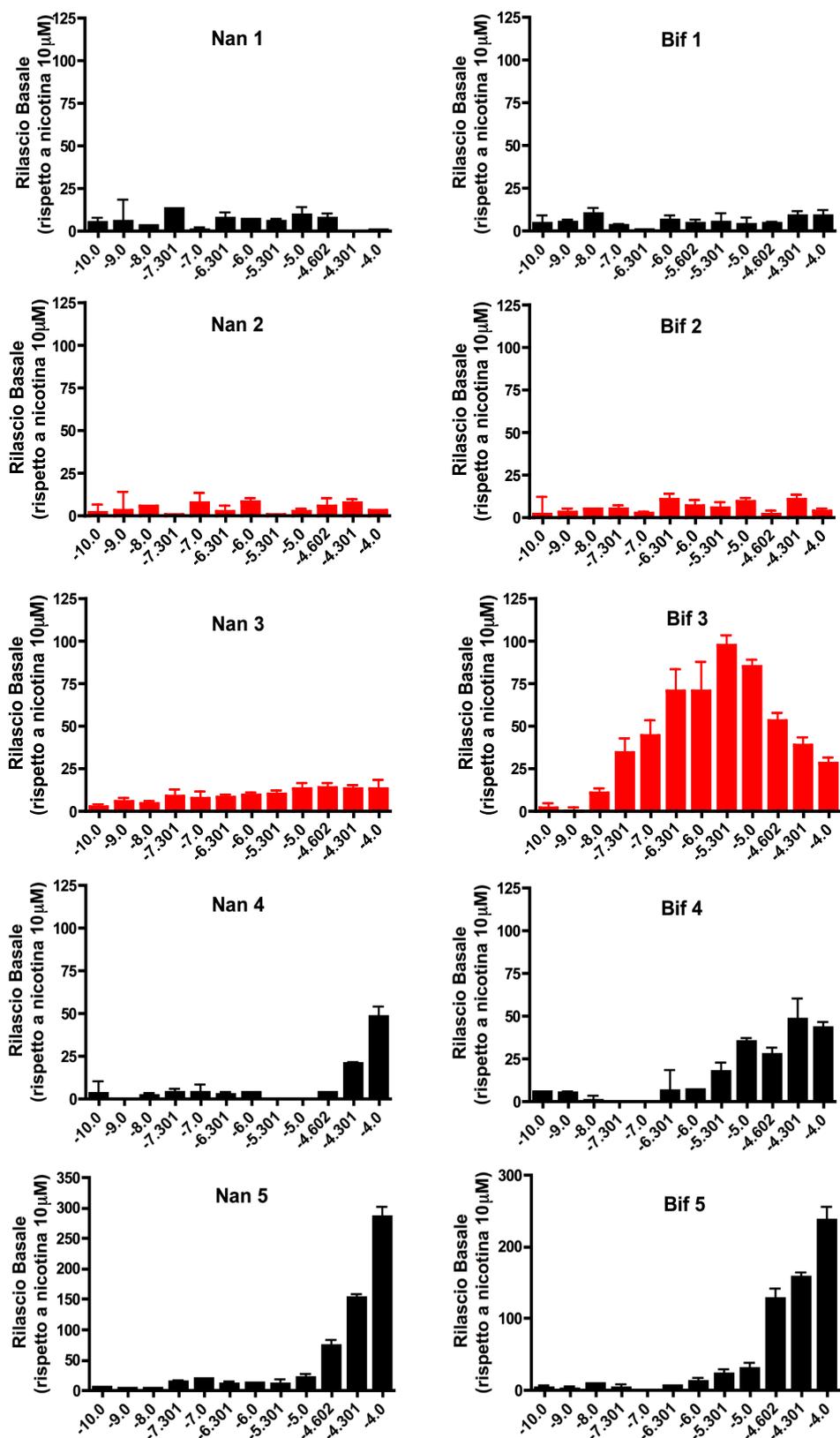


FIGURA 30: Istogrammi rappresentanti il rilascio basale di ³H-DA da fettine di striato di ratto indotto da concentrazioni crescenti dei composti indicati.

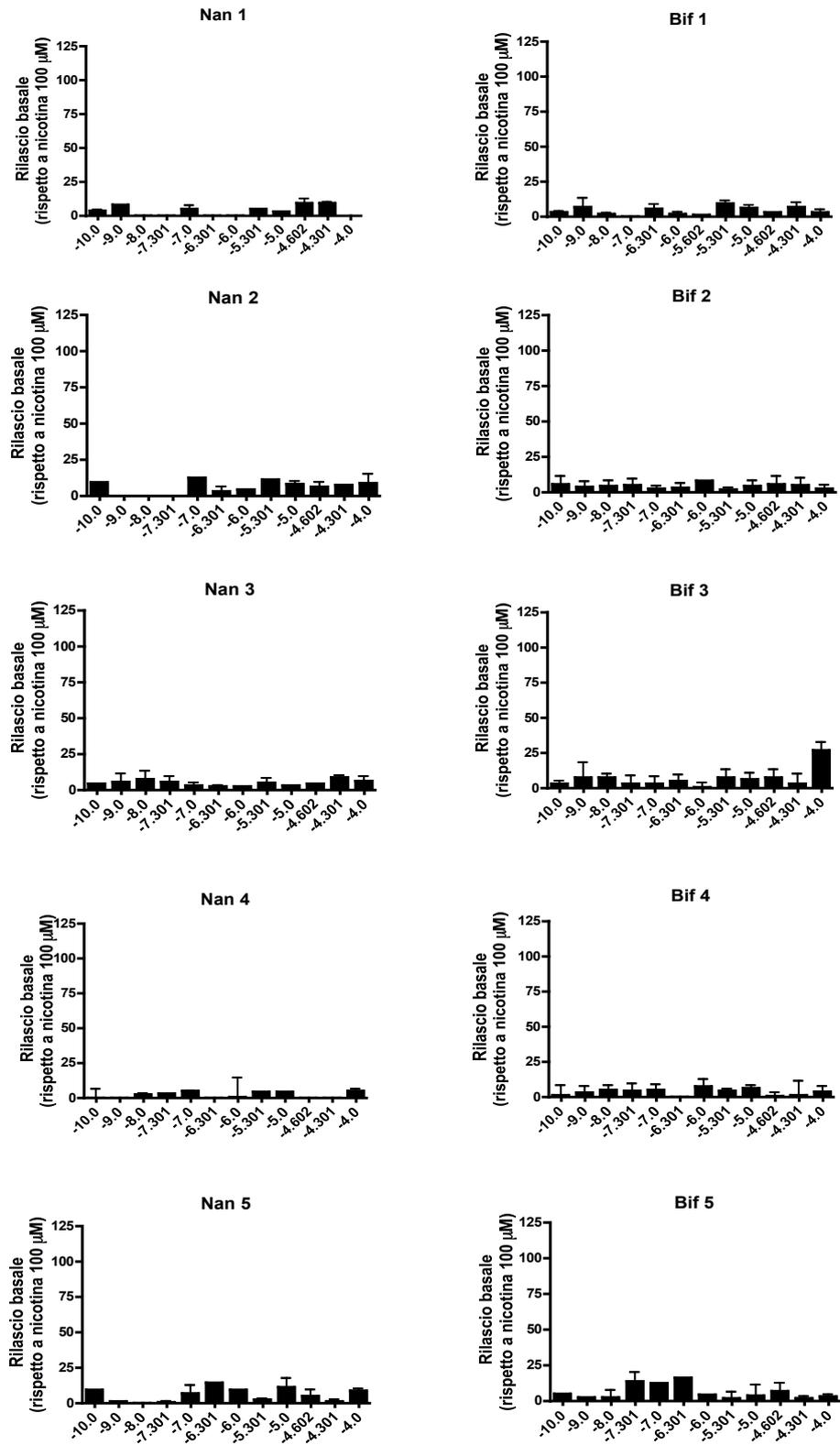


FIGURA 31: Istogrammi rappresentanti il rilascio basale di ³H-NA da fettine di ippocampo di ratto indotto da concentrazioni crescenti dei composti indicati.

