

# Modifiche trascrizionali comuni legate all'abuso di cocaina, cannabis e penciclidina

**Elin Lehmann** <sup>1,4,\*</sup>  
**Carlo Colantuoni** <sup>2</sup>  
**Amy Deep-Soboslay** <sup>2</sup>  
**Kevin G. Becker** <sup>3</sup>  
**Ross Lowe** <sup>4</sup>  
**Marilyn Huestis A.** <sup>4</sup>  
**Thomas M. Hyde** <sup>2</sup>  
**Joel E. Kleinman** <sup>2</sup>  
**William J. Freed** <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cellular Neurobiology Research Branch, National Institute on Drug Abuse (NIDA) Intramural Research Program, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, Baltimore, Maryland, United States of America,

<sup>2</sup> Clinical Brain Disorders Branch, GCAP, National Institute of Mental Health (NIMH) Intramural Research Program, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, Bethesda, Maryland, United States of America,

<sup>3</sup> Research Resources Branch, National Institute on Aging (NIA) Intramural Research Program, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, Baltimore, Maryland, United States of America,

<sup>4</sup> Chemistry and Drug Metabolism Section, National Institute on Drug Abuse (NIDA) Intramural Research Program, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, Baltimore, Maryland, United States of America

Un importante obiettivo della ricerca sulle droghe è quello di identificare e comprendere i cambiamenti indotti dalle sostanze stupefacenti sulla funzione cerebrale che sono comuni a molte di esse. Dato che questi possono essere alla base della dipendenza e dell'“addiction”, lo scopo del presente studio è stato quello di esaminare se differenti sostanze determinano modifiche nell'espressione di geni che convergono in comuni percorsi molecolari. È stata impiegata l'analisi mediante “microarray” per valutare l'espressione di geni a livello cerebrale, in campioni autoptici di corteccia prefrontale anteriore (aPFC) da 42 soggetti con storia anamnestica e tossicologica di abuso di cocaina, cannabis e/o phencyclidine e 30 casi controllo. Sono state dimostrate modifiche trascrizionali comuni per la maggior parte dei casi di abuso di sostanze (N = 34), rappresentate da una varietà di cambiamenti significativi di classi funzionali: erano diminuite le trascrizioni connesse alla Calmodulina (CALM1, CALM2, CAMK2B), mentre le trascrizioni relative alla biosintesi e al “trafficking” del colesterolo (FDFT1, APOL2, SCARB1) e alle funzioni (SEMA3B, GCC1) dell'apparato del Golgi/reticolo endoplasmatico (ER) erano tutte aumentate. In singoli casi, la PCR quantitativa ha convalidato la diminuzione in calmodulina 2 (CALM2) mRNA e l'aumento in apolipoproteina L, 2 (APOL2) e in semaphorin 3B (SEMA3B) mRNA. Un confronto tra casi di controllo con e senza malattie cardiovascolari e ad elevato indice di massa corporea ha indicato che tali modifiche non erano in relazione a stress cellulari generali e del metabolismo, ma risultavano specificamente legate all'uso di droghe. Pertanto, soggetti che hanno abusato di cocaina, cannabis e/o phencyclidina condividono una diminuzione della trascrizione di geni legati alla calmodulina e un aumento nella trascrizione di geni legati al metabolismo dei lipidi / colesterolo e alla funzione dell'apparato del Golgi/ER. Queste modifiche rappresentano comuni caratteristiche molecolari dell'abuso di sostanze, che possono essere alla base di cambiamenti della funzionalità e plasticità sinaptica, e che potrebbe avere importanti implicazioni per le capacità decisionali nei tossicodipendenti.

