

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Scuola di Dottorato in Scienze Farmacologiche

Ciclo XXVIII



RECETTORI COLINERGICI NICOTINICI  
NEURONALI E NON-NEURONALI:  
ANALISI DEGLI EFFETTI  
DEL TRATTAMENTO CRONICO CON NICOTINA  
IN CONDIZIONI FISIologiche E PATOLOGICHE

Coordinatore: Prof. Alberto CORSINI

Relatore: Dott. ssa Mariaelvina SALA

Correlatore: Dott. ssa Cecilia GOTTI

Tesi di Dottorato di:

Francesca Fasoli

Matricola: R10174

Anno Accademico 2014-2015

## INDICE

|  |         |
|--|---------|
| <b>RIASSUNTO</b> .....   | pag. 4  |
| <b>INTRODUZIONE</b> .....  | pag. 5  |
| 1. Componenti del fumo di sigaretta.....   | pag. 5  |
| <b>2. I recettori colinergici nicotinici neuronali</b> .....                                     | pag. 6  |
| 2.1. Struttura dei recettori colinergici nicotinici  |         |
| 2.2. Stati funzionali  |         |
| 2.3. Sottotipi recettoriali  |         |
| 2.4. Siti di legame  |         |
| 2.5. Ruolo delle subunità accessorie   |         |
| 2.6. Stechiometria   |         |
| 3. Biogenesi e traffico dei nAChRs.....  | pag. 12 |
| 3.1. L'assemblaggio  |         |
| 3.2. Traffico verso la membrana plasmatica   |         |
| 4. nAChRs nel Sistema Nervoso Centrale.....  | pag. 14 |
| 5. Effetti indotti dalla nicotina.....   | pag. 16 |
| 5.1. Up-regolazione dei nAChRs   |         |
| 5.2. Meccanismi molecolari coinvolti nell'up-regolazione   |         |
| 6. Il sistema mesocorticolimbico e i meccanismi coinvolti nella dipendenza.....                  | pag.19  |
| 7. Il sistema abenulo-interpeduncolare e i meccanismi coinvolti nell'astinenza da nicotina ..... | pag.21  |
| <b>8. I recettori nicotinici non-neuronali</b> .....   | pag. 23 |
| 9. nAChRs e tumori.....  | pag. 23 |
| 10. Meccanismi molecolari attivati da nicotina e nitrosamine.....                                | pag. 26 |
| 10.1. Attivazione della via ERK/MAPK   |         |
| 10.2. Attivazione delle vie di Src e Rb-E2F  |         |
| 10.3. Attivazione della via di JAK/STAT  |         |
| 10.4. Up-regolazione di molecole coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare                 |         |
| 10.5. Inibizione di molecole inibitorie del ciclo cellulare                                      |         |
| 10.6. Effetti anti-apoptotici indotti dalla nicotina   |         |
| 10.7. nAChRs nei processi di metastasi e invasione   |         |
| 10.8 nAChRs e angiogenesi  |         |
| 11. I gliomi.....  | pag. 31 |
| 11.1. Sottotipi di glioblastoma  |         |
| 11.2. Strategie terapeutiche attuali   |         |
| 11.3. Gliomi e recettori nicotinici  |         |
| 11. 4. Il ruolo dei canali ionici nei tumori cerebrali   |         |
| 11.5. Ruolo del glutammato   |         |
| 12. Stress ossidativo e carcinogenesi.....   | pag. 38 |
| 12.1. I mitocondri   |         |

|                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| 12.2. NADPH ossidasi e altri enzimi   |         |
| 12.3. Terapie anti-ossidanti e tumori |         |
| 13. Gli stilbeni.....                 | pag. 42 |

## **MATERIALI E METODI**

|   |         |
|---|---------|
| 1. Purificazione di anticorpi policlonali subunità specifici..... | pag. 44 |
| 2. Somministrazione cronica di nicotina per via endovenosa.....   | pag. 46 |
| 3. Preparazione di tessuti neuronali.....                         | pag. 47 |
| 4. Binding della <sup>3</sup> H-Epipatidina.....                  | pag. 47 |
| 5. Binding della <sup>125</sup> I- $\alpha$ -Bungarotossina.....  | pag. 49 |
| 6. Immunoprecipitazione degli estratti.....                       | pag. 49 |
| 7. Dosaggio proteico.....   | pag. 50 |
| 8. SDS-PAGE e western-blotting.....                               | pag. 50 |
| 9. Linee cellulari e condizioni di coltura.....                   | pag. 50 |
| 10. Real-time PCR.....  | pag. 51 |
| 11. Determinazione della vitalità cellulare.....                  | pag. 52 |
| 12. Dosaggio dei radicali dell'ossigeno.....                      | pag. 52 |
| 13. Analisi dei dati .....  | pag. 53 |

## **RISULTATI**

### **Effetti del trattamento cronico con nicotina sull'espressione dei nAChRs nel SNC.....**

1. Caratterizzazione degli anticorpi
2. Effetti indotti dal trattamento cronico con dosi crescenti di nicotina sull'espressione dei diversi sottotipi nicotinici
3. Effetti indotti dal trattamento cronico e dall'astinenza da nicotina sull'up-regolazione e sulla stechiometria del recettore  $\alpha 4\beta 2$  nella corteccia cerebrale e nel talamo

### **Recettori nicotinici non-neuronali: effetti del trattamento con nicotina, agonisti e antagonisti nicotinici nella terapia dei glioblastomi.....**

4. Identificazione dell'espressione di subunità codificanti per i recettori nicotinici in linee continue di glioma e in culture primarie di glioblastoma di pazienti
5. Effetto del trattamento cronico con nicotina, agonisti e antagonisti nicotinici sulla proliferazione di gliomi e glioblastomi
6. Identificazione delle vie intracellulari attivate dall'esposizione alla nicotina
7. Effetto del trattamento con composti derivati dallo stilbene sulla vitalità delle cellule tumorali
8. Effetti del trattamento con il composto F1 sulle cellule tumorali

### **FIGURE.....**

### **DISCUSSIONE.....**

### **BIBLIOGRAFIA.....**

**Questo progetto di ricerca e la borsa di studio della candidata sono stati finanziati dalla Fondazione Vollaro.**

## RIASSUNTO

I nAChRs sono largamente espressi nel sistema nervoso centrale (SNC) e periferico (SNP), dove funzionano come i classici canali ionici attivati da ligando, facilitando l'ingresso di calcio e promuovendo il rilascio di neurotrasmettitori. L'esposizione cronica alla nicotina, agonista che mima l'azione del ligando endogeno acetilcolina e componente additiva presente nel tabacco, determina una serie di adattamenti cellulari, che sono responsabili dell'instaurarsi della dipendenza da fumo di sigaretta e degli effetti neurobiologici e fisiologici ad essa associati. L'eterogeneità funzionale di questa famiglia recettoriale, ha stimolato negli anni interesse per il loro studio e per approfondire gli effetti del trattamento cronico e dell'astinenza da nicotina.

Nella prima parte di questo lavoro, ci siamo focalizzati sugli effetti *in vivo* dell'esposizione cronica a nicotina. In particolare, abbiamo analizzato gli effetti sul recettore nativo  $\alpha 4\beta 2$ ; tale sottotipo può esistere in due differenti stechiometrie, con due o tre copie della subunità  $\alpha$  nel pentamero, che presentano diverse proprietà funzionali e sono differenzialmente regolate dal trattamento cronico con nicotina.

Gli effetti addittivi della nicotina, sostanza di per se non cancerogena, incentivano il consumo di tabacco, e la presenza nel fumo di sigaretta di sostanze che sono potenti agenti cancerogeni, quali le nitrosamine NNN e NNK e le amine eterocicliche, determinano la comparsa nel DNA di mutazioni, che portano alla trasformazione neoplastica e allo sviluppo di cancro. La correlazione consumo di tabacco-insorgenza di tumore, è particolarmente evidente nel caso del tumore polmonare, dove la nicotina sostiene la crescita tumorale e partecipa alla fase di metastatizzazione, regolando *signaling* intracellulari che mediano proliferazione cellulare, apoptosi e angiogenesi. La recente scoperta che i nAChRs sono espressi anche in cellule non-neuronali, quali cellule endoteliali, cheratinociti, cellule del sistema immunitario e cellule gliali, ha spinto numerosi gruppi a indagare il ruolo dei nAChRs anche in tessuti extra-neuronali e in condizioni patologiche.

La seconda parte di questo progetto ha avuto lo scopo di determinare quale fosse l'effetto del trattamento con nicotina e con antagonisti nicotinici sulla crescita di cellule di glioma e su colture primarie umane di glioblastoma, poiché rimane ancora da chiarire il ruolo del fumo sull'eziologia dei gliomi.

## **INTRODUZIONE**

L'abitudine al fumo rappresenta uno dei più gravi problemi di salute pubblica al mondo e la prima causa di morte facilmente evitabile. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), ogni anno sono 6 milioni le persone che muoiono per malattie correlate al fumo quali cancro, malattie cardiovascolari e respiratorie; tale numero è destinato ad arrivare a 10 milioni entro il 2030, se non saranno adottate misure efficaci. Per i fumatori si stima una riduzione dell'aspettativa di vita di circa 10 anni e un aumento del rischio di malattie correlate al fumo tanto maggiore quanto più è anticipata l'età di inizio. Numerosi studi epidemiologici e statistici, realizzati negli ultimi anni, consentono di delineare le dimensioni del consumo di tabacco in Italia, fornendo un profilo dei fumatori e delle loro abitudini. In Italia fumano circa 10,9 milioni di persone, di cui il 25% maschi e il 19% femmine e oltre il 25% dei decessi è compreso tra i 35 e i 65 anni di età. La preoccupazione del Ministero della Salute tuttavia è volta soprattutto all'aumento del consumo di tabacco tra i giovani, di cui si stima 1,5 milioni di fumatori tra i 15 e 24 anni.

Tenuto conto dei dati riportati, è chiaramente comprensibile quanto la dipendenza dal fumo di tabacco sia un problema socio-sanitario mondiale. Il fumo non è soltanto responsabile del 90% dei tumori polmonari, ma rappresenta anche il principale fattore di rischio per circa l'80% delle malattie respiratorie non neoplastiche, fra cui la broncopneumopatia cronica ostruttiva; inoltre, è responsabile dell'insorgenza del 25% delle malattie cardiovascolari: un fumatore ha un rischio di mortalità, a causa di una coronopatia, superiore da 3 a 5 volte rispetto ad un non fumatore. In generale, bisogna considerare che la qualità della vita di un soggetto fumatore è seriamente compromessa a causa della maggiore frequenza di patologie respiratorie (tosse, bronchiti ricorrenti, asma ed enfisemi) e cardiache (ipertensione, ictus, infarto), che possono limitare le attività della vita quotidiana. Inoltre il fumo di sigaretta è responsabile dell'insorgenza di tumori alle vie aeree e al tratto uro-genitale ed è associato a disordini a livello riproduttivo, all'aumentata probabilità di sviluppare cataratta e, nelle donne, contribuisce anche alla diminuzione della densità delle ossa.

In questi anni sia a livello nazionale che internazionale, si stanno sempre più sviluppando interventi di prevenzione e di cura per affrontare questa "epidemia" in modo complessivo.

### **1. COMPONENTI DEL FUMO DI SIGARETTA**

Il fumo di sigaretta è un aerosol complesso, composto da più di 5.000 differenti molecole. Il suo costituente principale è rappresentato dalla nicotina, la principale componente psicoattiva responsabile degli effetti associati a dipendenza. Essa, infatti, agendo come agonista sui recettori nicotinici colinergici neuronali (nAChRs) all'interno del sistema dopaminergico mesostriatale, è in grado di incrementare il rilascio della dopamina (DA) nella

parte ventrale del sistema agendo direttamente sui recettori nicotinici localizzati sui neuroni dopaminergici nell'area ventrale tegmentale (VTA). È un composto lipofilico che, una volta raggiunto il circolo sanguigno, passa velocemente la barriera ematoencefalica e si accumula a livello cerebrale in concentrazione 100-500 nM. La nicotina ha un'emivita di circa due ore e, a differenza dell'acetilcolina (ACh) che è rapidamente idrolizzata dall'acetilcolinesterasi, può essere solo metabolizzata dagli enzimi epatici P450. Circa il 70-80% della nicotina nell'uomo è convertita in cotinina, che ne rappresenta quindi il principale metabolita. La cotinina stessa mostra effetti pro-tumorali, quali aumento della crescita cellulare, riattivazione dei telomeri e soppressione dell'apoptosi (Hukkanen et al., 2005).

Particolarmente nocivi sono gli idrocarburi aromatici policiclici contenuti nel tabacco e le nitrosammine derivanti dalla combustione della nicotina, quali la 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanone (NNK) e l'N-nitrosornicotina (NNN). Questi agenti infatti sono in grado di interagire direttamente con il DNA, inducendo l'insorgenza di mutazioni, che nel tempo possono portare allo sviluppo di tumori. Le nitrosamine NNN e NNK sono agonisti rispettivamente per i recettori nicotinici  $\alpha 7$  e per i recettori eteromerici  $\alpha\text{-}\beta$  ed è stato dimostrato che l'esposizione ad entrambe causa l'insorgenza di tumore ai polmoni in roditori (Hecht, 1999).

Oltre alle molecole sopra citate, il fumo di sigaretta contiene: sostanze irritanti, quali la formaldeide e gli ossidi di azoto, che inibiscono il movimento delle ciglia della mucosa delle vie respiratorie; sostanze ossidanti; catrame, che si deposita nei polmoni e nelle vie respiratorie aumentando il rischio di tumori; monossido di carbonio, prodotto dalla combustione incompleta, che lega l'emoglobina riducendo l'assorbimento dell'ossigeno.

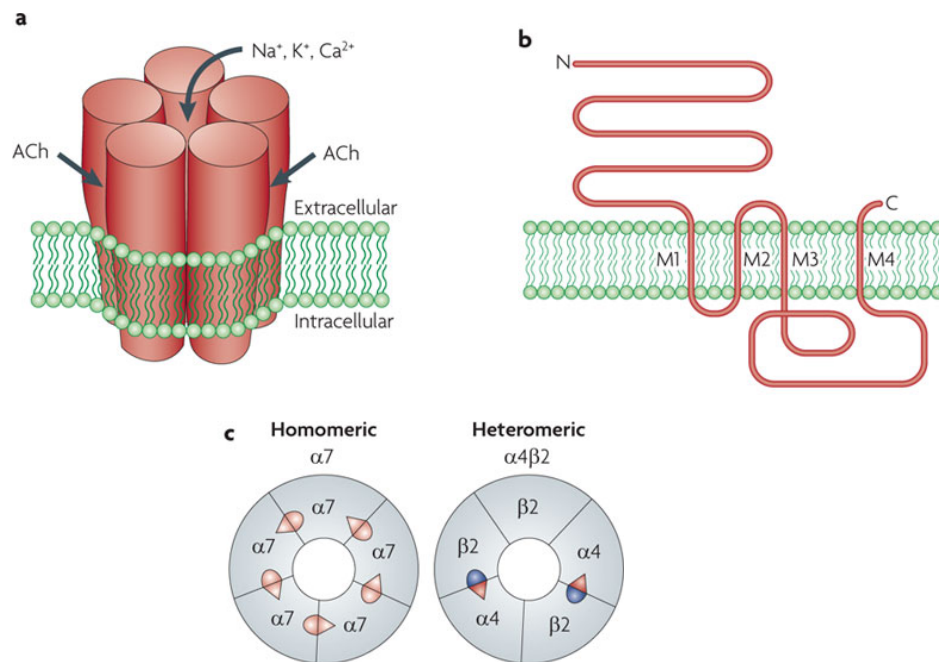
## **2. I RECETTORI COLINERGICI NICOTINICI**

I recettori colinergici nicotinici appartengono alla famiglia dei recettori canale Cys-loop attivati dal legame con il ligando, alla quale appartengono anche i recettori del GABA<sub>A</sub>, della glicina e della serotonina. L'attivazione di questi recettori da parte degli agonisti, regola una serie di funzioni fisiologiche. Nella giunzione neuromuscolare a livello post-sinaptico, mediano la contrazione del muscolo scheletrico; nel sistema nervoso autonomo sono responsabili della trasmissione sinaptica veloce eccitatoria; sono espressi a livello neuronale, a livello pre-sinaptico dove mediano il rilascio di numerosi neurotrasmettitori (quali GABA, dopamina, acetilcolina e glutammato) e sono coinvolti nella modulazione e nell'integrazione di una grande varietà di stimoli; infine, recenti studi hanno evidenziato l'espressione di questi recettori anche a livello non-neuronale, nelle cellule gliali, immunitarie ed endoteliali, suggerendo il coinvolgimento di questi recettori anche in *signaling* intracellulari al di fuori del SNC, quali la risposta immunitaria e la carcinogenesi (Wonnacott, 1997).

L'eterogeneità funzionale di questa famiglia recettoriale, ha stimolato negli anni interesse per il loro studio come possibili target terapeutici per molteplici condizioni patologiche, poiché regolano meccanismi coinvolti nella dipendenza da droghe d'abuso, oltre che funzioni cognitive; la loro alterazione è associata allo sviluppo di patologie neurodegenerative e neuropsichiatriche, come Alzheimer e Parkinson (Lewis and Picciotto 2013) e, inoltre, recenti studi hanno correlato i recettori colinergici nicotinici all'insorgenza di epilessia, schizofrenia, ansia, depressione e dolore (Gotti and Clementi, 2004; Picciotto et al., 2001; Hurst et al, 2013).

## 2.1. STRUTTURA DEI RECETTORI COLINERGICI NICOTINICI

I recettori colinergici nicotinici costituiscono una famiglia eterogenea di recettori. Ad oggi sono noti 17 geni codificanti per le diverse subunità nicotiniche; le subunità  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  e  $\gamma$  costituiscono il sottotipo muscolare; le altre ( $\alpha 2$ - $\alpha 10$  e  $\beta 2$ - $\beta 4$ ), espresse nel sistema nervoso, nella coclea e in tessuti non-neuronali, costituiscono il sottotipo neuronale (nAChRs). Le subunità si assemblano attorno ad un poro centrale a formare omo- o etero-pentameri con diverse proprietà farmacologiche e funzionali. In particolare, le subunità capaci di formare recettori omomerici sono le subunità  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$  e  $\alpha 10$ .



**Struttura schematica dei recettori colinergici nicotinici neuronali;** (a) rappresentazione di un recettore pentamerico con indicati i siti di legame per l'ACh; (b) rappresentazione della topologia di ogni subunità nicotinic: dominio extracellulare N-terminale, i domini transmembrana M1-M4 e dominio C-terminale; (c) struttura dei sottotipi recettoriali più diffusi nel SNC, il recettore omomero  $\alpha 7$  e il recettore eteromero  $\alpha 4\beta 2$  (Changeux et al., 2010).

Ciascuna subunità è costituita da un lungo dominio idrofilico extracellulare N-terminale, dove è presente il sito di legame per l'ACh, da quattro domini idrofobici transmembrana (M1-M4) e da un corto dominio extracellulare C-terminale (Dani and Bertrand, 2007). Tra il dominio M3 e M4 è presente un lungo *loop* intracellulare, responsabile della modulazione biochimica e del traffico del recettore. Il dominio transmembrana M2 delimita le pareti del poro recettoriale ed è fondamentale per garantire selettività al passaggio degli ioni. I domini M1 e M4 sono invece responsabili dell'interazione con le altre subunità (Zoli et al., 2015).

## **2.2. STATI FUNZIONALI**

I nAChRs possono esistere in quattro conformazioni: in assenza di ligando il canale è chiuso e il recettore si trova in uno stato di riposo (R). Il legame con l'agonista endogeno (ACh) o esogeno (per esempio nicotina), determina un riarrangiamento strutturale, che permette l'apertura del canale (A) e l'ingresso degli ioni. Nonostante l'agonista sia ancora legato con alta affinità, dopo pochi millisecondi il canale si chiude, desensitizzando il recettore (D). Quando questo stato si protrae a lungo termine, il recettore entra nello stato inattivo (I) (Changeux and Edelstein, 1998).

## **2.3. SOTTOTIPI RECETTORIALI**

Esperimenti di binding con ligandi radioattivi hanno permesso di distinguere due classi di nAChRs. La prima classe è costituita dai recettori sensibili all' $\alpha$ -Bugarotossina: sono i recettori costituiti dalle subunità  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$  e  $\alpha 10$ , che possono assemblarsi a formare recettori omomerici o eteromerici e che legano la tossina con un'affinità nM e gli agonisti con affinità  $\mu$ M. Inoltre, i recettori omomerici  $\alpha 7$  sono caratterizzati da un'elevata permeabilità al  $Ca^{2+}$ .

L'altra classe di recettori è costituita dai sottotipi eteromerici  $\alpha/\beta$ . Questi hanno alta affinità (nM) per la nicotina e per gli altri agonisti, ma sono insensibili all' $\alpha$ -Bungarotossina. Tra questi, quello maggiormente espresso nel SNC è il sottotipo  $\alpha 4\beta 2^*$ , seguito dal sottotipo  $\alpha 3\beta 4^*$  (Gotti e Clementi, 2004; Zoli et al., 2015). La diversa combinazione delle subunità recettoriali conferisce specifiche proprietà farmacologiche e diversa selettività ai cationi.

Nei sistemi di espressione eterologhi, le subunità co-assemblano in combinazioni maggiori rispetto ai tessuti nativi. Diversi studi hanno mostrato che, in sistemi eterologhi, la subunità  $\alpha 7$  può assemblarsi con subunità normalmente presenti nei recettori che non legano l' $\alpha$ -Bungarotossina, come per esempio  $\alpha 5$  (Girod et al., 1999),  $\beta 2$  (Khiroug et al., 2002),  $\beta 3$  (Palma et al., 1999) e  $\beta 4$  (Criado et al., 2012). Attraverso l'utilizzo di subunità  $\alpha 7$  e  $\beta 2$  fluorescenti, è stato possibile identificare la presenza del recettore  $\alpha 7\beta 2$  e caratterizzare le sue potenziali differenze farmacologiche rispetto al recettore omomero  $\alpha 7$ . La co-



espressione delle due subunità, infatti, determina una riduzione della corrente evocata dagli agonisti, senza alterare le caratteristiche di risposta dose-dipendente di un'ampia classe di agonisti e antagonisti (Murray et al., 2012).

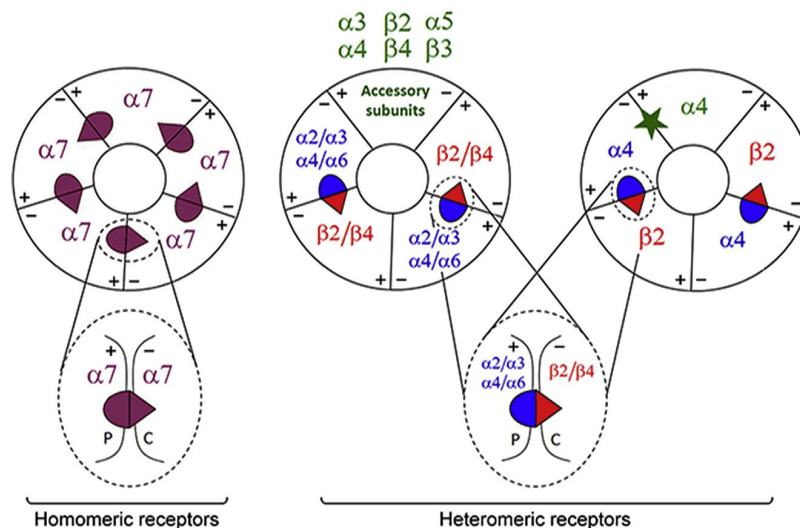
Un altro aspetto che determina la complessità dei sottotipi recettoriali nicotinici, è la presenza di possibili varianti delle subunità stesse e di polimorfismi. La subunità  $\alpha 7$ , per esempio, è codificata dall'esone 10 del gene *CHRNA7*, localizzato sul cromosoma 15q14. Analisi genetiche hanno evidenziato che, nell'uomo, gli esoni 5-10 di tale gene sono duplicati e fusi con tre esoni duplicati (A, B, C) di una serina/treonina chinasi, *ULK4* e uniti a un quarto dominio genico (D) tuttora sconosciuto. Tale gene duplicato, chiamato *CHRFAM7A*, codifica per una proteina  $\alpha 7$ dup, che perde il sito di legame per l'ACh (Hurst et al., 2013). Recenti studi condotti in ovociti, hanno mostrato che *CHRFAM7A* agisce come dominante negativo di  $\alpha 7$  nAChRs, riducendo il numero di recettori  $\alpha 7$  funzionali (deLucas-Cerillo et al., 2011). Inoltre, è stato dimostrato che *CHRFAM7A* è espresso in macrofagi e monociti, dove è downregolato in seguito al trattamento con LPS, mediante un meccanismo trascrizionale che causa la riduzione mediata da NF- $\kappa$ B dell'mRNA codificante per *CHRFAM7A*, suggerendo che questa isoforma di  $\alpha 7$ , la cui funzione è ancora sconosciuta, svolge un ruolo importante anche in processi fisiologici (Benfante et al., 2011). Infine, recenti studi *genome-wide association* hanno identificato varianti nel cromosoma 15q24-25, che codifica per le subunità nicotiniche umane  $\alpha 5$ ,  $\alpha 3$  e  $\beta 4$ . Questi polimorfismi contribuiscono a creare un ulteriore grado di complessità nei sottotipi recettoriali nicotinici e l'espressione di varianti delle subunità nicotiniche. Un esempio è rappresentato dalla sostituzione di un singolo nucleotide nel gene *CHRNA5* che codifica per la subunità  $\alpha 5$ ; in particolare, il polimorfismo rs16969968 porta alla sostituzione in posizione 398 nel loop intracellulare tra M3 e M4, dell'acido aspartico con l'asparagina; l'assemblaggio di queste subunità mutate nel pentamero, determina una diminuita funzionalità dei nAChRs e un aumento del rischio di dipendenza da nicotina, un aumento del consumo di tabacco e una maggiore incidenza di tumore al polmone (Bierut et al., 2008; Improgo et al., 2010).

## **2.4. SITI DI LEGAME**

### **2.4.1. SITI DI LEGAME ORTOSTERICI**

Un significativo contributo all'identificazione del sito di legame per l'ACh nei nAChRs è stato fornito da analisi cristallografiche della *Acetylcholine-binding protein* (AChBP), una proteina omopentamerica solubile, secreta dalle cellule gliali della lumaca d'acqua dolce e che presenta uno spettro di affinità per l'ACh del tutto simile a quello del recettore omomeroico  $\alpha 7$  o  $\alpha 9$ . (Celie et al. 2005; Rucktooa et al. 2009). Il sito di legame per l'ACh è localizzato in tasche idrofobiche situate all'interfaccia tra una subunità  $\alpha$  e una subunità adiacente ( $\alpha$  o  $\beta$ ),

che contribuiscono rispettivamente alla componente primaria (+) e alla componente complementare (-) del sito di legame. I nAChRs eteromerici presentano due siti di legame: la componente primaria è rappresentata dalle subunità  $\alpha 2$ - $\alpha 4$  e  $\alpha 6$ , mentre le subunità  $\beta 2$ - $\beta 4$  rappresentano quella complementare. Nei recettori omomerici le subunità  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$  e  $\alpha 9$  contribuiscono sia alla componente primaria che a quella complementare, per un totale di cinque siti di legame all'interno del pentamero (Gotti et al., 2009; Corringer et al., 2000; Taly et al., 2009). Per poter attivare stabilmente i nAChRs, l'ACh deve legare entrambi i siti ortosterici nei recettori eteromerici e tre siti di legame nei recettori omomerici (Rayes et al., 2009). Studi sul concatamero  $\alpha 4\beta 2\alpha 4\beta 2\alpha 4$  hanno evidenziato che, oltre ai due siti ortosterici canonici situati all'interfaccia  $\alpha 4/\beta 2$ , questi sottotipi presentano un altro sito di binding addizionale all'interfaccia  $\alpha 4/\alpha 4$  (Moroni et al., 2008; Mazzaferro et al., 2011). Jin et al., 2014 utilizzando la tecnica dei concatameri espressi in *Xenopus oocytes*, hanno recentemente dimostrato che la subunità  $\alpha 5$  può occupare la posizione che non partecipa al sito di legame o sostituire la subunità  $\beta 2$ , partecipando al sito di legame ortosterico. Comunque, recettori funzionali non possono avere la subunità  $\alpha 5$  in entrambi i siti di legame canonici.



**Rappresentazione schematica dei siti di legame dei diversi sottotipi di nAChRs.** I triangoli rappresentano la componente principale (+), i semicerchi la componente complementare (-); Oltre i due siti di legame ortosterici, il sottotipo  $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$  presenta un sito aggiuntivo all'interfaccia  $\alpha 4/\alpha 4$  (stella) (Zoli et al., 2015).

#### 2.4.2. SITI DI LEGAME ALLOSTERICI

Oltre al sito di legame ortosterico per l'ACh, l'attivazione dei nAChRs è modulata da una serie di molecole che si legano ai siti allosterici. Queste molecole, definite modulatori allosterici, possono essere ioni calcio (Galzi et al., 1996), piccole molecole (Pandya e Yakel,

2011) o proteine (Miwa et al. 2011). I modulatori allosterici possono potenziare o inibire l'attività fisiologica e sono caratterizzati da una bassa attività intrinseca, sebbene alcuni siano in grado di agire come veri agonisti. Da soli non sono in grado di attivare i nAChRs ma, se somministrati con agonisti endogeni come colina e ACh, possono selettivamente potenziare o inibire l'attività fisiologica del recettore.

## **2.5. RUOLO DELLE SUBUNITA' ACCESSORIE**

Le subunità che non prendono parte direttamente alla formazione del sito di legame, sono definite subunità accessorie. Nei sistemi eterologhi, le subunità  $\alpha 5$  e  $\beta 3$  possono formare canali funzionali solo se co-espresse con subunità che fungono da componente primaria e complementare (Groot-Kormelink et al., 1998), indicando che possono avere un ruolo esclusivamente accessorio. Al contrario, le subunità  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 4$  possono sia partecipare attivamente alla formazione del sito di legame, sia avere una posizione accessoria e determinare la formazione di recettori con una diversa stechiometria (Zoli et al., 2015).

Il ruolo delle subunità accessorie è stato studiato nel sottotipo  $\alpha 4\beta 2^*$ , nel quale la presenza della subunità accessoria ( $\alpha 5$ ,  $\alpha 4$ ,  $\beta 2$  o  $\beta 3$ ) cambia le proprietà farmacologiche e biofisiche, la sensibilità ai modulatori allosterici e all'up-regolazione. Il sottotipo  $(\alpha 4\beta 2)_2\alpha 5$ , per esempio, ha una più elevata permeabilità al calcio, mentre il sottotipo  $(\alpha 4\beta 2)_2\beta 2$  una maggiore affinità per ACh e nicotina ed è più sensibile alla desensitizzazione. Inoltre, la presenza della subunità  $\alpha 5$  nel sottotipo  $\alpha 4\beta 2^*$  conferisce maggiore sensibilità al modulatore allosterico galantamina, inibitore della colinesterasi (Kuryatov et al., 2008). La subunità  $\alpha 5$  altera le proprietà farmacologiche e funzionali anche del sottotipo  $\alpha 3\beta 2^*$  e  $\alpha 3\beta 4^*$ , aumentando la desensitizzazione e la permeabilità al calcio e alterando la risposta in seguito alla stimolazione con agonisti (Tapia et al., 2007).

La subunità  $\beta 3$  *in vitro* si assembla con numerosi sottotipi recettoriali, molti dei quali non risultano essere però funzionali (Broadbent et al., 2006). Studi *ex vivo* condotti in topi  $\beta 3$ KO mostrano una riduzione dei recettori  $\alpha 6^*$ , suggerendo che la subunità  $\beta 3$  si assembla preferenzialmente con  $\alpha 6$  (sottotipo recettoriale  $\alpha 6\beta 2^*$  o  $\alpha 4\alpha 6\beta 2^*$ ) e che  $\beta 3$  è importante per il corretto assemblaggio dei nAChRs, per la degradazione e il traffico (Fasoli e Gotti, 2015).

La subunità accessoria nella quinta posizione del pentamero può quindi influenzare molte caratteristiche dei nAChRs, inclusa la sensibilità all'agonista, la cinetica del canale, la permeabilità al calcio, l'assemblaggio, l'interazione con proteine, il traffico e la localizzazione cellulare (Colombo et al., 2013).

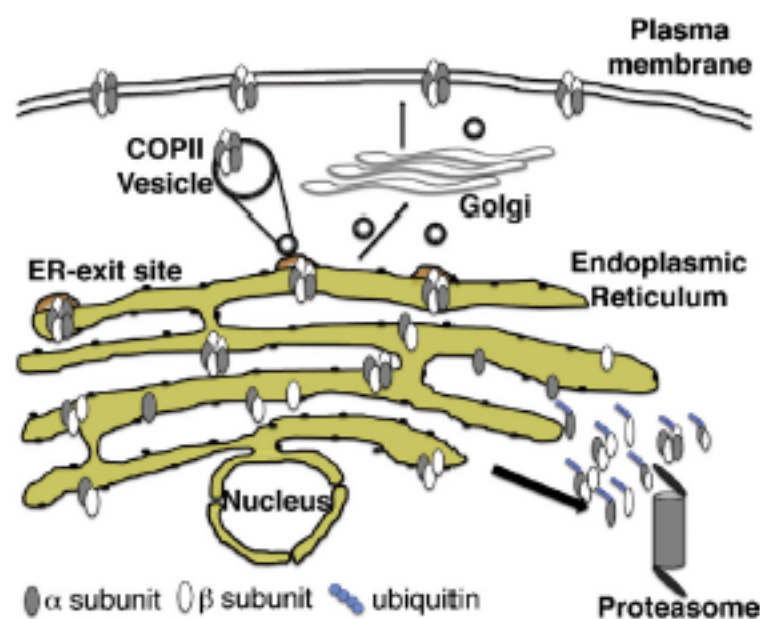
## 2.6. STECHIOMETRIA

Poiché i nAChRs sono strutture pentameriche, possono avere differenze nella composizione in subunità, ma anche avere diversa stechiometria pur avendo la stessa composizione in subunità. Questo ulteriore grado di complessità è una delle caratteristiche dei recettori nativi  $\alpha\beta 2$  e  $\alpha\beta 4$ , che possono esistere in due diverse stechiometria, a seconda che siano formati da due o tre copie della subunità  $\alpha$  all'interno del pentamero. Queste diverse stechiometrie presentano caratteristiche farmacologiche differenti; il sottotipo  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$  è attivato da concentrazioni più basse di ACh ( $EC_{50}$ : 1  $\mu M$ ) ed è più sensibile agli altri agonisti rispetto al sottotipo formato da tre subunità  $\alpha$   $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$  ( $EC_{50}$ : 100  $\mu M$ ) (Nelson et al., 2003; Moroni et al., 2006).

La sensibilità agli agonisti delle due diverse stechiometrie del sottotipo  $\alpha\beta 4$  è invece simile, ma solo il sottotipo  $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$  è sensibile all'aumento delle concentrazioni di ioni zinco, e le due stechiometrie hanno diverse cinetiche e una diversa conduttanza (Krashia et al., 2010). Esperimenti di binding condotti su aree cerebrali di roditore, hanno confermato l'espressione di entrambe le stechiometrie del sottotipo  $\alpha\beta 2$  in tessuti nativi, e studi *in vitro* hanno dimostrato che il trattamento con nicotina determina una up-regolazione del sottotipo  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$  (Gotti et al., 2008) e  $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$  (Mazzo et al., 2013).

## 3. BIOGENESI E TRAFFICO DEI nAChRs

La formazione dei nAChRs è un processo a tappe che prevede l'assemblaggio in pentameri all'interno del reticolo endoplasmico (RE), il reclutamento ai siti di uscite e il raggiungimento prima dell'apparato di Golgi e poi della membrana plasmatica.



Rappresentazione schematica delle vie di assemblaggio, trasporto e degradazione dei nAChRs (Colombo et al., 2013)

### **3.1. L'ASSEMBLAGGIO**

Il processo di assemblaggio svolge un ruolo chiave nel determinare la diversità dei sottotipi recettoriali che sono poi espressi sulla membrana plasmatica. È un processo lento e inefficiente e solo il 30% delle nuove subunità sintetizzate forma, in seguito a numerose modifiche post-traduzionali, come la formazione di ponti disolfuro e la N-glicosilazione di specifici residui, recettori funzionali (Millar e Harkness., 2008). Solo i recettori pentamerici correttamente assemblati riescono a lasciare il RE e raggiungere tramite vescicole COPII l'apparato di Golgi. Le subunità non ripiegate o non assemblate correttamente, vengono ubiquitinate e retrotraslocate nel citoplasma, dove sono degradate dal proteasoma. Il trattamento con inibitori del proteasoma aumenta i livelli delle subunità nicotiniche in membrana, suggerendo il suo ruolo chiave nel traffico dei nAChRs (Christianson e Green, 2004). L'assemblaggio, così come l'intero processo di biogenesi, è quindi strettamente controllato da proteine *chaperone* che assicurano non solo un corretto *folding* e assemblaggio, ma anche la ritenzione di polipeptidi immaturi nel RE. L'ubiquilina-1 è una proteina simile all'ubiquitina, che interagisce con il proteasoma e con le subunità nicotiniche  $\alpha 3$  e  $\alpha 4$ , sequestrandole e riducendone l'espressione sulla membrana plasmatica (Ficklin et al., 2005). Un'altra proteina importante per il controllo del corretto assemblaggio è UBXD4, proteina espressa in tessuti neuronali e non-neuronali e localizzata tra il RE e il Golgi. UBXD4 interagisce con il *loop* intracellulare di  $\alpha 3$  e  $\alpha 4$ , diminuendone l'ubiquitinazione e la conseguente degradazione e aumentando il numero di recettori  $\alpha 3^*$  in membrana (Rezvani et al., 2010).

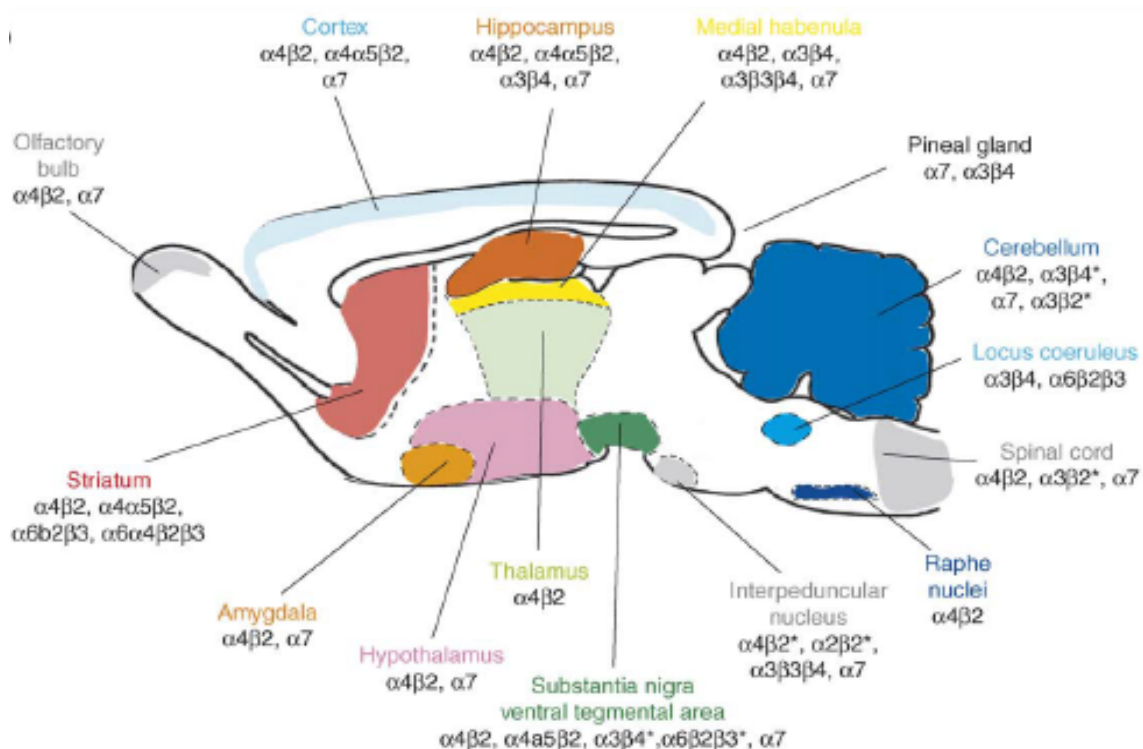
### **3.2. TRAFFICO VERSO LA MEMBRANA PLASMATICA**

Il trasporto verso la membrana plasmatica è una tappa cruciale per garantire l'efficacia della trasmissione sinaptica. Solo i recettori pentamerici correttamente assemblati, che mascherano il segnale di ritenzione ed espongono particolari segnali di esporto, riescono a lasciare il RE. È stato identificato nella subunità muscolare  $\alpha 1$  e nella subunità  $\alpha 4$ , una sequenza di-basica che viene riconosciuta come segnale dalle proteine COPI (Keller et al., 2001). Inoltre, è noto che il *loop* citosolico tra M3 e M4 svolge un ruolo chiave nel trasporto in membrana delle subunità nicotiniche e contiene sia segnali di ritenzione (RRQR), che segnali di esporto (LFM/LXM). Mutazioni nei siti RRQR e inserzioni di ulteriori motivi LFM nel *loop* intracellulare della subunità  $\beta 2$ , determinano un aumento del traffico in membrana della subunità  $\beta 2$  e, conseguentemente, di recettori  $\alpha 4\beta 2$  (Srinivasan et al., 2011). Il legame dei motivi LFM con la proteina sec24D, componente delle vescicole COPII, permette il reclutamento ai siti di uscita dell'RE e il trasporto del recettore assemblato alla membrana plasmatica attraverso la via secretoria.

La proteina VILIP-1 è un sensore neuronale del calcio, anch'essa coinvolta nel traffico dei nAChRs; la sua iniziale caratterizzazione è avvenuta in ovociti, dove è stato dimostrato che la co-espressione di VILIP-1 e del  $\alpha 4\beta 2$  nAChRs raddoppia la localizzazione di questo sottotipo sulla membrana plasmatica (Zhao et al., 2009a). VILIP-1 è localizzata nell'apparato di Golgi, indicando un ruolo importante nel traffico del recettore  $\alpha 4\beta 2$  dal Golgi alla membrana plasmatica (Zhao et al., 2009b).

#### 4. nAChRs NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

L'espressione dei diversi sottotipi nicotinici nel SNC è molto eterogenea. Lo studio e l'identificazione dei nAChRs si basa attualmente su una serie di tecniche sperimentali di localizzazione cellulare degli mRNA (ibridazione *in situ* e *single-cell* PCR) o delle proteine (immunoprecipitazione e immunostochimica), *imaging* dei sottotipi recettoriali (autoradiografie), analisi della composizione dei sottotipi recettoriali (tecniche di binding e di immunopurificazione) e infine studio dello stato funzionali dei diversi recettori (mediante tecniche basate su rilevazioni elettrofisiologiche e rilascio di neurotrasmettitori). Queste tecniche vengono applicate su animali WT, Het e KO.



Rappresentazione schematica della distribuzione dei nAChRs espressi nelle diverse aree del SNC di roditore (Gotti et al., 2006)

In accordo con i dati di ibridazione *in situ* che indicano gli mRNAs delle subunità nicotiniche  $\alpha 4$ ,  $\beta 2$  e  $\alpha 7$  come quelli più espressi nel cervello, i recettori  $\alpha 7$  e i recettori  $\alpha 4\beta 2^*$  sono quelli che presentano la più ampia distribuzione in molteplici aree del SNC, in varie specie di vertebrati (Gotti et al., 2006).

Il recettore nicotinicco  $\alpha 7$  sensibile alla  $\alpha$ -Bungarotossina, è principalmente espresso nella corteccia, nell'ippocampo, nelle regioni limbiche subcorticali e a bassi livelli nel talamo e nei gangli basali. La subunità  $\alpha 7$  costituisce recettori omomerici nel cervello di ratto e di pollo; in quest'ultimo sono anche presenti recettori omomerici  $\alpha 8$  e il recettore eteromericco  $\alpha 7\alpha 8$  (Gotti et al., 1994; Keyser et al., 1993; Drisdell and Green, 2000). Recenti studi hanno inoltre identificato un nuovo sottotipo recettoriale eteromericco  $\alpha 7\beta 2^*$ , espresso nel prosencefalo basale di topi WT e di campioni umani, ma non nel cervelletto. In particolare, esperimenti di western-blotting utilizzando Abs specifici, hanno mostrato che  $\alpha 7\beta 2^*$ nAChRs sono espressi in topi WT, ma non in topi  $\beta 2$ KO e rappresentano il 3% dei  $\beta 2^*$ nAChRs (Moretti et al. 2014). Le subunità  $\alpha 7$  e  $\beta 2$  sono co-esprese anche nei neuroni colinergici del prosencefalo basale di ratto, dove formano il sottotipo  $\alpha 7\beta 2^*$  che è risultato essere estremamente sensibile all'inibizione funzionale da parte delle forme oligomericche di amiloide A $\beta$ 1-42 e potrebbe avere un ruolo fondamentale nello sviluppo dell'Alzheimer (Liu et al., 2009).

I recettori  $\alpha 9/ \alpha 10^*$  non sono espressi nel cervello, ma svolgono funzioni importanti nella coclea e nei gangli. In particolare, la subunità  $\alpha 9$  forma recettori omomerici, mentre la subunità  $\alpha 10$  forma canali funzionali solo quando co-espressa con  $\alpha 9$  (Gotti and Clementi, 2004).