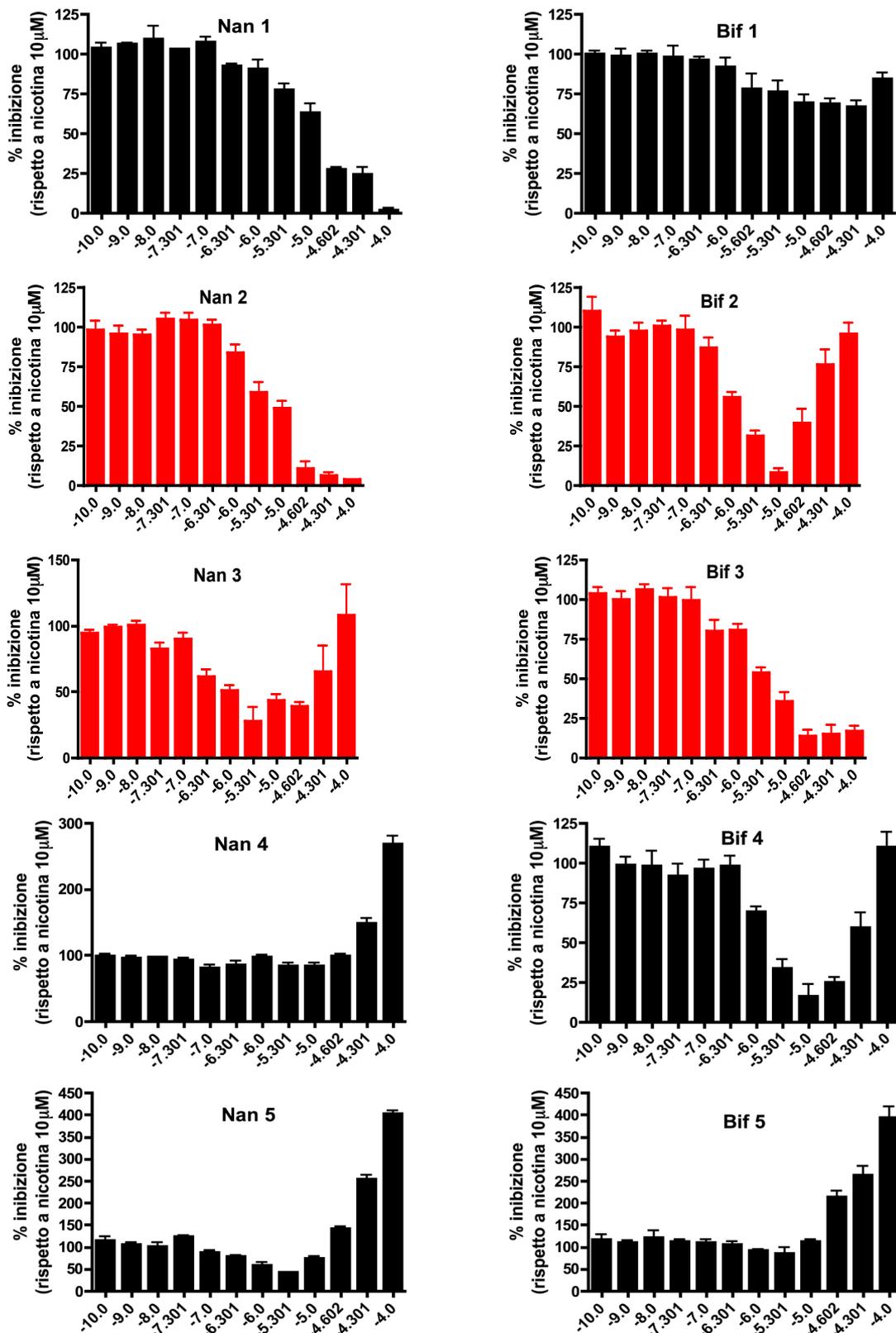


FIGURA 32: Inibizione del rilascio di ³H-DA indotto da nicotina 10 μM in fettine di striato. Gli istogrammi rappresentano l'inibizione del rilascio da parte di concentrazioni crescenti dei composti indicati.

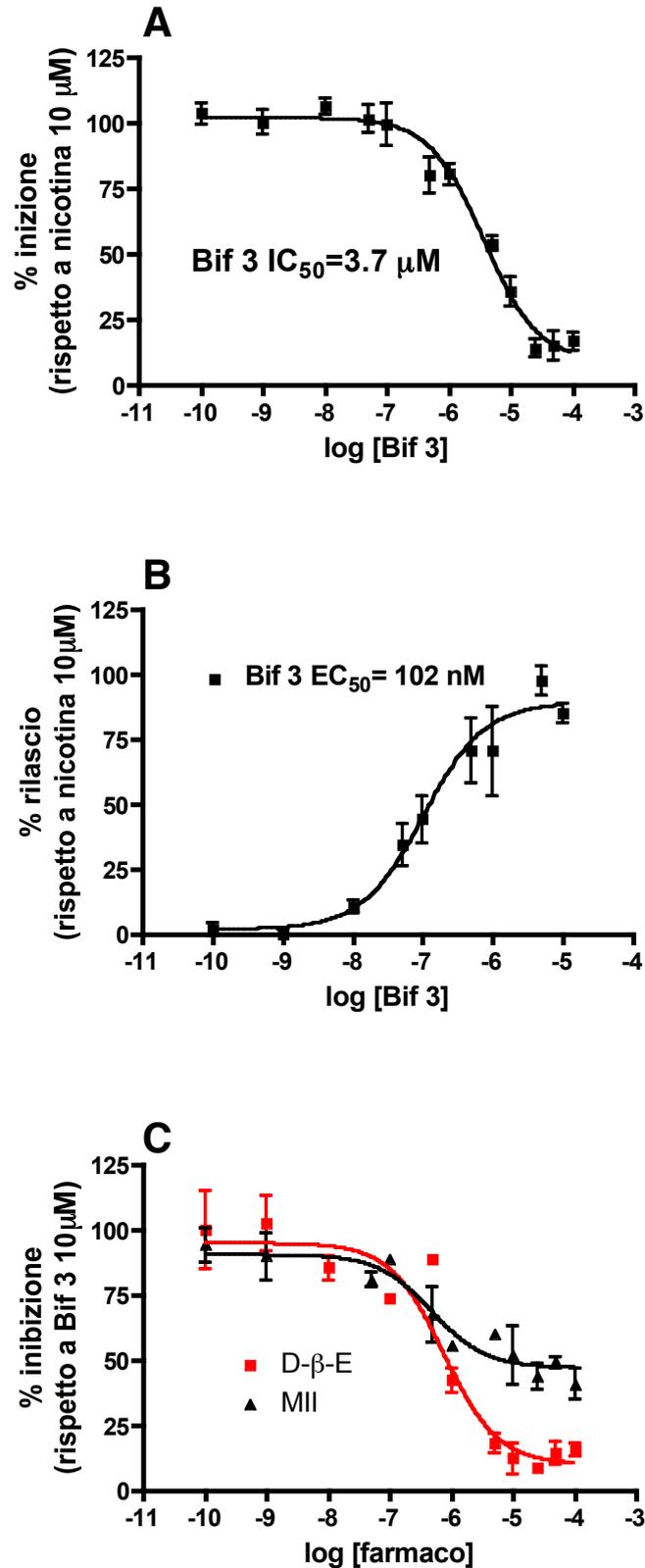


FIGURA 33: Rilascio di 3 H-DA da fettine di striato di ratto.

A) Curva di inibizione del rilascio indotto da nicotina 10 μ M in presenza di concentrazioni crescenti di Bif 3. B) Curva di rilascio ottenuta con concentrazioni crescenti di Bif 3. C) Curva di inibizione del rilascio indotto da 10 μ M Bif 3 in presenza di concentrazioni crescenti di di-idro- β -eritroidina (D- β -E) e di MII (MII).