## INTRODUZIONE

Anche se i soggetti con problemi di abuso da sostanze evidenziano preferenze selettive nella scelta individuale delle sostanze, l'abuso di sostanze multiple rappresenta la regola, e non l'eccezione [1]. Gli studi su animali hanno suggerito che, sebbene le differenti sostanze di abuso hanno meccanismi di azione unici e specifici, la stessa via metabolica molecolare può essere coinvolta nella mediazione di comuni effetti funzionali di più sostanze d'abuso [2]. Questi vie metaboliche molecolari possono pertanto riflettere comuni

Titolo originale:  
 “Transcriptional changes common to human cocaine, cannabis and phencyclidine abuse” - PLoS ONE 1(1): e 114. doi: 10.1371/journal.one.0000114

Traduzione a cura di:  
 Addiction & Neuroscience Verona Group.

cambiamenti nella funzione cerebrale, responsabili del continuo uso della droga e dei comportamenti compulsivi nella ricerca della droga, indipendentemente dal tipo di sostanza della quale si abusa

Varie regioni cerebrali sono coinvolte nella creazione e mantenimento dei comportamenti di dipendenza. La regolazione a livello della corteccia prefrontale dei processi cognitivi ed affettivi si modifica con l'abuso di sostanze, al punto che il controllo inibitorio di questi processi è carente, e l'uso della droga è rinforzato [3], [4]. La "aPFC", definito come il polo anteriore dell'Area 10 di Brodmann (BA10), contiene poche cellule, che presentano però una maggior densità e lunghezza rispetto ad altre regioni corticali [5]. Quest'area è mutuamente collegata alla corteccia prefrontale, temporale anteriore, e a quella del cingolo, e si ritiene che determini un importante ruolo integrativo nel perseguimento di obiettivi comportamentali [6]. Si è evidenziata l'attivazione concomitante di aPFC e della corteccia orbitofrontale in seguito alla somministrazione di cocaina in cocainomani [7]. Di conseguenza, l'alterata funzione del aPFC potrebbe avere importanti implicazioni per le capacità decisionali dei tossicodipendenti.

È stata utilizzata l'analisi mediante microarray per identificare i cambiamenti di trascrizione in soggetti con disturbi neuropsichiatrici quali la schizofrenia, la depressione e il disturbo bipolare [8] - [12], e in associazione con specifiche sostanze d'abuso [13] - [16]. In questi studi, tuttavia, mancano le analisi mediante microarray delle caratteristiche generali di trascrizione legate all'abuso di sostanze di per se'. Per affrontare questo argomento, abbiamo eseguito uno studio di microarray su campioni autoptici di aPFC ottenuti da 30 casi controllo e da 42 casi di soggetti con storia di abuso di varie droghe. Sono stati esaminati soggetti con storia di cocaina, cannabis e/o phencyclidine come sostanza primaria di abuso allo scopo di identificare modelli comuni di regolazione dell'espressione genica, che rappresentino funzioni biologiche identificabili. Mediante la classificazione di trascrizioni costantemente regolate in gruppi funzionali biologicamente rilevanti, abbiamo identificato una diminuita espressione di trascrizioni coinvolte nei meccanismi di "signaling" della calmodulina, ed una maggiore espressione di trascrizioni coinvolte nel metabolismo di lipidi /colesterolo e con funzioni correlate al Golgi / ER come comuni caratteristiche molecolari coinvolti in svariati patterns di abuso di sostanze.

## METODI

### Fonte e selezione dei casi

È stata riesaminata, dagli archivi presso la Clinical Brain Disorders Branch (NIMH GIV), una serie di 646 casi consecutivi allo scopo di evidenziare abuso di droghe sulla base dell'anamnesi o della tossicologia. Dei 138 casi

Factor	Drug abuse cases	Control cases	p-value
Brain pH	6.72±0.24	6.68±0.19	p = 0.45*
PMI	25.05±13.72	24.85±7.74	p = 0.93*
Age	31.05±11.09	31.90±8.17	p = 0.69*
Gender	16.7% F, 83.3% M	13.7% F, 86.3% M	p = 0.13**
Nicotine use	38.1% NS, 61.9% S	51.8% NS, 48.2% S	p = 0.12**
Ethnicity	0% A	1.2% A	p = 0.0019**
	85.7% AA	60.7% AA	(AA vs. others)
	9.5% CAUC	28.6% CAUC	
	4.8% HISP	9.5% HISP	