Il sottotipo recettoriale  $\alpha 4\beta 2$  rappresenta il più studiato e il più caratterizzato a livello farmacologico tra tutti i nAChRs. Rappresenta il 90% dei recettori nAChRs ad alta affinità nel cervello dei mammiferi ed è espresso in quasi tutte le aree cerebrali ed a più alto livello in corteccia, striato, collicolo superiore, talamo, nucleo genicolato laterale e cervelletto (Mao et al., 2008; Gotti et al., 2010).

Il sottotipo recettoriale  $\alpha 3\beta 4$  è il principale nAChRs espresso nel SNP nei gangli e nella porzione midollare del surrene; è espresso anche in alcune aree del SNC, nei neuroni della via Abenulo-Interpeduncolare, in particolare nella *medial habenula* (MHb), nella ghiandola pineale e nella retina (Grady et al., 2009; Scholze et al., 2012).

Sia i recettori  $\alpha 4\beta 2^*$  che  $\alpha 3\beta 4^*$  possono contenere anche la subunità  $\alpha 5$ , la cui presenza aumenta la desensitizzazione del recettore e la permeabilità al calcio (Fucile, 2004).

Il sottotipo  $\alpha 2^*$ nAChRs è espresso ad alti livelli nelle regioni corticali e subcorticali e a livelli inferiori in tutto il cervello dei primati, mentre la sua espressione risulta essere notevolmente ridotta nei cervelli di roditore, dove è limitata alla retina e al nucleo interpeduncolare (IPN) (Han et al. 2000; Moretti et al., 2004).

Oltre a questi sottotipi che sono i maggiormente espressi nelle aree del SNC, si possono formare molti altri recettori nativi, con funzioni importanti nella via mesostriatale, substantia nigra, VTA, nucleus accumbens (NAc) e caudato-putamen (CPu), e nella via visiva (retina e collicolo superiore), come per esempio i sottotipi  $\alpha 6\beta 2\beta 3^*$  che possono essere presenti in due forme,  $\alpha 6\beta 2\beta 3$  o  $\alpha 4\alpha 6\beta 2\beta 3$ . La prima è espressa principalmente nella via mesocorticolimbica, la seconda è espressa nei terminali dopaminergici del via nigrostriatale ed è il sottotipo fortemente diminuito nello striato dei pazienti affetti dalla malattia di Parkinson e nello striato dei modelli animali di tale patologia (Quirk and Wonnacott, 2011). Esiste inoltre una piccola popolazione di recettori  $\alpha 4\beta 2\beta 3$  espressi esclusivamente nel caudato-putamen (Gotti et al., 2010).

## **5. EFFETTI INDOTTI DALLA NICOTINA**

I nAChRs neuronali sono target del ligando esogeno nicotina, che spiazzata l'ACh dai siti di legame, attivando il recettore. La nicotina è la principale componente psicoattiva presente nel tabacco; è un composto lipofilo che, una volta raggiunto il circolo sanguigno, passa velocemente la barriera ematoencefalica (BBB) e si accumula a livello cerebrale in concentrazione 100-500 nM. Nel cervello di un fumatore, la nicotina rimane a lungo tempo a contatto con i nAChRs: a differenza dell'ACh, che è rapidamente idrolizzata dall'acetilcolinesterasi, la nicotina, che ha un'emivita di circa due ore, può essere solo metabolizzata dagli enzimi epatici P450. Circa il 70-80% della nicotina nell'uomo è convertita in cotinina, che ne rappresenta quindi il principale metabolita (Hukkanen et al., 2005). Studi in cervelli di soggetti fumatori (Perry et al. 1999; Mukhin et al., 2008) e in animali (Marks et al., 2004; Moretti et al., 2010) hanno dimostrato che l'esposizione a lungo termine alla nicotina causa una serie di effetti farmacologici tra cui la desensitizzazione dei nAChRs eteromerici e un aumento del numero dei recettori, fenomeno conosciuto come up-regolazione. Gli effetti di rinforzo e di gratificazione indotti dalla nicotina e che determinano la dipendenza, sono invece mediati da alterazioni nell'attività delle popolazioni neuronali presenti nel circuito mesocorticolimbico (Pistillo et al., 2015).

### **5.1. UP-REGOLAZIONE DEI nAChRs**

Studi condotti su tessuti derivanti da cervelli di soggetti fumatori e su animali esposti cronicamente alla nicotina, hanno mostrato che il trattamento con nicotina determina un aumento del numero di recettori ad alta affinità, senza alterare i livelli degli mRNAs, suggerendo che sono coinvolti solo meccanismi post-trascrizionali nel fenomeno di up-regolazione (Marks et al., 1992). L'up-regolazione coinvolge specifiche aree cerebrali, quali corteccia cerebrale e ipotalamo (Nashmi et al., 2007); inoltre, esperimenti di autoradiografie, immunoprecipitazione e western-blotting hanno chiaramente dimostrato che il sottotipo



principalmente coinvolto in questo fenomeno è il recettore eteromero  $\alpha 4\beta 2$  e che la presenza nel pentamero della subunità accessoria  $\alpha 5$  conferisce resistenza all'up-regolazione *in vivo* nell'ippocampo, nello striato e nella corteccia cerebrale di ratto (Mao et al., 2008), ma non nella corteccia caudale (Moretti et al., 2010). Il sottotipo  $\alpha 7$ , che ha una minore affinità per la nicotina, è meno soggetto all'up-regolazione, e soltanto in poche regioni cerebrali (Olale et al., 1997). Il sottotipo  $\alpha 3\beta 4$ , principalmente espresso nella ghiandola pineale, nella Mhb e nell'IPN, sembra non essere alterato dal trattamento cronico con nicotina (Nguyen et al., 2003). Per quanto riguarda i recettori  $\alpha 6^*$ , è stato dimostrato che la auto-somministrazione intravenosa di nicotina non altera i livelli di questo sottotipo in ratti (Parker et al., 2004), ma che il trattamento cronico con nicotina mediante mini-pompa o con nicotina sciolta in acqua, riduce il numero di  $\alpha 6^*$  nei neuroni dopaminergici del mesencefalo (Lai et al., 2005). La diminuzione dei  $\alpha 6^*$  nAChRs è accompagnata da una riduzione anche dei  $\beta 3^*$  nAChRs, in accordo con il fatto che il 70% dei recettori  $\alpha 6^*$  contengono anche la subunità  $\beta 3$  (Gotti et al., 2010).

La risposta al trattamento cronico con nicotina dipende, oltre che dal sottotipo recettoriale e dall'area cerebrale, anche dall'età. Doura et al., 2008 hanno trovato differenze nel numero di  $\alpha 4\beta 2^*$  e  $\alpha 7$  nAChRs in ratti adolescenti e adulti. In particolare, i recettori  $\alpha 4\beta 2^*$  e  $\alpha 7$  sono maggiormente up-regolati negli adulti, ma i ratti adolescenti presentano una maggiore up-regolazione dei  $\alpha 4\beta 2^*$  nAChRs nella corteccia prefrontale (PFC) rispetto ai ratti adulti (Counotte et al., 2012).

## **5.2. MECCANISMI MOLECOLARI COINVOLTI NELL'UP-REGOLAZIONE**

I meccanismi molecolari attraverso cui la nicotina determina l'up-regolazione dei nAChRs non sono ancora del tutto identificati. È noto che si tratta di meccanismi post-trascrizionali, che sono indipendenti dal tipo di cellula in cui il recettore è espresso e che possono interferire con le varie tappe di biogenesi del recettore.

### **5.2.1. SINTESI, MODIFICAZIONI POST-TRADUZIONALI DELLE SUBUNITA' E ASSEMBLAGGIO DEI PENTAMERI**

Numerose evidenze indicano che gli eventi chiave nell'up-regolazione indotta dall'esposizione a nicotina, avvengono a livello intracellulare durante la fase di sintesi, assemblaggio e trasporto dei recettori dal RE alla membrana plasmatica e alcuni studi hanno dimostrato che la nicotina possa agire come *chaperone*, favorendo l'assemblaggio delle subunità nicotiniche (Saletto et al., 2005; Kuryatov et al., 2005). Vallejo et al., 2005 hanno dimostrato che il trattamento con nicotina determina un aumento di 4-6 volte del binding della  $^{125}$ I-Epipatidina ai recettori eteromero  $\alpha 4\beta 2$ , senza riflettersi su un aumento significativo del numero dei recettori in membrana e sulla base di questi dati hanno proposto un meccanismo

secondo il quale l'esposizione alla nicotina stabilizza i recettori espressi sulla superficie e quelli presenti in uno stato di alta affinità, rendendo i recettori più attivi perché più sensibili agli agonisti e caratterizzati da una lenta desensitizzazione. Più recentemente è stato proposto un meccanismo bifasico di up-regolazione dei nAChRs nativi in neuroni corticali, caratterizzato da almeno due differenti meccanismi: il primo, più veloce, che non correla con cambiamenti nel numero dei nAChRs, ma con cambiamenti conformazionali, in accordo con gli studi precedenti (Vallejo et al., 2005); il secondo fenomeno, più lento e più duraturo, dovuto ad una ridotta degradazione della subunità  $\beta 2$  da parte del proteasoma; tale subunità si accumula nel RE e determina un aumento dell'assemblaggio delle subunità e un aumento dell'inserzione in membrana di nAChRs attraverso la via secretoria (Darsow et al., 2005). Questo studio ha evidenziato che l'up-regolazione indotta da nicotina è il risultato di molteplici processi e non è esclusivamente la causa di un singolo evento (Govind et al., 2012).

### **5.2.2. CAMBIAMENTI DELLA STECHIOMETRIA**

Come descritto precedentemente, le subunità  $\alpha 4$  e  $\beta 2$  sono espresse in sistemi eterologhi e sono presenti in due diverse stechiometrie, che hanno alta e bassa sensibilità all'agonista. Studi funzionali hanno dimostrato che la stechiometria  $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$  è quella maggiormente espressa in linee HEK293 stabilmente trasfettate, ma che l'esposizione a lungo termine a nicotina o l'aumento delle subunità  $\beta 2$ , promuove l'espressione della stechiometria più sensibile all'ACh  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ . Anche in ovociti trasfettati con gli mRNA codificanti per le subunità  $\alpha 4$  e  $\beta 2$ , il trattamento cronico con nicotina promuove la formazione della stechiometria  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$  (Lopez-Hernandez et al., 2004). L'up-regolazione della stechiometria  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$  è stata dimostrata anche mediante l'utilizzo della proteina fluorescente GFP, che ha evidenziato come la nicotina sia in grado di stabilizzare questa stechiometria a livello dell'RE, favorendone l'accumulo nei siti di uscita (Srinivasan et al., 2011). Tutti questi dati correlano con analisi elettrofisiologiche (Moroni et al., 2006).

Anche per il sottotipo  $\alpha 3\beta 4$  esiste una stechiometria maggiormente up-regolata dal trattamento con nicotina; dati ottenuti dal nostro laboratorio infatti, indicano che la stechiometria  $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$  è quella più sensibile al trattamento con nicotina e quella quindi maggiormente up-regolata sia in omogenati totali che in membrana plasmatica di cellule trasfettate (Mazzo et al., 2013).

### **5.2.3. AUMENTO DEL TRASPORTO DEI RECETTORI ALLA MEMBRANA PLASMATICA**

I nAChRs raggiungono la membrana plasmatica attraverso la via secretoria e il numero di recettori sulla superficie dipende dall'equilibrio tra endocitosi ed esocitosi. Darsow et al., 2005 hanno dimostrato che l'esposizione a nicotina determina un'up-regolazione dei recettori  $\alpha 4\beta 2$  in membrana dovuto ad un aumentato trasporto dei nAChRs lungo la via secretoria,

senza alcuna alterazione dell'internalizzazione dei recettori in membrana. Attraverso una tecnica di *live-cell imaging*, Richards et al., 2012 hanno evidenziato che il trattamento con nicotina e con citisina, agonista parziale dei recettori nAChRs, ha diversi effetti sulla stechiometria del recettore  $\alpha 4\beta 2$ ; in particolare, la nicotina favorisce il trasporto e l'inserzione in membrana del recettore in conformazione  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ , mentre la citisina favorisce la conformazione con tre subunità  $\alpha$  e due subunità  $\beta$ , in accordo con analisi condotte in ovociti di *Xenopus* (Moroni et al., 2006) e esperimenti di FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) (Srinivasan et al., 2012).

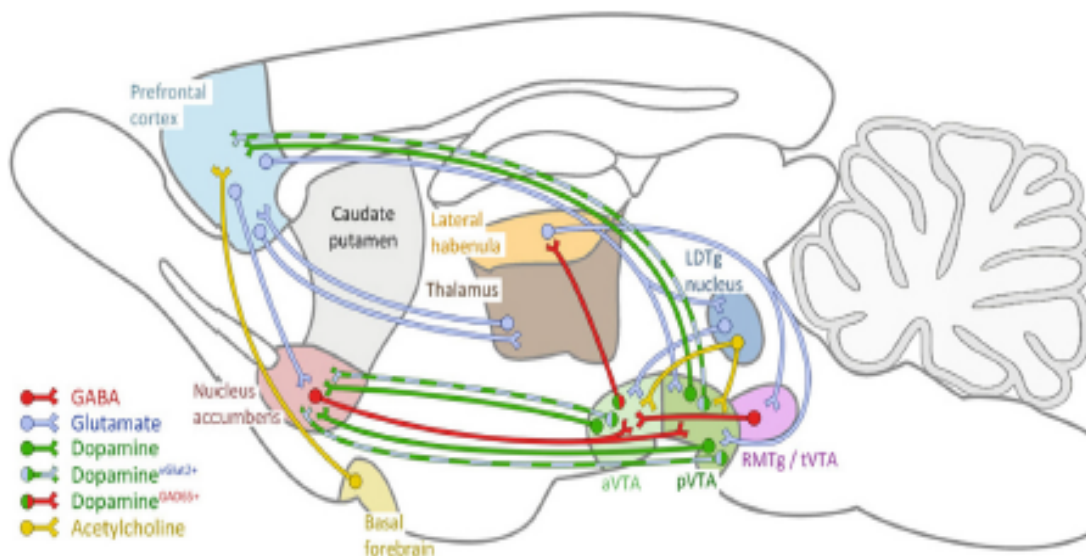
#### **5.2.4. RIDUZIONE DELLA DEGRADAZIONE**

L'ubiquitinazione regola la degradazione dei nAChRs e il sistema ubiquitina-proteasoma influenza la trasmissione sinaptica e la plasticità (Yi et al., 2007). Recentemente è stato dimostrato che la nicotina in concentrazioni simili a quelle presenti nel plasma di soggetti fumatori (400 nM), agisce indirettamente come parziale inibitore del proteasoma, inducendo una riduzione della degradazione della subunità  $\alpha 7$  (Rezvani et al., 2007).

### **6. IL SISTEMA MESOCORTICOLIMBICO E I MECCANISMI COINVOLTI NELLA DIPENDENZA DA NICOTINA**

L'esposizione a sostanze d'abuso determina cambiamenti a livello cerebrale, che possono spiegare anche le difficoltà alle quali un soggetto va incontro durante l'astinenza dalla droga. Recenti studi hanno dimostrato che l'attivazione e la conseguente desensitizzazione dei nAChRs e l'interazione con glutammato, dopamina (DA) e GABA all'interno del circuito mesocorticolimbico, sono responsabili dell'insorgenza della dipendenza e dei sintomi fisiologici e psicologici che insorgono durante il periodo di astinenza (Picciotto e Kenny 2013; Livingstone e Wonnacott, 2009). Il sistema mesocorticolimbico consiste in una rete nervosa che connette la VTA, la PFC, e il NAc.

Fulcro funzionale di questo sistema è rappresentato dai neuroni dopaminergici presenti nella VTA e dalle loro proiezioni alla PFC, al NAc e all'Amigdala basolaterale (Kauer e Malenka, 2007; Corrigall et al., 1992). I neuroni dopaminergici che proiettano al NAc, ricevono afferenze eccitatorie glutammatergiche e colinergiche che mediano gli stimoli di rinforzo e gratificazione (Forster e Blaha, 200; Lodge e Grace, 2006). Ricevono inoltre afferenze inibitorie dagli interneuroni GABAergici, che mediano risposte aversive (Stamatakis e Stuber, 2012; Lammel et al., 2011).



**Rappresentazione schematica del sistema mesocorticolimbico, in una sezione sagittale di cervello di roditore.** Sono rappresentate le proiezioni glutammatergiche (in blu), dopaminergiche (verde), colinergiche (gialle) e GABAergiche (rosse) (Pistillo et al., 2015).

L'esposizione cronica a nicotina determina:

- una diminuzione dell'attivazione dei recettori  $\alpha 4\beta 2^*$  espressi sugli interneuroni GABAergici con conseguente riduzione del rilascio di GABA e della sua attività inibitoria (Mansvelder et al., 2002);
- l'attivazione dei recettori  $\alpha 7$  sui terminali glutammatergici con conseguente aumento di rilascio di glutammato, che facilita l'attivazione dei neuroni dopaminergici della VTA, con un aumento dell'attività post-sinaptica dei recettori NMDA e l'induzione di LTP (*long-term potentiation*) (Zhao-Shea et al., 2011).

Nel complesso, questi eventi portano ad una diminuita inibizione del GABA sui neuroni dopaminergici della VTA e ad un aumento dell'attività di questi neuroni da parte del glutammato, con un conseguente aumento del rilascio di dopamina nel NAc; tale aumento media gli effetti di gratificazione che sono alla base dei meccanismi delle sostanze d'abuso e che determinano l'insorgenza della dipendenza (D'Souza e Markou, 2013).

Recenti evidenze sottolineano l'importanza degli nAChRs contenenti la subunità  $\alpha 5^*$  nei neuroni del sistema habenulo-interpeduncolare (Hb-IPN), via che regola le proprietà aversive alla nicotina (Fowler et al., 2011; Salas et al., 2009). Tali recettori sono anche espressi nell'80% dei neuroni dopaminergici della VTA che proiettano al NAc e promuovendo il rilascio di DA, inducono gli effetti di piacere e additivi delle sostanze d'abuso (Di Ciano and Everitt, 2004; Tolu et al., 2012). In questi neuroni i  $\alpha 5^*$  nAChRs hanno un ruolo chiave nella regolazione della dose minima di nicotina necessaria per l'attivazione delle cellule

dopaminergiche e quindi per l'effetto rinforzante della nicotina. Un polimorfismo riguardante un singolo nucleotide nel gene che codifica per la subunità  $\alpha 5$  e che porta alla sostituzione dell'acido aspartico in asparagina, determina la parziale perdita della funzionalità della proteina *in vivo*, che porta ad un aumento del consumo di nicotina attraverso self-administration (Morel et al., 2013).

## **7. IL SISTEMA ABENULO-INTERPEDUNCOLARE E I MECCANISMI COINVOLTI NELL'ASTINENZA DA NICOTINA**

L'astinenza da nicotina e la cessazione del consumo di tabacco alterano nuovamente gli equilibri che si erano instaurati in presenza di nicotina. La fase di astinenza è caratterizzata da segni somatici evidenti quali l'aumento di ansia, anedonia e irritabilità (Paolini e De Biasi, 2011; Baldwin et al., 2011). Alcuni studi hanno dimostrato che l'astinenza riduce l'attività del circuito mesocorticolimbico (Hildebrand et al., 1998), riduce i livelli di DA nella VTA, nel NAc e nello striato (Natividad et al., 2012; Zhang et al., 2012), aumenta la funzionalità dei trasportatori striatali della DA (Hadjiconstantinou et al., 2011) e riduce la trasmissione glutammatergica (Li et al., 2014). Inoltre, come accade per gli stimoli di stress e di avversione, l'astinenza da nicotina aumenta il rilascio di DA nella PFC, favorendo comportamenti associati all'ansia (Carboni et al., 2000).

Il sistema habenulo-interpeduncolare Hb-IPN è recentemente emerso come mediatore chiave nella sindrome dell'astinenza da nicotina. L'Hb è una struttura diencefalica, suddivisa in *lateral habenula* (LHb) e *medial habenula* (MHb) (Hikosaka, 2010). Mentre la LHb esercita una funzione inibitoria sull'attività dei neuroni dopaminergici della VTA, la MHb proietta all'IPN attraverso la via del fascicolo retroflesso, e recenti studi di optogenetica indicano che i neuroni colinergici di questa area rilasciano anche glutammato come co-trasmettitore (Ren et al., 2011). La MHb e l'IPN esprimono mRNA per le principali subunità nicotiniche, in particolare presentano un'elevata densità di recettori  $\alpha 5^*$ ,  $\alpha 3^*$  e  $\alpha 4^*$  (Grady et al., 2009). Inoltre, è stato dimostrato che la somministrazione di mecamilamina nella MHb, ma non nella corteccia, nell'ippocampo o nella VTA, precipita i sintomi di astinenza in topi trattati con nicotina e i sintomi sono assenti in topi  $\alpha 5$ ,  $\alpha 3$  e  $\alpha 4$  KO (Baldwin et al., 2011; De Biasi e Dani, 2011).

Diversi studi di *genome-wide association* hanno identificato che varianti nel cromosoma 15q24-25, che codifica per le subunità nicotiniche  $\alpha 5$ ,  $\alpha 3$  e  $\beta 4$ , sono associate ad un maggiore dipendenza da nicotina, ad maggior numero di sigarette fumate e ad una maggiore incidenza di tumore al polmone. Poiché due di queste subunità sono le stesse che sono importanti per la sindrome di astinenza nei topi, i recettori  $\alpha 5^*$ ,  $\alpha 3^*$  e  $\beta 4^*$  espressi nel sistema MHb-IPN potrebbero avere un ruolo anche nella dipendenza. In accordo con questi studi,

Fowler et al., 2011 hanno dimostrato che la subunità  $\alpha 5$  è fondamentale nella regolazione della somministrazione di nicotina: topi  $\alpha 5$  KO infatti, mostrano un'aumentata auto-somministrazione di nicotina, a dosi che determinano normalmente aversione nei topi WT. La ri-espressione selettiva della subunità  $\alpha 5$  nella MHb blocca questo effetto, indicando che i  $\alpha 5^*$  nAChRs presenti nella MHb hanno un ruolo importante anche nella regolazione degli effetti negativi della nicotina. Gli stessi autori hanno dimostrato inoltre che, bloccando la trasmissione mediata dagli NMDA nel sistema MHb-IPN, aumenta la auto-somministrazione di nicotina in ratti. Zhao-Shea et al., 2013 hanno infine dimostrato che, bloccando i neuroni GABAergici durante l'astinenza da nicotina, si ha una riduzione dell'attivazione neuronale dell'IPN e una riduzione dei sintomi dell'astinenza.

## 8. I RECETTORI NICOTINICI NON-NEURONALI

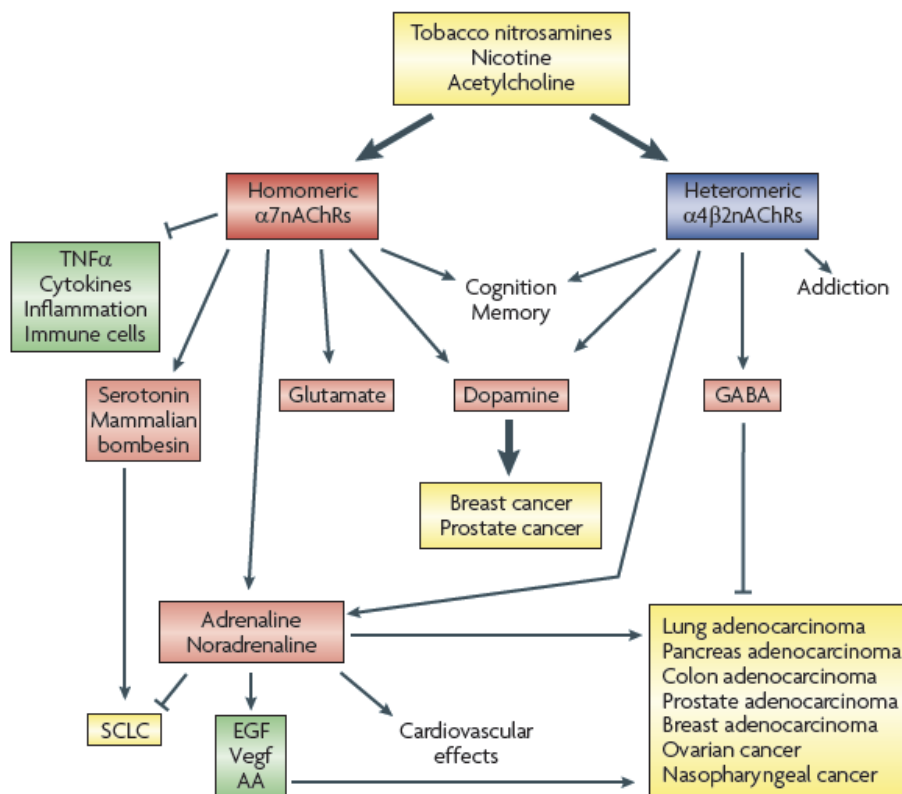
I nAChRs sono largamente espressi a livello della giunzione neuromuscolare e nel SNC e SNP, dove funzionano come i classici canali ionici attivati da ligando, facilitando l'ingresso di calcio e promuovendo il rilascio di neurotrasmettitori, quali GABA, dopamina e serotonina, coinvolti nella dipendenza indotta da nicotina (Itier and Bertrand, 2001).

Recenti studi hanno dimostrato che i recettori nicotinici sono espressi anche in cellule non neuronali, tra cui cellule di origine epiteliale, endoteliale e astrociti, dove mediano la sintesi e il rilascio di fattori di crescita, fattori proangiogenici e neurotrofici, suggerendo un possibile ruolo di questi recettori anche in *signaling* al di fuori del SNC, inclusa la crescita tumorale. (Carlisle et al., 2007; Singh et al., 2011).

La scoperta che i nAChRs sono espressi anche a livello non neuronale, è stata seguita dall'osservazione che la nicotina, sostanza di per se non cancerogena, è in grado di indurre un aumento della proliferazione delle cellule endoteliali e di promuovere la progressione della crescita tumorale attraverso la formazione di metastasi e favorendo l'angiogenesi, la migrazione e l'evasione dall'apoptosi (Shuller et al., 1995; Dasgupta et al., 2009; Heeschen et al., 2001). Se quindi, ad oggi, non ci sono evidenze che la nicotina sia coinvolta nella fase iniziale del processo di tumorigenesi ma esclusivamente nella crescita di tumori solidi *in vivo*, altre sostanze presenti nel tabacco sono cancerogene e quindi in grado di farlo. Tra queste sostanze, particolare importanza va attribuita alle nitrosamine NNN e NNK, che si legano ai recettori nicotinici con una più alta affinità rispetto all'acetilcolina, attivandoli e promuovendo una cascata di eventi che porta allo sviluppo del processo oncogenico (Shuller, 2009).

## 9. nAChRs E TUMORI

Tra i nAChRs espressi nelle cellule non-neuronali, il recettore omomeroico  $\alpha 7$  è quello maggiormente implicato nell'aumento della proliferazione cellulare indotto da nicotina e NNK, e il principale sottotipo responsabile dello sviluppo e della progressione tumorale *in vivo*. Al contrario, il recettore eteromeroico  $\alpha 4\beta 2$  regola risposte inibitorie sulla crescita, attraverso il rilascio di GABA, noto *tumor-suppressor* in molti tipi di cancro, tra i quali il tumore ai polmoni (Shuller, 2009), al pancreas (Shuller et al., 2008), al seno (Drell et al., 2003) e al colon (Joseph et al., 2002).



**Rappresentazione schematica delle diverse funzioni del recettore omomero  $\alpha 7$  e del recettore eteromero  $\alpha 4\beta 2$ .** (Shuller, 2009)

Entrambi i sottotipi recettoriali sono up-regolati in seguito all'esposizione a nicotina e nitrosamine: i recettori eteromero  $\alpha 4\beta 2$  vengono desensitizzati velocemente per la loro alta affinità, mentre i recettori  $\alpha 7$ , per la loro più bassa affinità, sono in grado di rimanere attivi più a lungo e di esercitare la loro funzione pro-tumorale. La desensitizzazione dei  $\alpha 4\beta 2$ nAChRs e l'up-regolazione della funzionalità dei  $\alpha 7$ nAChRs sono quindi l'evento chiave per lo sviluppo dei più comuni tipi di tumore (Shuller, 2009). Entrambi i recettori promuovono anche il rilascio di dopamina, neurotrasmettitore eccitatorio che, oltre alle azioni svolte nel cervello, stimola la proliferazione di cellule tumorali nella prostata e nella ghiandola mammaria (Lang et al., 2004). I recettori  $\alpha 7$  mediano inoltre azioni anti-infiammatorie attraverso l'inibizione delle sintesi di citochine pro-infiammatorie, di TNF $\alpha$  e inattivando cellule immunitarie quali linfociti T e B (Takahashi et al., 2007). Inoltre, promuovono il rilascio di serotonina (Cattaneo et al., 1993), del neuropeptide bombesina (Olincy et al., 1999) e dei neurotrasmettitori adrenalina e noradrenalina (Haass and Kubler, 1997); questi, oltre a regolare funzioni cerebrali, agiscono come fattori di crescita per vari tipi di tumore, attraverso l'attivazione diretta di vie intracellulari o indirettamente attraverso l'attivazione dei recettori  $\beta$ -



adrenergici, che stimolano il rilascio di EGF, VEGF e AA e quindi la progressione tumorale (Shuller, 2009).

Come descritto precedentemente, esiste un'isoforma alterativa della subunità  $\alpha 7$ , chiamato CHR7A, mancante del sito di legame per l'ACh, che agisce come dominante negativo di  $\alpha 7$  nAChRs, riducendo il numero di recettori  $\alpha 7$  funzionali. Tale isoforma non è in grado, quando espressa da sola in ovociti, di evocare corrente in seguito al trattamento con nicotina o ACh (Hurst et al., 2013; deLucas-Cerillo et al., 2011). L'espressione di questa isoforma di  $\alpha 7$  è relativamente bassa nel cervello, ma elevata nel sistema immunitario, nei monociti e nei macrofagi (Benfante et al., 2011).

Altre evidenze che correlano i recettori nicotinici, il fumo di sigaretta e il cancro, derivano da studi GWAS (*genome-wide association studies*), che hanno identificato un locus sul cromosoma 15q24-25, contenente i geni che codificano per le subunità nicotiniche  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  e  $\beta 4$ , associato a un aumentato rischio di sviluppare tumore ai polmoni, dipendenza da nicotina e aumento del numero di sigarette fumate al giorno. Il coinvolgimento del cluster genico CHR5A3/B4 è dimostrato anche dal fatto che è over-espresso in linee di tumore al polmone a piccole cellule (*small cell lung cancer*, SCLC) di derivazione neuroendocrina (Improgo et al., 2010; Reina et al., 2010). Tra i polimorfismi SNP (*non-synonymous single nucleotide polymorphism*) che caratterizzano questa regione, quello più particolarmente studiato e diffuso soprattutto nella popolazione caucasica, consiste nella sostituzione dell'acido aspartico in asparagina (D398N) nella subunità  $\alpha 5$  (Tammimaki et al., 2012). È stato recentemente dimostrato che i  $\alpha 5$  nAChRs mediano le risposte alla nicotina nell'abenua mediale (Fowler et al., 2011) e nella VTA (Morel et al., 2014). L'assenza della subunità  $\alpha 5$  o la presenza di una subunità  $\alpha 5$  con il polimorfismo D398N nell' abenua mediale determina un aumento del consumo di nicotina; questo SNP svolge quindi un duplice ruolo: da una parte, la sua presenza aumenta la concentrazione minima di nicotina necessaria per attivare i neuroni dopaminergici, dall'altra la parziale perdita di funzione di questi neuroni riduce le proprietà aversive alle alte dosi di nicotina e promuove il consumo della nicotina stessa, determinando l'insorgenza della dipendenza. Un altro SNP localizzato in una regione non codificante di  $\alpha 5$ , è associato ad un'alterazione dei livelli di mRNA codificanti per  $\alpha 5$  nel cervello (Wang et al., 2009).

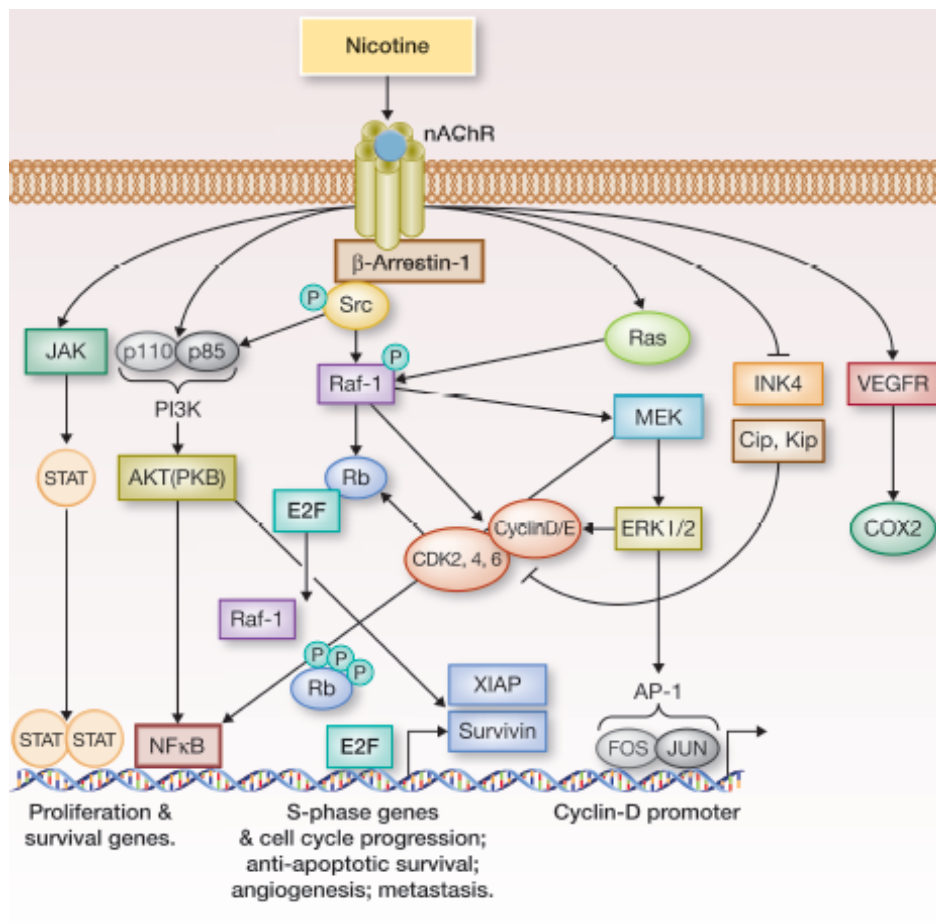
Lee et al., 2010 hanno trovato che un altro sottotipo largamente espresso in molte linee cellulari di tumore ai polmoni e al seno, è  $\alpha 9$  nAChRs e recenti studi hanno evidenziato che il silenziamento di tali recettori riduce la proliferazione cellulare *in vivo* e *in vitro*. L'analisi degli mRNAs espressi in linee cellulari bronchiali immortalizzate, ha identificato quattro diverse isoforme di  $\alpha 9$ , uno che codifica per la proteina completa e tre per proteine tronche. L'over-espressione dell'isoforma completa *in vivo* promuove la proliferazione cellulare e lo sviluppo tumorale indotto da NNK; al contrario, l'over-espressione degli mRNAs codificanti per le

proteine tronche, riduce la proliferazione cellulare e la trasformazione neoplastica, suggerendo un ruolo chiave dei sottotipi  $\alpha 9$ nAChRs nello sviluppo tumorale (Chernyavsky et al., 2015).

## 10. MECCANISMI MOLECOLARI ATTIVATI DA NICOTINA E NITROSAMINE

Recenti studi sono stati condotti per indagare l'effetto della nicotina, di NNK e NNN, le due principali nitrosamine, derivate dalla combustione del tabacco e contenute nel fumo di sigaretta. Queste nitrosamine sono agonisti rispettivamente per i recettori nicotinici  $\alpha 7$  e per i recettori eteromerici  $\alpha$ - $\beta$  ed è stato dimostrato che l'esposizione ad entrambe causa l'insorgenza di tumore ai polmoni in roditori (Hecht, 1999). L'affinità di NNK per i  $\alpha 7$ nAChRs è più alta rispetto a quella della nicotina ( $EC_{50}$  NNK: 30 nM;  $EC_{50}$  nicotina: 40  $\mu$ M) così come quella di NNN per i recettori eteromerici ( $EC_{50}$  NNN: 0.83 nM;  $EC_{50}$  nicotina: 4.27  $\mu$ M) (Schuller and Orloff, 1998). Data la loro elevata affinità, NNN e NNK sono in grado di legare i nAChRs, spiazzando la nicotina; il legame di NNK con i recettori  $\alpha 7$ , determina l'ingresso di  $Ca^{2+}$  in cellula, con conseguente depolarizzazione della membrana e attivazione dei canali al  $Ca^{2+}$  voltaggio-dipendenti (Sheppard et al., 2000). Inoltre, è noto che l'esposizione cronica a nicotina e NNK *in vitro* determina una up-regolazione dei  $\alpha 7$ nAChRs (Plummer et al., 2000) e risultati analoghi sono stati ottenuti *in vivo* in modelli animali di tumore al polmone, dove la nicotina è in grado di aumentare la massa tumorale e di promuovere metastasi (Heeschen et al., 2001). Risultati analoghi sono stati ottenuti recentemente anche nel tumore al pancreas (Trevino et al., 2012; Momi et al., 2013).

Numerosi studi sono stati condotti per mettere in luce i meccanismi molecolari coinvolti nell'effetto della nicotina e delle nitrosamine sull'aumento della proliferazione cellulare; tali studi hanno rivelato l'attivazione da parte dei nAChRs di molteplici vie di segnalazione intracellulari.



Rappresentazione schematica della cascata attivata dai nAChRs nel tumore al polmone in seguito al legame con nicotina o agonisti (Schaal and Chellappan, 2014)

### 10.1. ATTIVAZIONE DELLA VIA ERK/MAPK

In molti tipi cellulari, i nAChRs attivano le vie di segnalazione attivate della protein chinasi attivate da mitogeni (MAPK), note per essere coinvolte nella regolazione della proliferazione cellulare. Il legame con l'agonista, determina l'attivazione di Ras, che promuove la fosforilazione di Raf-1. Raf-1 induce la fosforilazione della chinasi MAPK/ERK (MEK), che a sua volta attiva la protein chinasi ERK (Heidecker et al., 1992).

Numerosi studi sono stati condotti per indagare gli effetti del trattamento con nicotina e nitrosamine su questa via intracellulare. L'esposizione di SCLC a nicotina determina l'attivazione della cascata delle MAPK in maniera dose-dipendente ( $ED_{50}=10$  nM) e il trattamento con l'antagonista mecamilamina blocca tale effetto (Cattaneo et al., 1997). Inoltre, è stato dimostrato che la nicotina determina soprattutto l'attivazione dell'isoforma ERK2 (Heush and Maneckjee, 1998). Nelle SCLC il trattamento con 100 pM NNK determina un aumento della sintesi di DNA e della proliferazione, che è bloccato dal trattamento con l'antagonista  $\alpha$ -Bungarotossina (Jull et al., 2001). Queste evidenze supportano il

coinvolgimento dei  $\alpha 7$ nAChRs in cellule tumorali; le stesse vie sono attivate anche in cellule sane per regolare la normale proliferazione cellulare.

### **10.2. ATTIVAZIONE DELLE VIE DI Src E Rb-E2F**

Poichè i nAChRs non possiedono un'attività chinasi intrinseca, alcuni studi sono stati condotti per capire come i  $\alpha 7$ nAChRs fossero in grado di determinare l'attivazione della cascata delle MAPK. In particolare, Dasgupta et al., 2006 hanno dimostrato che, in seguito alla stimolazione con nicotina e nitrosamine, i  $\alpha 7$ nAChRs reclutano la proteina *scaffold*  $\beta$ -arrestina-1; tale reclutamento è necessario per la successiva attivazione della chinasi Src, che fosforila la-chinasi Raf-1 e ne permette il legame con il *tumor suppressor* Rb, proteina del retinoblastoma e noto regolatore della progressione del ciclo cellulare. Tale legame determina l'inattivazione di Rb da parte di chinasi associate alla ciclina D e E. Analisi mediante immunoprecipitazione e western blotting su tessuti di tumore a non piccole cellule (*non-small cell lung cancer*, NSCLC), hanno infatti evidenziato un maggiore numero di complessi Raf-1/Rb rispetto ai tessuti sani adiacenti, suggerendo che questa via sia coinvolta nella genesi di tali tumori (Kinkade et al., 2008; Johnson et al., 2012).

In una cellula quiescente Rb è iperfosforilato, associato con il promotore insieme al fattore trascrizionale E2F, che viene represso. Nelle cellule tumorali NSCLC, Rb è inattivato e si dissocia dal promotore, E2F rimane attivo e avvia la trascrizione dei geni di fase S e la progressione del ciclo cellulare (Schaal and Chellappan, 2014).

### **10.3. ATTIVAZIONE DELLA VIA DI JAK-STAT**

La stimolazione con nicotina determina anche attivazione della via di JAK/STAT, i cui geni target sono coinvolti in molti tipi di cancro. Nelle NSCLC, l'esposizione a concentrazioni elevate di nicotina e NNK aumenta i livelli di fosforilazione di STAT3, incrementando l'espressione del suo gene target IKBKE (Guo et al., 2013), i cui livelli sono alterati anche in altri tipi di cancro, incluso il tumore al seno (Eddy et al., 2005) e alla prostata (Adli et al., 2006). L'espressione ectopica di IKBKE in linee di NSCLC induce chemoresistenza, mentre il knockdown di IKBKE sensibilizza le cellule all'apoptosi e riduce la sopravvivenza cellulare indotta dalla nicotina e da STAT3 (Guo et al., 2013). In linee di cheratinociti, la stimolazione dei recettori  $\alpha 7$  con concentrazioni di 10  $\mu$ M di nicotina, attiva sia le vie Ras/Raf/MEK/ERK determinando un aumento dell'mRNA e della proteina STAT3, sia la contemporanea attivazione della tirosin chinasi JAK-2 che, fosforilando STAT3, favorisce la dimerizzazione, la traslocazione al nucleo e l'alterazione dell'espressione genica. Il trattamento con l'antagonista  $\alpha$ -Bungarotossina o il silenziamento dell'espressione di  $\alpha 7$  mediante un siRNA- $\alpha 7$ , previene l'attivazione sia delle vie Ras/Raf/MEK/ERK che di JAK- indotto dalla nicotina. Nello stesso studio gli autori dimostrano anche che in topi  $\alpha 7$ KO, la nicotina non è in grado di

indurre l'attivazione di STAT3 mediata da Ras, a sostegno del ruolo essenziale svolto dal sottotipo  $\alpha 7$  nell'attivazione di questa via intracellulare (Arredondo et al., 2006).

#### **10.4. UP-REGOLAZIONE DI MOLECOLE COINVOLTE NELLA REGOLAZIONE DEL CICLO CELLULARE**

Oltre ad attivare vari tipi di segnalazione intracellulari, è stato dimostrato che la nicotina e le nitrosamine hanno anche come target alcuni regolatori del ciclo cellulare. La ciclina D1 viene up-regolata in seguito al trattamento con nicotina in cellule epiteliali polmonari e, come già accennato precedentemente, tale up-regolazione avviene in concomitanza con l'aumento della fosforilazione di Rb e dell'attività trascrizionale di E2F, promuovendo il ciclo cellulare di queste cellule (Dasgupta et al., 2006).

#### **10.5. INIBIZIONE DI MOLECOLE INIBITORIE DEL CICLO CELLULARE**

La nicotina e gli altri componenti presenti nel tabacco, controllano il ciclo cellulare anche attraverso l'inibizione di regolatori della crescita cellulare, come gli inibitori delle protein chinasi dipendenti da cicline (cdk). Questi sono suddivisi in due classi, gli INK4 e i Cip/Kip inibitori, e sono entrambe capaci di arrestare il ciclo cellulare in fase G<sub>1</sub>, prevenendo la fosforilazione di Rb (Baldi et al., 2011). In alcune linee NSCLC, è stato dimostrato che la nicotina stimola l'attivazione del repressore trascrizionale ID1, responsabile dell'aumento della proliferazione cellulare attraverso l'inibizione di alcuni cdk inibitori (Norton, 2000).