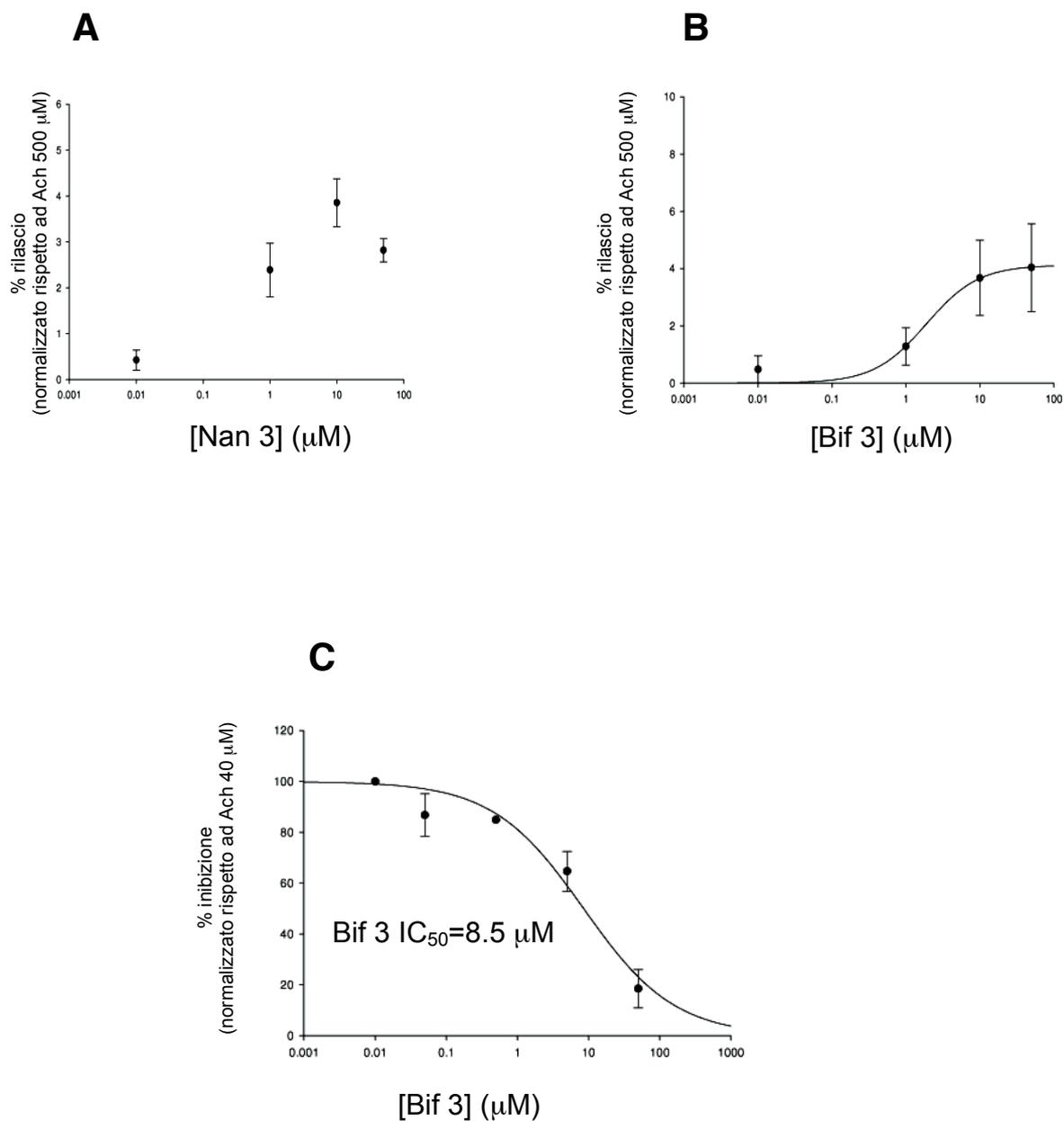


FIGURA 34: Caratterizzazione elettrofisiologica dei composti Nan 3 e Bif 3 in cellule HEK293 transfettate con il sottotipo $\alpha 4\beta 2$ umano. Curve delle correnti indotte da Nan 3 (A) e Bif 3 (B), considerando come 100% la corrente indotta da 500 μM ACh. C) Curva di inibizione con concentrazioni crescenti di Bif 3, della corrente indotta da ACh 40 μM .

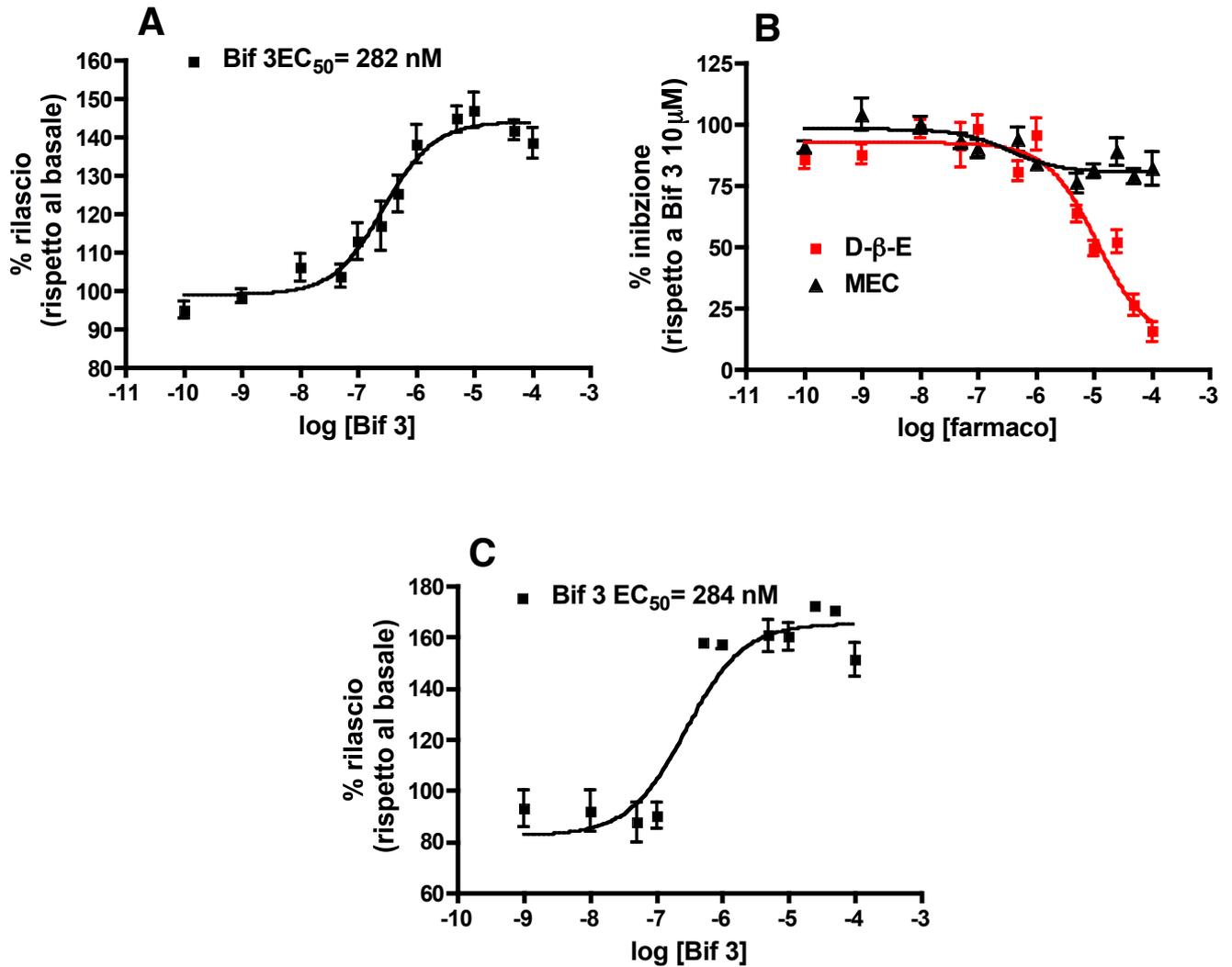


FIGURA 35: Rilascio di ³H-DA da sinaptosomi di topo C57BL.

A) Curva di rilascio, indotta da concentrazioni crescenti di Bif 3. B) Curva di inibizione del rilascio da concentrazioni crescenti di mecamilamina (MEC) e di-idro-β-eritroidina (D-β-E). C) Curva di rilascio da parte di dosi crescenti di Bif 3.

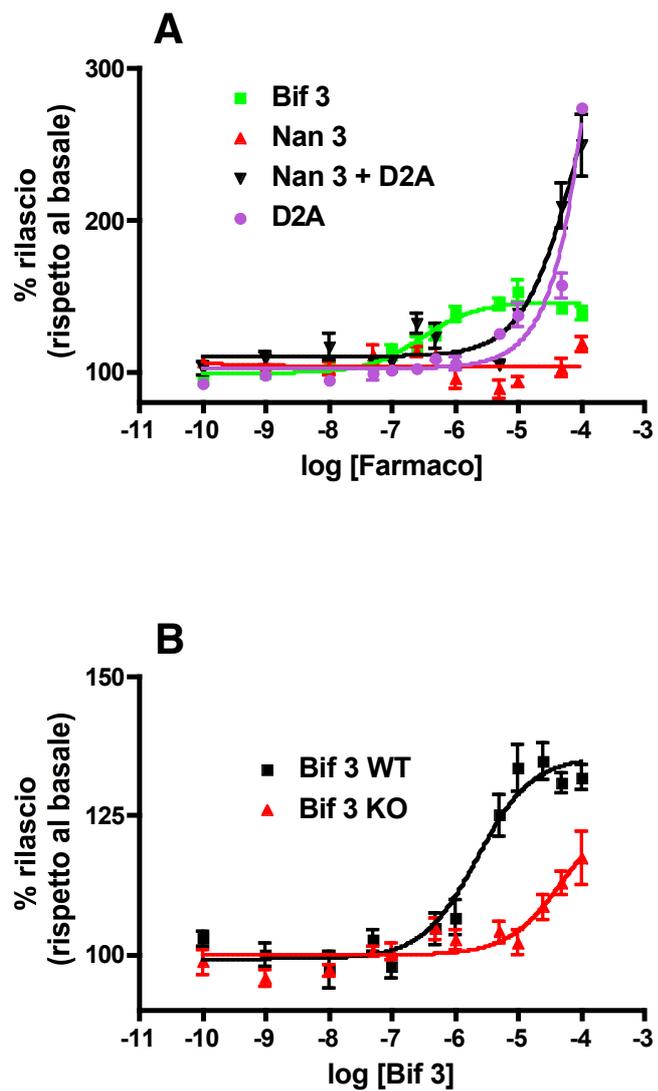


FIGURA 36: A) Curva di rilascio ottenuta con concentrazioni crescenti di Bif 3, Nan 3, Nan 3 + D2A (concentrazioni equimolari) e D2A di $^3\text{H-DA}$ da sinaptosomi di topo C57BL. B) Curva del rilascio di $^3\text{H-DA}$ da sinaptosomi di topi WT e KO ottenuta con concentrazioni crescenti di Bif 3.