**Tabella 1. Sintesi delle informazioni demografiche per i soggetti con abuso di sostanze (42) e i casi controllo(30).**

Ciascun caso di abuso di sostanze è stato confrontato con 4 casi controllo (informazioni di supporto nella tabella 4) appaiati (matched) per pH cerebrale, intervallo post-mortem (PMI, in ore), età (anni), sesso (F, femminile, M, maschile), uso di nicotina (NS, non fumatori, S, fumatori), etnia (A, asiatici, AA, africani americani, CAUC, caucasici, HISP, ispanici). Le medie indicate rappresentano le medie dei 4 controlli matched a ciascun caso individuale di abuso di una specifica sostanza. I valori di P sono dal t-test (a 2 code) o dal Fisher exact test (a 2 code). Per quest'ultimo test, i dati di ciascun controllo venivano introdotti per il numero di volte che quel controllo veniva utilizzato.

identificati, 50 casi sono stati individuati in base all'anamnesi, 25 in base alla tossicologia, e 63 casi in base ad entrambe le misure. Sono stati esclusi i casi sulla base di gravi co-morbidità neurologiche o psichiatriche, anomalie neuropatologiche microscopiche o macroscopiche, scarsa qualità del RNA, intervalli post-mortem (PMI) > 72 ore, o campioni di tessuto cerebrale con pH <6,0. Sono stati presi in considerazione 42 casi per i quali erano disponibili le storie cliniche a partire dalle cartelle mediche e da files dell'esaminatore, ed interviste strutturate con parenti stretti. I controlli (N = 30) sono stati selezionati da un altrettanto ben caratterizzato coorte di controllo [17]. Per limitare l'impatto di variabili confondenti nei controlli, ogni caso d'abuso di droga è stato abbinato a quattro controlli che, sia individualmente che in media, venivano idealmente appaiati in termini di pH, PMI, età, sesso, etnia e storia di fumo. La tabella 1 fornisce i dati demografici per i soggetti con problemi di abuso e per i controlli, dimostrando che il pH cerebrale, PMI, età e sesso non differivano in modo significativo tra tossicodipendenti e controlli. I dati demografici per i singoli casi vengono forniti nella tabella S1.

### Valutazione tossicologica

Le informazioni tossicologiche generali sulle sostanze d'abuso presenti al momento del decesso sono state ottenute da un medico di ufficio, e completate con ulteriori prove tossicologiche su sangue o cervello, allo scopo di convalidare e ampliare il range di sostanze inizialmente testate (National Medical Services, Willow Grove, PA). In tutti i 72 casi, la presenza di cocaina, anfetamine, phencyclidine, oppiacei e loro metaboliti nel tessuto cerebrale è stata determinata mediante Gas cromatografia-spettrometria di massa (GC-MS) [18]. In aggiunta a questa valutazione tossicologica generale, è stata utiliz-