#### **10.6. EFFETTI ANTI-APOPTOTICI INDOTTI DALLA NICOTINA**

Le componenti presenti nel tabacco conferiscono resistenza ai farmaci chemoterapici e alle radiazioni e molti studi hanno dimostrato che pazienti che fumano hanno una scarsa risposta a tali trattamenti e una prognosi peggiore rispetto ai soggetti non fumatori (Warren et al., 2012). In questo contesto, particolare attenzione è stata data allo studio degli effetti di sopravvivenza e anti-apoptotici indotti dai nAChRs. La via PI3K/AKT è quella più coinvolta nella crescita tumorale, regola la progressione del ciclo cellulare e la sopravvivenza. Il trattamento con nicotina e NNK induce un aumento di fosforilazione di AKT dose e tempo-dipendente in linee di cellule epiteliali bronchiali, in tessuti polmonari umani di soggetti fumatori e in SCLC e NSCLC. Questa risposta è bloccata dal trattamento con inibitori di PI3K e con l'antagonista DH $\beta$ E selettivo per  $\alpha 3/\alpha 4$  nAChRs ma non dal trattamento con l'antagonista  $\alpha 7$   $\alpha$ -Bungarotossina, indicando che AKT in queste linee è attivata tramite PI3K e  $\alpha 3/\alpha 4^*$  nAChRs (West et al., 2002). Da queste osservazioni, alcuni studi hanno proposto una correlazione tra nicotina e induzione di chemoresistenza; è stato osservato, infatti, che l'esposizione di NSCLC a nicotina 1  $\mu$ M conferisce resistenza all'apoptosi indotta da cisplatino e taxolo, attraverso un aumento dell'inibitore dell'apoptosi XIAP e di survivina (Dasgupta et al., 2006). In particolare, la fosforilazione di AKT previene l'ubiquitinazione e la

degradazione di XIAP (Dan et al., 2004). Inoltre, uno studio di Tsurutani et al., 2005, ha dimostrato che la capacità della nicotina di promuovere la sopravvivenza cellulare in SCLC e NSCLC è dipendente dalla capacità di attivare, attraverso AKT, NF- $\kappa$ B, che trasloca nel nucleo e lega il DNA.

Oltre a questi, la nicotina è in grado di attivare altre vie che promuovono resistenza all'apoptosi; tra questi, è stato dimostrato che la nicotina stimola l'aumento dei livelli di proteine anti-apoptotiche della famiglia di Bcl-2 e l'inattivazione delle proteine pro-apoptotiche Bax e Bad (Wen et al., 2011).

### **10.7. nAChRs NEI PROCESSI DI METASTASI E INVASIONE**

Numerose evidenze correlano i nAChRs anche all'aumento delle capacità invasive e migratorie delle cellule tumorali. Il processo di EMT (*epithelial-to-mesenchymal transition*) è una tappa fondamentale per lo sviluppo di metastasi e per la progressione del tumore. Questo processo prevede la progressiva perdita di molecole di adesione e conseguente aumento della motilità cellulare. È stato dimostrato che, in molte linee cellulari, la nicotina è in grado di inibire l'espressione della E-caderina, proteina di adesione delle cellule epiteliali che partecipa alla formazione delle giunzioni ancoranti, e della  $\beta$ -catenina, importante per la stabilità del citoscheletro. Inoltre è stato dimostrato che la nicotina promuove la trascrizione di geni mesenchimali, quali la fibronectina e la vimentina (Dasgupta et al., 2009).

In alcune linee di SCLC, la nicotina promuove la formazione di metastasi, attraverso l'up-regolazione di varie metalloproteinasi, quali MMP9, MMP14 e MMP15, proteine che degradano la matrice extracellulare attraverso la scissione del collagene di tipo IV e della lamina nella membrana basale, e quindi coinvolte nei processi d'invasione; questo meccanismo è regolato da E2F1, per il quale le metalloproteinasi hanno numerosi siti di legame (Johnson et al., 2012).

Infine, l'esposizione cronica a nicotina è in grado di conferire alle cellule tumorali di due linee di carcinoma, caratteristiche simili a quelle delle cellule staminali, promuovendo la trascrizione di alcuni marker di staminalità, quali Oct4, Nanog e CD44. La presenza all'interno della massa tumorale di queste cellule con proprietà staminali e quindi in grado di mantenersi e di differenziarsi in vari tipi cellulari, è un requisito fondamentale per la progressione tumorale (Yu et al., 2012).

### **10.8. nAChRs E ANGIOGENESI**

La formazione di nuovi vasi attraverso il processo di angiogenesi è un evento cruciale per sostenere lo sviluppo tumorale ed è regolato da un preciso equilibrio tra molecole pro- e anti-angiogeniche. Stimoli quali l'ipossia o la presenza di citochine infiammatorie, determinano l'espressione e il rilascio dei fattori angiogenici VEGF e FGF, che inducono le cellule

endoteliali della vascolatura esistente a proliferare e a migrare, promuovendo la formazione di nuovi vasi. È stato dimostrato che i nAChRs contribuiscono alla formazione di nuovi vasi attraverso il rilascio di VEGF e COX2 e facilitando la mobilità delle cellule endoteliali. Questo fenomeno è regolato dai  $\alpha 7$ nAChRs, poichè il trattamento con l'antagonista mecamilamina ne blocca l'effetto (Heeschen et al., 2002).

Tutti i meccanismi descritti evidenziano che i nAChRs sono coinvolti nell'aumento della proliferazione cellulare, della crescita tumorale e dell'invasività dei tumori attraverso la formazione di metastasi. Queste scoperte suggeriscono quindi che i nAChRs possano rappresentare un nuovo target terapeutico per vari tipi di tumore.

## **11. I GLIOMI**

I gliomi rappresentano i più comuni tumori al cervello. Originano dalla glia, il tessuto cerebrale che dà supporto alle cellule neuronali, fornendo ossigeno, nutrienti e supporto meccanico. Sono stati classificati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità in quattro gradi, sulla base dell'origine cellulare e delle caratteristiche istologiche. I gliomi di I e II grado sono tumori ben differenziati, sono maligni, ma nonostante questo hanno una prognosi migliore rispetto ai gliomi di III e IV grado. Il glioblastoma multiforme (GBM) è il più aggressivo tra i gliomi; è classificato come il IV grado dei gliomi ed è considerato il più comune (50%) e letale, poiché è caratterizzato da un'elevata capacità proliferativa, migratoria e invasiva (DeAngeli et al., 2001); esiste poi un'altra forma di glioma, il gliosarcoma (GSM), ancora più raro e aggressivo, che rappresenta il 3% dei gliomi di IV grado (Lutterbach et al., 2001).

### **11.1. SOTTOTIPI DI GLIOBLASTOMA**

Numerosi gruppi hanno cercato di determinare quali fossero i meccanismi molecolari alla base della tumorigenesi del GBM, identificando quattro principali forme di GBM: la classica, la proneurale, la neurale e la mesenchimale. La forma classica è caratterizzata da una perdita del cromosoma 10, da un'amplificazione del cromosoma 7, da alti livelli di mutazioni a carico di EGFR e da una perdita di funzione del *tumor suppressor* p53. La forma proneurale è caratterizzata da alterazione del recettore A per PDGF (*platelet-derived growth factor*) e da mutazioni puntiformi dell'enzima isocitrato deidrogenasi 1, codificato dal gene IDH1. La forma neurale è caratterizzata dall'espressione di numerosi marker neuronali, quali NEFL, GABRA1 e SYT1, mentre il sottotipo mesenchimale presenta mutazioni a carico di NF1, gene oncosoppressore che codifica per la neurofibromina 1, che regola negativamente l'attività di Ras (Verhaak et al., 2010). La presenza di questi sottotipi suggerisce un'elevata eterogeneità di questo tumore. Inoltre, negli ultimi trent'anni numerose indagini genetiche sono state condotte per identificare i principali target che, mutati, potessero determinare la formazione dei tumori cerebrali. Queste analisi hanno permesso di identificare tre vie

intracellulari, frequentemente alterate nei glioblastomi: l'attivazione della via del recettore della tirosin-chinasi/RAS/PI-3K e l'inattivazione dei *tumor suppressor* p53 e Rb (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008).

### **11.2. STRATEGIE TERAPEUTICHE ATTUALI**

Nonostante sia stato fatto un sostanziale progresso nella terapia di questi tumori, la prognosi rimane ancora infausta e i pazienti muoiono dopo 1-2 anni dalla diagnosi. I trattamenti ad oggi utilizzati consistono esclusivamente nella rimozione della massa tumorale e nell'utilizzo di radioterapia combinata alla chemioterapia. L'utilizzo della Temozolomide (TMZ) durante e dopo il trattamento con le radiazioni, e del Bevacizumab, un anticorpo monoclonale contro VEGF recentemente approvato nella terapia anti-angiogenica, ha migliorato la prognosi dei pazienti (Van Meir et al., 2010). Nonostante la rimozione della massa tumorale, alcune cellule possono infiltrarsi nei tessuti sani circostanti e originare un tumore secondario, ancora più aggressivo del precedente.

La ricomparsa del tumore ha suggerito la presenza di cellule tumorali staminali (GSCs: *glioblastoma stem cells*), che risiedono in specifiche nicchie all'interno della massa tumorale. Come tutte le cellule staminali, le GSCs sono in grado di mantenere il pool indifferenziato, ma sono anche capaci di differenziarsi e di ripopolare la massa tumorale, contribuendo alla crescita del tumore, alla vascolarizzazione e all'insorgenza di resistenza alla radioterapia (Bao et al., 2006; Cheng et al., 2013). Queste cellule, se impiantate in topi immunocompromessi, sono capaci di determinare l'insorgenza di un nuovo tumore, con caratteristiche simili al glioblastoma (Morokoff et al., 2015). All'interno del glioblastoma è possibile identificare due classi di GSCs: le cellule staminali di tipo I hanno caratteristiche simili alle cellule staminali neurali fetali, esprimono marker come CD133, una glicoproteina transmembrana i cui livelli sono elevati nelle CSC (*cancer stem cells*), e CD15, una molecola di adesione coinvolta in chemiotassi e fagocitosi, e crescono a sfere. Le cellule staminali di tipo II presentano caratteristiche più simili alle cellule staminali neurali adulte, non esprimono il marker CD133, ma sono positive per CD44, una glicoproteina trans-membrana coinvolta nell'adesione intercellulare e over-espressa in vari tessuti tumorali. Inoltre, le cellule staminali di tipo II sono più invasive rispetto a quelle di classe I e crescono in condizioni di semi-aderenza (Lottaz et al., 2010, Joo et al., 2008; Beier et al., 2007). Poiché le GSCs sono responsabili della propagazione tumorale, numerosi studi sono ora indirizzati allo sviluppo di strategie terapeutiche che abbiano queste cellule come principale target.

Un'altra caratteristica del GBM è la presenza all'interno della massa tumorale di macrofagi (TAMs: *tumour-associated macrophages*). Questi macrofagi perdono la loro attività fagocitica (Hao et al., 2002) e promuovono la progressione tumorale, favorendo il rilascio di citochine quali IL-6 e IL-10 che promuovono la proliferazione cellulare (Samaras et al., 2007) e la



formazione di nuovi vasi (Hirano et al., 2001; Kanamori et al., 2006). Inoltre, sono in grado di interferire con le funzioni anti-tumorali delle altre cellule immunitarie, inibendone l'attività (Morford et al., 1999). Lo studio dei meccanismi cellulari e molecolari attraverso cui i TAMs sono reclutati alla massa tumorale ed esercitano la loro attività pro-tumorale, può facilitare lo sviluppo di nuove terapie. Alcuni studi hanno evidenziato l'arricchimento di TAMs nelle nicchie in cui risiedono le GSCs, in aree localizzate vicino ai vasi sanguigni (Calabrese et al., 2007; Lathia et al., 2011). Uno studio recente ha ipotizzato l'esistenza di proteine secrete dalle GSCs in grado di attrarre TAMs nella massa tumorale. Una possibile candidata in questo processo è periostin, una proteina di adesione appartenente alla famiglia delle Fascicine, coinvolta in molteplici aspetti della tumorigenesi e nella via AKT/PI3K. Questa proteina è up-regolata nel tumore al seno, dove partecipa al mantenimento del *pool* di cellule staminali tumorali e svolge un ruolo chiave nel processo di metastatizzazione. Gli autori di questo lavoro hanno dimostrato che il silenziamento di periostin riduce il reclutamento di TAMs, inibisce la crescita tumorale e aumenta la sopravvivenza di modelli animali di GBM (Zhou et al., 2014).

### **11.3. GLIOMI E RECETTORI NICOTINICI**

Studi recenti hanno dimostrato che sottotipi diversi di nAChRs sono espressi anche in cellule della glia, quali astrociti e oligodendrociti, suggerendo un loro importante ruolo nel *signalling* di queste cellule (Shuller et al., 1995). Come abbiamo visto, è noto che il fumo di sigaretta rappresenta un fattore di rischio per numerosi tipi di tumore e che la nicotina agisce come *tumor promoter* per numerose forme di cancro. Gli effetti della nicotina sull'eziologia dei gliomi è ancora in fase di studio e oggetto di dibattito; quello che è noto è che i soggetti fumatori rappresentano una porzione predominante tra gli individui a cui viene diagnosticato questo tipo di tumore (Dasgupta et al., 2009; Heeschen et al., 2001).

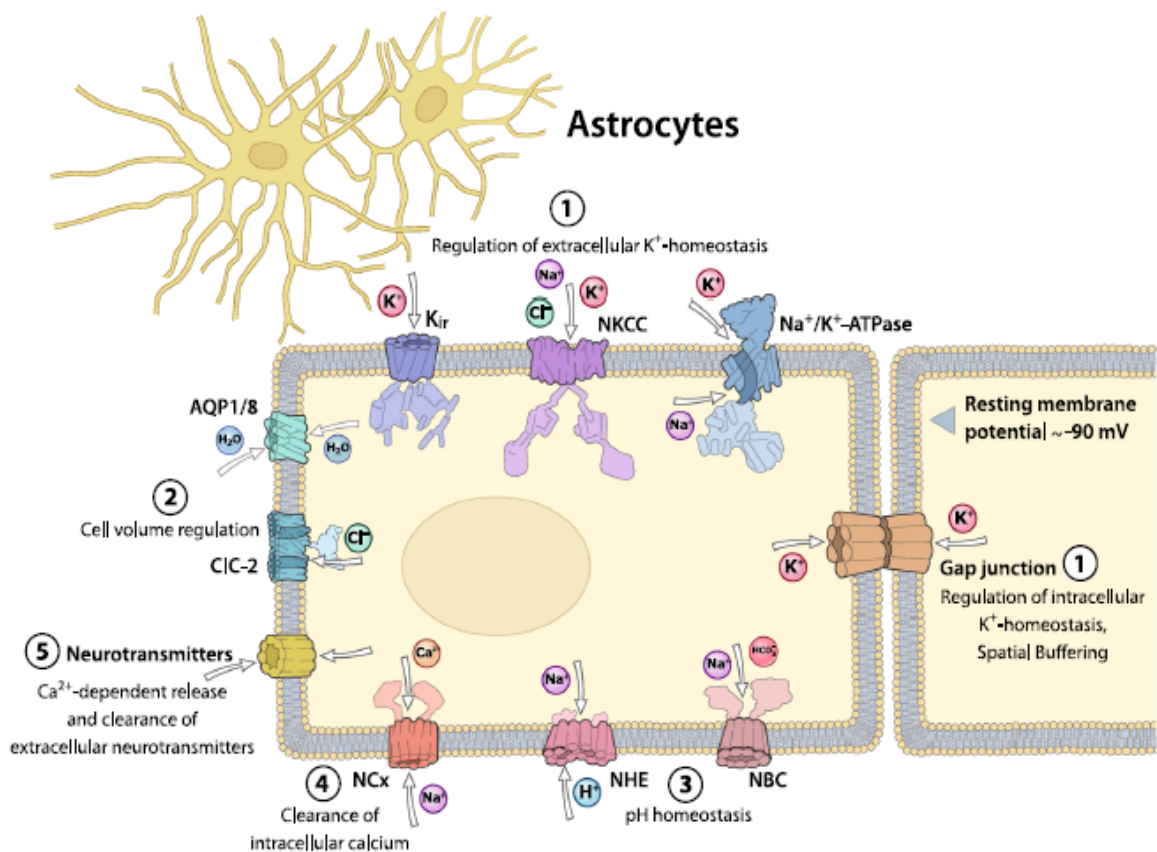
La nicotina è in grado di attivare ERK, un membro della via delle MAPK che svolge un ruolo chiave nella trasmissione intracellulare che regola proliferazione cellulare e migrazione; la fosforilazione di ERK e la sua attivazione sono regolate da recettori associati a G proteine attraverso la via di EGFR (*epidermal growth factor receptor*) (Kanada and Watanabe, 2007). Poiché l'esposizione di cellule di glioma a radiazioni ionizzanti è stata associata all'attivazione di EGFR e all'induzione di radioresistenza (Chung and Broaddus, 2005), uno studio di Khalil et al., 2013 ha ipotizzato che la nicotina fosse in grado di promuovere la proliferazione, la migrazione e la radioresistenza di cellule di glioma maligni. Gli autori di questo lavoro hanno infatti dimostrato che il trattamento cronico di 72 ore con nicotina (0.1-10  $\mu$ M) aumenta la proliferazione cellulare della linea stabile di glioma U87MG e di una linea di glioblastoma (GBM12), aumenta la motilità cellulare e la formazione di colonie. Il trattamento con l'inibitore di EGFR AE788 riduce l'effetto indotto dalla nicotina sia sulla

proliferazione cellulare che sulla migrazione, suggerendo che l'attivazione della via di EGFR è essenziale per la proliferazione di queste cellule tumorali. Inoltre, gli stessi autori dimostrano che la nicotina agisce su questa via attivando la fosforilazione di AKT e ERK dopo 24 ore di trattamento, che risultano essere resistenti al trattamento con radiazioni ionizzanti.

#### 11.4. IL RUOLO DEI CANALI IONICI NEI TUMORI CEREBRALI

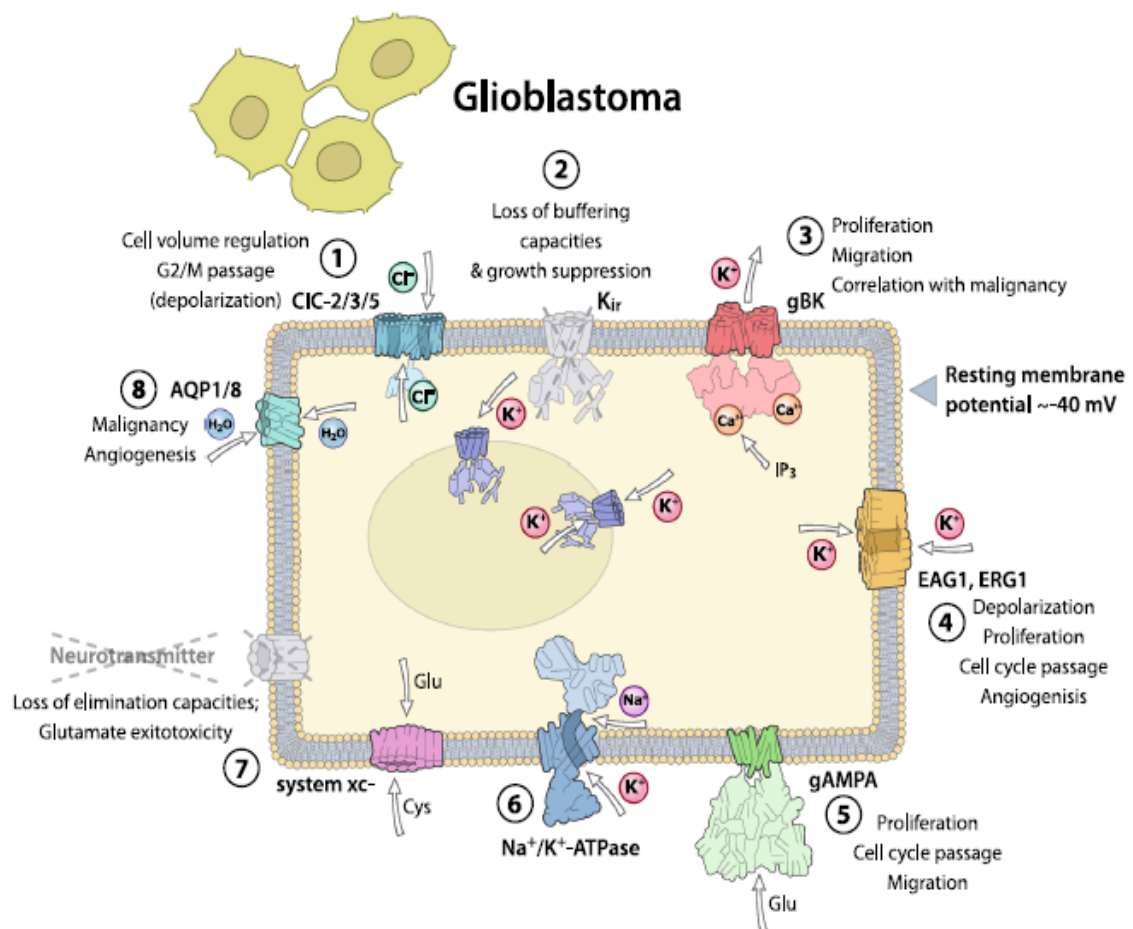
Negli ultimi anni, è emersa l'importanza dei canali ionici nella patofisiologia dei tumori e l'evidenza che, per la loro facilmente accessibile struttura, potrebbero anche rappresentare un target terapeutico nella lotta contro i tumori. I canali ionici, infatti, sono coinvolti nella proliferazione cellulare (Becchetti, 2011), nella migrazione cellulare e nei processi di invasione (Soroceanu et al., 1999).

Gli astrociti esprimono molteplici canali ionici tra cui i canali al  $\text{Cl}^-$  voltaggio-dipendenti, i canali del  $\text{Na}^+$ , del  $\text{Ca}^{2+}$  e del  $\text{K}^+$  (Bordey and Sontheimer, 1999).



Rappresentazione dei canali ionici e delle loro funzioni in astrociti normali (Simon et al., 2015)

Una delle principali funzioni fisiologiche degli astrociti è il mantenimento del  $K^+$  extracellulare a livelli essenziali tali da permettere le normali funzioni neuronali; per mediare a questa rapida distribuzione di  $K^+$ , gli astrociti sono in grado di formare connessioni cellulari attraverso giunzioni aderenti. Sono stati descritti diversi tipi di canali per il  $K^+$ , tra cui i  $K_{IR}$ , canali del potassio rettificanti anomali che permangono aperti in condizioni di iperpolarizzazione della membrana e si chiudono quando questa depolarizza, i  $K_{DR}$ , attivati dalla depolarizzazione della membrana, e i  $K_A$ , canali al potassio con un'inattivazione molto rapida. In particolare, i  $K_{IR}$  sono quelli più abbondantemente espressi e i principali responsabili dell'omeostasi del  $K^+$ , insieme ai co-trasportatori  $Na^+/K^+/Cl^-$  e alla  $Na^+/K^+$ -ATPasi che vengono attivati in caso di elevata concentrazione extracellulare di  $K^+$  (Hajek et al., 1996). Inoltre queste cellule sono essenziali per il mantenimento dell'omeostasi del SNC, attraverso il controllo del pH (scambiatori sodio/protoni e sodio/bicarbonato), dei fluidi intracellulari (mantenimento dell'omeostasi dell'acqua mediato dalle acquaporine) e della rimozione dei neurotrasmettitori dallo spazio extracellulare (Halassa et al., 2009). Nelle cellule di glioblastoma si verificano una serie di cambiamenti a carico di tutti i canali ionici.



**Rappresentazione dei canali ionici e delle loro alterazioni nelle cellule di glioblastoma**  
(Simon et al., 2015).

#### **11.4.1. ALTERAZIONI DEI CANALI DEL Cl<sup>-</sup>**

Nelle cellule tumorali di glioblastoma si trovano differenti canali per il Cl<sup>-</sup> rispetto alle cellule sane; in particolare, CIC-2, CIC-3 e CIC-5 sono altamente espressi nelle cellule tumorali rispetto agli astrociti, dove in membrana è espresso soltanto CIC-2 (Olsen et al., 2003). L'alterata espressione di questi canali determina la regolazione del volume cellulare che facilita la migrazione cellulare. L'inibizione dei CIC mediante cloro tossina, tetraetilammonio e tamoxifen inibisce la migrazione delle cellule tumorali in maniera dose-dipendente (Soroceanu et al., 1999; Lui et al., 2010). L'overespressione di questi canali determina depolarizzazione della cellula di glioblastoma e la progressione del ciclo cellulare (Olsen et al., 2003).

#### **11.4.2. ALTERAZIONI DEI CANALI DEL K<sup>+</sup>**

Le cellule tumorali presentano un diverso potenziale di membrana a riposo (-40 mV) rispetto agli astrociti sani (-90 mV). Inizialmente era stato ipotizzato che questo fosse dovuto a una ridotta espressione dei canali K<sub>IR</sub>, ma è stato invece dimostrato che, mentre gli astrociti e le cellule gliali sane esprimono i canali K<sub>IR</sub> sulla membrana plasmatica, le cellule di glioma presentano una ridistribuzione di questi canali nel nucleo, che altera la normale funzionalità e l'omeostasi del K<sup>+</sup> (Olsen and Sontheimer, 2004). L'espressione dei canali K<sub>IR</sub> è correlata alla corretta differenziazione delle cellule gliali e alla divisione mitotica cellulare e alterazioni della corretta localizzazione di questi canali determina la crescita incontrollata di queste cellule (MacFarlane and Sontheimer, 2000). Inoltre, i canali K<sup>+</sup> attivati dal Ca<sup>+</sup> (*BK channels*) sono over-espressi rispetto alle cellule sane (Ransom and Sontheimer, 2001), determinando un'aumentata risposta a normali stimoli quali fattori di crescita (Ransom et al., 2002). È stata inoltre clonata e caratterizzata una variante dei BK espressa nei gliomi (gBK), i cui livelli di espressione risultano correlati al grado del tumore (Liu et al., 2002) e che determina cambiamenti nel volume cellulare, contribuendo ad un aumento della migrazione cellulare (Wondergem and Bartley, 2009). I canali voltaggio-dipendenti EAG1 e hERG1 sono up-regolati nelle cellule di glioblastoma e facilitano la depolarizzazione, la progressione del ciclo cellulare e la proliferazione. Inoltre, il canale hERG1 è correlato alla neoangiogenesi mediata da VEGF (Patt et al., 2004; Masi et al., 2005).

#### **11.4.3. ALTERAZIONI DEI CANALI DEL Ca<sup>2+</sup>**

Il calcio svolge un importante ruolo come secondo messaggero in molti tipi cellulari. I segnali extracellulari sono trasmessi da differenti recettori (associati a G proteine o ad attività protein chinasi) che determinano l'attivazione della fosfolipasi C e il rilascio di Ca<sup>2+</sup> dal RE. L'ingresso di Ca<sup>2+</sup> è mediato anche da differenti canali sulla membrana plasmatica (AMPA, NMDA e canali del Ca<sup>2+</sup> voltaggio-dipendenti). In particolare, nelle cellule di glioblastoma sono stati identificati forme aberranti di recettori AMPA (gAMPA) che promuovono l'ingresso di

Ca<sup>2+</sup>, facilitando la proliferazione, la progressione del ciclo cellulare e la migrazione (Ishiuchi et al., 2007).

#### **11.4.4. ALTERAZIONI DEI CANALI DEL Na<sup>+</sup>**

Alterazioni ai canali del sodio sono correlate ad una minore sopravvivenza dei pazienti affetti da glioblastoma (Joshi et al., 2011). Anche lo scambiatore Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasi è over-espresso nei glioblastomi (Palani et al., 2008) mentre il regolatore dello scambiatore sodio/protoni NHERF1 è più espresso e il suo *knockdown* altera le capacità migratorie e invasive delle cellule tumorali e resistenza al trattamento con TMZ (Kislin et al., 2009).

#### **11.5. RUOLO DEL GLUTAMMATO**

Il glutammato è un amminoacido non essenziale e un importante neurotrasmettitore eccitatorio, che regola apprendimento, memoria e comportamento. Elevati livelli di glutammato portano ad un'elevata attivazione dei suoi recettori e a morte neuronale in molti disturbi neurodegenerativi, nell'epilessia, nell'ipossia e nell'infarto (Peng et al., 2011). Il glutammato esercita le sue funzioni attraverso recettori metabotropici (mGluRs) e ionotropici (iGluRs), entrambi coinvolti in un ampio spettro di patologie neurodegenerative, ma anche in *signalling* oncogenici; proprio il potenziale ruolo di questi recettori nello sviluppo e nella progressione neoplastica, li rende possibili *target* terapeutici per molti tipi di tumore.

Il glutammato regola la proliferazione, la migrazione e la sopravvivenza dei progenitori neuronali e dei neuroni immaturi durante il normale sviluppo cerebrale (Ikonomidou et al., 1999), ma rappresenta anche un potenziale fattore di crescita nello sviluppo tumorale; cellule gliali tumorali infatti, producono un'elevata quantità di glutammato (Takano et al., 2001) e il glutammato stesso stimola la proliferazione delle cellule di glioma *in vivo* (Ye and Sontheimer, 1999). Inoltre, elevate concentrazioni di glutammato (circa 100 µM) sono state rilevate nello spazio extracellulare, ai margini della massa di glioblastoma (deGroot and Sontheimer, 2011): la conseguente morte neuronale facilita a sua volta la crescita tumorale (Rothstein and Brem, 2001) e possibili crisi epilettiche nei pazienti affetti da glioma (Oberndorfer et al., 2002).

Recenti studi hanno evidenziato che gli elevati livelli di glutammato derivano da un'alterata capacità delle cellule di glioma nel rilascio e nell'*uptake* del neurotrasmettitore attraverso lo scambiatore citosina-glutammato Na<sup>+</sup>-indipendente (Lyons et al., 2007). Le cellule gliali tumorali quindi, pur mantenendo la loro capacità di rilasciare glutammato, sono incapaci di recuperarlo e questo processo porta all'aumento della crescita tumorale e della capacità invasiva, attraverso la distruzione del tessuto neuronale sano adiacente (Ye et al., 1999; Ye and Sontheimer 1999).

Per quanto riguarda i recettori ionotropici NMDA, la subunità NR1, la cui presenza nel canale è fondamentale per determinare la formazione di un dimero funzionale, non è espressa nelle

linee di glioma, indicando quindi l'assenza di recettori funzionali NMDA in questi tumori (Stepulak et al., 2009).

I recettori ionotropici AMPA invece, sono abbondantemente espressi nei gliomi e contribuiscono a determinare il grado di malignità (deGroot and Sontheimer, 2011). Gli AMPA sono complessi eteromerici costituiti da quattro subunità differenti (GluR1, GluR2, GluR3, GluR4), la cui diversa combinazione determina una diversa conduttanza del canale per il  $Ca^{2+}$ ; in particolare, la presenza della subunità GluR2 nel complesso determina una minore permeabilità al  $Ca^{2+}$ , la sua down-regolazione determina un aumento della proliferazione cellulare e la sua over-espressione nella linea di glioma U87MG promuove il blocco della crescita tumorale attraverso l'inattivazione della via di ERK1/2-Src e l'induzione di apoptosi (Beretta et al., 2009). E' stato dimostrato che bloccando i recettori AMPA si ha una riduzione della migrazione e un aumento dell'apoptosi in linee cellulari di glioblastoma (Ishiyuchi et al., 2002) e che il *knockdown* di GluR1 inibisce la crescita tumorale (deGroot et al., 2008).

Infine, è stato recentemente dimostrato che l'inibizione del recettore metabotropico mGluR1 nella linea di glioma U87MG mediante siRNA o specifici antagonisti, causa la riduzione della vitalità cellulare. Questo effetto è accompagnato dall'attivazione caspasi-dipendente dell'apoptosi cellulare, dal blocco del ciclo cellulare in fase G0/G1 e dalla riduzione dell'invasione e della migrazione cellulare. Questi effetti sono determinati dalla riduzione della fosforilazione di PI3K, di AKT e di mTOR, indicando il coinvolgimento di questa via intracellulare (Zhang et al., 2015). Da questi studi possiamo concludere che il glutammato svolge importanti ruoli nello sviluppo e nella progressione tumorale, agendo come fattore di crescita e che l'utilizzo di agonisti e antagonisti dei recettori del glutammato possono rappresentare una nuova strategia terapeutica in gliomi e glioblastomi.

## **12. STRESS OSSIDATIVO E CARCINOGENESI**

Lo stress ossidativo è fortemente correlato con la sopravvivenza cellulare. La produzione di elevate concentrazioni di ROS (*reactive oxygen species*) determina un forte stress ossidativo all'interno della cellula e causa ossidazione dei lipidi intracellulari, delle proteine e del DNA, portando all'accumulo di molecole biologiche danneggiate, alterazioni della proliferazione cellulare, dei contatti cellula-cellula e determinando instabilità genomica e morte cellulare per apoptosi. Nelle cellule tumorali, in particolar modo nelle cellule staminali tumorali, le elevate concentrazioni di ROS sono bilanciate da efficienti meccanismi anti-ossidativi, quali la presenza della superossido dismutasi, della catalasi e della glutazione perossidasi: la presenza di elevati livelli di queste proteine anti-ROS è cruciale per la fase iniziale dello

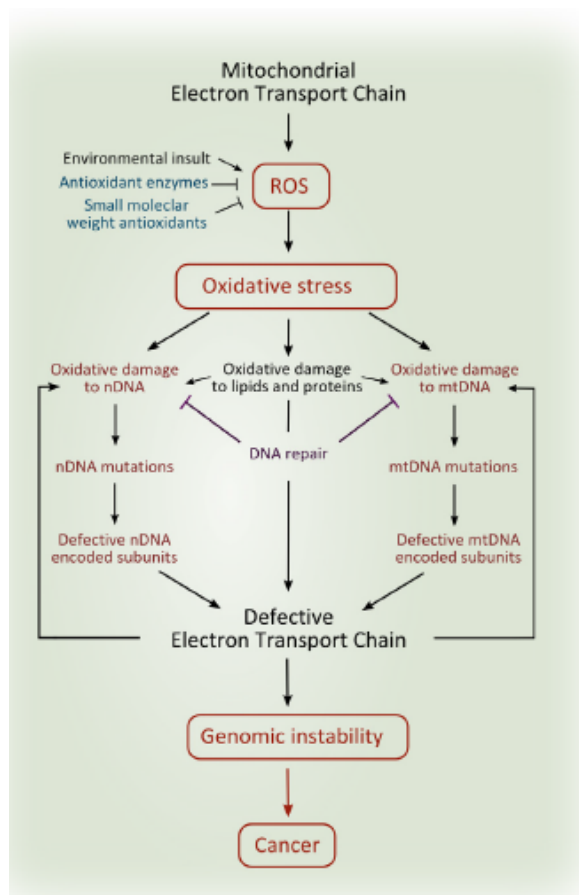
sviluppo tumorale, per la propagazione del tumore e per l'insorgenza di radioresistenza (Pennington et al., 2005; Shi et al., 2012; Wellen and Thompson, 2010).

All'interno della cellula sono presenti numerose fonti di produzione di ROS.

### 12.1. I MITOCONDRI

I mitocondri sono la principale fonte di ROS all'interno della cellula; generano ATP attraverso il flusso di elettroni nella catena respiratoria, che culmina nel complesso IV con la riduzione di O<sub>2</sub> in acqua. Attraverso questo processo si può formare anche l'anione superossido: la sua reattività con lipidi, proteine e acidi nucleici è piuttosto bassa, ma può interagire con acqua ossigenata e favorire la produzione del radicale idrossile OH, estremamente reattivo.

Sono state identificate differenze morfologiche tra cellule sane e tumorali a carico dei mitocondri; le cellule tumorali presentano un minor numero di mitocondri ma una più elevata concentrazione di ROS. Lo stress ossidativo indotto dall'over-produzione di ROS, determina l'accumulo di mutazioni sia nel nDNA che nel DNA mitocondriale (mtDNA). Se non correttamente riparato, il danno al DNA determina instabilità genomica e un'ulteriore disfunzione mitocondriale (Larman et al., 2012; Yu, 2011; Vives-Bauza et al., 2006).



Rappresentazione schematica degli effetti della produzione di specie reattive dell'ossigeno e del loro coinvolgimento nella cancerogenesi (Tokarz and Blasiak, 2014)

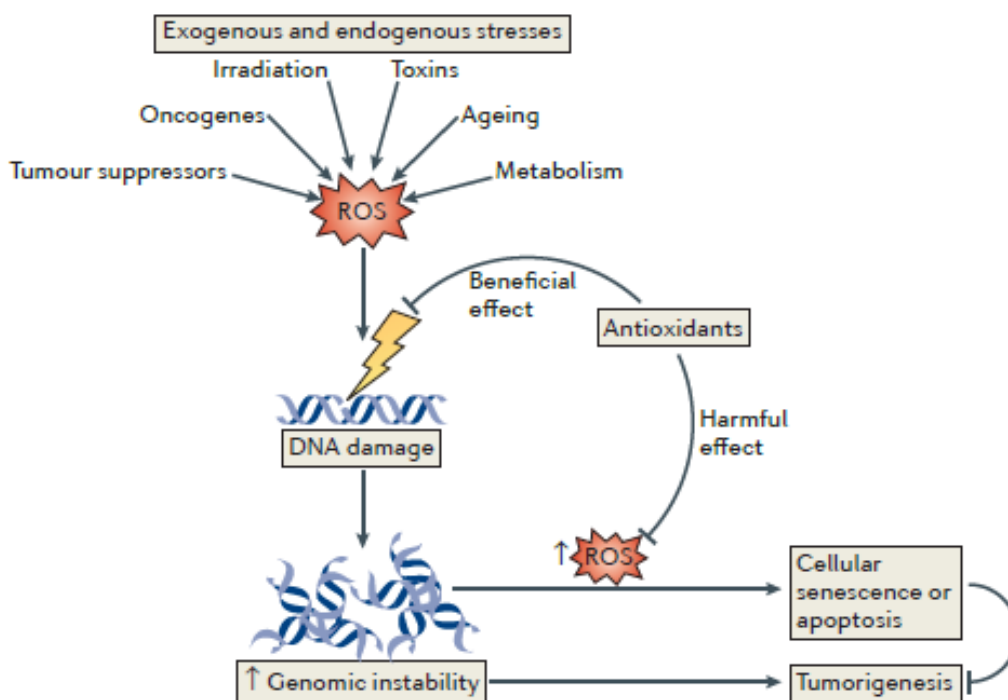
## 12.2. NADPH OSSIDASI E ALTRI ENZIMI

Questa famiglia di enzimi, conosciuta ora come enzimi NOX, è stata trovata per la prima volta nei neutrofili. I neutrofili sono cellule con attività fagocitica, attivate dai mediatori dell'infiammazione, che eliminano batteri e microrganismi patogeni attraverso un'elevata produzione di ROS (Hampton et al., 1998). Contengono un complesso proteico che trasferisce elettroni dal NADPH citosolico all'ossigeno molecolare, producendo anione superossido. La porzione catalitica di questo complesso è rappresentata da NOX2. Pazienti con mutazioni a carico di NOX2 sono caratterizzati da ricorrenti infezioni batteriche. È ora noto che nell'uomo sono presenti sette isoforme di NOX che producono elevate quantità di ROS (Aguirre and Lambeth, 2010).

Un'ampia varietà di enzimi, oltre agli enzimi NOX, e altri organelli oltre ai mitocondri, come i perossisomi e il RE, sono in grado di produrre ROS all'interno della cellula e potrebbero essere anch'essi coinvolti nel processo tumorale. Tra gli enzimi intracellulari che partecipano alla produzione di ROS, particolare importanza è assunta dalle lipossigenasi, dalle xantine, dalle ciclossigenasi e dal citocromo P450.

## 12.3. TERAPIE ANTI-OSSIDANTI E TUMORI

Il ruolo dei ROS nei tumori è molto complesso e il trattamento con anti-ossidanti può risultare da una parte protettivo, dall'altra estremamente dannoso.



Potenziali effetti benefici e dannosi degli anti-ossidanti nella tumori genesi Intuitivamente, (Holmstrom and Finkel, 2014)



potrebbe essere facile pensare che il trattamento con anti-ossidanti, attraverso la riduzione di ROS, possa proteggere le cellule dai danni al DNA indotti dallo stress ossidativo, ridurre l'instabilità genomica e quindi l'incidenza di tumori. Un ampio numero di trial epidemiologici ha dimostrato però che le terapie anti-ossidanti possono in alcuni casi non avere effetti, in altri incrementare il rischio di tumore.

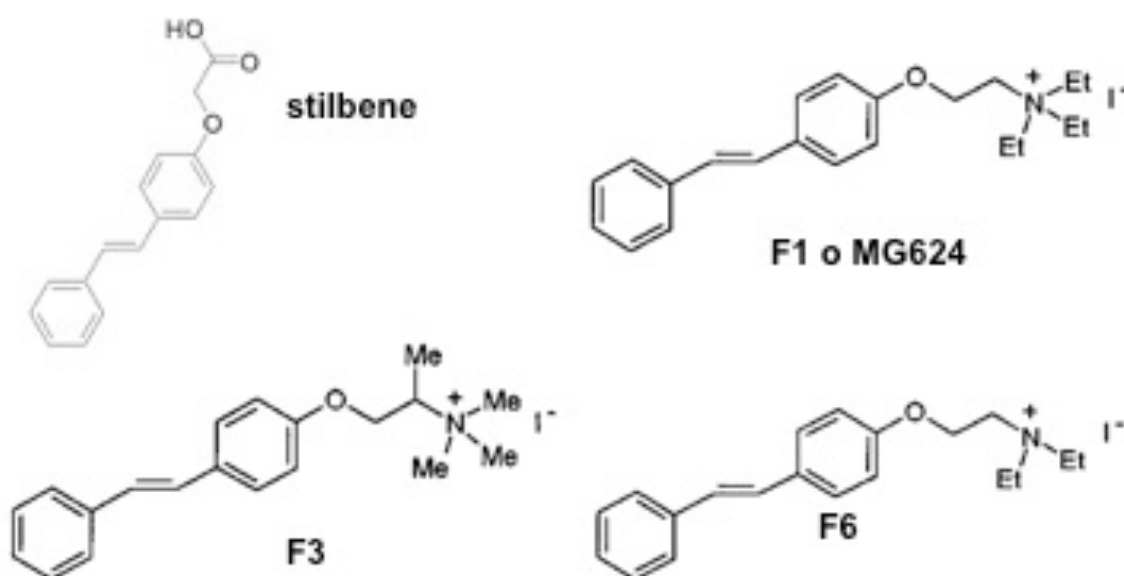
Un recente studio ha dimostrato che le GSCs hanno un metabolismo mitocondriale più elevato rispetto alle cellule sane adiacenti, ma un efficiente meccanismo anti-ossidante bilancia l'elevata produzione di ROS (Vlasi et al., 2011). Queste proteine anti-ossidanti potrebbero rappresentare un target terapeutico per molti tipi di tumore. Uno studio recente ha evidenziato l'over-espressione nei glioblastomi di una proteina anti-ossidante PRDX4, i cui livelli di mRNA risultano 5 volte superiori rispetto al normale tessuto cerebrale (Kim et al., 2014). PRDX4 elimina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tavender and Bulleid, 2010) e la sua inibizione mediante shRNA nelle cellule di glioblastoma determina un aumento dei livelli di ROS e morte cellulare per apoptosi *in vitro* e *in vivo* (Kim et al., 2014). PRDX4 è overespresso non solo nel glioblastoma, ma in molti tipi di tumore, quali il tumore alla prostata, ai polmoni e al seno e la sua inibizione determina una ridotta capacità invasiva delle cellule tumorali (Karihtala et al., 2011; Park et al., 2008; Wei et al., 2011). Recenti studi hanno dimostrato che alcuni composti naturali sono in grado di uccidere le cellule tumorali nel glioblastoma sia *in vitro* sia in modelli animali, targettando le proteine anti-ossidanti e aumentando i livelli intracellulari di ROS, mimando il silenziamento di PDX4 (Badr et al., 2013; Bezerra et al., 2008).

Recenti evidenze suggeriscono che il resveratrolo, potente antiossidante, ha effetti benefici in molti tipi di tumore (Boocock et al., 2007; Almeida et al., 2009). Questo composto naturale, presente nell'uva, nel vino rosso e in un'ampia gamma di cibi, ha una bassa tossicità e può essere somministrato anche in dosi elevate all'uomo. I suoi effetti benefici sono dovuti al fatto che agisce come anti-ossidante e antimutageno, media effetti anti-infiammatori e inibisce le ciclossigenasi (che partecipano alla produzione di ROS). Inoltre è stato dimostrato che il trattamento con resveratrolo aumenta la sensibilità delle cellule tumorali di glioblastoma, ma anche di altre forme tumorali, a vari agenti chemioterapici come la vincristina e la doxorubicina (Gupta et al., 2011; Harikumar et al., 2010). Infine, è noto che il resveratrolo potenzia gli effetti antitumorale della TMZ *in vitro* e *in vivo* in modelli animali; in particolare, inibisce la crescita cellulare, arresta il ciclo cellulare in fase G2/M, inibisce la migrazione cellulare e aumenta la morte cellulare per apoptosi, attraverso l'attivazione di AMPK, che inibisce a sua volta il via di mTOR, regolatore della sopravvivenza cellulare, determinando così il blocco della crescita cellulare e della tumorigenesi (Yuan et al., 2012).

### 13. GLI STILBENI

Le evidenze che i recettori nicotinici giocano un ruolo importante in numerose funzioni fisiologiche dell'organismo, ma anche in alcune patologie, hanno spinto i ricercatori alla ricerca di nuovi farmaci in grado di legarsi selettivamente ai diversi sottotipi nicotinici, da utilizzare come possibili nuove terapie per l'uomo.

Gli stilbeni sono composti naturali prodotti da diverse famiglie di piante; sono composti fenolici a basso peso molecolare e largamente presenti in natura. Nella ricerca di composti selettivi per i recettori nicotinici, nel nostro laboratorio sono stati caratterizzati tre farmaci MG624 (F1), F3 e F6, derivanti dallo stilbene, a cui sono state apportate modifiche per determinare l'affinità verso i recettori nicotinici. Il composto F1 è un'ammina quaternaria, con tre gruppi etili a livello della testa di ammonio; F3 è anch'esso un'ammina quaternaria, che presenta a differenza di F1, tre gruppi metili a livello della testa di ammonio, e quindi un minore ingombro sterico; F6 è un derivato di F1, al quale è stato rimosso un gruppo etilico a livello della testa di ammonio, così da ottenere un'ammina terziaria, più liposolubile.