TABELLA 1

Peptide	Sequenza	Affinità K_i [nM] $\alpha 6\beta 2^*$	CV
PIA nativa	RDPCCSNPVCTVHNPQIC	<i>sito alta</i> affinità 32	42
		<i>Sito bassa</i> affinità 35000	48
Δ R-PIA	DPCCSNPVCTVHNPQIC	4700	28
Δ RD-PIA	PCCSNPVCTVHNPQIC	7200	29
Δ RDP-PIA	CCSNPVCTVHNPQIC	15900	19
R[diMe]DP-PIA	R[diMe]DPCCSNPVCTVHNPQIC	5400	33
[R1K]PIA	KDPCCSNPVCTVHNPQIC	1800	29
[R1L]PIA	LDPCCSNPVCTVHNPQIC	3200	32
[R1E]PIA	EDPCCSNPVCTVHNPQIC	16000	44

TABELLA 2

	Sequenza	Affinità K_i [nM] $\alpha6\beta2^*$	CV
MII nativa	GCCSNPVCHLEHSNLC	<i>sito alta</i> affinità 5.6	59
		<i>Sito bassa</i> affinità 8000	55
RDP-MII	RDPCCSNPVCHLEHSNLC	<i>sito alta</i> affinità 0.43	45
		<i>Sito bassa</i> affinità 23000	49
R[diMe]DP-MII	R[diMe]DPCCSNPVCHLEHSNLC	<i>sito alta</i> affinità 4.5	23
		<i>Sito bassa</i> affinità 14700	47
[H9A;L15A]MII	GCCSNPVCALEHSNAC	1900	44
[H9A;L15A]RDP-MII	RDPCCSNPVCALEHSNAC	300	35
MII[E11R]	GCCSNPVCHLRHSNLC	<i>sito alta</i> affinità 5	43
		<i>Sito bassa</i> affinità 6000	78
MII-RDP[E11R]	RDPCCSNPVCHLRHSNLC	<i>sito alta</i> affinità 0.9	41
		<i>Sito bassa</i> affinità 9200	49

TABELLA 3

Peptide	K_i [nM] [% CV] $\alpha 3\beta 2^*$ Ratto	IC_{50} [nM] $\alpha 3\beta 2^*$ Ratto	K_i [nM] [% CV] $\alpha 3\beta 2^*$ Umano	IC_{50} [nM] $\alpha 3\beta 2^*$ Umano
MII native	62 [55]	3.04 ± 0.8	255 [25]	4.43 ± 1.2
RDP-MII	50 [45]	9.68 ± 0.9	86 [22]	6.19 ± 1.0
MII[E11R]	4230 [43]	64.1 ± 5.8	> 5000	36.38 ± 3.8
MII-RDP[E11R]	4410 [41]	33.48 ± 1.9	> 5000	20.14 ± 5.4

TABELLA 4

COMPOSTI	Affinità $\alpha 6\beta 2^*$ $K_i[\mu M]$	CV [%]	Affinità $\alpha 4\beta 2^*$ $K_i[\mu M]$	CV [%]	Affinità $\alpha 7$ $K_i[\mu M]$	CV [%]	Affinità D2 $K_i[\mu M]$
D2A	21	14	>100	-	>100	-	0.049
Nan 1	7,2	27	4,5	19	>100	-	
Bif 1	4,4	24	3,6	17	11	26	0.120
Nan 2	7,6	24	4,1	17	>100	-	
Bif 2	0,250	24	0,093	20	13	50	0.097
Nan 3	0,107	21	0,059	16	56	72	
Bif 3	0,394	21	0,183	17	80	69	
Nan 4	34	32	38	26	84	85	
Bif 4	1,2	21	0,718	17	43	69	
Nan 5	1,8	21	1,1	18	83	77	
Bif5	4,4	23	1,8	17	65	85	

DISCUSSIONE

Le conotossine sono piccoli peptidi contenuti nel veleno di oltre 500 specie diverse di lumache marine. Costituiti da 10 a 30 aminoacidi legano svariati bersagli farmacologici e quindi offrono una gamma molto vasta di molecole interessanti dal punto di vista farmacologico. Alcune conotossine sono già entrate in trials clinici, come lo Ziconotide per la terapia del dolore cronico. Vengono classificate in 5 grandi classi dette α , δ , κ , μ e ω . La classe delle α -CTx hanno come bersaglio farmacologico i nAChR. Esistono varie sottocategorie di classificazione in base alla disposizione dei residui di cisteina e in base a residui all'interno dei loop formati dalle cisteine stesse. Nel mio progetto di dottorato mi sono interessato a due particolari α -CTx in grado di legare un sottotipo specifico di nAChR, il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ che recentemente è stato dimostrato avere un ruolo importante negli effetti neurochimici e comportamentali della nicotina.

PIA e MII sono dei potenti antagonisti del nAChR $\alpha 6\beta 2^*$, MII è caratterizzata da una maggiore potenza verso il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ ma lega, anche se con minore affinità, il sottotipo $\alpha 3\beta 2^*$ (Azam et al., 2009). Le due α -CTx sono costituite da quattro residui uguali all'interno del *loop 1* e sette residui differenti nel *loop 2*. Studi di spettroscopia a risonanza magnetica nucleare hanno dimostrato che i residui 9-14 di PIA e i residui 7-12 di MII hanno la stessa conformazione ad α -elica (Chi et al., 2005). Quindi, come si può vedere in fig 19B la conformazione complessiva delle due α -CTx native è molto simile, eccetto per la porzione N-terminale che protrude all'esterno che è caratteristica di PIA.

In questo studio mediante sintesi di peptidi, analisi farmacologiche e studi di modellistica molecolare sono state analizzate le caratteristiche farmacologiche di un gruppo di peptidi mutati, analoghi alle α -CTx PIA e MII, rispetto ai nAChR. Inizialmente abbiamo investigato e dimostrato l'importanza della coda N-terminale di PIA sintetizzando peptidi troncati dei residui R, D e P e valutato individualmente l'affinità e la funzionalità rispetto al sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ nativo di ratto. Studi precedenti avevano dimostrato che i residui RDP della coda N-terminale di PIA non sono distribuiti in maniera disordinata in soluzione, ma formano una struttura secondaria stabile $\beta 1$; i nostri risultati hanno dimostrato che questa corta sequenza di aminoacidi è cruciale per l'attività dell' α -CTx, sia per quanto riguarda il binding al recettore sia

per l'attività antagonista della tossina. Infatti se il tripeptide RDP viene rimosso oppure troncato vi è una riduzione significativa sia dell'affinità che della potenza di PIA verso il recettore $\alpha 6\beta 2^*$. Inoltre abbiamo dimostrato che per PIA l'arginina in posizione 1, ed in particolare il gruppo guanidinico che caratterizza la catena laterale di questo aminoacido conferendogli una carica fortemente basica necessaria per il legame al recettore, è fondamentale per l'affinità e la potenza verso il sottotipo nativo $\alpha 6\beta 2^*$. Infatti troncando PIA e generando il peptide ΔR -PIA oppure sostituendo R con R[diMe] (che maschera il gruppo guanidinico) si riduce l'affinità. Questi risultati sono stati confermati dagli esperimenti funzionali di rilascio di $^3\text{H-DA}$, indotto da nicotina 10 μM in fettine di striato di ratto, dove abbiamo dimostrato che i peptidi mutati non sono più in grado di inibire il rilascio.