<i>GC/MS analysis of cocaine, opioids and amphetamines</i>										<i>Other general toxicology data</i>										<i>Hair testing</i>
DOA	COC	BE	EME	EEE	CE	AEME	MOR	COD	PCP	THC	MOR	COD	EIOH	COC, PCP, cTHC, OPIOIDS, AMPHETAMINES						
DA1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	cTHC 1.50						
DA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.06	COC 1.77, cTHC 0.49						
DA3	-	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.10	COC 0.70, cTHC						
DA4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.07	(COC)						
DA5	245	808	426	65	141	-	-	-	-	-	-	-	0.01	(COC)						
DA6	271	390	310	57	196	-	-	-	-	-	-	-	0.03	N/A						
DA7	-	-	-	-	-	-	-	-	PCP	-	-	-	0.26	N/A						
DA8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	cTHC	-	-	-	COC 0.58, cTHC 3.19						
DA9	-	57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.02	N.D.						
DA10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	cTHC	-	-	-	COC >20.0, PCP 1.81, cTHC						
DA11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	THC	-	-	-	COC 0.81, cTHC >1.60						
DA12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.19	N/A						
DA13	145	577	371	83	195	-	-	-	-	-	-	-	0.19	COC >20.0						
DA14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	THC, cTHC	-	-	0.01	N/A						
DA15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N/A						
DA16	107	154	103	-	83	-	-	-	-	-	-	-	0.29	N/A						
DA17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	THC, cTHC	-	-	0.08	cTHC 4.10						
DA18	1377	397	437	79	366	-	-	-	-	cTHC	-	-	0.06	COC4.85, cTHC 1.60						
DA19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	THC	-	-	-	N/A						
DA20	-	-	-	-	-	-	-	-	PCP	-	-	-	0.05	N/A						
DA21	-	-	-	-	-	-	-	333	-	-	-	-	-	N/A						
DA22	-	654	152	-	-	-	-	-	-	-	MOR, MTD	-	-	COC 1.80						
DA23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.12	COC 0.45						
DA24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	THC, cTHC	-	-	-	COC 0.03, cTHC 0.42						
DA25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	THC, cTHC	-	-	-	COC 8.04, PCP 0.32, cTHC 2.55						
DA26	774	524	290	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N/A						
DA27	-	-	-	-	-	-	-	-	PCP	THC	-	-	-	COC 3.53, PCP 2.94, cTHC 0.64						
DA28	1103	413	549	-	-	58	-	-	-	-	-	-	-	COC 3.71, MOR 0.12, 6AM 0.12						
DA29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	THC, cTHC	-	-	0.07	COC 7.18, PCP 1.53, cTHC >5.0						
DA30	248	465	329	90	96	-	-	-	-	-	-	-	0.04	COC >20.0, cTHC 0.29						
DA31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	COC 9.39, cTHC 1.12						
DA32	-	688	438	200	123	-	-	-	-	-	-	-	0.03	(COC)						
DA33	-	2940	1153	-	-	-	88	-	-	-	MOR	-	-	COC 14.3, MOR 2.12, 6AM 0.39, COD 0.85, OXYC 0.07						
DA34	-	425	81	-	-	-	126	-	-	-	MOR	-	-	COC 19.90, MOR 5.72, 6AM 1.01, COD 0.61						
DA35	-	-	-	-	-	-	-	-	PCP	-	-	-	-	cTHC 0.94						
DA36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	COC 0.56, MOR 0.06, 6AM 0.45						
DA37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	THC, cTHC	-	-	-	COC 1.23, cTHC 2.15						
DA38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	cTHC 1.02						
DA39	-	49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N/A						
DA40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.26	NEG						
DA41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(OPIOIDS)						
DA42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	THC, cTHC	-	-	-	COC 1.23, PCP 0.15, cTHC >5.0, MDMA 0.75						

Tabella 2. Valutazione tossicologica.