Struttura dei composti MG624, F3, F6 e stilbene

Esperimenti di binding alle membrane hanno dimostrato che i tre composti presentano affinità nanomolare verso i nAChRs sensibili all' $\alpha$ -Bungarotossina, in particolare modo per i  $\alpha 7$ \*nAChRs, e affinità micromolare per i recettori eteromerici  $\beta 2$ \* o  $\beta 4$ \* (Gotti et al., 1998, Gotti et al., 2000).

Studi di elettrofisiologia hanno permesso di definire meglio la selettività di questi composti. I composti F1 e F3 sono in grado di inibire, in modo dose-dipendente, la corrente evocata dall'ACh in ovociti esprimanti recettori  $\alpha 7$  omomerici di pollo, indicando quindi che entrambi i

composti sono degli antagonisti competitivi dei  $\alpha 7$ \*nAChRs. Esperimenti di binding su tessuti, esperimenti recettori contenenti il sottotipo  $\alpha 7$ , provenienti da specie diverse, sono stati condotti per verificare la specie-specificità di questi composti. I risultati mostrano che, pur mantenendo la loro attività verso il sottotipo  $\alpha 7$ , l'affinità verso questo sottotipo varia a secondo della specie. Per esempio, F1 ha una maggiore affinità per i recettori di pollo, mentre F3 ha un'affinità superiore per i recettori di mammiferi (Gotti et al., 1998, Gotti et al., 2000).

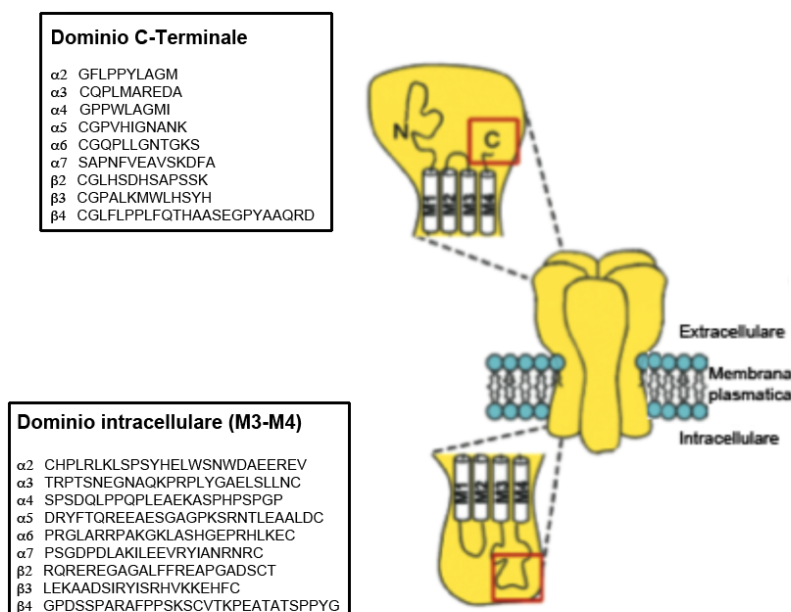
Questi composti, grazie al loro effetto selettivo su  $\alpha 7$ nAChRs, possano essere considerati potenziale farmaci da utilizzare non solo *in vitro*, ma anche *in vivo*. E' noto che il composto MG624 ha attività ganglioplegica nel SNP e agisce anche sul SNC (Mantegazza e Tommasini, 1955); inoltre è in grado di ridurre i tremori indotti dalla nicotina in coniglio e blocca la corrente indotta dall'acetilcolina attraverso i  $\alpha 7$ \*nAChRs di pollo espressi in ovociti (Gotti et al 2008; Maggi et al., 1999). Recenti studi hanno evidenziato anche l'effetto anti-proliferativo e l'attività anti-angiogenica di questo composto in due modelli animali di SCLC. L'effetto anti-angiogenico di MG624 è mediato dall'inibizione del rilascio da parte della nicotina del fattore angiogenico FGF2, fattore che promuove l'accelerazione del processo di formazione di nuovi vasi (Brown et al., 2012). Dati preliminari ottenuti nel nostro laboratorio, mostrano che questo composto è in grado di ridurre la migrazione in una linea di SCLC. MG624 non mostra effetti collaterali tossici, non altera il consumo di cibo o di acqua in roditori e potrebbe rappresentare una nuova molecola utile per il trattamento di tumori solidi *in vivo*.

# MATERIALI E METODI

## 1. PRODUZIONE ANTICORPI POLICLONALI SUBUNITÀ SPECIFICI

### 1.1. SINTESI PEPTIDI

Gli Abs policlonali sono stati prodotti contro i peptidi ottenuti dalle sequenze delle subunità nicotiniche clonate di roditori ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ). Le sequenze scelte come epitopo rappresentano la zona di minore omologia con le altre subunità, individuate comparando al computer le varie sequenze così da evitare fenomeni di cross-reattività. Per sintetizzare i diversi peptidi è stato utilizzato il sintetizzatore di peptidi Applied Biosystem modello 431, secondo la metodica di Merrifield (Vailati et al, 1999). Il materiale ottenuto è poi stato purificato con una cromatografia a scambio ionico seguita da una cromatografia liquida in fase inversa semi-preparativa. Sono stati sintetizzati sia un peptide localizzato nel dominio citoplasmatico posto tra le regioni M3 e M4, che uno localizzato all'estremità carbossilica extracellulare. Per 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) cicloesan-1-carbossilato. Per lo screening dell'antisiero il peptide è stato coniugato via cisteina, all'albumina sierica di coniglio. Il peptide non coniugato viene separato mediante cromatografia in gel permeazione su colonna Sephacryl H-100 (Pharmacia).



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

## **1.2. IMMUNIZZAZIONE E PRELIEVO**

Gli anticorpi policlonali sono stati ottenuti immunizzando conigli maschi (peso 2.8-3.2Kg) con il peptide designato. Prima dell'immunizzazione a ciascun coniglio è stato effettuato un prelievo per ottenere il siero preimmune. Per le prime due immunizzazioni eseguite a tempo 0 (T0) e dopo 15 giorni, i peptidi purificati legati all'ovoalbumina vengono diluiti in 500ml acqua (concentrazione finale 0,5 mg/ml) ed emulsionati con un volume equivalente di adiuvante completo di Freund. La terza immunizzazione viene fatta dopo 30 giorni (T30) e da questo momento si procede con un richiamo trimestrale. Per l'immunizzazione a 30 giorni e per quelle successive, il peptide viene emulsionato con adiuvante incompleto (Sigma). Le emulsioni vengono iniettate sottocute con la formazione di sei centri di reazione. Dopo 15 giorni dal T30 e ogni due settimane successive, viene effettuato un prelievo dalla vena marginale dell'orecchio del coniglio. Il sangue prelevato (circa 50 ml) viene incubato per un'ora a 37°C e poi centrifugato a 4°C a 2000 rpm per 45 minuti. Il siero ottenuto viene recuperato ed ulteriormente centrifugato con la stessa modalità. Il siero chiarificato, ottenuto dopo la seconda centrifugata viene raccolto in una provetta da 50 ml e congelato.

## **1.3. PURIFICAZIONE ANTICORPI**

Gli Abs prodotti sono stati purificati dal siero attraverso cromatografia d'affinità, utilizzando resine di Sefarosio 4B CNBr-attivate (GE Healthcare) coniugate al peptide libero (1 mg di peptide/1 ml di resina). Il siero viene incubato con la resina (in rapporto 5:1) per 2h a temperatura ambiente in agitazione su ruota. La resina viene poi lavata con PBS (0,14M NaCl; 2,6mM KCl; 8,1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e gli anticorpi legati vengono eluiti con glicina 0,2M pH 2,2 in frazioni da circa 1 ml e tamponati con TRIS 1M. La concentrazione di Abs nelle frazioni viene determinata attraverso lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 280nm.

## **1.4. DETERMINAZIONE DELLA SPECIFICITÀ DEGLI ANTICORPI PRODOTTI**

La validità dei nostri studi dipende dalla specificità degli Abs prodotti, che viene accuratamente e costantemente verificata. A tale scopo vengono condotti esperimenti di immunoprecipitazione su recettori estratti o purificati da diverse aree del SNC. I valori vengono espressi come percentuale di immunoprecipitazione (indice della frazione di recettori precipitati dall'Ab utilizzato, considerando come 100% la quantità di recettori presenti nell'estratto prima dell'immunoprecipitazione) oppure come femtomoli di recettore legante la <sup>3</sup>H-Epipatidina immunoprecipitate dall'anticorpo per mg di proteine presenti.

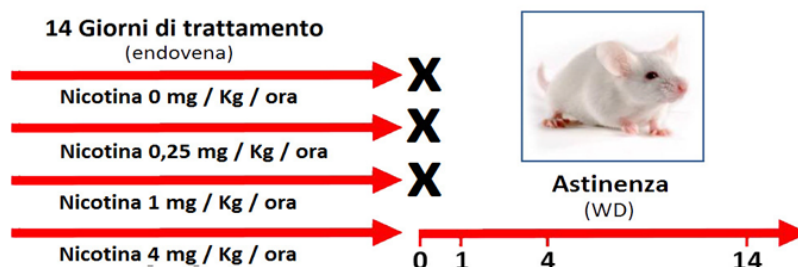
La determinazione della percentuale di immunoprecipitazione ha permesso di confrontare la capacità immunoprecipitante dei diversi Abs e quantificarla in valori compresi tra l'80-90%. La specificità è stata controllata confrontando le fmo di recettore immunoprecipitato

dall'anticorpo diretto verso una determinata subunità in tessuti WT o KO per quella specifica subunità. La specificità degli anticorpi è stata ulteriormente verificata attraverso esperimenti di western blotting condotti alternativamente su estratti ottenuti da tessuti neuronali di topi KO, Het o WT.

## 2. SOMMINISTRAZIONE CRONICA DI NICOTINA PER VIA ENDOVENOSA

I modelli animali usati in questo progetto di ricerca sono topi maschi di 4-6 mesi C57BL/6J. Gli esperimenti sono stati condotti seguendo protocolli conformi alle direttive europee e nazionali in materia di sperimentazione animale. Questi topi sono stati stabulati in un ambiente mantenuto a 22°C in cui la luce era presente dalle 7 del mattino fino alle 7 di sera e l'accesso al cibo e all'acqua era libero.

I tessuti cerebrali oggetto degli esperimenti di questo progetto di dottorato sono stati forniti dal laboratorio del Dr. Michael Marks (Institute for Behavioral Genetics, University of Colorado, Boulder, Colorado, USA). I topi anestetizzati per via intraperitoneale (Pentobarbital 55mg/Kg; Idrato di Cloralio 110mk/Kg) hanno subito un intervento in cui è stata fatta una piccola incisione in modo da rendere visibile la vena giugulare destra, in cui è stata inserita una cannula di silastic riempita di soluzione salina sterile + 0,3% Acido citrico (anticoagulante). I topi vengono lasciati recuperare dall'intervento chirurgico e successivamente trasferiti in una camera individuale d'infusione (lunghezza 15cm, larghezza 15cm, altezza 25cm). Nella camera d'infusione la cannula viene attaccata ad una pompa ad infusione (Harvard Infusion Pump), mediante la quale viene infusa per due giorni una soluzione salina sterile ad un tasso di 35ml/ora. Dopo due giorni i topi sono stati divisi in quattro gruppi di trattamento che hanno ricevuto diverse dosi di nicotina: 0 (controllo), 0,25 mg/kg/ora, 1 mg/kg/ora e 4 mg/kg/ora. Dopo 14 giorni di trattamento con nicotina o salina, i topi sono stati anestetizzati e sacrificati rispettivamente dopo due ore (tempo 0), tempo necessario per consentire la quasi completa metabolizzazione della nicotina, dopo uno, quattro e quattordici giorni dalla fine del trattamento.



Protocollo sperimentale per il trattamento cronico con nicotina di topi  $\alpha 4$  o  $\beta 2$  WT, Het e KO.

### **3. PREPARAZIONE DEI TESSUTI NEURONALI**

#### **3.1. PREPARAZIONE DI OMOGENATI ED ESTRATTI**

I topi sono stati anestetizzati e sacrificati mediante dislocazione cervicale e il cervello rapidamente rimosso. I tessuti neuronali (cervelli interi o singole aree dissezionate) vengono pesati, lavati per centrifugazione in tampone B (Na~P pH7,4, 1M NaCl, 50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM EDTA, 2mM EGTA), successivamente omogenizzati con Ultraturrax e centrifugati per 1h a 15000 rpm. Il pellet ottenuto viene quindi risospeso nello stesso tampone in presenza di inibitori delle proteasi (bestatina, pepstatina e leupeptina) alla concentrazione di 10 µg/ml. L'estrazione del recettore avviene successivamente mediante aggiunta di TRITON X-100 alla concentrazione finale del 2%. Le membrane vengono lasciate ad estrarre in agitazione per 2h a 4°C e poi centrifugate a 15000 rpm per 1h30'. Il surnatante (frazione solubilizzata) viene recuperato e congelato a -20°C.

#### **3.2. PURIFICAZIONE DELLA FRAZIONE SINAPTOSOMALE**

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

### **4. BINDING DELLA <sup>3</sup>H EPIBATIDINA**

L'epibatidina è un alcaloide estratto dalla pelle di una rana dell'Ecuador, la *Epipedobates tricolor*. Tale sostanza, isolata per la prima volta da John Daly al NIH, presenta proprietà analgesiche duecento volte superiori a quelle della morfina mediate però non dai recettori µ-oppioidi, ma dai recettori nicotinici eteromerici ed omomerici del SNC, con affinità (Kd) diverse a seconda del sottotipo. Studi precedenti condotti dal nostro laboratorio hanno determinato che l'<sup>3</sup>H-Epibatidina (Perkin Elmer Life Sciences; attività specifica 56-66 Ci/mmol) oltre a legare con alta affinità i recettori contenenti le subunità β2 e β4 è in grado di legare i recettori contenenti la subunità α7 con affinità variabile. Per evitare che i sottotipi contenenti le subunità α7 contribuissero al legame della <sup>3</sup>H-Epibatidina, tutti gli esperimenti di binding e di immunoprecipitazione sono stati condotti in presenza di 2 µM α-Bgtx.

#### **4.1. BINDING ALLE MEMBRANE**

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

#### **4.2. BINDING AI RECETTORI SOLUBILIZZATI**

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



## **5. BINDING DELLA <sup>125</sup>I- αBUNGAROTOSSINA**

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

## **6. IMMUNOPRECIPITAZIONE DEGLI ESTRATTI**

### **6.1. LEGAME DELLA PROTEINA A AGLI ANTICORPI PURIFICATI**

La proteina A viene lasciata idratare tutta notte in una provetta da 15 ml con il PBS, la mattina successiva viene lavata con PBS e viene aggiunto l'anticorpo (2mg/500ml di proteinaA). Il legame dell'anticorpo alla proteina A avviene in agitazione su ruota per un'ora a RT. Dopo l'incubazione le provette vengono centrifugate e il surnatante letto allo spettrofotometro per verificare il legame dell'anticorpo alla proteina A. La proteina A viene quindi lavata con sodio borato (0,2M; pH9), si aggiunge il composto cross-linkante DimetilPimelimidato (20mM) (DMP, Thermo scientific) e si lascia incubare su ruota per 30' a RT. La proteina con legato l'Ab viene quindi recuperata e lavata con etanolamina (0,2M; pH 8 ) per 1h, rilavata con PBS e infine conservata in PBS + NaN<sub>3</sub> (0.05%).

### **6.2. IMMUNOPRECIPITAZIONE DEGLI ESTRATTI**

Le concentrazioni di <sup>3</sup>H-Epi e di <sup>125</sup>I-αBgtx utilizzate per marcare l'estratto sono state calcolate precedentemente attraverso curve di saturazione e di binding. Gli estratti preparati marcati con <sup>3</sup>H-Epi 1 nM vengono incubati per tutta la notte con 20 μl di proteina A-Ab (2mg Ab/500ml proteina A) in agitazione su ruota in camera fredda. La mattina successiva i campioni vengono centrifugati e viene eliminato il surnatante. Si procede con due lavaggi con il tampone di lavaggio + 0.1%Triton X-100. Alle resine con immunoimmobilizzati i recettori marcati con <sup>3</sup>H-Epi vengono poi aggiunti 200 μl di NaOH 1N. I campioni eluiti vengono trasferiti in vials, e la radioattività emessa rilevata al β-counter dopo l'aggiunta di 10ml di scintillante.

Per quantificare il recettore contenente la subunità α7, gli estratti vengono marcati con <sup>125</sup>I-αBgtx 2-4 nM e incubati per una notte con la proteina A con legati gli anticorpi anti-α7. Il giorno successivo le resine vengono lavate due volte mediante centrifugazione e successivamente contate direttamente nel gamma counter. Il binding dell'immunoprecipitato

è espresso come fmol di recettori marcati con  $^3\text{H-Epi}$  o  $^{125}\text{I-}\alpha\text{BgTx}$  precipitati per mg di proteine o come percentuale di immunoprecipitazione.

## **7. DOSAGGIO PROTEICO**

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

## **8. SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING**

Basandosi sul dosaggio proteico precedentemente descritto vengono preparati campioni contenenti una quantità costante di proteine totali. Volumi costanti dei diversi campioni vengono caricati su un gel di acrilamide (9%) e separati elettroforeticamente (100 Volt costanti). Le proteine vengono quindi trasferite su una membrana di nitrocellulosa (100 Volt costanti per 1h30'). I blot ottenuti vengono incubati O/N in TBS (20mM TRIS, 150mM HCl, pH 7,5) 4% latte per bloccare il legame aspecifico degli anticorpi e successivamente incubati con anticorpi subunità specifici diluiti alla appropriata concentrazione per 2 ore a RT (anti-AKT BD Transduction Laboratories; anti-pAKT Life Technologies; anti-ERK e anti-pERK Cell Signaling; gli altri Abs utilizzati sono autoprodotti come precedentemente descritto). Dopo ripetuti lavaggi, le membrane vengono incubate con gli Abs secondari opportuni per 1h a RT (anti-rabbit Ly-Cor IRDye800RD; anti-mouse Ly-Cor IRDye680RD). Il segnale emesso viene rilevato da uno scanner ad infrarosso (Odyssey CLx - Infrared Imaging System).

## **9. LINEE CELLULARI E CONDIZIONI DI COLTURA**

Per effettuare gli esperimenti sono state utilizzate diverse linee cellulari: le U87MG, linea cellulare umana adesa di glioblastoma, derivante da un glioma maligno di tipo III, con morfologia epiteliale; quattro tipi di colture primarie umane di glioblastoma gentilmente offerte dal Dott. Daga (Ospedale S. Martino, Genova), derivanti da pazienti con differente stadio di tumore; linee controllo quali le T98G (linea cellulare umana adesa di glioblastoma), HepG2 (linea di epatociti umani) e SHSY5Y (derivanti da una linea di neuroblastoma umano).

La linea cellulare U87MG è mantenuta in terreno di crescita DMEM (Gibco, Invitrogen), addizionato con 10% FBS (Gibco, Invitrogen), 1% L-glutamina (Euroclone) e 1% di penicillina e streptomina (Euroclone).

Le colture primarie umane sono mantenute in un terreno di crescita costituito da DMEM-F12/Neurobasal (1:2; Gibco, Invitrogen) con aggiunta di B27 Supplement (1:100, Invitrogen), FGF-2 (10 ng/ml; Cell Signaling) e EGF (20 ng/ml; Cell Signaling), 1% L-glutamina (Euroclone) e 1% di penicillina e streptomina (Euroclone). Sono cellule che crescono in sospensione e per poter effettuare gli esperimenti sono state fatte crescere in adesione mediante il coating delle flask (60 minuti a 37°C) con Matrigel BD (Corning) preparato 1:200 in DMEM.

Le cellule sono tenute in incubatori secondo le condizioni di coltura standard a 37°C, in atmosfera umidificata e con una pressione parziale di CO<sub>2</sub> del 5%.

Prima dell' utilizzo, le linee cellulari sono state sottoposte al test per il micoplasma a cui sono risultate negative.

## **10. REAL-TIME PCR**

Questa parte del lavoro è stata svolta in collaborazione con la Dott.ssa R. Benfante (Istituto di Neuroscienze, CNR, Milano). L'estrazione dell'RNA totale dalle cellule in coltura è stato effettuato utilizzando il kit QUIAGEN Rneasy Mini. Le cellule in coltura ( $\approx 10^7$  cellule), sono state lavate con PBS, staccate e raccolte per essere centrifugate. Successivamente sono state omogeneizzate tramite l'aggiunta di un volume appropriato di tampone di lisi e sono state passate su colonnina QIAshredder (Quiagen). All' omogenato ottenuto è stato poi aggiunto 70% etanolo ed è stato caricato su colonna RNeasy Mini (Quiagen). Per eliminare l'eventuale contaminazione da DNA, è stato effettuato un trattamento con DNasi I sull'RNA legato alla matrice della colonna. L'RNA eluito è stato retrotrascritto a cDNA. Il cDNA ottenuto a partire dall' mRNA estratto dalle cellule, è stato utilizzato per effettuare una Real-Time PCR al fine di determinare l' espressione di ciascuna subunità dei recettori nicotinici nelle linee cellulari d' interesse.

Mediante questa tecnica quantitativa e in presenza di uno specifico primer TaqMan® è stata determinata l' espressione delle diverse subunità dei nAChRs. Il programma, eseguito con il termociclatore ABI PRISM 700 (Applied Biosystem), si è basato sui 40 cicli consecutivi.

Per analizzare i dati è stato utilizzato il metodo del Ciclo Soglia (Ct) e per valutare correttamente l'espressione di un determinato messaggero, il suo Ct è stato normalizzato su quello della Gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), essendo questo un noto gene *housekeeping*.

## **11. DETERMINAZIONE DELLA VITALITA' CELLULARE**

### **11.1. MTS ASSAY**

Il saggio CellTiter 96<sup>®</sup>AQ<sub>ueous</sub> One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) è un metodo colorimetrico basato sull'utilizzo del [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethophenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2h-tetrazolium, MTS], che misura, come indice di vitalità cellulare, la capacità riduttiva degli enzimi deidrogenasi, in grado di catalizzare la riduzione, da parte delle cellule metabolicamente attive, dell' MTS a formazan solubile. Al termine dei trattamenti, i terreni addizionati o meno di farmaci sono stati aspirati e ciascun pozzetto, contenente una concentrazione costante di cellule, è stato lavato con 500 µl di PBS. Successivamente sono stati aggiunti 250 µl di terreno completo fresco e 50 µl di MTS in ciascun pozzetto. Le piastre sono state incubate dalle 2 alle 4 ore. L'assorbanza è letta ad uno spettrofotometro per piastre alla lunghezza d'onda di 490nm. Tale misura è indice della quantità di formazan prodotto a partire dalla forma ossidata di MTS; quest'ultimo viene quindi ridotto dalle cellule attraverso i loro enzimi riducenti (NAD-deidrogenasi dipendenti), generando una forma che assorbe a 490nm. Questo metodo permette di determinare la vitalità cellulare in maniera rapida, non invasiva, senza impiego di agenti radioattivi e utilizzando le proprietà stesse delle cellule relative al loro metabolismo fisiologico.

I farmaci nicotinici F1, F3, F6 e stilbene sintetizzati dal Prof. M. Pallavicini (Università degli Studi di Milano) sono stati sciolti in DMSO e filtrati per garantirne la sterilità. Le concentrazioni dei farmaci utilizzati sono state ottenute mediante diluizioni successive e il saggio dell' MTS è stato effettuato dopo 24 ore di trattamento.

### **11.2. CONTA CELLULARE**

Le cellule sono state seminate in numero costante a seconda della linea. Al termine delle ore di trattamento sono state lavate con PBS, staccate, risospese in 500 µl di terreno e contate mediante camera di Burker (4 quadranti per ciascun pozzetto). La nicotina viene sciolta nello stesso terreno delle cellule in esame, viene controllato il pH e il terreno viene filtrato. Gli antagonisti nicotinici metillicaconitina (MLA,) mecamilamina e  $\alpha$ -Bungarotossina ( $\alpha$ Bgtx) sono sciolti in H<sub>2</sub>O alle concentrazioni indicate e aggiunti alle cellule in coltura 30 minuti prima dell' aggiunta di nicotina. La conta cellulare è effettuata dopo 72 ore di trattamento.

## **12. DOSAGGIO DEI RADICALI DELL'OSSIGENO**

La capacità dei farmaci nicotinici di indurre la formazione di ROS nelle colture di cellule tumorali, è stata misurata attraverso la trasformazione della H<sub>2</sub>-diclorofluorosceina-diacetato (DCF-DA, Sigma Aldrich), molecola non fluorescente che, in seguito al clivaggio di un gruppo acetato da parte di esterasi intracellulari o dall' ossidazione, viene convertita in 2',7'-

diclorofluoresceina (DCF), molecola altamente fluorescente, che può essere agevolmente misurata come picco di fluorescenza dell'analisi citofluorimetrica, indicando la presenza di ROS. La sonda viene aggiunta alle cellule, dopo le 24 ore di trattamento con il farmaco in esame, in concentrazione 10  $\mu$ M. Le cellule vengono incubate 30' a 37°C e 5% di CO<sub>2</sub>. Al termine dell'incubazione, la sonda viene rimossa, vengono effettuati due lavaggi con PBS e la fluorescenza viene misurata a 550 nM al Wallac. I risultati vengono poi normalizzati sulle proteine.

### **13. ANALISI DATI**

I dati ottenuti dallo scanner ad infrarosso sono stati analizzati mediante il software iStudio in dotazione allo strumento. Per l'analisi statistica dei dati di WB è stato utilizzato il test Kruskal-Wallis seguito da post-hoc Dunn's multiple comparison utilizzando il software GraphPad PRISM.

Le Ki dei farmaci sono state calcolate con il programma LIGAND.

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

La significatività dei dati è espressa con il valore:

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

## **RISULTATI**

### **EFFETTI DEL TRATTAMENTO CRONICO CON NICOTINA SULL'ESPRESSIONE DEI nAChRs NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE**

Questo parte di progetto ha lo scopo di descrivere e di identificare quali siano gli effetti del trattamento cronico e dell'astinenza da nicotina sull'espressione delle subunità nicotiniche nel sistema nervoso centrale, con particolare attenzione al sottotipo  $\alpha 4\beta 2$  e a due aree specifiche del cervello dei roditori, talamo e corteccia.

#### **1. CARATTERIZZAZIONE DEGLI ANTICORPI**

Per verificare la specificità degli anticorpi prodotti in coniglio e diretti contro le diverse subunità nicotiniche, abbiamo condotto esperimenti di western blotting e di immunoprecipitazione su tessuti di corteccia cerebrale di topi WT, Het e KO per le subunità  $\alpha 4$  o  $\beta 2$  trattati con salina o con 4 mg/kg/ora di nicotina. I risultati mostrano che tali anticorpi riconoscono in modo altamente specifico le subunità  $\alpha 4$  e  $\beta 2$  nei topi WT e Het, ma non riconoscono nessuna banda nei topi KO (Fig.1, pannello A).

Abbiamo inoltre valutato la linearità degli anticorpi purificati attraverso esperimenti di western blotting, condotti su quantità crescenti di estratti ottenuti da corteccia cerebrale di topi WT per la subunità  $\beta 2$ , trattati con salina o con 4 mg/kg/ora di nicotina. I blot rappresentativi e i relativi grafici confermano l'esistenza di una relazione lineare tra la quantità di estratto caricata, espressa in  $\mu\text{g}$  di proteine, e le unità arbitrarie di fluorescenza rivelate mediante incubazione con l'anticorpo secondario fluorescente per entrambe le subunità analizzate (Fig. 1, pannello B).

#### **2. EFFETTI INDOTTI DAL TRATTAMENTO CRONICO CON DOSI CRESCENTI DI NICOTINA SULL'ESPRESSIONE DEI DIVERSI SOTTOTIPI NICOTINICI**

La prima fase dello studio è stata la caratterizzazione, mediante esperimenti di binding, western blotting e immunoprecipitazione, degli animali WT, Het e KO per le subunità  $\alpha 4$  e  $\beta 2$ , in condizioni basali e dopo trattamento con dosi crescenti di nicotina. In questa parte del lavoro le analisi sono state condotte su cervelli *in toto*.

##### **2.1 CARATTERIZZAZIONE MEDIANTE ESPERIMENTI DI BINDING**

Gli esperimenti di binding (Fig. 2) mostrano che, in condizioni basali, la delezione anche di una sola delle due subunità, è sufficiente per la perdita della metà dei siti di legame per la  $^3\text{H}$ -Epibatidina: si ha, infatti, una riduzione dei siti di legame nei topi Het rispetto ai WT, sia nel genotipo  $\alpha 4$  (45%:  $\alpha 4\text{WT}$  e  $\alpha 4\text{Het}$  rispettivamente 92.6 e 49.9 fmol recettore/mg di proteine) che nel genotipo  $\beta 2$  (46%:  $\beta 2\text{WT}$  e  $\beta 2\text{Het}$  rispettivamente 90.2 e 49.3 fmol recettore/mg di proteine).

Un altro importante dato ottenuto dagli esperimenti di binding è che il trattamento cronico con nicotina determina un aumento dose-dipendente dei siti di legame per la  $^3\text{H}$ -Epibatidina nei cervelli dei topi WT (Fig. 2, pannello A) e Het (Fig. 2, pannello B) per entrambe le subunità. In particolare l'aumento è significativo nei topi  $\alpha 4$  e  $\beta 2$  WT in seguito al trattamento con 1 mg/kg/ora e 4 mg/kg/ora (rispettivamente circa 1.2 e 1.4 volte rispetto ai topi controllo non trattati). Nei topi  $\alpha 4$ Het l'aumento risulta significativo dopo trattamento con nicotina 4 mg/kg/ora (1.6 volte), mentre nei topi  $\beta 2$ Het sia dopo trattamento con nicotina 1 mg/kg/ora sia 4 mg/kg/ora (1.4 e 1.5 volte rispettivamente). I topi Het mostrano sempre livelli di espressione di recettori nicotinici di circa la metà rispetto agli animali WT, anche al termine dei diversi trattamenti.

Studi analoghi sono stati condotti anche su topi  $\alpha 4$  e  $\beta 2$  KO e i risultati mostrano una riduzione del 95% di siti di binding per la  $^3\text{H}$ -Epibatidina.

Per quanto riguarda i recettori omomerici  $\alpha 7$ , i dati di binding non mostrano differenze tra i genotipi nè effetti dovuti al trattamento cronico con dosi crescenti di nicotina.

## **2.2 CARATTERIZZAZIONE MEDIANTE WESTERN BLOTTING**

Successivamente, sugli stessi campioni analizzati per binding, abbiamo condotto esperimenti di western blotting. Abbiamo confrontato i valori di unità arbitrarie di fluorescenza delle subunità  $\alpha 4$  e  $\beta 2$  negli estratti di cervello di entrambi i genotipi di topi WT ed Het trattati con salina, per analizzare se vi fossero differenze di espressione basale delle due subunità correlate al diverso genotipo. I risultati ottenuti evidenziano che non ci sono differenze di espressione nei livelli basali delle due subunità nei topi WT. Al contrario, il livello basale di  $\alpha 4$  è più alto nei topi  $\beta 2$ Het, mentre i topi  $\alpha 4$ Het hanno un più alto livello di espressione di  $\beta 2$ . Tale differenza si mantiene anche dopo il trattamento cronico con 4 mg/kg/ora di nicotina. Inoltre il trattamento con dosi crescenti di nicotina determina un aumento dose-dipendente delle subunità  $\alpha 4$  e  $\beta 2$  sia nei topi WT (Fig. 3, pannello A) che nei topi Het (Fig. 3, pannello B), indicando che l'aumento dei siti di binding è associato all'aumento delle subunità stesse.

## **2.3 CARATTERIZZAZIONE MEDIANTE IMMUNOPRECIPITAZIONE**

Esperimenti di immunoprecipitazione, condotti sui medesimi campioni utilizzando anticorpi diretti contro le diverse subunità nicotiniche, confermano che il sottotipo  $\alpha 4\beta 2$  è quello maggiormente espresso nel SNC sia dei topi WT che dei topi Het per entrambe le subunità. L'espressione di tale sottotipo risulta essere quasi la metà negli animali  $\alpha 4$ Het e  $\beta 2$ Het rispetto ai topi WT e quasi del tutto assente nei topi KO, indicando che è il sottotipo maggiormente affetto dalla delezione di una delle due subunità (Fig. 4, pannello A).

In accordo con i dati di binding e di western blotting, il trattamento cronico con dosi crescenti di nicotina determina un aumento dose-dipendente dei recettori immunoprecipitati dagli

anticorpi anti- $\alpha 4$  e anti- $\beta 2$ , analogo nei topi WT e Het (Fig. 4, pannello A). Il trattamento induce anche un aumento nei livelli di recettori contenenti la subunità  $\alpha 3$  sia nei topi WT che Het, senza alterare a nessuna dose, i livelli della subunità  $\beta 4$  (Fig. 4, pannello C), suggerendo quindi che l'up-regolazione sia a carico del sottotipo recettoriale  $\alpha 3\beta 2$  piuttosto che  $\alpha 3\beta 4$ .

Infine, il trattamento cronico con nicotina non ha un effetto significativo sulle subunità  $\alpha 5$  (Fig. 4, pannello B),  $\alpha 6$  (Fig. 4, pannello E),  $\alpha 2$  (Fig. 4, pannello F), e  $\beta 3$  (Fig. 4, pannello G) nè sui recettori omomerici  $\alpha 7$ , in accordo con i dati di binding (Fig. 4, pannello D).

Complessivamente questi dati indicano che:

- la delezione anche di una sola delle due subunità negli animali Het è condizione sufficiente per la perdita della metà dei siti di legame per la  $^3\text{H}$ -Epibatidina e il trattamento cronico con nicotina induce un aumento dose-dipendente di tali siti;
- l'aumento dei siti di binding è associato all'aumento dose-dipendente delle subunità  $\alpha 4$  e  $\beta 2$  determinato dal trattamento con dosi crescenti di nicotina;
- il recettore  $\alpha 4\beta 2$  è quello più soggetto all'up-regolazione indotta da nicotina;
- il trattamento cronico con nicotina non ha effetto sui recettori contenenti le subunità  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 3$  e  $\beta 4$ ;
- la subunità  $\alpha 3$ , associata alla subunità  $\beta 2$  a formare il sottotipo  $\alpha 3\beta 2$ , è up-regolata in seguito al trattamento cronico con nicotina.

### **3. EFFETTI INDOTTI DAL TRATTAMENTO CRONICO E DALL'ASTINENZA DA NICOTINA SULL'UP-REGOLAZIONE E SULLA STECHIOMETRIA DEL RECETTORE $\alpha 4\beta 2$ NELLA CORTECCIA CEREBRALE E NEL TALAMO**

E' noto in letteratura che il sottotipo  $\alpha 4\beta 2$  esiste nel SNC in due diverse stechiometrie, con due o tre subunità  $\alpha$  all'interno del pentamero; le due conformazioni hanno diverse caratteristiche farmacologiche e proprietà funzionali e, in sistemi eterologhi, sono differentemente regolate dal trattamento cronico con nicotina. In particolare, è noto che il trattamento con nicotina favorisce *in vitro* la stechiometria  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ .

Scopo di questa parte del progetto è stato quello di analizzare gli effetti *in vivo* del trattamento cronico e dell'astinenza da nicotina sull'up-regolazione e sulla stechiometria del sottotipo recettoriale  $\alpha 4\beta 2$ . Ci siamo focalizzati su due aree che rispondono differentemente all'esposizione alla nicotina: la corteccia cerebrale, dove l'effetto della nicotina è più evidente, e il talamo.



### **3.1 ANALISI DEGLI EFFETTI DEL TRATTAMENTO E DELL'ASTINENZA DA NICOTINA SUI RECETTORI ETEROMERICI NELL'OMOGENATO TOTALE**

#### **3.1.1. CORTECCIA**

Abbiamo analizzato il numero dei siti di legame per la  $^3\text{H}$ -Epibatidina negli estratti ottenuti dagli omogenati totali di corteccia di topi trattati con salina o nicotina 4 mg/kg/ora e sacrificati due ore, 1 (WD1), 4 (WD4) e 14 (WD14) giorni dopo la fine del trattamento (Fig. 5). La nicotina aumenta significativamente il numero dei siti di legame per la  $^3\text{H}$ -Epibatidina nella corteccia (47%: salina 81.3; nicotina 119.5 fmol recettore/mg di proteine), che si mantiene ancora alto dopo 24 ore dalla fine del trattamento (42%: WD1 116.2 fmol recettore/mg di proteine) e ritorna ai livelli basali dopo 4 e 14 giorni dall'ultima infusione (WD4: 92.2; WD14: 85.9 fmol recettore/mg di proteine).

I dati di immunoprecipitazione mostrati in figura 6 evidenziano l'espressione in corteccia delle subunità  $\alpha 4$ ,  $\beta 2$  e  $\alpha 5$ , confermando che i sottotipi recettoriali  $\alpha 4\beta 2$  e  $\alpha 4\beta 2\alpha 5$  sono i più abbondantemente espressi in questa area del SNC. I livelli di espressione delle altre subunità risultano bassi. Il trattamento con nicotina aumenta l'espressione dei recettori  $\alpha 4^*$  e  $\beta 2^*$ , lasciando inalterati i livelli della subunità  $\alpha 5$ , suggerendo che solo il sottotipo recettoriale  $\alpha 4\beta 2$  sia up-regolato dalla nicotina.

L'aumento dell'espressione delle subunità  $\alpha 4$  e  $\beta 2$  correla con un aumento del numero di recettori assemblati e funzionali; infatti, l'immunoprecipitazione utilizzando anticorpi anti- $\alpha 4$ , determina la perdita del 95% dei siti di legame per la  $^3\text{H}$ -Epibatidina e la successiva analisi mediante western blotting dei surnatanti degli immunoprecipitati, evidenzia l'assenza della banda specifica per  $\beta 2$ , che rimane invece presente dopo l'immunoprecipitazione con le IgG di controllo (Fig. 7).

In accordo con i dati di binding e di immunoprecipitazione, anche i livelli di espressione delle subunità  $\alpha 4$  e  $\beta 2$  analizzati mediante western blotting, aumentano significativamente in seguito al trattamento con nicotina (Fig. 9, pannello A).

#### **3.1.2. TALAMO**

Il trattamento cronico con nicotina non ha effetti sul numero dei siti di legame per la  $^3\text{H}$ -Epibatidina negli estratti ottenuti dagli omogenati totali di talamo di topi trattati con salina o nicotina 4 mg/kg/ora e sacrificati due ore, 1, 4 e 14 giorni dopo la fine del trattamento (Fig. 5).

I dati di immunoprecipitazione mostrati in figura 8 evidenziano l'espressione in questa area delle subunità  $\alpha 4$ ,  $\beta 2$  e  $\alpha 5$ . Il trattamento cronico con nicotina aumenta non significativamente l'espressione dei recettori  $\alpha 4\beta 2^*$ ; l'espressione delle due subunità ritorna comunque a livelli basali già dopo un giorno dalla fine del trattamento. Come atteso dai dati di binding e immunoprecipitazione, i livelli di espressione delle subunità  $\alpha 4$  e  $\beta 2$  analizzati

mediante western blotting non aumentano significativamente dopo trattamento cronico con nicotina (Fig. 9, pannello B).

### **3.2 ANALISI DEGLI EFFETTI DEL TRATTAMENTO E DELL'ASTINENZA DA NICOTINA SUL RECETTORE $\alpha 4\beta 2$ NELLA FRAZIONE SINAPTOSOMALE**

Allo scopo di descrivere e meglio caratterizzare quale fosse l'effetto della nicotina sui recettori eteromerici localizzati in membrana, abbiamo purificato la frazione sinaptosomale P2 di corteccia e talamo di topi trattati con nicotina e sacrificati ai diversi tempi dalla fine del trattamento, e analizzato l'espressione delle subunità  $\alpha 4$  e  $\beta 2$ .

#### **3.2.1. CORTECCIA**

I dati di binding ottenuti analizzando i P2 della corteccia cerebrale, mostrano che i recettori presenti nella frazione sinaptosomale rappresentano il 20-25% dei recettori leganti la  $^3\text{H}$ -Epibatidina e presenti nell'omogenato di partenza, e non si evidenziano differenze significative per quanto riguarda l'aumento dell'attività specifica rispetto all'omogenato totale della stessa area; infatti, l'aumento dopo trattamento con nicotina rispetto ai topi trattati con la salina è del 47% nell'omogenato totale (Fig. 5) e del 56% nei sinaptosomi (Fig. 10). In accordo con i dati di binding, l'analisi quantitativa mediante western blotting conferma l'aumento dei livelli di espressione delle subunità  $\alpha 4$  e  $\beta 2$  (Fig. 11, pannello A).

Nel complesso questi dati indicano che la maggior parte dei recettori eteromerici espressi in quest'area sono intracellulari e che l'arricchimento in seguito al trattamento con nicotina è lo stesso sia a livello intracellulare che a livello della membrana.

#### **3.2.2. TALAMO**

Il frazionamento del talamo, al contrario di quanto avviene nella corteccia, ci ha permesso di ottenere una frazione P2 che contiene il 25% dei recettori nei topi trattati con salina, ma un recupero del 39% dei recettori nei topi trattati con nicotina e sacrificati alla fine del trattamento. L'aumento dei recettori nicotinici indotto dal trattamento con nicotina nella frazione sinaptosomale del talamo, è confermato dal significativo aumento dell'attività specifica nei topi trattati rispetto ai controlli (Fig. 10; 50%: salina 119.3; nicotina 179.2; 40%: WD1 167.1 fmol recettore/mg di proteine). In accordo con i dati di binding, l'analisi quantitativa mediante western blotting ha confermato l'aumento dei livelli di espressione delle subunità  $\alpha 4$  e  $\beta 2$  (Fig. 11, pannello B), suggerendo quindi un effetto del trattamento cronico con nicotina in quest'area sui recettori localizzati nei sinaptosomi.

### **3.3 ANALISI DEGLI EFFETTI DEL TRATTAMENTO E DELL'ASTINENZA DA NICOTINA SULLA STECHIOMETRIA DEI RECETTORE $\alpha 4\beta 2$**

Scopo di questo studio è stato anche quello di determinare se l'esposizione alla nicotina fosse in grado di determinare un cambiamento di stechiometria del sottotipo recettoriale nicotinico  $\alpha 4\beta 2$ . Come prima cosa abbiamo analizzato se esistessero differenze area-specifiche nella stechiometria del recettore in animali controllo trattati con salina. A tal fine, mediante l'utilizzo degli stessi anticorpi anti- $\alpha 4$  e anti- $\beta 2$  e analizzando campioni caricati sul medesimo blot, abbiamo calcolato il rapporto tra la subunità  $\beta 2$  e la subunità  $\alpha 4$  negli estratti degli omogenati totali di entrambe le aree prese in esame. I risultati ottenuti e mostrati in figura 12 (pannello A), evidenziano una differenza statisticamente significativa (paired t test  $P=0.0039$ ) tra il rapporto  $\beta/\alpha$  trovato nella corteccia ( $0.4\pm 0.05$ ) rispetto al talamo ( $0.61\pm 0.09$ ). La stessa analisi è stata condotta su estratti delle frazioni P2 ottenute dai medesimi animali. Analogamente ai risultati ottenuti sugli estratti degli omogenati totali, il rapporto  $\beta/\alpha$  trovato nella corteccia è statisticamente diverso da quello del talamo (corteccia:  $0.33\pm 0.09$ ; talamo:  $0.47\pm 0.11$ ; paired t test  $P<0.0001$ ). Questi dati indicano chiaramente che in condizioni basali, i recettori  $\alpha 4\beta 2$  espressi nel talamo hanno un più alto contenuto di  $\beta 2$  rispetto alla corteccia e che quindi, nel talamo il recettore eteromero  $\alpha 4\beta 2$  sia maggiormente presente con la stechiometria  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ .

Stabilita la condizione a livello basale nelle due aree, abbiamo calcolato, negli omogenati totali di corteccia e talamo, il rapporto  $\beta/\alpha$  di ciascun gruppo sperimentale. I dati ottenuti evidenziano nella corteccia un aumento di circa il 30% di tale rapporto dopo 14 giorni di trattamento rispetto ai controllo trattati con salina (Fig.12, pannello B), indicando che la nicotina è in grado di incrementare la formazione di pentameri con stechiometria  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ , che vengono però rapidamente rimossi quando cessa l'esposizione alla nicotina; i rapporti  $\beta/\alpha$  ritornano infatti poi ai livelli basali negli altri gruppi sperimentali (WD1, WD 4, WD14). Risultati analoghi sono stati ottenuti calcolando il rapporto delle due subunità espresse nella frazione P2 della corteccia, dove l'effetto del trattamento permane in maniera significativa anche dopo 24 ore dalla fine del trattamento (WD1) (Fig.12, pannello C).

Nel talamo invece non si osservano alterazioni significative del rapporto  $\beta/\alpha$  ne nell'omogenato totale (Fig.12, pannello B) ne nei sinaptosomi (Fig.12, pannello C), nonostante vi fosse un aumento significativo delle subunità stesse in questa frazione (Fig.11, pannello B).