In collaborazione con il Dott. Grazioso dell'Istituto di Chimica dell'Università di Milano è stato elaborato un modello molecolare tridimensionale del recettore $\alpha 6\beta 2$. Dall'analisi computazionale dell'interazione tra recettore e PIA si è scoperto che PIA si lega al recettore mediante un'interazione ionica tra il gruppo guanidinico di R1 e la porzione carica negativamente dei residui D166-D167 presenti nella subunità $\beta 2$ del recettore, mentre altri aminoacidi dell' α -CTx interagiscono con alcuni residui presenti nell'ansa C, che partecipa alla formazione della tasca di legame della subunità $\alpha 6$. Inoltre è stata evidenziata la presenza di un ponte a idrogeno tra il gruppo guanidinico NH di R1 e il gruppo carbonilico presente sul residuo C5 di PIA, quest'ultima interazione è in grado di ridurre la flessibilità della catena laterale di R1 forzando la carica positiva del gruppo guanidinico nella direzione della catena laterale dei residui D166 e D167 presenti sulla subunità $\beta 2$. Quindi i tre punti d'interazione che coinvolgono il residuo R1 di PIA, illustrati in fig 20, emergono come punti fondamentali per il legame con il nAChR $\alpha 6\beta 2^*$ ($K_i = 32 \text{ nM}$). Di conseguenza la sostituzione di R1 con altri aminoacidi ha un effetto dannoso per il legame anche quando l'aminoacido sostituito porta la stessa carica positiva, come nel caso della lisina [R1K]PIA ($K_i = 1.8 \mu\text{M}$). Questi risultati aggiungono nuove informazioni ai dati preesistenti sullo studio delle α -CTx mutate della sottofamiglia α -CTx4/7 e dimostrano che le caratteristiche di anfipaticità, idrofobicità e la distribuzione delle cariche sulla superficie sono cruciali per l'interazione specifica di queste molecole con il sottotipo nAChR $\alpha 6\beta 2^*$ (Turner et al., 2009). Nel caso di PIA le interazioni degli aminoacidi presenti all'interno della sequenza della tossina appaiono meno

importanti rispetto alle interazioni molecolari che avvengono tra il residuo R1 e il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$.

I dati che dimostrano l'importanza fondamentale della coda N-terminale per il legame specifico con il recettore $\alpha 6\beta 2^*$ sono in linea con quelli ottenuti studiando l' α -CTxGID, un'altra α -CTx della sottofamiglia α -CTx4/7 isolata da *Conus geographus*, che possiede un tetrapeptide sulla coda N-terminale formato da isoleucina, arginina, acido aspartico e acido γ -carbossiglutammico; anche in questo studio la delezione di ciascuno di questi residui non modifica il legame con i sottotipi $\alpha 7$ e $\alpha 3\beta 2$ ma riduce significativamente il legame con il sottotipo $\alpha 4\beta 2$, trasformando $\Delta 1$ -4GID in un'agonista parziale per questo recettore (Nicke et al., 2003).

Per cercare di capire meglio se le caratteristiche del tripeptide RDP sono peculiari della PIA si è deciso di aggiungere questa breve sequenza sulla tossina MII, che di per sè ha un'affinità 6 volte maggiore rispetto a PIA, e valutarne gli effetti. L'inserzione di RDP all'N-terminale di MII (RDP-MII), provoca un aumento di affinità per il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ di 13 volte e un aumento di potenza di circa 5 volte rispetto alla MII nativa, mentre non mostra effetti significativi sul sottotipo $\alpha 3\beta 2^*$.

Studi precedenti hanno dimostrato che i residui localizzati all'interno della sequenza di MII sono fondamentali per l'interazione della molecola con la subunità $\alpha 6$ del nAChR. Tuttavia i nostri risultati sull'ibrido MII/PIA dimostrano chiaramente che esiste un ruolo extra-modulatorio del tripeptide iniziale sia a livello di legame che a livello funzionale. Il contributo di R1 al processo molecolare di riconoscimento del target biologico da parte della RDP-MII è meno rilevante rispetto a quello di PIA, infatti si osserva una riduzione di solo 10 volte circa passando da RDP-MII a R[diMe]DP-MII (K_i rispettivamente di 0.43 e 4.5 nM), mentre la stessa variazione da PIA a R[diMe]DPIA causa una netta diminuzione di affinità (K_i rispettivamente di 32 nM e 5.4 μ M). Questi risultati infine evidenziano differenze nei requisiti strutturali che permettono a PIA e MII di legarsi al sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ e suggeriscono che il tripeptide RDP di PIA e RDP-MII interagisca allo stesso modo all'interno della tasca di legame.

Lo studio Harvey et al (1997) aveva dimostrato l'importanza degli aminoacidi K-183 e I-186 presenti nella subunità $\alpha 3$ del nAChR nel determinare l'affinità di MII per il sottotipo $\alpha 3\beta 2^*$. Entrambi questi residui aminoacidici sono anche conservati nella subunità $\alpha 6$ e anche nel sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ possono essere importanti per il legame di

MII. In uno studio volto all'identificazione degli aminoacidi che all'interno della sequenza delle subunità $\alpha 3$ e $\alpha 6$ conferiscono selettività a MII è stata dimostrata l'importanza del residuo E151 e della sua carica negativa (Azam et al., 2008). Infatti l'espressione in ovociti dei recettori chimerici $\alpha 6/\alpha 3\beta 3\beta 2$ mutati in cui l'acido glutammico è stato sostituito con l'aminoacido lisina nei residui $\alpha 6$ -E151K e $\alpha 6$ -E151R determina la comparsa di recettori con una minore affinità di legame verso peptidi analoghi a MII.

Analizzando nel nostro modello computazionale le interazioni molecolari, emerge anche chiaramente che il residuo E151 della subunità $\alpha 6$ è localizzato vicino al residuo E11 di MII e il residuo E11 del peptide nativo interagisce con la carica positiva K75 presente sulla subunità $\beta 2$ (fig. 23).

Sulla base anche di questi studi sono stati quindi sintetizzati i mutanti MII[E11R] e MII-RDP[E11R] e valutata la loro interazione con i sottotipi nativi presenti in vivo. I profili farmacologici e funzionali di MII[E11R] e MII-RDP[E11R] valutati verso il sottotipo $\alpha 3\beta 2^*$ mostrano una diminuzione di potenza ed efficacia di MII[E11R] e MII-RDP[E11R] mentre verso il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ rimangono quasi identici a quelli ottenuti con i peptidi MII e RDP-MII.

La presenza nei due peptidi mutati della carica positiva R11 determinerebbe la repulsione con il residuo K75 del sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ favorendo però l'interazione con i residui E19 e E151 (fig. 24) di $\alpha 6$. Nella subunità $\alpha 3$ la presenza nella stessa posizione della lisina K151, che ha la stessa carica di R11, determinerebbe una repulsione tra i peptidi mutati e il sottotipo $\alpha 3\beta 2^*$ che indebolisce l'interazione con perdita di affinità verso il sottotipo $\alpha 3\beta 2^*$.

Se si confrontano i dati ottenuti dagli studi di legame verso il sottotipo $\alpha 3\beta 2^*$ dei peptidi MII[E11R] e MII-RDP[E11R] rispetto a MII e RDP-MII otteniamo una perdita di affinità rispettivamente di 68 e 88 volte e una perdita di potenza di rispettivamente 21 e 3.5 volte, ottenendo quindi due peptidi mutati con maggiore selettività verso il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$. In termini di interazioni molecolari è realistico attribuire la perdita di affinità del sottotipo $\alpha 3\beta 2^*$ alla mancanza dell'interazione tra i residui E11-K151. E' molto più difficile attribuire alla mutazione E11R la trascurabile variazione di affinità dei peptidi mutati, rispetto al sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$, la sostituzione E11R potrebbe implicare un cambiamento di interazione da E11- $\beta 2$ K75 a R11 con la porzione negativa formata dai residui E19 e E151 della subunità $\alpha 6$ (fig. 24).

In conclusione tramite studi di sintesi di peptidi, studi farmacologici e computazionali sulle α -CTx PIA e MII e relativi ibridi è stata dimostrata l'importanza del frammento RDP per il legame tra PIA e nAChR $\alpha 6\beta 2^*$. Elaborando un modello per omologia del recettore $\alpha 6\beta 2$ abbiamo individuato i residui presenti sulle subunità $\alpha 6$ e $\alpha 3$ responsabili delle interazioni con i peptidi. Infine abbiamo progettato due ibridi di PIA ed MII in grado di discriminare meglio tra i sottotipi $\alpha 3\beta 2^*$ e $\alpha 6\beta 2^*$ e siamo fiduciosi che tutti questi dati possano portare una maggiore conoscenza sul meccanismo di interazione tra ligando e recettore per studio e la creazione di nuovi composti selettivi per il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ con potenziali implicazioni cliniche per la cura della dipendenza da fumo di sigaretta e quelle patologie dove c'è un'alterazione della trasmissione dopaminergica.

Durante l'ultimo anno di dottorato, accanto del progetto di caratterizzazione di nuove α -CTx, mi sono occupato della caratterizzazione farmacologica di una nuova famiglia di molecole, dette ligandi bivalenti che sono costituiti da due molecole dirette contro due target farmacologici diversi uniti da una catena metilenica di varia lunghezza.

Studi recenti hanno chiaramente dimostrato che a livello dei terminali dopaminergici dello striato i nAChR interagiscono fisicamente con la classe di recettori associati a proteine G. In particolare nello studio di Quarta et al (2007) è stata dimostrata l'interazione fisica dei nAChR con i recettori dopaminergici D2. Il recettore D2 è associato alla proteina G_i che quando attivata inibisce la formazione di cAMP e come risultato finale ha un'inibizione del rilascio di DA dal terminale. In collaborazione con il Prof. De Amici dell'Università di Milano, che ha progettato e sintetizzato una famiglia di farmaci composti da un agonista dopaminergico D2 (D2A) legato ad un antagonista nicotinic, si è valutato il profilo farmacologico di questa nuova classe di molecole valutando l'interazione dei farmaci con i rispettivi recettori e la capacità di modulare di rilascio di DA. Questo studio era inizialmente volto alla valutazione di nuove molecole che inibendo il rilascio di DA potessero essere interessanti in ambito clinico come farmaci contro il fumo.

Preliminarmente sono stati compiuti studi di tipo farmacologici con esperimenti di binding sia al recettore immunoimmobilizzato $\alpha 6\beta 2^*$ e $\alpha 4\beta 2^*$ sia al recettore omomero $\alpha 7$ di membrana volti a valutare la capacità di legame sia dei composti bivalenti (Bif 1-Bif 5) sia delle singole componenti nicotinic (Nan 1-Nan 5) e della

parte dopaminergica (D2A). Degli 11 farmaci presi in esame quelli con un valore di K_i abbastanza elevato risultano essere Bif 2, Nan 3 e Bif 3 (tab. 4), inoltre gli stessi composti risultano avere una buona selettività nei confronti dei sottotipi eteromerici $\alpha 6\beta 2^*$ e $\alpha 4\beta 2^*$ rispetto al sottotipo omomero $\alpha 7$. La variazione dei valori di K_i evidenzia un dato molto importante, ossia che la diversa lunghezza della catena metilenica è molto importante per il legame con i nAChR. Un altro dato molto importante è la differenza di valori di K_i tra Bif 2 (250 nM $\alpha 6\beta 2^*$ e 93 nM $\alpha 4\beta 2^*$) rispetto alla propria singola componente nicotinic Nic 2 (7.6 μ M $\alpha 6\beta 2^*$ e 4.1 μ M $\alpha 4\beta 2^*$). Per il composto Bif 3 e la sua componente nicotinic Nic 3, abbiamo determinato un basso valore di K_i senza invece evidenziare differenze significative tra loro due.

Esperimenti successivi volti a valutare la funzionalità dei composti compiuti su fettine di striato hanno mostrato degli effetti inaspettati. Il composto Bif 3, composto da un agonista dopaminergico D2 legato ad un antagonista nicotinic tramite una catena di 7 atomi di carbonio, è in grado a basse concentrazioni (EC_{50} 102 nM) di far rilasciare 3H -DA a livello basale. Lo stesso farmaco è anche in grado di bloccare ad alte dosi il rilascio di 3H -DA indotto da nicotina (IC_{50} = 3.7 μ M). Essendo Bif 3 un composto formato da due farmaci diversi si è cercato di capire se il rilascio indotto nel basale sia dovuto alla sua componente nicotinic oppure alla componente dopaminergica. Compiendo studi di rilascio indotto da Bif 3 e saggiando antagonisti selettivi per i nAChR abbiamo determinato che l'antagonista nicotinic (di-idro- β -eritroidina) blocca quasi completamente questo rilascio (con un blocco fino al 90%), mentre l'antagonista selettivo per il sottotipo $\alpha 6\beta 2^*$ (MII) blocca il 50% del rilascio di DA. Quindi il composto Bif 3 è in grado di far rilasciare DA a livello basale attraverso il legame ai sottotipi $\alpha 4\beta 2^*$ e/o $\alpha 6\beta 2^*$.

L'attività di Bif 3 sul rilascio di DA non è dovuto ad un cambio delle sue proprietà antagoniste, poiché gli studi elettrofisiologici hanno confermato che anche il composto bivalente si comporta da antagonista con una minima attività agonista (4%), comunque non sufficiente per giustificare il rilascio basale di DA.

Per cercare di capire meglio se il risultato ottenuto con gli esperimenti di rilascio di 3H -DA da fettine di striato sia dovuto ad un'interazione aspecifica del farmaco Bif 3 con altre componenti del circuito, che viene preservato utilizzando le fettine di tessuto, è stato analizzato il rilascio di 3H -DA da sinaptosomi. Questa metodica

permette di frazionare attraverso centrifugazioni differenziali i sinaptosomi dalle altre componenti cellulari e quindi di analizzare il rilascio di $^3\text{H-DA}$ solamente dalla componente presinaptica del terminale dopaminergico.

Il farmaco Bif 3 è in grado di far rilasciare $^3\text{H-DA}$ a livello basale anche dai sinaptosomi con un valore di EC_{50} molto simile a quello ottenuto con fettine. Lo studio del rilascio di DA dai sinaptosomi, mediante l'utilizzo di farmaci antagonisti, ha mostrato che l'impiego dell'antagonista competitivo di-idro- β -eritroidina, che compete con il sito di legame per l'agonista blocca il rilascio indotto da Bif 3 dell'80% mentre in presenza dell'antagonista non competitivo mecamilamina, che è un bloccante del canale del nAChR, il rilascio persiste. Successivamente comparando i dati ottenuti da curve dose/risposta ottenute con concentrazioni crescenti di Bif 3 e concentrazioni crescenti equimolari di Nan 3 e D2A (singole componenti che formano Bif 3) l'effetto che si ottiene è completamente diverso da quello ottenuto con il composto Bif 3. Mentre Bif 3 evoca il rilascio di $^3\text{H-DA}$ a basse concentrazioni, la somma dei due composti (D2A più Nan 3) evoca il rilascio di $^3\text{H-DA}$ solo a concentrazioni molto elevate e l'andamento della curva è simile a quello ottenuto utilizzando la sola componente dopaminergica D2A (fig 36A).

Questi risultati sono stati ulteriormente confermati dagli studi di rilascio effettuati su sinaptosomi proveniente da topi KO per le subunità nicotiniche $\alpha 4$ e $\alpha 6$. Bif 3 è in grado di far rilasciare DA a basse dosi dai sinaptosomi dei topi WT mentre alle stesse concentrazioni non evoca il rilascio di neurotrasmettitore dai sinaptosomi di topi KO (fig 36B).

Questi risultati ci permettono di affermare che il farmaco Bif 3 è in grado di legarsi a nAChR presente sui terminali dopaminergici e provocare il rilascio di DA agendo sulla componente dopaminergica. Dagli studi finora compiuti non siamo ancora in grado di definire se l'attività della componente dopaminergica del farmaco bifunzionale avviene direttamente per azione sul recettore dopaminergico D2 oppure se il legame al recettore determina una modificazione della conformazione del recettore D2 che possa influenzare l'attività del trasportatore della dopamina che è fisicamente associato al recettore D2.

Questi studi, che sono ancora tuttora in corso, sono molto promettenti e sembrano portare nuove prove a favore dell'interazione fisica e soprattutto funzionale delle due classi diverse di recettori che regolano il rilascio di DA nello striato.

L'obiettivo finale di questa seconda parte del progetto è quindi di valutare se questi complessi recettoriali identificati possono rappresentare potenziali bersagli molecolari per lo sviluppo di strategie terapeutiche innovative da impiegare in patologie dove la alterazione della funzionalità dopaminergica può manifestare gravi patologie che vanno dal morbo di Parkinson a disturbi affettivi e psichiatrici, fino alla dipendenza da droghe.