Complessivamente questi dati indicano che:

- in condizioni basali i recettori  $\alpha 4\beta 2$  espressi nel talamo hanno un più alto contenuto di  $\beta 2$  rispetto alla corteccia e il recettore eteromero  $\alpha 4\beta 2$  è maggiormente presente con la stechiometria  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ ;

- l'esposizione cronica *in vivo* alla nicotina induce un aumento area-specifico dell'espressione dei recettori  $\alpha 4\beta 2^*$ ; tale aumento risulta evidente nella corteccia cerebrale, ma non nel talamo;
- nella corteccia cerebrale il trattamento cronico *in vivo* con nicotina è in grado di incrementare la formazione di pentameri con stechiometria  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ , che vengono però rapidamente rimossi quando cessa l'esposizione alla nicotina;

## **RECETTORI NICOTINICI NON-NEURONALI: EFFETTI DEL TRATTAMENTO CON NICOTINA, AGONISTI E ANTAGONISTI NICOTINICI NELLA TERAPIA DEI GLIOBLASTOMI**

Questa parte di progetto si prefigge lo studio del ruolo dei recettori nicotinici in tessuti extraneuronali, in particolare in linee di glioma e glioblastoma, derivate da pazienti con differente stadio di tumore.

### **4. IDENTIFICAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI SUBUNITÀ CODIFICANTI PER I RECETTORI NICOTINICI IN LINEE CONTINUE DI GLIOMA E IN CULTURE PRIMARIE DI GLIOBLASTOMA DI PAZIENTI**

In un lavoro preliminare, svolto in collaborazione con la Dott.ssa R. Benfante, abbiamo valutato i livelli di mRNA delle subunità nicotiniche nella linea stabile di glioma U87MG (Fig. 13, pannello A) e nelle quattro diverse linee primarie umane di glioblastoma (Fig. 13, pannello B) mediante qRT-PCR. I risultati mostrati in figura, confermano l'espressione degli mRNA delle subunità nicotiniche  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 7$  duplicata,  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$  e  $\beta 2$  in entrambe le linee analizzate. Sono al contrario assenti i trascritti CHRNA4, CHRNA6 e CHRNAB3, sia nella linea stabile che nelle linee primarie umane e l'mRNA dei geni CHRNAB2 e CHRNAB4 rispettivamente nelle linee primarie e nelle U87MG. Come controllo è stata utilizzata la linea stabile T98G, una linea di glioma che non esprime o esprime basse quantità di mRNA codificanti le subunità nicotiniche.

Questi dati confermano l'espressione dei mRNAs delle subunità nicotiniche già note in letteratura per essere coinvolte nella progressione di vari tipi di tumore, quali il tumore ai polmoni o al seno, e nell'attivazione di geni che regolano la sopravvivenza cellulare e la resistenza all'apoptosi. Gli esperimenti successivi si sono focalizzati in particolare sulla subunità  $\alpha 7$ , i cui livelli di trascritto sono risultati significativamente elevati sia nella linea stabile U87MG che nelle linee primarie.

### **5. EFFETTO DEL TRATTAMENTO CRONICO CON NICOTINA, AGONISTI E ANTAGONISTI NICOTINICI SULLA PROLIFERAZIONE DI GLIOMI E GLIOBLASTOMI**

Al fine di valutare l'effetto della nicotina sulla vitalità delle linee tumorali prese in esame, abbiamo trattato le cellule con concentrazioni crescenti di nicotina per 72 ore. I risultati mostrano che il trattamento cronico con nicotina aumenta la proliferazione della linea cellulare stabile di glioma U87MG (Fig. 14, pannello A); in particolare tale aumento risulta significativo quando le cellule sono trattate con nicotina alla concentrazione di 10 nM, 50 nM e 100 nM. Analogamente, il trattamento cronico di 72 ore con concentrazioni crescenti di ICH3, un agonista selettivo  $\alpha 7$  precedentemente caratterizzato nel nostro laboratorio (Fig.

14, pannello B), e con due diverse nitrosammine derivate dalla combustione della nicotina e potenti agenti cancerogeni, NNN (Fig. 14, pannello C) e NNK (Fig. 14, pannello D), aumenta significativamente la vitalità delle cellule tumorali U87MG. Le affinità delle due nitrosammine verso il sottotipo  $\alpha 7$  sono state calcolate mediante esperimenti di binding su membrane di ippocampo di ratto (NNN:  $K_i=356 \mu\text{M}$ ; CV=44%; NNK:  $K_i=86 \mu\text{M}$ ; CV=47%).

Per determinare se i recettori nicotinici contenenti la subunità  $\alpha 7$  mediassero realmente questo aumento di proliferazione indotto sia dalla nicotina che da specifici agonisti  $\alpha 7$ , abbiamo valutato l'effetto del trattamento cronico con gli antagonisti selettivi mecamilamina (Fig. 14, pannello E),  $\alpha$ -Bungarotossina (Fig. 14, pannello F) e metilcaconitina (MLA) (Fig. 14, pannello G) alle concentrazioni rispettivamente di 1 mM, 1  $\mu\text{M}$  e 500 nM. Abbiamo scelto la concentrazione 50 nM di nicotina, risultata significativa nell' aumento della vitalità cellulare. I risultati, ottenuti mediante conta delle cellule vive in ciascun pozzetto in seguito ai diversi trattamenti, evidenziano che il co-trattamento con nicotina e i diversi antagonisti, riduce in maniera significativa il numero di cellule di glioma U87MG vitali, rispetto alle stesse cellule trattate solo con nicotina 50 nM.

Ottenuto questo risultato nella linea stabile U87MG, abbiamo analizzato se anche nelle linee umane primarie di glioblastoma derivate da pazienti a diverso stadio di tumore, la nicotina fosse in grado di aumentare la proliferazione delle cellule tumorali stesse. I dati in figura 15 mostrano che il trattamento cronico per 72 ore con nicotina 50 nM e 100 nM induce un aumento significativo della proliferazione cellulare anche in due diverse linee primarie di glioblastoma analizzate (VIPI, pannello A, B e C; ZEMA pannello D e E). Tale aumento è mediato anche nelle linee primarie dai recettori nicotinici contenenti la subunità  $\alpha 7$ . Infatti, il co-trattamento con gli antagonisti MLA (Fig. 15, pannello B e D) e  $\alpha$ -Bungarotossina (Fig. 15, pannello C ed E) alle concentrazioni rispettivamente di 500 nM e 1  $\mu\text{M}$  riduce in modo significativo il numero delle cellule vitali rispetto alle stesse cellule trattate solo con nicotina 50 nM e 100 nM.

## **6. IDENTIFICAZIONE DELLE VIE INTRACELLULARI ATTIVATE DALL'ESPOSIZIONE ALLA NICOTINA**

I recettori nicotinici, in seguito a legame con la nicotina, sono in grado di attivare diverse vie di segnalazione intracellulare che possono avere effetti tumorigenici. Gli esperimenti successivi hanno quindi avuto lo scopo di determinare quali potessero essere le vie coinvolte nell'aumento della proliferazione delle cellule tumorali indotto dal trattamento cronico con nicotina. A tal fine abbiamo identificato due possibili target, la via della protein chinasi Akt, nota in letteratura per avere effetti anti-apoptotici, e la via della protein chinasi Erk, via che stimola la proliferazione cellulare. Abbiamo valutato mediante western blotting la loro attivazione, in presenza e assenza di nicotina, a diversi tempi di trattamento. Come mostrato

in figura 16 (pannello A e B) nella linea stabile U87MG la nicotina induce un significativo e tempo-dipendente aumento dei livelli di fosforilazione di Akt e di Erk. In particolare, l'aumento della forma fosforilata di Akt risulta significativo dopo un trattamento di 5, 10 e 15 minuti con nicotina 100 nM, mentre i livelli di pErk aumentano significativamente solo dopo 5 minuti di trattamento con la stessa dose di nicotina. Dopo 30 minuti di trattamento, i livelli di tali proteine ritornano a livello basale, suggerendo l'attivazione di una cascata intracellulare di eventi che portano poi all'aumento della proliferazione cellulare visibile dopo 72 ore di trattamento con nicotina.

Questo effetto di aumento della fosforilazione di Akt e di Erk è indotto dalla nicotina e bloccato dal pre-trattamento con gli antagonisti selettivi  $\alpha 7$ , MLA (Fig. 16, pannello A) e  $\alpha$ -Bungarotossina (Fig. 16, pannello B), suggerendo che questo sottotipo recettoriale sia coinvolto in tale fenomeno.

Lo stesso effetto lo osserviamo nella coltura primaria umana di glioblastoma VIPI: la nicotina 100 nM aumenta significativamente i livelli di fosforilazione di Akt dopo 5, 10 e 15 minuti di trattamento e la fosforilazione di Erk dopo 15 minuti. Il pre-trattamento con gli antagonisti selettivi MLA (Fig. 17, pannello A) e  $\alpha$ -Bungarotossina (Fig. 17, pannello B) blocca l'effetto indotto dalla nicotina.

## **7. EFFETTO DEL TRATTAMENTO CON COMPOSTI DERIVATI DALLO STILBENE SULLA VITALITÀ DELLE CELLULE TUMORALI**

Nel nostro laboratorio sono stati precedentemente caratterizzati tre farmaci antagonisti selettivi  $\alpha 7$  derivati dallo stilbene: F1 ( $K_i = 1.08 \mu\text{M}$ ), F3 ( $K_i = 57 \text{ nM}$ ) e F6 ( $> 10 \mu\text{M}$ ). I composti F1 e F3 sono delle amine quaternarie; F6 è un derivato di F1, al quale è stato rimosso un gruppo etilico a livello della testa di ammonio, al fine di ottenere un'amina terziaria più liposolubile (Gotti et al., 1998, Gotti et al., 2000).

Abbiamo valutato l'effetto del trattamento di tre farmaci sulla vitalità delle cellule di glioma e glioblastoma, mediante il test di vitalità cellulare (MTS assay) e conta manuale delle cellule.

Quello che abbiamo osservato dai valori di  $IC_{50}$  di ciascun farmaco nelle diverse linee cellulari analizzate e riportati in tabella, è che i tre farmaci F1, F3 e F6 sono in grado di diminuire la vitalità cellulare in modo dose dipendente sia nelle U87MG (Fig. 18, pannello A) sia nelle due linee primarie ZEMA (Fig. 18, pannello B) e VIPI (Fig. 18, pannello C). Come controllo, per escludere che l'effetto potesse essere dovuto ad un'azione aspecifica della molecola stessa, abbiamo utilizzato un composto costituito esclusivamente dallo scheletro di stilbene, privo quindi dei residui importanti per determinare l'affinità verso i recettori nicotinici. Questo composto non altera significativamente la vitalità delle cellule ( $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$ ).

Come ulteriore controllo, abbiamo testato il farmaco più potente F1 sulla vitalità cellulare di HepG2, una linea di epatociti umani che non esprime i recettori nicotinici, e SH-SY5Y, linea

di neuroblastoma umano che esprime bassi livelli di mRNA per le subunità nicotiniche (Fig. 18, pannello D). La vitalità di queste cellule dopo trattamento con le stesse dosi di F1, valutata mediante il test di vitalità dell'MTS, mostra che il composto F1 ha un effetto molto modesto su entrambe le linee cellulari e comunque solo a concentrazioni molto più alte rispetto quelle attive sulle linee di glioma e glioblastoma (>200  $\mu$ M).

## **8. EFFETTI DEL TRATTAMENTO CON IL COMPOSTO F1 SULLE CELLULE TUMORALI**

### **8.1. EFFETTI SULLA VITALITA' CELLULARE**

Il composto F1 è un derivato del 4-oxistilbene, modificato per aumentare la sua affinità per i nAChRs contenenti la subunità  $\alpha 7$ . Verificato il suo effetto tossico sulle cellule di glioma e glioblastoma, abbiamo analizzato nella linea stabile U87MG quale fosse l'effetto del co-trattamento cronico per 72 ore della nicotina 50 nM, risultata significativa nell'aumento della vitalità cellulare, con F1 1  $\mu$ M, dose molto inferiore al valore di  $IC_{50}$  del composto stesso. I risultati, ottenuti mediante conta delle cellule vive in ciascun pozzetto in seguito ai diversi trattamenti, evidenziano che il co-trattamento con nicotina e F1, riduce in maniera significativa il numero di cellule di glioma U87MG vitali, rispetto alle stesse cellule trattate solo con nicotina 50 nM (Fig. 19, pannello A). Esperimenti analoghi sono stati condotti nelle linee umane primarie di glioblastoma ZEMA e VIPI, utilizzando la nicotina a due diverse concentrazioni, 50 nM e 100 nM. Anche in queste linee, il co-trattamento con l'antagonista F1 riduce in modo significativo il numero delle cellule vitali rispetto alle stesse cellule trattate solo con nicotina 50 nM e 100 nM (Fig. 19, pannello B e C).

### **8.2 EFFETTI SULLA PRODUZIONE DI RADICALI DELL' OSSIGENO**

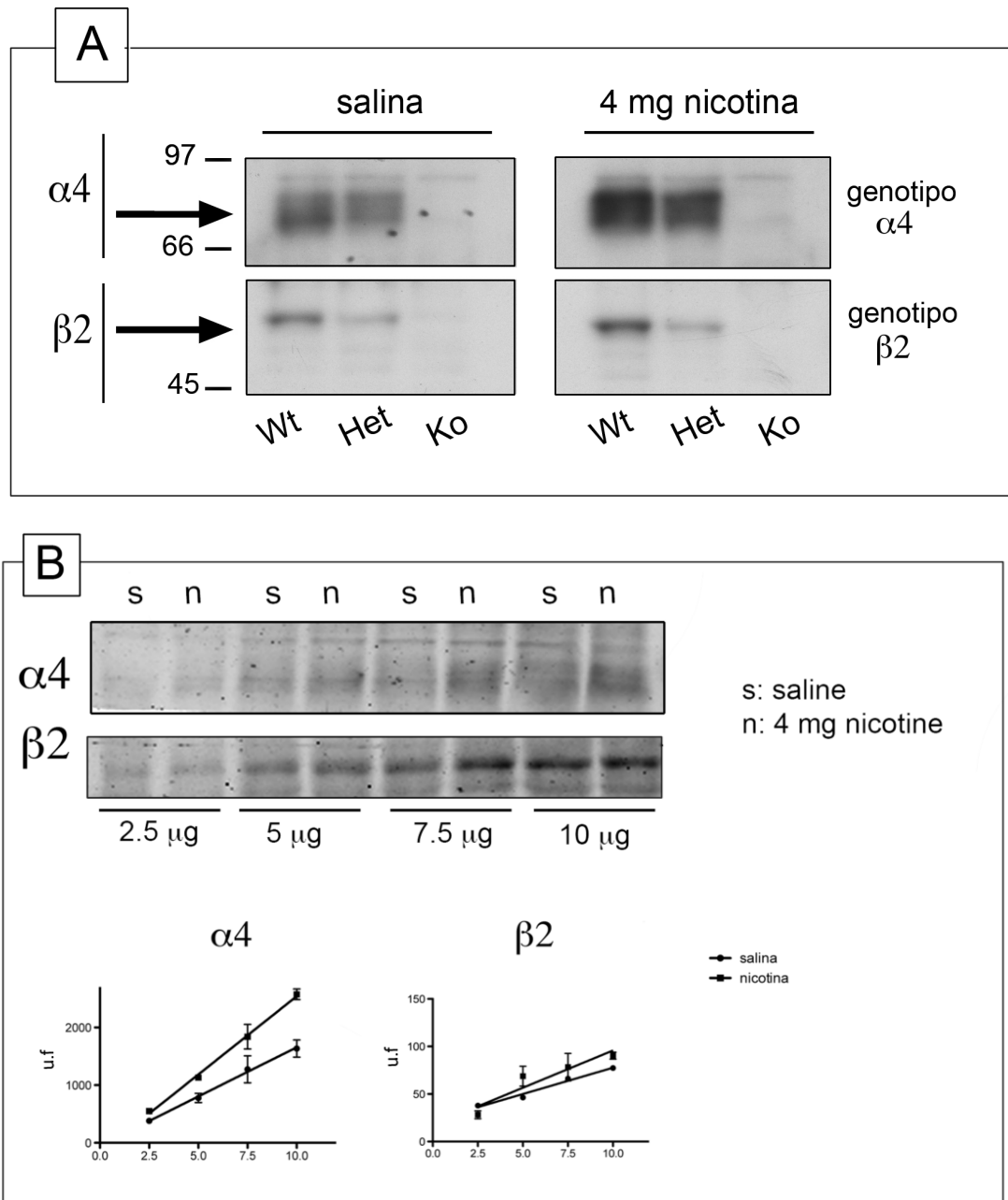
Studi recenti hanno dimostrato che i derivati del resveratrolo possono essere citotossici per le cellule tumorali, determinando un'aumento nella produzione di radicali dell'ossigeno (ROS). Poiché il composto F1 contiene il gruppo stilbenico presente nel resveratrolo, abbiamo determinato se potesse influenzare la produzione di ROS. Abbiamo testato l'effetto del trattamento con dosi crescenti di F1 sulla linea U87MG (Fig. 20, pannello A) e sulle linee primarie umane ZEMA (Fig. 20, pannello B) e VIPI (Fig. 20, pannello C) e determinato che F1 aumenta in modo dose-dipendente la produzione di ROS.

Complessivamente questi dati indicano che:

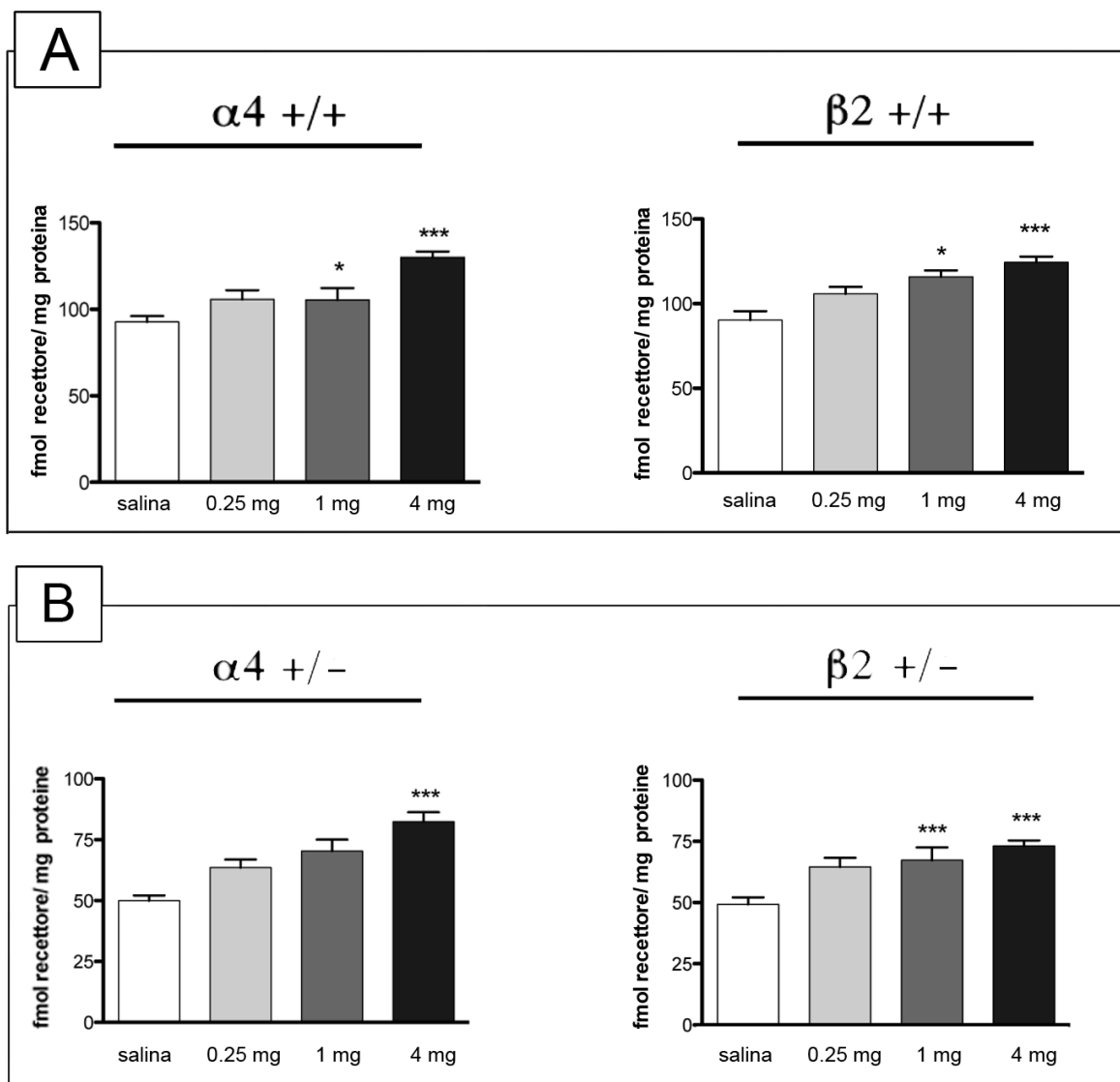
- i recettori nicotinici sono espressi in linee primarie umane di glioblastoma;
- i recettori nicotinici  $\alpha 7$  mediano la proliferazione di queste cellule tumorali; in particolare, la nicotina e gli agonisti nicotinici aumentano in maniera dose-dipendente la vitalità delle cellule di glioblastoma; tale effetto è bloccato dal co-trattamento con antagonisti selettivi  $\alpha 7$ ;



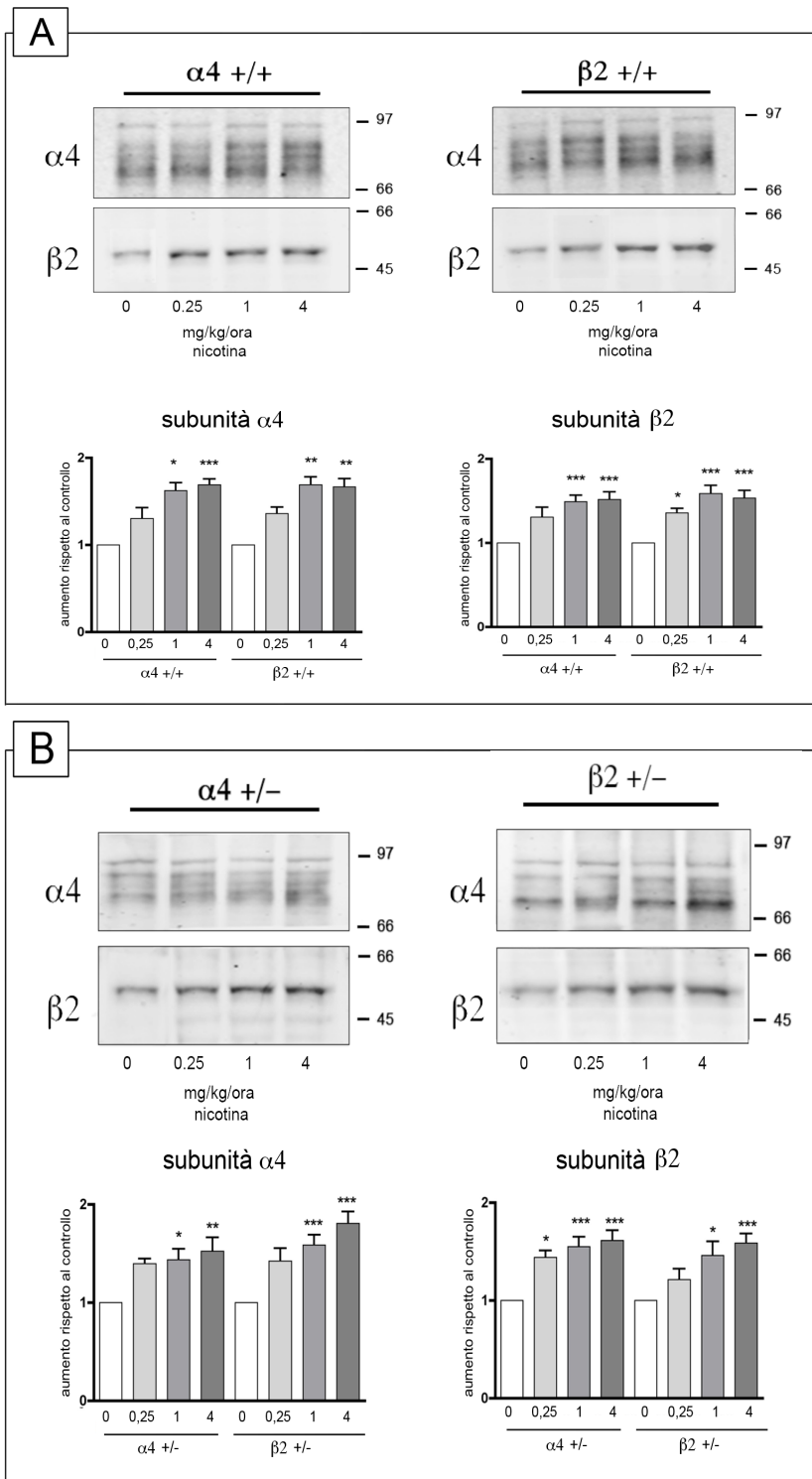
- il trattamento con nicotina aumenta i livelli di fosforilazione di due protein chinasi coinvolte nella proliferazione e nella regolazione del ciclo cellulare, Akt e Erk; il co-trattamento con antagonisti selettivi  $\alpha 7$  impedisce questa attivazione;
- il trattamento con composti derivati dallo stilbene determina morte cellulare attraverso l'inibizione dei recettori sensibili alla  $\alpha$ -Bungarotossina, aumento della produzione di ROS e dati preliminari sembrano mostrare attraverso l'inibizione della proliferazione cellulare attraverso le vie di Akt e Erk;
- i recettori nicotinici  $\alpha 7$  potrebbero rappresentare una nuova strategia terapeutica nel trattamento di gliomi e glioblastomi.



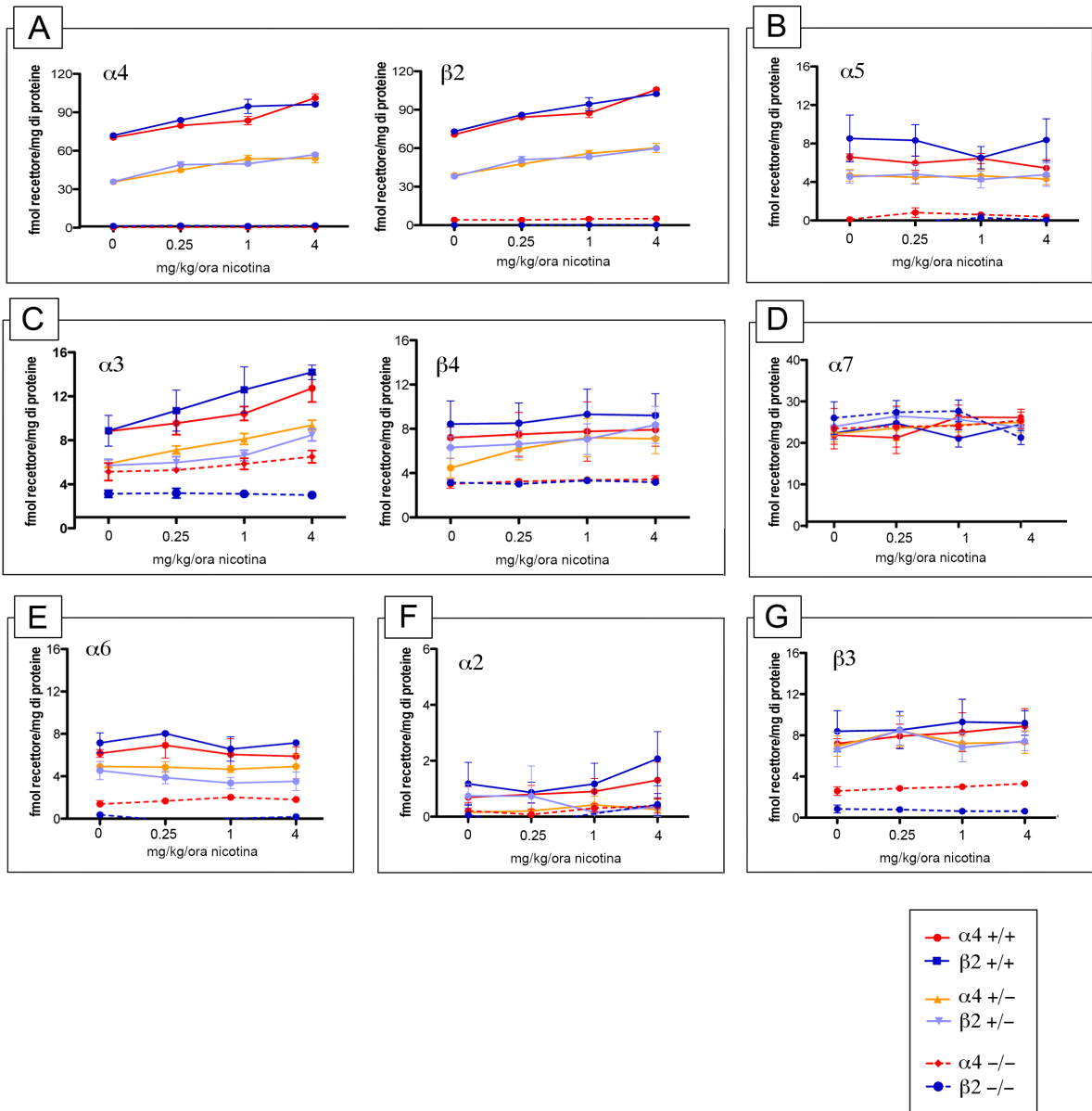
**Figura 1: analisi della specificità (A) e della linearità (B) degli anticorpi.** In A è riportata la quantificazione dell'espressione della subunità  $\alpha 4$  e della subunità  $\beta 2$  mediante anticorpi policlonali subunità specifici in estratti ottenuti da corteccia cerebrale di topi WT, Het e KO sia per la subunità  $\alpha 4$  (genotipo  $\alpha 4$ ) che per la subunità  $\beta 2$  (genotipo  $\beta 2$ ). In B è riportata la quantificazione dell'espressione della subunità  $\alpha 4$  e della subunità  $\beta 2$  mediante anticorpi policlonali subunità specifici in quantità crescenti di estratti ottenuti da corteccia cerebrale di topi trattati con salina o con nicotina (u.f = unità arbitrarie di fluorescenza).



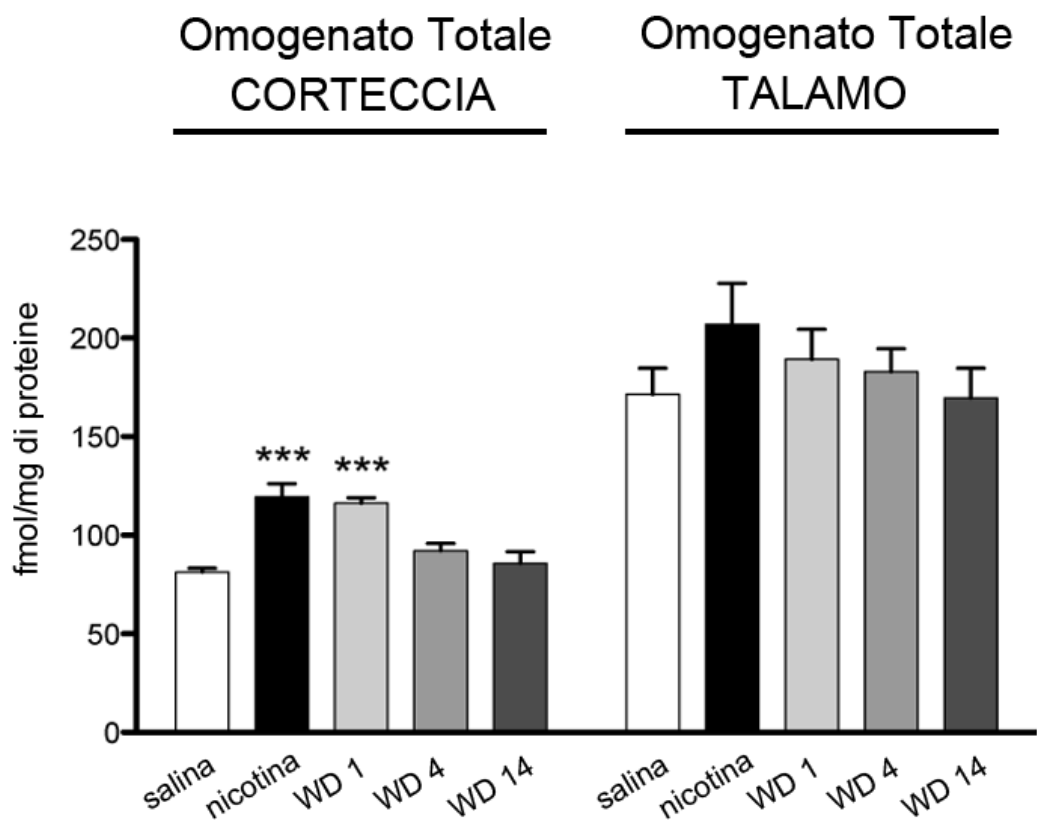
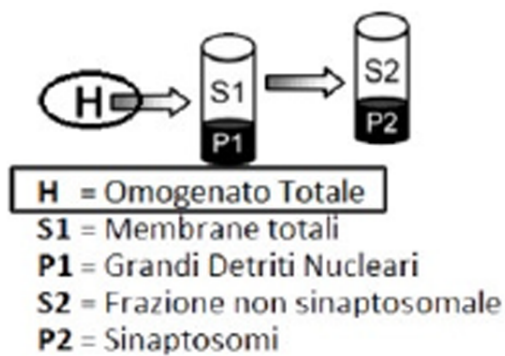
**Figura 2: analisi degli effetti del trattamento cronico con salina o dosi crescenti di nicotina (0.25, 1 o 4 mg/kg/ora) sull'espressione dei diversi sottotipi nicotinici mediante binding con  $^3\text{H}$ -Epibatidina.** Le analisi sono state effettuate su estratti di cervello di topi WT (A) e Het (B) per le subunità  $\alpha 4$  e  $\beta 2$ . I valori riportati sono espressi come fmol di recettori/mg di proteine. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando one-way ANOVA e *post hoc* Bonferroni (\*\*\* $P < 0.001$ ; \* $P < 0.05$  vs salina).



**Figura 3: analisi dei livelli di espressione delle subunità  $\alpha 4$  e  $\beta 2$  in estratti di cervello di topi  $\alpha 4$  e  $\beta 2$  WT (A) e  $\alpha 4$  e  $\beta 2$  Het (B), dopo trattamento cronico con dosi crescenti di nicotina (0.25, 1 e 4 mg/kg/ora). In ogni pannello sono riportati i western blot rappresentativi e le relative quantificazioni. I valori riportati sono ottenuti dalla media  $\pm$  SEM di 10 esperimenti e sono espressi come incremento rispetto al controllo non trattato. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando one-way ANOVA e test di Dunn's (\*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$  vs salina).**

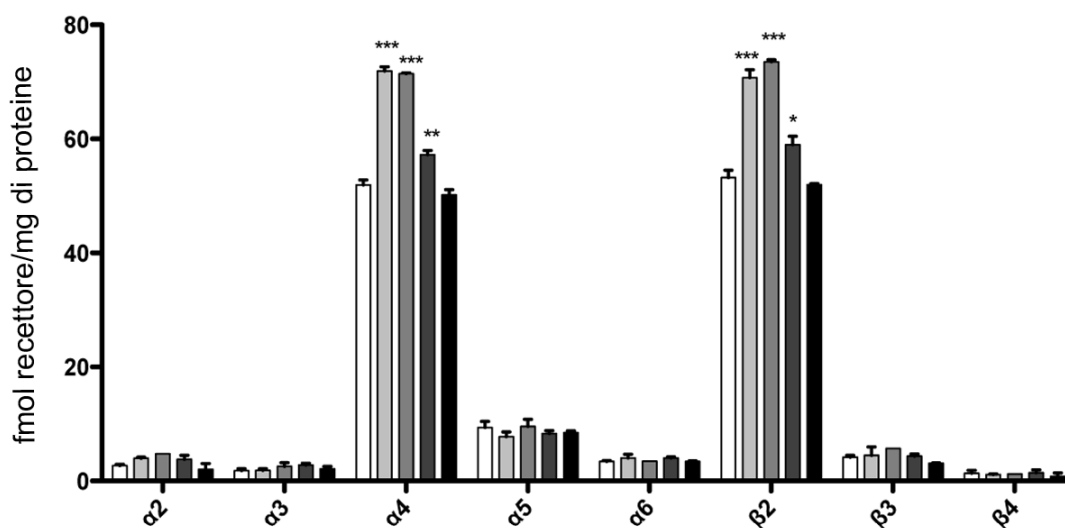


**Figura 4: effetti del trattamento cronico con dosi crescenti di nicotina sull'espressione dei diversi sottotipi nicotinici mediante immunoprecipitazione dei recettori leganti  $^{125}$ I- $\alpha$ Bungarotossina da parte di anticorpi diretti contro la subunit  $\alpha 7$  (D) o  $^3$ H-Epibatidina da parte di anticorpi diretti contro le subunit  $\alpha 4$  e  $\beta 2$  (A),  $\alpha 5$  (B),  $\alpha 3$  e  $\beta 4$  (C),  $\alpha 6$  (E),  $\alpha 2$  (F) e  $\beta 3$  (G). L'analisi è stata effettuata in cervelli di topi WT, Het e KO sia per la subunit  $\alpha 4$  (genotipo  $\alpha 4$ ) che per la subunit  $\beta 2$  (genotipo  $\beta 2$ ), trattati con salina o nicotina 0,25, 1 o 4 mg/kg ora. I valori riportati sono ottenuti dalla media di 7-10 esperimenti e sono espressi come fmol di recettore immunoprecipitato/mg di proteine.**



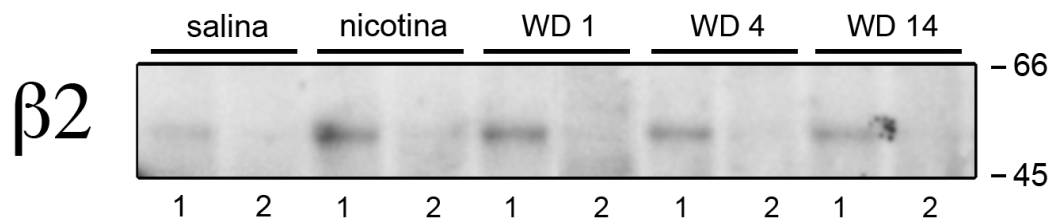
**Figura 5: analisi degli effetti del trattamento cronico con nicotina (4 mg/kg/ora) e dopo 1 (WD1) 4 (WD4) o 14 (WD14) giorni di astinenza sull'espressione dei diversi sottotipi nicotinici mediante binding con  $^3\text{H}$ -Epibatidina.** Le analisi sono state effettuate su estratti di corteccia cerebrale e talamo di topi  $\beta 2$  WT. I valori riportati sono espressi come fmol di recettori/mg di proteine. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando one-way ANOVA e *post hoc* Bonferroni test (\*\*\*) $P < 0.001$  vs salina).

# CORTECCIA



|            | salina         | nicotina           | WD1                | WD4               | WD14           |
|------------|----------------|--------------------|--------------------|-------------------|----------------|
| $\alpha 2$ | 2.7 $\pm$ 0.2  | 4.0 $\pm$ 0.2      | 4.7 $\pm$ 0.1      | 3.8 $\pm$ 0.7     | 2.0 $\pm$ 1.1  |
| $\alpha 3$ | 1.8 $\pm$ 0.3  | 1.9 $\pm$ 0.3      | 2.5 $\pm$ 0.7      | 2.8 $\pm$ 0.3     | 2.2 $\pm$ 0.4  |
| $\alpha 4$ | 51.9 $\pm$ 0.9 | 71.9 $\pm$ 0.7 *** | 71.4 $\pm$ 0.1 *** | 57.3 $\pm$ 0.7 ** | 50.2 $\pm$ 1.0 |
| $\alpha 5$ | 9.4 $\pm$ 1.1  | 7.8 $\pm$ 0.8      | 9.5 $\pm$ 1.2      | 8.3 $\pm$ 0.5     | 8.5 $\pm$ 0.3  |
| $\alpha 6$ | 3.5 $\pm$ 0.1  | 4.0 $\pm$ 0.7      | 3.4 $\pm$ 0.1      | 4.1 $\pm$ 0.2     | 3.4 $\pm$ 0.1  |
| $\beta 2$  | 53.2 $\pm$ 1.3 | 70.8 $\pm$ 1.4 *** | 73.5 $\pm$ 0.4 *** | 59.0 $\pm$ 1.5 *  | 52.0 $\pm$ 0.2 |
| $\beta 3$  | 4.2 $\pm$ 0.3  | 4.5 $\pm$ 1.5      | 5.7 $\pm$ 0.1      | 4.3 $\pm$ 0.4     | 3.1 $\pm$ 0.1  |
| $\beta 4$  | 1.3 $\pm$ 0.5  | 1.1 $\pm$ 0.1      | 1.2 $\pm$ 0.1      | 1.4 $\pm$ 0.5     | 0.8 $\pm$ 0.6  |

**Figura 6: analisi degli effetti del trattamento cronico con nicotina (4 mg/kg/ora) e dopo 1 (WD 1), 4 (WD 4) o 14 (WD 14) giorni di astinenza sull'espressione in corteccia dei diversi sottotipi nicotinici mediante immunoprecipitazione dei recettori leganti  $^3\text{H}$ -Epibatidina da parte di anticorpi diretti contro le subunità  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  e  $\beta 4$ . L'analisi è stata effettuata utilizzando concentrazioni saturanti (10  $\mu\text{g}$ ) di anticorpo legato alla proteina A, in estratti di corteccia cerebrale di topi  $\beta 2$  WT. Al contenuto immunoprecipitato da ciascun anticorpo è stato sottratto il valore ottenuto nei campioni controllo contenenti un uguale concentrazione di IgG di coniglio. I valori riportati sono ottenuti dalla media  $\pm$  SEM di tre esperimenti in duplicato e sono espressi come fmol di recettore immunoprecipitato/mg di proteine. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando one-way ANOVA e *post hoc* Bonferroni test (\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$  vs salina).**



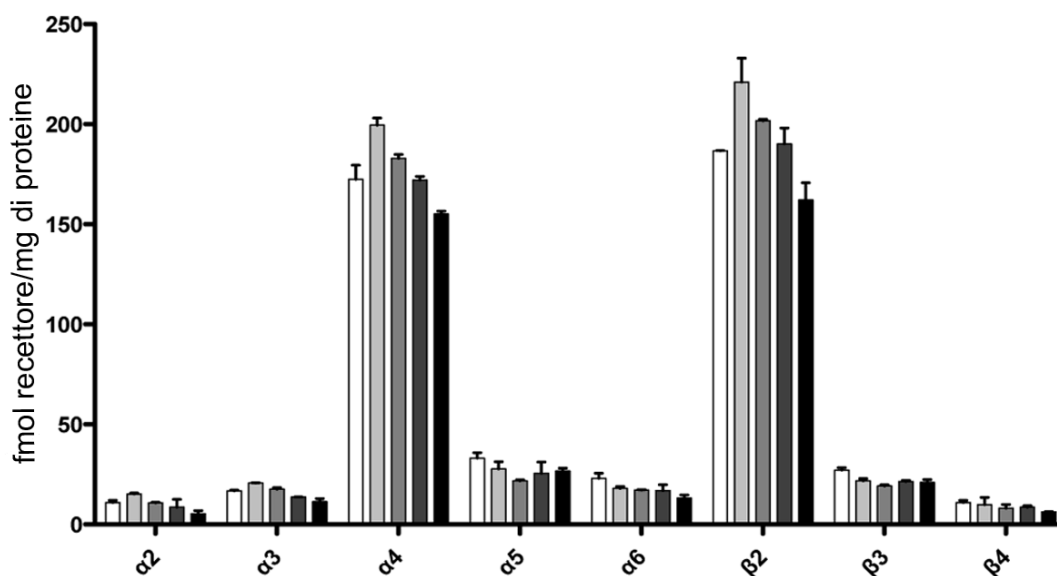
1 = IgG controllo

2 = anti- $\alpha$ 4

**Figura 7: analisi dell'assemblaggio delle subunità  $\alpha$ 4 e  $\beta$ 2 presenti negli omogenati di corteccia di topi in seguito al trattamento cronico e all'astinenza (WD1; WD4; WD14) da nicotina.** L'analisi è stata effettuata in estratti di corteccia cerebrale di topi  $\beta$ 2 WT, che sono stati incubati per due ore con 10  $\mu$ g di proteina A legata ad anticorpi anti- $\alpha$ 4 o alle IgG di controllo. La figura mostra l'espressione della subunità  $\beta$ 2 analizzata mediante anticorpi policlonali subunità specifici in uguali quantità di surnatante.