BIBLIOGRAFIA

- Alderson HL, Latimer MP and Winn P (2005) Involvement of the laterodorsal tegmental nucleus in the locomotor response to repeated nicotine administration. *Neurosci Lett* **380**(3):335-339.
- Alderson HL, Latimer MP and Winn P (2006) Intravenous self-administration of nicotine is altered by lesions of the posterior, but not anterior, pedunculopontine tegmental nucleus. *Eur J Neurosci* **23**(8):2169-2175.
- Armishaw CJ and Alewood PF (2005) Conotoxins as research tools and drug leads. *Curr Protein Pept Sci* **6**(3):221-240.
- 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 β_2^* nicotinic receptors and dopamine pathways in the control of spontaneous locomotion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(41):15991-15996.
- Azam L, Chen Y and Leslie FM (2007) Developmental regulation of nicotinic acetylcholine receptors within midbrain dopamine neurons. *Neuroscience* **144**(4):1347-1360.
- Azam L and McIntosh JM (2009) Alpha-conotoxins as pharmacological probes of nicotinic acetylcholine receptors. *Acta Pharmacol Sin* **30**(6):771-783.
- Azam L, Yoshikami D and McIntosh JM (2008) Amino acid residues that confer high selectivity of the α_6 nicotinic acetylcholine receptor subunit to alpha-conotoxin MII[S4A,E11A,L15A]. *J Biol Chem* **283**(17):11625-11632.
- Broadbent SD, Groot-Kormelink PJ, Krashia PA, Harkness PC, Millar NS, Beato M and Sivilotti L (2006) Incorporation of the β_3 subunit has a dominant negative effect on the function of recombinant central-type neuronal nicotinic receptors. *Mol Pharmacol*.
- Celie PH, Kasheverov IE, Mordvintsev DY, Hogg RC, van Nierop P, van Elk R, van Rossum-Fikkert SE, Zhmak MN, Bertrand D, Tsetlin V, Sixma TK and Smit AB (2005) Crystal structure of nicotinic acetylcholine receptor homolog AChBP in complex with an alpha-conotoxin PnIA variant. *Nat Struct Mol Biol* **12**(7):582-588.
- Celie PH, van Rossum-Fikkert SE, van Dijk WJ, Brejc K, Smit AB and Sixma TK (2004) Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. *Neuron* **41**(6):907-914.
- Champtiaux N, Han ZY, Bessis A, Rossi FM, Zoli M, Marubio L, McIntosh JM and Changeux JP (2002) Distribution and pharmacology of alpha 6-containing nicotinic acetylcholine receptors analyzed with mutant mice. *J Neurosci* **22**(4):1208-1217.
- Changeux JP and Edelstein SJ (1998) Allosteric receptors after 30 years. *Neuron* **21**(5):959-980.
- Chi SW, Lee SH, Kim DH, Kim JS, Olivera BM, McIntosh JM and Han KH (2005) Solution structure of alpha-conotoxin PIA, a novel antagonist of α_6 subunit containing nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Biophys Res Commun* **338**(4):1990-1997.
- Clark RJ, Fischer H, Dempster L, Daly NL, Rosengren KJ, Nevin ST, Meunier FA, Adams DJ and Craik DJ (2005) Engineering stable peptide toxins by means of backbone cyclization: stabilization of the alpha-conotoxin MII. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(39):13767-13772.

- Cooper E, Couturier S and Ballivet M (1991) Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature* **350**(6315):235-238.
- Corrigall WA, Franklin KB, Coen KM and Clarke PB (1992) The mesolimbic dopaminergic system is implicated in the reinforcing effects of nicotine. *Psychopharmacology (Berl)* **107**(2-3):285-289.
- Corringer PJ, Le Novere N and Changeux JP (2000) Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**:431-458.
- Cragg SJ (2006) Meaningful silences: how dopamine listens to the ACh pause. *Trends Neurosci* **29**(3):125-131.
- David V, Besson M, Changeux JP, Granon S and Cazala P (2006) Reinforcing effects of nicotine microinjections into the ventral tegmental area of mice: dependence on cholinergic nicotinic and dopaminergic D1 receptors. *Neuropharmacology* **50**(8):1030-1040.
- Davis JA and Gould TJ (2009) Hippocampal nAChRs mediate nicotine withdrawal-related learning deficits. *Eur Neuropsychopharmacol* **19**(8):551-561.
- Descarries L, Gisiger V and Steriade M (1997) Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Prog Neurobiol* **53**(5):603-625.
- Dowell C, Olivera BM, Garrett JE, Staheli ST, Watkins M, Kuryatov A, Yoshikami D, Lindstrom JM and McIntosh JM (2003) Alpha-conotoxin PIA is selective for alpha6 subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* **23**(24):8445-8452.
- Drenan RM, Grady SR, Whiteaker P, McClure-Begley T, McKinney S, Miwa JM, Bupp S, Heintz N, McIntosh JM, Bencherif M, Marks MJ and Lester HA (2008) In vivo activation of midbrain dopamine neurons via sensitized, high-affinity alpha 6 nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron* **60**(1):123-136.
- Floresco SB, West AR, Ash B, Moore H and Grace AA (2003) Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nat Neurosci* **6**(9):968-973.
- Gotti C and Clementi F (2004) Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* **74**(6):363-396.
- 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. *Biochem Pharmacol* **78**(7):703-711.
- Gotti C, Moretti M, Bohr I, Ziabreva I, Vailati S, Longhi R, Riganti L, Gaimarri A, McKeith IG, Perry RH, Aarsland D, Larsen JP, Sher E, Beattie R, Clementi F and Court JA (2006) Selective nicotinic acetylcholine receptor subunit deficits identified in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies by immunoprecipitation. *Neurobiol Dis* **23**(2):481-489.
- Gotti C, Moretti M, Clementi F, Riganti L, McIntosh JM, Collins AC, Marks MJ and Whiteaker P (2005) Expression of nigrostriatal alpha 6-containing nicotinic acetylcholine receptors is selectively reduced, but not eliminated, by beta 3 subunit gene deletion. *Mol Pharmacol* **67**(6):2007-2015.
- Gotti C, Moretti M, Gaimarri A, Zanardi A, Clementi F and Zoli M (2007) Heterogeneity and complexity of native brain nicotinic receptors. *Biochem Pharmacol* **74**(8):1102-1111.
- Govind AP, Vezina P and Green WN (2009) Nicotine-induced upregulation of nicotinic receptors: underlying mechanisms and relevance to nicotine addiction. *Biochem Pharmacol* **78**(7):756-765.

- Grace AA (2006) Disruption of cortical-limbic interaction as a substrate for comorbidity. *Neurotox Res* **10**(2):93-101.
- Grace AA, Floresco SB, Goto Y and Lodge DJ (2007) Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci* **30**(5):220-227.
- 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. *J Neurosci* **29**(7):2272-2282.
- Grady SR, Salminen O, Laverty DC, Whiteaker P, McIntosh JM, Collins AC and Marks MJ (2007) The subtypes of nicotinic acetylcholine receptors on dopaminergic terminals of mouse striatum. *Biochem Pharmacol* **74**(8):1235-1246.
- Greenbaum L, Rigbi A, Teltsh O and Lerer B (2009) Role of genetic variants in the CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 cluster in nicotine dependence risk: importance of gene-environment interplay. *Mol Psychiatry* **14**(9):828-830.
- Han ZY, Le Novère N, Zoli M, Hill JA, Jr., Champtiaux N and Changeux JP (2000) Localization of nAChR subunit mRNAs in the brain of *Macaca mulatta*. *Eur J Neurosci* **12**(10):3664-3674.
- Improgo MR, Scofield MD, Tapper AR and Gardner PD The nicotinic acetylcholine receptor CHRNA5/A3/B4 gene cluster: dual role in nicotine addiction and lung cancer. *Prog Neurobiol* **92**(2):212-226.
- Jackson KJ, Marks MJ, Vann RE, Chen X, Gamage TF, Warner JA and Damaj MI (2010) Role of alpha5 nicotinic acetylcholine receptors in pharmacological and behavioral effects of nicotine in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **334**(1):137-146.
- Jackson KJ, McIntosh JM, Brunzell DH, Sanjakdar SS and Damaj MI (2009) The role of alpha6-containing nicotinic acetylcholine receptors in nicotine reward and withdrawal. *J Pharmacol Exp Ther* **331**(2):547-554.
- Karlin A (2002) Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci* **3**(2):102-114.
- Kitai ST, Shepard PD, Callaway JC and Scroggs R (1999) Afferent modulation of dopamine neuron firing patterns. *Curr Opin Neurobiol* **9**(6):690-697.
- Klink R, de Kerchove d'Exaerde A, Zoli M and Changeux JP (2001) Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *J Neurosci* **21**(5):1452-1463.
- Koob GF and Le Moal M (2008) Addiction and the brain antireward system. *Annu Rev Psychol* **59**:29-53.
- Lai A, Sum J, Fan H, McIntosh JM and Quirk M (2004) Selective recovery of striatal 125I-alpha-conotoxin mii nicotinic receptors after nigrostriatal damage in monkeys. *Neuroscience* **127**(2):399-408.
- Laviolette SR, Alexson TO and van der Kooy D (2002) Lesions of the tegmental pedunculopontine nucleus block the rewarding effects and reveal the aversive effects of nicotine in the ventral tegmental area. *J Neurosci* **22**(19):8653-8660.
- Laviolette SR and van der Kooy D (2004) The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behaviour. *Nat Rev Neurosci* **5**(1):55-65.
- Le Novère N, Corringer PJ and Changeux JP (2002) The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J Neurobiol* **53**(4):447-456.