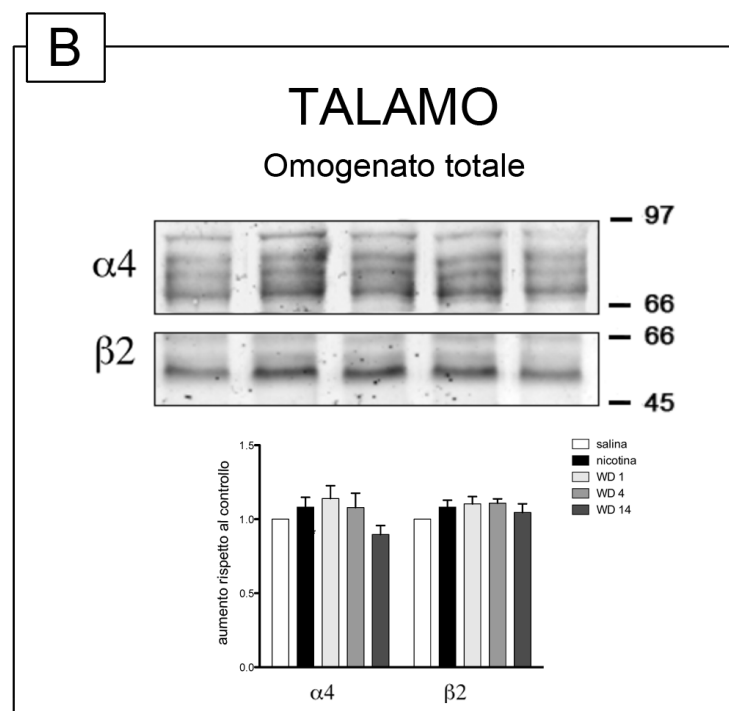
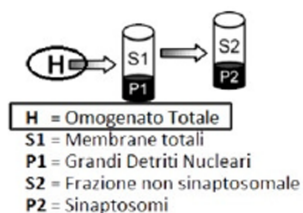
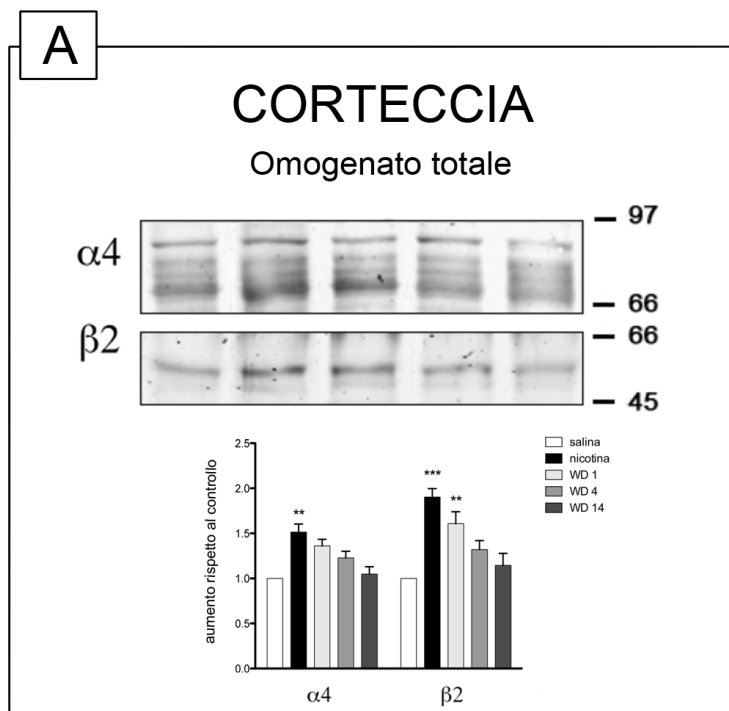
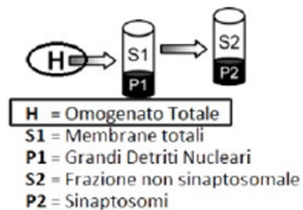


# TALAMO

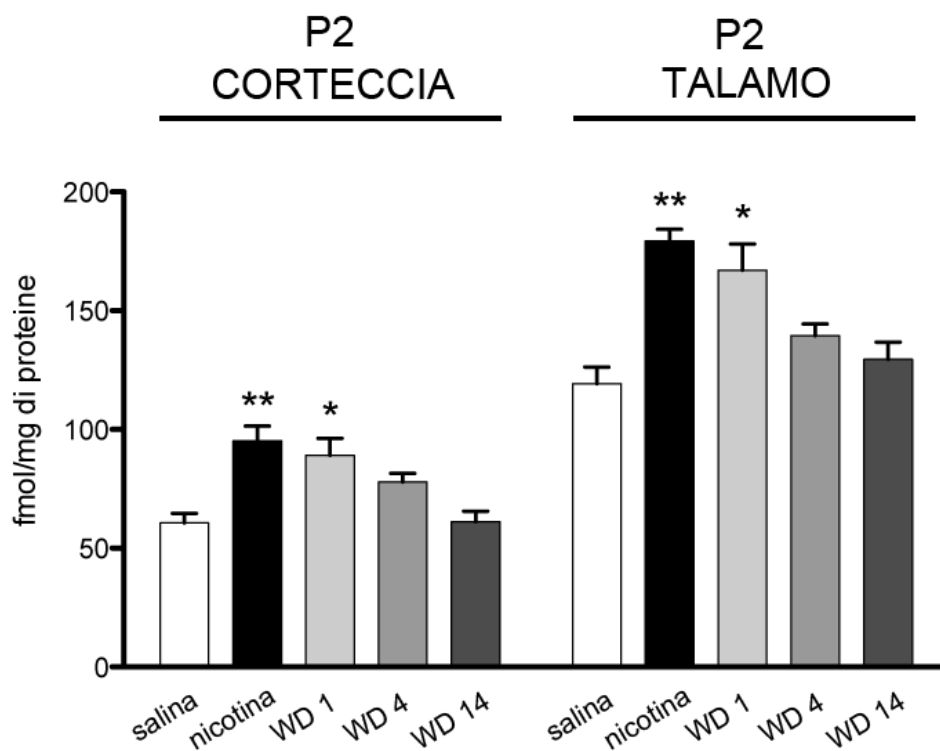


|            | salina      | nicotina     | WD1         | WD4         | WD14        |
|------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| $\alpha 2$ | 10.9 ± 1.1  | 15.2 ± 0.4   | 10.8 ± 0.2  | 8.6 ± 3.9   | 5.3 ± 1.5   |
| $\alpha 3$ | 16.8 ± 0.3  | 20.7 ± 0.1   | 17.7 ± 0.7  | 13.7 ± 0.1  | 11.4 ± 1.5  |
| $\alpha 4$ | 172.4 ± 7.1 | 199.5 ± 3.5  | 182.9 ± 2.0 | 172.1 ± 1.8 | 155 ± 1.5   |
| $\alpha 5$ | 33.1 ± 2.7  | 27.8 ± 3.5   | 21.7 ± 0.6  | 25.5 ± 5.7  | 26.7 ± 1.5  |
| $\alpha 6$ | 23.0 ± 2.6  | 18.0 ± 1.0   | 17.2 ± 0.2  | 16.9 ± 3.0  | 13.1 ± 1.5  |
| $\beta 2$  | 186.7 ± 0.2 | 221.0 ± 12.0 | 201.7 ± 0.7 | 190.2 ± 7.9 | 162.2 ± 8.5 |
| $\beta 3$  | 27.2 ± 1.2  | 21.7 ± 1.1   | 19.2 ± 0.7  | 21.4 ± 0.7  | 20.9 ± 1.5  |
| $\beta 4$  | 11.0 ± 1.0  | 9.9 ± 3.6    | 8.1 ± 1.8   | 8.6 ± 0.7   | 6.3 ± 0.1   |

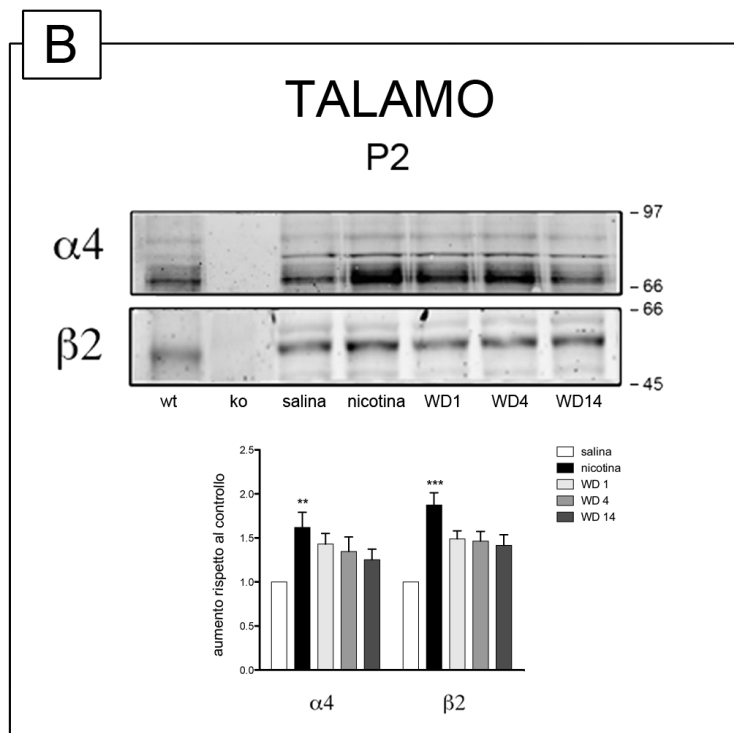
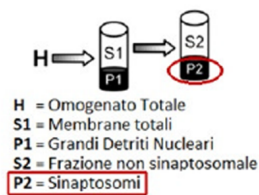
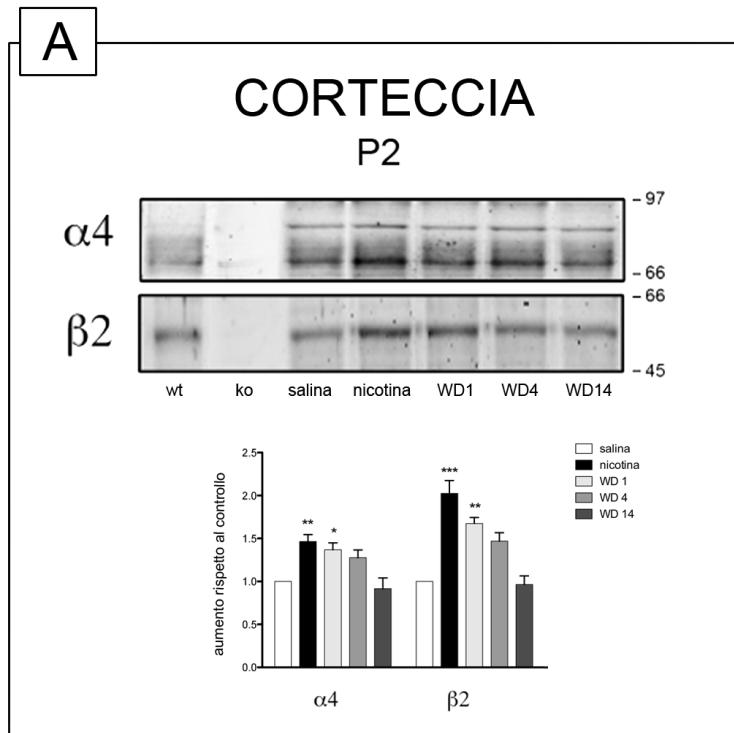
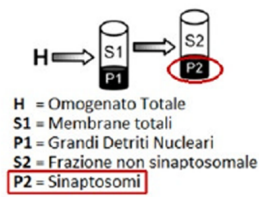
**Figura 8: analisi degli effetti del trattamento cronico con nicotina (4 mg/kg/ora) e dopo 1 (WD1), 4 (WD4) o 14 (WD14) giorni di astinenza sull'espressione dei diversi sottotipi nicotinici mediante immunoprecipitazione** dei recettori leganti  $^3\text{H}$ -Epibatidina da parte di anticorpi diretti contro le subunità  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  e  $\beta 4$ . L'analisi è stata effettuata utilizzando concentrazioni saturanti (10  $\mu\text{g}$ ) di anticorpo legato alla proteina A, in estratti di talamo di topi  $\beta 2$  WT. Al contenuto immunoprecipitato da ciascun anticorpo è stato sottratto il valore ottenuto nei campioni controllo contenenti un uguale concentrazione di IgG di coniglio. I valori riportati sono ottenuti dalla media  $\pm$  SEM di due esperimenti in triplicato e sono espressi come fmol di recettore immunoprecipitato/mg di proteine. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando one-way ANOVA e *post hoc* Bonferroni test.



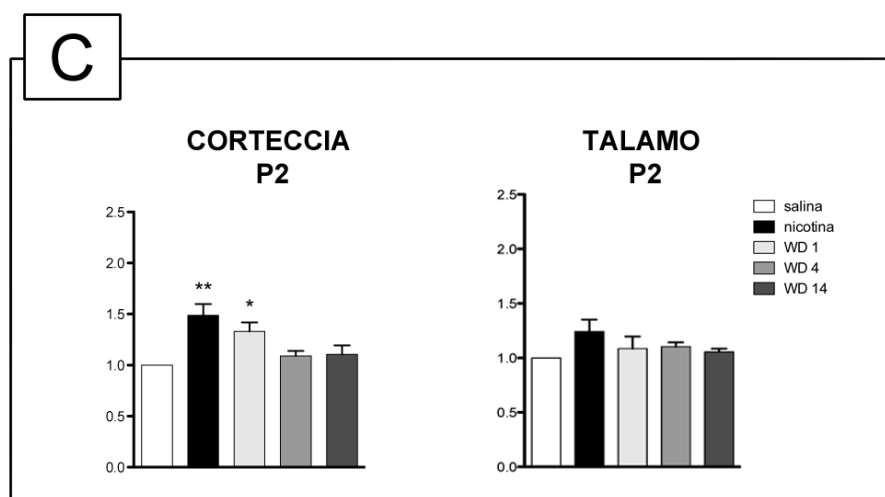
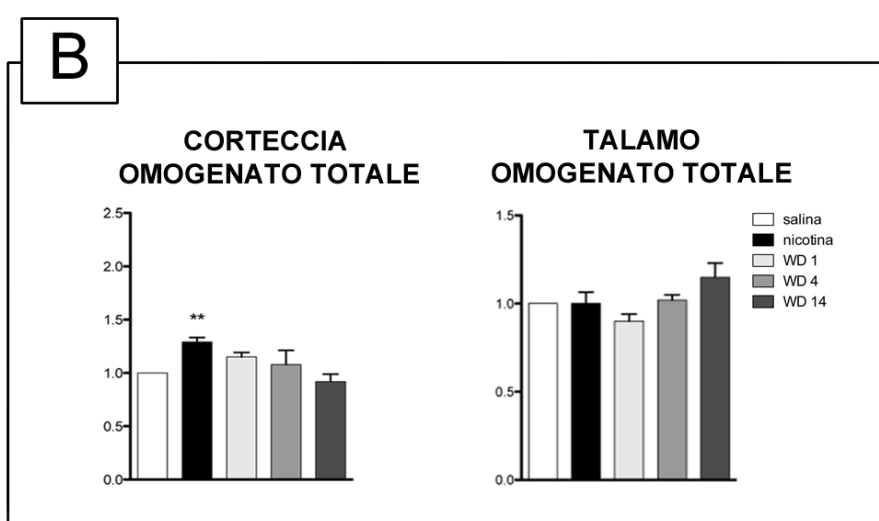
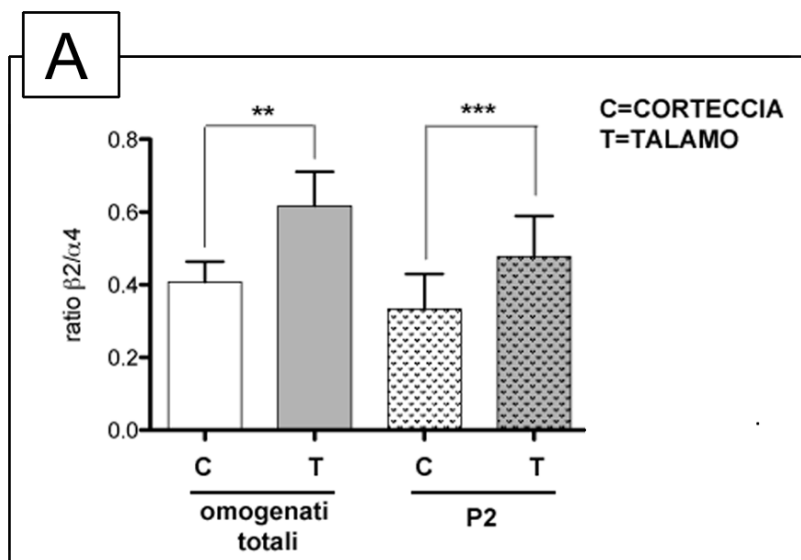
**Figura 9: analisi dei livelli di espressione delle subunità  $\alpha 4$  e  $\beta 2$  in estratti di corteccia (A) e talamo (B) di topi dopo trattamento cronico e astinenza (WD1; WD4; WD14) da nicotina. In ogni pannello sono riportati i western blot rappresentativi e le relative quantificazioni. I valori riportati sono ottenuti dalla media  $\pm$  SEM di 5 esperimenti e sono espressi come aumento di ciascuna subunit  rispetto al controllo non trattato. L'analisi statistica   stata condotta utilizzando one-way ANOVA e test di Dunn's (\*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  vs salina).**



**Figura 10: analisi degli effetti del trattamento cronico con nicotina (4 mg/kg/ora) e dopo 1 (WD1), 4 (WD4) o 14 (WD14) giorni di astinenza sull'espressione dei diversi sottotipi nicotinici mediante binding con <sup>3</sup>H-Epipatidina.** Le analisi sono state effettuate su sinaptosomi (P2) di corteccia cerebrale e talamo di topi  $\beta 2$  WT. I valori riportati sono espressi come fmol di recettori/mg di proteine. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando one-way ANOVA e *post hoc* Bonferroni test (\*\*P<0.01; \*P<0.05 vs salina).

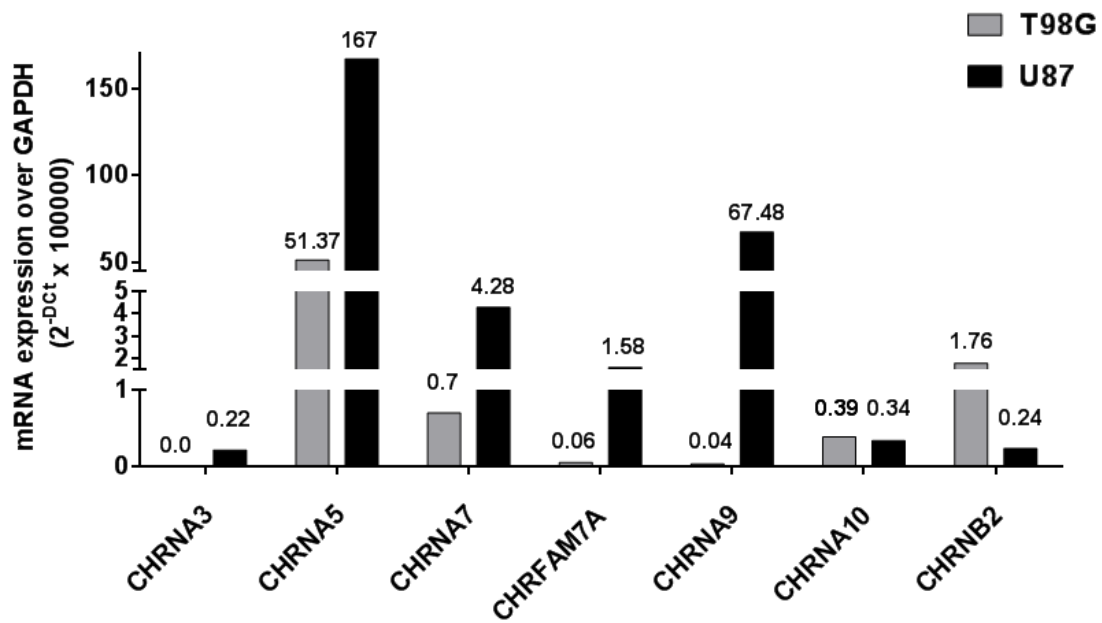


**Figura 11: analisi dei livelli di espressione delle subunità  $\alpha 4$  e  $\beta 2$  in sinaptosomi (P2) di corteccia (A) e talamo (B) di topi  $\beta 2$  WT dopo trattamento cronico e astinenza (WD1; WD4; WD14) da nicotina.** In ogni pannello sono riportati i western blot rappresentativi e le relative quantificazioni. Come controllo sono stati caricati campioni di estratti di corteccia di topi WT e KO. I valori riportati sono espressi come incremento rispetto al controllo non trattato. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando one-way ANOVA e test di Dunn's (\*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \* $P < 0.05$  vs salina).



**Figura 12: analisi del rapporto  $\beta 2/\alpha 4$  in corteccia e talamo.** In A negli omogenati totali e nei P2 di corteccia e talamo dei topi trattati con salina; paired t test  $**P=0.0039$  per gli omogenati; paired t test  $***P<0.0001$  per i P2. In B negli omogenati totali di tutti i gruppi sperimentali (salina, nicotina e tre tempi di WD). In C nelle frazioni P2 di tutti i gruppi sperimentali. In B e C i risultati sono espressi come aumento del rapporto  $\beta/\alpha$  rispetto al controllo. In B e C l'analisi statistica è stata condotta utilizzando one-way ANOVA e test di Dunn's ( $**P<0.01$ ;  $*P<0.05$  vs salina).

A



B

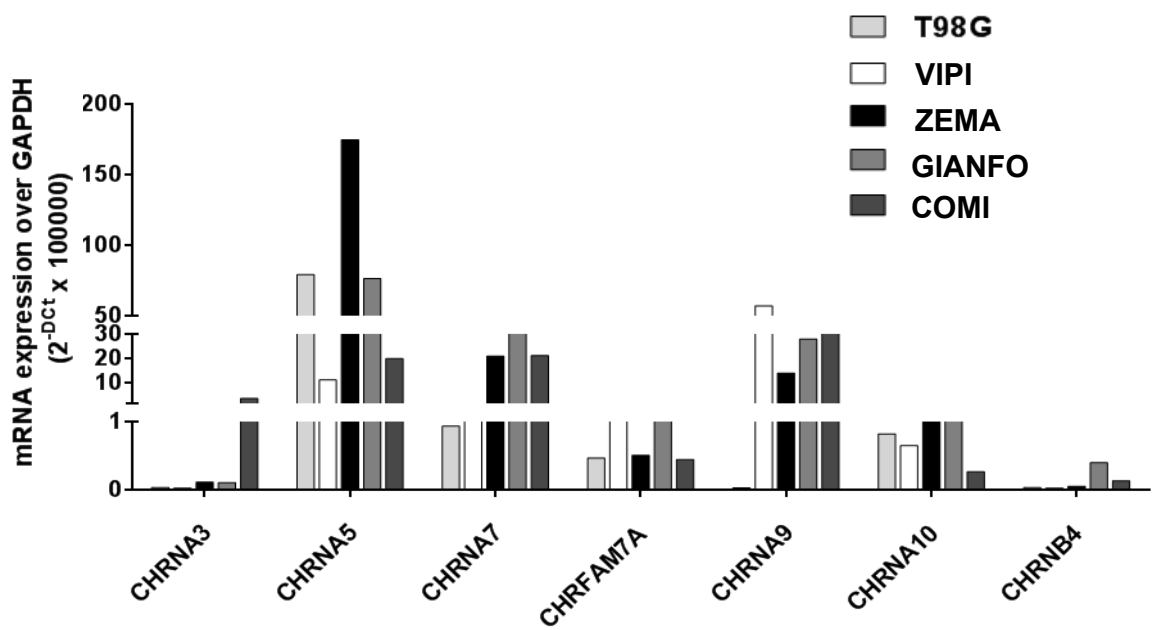
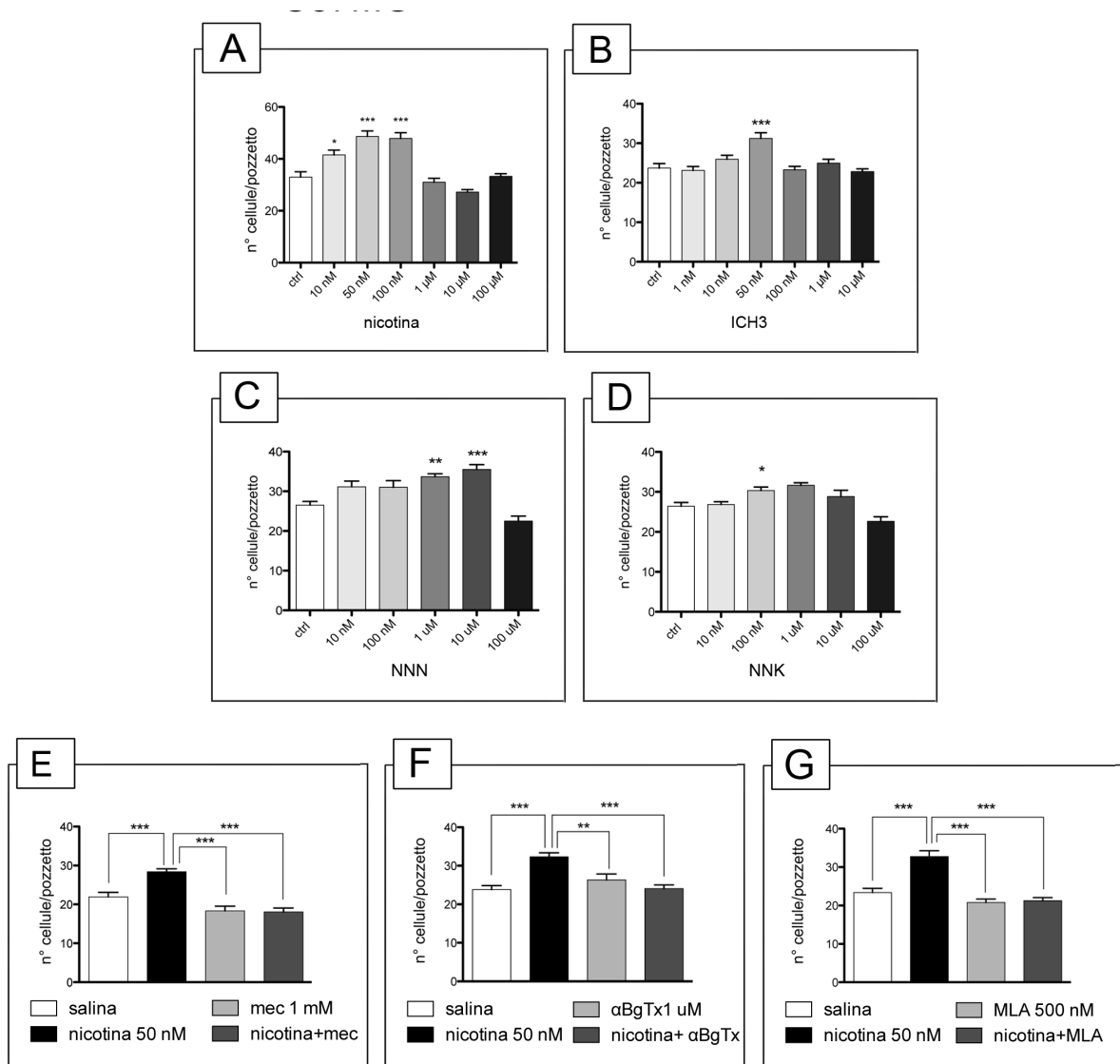
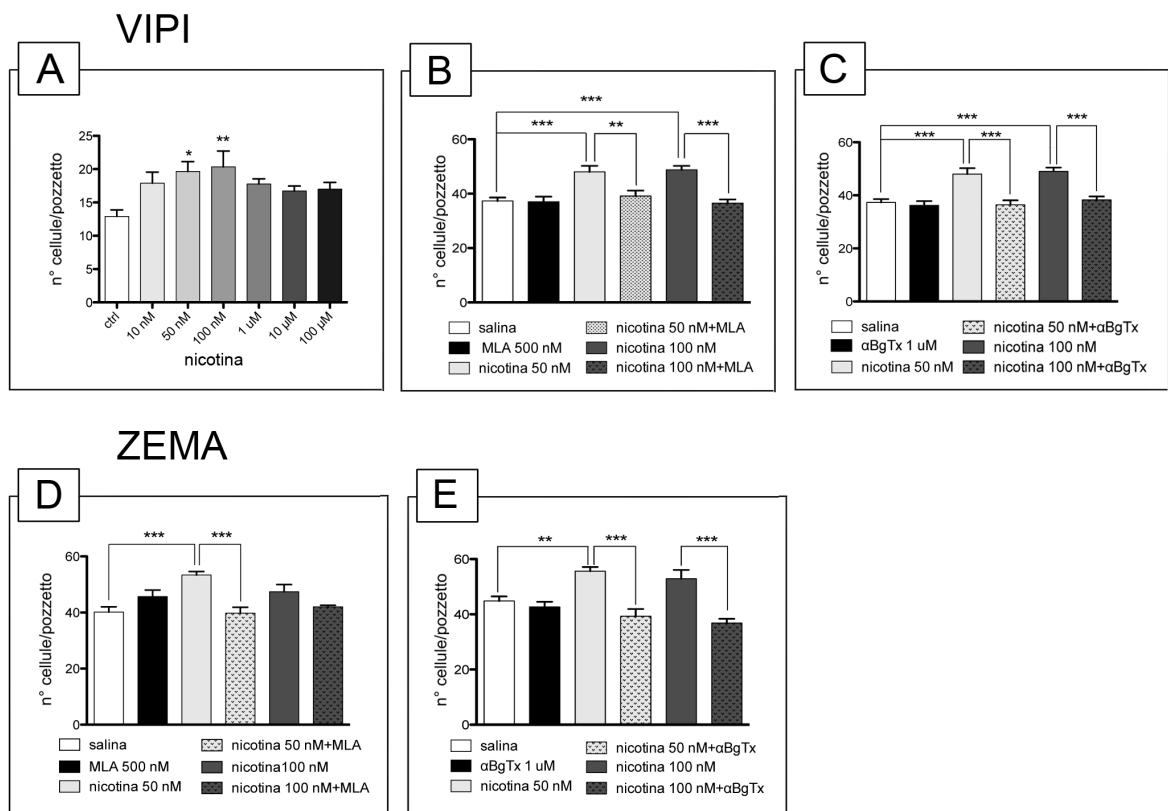


Figura 13: espressione dei trascritti delle subunità nicotiniche nella linea cellulare umana di glioma U87MG (A) e in linee primarie umane di glioblastoma (B), ottenuta mediante qRT-PCR. La linea T98G è stata utilizzata come controllo e i valori ottenuti sono stati normalizzati sulla quantità di trascritto della GAPDH secondo il metodo  $2^{-\Delta Ct}$ .

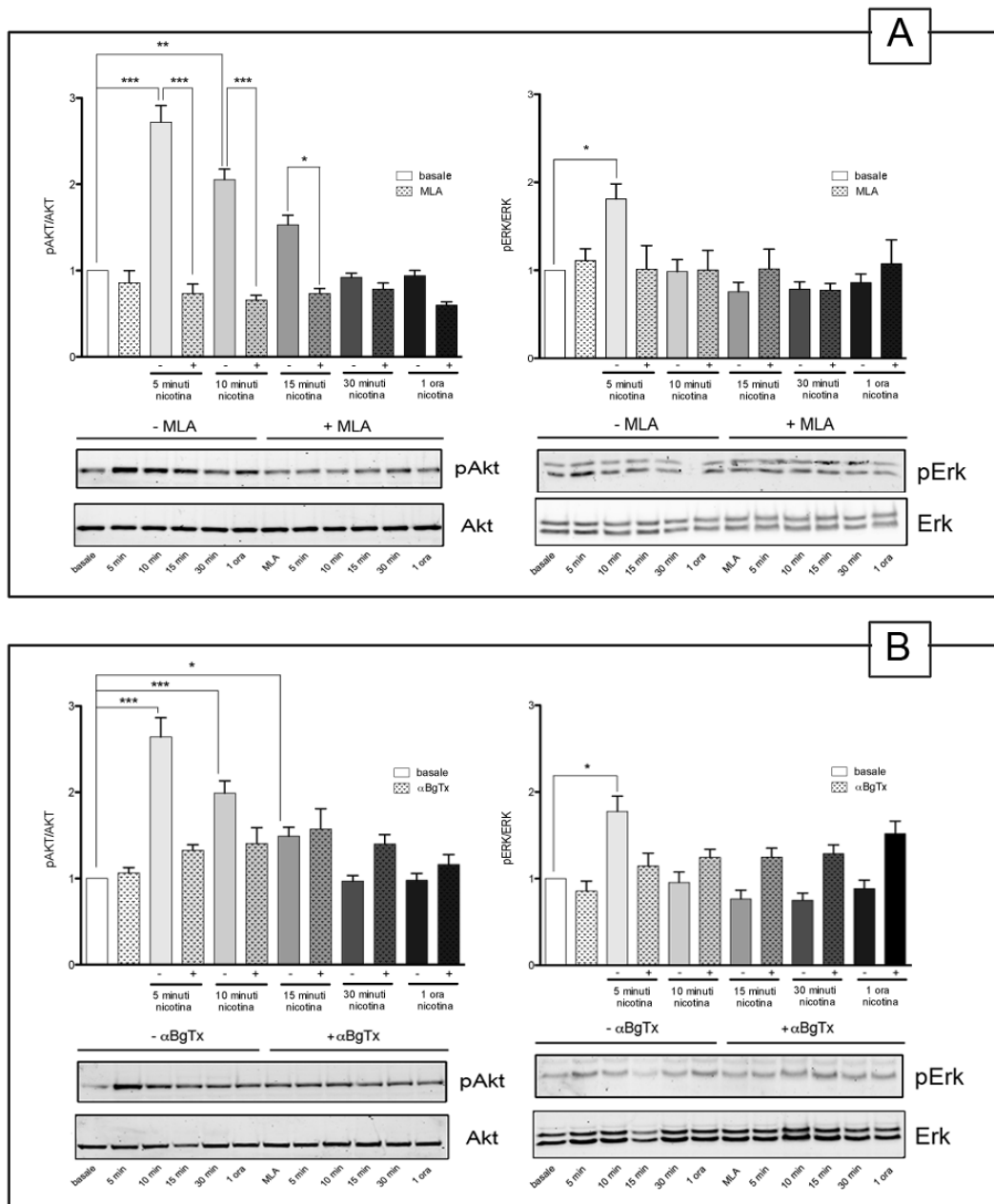


**Figura 14: effetto del trattamento cronico con nicotina, agonisti e antagonisti nicotinici sulla vitalità cellulare della linea stabile di glioma.** L'analisi è stata effettuata sulla linea stabile U87MG mediante conta delle cellule in seguito al trattamento di 72 ore con le concentrazioni indicate di nicotina (A), agonista nicotinico ICH3 (B), nitrosammine NNN (C) e NNK (D), antagonisti nicotinici mecamilamina (E), α-Bungarotossina (F) e MLA (G). I risultati sono la media di tre esperimenti in triplicato e sono espressi come numero di cellule vitali in ciascun pozzetto. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando one-way ANOVA e *post hoc* Bonferroni test (\*\*\*P<0.001; \*\*P<0.01; \*P<0.05).

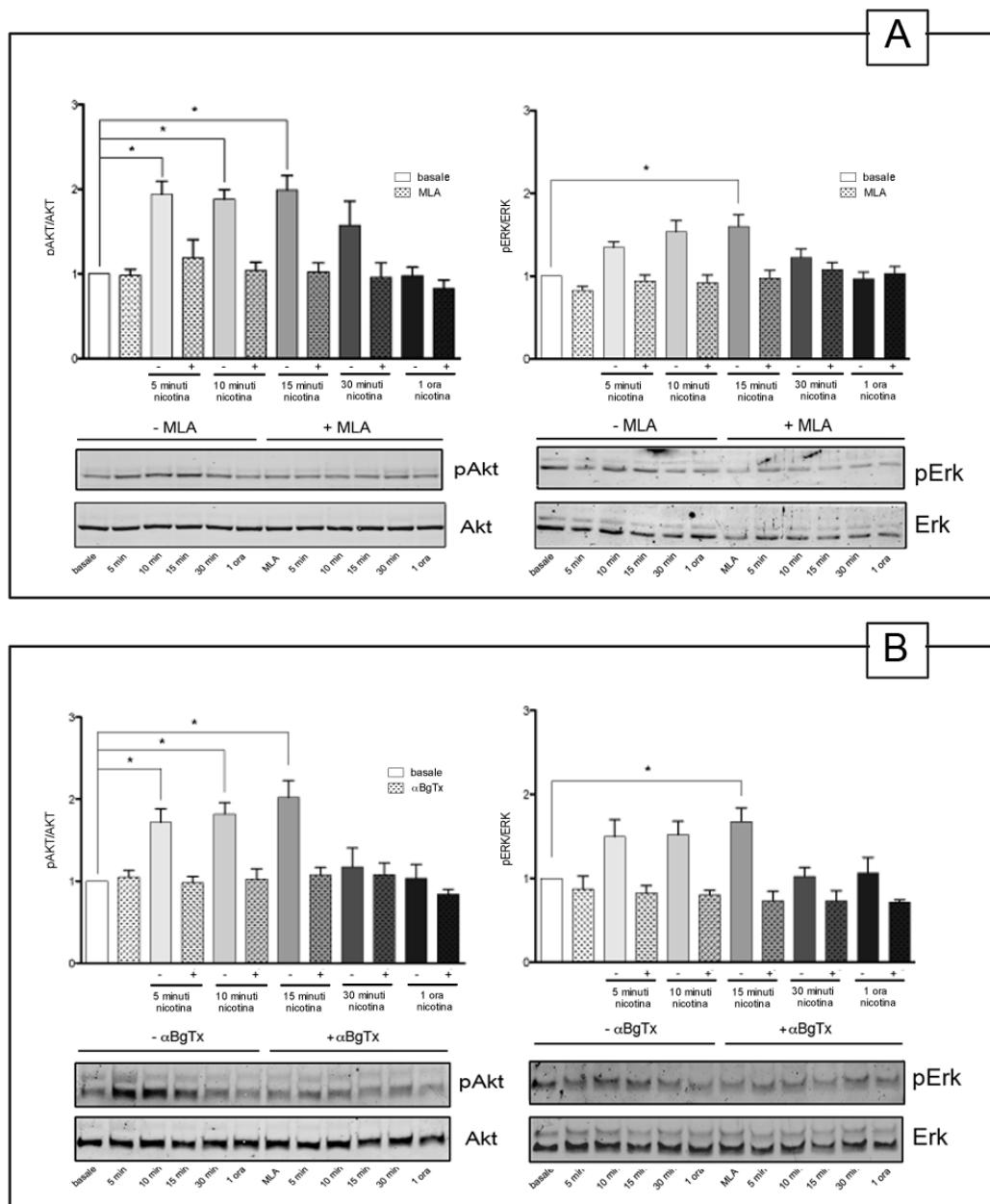


**Figura 15: effetto del trattamento cronico con nicotina e antagonisti nicotinici sulla vitalità cellulare delle linee primarie umane di glioblastoma.** L'analisi è stata effettuata su due diverse linee primarie umane di glioblastoma, VIPI (A; B; C) e ZEMA (D; E), mediante conta delle cellule in seguito al trattamento di 72 ore con le concentrazioni indicate di nicotina (A) e di nicotina in presenza degli antagonisti selettivi MLA (B e D) e  $\alpha$ -Bungarotossina (C e E). I risultati sono la media di tre esperimenti in triplicato e sono espressi come numero di cellule vitali in ciascun pozzetto. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando one-way ANOVA e *post hoc* Bonferroni test (\*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ ).

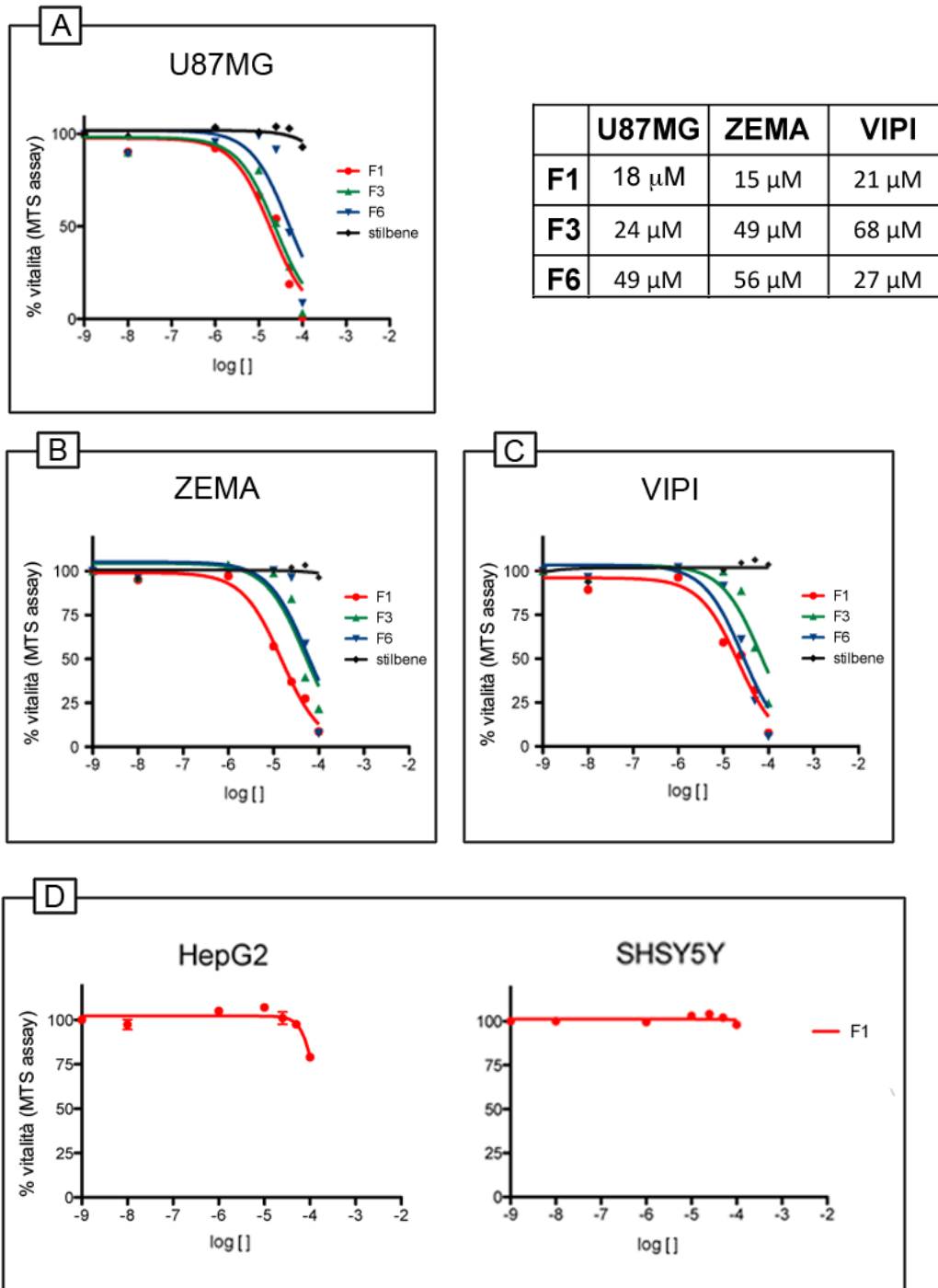




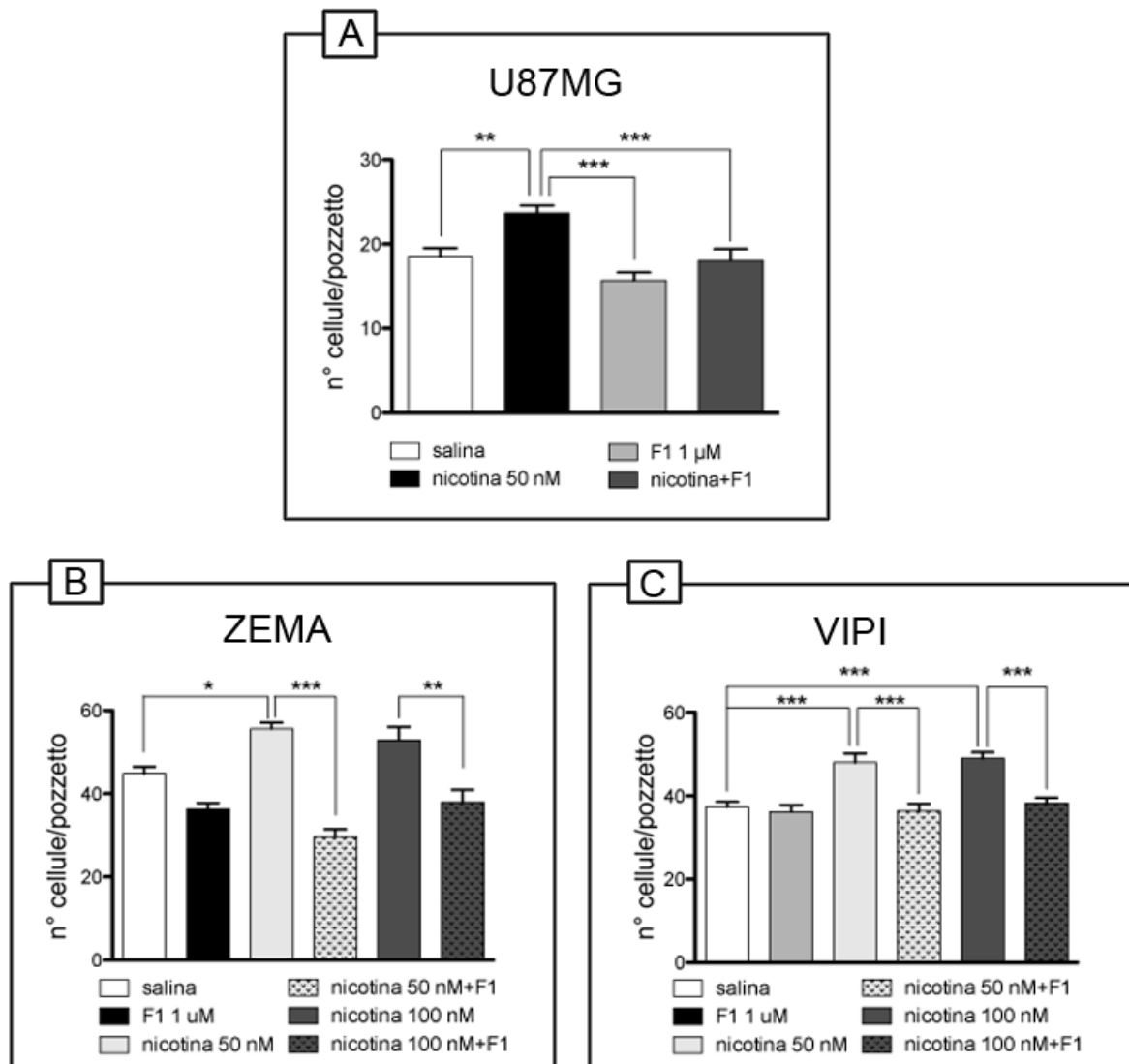
**Figura 16: analisi mediante western blotting dell'effetto tempo-dipendente del trattamento con 100 nM nicotina e antagonisti nicotinici sull'attivazione di Akt e Erk nella linea stabile U87MG.** Sono stati analizzati i livelli di fosforilazione di Akt e Erk in seguito a trattamenti brevi con nicotina (5, 10, 15, 30 e 60 minuti), in presenza o assenza di due diversi antagonisti nicotinici MLA (A) e  $\alpha$ -Bungarotossina (B), alle concentrazioni rispettivamente di 500 nM e 1  $\mu$ M. Le cellule sono state esposte per i tempi indicati a nicotina o a nicotina in presenza di antagonisti, sono state raccolte, lisate e separate in un gel al 9% di acrilamide. Le proteine sono state trasferite mediante western blotting e i blots incubati con gli anticorpi anti-Akt e anti-pAkt, anti-Erk e anti p-Erk. In ogni pannello sono riportati i western blot rappresentativi e le relative quantificazioni. I risultati sono espressi come rapporto tra la forma fosforilata della proteina e quella totale considerando questo parametro uguale ad 1 nelle cellule di controllo non trattate. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando one-way ANOVA e test di Dunn's (\*\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$  vs basale).