- Lindstrom J (2000a) The Structures of Neuronal Nicotinic Receptors, in *Handbook of Experimental Pharmacology* (Clementi F, Fornasari D and Gotti C eds) pp 101-162, Springer, Berlin.
- Lindstrom J (2002) Autoimmune diseases involving nicotinic receptors. *J Neurobiol* **53**(4):656-665.
- Lindstrom JM (2000b) Acetylcholine receptors and myasthenia. *Muscle Nerve* **23**(4):453-477.
- Lodge DJ and Grace AA (2006) The laterodorsal tegmentum is essential for burst firing of ventral tegmental area dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(13):5167-5172.
- 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, Keath JR and McGehee DS (2002) Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. *Neuron* **33**(6):905-919.
- Maskos U (2008) The cholinergic mesopontine tegmentum is a relatively neglected nicotinic master modulator of the dopaminergic system: relevance to drugs of abuse and pathology. *Br J Pharmacol* **153 Suppl 1**:S438-445.
- 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 and Changeux JP (2005) Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature* **436**(7047):103-107.
- Maubourguet N, Lesne A, Changeux JP, Maskos U and Faure P (2008) Behavioral sequence analysis reveals a novel role for beta2* nicotinic receptors in exploration. *PLoS Comput Biol* **4**(11):e1000229.
- McIntosh JM, Yoshikami D, Mahe E, Nielsen DB, Rivier JE, Gray WR and Olivera BM (1994) A nicotinic acetylcholine receptor ligand of unique specificity, alpha-conotoxin ImI. *J Biol Chem* **269**(24):16733-16739.
- Meyer EL, Yoshikami D and McIntosh JM (2008) The neuronal nicotinic acetylcholine receptors alpha 4* and alpha 6* differentially modulate dopamine release in mouse striatal slices. *J Neurochem* **105**(5):1761-1769.
- Missale C, Fiorentini C, Collo G and Spano P (2010) The neurobiology of dopamine receptors: evolution from the dual concept to heterodimer complexes. *J Recept Signal Transduct Res* **30**(5):347-354.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M and Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* **78**(1):189-225.
- 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. *Mol Pharmacol* **66**(1):85-96.
- Moroni M and Bermudez I (2006) Stoichiometry and pharmacology of two human alpha4beta2 nicotinic receptor types. *J Mol Neurosci* **30**(1-2):95-96.
- Nicke A, Loughnan ML, Millard EL, Alewood PF, Adams DJ, Daly NL, Craik DJ and Lewis RJ (2003) Isolation, structure, and activity of GID, a novel alpha 4/7-conotoxin with an extended N-terminal sequence. *J Biol Chem* **278**(5):3137-3144.
- Oakman SA, Faris PL, Cozzari C and Hartman BK (1999) Characterization of the extent of pontomesencephalic cholinergic neurons' projections to the

- thalamus: comparison with projections to midbrain dopaminergic groups. *Neuroscience* **94**(2):529-547.
- Parish CL, Nunan J, Finkelstein DI, McNamara FN, Wong JY, Waddington JL, Brown RM, Lawrence AJ, Horne MK and Drago J (2005) Mice lacking the alpha4 nicotinic receptor subunit fail to modulate dopaminergic neuronal arbors and possess impaired dopamine transporter function. *Mol Pharmacol* **68**(5):1376-1386.
- Perez XA, Bordia T, McIntosh JM, Grady SR and Quik M (2008) Long-term nicotine treatment differentially regulates striatal alpha6alpha4beta2* and alpha6(nonalpha4)beta2* nAChR expression and function. *Mol Pharmacol* **74**(3):844-853.
- Picciotto MR (1999) Knock-out mouse models used to study neurobiological systems. *Crit Rev Neurobiol* **13**(2):103-149.
- Picciotto MR, Addy NA, Mineur YS and Brunzell DH (2008) It is not "either/or": activation and desensitization of nicotinic acetylcholine receptors both contribute to behaviors related to nicotine addiction and mood. *Prog Neurobiol* **84**(4):329-342.
- Picciotto MR, Zoli M, Rimondini R, Lena C, Marubio LM, Pich EM, Fuxe K and Changeux JP (1998) Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature* **391**(6663):173-177.
- 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. *J Neurosci* **28**(47):12318-12327.
- Quarta D, Ciruela F, Patkar K, Borycz J, Solinas M, Lluís C, Franco R, Wise RA, Goldberg SR, Hope BT, Woods AS and Ferré S (2007) Heteromeric nicotinic acetylcholine-dopamine autoreceptor complexes modulate striatal dopamine release. *Neuropsychopharmacology* **32**(1):35-42.
- Quarta D, Di Francesco C, Melotto S, Mangiarini L, Heidbreder C and Hedou G (2009) Systemic administration of ghrelin increases extracellular dopamine in the shell but not the core subdivision of the nucleus accumbens. *Neurochem Int* **54**(2):89-94.
- Quik M and Kulak JM (2002) Nicotine and nicotinic receptors; relevance to Parkinson's disease. *Neurotoxicology* **23**(4-5):581-594.
- Quik M, Polonskaya Y, Kulak JM and McIntosh JM (2001) Vulnerability of 125I-alpha-conotoxin MII binding sites to nigrostriatal damage in monkey. *J Neurosci* **21**(15):5494-5500.
- Rice ME and Cragg SJ (2004) Nicotine amplifies reward-related dopamine signals in striatum. *Nat Neurosci* **7**(6):583-584.
- Salas R, Sturm R, Boulter J and De Biasi M (2009) Nicotinic receptors in the habenulo-interpeduncular system are necessary for nicotine withdrawal in mice. *J Neurosci* **29**(10):3014-3018.
- Schilstrom B, Svensson HM, Svensson TH and Nomikos GG (1998) Nicotine and food induced dopamine release in the nucleus accumbens of the rat: putative role of alpha7 nicotinic receptors in the ventral tegmental area. *Neuroscience* **85**(4):1005-1009.
- Schultz W (2002) Getting formal with dopamine and reward. *Neuron* **36**(2):241-263.
- Stolerman IP, Chamberlain S, Bizarro L, Fernandes C and Schalkwyk L (2004) The role of nicotinic receptor alpha 7 subunits in nicotine discrimination. *Neuropharmacology* **46**(3):363-371.

- Suarez SV, Amadon A, Giacomini E, Wiklund A, Changeux JP, Le Bihan D and Granon S (2009) Brain activation by short-term nicotine exposure in anesthetized wild-type and beta2-nicotinic receptors knockout mice: a BOLD fMRI study. *Psychopharmacology (Berl)* **202**(4):599-610.
- Taly A, Corringer PJ, Guedin D, Lestage P and Changeux JP (2009) Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov* **8**(9):733-750.
- Tapper AR, McKinney SL, Nashmi R, Schwarz J, Deshpande P, Labarca C, Whiteaker P, Marks MJ, Collins AC and Lester HA (2004) Nicotine activation of alpha4* receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization. *Science* **306**(5698):1029-1032.
- 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 J* **24**(3):723-730.
- Turner M, Eidemiller S, Martin B, Narver A, Marshall J, Zemp L, Cornell KA, McIntosh JM and McDougal OM (2009) Structural basis for alpha-conotoxin potency and selectivity. *Bioorg Med Chem* **17**(16):5894-5899.
- Vishwanath VA and McIntosh JM (2006) Synthesis of fluorescent analogs of alpha-conotoxin MII. *Bioconjug Chem* **17**(6):1612-1617.
- 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 (Berl)* **184**(3-4):339-344.
- Xiao Y, Baydyuk M, Wang HP, Davis HE and Kellar KJ (2004) Pharmacology of the agonist binding sites of rat neuronal nicotinic receptor subtypes expressed in HEK 293 cells. *Bioorg Med Chem Lett* **14**(8):1845-1848.
- Zhang T, Zhang L, Liang Y, Siapas AG, Zhou FM and Dani JA (2009) Dopamine signaling differences in the nucleus accumbens and dorsal striatum exploited by nicotine. *J Neurosci* **29**(13):4035-4043.
- 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. *J Neurosci* **22**(20):8785-8789.