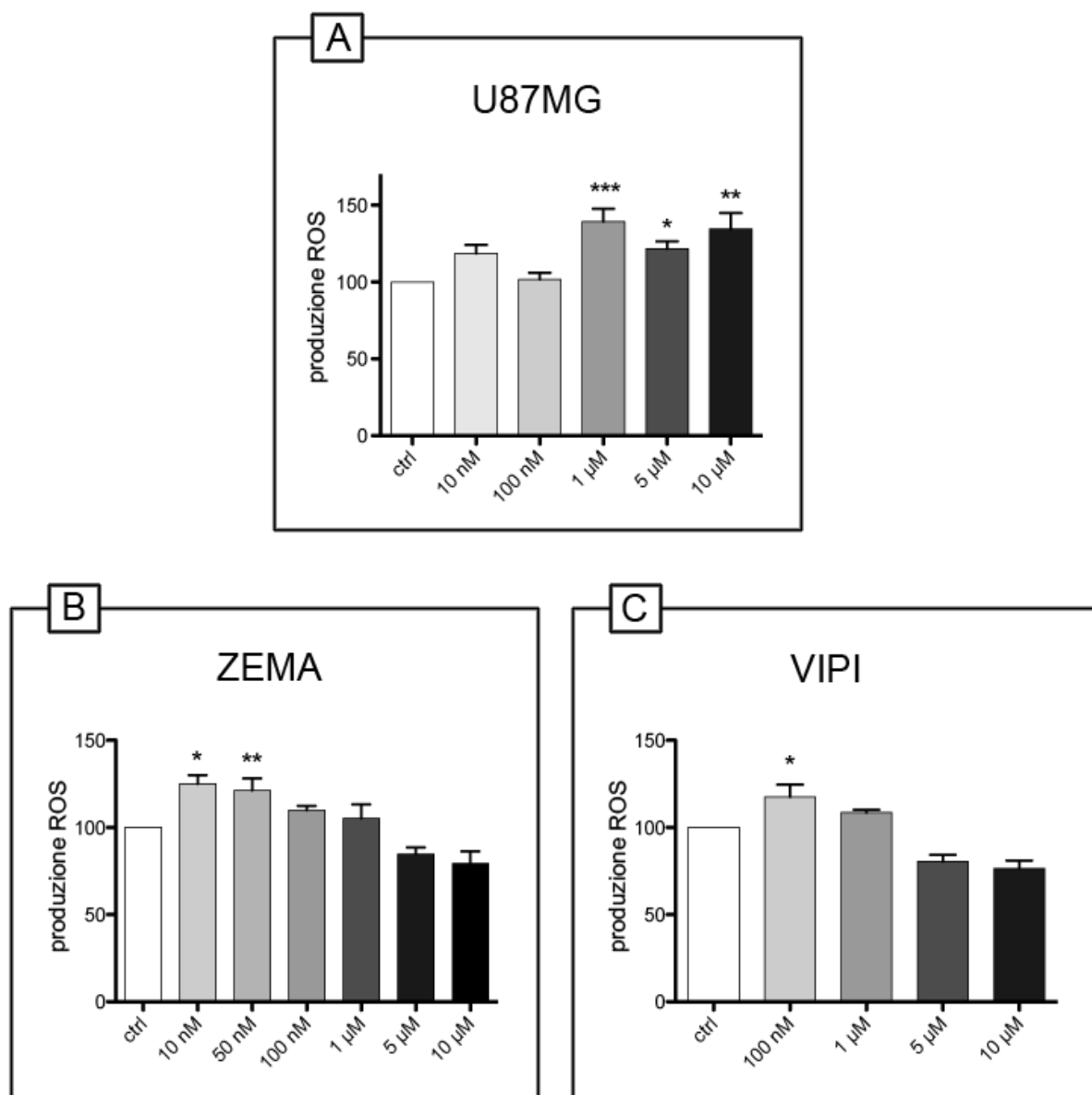
**Figura 17: analisi mediante western blotting dell' effetto tempo-dipendente del trattamento con nicotina 100 nM e antagonisti nicotinici sull'attivazione di Akt e Erk nella colture primaria umana VIPI.** Sono stati analizzati i livelli di fosforilazione di Akt e Erk in seguito a trattamenti brevi con nicotina (5, 10, 15, 30 e 60 minuti), in presenza o assenza di due diversi antagonisti nicotinici MLA (A) e  $\alpha$ -Bungarotossina (B), alle concentrazioni rispettivamente di 500 nM e 1  $\mu$ M. Le cellule sono state esposte per i tempi indicati a nicotina o a nicotina in presenza di antagonisti, sono state raccolte, lisate e separate in un gel al 9% di acrilamide. Le proteine sono state trasferite mediante western blotting e i blots incubati con gli anticorpi anti-Akt e anti-pAkt, anti-Erk e anti p-Erk. In ogni pannello sono riportati i western blot rappresentativi e le relative quantificazioni. I risultati sono espressi come rapporto tra la forma fosforilata della proteina e quella totale considerando questo parametro uguale ad 1 nelle cellule di controllo non trattate. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando one-way ANOVA e test di Dunn's (\*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; \*P<0.05 vs basale).



**Figura 18: effetto del trattamento con composti derivati dallo stilbene sulla vitalità delle cellule tumorali.** L'analisi è stata effettuata utilizzando il test dell' MTS a sulla linea stabile U87MG (A) e su due linee primarie umane di glioblastoma, ZEMA (B) e VIPI (C), in seguito al trattamento di 24 ore con dosi crescenti di F1, F3, F6 e stilbene. Come controllo, è stato valutato l'effetto del trattamento di 24 ore con F1 su due linee che non esprimono (D, HepG2) o esprimono bassi livelli mRNA per le subunità nicotinicche (D, SHSY5Y). I risultati sono la media di tre esperimenti e sono espressi come % di cellule vitali rispetto al controllo non trattato. In tabella sono riportati I valori di  $IC_{50}$  di ciascun farmaco in ciascuna delle linee analizzate.



**Figura 19: effetto del trattamento con F1 sulla vitalità delle cellule tumorali.** L'analisi è stata effettuata sulla linea stabile U87MG (A) e su due linee primarie umane di glioblastoma, ZEMA (B) e VIPI (C), mediante conta delle cellule in seguito al trattamento di 72 ore con F1, in presenza o meno di nicotina. I risultati sono la media di tre esperimenti in triplicato e sono espressi come numero di cellule vitali in ciascun pozzetto. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando one-way ANOVA e *post hoc* Bonferroni test (\*\* $P < 0.001$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ ).



**Figura 20: effetto del trattamento con F1 sulla produzione di specie reattive dell'ossigeno nelle cellule tumorali.** L'analisi è stata effettuata sulla linea stabile U87MG (A) e su due linee primarie umane di glioblastoma, ZEMA (B) e VIPI (C), utilizzando la sonda DCF-DA, in seguito al trattamento di 24 ore con dosi crescenti di F1. I risultati sono la media di tre esperimenti in triplicato. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando one-way ANOVA e test di Dunn's (\*\*P<0.01; \*P<0.05 vs controllo non trattato).

## DISCUSSIONE

### EFFETTI DEL TRATTAMENTO CRONICO CON NICOTINA SULL'ESPRESSIONE DEI nAChRs NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

I recettori colinergici nicotinici neuronali sono ampiamente espressi nel SNP e nel SNC a livello pre- e post- sinaptico, dove svolgono un ruolo fondamentale nel controllo della trasmissione nervosa e regolano il rilascio di numerosi neurotrasmettitori. La nicotina, che esplica le sua attività legandosi ai nAChRs, è la componente additiva presente nel tabacco ed è nota causare disturbi cardiovascolari e determinare effetti neurobiologici e fisiologici associati a dipendenza e *addiction* (Benowitz, 2008). Numerosi studi, condotti nel corso degli anni, hanno indagato e descritto svariati aspetti dei nAChRs, il loro assemblaggio, il traffico, e l'espressione dei vari sottotipi nelle diverse aree cerebrali (Colombo et al., 2014; Zoli et al., 2014; Changeux et al., 2010). Altri, come gli effetti del trattamento cronico con nicotina sui diversi sottotipi recettoriali, sono ancora da approfondire.

È noto dalla letteratura che l'esposizione cronica a nicotina determina un aumento del numero dei siti di legame e che tale aumento sia dovuto a meccanismi post-traduzionali e dipenda dal sottotipo recettoriale preso in esame, dall'area cerebrale analizzata e dal tipo di protocollo utilizzato per somministrare la nicotina (Marks et al., 1992; Parker et al., 2004; Lai et al., 2005).

La prima parte di questo progetto di ricerca ha avuto come scopo quello di identificare e chiarire gli effetti del trattamento cronico *in vivo* con dosi crescenti di nicotina, sull'espressione nel SNC dei diversi sottotipi di nAChRs in topi WT, Het e KO per le subunità  $\alpha 4$  e  $\beta 2$ . I dati riportati, ottenuti in cervelli *in toto* di topi C57BL/6, indicano chiaramente che la delezione anche di una sola delle due subunità nei topi WT, è condizione sufficiente per la perdita della metà dei siti di legame per la  $^3\text{H}$ -Epibatidina e che il trattamento con dosi crescenti di nicotina (0, 0.25, 1 e 4 mg/kg/ora) determina un aumento dose-dipendente di tali siti nei topi WT e Het, ma non nei topi KO, suggerendo che l'espressione delle subunità  $\alpha 4$  e  $\beta 2$  siano necessarie per l'up-regolazione indotta da nicotina. L'aumento dei siti di legame è associato ad un aumento di espressione delle subunità  $\alpha 4$  e  $\beta 2$ , indicando il recettore  $\alpha 4\beta 2$  come quello più soggetto all'up-regolazione indotta dal trattamento cronico con nicotina. I dati di immunoprecipitazione, in accordo con i dati presenti in letteratura (Gotti et al., 2007), confermano che il sottotipo  $\alpha 4\beta 2$  è quello maggiormente espresso nel SNC sia dei topi WT che dei topi Het per entrambe le subunità. L'espressione di tale sottotipo risulta essere quasi la metà negli animali  $\alpha 4\text{Het}$  e  $\beta 2\text{Het}$  rispetto ai topi WT e quasi del tutto assente nei topi KO, indicando che è il maggiormente affetto dalla delezione anche di una sola delle due subunità. Come atteso, i risultati mostrano che il trattamento cronico con nicotina non ha alcun effetto

sui recettori contenenti le subunità  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 3$  e  $\beta 4$ , mentre la subunità  $\alpha 3$  è up-regolata in seguito al trattamento e associata quindi a formare recettori  $\alpha 3\beta 2$ , piuttosto che  $\alpha 3\beta 4$ .

Un ulteriore grado di complessità nella struttura dei nAChRs, oltre che la diversa combinazione in subunità, si riscontra in quei sottotipi che presentano la stessa composizione in subunità, ma una diversa stechiometria. E' noto in letteratura che il sottotipo  $\alpha 4\beta 2$  è presente nel SNC in due diverse stechiometrie, con due o tre subunità  $\alpha$  all'interno del pentamero; le due conformazioni hanno diverse caratteristiche farmacologiche e proprietà funzionali e sono differenzialmente regolate dal trattamento cronico con nicotina (Nelson et al., 2003; Moroni et al., 2006; Krashia et al., 2010). In particolare, è noto che il trattamento con nicotina favorisce *in vitro* la stechiometria  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$  (Gotti et al., 2008). Scopo di questa prima parte del progetto è stato anche quello di analizzare gli effetti *in vivo* del trattamento cronico e dell'astinenza da nicotina sull'up-regolazione e sulla stechiometria del sottotipo  $\alpha 4\beta 2$ , in due aree specifiche del cervello dei roditori, talamo e corteccia, aree che rispondono differenzialmente al trattamento con nicotina. Dati precedenti presenti in letteratura, evidenziano, dopo trattamento con nicotina, un aumento del binding per  $\alpha 4\beta 2$  non uniforme in queste due aree, in particolare maggiore nella corteccia rispetto al talamo (Marks et al., 2011; Doura et al., 2008). I dati da noi ottenuti analizzando queste due specifiche aree cerebrali, evidenziano che i recettori  $\alpha 4\beta 2$  espressi nel talamo hanno un più alto contenuto di  $\beta 2$  rispetto alla corteccia e che quindi, in condizioni basali, nel talamo il recettore eteromero  $\alpha 4\beta 2$  è maggiormente presente con la stechiometria  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ . Il trattamento cronico *in vivo* con nicotina induce un'up-regolazione dei  $\alpha 4\beta 2$  nAChRs, più evidente nella corteccia rispetto al talamo, dove l'aumento è significativo solo nella frazione sinaptosomale e non nell'omogenato totale. L'up-regolazione indotta da nicotina è principalmente dovuta, nella corteccia, ad un aumento del recettore  $\alpha 4\beta 2$  con stechiometria  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ . Il trattamento con nicotina favorisce quindi l'assemblaggio di nAChRs contenenti tre subunità  $\beta 2$ ; tale fenomeno ha un impatto più evidente nella corteccia, dove questa stechiometria del recettore è meno rappresentata, rispetto al talamo, che già negli animali controllo non trattati con nicotina, presenta un maggior contenuto di recettori con stechiometria  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ . Il cambiamento della stechiometria che avviene nella corteccia dopo esposizione cronica a nicotina, è transiente e scompare dopo 4 giorni dalla fine del trattamento. Questi dati sono in accordo con quanto trovato da Turner et al., 2011 e Hilario et al., 2012, ma differente da quanto scoperto in campioni di corteccia umana da Cosgrove et al., 2009, dove i livelli di espressione dei  $\beta 2$ \*nAChRs rimanevano elevati fino a 12 giorni dalla fine del trattamento con nicotina. La differenza di up-regolazione dei recettori nicotinici durante la fase di astinenza può essere dovuta ad un diverso metabolismo e ad una diversa farmacocinetica della nicotina nell'uomo rispetto al topo (Matta et al., 2007). Altro dato importante ottenuto dalle nostre analisi e in accordo con lavori precedenti (Whiteaker et al.,

2006), è che, almeno nella corteccia, le subunità  $\alpha 4$  e  $\beta 2$  sono presenti in recettori eteromerici maturi e assemblati; esperimenti di immunoprecipitazione con anticorpi anti- $\alpha 4$ , mostrano infatti una perdita del 95% dei siti di legame per la  $^3\text{H}$ -Epibatidina e la successiva analisi western blotting dei surnatanti evidenzia la riduzione della subunità  $\beta 2$ , che è invece presente dopo l'immunoprecipitazione con le IgG di controllo.

Le frazioni di sinaptosomi crudi da noi ottenute, che contengono sia la porzione pre-sinaptica che la porzione post-sinaptica, non ci permettono però di discriminare la localizzazione del recettore che viene up-regolato e che cambia la sua stechiometria. È noto però che la maggior parte dei  $\alpha 4\beta 2$  nAChRs è espressa a livello pre-sinaptico (Wonnacott, 1997) e che la localizzazione dei  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$  a livello pre-sinaptico indotta dal nicotina permette un più efficace rilascio di neurotrasmettitori e amplifica l'effetto della nicotina stessa (Nelson et al., 2003).

Saranno da effettuare altri studi per capire quale sia il meccanismo attraverso cui la nicotina induce l'aumento dei recettori  $\alpha 4\beta 2$ , in particolare dei  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ . Studi *in vitro* hanno dimostrato che la nicotina può agire come *chaperone* molecolare a livello del RE, mediando l'up-regolazione dei diversi sottotipi recettoriali (Salette et al., 2004; Kuryatov et al., 2005); può inoltre favorire il trasporto lungo la via secretoria dei nAChRs, senza alterare l'internalizzazione dei recettori in membrana (Darsow et al., 2005) o inibire il proteasoma e quindi la degradazione delle subunità nicotiniche (Rezvani et al., 2007). Inoltre, recenti studi condotti *in vitro* suggeriscono che la nicotina favorisca l'assemblaggio dei recettori costituiti da due subunità  $\alpha$  e tre subunità  $\beta$ , e che questa combinazione sia quella più trasportata in membrana e meno sensibile alla degradazione (Srinivasan et al., 2011; Mazzo et al., 2013).

## **RECETTORI NICOTINICI NON-NEURONALI: EFFETTI DEL TRATTAMENTO CON NICOTINA, AGONISTI E ANTAGONISTI NICOTINICI NELLA TERAPIA DEI GLIOBLASTOMI**

Il consumo di tabacco è un noto fattore di rischio associato all'insorgenza di tumore. Questa correlazione è particolarmente evidente nel caso del tumore polmonare e numerosi studi, nel corso degli anni, hanno indagato gli effetti della nicotina e del fumo di sigaretta sull'insorgenza e la progressione di questo tumore. Gli effetti addittivi della nicotina, sostanza di per se non cancerogena, incentivano il consumo di tabacco, e la presenza nel fumo di tabacco di sostanze che sono invece potenti agenti cancerogeni, quali le nitrosamine NNN e NNK e le amine eterocicliche, determinano la comparsa nel DNA di mutazioni, che portano alla trasformazione neoplastica e allo sviluppo di cancro. Mentre da una parte ha un ruolo limitato nella fase di sviluppo del tumore, dall'altra parte la nicotina sostiene la crescita tumorale e partecipa alla fase di metastatizzazione, regolando *signaling* intracellulari che



mediano proliferazione cellulare, apoptosi e angiogenesi. La recente scoperta che i nAChRs sono espressi anche in cellule non-neuronali, quali cellule endoteliali, cheratinociti, cellule del sistema immunitario e cellule gliali, ha spinto numerosi gruppi a indagare il ruolo dei nAChRs anche in tessuti extra-neuronali e in condizioni patologiche (Shuller et al., 1995; Dasgupta et al., 2009; Heeschen et al., 2001).

Ben descritti in letteratura sono gli effetti della nicotina su vari tipi di cellule tumorali e numerosi sono i tumori la cui crescita è promossa dal trattamento con nicotina; tra questi i carcinomi SCLC e NSCLC, il tumore al pancreas, al fegato, al colon, al seno e al rene. Inoltre, SNPs in geni codificanti per i nAChRs determinano un'aumentata suscettibilità allo sviluppo di tumori (Wu et al., 2011; Jensen et al., 2012; Russo et al., 2012). Ancora da chiarire è invece l'effetto del fumo sull'eziologia dei gliomi, le più aggressive forme di tumore che colpiscono le cellule gliali, caratterizzati da una rapida proliferazione cellulare, da elevate capacità invasive, da radioresistenza ed elevata frequenza di ricomparsa dopo la rimozione chirurgica. Quello che è noto è che i soggetti fumatori rappresentano una porzione predominante tra gli individui a cui viene diagnosticato questo tipo di tumore (Khalil et al., 2012).

Sulla base dei dati presenti in letteratura, secondo cui la nicotina può agire come *promoter* di numerosi tipi di tumore, scopo di questa parte della ricerca è stato quello di determinare quali fossero gli effetti del trattamento con nicotina e con antagonisti nicotinici sulla crescita di cellule di glioma e su colture primarie umane di glioblastoma, derivate da pazienti con diverso stadio di tumore. In primo luogo abbiamo verificato che le linee cellulari di glioma U87MG e le colture primarie di glioblastoma utilizzate nei nostri esperimenti, esprimessero i nAChRs. I dati di qRT-PCR hanno confermato l'espressione dei mRNAs delle subunità  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 7$  duplicata (il cui ruolo, anche se ancora largamente sconosciuto, sembra essere quello di agire da dominante negativo del recettore  $\alpha 7$ ),  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$  e  $\beta 2$ , in tutte le linee analizzate.

La caratterizzazione farmacologica dei nAChRs espressi nelle linee di glioma era importante per definire meglio i sottotipi recettoriali espressi in queste linee cellulari e il loro eventuale coinvolgimento nella progressione tumorale. Mediante studi di vitalità e proliferazione cellulare, sono stati quindi indagati gli effetti di nicotina, agonisti e antagonisti nicotinici su queste linee tumorali. I dati da noi ottenuti evidenziano che il trattamento cronico di 72 ore con nicotina induce un aumento dose-dipendente della proliferazione della linea stabile di glioma U87MG e di due colture primarie umane di glioblastoma. Questi dati sono in accordo con quanto dimostrato da Khalil et al., 2012. Analogamente, il trattamento cronico di 72 ore con concentrazioni crescenti di due diverse nitrosammine derivate dalla combustione della nicotina e potenti agenti cancerogeni, NNN e NNK, aumenta significativamente la vitalità delle cellule tumorali U87MG. È noto che le nitrosammine più che la nicotina di per sé, sono in grado di determinare l'insorgenza di tumore, come per esempio di tumore al polmone in

animali da laboratorio (Shuller and Orloff, 1998), attraverso il loro legame con i  $\alpha 7$ nAChRs e il conseguente ingresso di  $Ca^{2+}$  in cellula. Il trattamento con NNK e NNN stimola la proliferazione di SCLC attraverso l'attivazione di PKC, RAF1, ERK1 ed ERK2 (Cattaneo et al., 1993; Jull et al., 2001), stimola la migrazione (Xu and Deng, 2004) e inibisce l'apoptosi di SCLC attraverso l'attivazione di Bcl-2 (Jin et al., 2004).

Come descritto precedentemente, è noto che il recettore omomeroico  $\alpha 7$  è quello maggiormente implicato nell'aumento della proliferazione cellulare indotta da nicotina e NNK, e il principale sottotipo responsabile dello sviluppo e della progressione tumorale *in vivo* (Shuller, 2009). Poiché i livelli di trascritto per la subunità  $\alpha 7$  sono risultati significativamente elevati sia nella linea stabile U87MG che nelle linee primarie, la nostra attenzione si è focalizzata quindi sul ruolo del recettore omomeroico  $\alpha 7$  nella progressione di questo tumore. I risultati ottenuti, mostrano che il trattamento cronico di 72 ore con concentrazioni crescenti di ICH3, un agonista selettivo  $\alpha 7$  precedentemente caratterizzato nel nostro laboratorio, aumenta significativamente la vitalità delle cellule tumorali U87MG. Abbiamo quindi valutato l'effetto del trattamento cronico con gli antagonisti selettivi mecamilamina,  $\alpha$ -Bungarotossina e MLA e i risultati evidenziano che il co-trattamento con nicotina e i diversi antagonisti, riduce in maniera significativa il numero di cellule di glioma e di GBM vitali, rispetto alle stesse cellule trattate solo con nicotina. Questi dati indicano che i recettori nicotinici contenenti la subunità  $\alpha 7$  mediano realmente questo aumento di proliferazione indotto sia dalla nicotina che da specifici agonisti  $\alpha 7$ , dato in accordo con quanto già dimostrato per altri tipi di tumore (Grozio et al., 2008; Paleari et al., 2009; Alama et al., 2011).

Numerosi studi sono stati condotti per mettere in luce i meccanismi molecolari coinvolti nell'effetto della nicotina e delle nitrosamine sull'aumento della proliferazione cellulare; tali studi hanno rivelato l'attivazione da parte dei nAChRs di molteplici *signalling* intracellulari, che regolano geni coinvolti oltre che nella proliferazione, anche nella sopravvivenza cellulare e nella resistenza agli stimoli apoptotici, nella regolazione del ciclo cellulare, nell'angiogenesi e nei processi di metastasi (Schaal and Chellappan, 2014). Tra questi, ci siamo focalizzati sull'effetto della nicotina su due possibili target, la via della protein chinasi Akt, nota in letteratura per avere effetti anti-apoptotici, e la via della protein chinasi Erk, via che stimola la proliferazione cellulare. Il significativo e tempo-dipendente aumento dei livelli di fosforilazione di Akt e di Erk, è in accordo con quanto già evidenziato per altri tipi di tumore, come per esempio per cellule tumorali polmonari (Tsurutani et al., 2005), e suggeriscono l'attivazione di una cascata intracellulare di eventi che porta all'aumento della proliferazione cellulare visibile dopo 72 ore di trattamento con nicotina. Questo effetto di aumento della fosforilazione di Akt e di Erk è indotto dalla nicotina e bloccato dal pre-trattamento con gli antagonisti selettivi  $\alpha 7$ , MLA e  $\alpha$ -Bungarotossina sia nella linea stabile

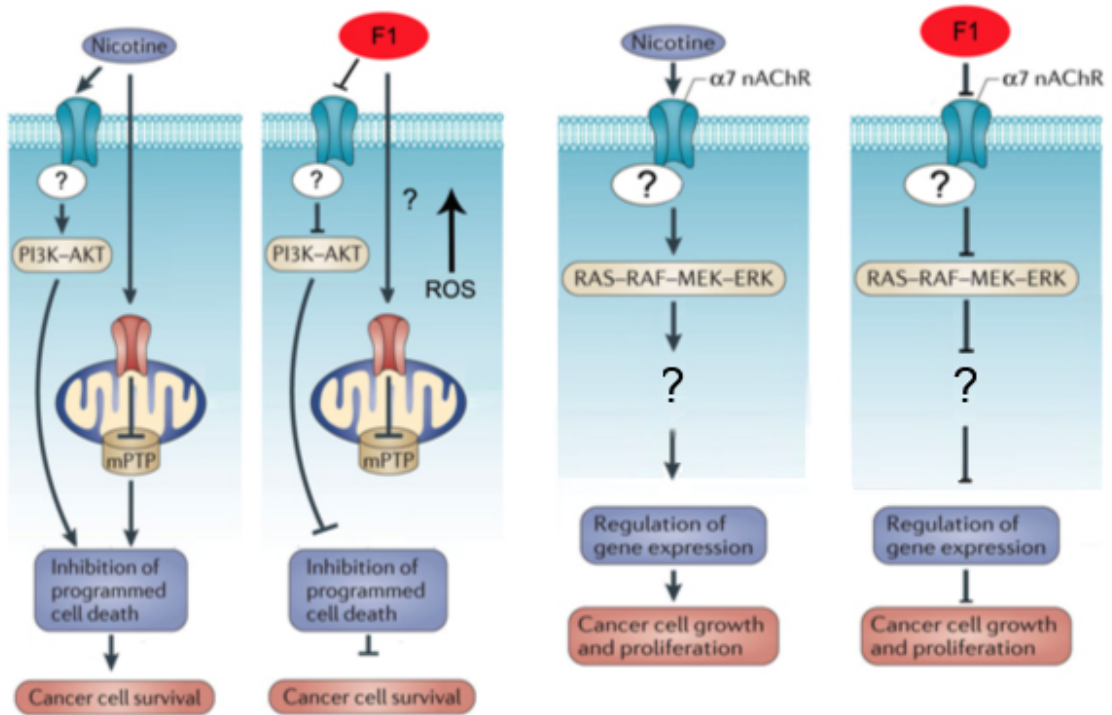
U87MG che nelle colture primarie umane di glioblastoma, suggerendo che il sottotipo recettoriale  $\alpha 7$  sia coinvolto in tale fenomeno.

Nel nostro laboratorio sono stati precedentemente caratterizzati alcuni farmaci derivati dallo stilbene F1, F3 e F6, di cui è stata verificata l'affinità per i sottotipi recettoriali nicotinici. I dati di binding effettuati sui sottotipi di pollo avevano mostrato una selettività dei composti verso il sottotipo  $\alpha 7$  e successivi studi hanno confermato un'alta affinità dei composti verso il sottotipo di ratto e umano (Gotti et al., 1998). Dal momento che il recettore  $\alpha 7$  è considerato uno dei principali recettori nicotinici coinvolti nella progressione tumorale, abbiamo voluto analizzare gli effetti dei tre composti stilbenici come antagonisti di tale recettore. I risultati da noi ottenuti mostrano che i farmaci F1, F3 ed F6 influiscono sulla vitalità cellulare di tutte le linee tumorali analizzate, determinando una riduzione del metabolismo cellulare in maniera dose-dipendente. Altro dato importante da noi ottenuto, è che il farmaco più potente F1 non altera, se non a dosi più alte rispetto a quelle attive sulle linee di glioma e glioblastoma ( $>200 \mu\text{M}$ ), la vitalità cellulare né di una linea di epatociti umani che non esprime i recettori nicotinici (HepG2) né di una linea di neuroblastoma umano che esprime bassi livelli di mRNA per le subunità nicotiniche (SH-SY5Y). Inoltre, il composto costituito esclusivamente dallo scheletro di stilbene, privo quindi dei residui importanti per determinare l'affinità verso i recettori nicotinici non altera significativamente la vitalità delle cellule ( $\text{IC}_{50} >100 \mu\text{M}$ ), suggerendo che l'effetto dei composti sulla vitalità sia dovuto, almeno in parte, alla loro azione come antagonisti nicotinici  $\alpha 7$ . Questi dati sono confermati anche dalla riduzione della vitalità delle cellule di glioma e glioblastoma in seguito al co-trattamento con nicotina.

Studi recenti hanno dimostrato che i derivati del resveratrolo possono essere citotossici per le cellule tumorali e determinare un'aumento nella produzione ROS (Sassi et al., 2014). Il resveratrolo è stato studiato anche per le sue proprietà anti-infiammatorie e anti-ossidanti e un suo analogo naturale, il pterostilbene, che possiede una maggiore liposolubilità, riduce la proliferazione di diversi tipi di cellule tumorali attraverso l'alterazione del ciclo cellulare, l'aumento dell'apoptosi e la riduzione di metastasi (Mena et al., 2012). Uno studio recente ha mostrato che il meccanismo attraverso cui il pterostilbene svolge la sua attività antitumorale *in vivo* e *in vitro* in una linea di SCLC, le A549, è legata alla via di segnalazione di Notch 1 (Yang et al., 2013). Inoltre, è stato dimostrato che i  $\alpha 7\text{nAChRs}$ , ma anche non- $\alpha 7\text{nAChRs}$ , sono espressi sulla membrana esterna dei mitocondri; attraverso il legame con questi recettori, la nicotina può quindi bloccare l'apertura del poro mitocondriale, il rilascio di citocromo C e le fasi iniziali del processo apoptotico (Chernyavsky et al., 2015).

Abbiamo quindi verificato se il composto F1, contenente il gruppo stilbenico presente nel resveratrolo, potesse influenzare la produzione di radicali liberi. I dati ottenuti mostrano che il trattamento con dosi crescenti di F1 determina un aumento della produzione di ROS sia nella

linea U87MG che in due diverse linee primarie di GBM, seppur a dosi differenti. Questo ci ha portato ad ipotizzare ad un duplice effetto del composto F1 sull'inibizione della crescita di questo tipo di tumore, da una parte dovuto al suo effetto come antagonista dei  $\alpha 7$  nAChRs, dall'altra al suo effetto sull'aumento di ROS e al conseguente aumento di morte cellulare.



**Rappresentazione schematica dei pathway intracellulari attivati dalla nicotina per promuovere la crescita cellulare e la proliferazione tumorale e del duplice meccanismo d'azione del composto F1**

Complessivamente questi dati indicano che i recettori nicotinici sono espressi in linee primarie umane di glioblastoma e che il sottotipo  $\alpha 7$  media la proliferazione di queste cellule tumorali attraverso la via delle protein chinasi Akt e Erk, suggerendo che i recettori nicotinici  $\alpha 7$  potrebbero rappresentare una nuova strategia terapeutica nel trattamento di gliomi e glioblastomi. Alcuni dei nostri derivati stilbenici sono in grado di inibire la proliferazione cellulare a dosi relativamente basse, attraverso l'inibizione dei recettori sensibili alla  $\alpha$ -Bungarotossina, l'aumento della produzione di ROS e, dati preliminari suggeriscono anche attraverso l'inibizione della proliferazione cellulare attraverso le vie di Akt e Erk. I meccanismi alla base di questo fenomeno sono ancora da studiare e caratterizzare e questo sar  oggetto degli studi del laboratorio negli anni futuri.

## BIBLIOGRAFIA

- Adii M., Baldwin AS. *IKK-i/IKKepsilon controls constitutive, cancer cell-associated NF-kappaB activity via regulation of Ser-536 p65/RelA phosphorylation*. J Biol Chem 2006; 281:26976-984
- Aguirre J., Lambeth JD. *Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals*. Free Radic Biol Med 2010; 49: 1342-53
- Alama A., Bruzzo C., Cavalieri Z., Forlani A., Utkin Y., Casciano I., Romani M. *Inhibition of the nicotinic acetylcholine receptors by cobra venom  $\alpha$ -neurotoxin: is there a perspective in lung cancer treatment?* Plos One 2011; 6: e20695
- Almeida L., Vaz-da-Silva M., Falcao A., Soares E., Costa R., Loureiro AI., Fernandes-Lopes C., Rocha JF., Nunes T., Wright L., Soares-da-Silva P. *Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers*. Mol Nutr Food Res 2009; 53:1-15
- Arredondo J., Chernyavsky AI., Jolkovsky DL., Pinkerton KE., Grando SA. *Receptor-mediated tobacco-toxicity: cooperation of the Ras/Raf-1/MEK1/ERK and JAK-2/STAT-3 pathways downstream of  $\alpha$ 7 nicotinic receptor in oral keratinocytes*. FASEB J 2006; 20:2093-101
- Badr G., Al-Sadoon MK., Rabah DM. *Therapeutic efficacy and molecular mechanism of snake venom-loaded silica nanoparticles in the treatment of breast cancer- and prostate cancer- bearing experimental mouse models*. Free Radic Biol Med 2013; 65: 175-89
- Baldi A., De Luca A., Esposito V., Campioni M., Spugnini EP., Citro G. *Tumor suppressors and cell-cycle proteins in lung cancer*. Patholog Res Int 2011; 2011:605042
- Baldwin PR., Alanis R., Salas R. *The role of the habenula in nicotine addiction*. J Addict Res Ther 201; S1(2).pii:002
- Bao S., Wu Q., McLendon RE., Hao Y., Shi Q., Hjelmeland AB., Dewhirst MW., Bigner DD., Rich JN. *Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response*. Nature 2006; 444: 756:60
- Becchetti A. *Ion channels and transporters in cancer. Ion channels and cell proliferation in cancer*. Am J Physiol Cell 2011; 301: C255-C265
- Beier D., Hau P., Proescholdt M., Lohmeier A., Wischhunsen J., Oefner PJ., Aigner L., Brawanski A., Bogdahn U., Beier CP. *CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles*. Cancer Res 2007; 67:4010-5
- Benfante R., Antonini RA., De Pizzol M., Gotti C., Clementi F., Locati M., Fornasari D. *Expression of the alpha7 nAChR subunit duplicate form (CHRFAM7A) is down-regulated in the monocytic cell line THP-1 on treatment with LPS*. J Neuroimmunol 2011; 230: 74-84
- Benowitz NL. *Neurobiology of nicotine addiction: implications for smoking cessation treatment*. Am J Med 2008; 121: S3-10
- Beretta F., Bassani S., Binda E., Verpelli C., Bello L., Galli R., Passafaro M. *The GluR2 subunit inhibits proliferation by inactivating Src-MAPK signaling and induces apoptosis by means of caspase3/6-dependent activation in glioma cells*. Eur J Neurosci 2009; 30: 25-34

- Bezerra DP., Alves AP., de Alencar NM., Mesquita Rde O., Lima MW., Pessoa C., de Moraes MO., Lopes JN, Lopes NP., costa-Lotufu LV. *Antitumor activity of two derivatives from 2-acrylamine -1,4- naphthoquinone in mice bearing S180 tumor.* J Exp Ther Oncol 2008; 7:113-21
- Boocock DJ., Faust GE., Patel KR., Schinas AM., Brown VA., Ducharme MP., Booth TD., Crowell JA., Perloff M., Gescher AJ., Steward WP., Brenner DE. *Phase I dose escalation pharmacokinetics study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007; 16: 1246-52
- Bordey A., Sontheimer H. *Ion Channel expression by astrocytes in situ: comparison of different CNS regions.* Glia 2000; 30:27-38
- Broadbent S., Groot-Kormelink PJ., Krashia PA., Harkness PC., Millar NS., Beato M., Sivilotti LG. *Incorporation of the beta3 subunit has a dominant-negative effect on the function of recombinant central-type neuronal nicotinic receptors.* Mol Pharmacol 2006; 70:1350-7
- Brown KC., Lau JK., Dom AM., Witte TR., Luo H., Crabtree CM., Shah YH., Shiflett BS., Marcelo AJ., Proper NA., Hardman WE., Egleton RD., Chen YC., Mangiarua EI., Dasgupta P. *MG624, an alpha7 nAChRs antagonist, inhibits angiogenesis via the Egr-1/FGF2 pathway.* Angiogenesis 2012; 15:99-114
- Calabrese C., Poppleton H., Kocak M., Hogg TL., Fuller C., Hamner B., Oh EY., et al. *A perivascular niche for brain tumor stem cells.* Cancer Cell 2007; 11: 69-82
- Cancer Genome Atlas Research Network, *Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways.* Nature 2013; 28:494-506
- Carboni E., Bortone L., Giua C., Di Chiara G. *Dissociation of physical abstinence signs from changes in extracellular dopamine in the nucleus accumbens and in the prefrontal cortex of nicotine dependent rats.* Drug Alcohol Depend 2000; 58:93-102
- Carlisle DL., Liu X., Hopkins TM., Swick MC., Dhir R., Siegfried JM. *Nicotine activates cell-signalling pathways through muscle-type and neuronal nicotinic acetylcholine receptors in non-small cell lung cancer cells.* Pulm Pharmacol Ther 2007; 20:629-41
- Cattaneo MG., Codignola A., Vicentini LM., Clementi F., Sher E. *Nicotine stimulates a serotonergic autocrine loop in human small-cell lung carcinoma.* Cancer Res 1993; 53:5566-68
- Cattaneo MG., D'Atri F., Vicentini LM. *Mechanism of mitogen-activated protein kinase activation by nicotine in small-cell lung carcinoma cells.* Biochem J 1997; 328:499-503
- Celie PH., Klassen RV., van Rossum-Fikkert SE., van Elk R., van Nierop P., Smit AB., Sixma TK. *Crystal structure of acetylcholine-binding protein from *Bulinus truncatus* reveals the conserved structural scaffold and sites of variation in nicotinic acetylcholine receptors.* J Biol Chem 2005; 280:26457-66
- Changeux JP. *Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice.* Nat Rev Neurosci 2010; 11:389-401
- Changeux JP., Edelstein SJ. *Allosteric receptors after 30 years.* Neuron 1998;21:959-80
- Charles AC., Merrill JE., Dirksen ER., Sanderson MJ. *Intracellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate.* Neuron 1991; 6:983-92

- Cheng L., Huang Z., Zhou W., Wu Q., Donnola S., Liu JK et al., *Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth*. Cell 2013; 153: 139-52
- Chernyavsky AI., Shchepotin IB., Grando SA. *Mechanisms of growth-promoting and tumor-protecting effects of epithelial nicotinic acetylcholine receptors*. Int Immunopharmacol 2015; 29: 36-44
- Christianson JC., Green WN. *Regulation of nicotinic receptor expression by the ubiquitin-proteasome system*. Embo J 2004; 23:4156-65
- Chung TD., Broaddus WC. *Molecular targeting in radiotherapy: epidermal growth factor receptor*. Mol Interv 2005; 5: 15-9
- Colombo S., Mazzo F., Pistillo F., Gotti C. *Biogenesis, trafficking and up-regulation of nicotinic ACh receptors*. Biochem Pharmacol 2013; 86:1063-73
- Corrigan WA., Franklin KB., Coen KM., Clarke PB. *The mesolimbic dopaminergic system is implicated in the reinforcing effects of nicotine*. Psychopharmacology 1992; 107: 285-89
- Corringer PJ., Le Novère N., Changeux JP. *Nicotinic receptors at the amino acid level*. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2000; 40:431-58
- Cosgrove, KP., Batis J., Bois F., Maciejewski PK., Esterlis I., Kloczynski T., Stiklus S., et al. *Beta2-nicotinic acetylcholine receptor availability during acute and prolonged abstinence from tobacco smoking*. Arch Gen Psychiatry, 2009; 66: 666-76
- Counotte DS., Goriounova NA., Moretti M., Smoluch MT., Irth H., Clementi F., et al. *Adolescent nicotine exposure transiently increases high-affinity nicotinic receptors and modulates inhibitory synaptic transmission in rat medial prefrontal cortex*. Faseb J 2012; 26: 1810-20
- Criado M., Valor LM., Mulet J., Gerber S., Sala S., Sala F. *Expression and functional properties of alpha7 acetylcholine nicotinic receptors are modified in the presence of other receptor subunits*. J Neurochem 2012, 123: 504-14
- D'Souza MS., Markou A. *The "stop" and "go" of nicotine dependence: role of GABA and glutamate*. Cold Spring Harb Perspect Med 3 2013
- Dan HC., Sun M., Kaneko S., Feldmen RI., Nicosia SV., Wang HG., et al. *AKT phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)*. J Biol Chem 2004; 279:5405-12
- Dani JA., Bertrand D. *Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system*. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2007; 47:699-729
- Darsow T., Booker TK., Pina-Crespo JC., Heinemann SF. *Exocytic trafficking is required for nicotine-induced up-regulation of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors*. J Biol Chem 2005; 280:18311-20
- Dasgupta P., Kinkade R., Joshi B., Decoock C., Haura E., Chellappan S. *Nicotine inhibits apoptosis induced by chemotherapeutic drugs by up-regulating XIAP and survivin*. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103:6332-7
- Dasgupta P., Rastogi S., Pillai S., Ordonez-Ercan D., Morris M., Haura E., Chellappan S. *Nicotine induces cell proliferation by beta-arrestin-mediated activation of Src and Rb-Raf-1 pathways*. J Clin Invest 2006; 116:2208-17

- Dasgupta P., Rizwani W., Pillai S., Kinkade R., Kovacs M., Rastogi S. *Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines.* Int J Cancer 2009; 124:36-45
- DeAngelis LM. *Brain tumors.* N Engl J Med 2001; 344: 114-23
- DeBiasi M., Dani JA. *Reward, addiction, withdrawal to nicotine.* Annu Rev Neurosci 2011; 34:105-30
- deGroot J., Sontheimer H. *Glutamate and the biology of gliomas.* Glia 2011; 59: 1181-89
- deGroot JF., Piao Y., Lu L., Fuller GN., Yung WK. *Knockdown of GluR1 expression by RNA interference inhibits glioma proliferation.* J Neurooncol 2008; 88: 121-33
- deLucas-Cerillo AM., Maldifassi MC., Amalich F., Renart J., Atienza G., Serantes R., Cruces J., Sanchez-Pacheco A., Andres-MAteos E., Montiel C. *Function of partially duplicated human alpha7 nicotinic receptor subunit CHRFAM7A gene: potential implications for the cholinergic anti-inflammatory response.* J Biol Chem 2011; 286: 594-603
- Di Ciano P., Everitt BJ. *Contribution of the ventral tegmental area to cocaine-seeking maintained by a drug-paired conditioned stimulus in rats.* Eur J Neurosci 2004; 19: 1661-7
- Doura MB., Gold AB., Keller AB., Perry DC. *Adult and periadolescent rats differ in expression of nicotinic cholinergic receptor subtypes and in the response of these subtypes to chronic nicotine exposure.* Brain Res 2008; 1215: 40-52
- Drell TL., Joseph J., Lang K., Niggemann B., Zaenker KS., Entschladen F. *Effects of neurotransmitter to the chemokinesis and chemotaxis of MDA-MB468 human breast carcinoma cells.* Breast Cancer Res Treat 2003; 80:63-70
- Drisdell RC., Green WN. *Neuronal alpha-Bungarotoxin receptors are alpha7 subunit homomers.* J Neurosci 2000; 20:133-39
- Eddy et al., 2005
- Eddy SF. GUO S., Demicco EG., Romieu-Mourez R., Landesman-Bollag E., Seldin DC. et al., *Inducible I $\kappa$ B kinase/I $\kappa$ B kinase epsilon expression is induced by CK2 and promotes aberrant nuclear factor-kappaB activation in breast cancer cells.* Cancer Res 2005; 65:11375-383
- Fasoli F., Gotti C. *Structure of neuronal nicotinic receptors.* Current Topics in Behavioural Neurosciences 2015; 23:1-17
- Ficklin MB., Zhao S., Feng G. *Ubiquitin-1 regulates nicotine-induced up-regulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors.* J Biol Chem 2005; 280: 34088-95
- Forster GL., Blaha CD. *Laterodorsal tegmental stimulation elicits dopamine efflux in the rat nucleus accumbens by activation of acetylcholine and glutamate receptors in the ventral tegmental area.* Eur J Neurosci 2000; 12:3596-604
- Fowler CD., Lu Q., Johnson PM., Marks MJ., Kenny PJ. *Habenular alpha5 nicotinic receptor subunit signalling controls nicotine intake.* Nature 2011; 471:597-601
- Fucile S. *Calcium permeability of nicotinic acetylcholine receptors.* Cell Calcium 2004; 35:1-8
- Galzi JL., Bertrand S., Corringer PJ., Changeux JP., Bertrand D. *Identification of calcium binding sites that regulate potentiation of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor.* Embo J 1996; 15:5824-32



- Girod R., Crabtree G., Ernstrom G., Ramirez-La torre J., McGehee D., Turner J., Role L. *Heteromeric complexes of alpha5 and/or alpha7 subunits. Effects of calcium and potential role in nicotine-induced presynaptic facilitation.* Ann N Y Acad Sci 1999; 868: 578-90
- Gotti C., Balestra B., Moretti M., Rovati GE., Maggi L., Rossoni G., Berti F., Villa L., Pallavcini M., Clementi F. *4-Oxystilbene compounds are selective ligands for neuronal nicotinic alphaBungarotoxin receptors.* Br J Pharmacol. 1998; 124:1197-1206.
- Gotti C., Carbonelle E., Moretti M., Zwart R., Clementi F. *Drugs selective for nicotinic receptor subtypes: a real possibility or a dream?* Behav Brain Res. 2000; 113:183-92.
- Gotti C., Clementi F. *Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology.* Prog Neurobiol 2004; 74:363-96
- Gotti C., Clementi F., Fornari A., Gaimarri A., Guiducci S., Manfredi I., Moretti M., Pedrazzi P., Pucci L., Zoli M. *Structural and functional diversity of native nrain neuronal nicotinic receptors.* Biochem Pharmacol 2009; 78:703-11
- Gotti C., Guiducci S., Tedesco V., Corbioli S., Zanetti L., Moretti M., Zanardi A., Rimondini R., Mugnaini M., Clementi F., Chiamulera C., Zoli M. *Nicotinic acteylcholine receptorsin the mesolimbic pathway: primary role of ventral segmenta area alpha6beta2\* receptors in mediatins sistemi nicotine effects on dopamine release, locomotion and reinforcement.* J Neurosci 2010; 30: 5311-25
- Gotti C., Hanke W., Maury K., Moretti M., Ballivet M., Clementi F., Bertrand D. *Pharmacology and biophysical properties of alpha7 and alpha7alpha8 alpha-bungarotoxin receptor subtype immunopurified from the chick optic lobe.* Eur J Neurosci 1994; 6: 1281-91
- Gotti C., Moretti M., Meinerz NM., Clementi F., Gaimarri A., Collins AC., Marks MJ. *Partial deletion of the nicotinic cholinergic receptor alpha4 or beta2 subunit genes changes the acetylcholine sensitivity of receptor-mediated 86Rb+ efflux in cortex and thalamus and alters relative expression of alpha4 and beta2 subunits.* Mol Pharmacol 2008; 73: 1796-807
- Gotti C., Zoli M., Clementi F. *Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance.* Trends Pharmacol Sci 2006; 27: 482-91
- Gotti C., Moretti M., Gaimarri A., Zanardi A., Clementi F., Zoli M. *Heterogeneity and complexity of native brain nicotinic receptors.* Biochem Pharmacol 2007; 74: 1102-11
- Govind AP., Walsh H., Green WN. *Nicotine-induced upregulation of native neuronal nicotinic receptors is caused by multiple mechanisms.* J Neurosci 2012; 32:2227-38
- Grady SR., Moretti M., Zoli M., Marks MJ., Zanardi A., Pucci L., Clementi F., Gotti C. *Rodent habenulo-interpeduncular pathway espreses a large variety of un common nAChRs subtypes, but only the alpha3beta4\* and alpha3beta3beta4\* subtypes mediate acetylcholine release.* J Neurosci 2009; 29:2272-82
- Groot-Kormelink PJ., Luyten WH., Colquhoun D., Sivilotti LG. *A receptor mutation approach shows incorporation of the "orphan" subunit beta3 into a functional nicotinic receptor.* J Biolo Chem 1998; 273:15317-20

- Grozio A., Paleari L., Catassi A., Servent D., Cilli M., Piccardi F., Paganuzzi M., Cesario A., Granone P., Mourier G., Russo P. *Natural agents targeting the alpha7 nicotinic receptor in NSCLC: a promising prospective in anti-cancer drug development.* Int J Cancer 2008;122:1911-5
- Guo JP., Tian W., Shu S., Xin Y., Shou C., Cheng JQ. *IKBKE phosphorylation and inhibition of FOXO3a: a mechanism of IKBKE oncogenic function.* Plos One 2013; 8: e63636
- Guo J., Kim D., Gao J., Kurtyka C., Chen H., Yu C., Wu D., Mittal A., Beg AA., Chellappan SP., Haura EB., Cheng JQ. *IKBKE is induced by STAT3 and tobacco carcinogen and determines chemosensitivity in non-small cell lung cancer.* Oncogene 2013; 32:151-9
- Gupta SC., Kannappan R., Reuter S., Kim JH., Aggarwal BB. *Chemosensitization of tumors by resveratrol.* Ann N Y Acad Sci 2011; 1215: 150-60
- Hadjiconstantinou M., Ducheim AM., Zhang H., Neff NH. *Enhanced dopamine transporter function in striatum during nicotine withdrawal.* Synapse 2011; 65:91-8
- Hajek I., Subbarao KV., Hertz L. *Acute and chronic effects of potassium and noradrenaline on NA+K+ATPase activity in cultured mouse neurons and astrocytes.* Neurochem Int 1996;28:335-42
- Halassa MM., Fellin T., Haydon PG. *Tripartite synapses: roles for astrocytes purines in the control of synaptic physiology and behavior.* Neuropharmacology 2009; 57: 343-46
- Hampton MB., Fadeel B., Orrenius S. *Redox regulation of the caspases during apoptosis.* Ann N Y Acad Sci 1998; 854: 328-35
- Han ZY., Le Novere N., Zoli M., Hill Jr JA., Champtiauz N., Changeux JP. *Localization of nAChRs subunit mRNAs in the brain of Macaca mulatta.* Eur J Neurosci 2000; 12: 3664-74
- Hao C., Parney IF., Roa WH., Turner J., Petruk KC., Ramsay DA. *Cytokine and cytokine receptor mRNA expression in human glioblastomas: evidence of Th1, Th2 and Th3 cytokine dysregulation.* Acta Neuropathol 2002; 103: 171-78
- Hass M., Kubler W. *Nicotine and sympathetic neurotransmission.* Cardiovasc Drugs Ther 1997; 19:657-65
- Heeschen C., Jang JJ., Weis M., Pathak A., Kaji S., Hu RS. *Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis.* Nat Med 2001; 7:833-9
- Heeschen C., Weis M., Aicher A., Dimmeler S., Cooke JP. *A novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors.* J Clin Invest 2002; 110: 527-36
- Heidecker G., Kolch W., Moriso DK., Rapp UR. *The role of Raf-1 phosphorylation in signal transduction.* Adv Cancer Res 1992; 58:53-73
- Heusch WL., Maneckjee R. *Signalling pathways involved in nicotine regulation of apoptosis of human lung cancer cells.* Carcinogenesis 1998; 19:551-6
- Hikosaka O. *The habenula: from stress evasion to value-based decision-making.* Nat Rev Neurosci 2010; 11:503-13
- Hilario MR., Turner JR., Blendy JA. *Reward sensitization: effects of repeated nicotine exposure and withdrawal in mice.* Neuropsychopharmacol, 2012; 37: 2661-70
- Hildebrand BE., Nomikos GG., Hertel P., Schilstrom B., Svensson TH. *Reduced dopamine output in the nucleus accumbens but not in the medial prefrontal cortex in rats displaying a mecamylamine-precipitated nicotine withdrawal syndrome.* Brain Res 1998; 779: 214-25

- Hirano H., Tanioka K., Yokoyama S., Akiyama S., Kuratsu J. *Angiogenic effect of thymidine phosphorylase on macrophages in glioblastoma multiforme*. J Neurosurg 2001; 95: 89-95
- Holmstrom KM., Finkel T. *Cellular mechanism and physiological consequences of redox-dependent signaling*. Nat Mol Cell Biol 2014; 15: 411-21
- Hukkanen J., Jacob 3<sup>rd</sup> P., Benowitz NL. *Metabolism and disposition kinetics of nicotine*. Pharmacol Rev 2005; 57:79-115
- Hurst R., Rollema H., Bertrand D. *Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics*. Pharmacol Ther 2013; 137: 22-54
- Hurst R., Rollema H., Bertrand D. *Nicotinic acetylcholine receptors: from basic sciences to therapeutics*. Pharmacol Ther 2013; 137: 22-54
- Ikonomidou C., Bosch F., Miksa M., Bittigau P., Vockler J., Dikranian K., Tenkova TI., Stefovskva V., Turski L., Olney JW. *Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain*. Science 1999; 283: 70-74
- Improgo MR., Scofield MD., Tapper AR., Fardner PD. *From smoking to lung cancer: the CHRNA5/A3/B4 connection*. Oncogene 2010; 29:4874-84
- Ishiuchi S., Tsuzuki K., Yoshida Y., Yamada N., Hagimura M., Okada H., Miwa A., Kurihara H., Nakazato Y., Tamura M., Sasaki T., Ozawa S. *Blockage of Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors suppresses migration and induces apoptosis in human glioblastoma cells*. Nat Med 2002; 8:971-78
- Ishiuchi S., Yoshida Y., Sugawara K., Aihara M., Ohtani T., Watanabe T., Saito N., Tsuzuki K., Okado H., Miwa A., Nakazato Y., Ozawa S. *Ca<sup>2+</sup> permeable AMPA receptors regulate growth of human glioblastoma via Akt activation*. J Neurosci 2007; 27: 7987-8001
- Itier V. and Bertrand D. *Neuronal nicotinic receptors: from protein structure to function*. FEBS Lett 2001; 504:118-25
- Jin Z., Gao F., Flagg T., Deng X. *Tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone promotes functional cooperation of Bcl-2 and c-Myc through phosphorylation in regulating cell survival and proliferation*. J Biol Chem 2004; 279: 40209-19
- Jin X., Bermudez I., Steinbach JK. *The nicotinic alpha5 subunit can replace either an acetylcholine-binding or nonbinding subunit in the alpha4beta2\* neuronal nicotinic receptor*. Mol Pharmacol 2014; 85: 11-7
- Johnson JL., Pillai S, Pernazza D., Sebt SM., Lawrence NJ., Chellappan SP. *Regulation of matrix metalloproteinase genes by E2F transcription factors: Rb-Raf-1 interaction as a novel target for metastatic disease*. Cancer Res 2012; 72:516-26
- Joo KM., Kim SY., Jin X., Song SY., Kong DS., Lee JI., et al. *Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas*. Lab Invest 2008; 88:808-15
- Joseph J., Niggemann B., Zaenker KS., Entschladen F. *The neurotransmitter gamma-aminobutyric acid is an inhibitory regulator for the migration of SW480 colon carcinoma cells*. Cancer Res 2002; 62:6467-69
- Joshi AD., Parsons DW., Velculescu VE., Riggins GJ. *Sodium ion channel mutations in glioblastoma patients correlate with shorter survival*. Mol Cancer 2011; 10:17

- Jull BA., Plummer HK., Shuller HM. *Nicotinic receptor-mediated activation by the tobacco specific nitrosamine NNK of a Raf-1/MAP kinase pathway, resulting in phosphorylation of c-myc in human small cell lung carcinoma cells and pulmonary neuroendocrine cells.* J Cancer Res Clin Oncol 2001; 127:707-17
- Kanda Y., Watanabe Y. *Nicotine-induced vascular endothelial growth factor release via EGFR-ERK pathway in rat vascular smooth muscle cells.* Life Sci 2007; 80: 1409-14
- Kanamori M., Kawaguchi T., Berger MS., Pieper RO. *Intracranial microenvironment reveals independent opposing functions of host  $\alpha\beta3$  expression on glioma growth and angiogenesis.* J Biol Chem 2006; 281: 37256-64
- Karihtala P., Kauppila S., Soini Y., Arja-jukkola-Vuorinen. *Oxidative stress and counteracting mechanisms in hormone receptor positive, triple-negative and basal-like breast carcinomas.* BMC Cancer 2011; 11:262
- Kauer JA., Malenka RC. *Synaptic plasticity and addiction.* Nat Rev Neurosci 2007; 8:844-58
- Keller SH., Lindstrom J., Ellisman M., Taylor P. *Adjacent basic amino acid residues recognized by the COP I complex and ubiquitination govern endoplasmatic reticulum to cell surface trafficking of the nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit.* J Biol Chem 2001; 276:18384-91
- Keyser KT., Britto LR., Schoepfer R., Whiting P., Cooper J., Conroy W., Brozowska Prechtl A., Karten J., Lindstrom J. *Three subtypes of alpha bungarptoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors are expressed in chick retina.* J Neurosci 1993;13:442-54
- Khalil AA., Jameson MJ., Broaddus WC., Lin PS., Chung TD. *Nicotine enhances proliferation, migration and radioresistance of human malignant glioma cells through EGFR activation.* Brain Tumor Pathol 2013; 30:73-83
- Khiroug SS., Harkness PC., Lamb PW., Sudweeks SN., Khiroug L., Millar NS., Yakel JL. *Rat nicotinic ACh receptor alpha7 and beta2 subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels.* J Physiol 2002; 540: 425-34
- Kim SH., Kwon CH., Nakano I. *Detoxification of oxidative stress in glioma cells: mechanism, clinical relevance and therapeutic development.* J Neurosci Res 2014; 92: 1419-24
- Kinkade R., Dasgupta P., Carie A., Pernazza D., Carless M., Pillai S., Lawrence N., Sebt SM., Chellappan S. *A small molecule disruptor of Rb/Raf-1 interaction inhibits cell proliferation, angiogenesis and growth of human tumor xenografts in nude mice.* Cancer Res 2008; 68:3810-8
- Kislin KL., McDonough WS., Eschbacher JM., Armstrong BA., Berens ME. *NHERF-1: modulator of glioblastoma cell migration and invasion.* Neoplasia 2009; 11:377-87
- Krashia P., Moroni A., Broadbend S., Hoffman G., Kracun S., Beato M. et al., *Human alpha3beta4 neuronal nicotinic receptors show different stoichiometry if they are expressed in Xenopus oocytes or mammalian HEK293 cells.* Plos One 2010; 5:e13611
- Kuryatov A., Luo J., Cooper J., Lindstrom J. *Nicotine acts as a pharmacological chaperone to up-regulate human alpha4beta2 acetylcholine receptors.* Mol Pharmacol 2005; 68: 1839-51
- Kuryatov A., Onksen J., Lindstrom J. *Roles of accessory subunits in alpha4beta2\* nicotinic receptors.* Mol Pharmacol 2008; 74:132-43

- Lai A., Parameswaran N., Khwaja M., Whiteaker P., Lindstrom JM., Fan H., et al. *Long-term nicotine treatment decreases striatal alpha6\* nicotinic acetylcholine receptor sites and function in mice.* Mol Pharmacol 2005; 67: 1639-47
- Lammel S., Ion DI., Roeper J., Malenka RC. *Projection-specific modulation of dopamine neurons synapses by aversive and rewarding stimuli.* Neuron 2011; 70:855-62
- Lang K., Drell TL., Lindecke A., Niggemann B., Kaltschmidt C., Zaenker KS., Entschladen F. *Induction of a metastatogenic tumor cell type by neurotransmitters and its pharmacological inhibition by established drugs.* Int J Cancer 2004; 112:231-38
- Larman TC., DePalma SR., Hadjipanayis AG., Protopopov A., Zhang J., Gabriel SB., Chin L., Seidman CE., Seidman JG. *Spectrum of somatic mitochondrial mutations in five cancers.* Proc Natl Acad Sci USA 2012; 109: 14087-91
- Lathia JD., Heddleston JM., Venere M., Rich JN. *Deadly teamwork: neural cancer stem cells and the tumor microenvironment.* Cancer Stem Cell 2011; 8:482-85
- Lewis AS., Picciotto MR. *High-affinity nicotinic acetylcholine receptor expression and trafficking abnormalities in psychiatric illness.* Psychopharmacology (Berl) 2013; 229:477-85
- Li X., Semenova S., D'Souza MS., Stoker AK., Markou A. *Involvement of glutamatergic and GABAergic systems in nicotine dependence: implications for novel pharmacotherapies for smoking cessation.* Neuropharmacology 2014; 76 (Pt B): 554-65
- Liu Q., Huang Y., Xue F., Simard A., DeChon J., Li G., Zhang J., Lucero L., Wang M., Sierks M., Hu G., Chang Y., Lukas RJ., Wu J. *A novel nicotinic acetylcholine receptor subtype in basal forebrain cholinergic neurons with high sensitivity to amyloid peptides.* J Neurosci 2009; 29:918-29
- Liu X., Chang Y., Reinhart PH., Sontheimer H. *Cloning and characterization of glioma BK, a novel BK channel isoform highly expressed in human glioma cells.* J Neurosci 2002; 22:1840-49
- Livingstone PD., Wonnacott S. *Nicotinic acetylcholine receptors and the ascending dopamine pathways.* Biochem Pharmacol 2009; 78:744-55
- Lodge DJ., Grace AA. *The laterodorsal tegmentum is essential for burst firing of ventral tegmental area dopamine neurons.* Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103: 5167-72
- Lopez-Hernandez GY., Sanchez-Padilla J., Ortiz-Acevedo A., Lizardi-Ortiz J., Salas-Vincenty J., Rojas LV., et al. *Nicotine-induced up-regulation and desensitization of alpha4beta2 neuronal nicotinic receptors depend on subunit ratio.* J Biol Chem 2004; 279: 38007-15
- Lottaz C., Beier D., Meyer K., Kumar P., Hermann A., Schwarz J., Junker M., Oefner PJ., et al. *Transcriptional profiles of CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cell lines suggest different cells of origin.* Cancer Res 2010; 70: 2030-40
- Lui VC., Lung SS., Pu JK., Hung KN., Leung GK. *Invasion of human glioma cells is regulated by multiple chloride channels including CIC-3.* Anticancer Res 2010; 30: 4515-24
- Lutterbach J., Guttenberger R., Pagenstecher A. *Gliosarcoma: a clinical study.* Radiother Oncol 2001; 61: 57-64
- Lyons SA., Chung WJ., Weaver AK., Ogunrinu T., Sontheimer H. *Autocrine glutamate signaling promotes glioma cell invasion.* Cancer Res 2007; 67: 9463-71

- MacFarlane SN., Sontheimer H. *Changes in ion channel expression accompany cell cycle progression of spinal cord astrocytes*. *Glia* 2000; 30: 39-48
- Maggi L., Palma E., Eusebi F., Moretti M., Balestra B., Clementi F., Gotti C. *Selective effects of 4-oxystilbene derivative on wild and mutant neuronal chick alpha7 nicotinic receptor*. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 285-95
- Mansvelder HD., Keath JR., McGehee DS. *Synaptic mechanism underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas*. *Neuron* 2002; 33:905-19
- Mantegazza P., Tommasini R. *Central antinicotinic activity of 4-oxystilbene and 4-oxydiphenylethane derivatives*. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1995; 103: 371-403
- Mao D., Perry DC., Yasuda RP., Wolfe BB., Kellar KJ. *The alpha4beta2alpha5 nicotinic acetylcholine receptor in rat brain is resistant to up-regulation by nicotine in vivo*. *J Neurochem* 2008; 104:446-56
- Marks MJ., Pauly JR., Gross SD., Deneris ES., Hermans-Borgmeyer I., Heinemann SF., et al. *Nicotine binding and nicotinic receptor subunit RNA after chronic nicotine treatment*. *J Neurosci* 1992; 12: 2765-84
- Marks MJ., Rowell PP., Cao JZ., Grady SR., McCallum SE., Collins AC. *Subset of acetylcholine-stimulated <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> efflux and [<sup>125</sup>I]-epibatidine binding sites in C57BL/6 mouse brain are differentially affected by chronic nicotine treatment*. *Neuropharmacology* 2004; 46:1141-57
- Masi A., Becchetti A., Restano-Cassulini R., Polvani S., Hofmann G., Buccoliero AM., Paglierani M., Pollo B., Taddei GL., Gallina P., Di Lorenzo N., Franceschetti S., Wanke E., Arcangeli A. *hERG1 channels are overexpressed in glioblastoma multiforme and modulate VEGF secretion in glioblastoma cell lines*. *Br J Cancer* 2005; 93:781-92
- Matta SG., Balfour DJ., Benowitz NL., et al. *Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research*. *Psychopharmacol* 2007; 190: 269-319.
- Mazzaferro S., Benallegue N., Carbone A., Gasparri F., Vijayan R., Biggin PC., Moroni M., Bermudez I. *Additional acetylcholine (ACh) binding site at alpha4/alpha4 interface of (alpha4beta2)2alpha4 nicotinic receptor influences agonist sensitivity*. *J Biol Chem* 2011; 286: 31043-54
- Mazzo F., Pistillo F., Grazioso G., Clementi F., Borgese N., Gotti C., Colombo SF. *Nicotine-modulated subunit stoichiometry affects stability and trafficking of alpha3beta4 nicotinic receptor*. *J Neurosci* 2013; 33:12316-28
- Mena S., Rodriguez ML., Ponsoda X., Estrela JM., Jaattela M., Ortega AL. *Pterostilbene-induced tumor cytotoxicity: a lysosomal membrane permeabilization-dependent mechanism*. *Plos One* 2012; 7: e44524
- Millar NS., Harkness PC. *Assembly and trafficking of nicotinic acetylcholine receptors*. *Mol Membr Biol* 2008; 25: 279-92
- Miwa JM., Freedman R., Lester HA. *Neural systems governed by nicotinic acetylcholine receptors: emerging hypotheses*. *Neuron* 2011; 70:20-33

- Momi N., Ponnusamy MP., Kaur S., Rachagani S., Kunigal SS., Chellappan S. *Nicotine/cigarette smoke promotes metastasis of pancreatic cancer through  $\alpha 7$  nAChR-mediated MUC4 upregulation.* *Oncogene* 2013; 32:1384-95
- Morel C., Fattore L., Pons S., Hay YA., Marti F., Lambomez B., De Biasi M., Lathrop M., Fratta W., Maskos U., Faure P. *Nicotine consumption is regulated by a human polymorphism in dopamine neurons.* *Mol Psychiatry* 2013; 19: 930-6
- Moretti M., Vailati S., Zoli M., Lippi G., Riganti L., Longhi R., Viegi A., Clementi F., Gotti C. *Nicotinic acetylcholine receptor subtypes expression during rat retina development and their regulation by visual experience.* *Mol Pharmacol* 2004; 66: 85-96
- Moretti M., Mugnaini M., Tessari M., Zoli M., Gaimarri A., Manfredi I., Pistillo F., Clementi F., Gotti C. *A comparative study of the effects of the intravenous self-administration or subcutaneous minipump infusion of nicotine on the expression of brain neuronal nicotinic receptor subtypes.* *Mol Pharmacol* 2010; 78:287-96
- Moretti M., Zoli M., George AA., Lukas RJ., Pistillo F., Maskos U., Whiteaker P., Gotti C. *The novel  $\alpha 7\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptor subtype is expressed in mouse and human basal forebrain: biochemical and pharmacological characterization.* *Mol Pharmacol* 2014; 86: 306-17
- Morford LA., Dix AR., Brooks WH., Roszman TL. *Apoptotic elimination of peripheral T lymphocytes in patients with primary intracranial tumors.* *J Neurosurg* 1999; 91: 935-46
- Morokoff A., Ng W., Gogos A., Kaye AH. *Molecular subtypes, stem cells and heterogeneity: implications for personalised therapy in glioma.* *J Clin Neurosci* 2015; 22: 1219-26
- Moroni M., Vijayan R., Carbone A., Zwart R., Biggin PC., Bermudez I. *Non-agonist-binding subunit interfaces confer distinct functional signatures to the alternate stoichiometries of the  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptor: an  $\alpha 4$ - $\alpha 4$  interface is required for  $Zn^{2+}$  potentiation.* *J Neurosci* 2008; 28: 6884-94
- Moroni M., Zwart R., Sher E., Cassels BK., Bermudez I.  *$\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptors with high and low acetylcholine sensitivity: pharmacology, stoichiometry and sensitivity to long-term exposure to nicotine.* *Mol Pharmacol* 2006; 70: 755-68
- Mukhin AG., Kimes AS., Chefer SI., Matochik JA., Contoreggi CS., Horti AG., Vaupel DB., Pavlova O., Stein EA. *Greater nicotinic acetylcholine receptor density in smokers than in nonsmokers: a PET study with 2-18F-FA-85380.* *J Nucl Med* 2008; 49: 1628-35
- Murray TA., Bertrand D., Papke RL., George AA., Pantoja R., Srinivasan R., Liu Q., Wu J., Whiteaker P., Lester HA., Lukas RJ.  *$\alpha 7\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptors assemble, function and are activated primarily via their  $\alpha 7$ - $\alpha 7$  interfaces.* *Mol Pharmacol* 2012; 81: 175-88
- Nashmi R., Xiao C., Despande P., McKinney S., Grady SR., Whiteaker P., et al. *Chronic nicotine cell specifically upregulates functional  $\alpha 4^*$  nicotinic receptors: basis for both tolerance in midbrain and enhanced long-term potentiation in perforant path.* *J Neurosci* 2007; 27: 8202-18
- Natividad LA., Buczynski MW., Parsons LH., Torres OV., O'Dell LE. *Adolescent rats are resistant to adaptations in excitatory and inhibitory mechanisms that modulate mesolimbic dopamine during nicotine withdrawal.* *J Neurochem* 2012; 123: 578-88

- Nelson ME., Kuryatov A., Choi CH., Zhou Y., Lindstrom J. *Alternative stoichiometries of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors*. Mol Pharmacol 2003; 63:332-41
- Nguyen HN., Rasmussen BA., Perry DC. *Subtype-selective up-regulation by chronic nicotine of high-affinity nicotinic receptors in rat brain demonstrated by receptor autoradiography*. J Pharm Exp Ther 2003; 307:1090-7
- Norton JD. *ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis*. J Cell Sci 2000; 113:3897-905
- Oberndorfer S., Schmal T., Lahrmann H., Urbanitas S., Lindner K., Grisold W. *The frequency of seizures in patients with primary brain tumors or cerebral metastases*. 114: 911-16
- Olale F., Gerzanich V., Kuryatov A., Wang F., Lindstrom J. *Chronic nicotine exposure differentially affects the function of human alpha3, alpha4 and alpha7 neuronal nicotinic receptor subtypes*. J Pharm Exp Ther 1997; 283:675-83
- Olincy A., Leonard S., Young DA., Sullivan B., Freedman R. *Decreased bombesin peptide response to cigarette smoking in schizophrenia*. Neuropsychopharmacology 1999; 20:52-59
- Olsen ML., Schade S., Lyons SA., Amaral MD., Sontheimer H. *Expression of voltage-gated chloride channels in human glioma cells*. J Neurosci 2003; 23: 5572-82
- Olsen ML., Sontheimer H. *Mislocalization of Kir channels in malignant glioma*. Glia 2004; 46: 63-73
- Palani M., Arunkumar R., Janardhanam V. *Biochemical and cytogenetic analysis of brain tissues in different grades of glioma patients*. Ann Neurosci 2010; 17:120-25
- Paleari L., Cesario A., Fini M., Russo P. *Alpha7-nicotinic receptor antagonists at the beginning of a clinical era for NSCLC and mesothelioma?* Drug Discov Today 2009; 14: 822-36
- Palma E., Maggi L., Barabino B., Eusebi F., Ballivet M. *Nicotinic acetylcholine receptors assembled from the alpha7 and beta3 subunits*. J Biol Chem 1999; 274: 18335-40
- Pandya A., Yakel JL. *Allosteric modulators of the alpha4beta2 subtype of neuronal nicotinic acetylcholine receptors*. Biochem Pharmacol 2011; 82:952-58
- Paolini M., DeBiasi M. *Mechanistic insights into nicotine withdrawal*. Biochem Pharmacol 2011; 82: 996-1007
- Park HJ., Kim BG., Lee SJ., Heo SH., Kim JY., Kwon TH., Lee EB., Ryoo HM., Cho JY. *Proteomic profiling of endothelial cells in human lung cancer*. J Proteome Res 2008; 7: 1138-50
- Parker SL., Fu Y., McAllen K., Luo J., McIntosh J., Lindstrom JM., et al. *Up-regulation of brain nicotinic acetylcholine receptors in the rat during long-term self-administration of nicotine: disproportionate increase of the alpha6 subunit*. Mol Pharmacol 2004; 65:611-22
- Patt S., Preussat K., Beetz C., Kraft R., Schrey M., Kalff R., Schonherr K., Heinemann SH. *Expression of ether a go-go potassium channels in human gliomas*. Neurosci Lett 2004; 368: 249-53
- Peng S., Zhang Y., Wang H., Ren B. *Glutamate receptors and signal transduction in learning and memory*. Mol Biol Rep 2011; 38: 453-60



- Pennington JD., Wang TJ., Nguyen P., Sun L., Bisht K., Smart D., Gius D. *Redox-sensitive signaling factors as a novel molecular targets for cancer therapy*. Drug Resist Updat 2005; 8: 322-30
- Perry DC., Davila-Garcia MI., Stockmeier CA., Kellar KJ. *Increased nicotinic receptors in brain from smokers: membrane binding and autoradiography studies*. J Pharmacol Exp Ther 1999; 289:1545-52
- Picciotto MR., Caldarone BJ., Brunzell DH., Zachariou V., Stevens TR., King SL., *Neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit knockout mice: physiological and behavioral phenotypes and possible clinical implications*. Pharmacol Ther 2001; 92:89-108
- Picciotto MR., Kenny PJ. *Molecular mechanism underlying behaviors related to nicotine addiction*. Cold Spring Harb Perspect Med 2013; 3:a012112
- Plummer HK., Dhar M., Shuller HM. *Interaction of tobacco-specific toxicants with nicotinic cholinergic regulation of fetal pulmonary neuroendocrine cells: implications for pediatric lung disease*. Exp Lung Res 2000; 26:121-35
- Quick M., Wonnacott S. *Alpha6beta2\* and alpha4beta2\* nicotinic acetylcholine receptors as drug targets for Parkinson's disease*. Pharmacol Rev 2011; 63: 938-66
- Ransom CB., Liu X., Sontheimer H. *BK channels in human glioma cells have enhanced calcium sensitivity*. Glia 2002; 38: 281-91
- Ransom CB., Sontheimer H. *BK channels in human glioma cells*. J Neurophysiol 2001; 85: 790-803
- Rayes D., De Rosa MJ., Sine SM., Bouzat C. *Number and locations of agonist binding sites required to activate homomeric Cys-loop receptors*. J Neurosci 2009; 29:6022-32
- Reina MA., Improgo D., Scofield MD., Tapper AR., Gardner PD. *The nicotinic acetylcholine receptor CHRNA5/A3/B4 gene cluster: dual role in nicotine addiction and lung cancer*. Prog Neurobiol 2010; 92:212-26
- Ren J., Qin C., Hu F., Tan J., Qiu L., Zhao S., Feng G., Luo M. *Habenula "cholinergic" neurons co-release glutamate and acetylcholine and activate postsynaptic neurons via distinct transmission modes*. Neuron 2011; 69: 445-52
- Rezvani K., Teng Y., De Biasi M. *The ubiquitin-proteasome system regulates the stability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors*. J Mol Neurosci 2010; 40:177-84
- Rezvani K., Teng Y., Shim D., De Biasi M. *Nicotine regulates multiple synaptic proteins by inhibiting proteasomal activity*. J Neurosci 2007; 27: 10508-19
- Richards CI., Luong K., Srinivasan R., Turner SW., Dougherty DA., Korlach J., et al. *Live-cell imaging of single receptor composition using zero-mode waveguide nanostructures*. Nano Lett 2012; 12:3690-4
- Rothstein JD., Brem H. *Excitotoxic destruction facilitates brain tumor growth*. Nat Med 2001; 7: 994-95
- Rucktooa P., Smit AB., Sixma TK. *Insight in nAChR subtype selectivity from AChBP crystal structures*. Biochem Pharmacol 2009; 78: 777-87

- Salas R., Sturm R., Boulter J., DeBiasi M. *Nicotinic receptors in the habenulo-interpeduncular system are necessary for nicotine withdrawal in mice.* J Neurosci 2009; 29: 3014-8
- Salette J., Pons S., Devillers-Thierry A., Soudant M., Prado de Carvalho L., Changeux JP., et al. *Nicotine upregulates its own receptors through enhanced intracellular maturation.* Neuron 2005; 46: 595-607
- Samaras V., Piperi C., Korkolopoulou P., Zisakis A., Levidou G., et al. *Application of the ELISPOT method for comparative analysis of IL6 and IL10 secretion in peripheral blood of patients with astroglial tumors.* Mol Cell Biochem 2007; 304: 343-51
- Sassi N., Mattarei A., Azzolini M., Szabò I., Paradisi C., Zoratti M., Biasutto L. *Cytotoxicity of mitochondria-targeted resveratrol derivatives: interactions with respiratory chain complexes and ATP synthase.* Biochem Biophys Acta 2014; 1837: 1781-9
- Schaal C., Chellappan SP. *Nicotine-mediated cell proliferation and tumor progression in smoking-related cancers.* Mol Cancer Res 2014; 12: 14-23
- Scholze P., Koth G., Orr-Urtreger A., Huck S. *Subunit composition of alpha5 containing nicotinic receptors in the rodent habenula.* J Neurochem 2012; 121:551-60
- Schuller HM., Orloff M. *Tobacco-specific carcinogenic nitrosamines. Ligands for nicotinic acetylcholine receptors in human lung cancer cells.* Biochem Pharmacol 1998; 55: 1377-84
- Schuller HM., McGavin MD., Orloff M., Riechert A., Porter B. *Simultaneous exposure to nicotine and hyperoxia causes tumors in hamsters.* Lab Invest 1995; 73:448-56
- Sheppard BJ., Williams M., Plummer HK., Shuller HM. *Activation of voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channels in human small cell lung carcinoma by the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone.* Int J Oncol 2000; 16:513-18
- Shi X., Zhang Y., Zheng J., Pan J. *Reactive oxygen species in cancer stem cells.* Antioxid Redox Signal 2012; 16: 1215-28
- Shuller HM. *Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors?* Nat Rev Cancer 2009; 9:195-205
- Shuller HM., Al-Wadei HA., Majidi M. *GABA B receptro is a novel drug target for pancreatic cancer.* Cancer 2208; 112:767-78
- Simon OJ., Muntefering T., Grauer OM., Meuth SG. *The role of ion channels in malignant brain tumors.* J Neurooncol 2015; 125: 225-35
- Singh S., Pillai S., Chellappan S. *Nicotinic acetylcholine receptor signaling in tumor growth and metastasis.* J Oncol 2011; 2011:3456743
- Soroceanu L., Manning Tj Jr, Sontheimer H. *Modulation of glioma cell migration and invasion usin Cl(-) and K(+)* ion channel blockers. J Neurosci 1999; 19: 5942-54
- Soroceanu L., Manning TJ Jr., Sontheimer H. *Modulation of glioma cell migration and invasion using Cl- and K+ ion channel blockers.* J Neurosci 1999; 19: 5942-54
- Srinivasan R., Richards CI., Dilworth C., Moss FJ., Dougherty DA., Lester HA. *Forster resonance energy transfer (FRET) correlates of altered subunit stoichiometry in cys-loop receptors, exemplified by nicotinic alpha4beta2.* Int J Mol Sci 2012; 13: 10022-40

- Srinivasan R., Pantoja R., Moss FJ., Mackey ED., Son CD., Miwa J. et al. *Nicotine up-regulates alpha4beta2 nicotinic receptors and ER exit sites via stoichiometry-dependent chaperoning*. J Gen Physiol 2011; 137:59-79
- Stamatakis AM., Stuber GD. *Activation of lateral habenula inputs to the ventral midbrain promotes behavioral avoidance*. Nat Neurosci 2012; 15: 1105-07
- Stepulak A., Luksch H., Gebhardt C., Uckermann O., Marzahn J., Sifringer M., Rzeski W., Stauffer C., Brocke KS., Turski L., Ikonomidou C. *Expression of glutamate receptor subunits in human cancers*. Histochem Cell Biol 2009; 132: 435-45
- Takahashi HK., Iwagaki H., Hamano R., Kanke T., Liu K., Sadamori H., Yagi T., Yoshino T., Tanaka N., Nishibori M. *The immunosuppressive effects of nicotine during mixed lymphocyte reaction*. Eur J Pharmacol 2007; 559:69-74
- Takano T., Lin JH., Arcuino G., Gao Q., Yang J., Nedergaard M. *Glutamate release promotes growth of malignant gliomas*. Nat Med 2001; 7:1010-15
- Taly A., Corringer PJ., Guedin D., Lestage P., Changeux JP. *Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system*. Nat Rev Drug Discov 2009; 8:733-50
- Tammimaki A., Herder P., Li P., Esch C., Laughlin JR., Akk G., Stitzel JA. *Impact of human D398N single nucleotide polymorphism on intracellular calcium response mediated by alpha3beta4a5 nicotinic acetylcholine receptors*. Neuropharmacology 2012; 63:1002-11
- Tapia L., Kuryatov A., Lindstrom J. *Calcium permeability of the (alpha4)3(beta2)2 stoichiometry greatly exceeds that of (alpha4)2(beta2)3 human acetylcholine receptors*. Mol Pharmacol 2007; 71:769-76
- Tavender TJ., Bulleid NJ. *Peroxiredoxin IV protects cells from oxidative stress by removing H2O2 produced during disulphide formation*. J Cell Sci 2010; 123: 2672-9
- Tokarz P., Blasiak J. *Role of mitochondria in carcinogenesis*. Acta Biochem Pol 2014; 61: 671-8
- Tolu S., Eddine R., Marti F., David V., Graupner M., Pons S., Baudonnat M., et al. *Co-activation of VTA DA and GABA neurons mediates nicotine reinforcement*. Mol Psychiatry 2012; 18: 382-93
- Trevino JG., Pillai S., Kunigal S., Singh S., Fulp WJ., Centeno BA. *Nicotine induces inhibitor of differentiation-1 in a Src-dependent pathway promoting metastasis and chemoresistance in pancreatic adenocarcinoma*. Neoplasia 2012; 14:1102-14
- Tsurutani J., Castillo SS., Brognard J., Granville CA., Zhang C., Gills JJ. et al. *Tobacco components stimulate AKT-dependent proliferation and NF-kB-dependent survival in lung cancer cells*. Carcinogenesis 2005; 26:1182-95
- Turner JR., Castellano LM., Blendy JA. *Parallel anxiolytic-like effects and upregulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors following chronic nicotine and varenicline*. Nicotine Tob Res 2011; 13: 41-6
- Vallejo YF., Buisson B., Bertrand D., Greed WN. *Chronic nicotine exposure upregulates nicotinic receptors by a novel mechanism*. J Neurosci 2005; 25:5563-72
- Van Meir EG., Hadjipanayis CG., Norden AD., Shu HK., Wen PY., Olson JJ. *Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma*. CA Cancer J Clin 2010; 60: 166-93

- Verhaak RG., Hoadley KA., et al. *Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1.* Cancer Cell 2010; 17: 98-110
- Vivies-Bauza C., Gonzalo R., Manfredi G., Garcia-Arumi E., Andreu AL. *Enhanced ROS production and antioxidant defense in cybrids harbouring mutations in mtDNA.* Neurosci Lett 2006; 391: 136-41
- Vlashi E., Lagadec C., Vergnes L., Matsutani T., Masui K., Poulou M., Popescu R., Della Donna L., Evers P., Dekmezian C., Reue K., Christofk H., Mischel PS., Pajonk F. *Metabolic state of glioma stem cells and nontumorigenic cells.* Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108: 16062-7
- Warren GW., Romano MA., Kudrimoti MR., Randali ME., McGarry RC., Singh AK. et al. *Nicotinic modulation of therapeutic response in vitro and in vivo.* Int J Cancer 2012; 131:2519-27
- Wei Q., Jiang H., Xiao Z., Baker A., Young MR., Veenstra TD., Colburn NH. *Sulfiredoxin-Peroxiredoxin IV axis promotes human lung cancer progression through modulation of specific phosphokinase signaling.* Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108: 7004-9
- Wellen KE., Thompson CB. *Cellular metabolic stress: considering how cells respond to nutrient excess.* Mol Cell 2010; 40: 323-32
- Wen J., Fu JH., Zhang W., Guo M. *Lung carcinoma signaling pathways activated by smoking.* Chin J Cancer 2011; 30:551-8
- West KA., Castillo SS., Dennis PA. *Activation of the PI3K/AKT pathway and chemotherapeutic resistance.* Drug Resist Updat 2002; 5:234-48
- Whiteaker P., Cooper JF., Salminen O., Marks MJ., McClure-Begley TD., Brown RW., Collins AC., Lindstrom JM. *Immunolabeling demonstrates the interdependence of mouse brain alpha4 and beta2 nicotinic acetylcholine receptor subunit expression.* J Comp Neurol, 2006; 499:1016-38.
- Wondergem R., Bartley JW. *Menthol increases human glioblastoma intracellular Ca<sup>2+</sup>, BK channel activity and cell migration.* J Biomed Sci 2009; 16:90
- Wonnacott S. *Presynaptic nicotinic ACh receptors.* Trend Neurosci 1997; 20:92-8
- Yang Y., Yan X., Duan W., Yan J., Yi W., Liang Z., et al. *Pterostilbene exerts antitumor activity via the Notch1 signaling pathway in human lung adenocarcinoma cells.* Plos One 2013; 8: e62652
- Ye ZC., Sontheimer H. *Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate.* Cancer res 1999; 59: 4383-91
- Yi JJ., Ehlers MD. *Emerging roles for ubiquitin and protein degradation in neuronal function.* Pharmacol Rev 2007; 59: 14-39
- Yu MA., Kiang A., Wang-Rodriguez J., Rahimy E., Haas M., Yu V.,Ellies LG., Chen J., Fan JB., Brumund KT., Weisman RA., Ongkeko WM. *Nicotine promotes acquisition of stem cell and epithelial-to-mesenchymal properties in head and neck squamous cell carcinoma.* PLoS ONE 2012;7:e51967
- Zhang L., Dong Y., Doyon WM., Dani JA. *Withdrawal from chronic nicotine exposure alters dopamine signaling dynamics in the nucleus accumbens.* Biol Psychiatry 2012; 71: 184-91

- Zhao CJ., Anand R., Braunewell KH. *Nicotine-induced Ca<sup>2+</sup> myristoyl switch of neuronal Ca<sup>2+</sup> sensor VILIP-1 in hippocampal neurons: a possible crosstalk mechanism for nicotinic receptors.* Cell Mol Neurobiol 2009; 29:273-86 (b)
- Zhao CJ., Noack C., Brackmann M., Glovel T., Maelicke A., Heinemann U., et al. *Neuronal Ca<sup>2+</sup> sensor VILIP-1 leads to the upregulation of functional alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors in hippocampal neurons.* Mol Cell Neurosci 2009; 40: 280-92 (a)
- Zhao-Shea R., Liu L., Pang X., Gardner PD., Tapper AR. *Activation of GABAergic neurons in the interpeduncular nucleus triggers physical nicotine withdrawal symptoms.* Curr Biol 2013; 23: 2327-35
- Zhao-Shea R., Liu L., Soll LG., Impropgo MR., Meyers EE., McIntosh JM., Grady SR., Marks MJ., Gardner PD., Tapper AR. *Nicotine-mediated activation of dopaminergic neurons in distinct regions of the ventral tegmental area.* Neuropsychopharmacology 2011; 36: 1021-32
- Zhou W., Ke SQ., Huang Z., Flavahan W., Fang X., Paul J., Wu L., Sloan AE., McLendon R., Li X., Rich JN., Bao S. *Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth.* Nat Cell Biol 2015; 17:170-82
- Zoli M., Pistillo F., Gotti C. *Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain.* Neuropharm 2015; 96: 302-11