CASE	ABUSE HISTORY & DURATION	GENERAL TOXICOLOGY	HAIR TOXICOLOGY
DA1	Cannabis, nicotine (N/A)	N.D.	cTHC 1.5
DA2	Crack-cocaine, cannabis, alcohol, nicotine (N/A)	EtOH 0.06 g%	COC 1.8, cTHC 0.5
DA3	Crack-cocaine (2-3 yrs)	BE, EtOH 0.10 g%	COC 0.7, (cTHC)
DA4	Crack-cocaine, alcoholic ("many years")	EtOH 0.07g%	(COC)
DA5	Crack-cocaine (5+ yrs)	COC, BE, EME, CE, EEE	(COC)
DA6	Cocaine, cannabis, nicotine, (heroin, alcohol) (30 yrs)	COC, BE, EME, CE, EEE	N/A
DA7	Crack-cocaine, alcoholic (9 yrs)	PCP, EtOH 0.26 g%	N/A
DA8	Cannabis distribution, nicotine (N/A)	cTHC	COC 0.6, cTHC 3.2
DA9	N.D.	BE	N.D.
DA10	Nicotine (N/A)	cTHC	COC >20.0, PCP 1.8, (cTHC)
DA11	Cannabis (N/A)	(THC)	COC 0.8, cTHC >5.0
DA12	Social drinker (N/A)	EtOH 0.19 g%	N/A
DA13	Nicotine (N/A)	COC, BE, EME, CE, EEE, EtOH 0.19 g%	COC >20.0
DA14	Nicotine (5 yrs)	THC, cTHC	N/A
DA15	Alcoholic, nicotine, (cocaine, cannabis) (25 yrs)	N.D.	N/A
DA16	Alcoholic, cocaine, cannabis, nicotine (14 yrs)	COC, BE, EME, CE, EtOH 0.29 g%	N/A
DA17	N.D.	THC, cTHC, EtOH 0.08 g%	cTHC 4.1
DA18	Cannabis, alcohol, nicotine (10 yrs)	COC, BE, EME, CE, EEE, cTHC, EtOH 0.06g%	COC 4.9, cTHC 1.6
DA19	"Substance abuse history", nicotine (N/A)	THC	N/A
DA20	Cannabis, nicotine (N/A)	PCP, EtOH 0.05 g%	N/A
DA21	PCP, cannabis, nicotine, (alcohol) (12 yrs)	COD	N/A
DA22	Cocaine, heroin, methadone, cannabis, alcohol, nicotine (25 yrs)	BE, EME, MOR, COD, MTD	COC 1.8
DA23	Cannabis, alcohol (N/A)	EtOH 0.12 g%	COC 0.5
DA24	Cannabis, nicotine (N/A)	THC, cTHC	COC 0.03, cTHC 0.4
DA25	Cannabis (use, in utero), alcohol, nicotine (N/A)	THC, cTHC	COC 8.0, PCP 0.3, cTHC 2.6
DA26	N.D.	COC, BE, EME	N/A
DA27	N.D.	PCP, THC	COC 3.5, PCP 2.9, cTHC 0.6
DA28	Crack-cocaine (i.v., smoked), nicotine (13 yrs)	COC, BE, EME, AEME	COC 3.7, MOR 0.1, 6AM 0.1
DA29	Cannabis, alcohol, nicotine (N/A)	THC, cTHC, EtOH 0.07 g%	COC 7.2, PCP 1.5, cTHC >5.0
DA30	(Cocaine, other drugs), nicotine (20 yrs)	COC, BE, EME, CE, EEE	COC >20.0, THC 0.3
DA31	Cannabis, nicotine (1 yr)	N.D.	COC 9.4, cTHC 1.1
DA32	Cocaine, alcohol (N/A)	BE, EME, CE, EEE	(COC)
DA33	Crack-cocaine, nicotine (10 yrs)	BE, EME, MOR, COD	COC 14.3, MOR 2.1, 6AM 0.4, COD 0.9, OXYC 0.1
DA34	Alcoholic ("years")	BE, EME, MOR	COC 19.9, MOR 5.7, 6AM 1.0, COD 0.6
DA35	Cannabis (N/A)	(PCP)	cTHC 0.9
DA36	Alcoholic, cocaine, nicotine (6 yrs)	N.D.	COC 0.6, MOR 0.1, 6AM 0.5
DA37	Cannabis, nicotine (yrs)	THC, cTHC	COC 1.2, cTHC 2.2
DA38	Alcoholic, cannabis, nicotine (30+ yrs)	N.D.	cTHC 1.0
DA39	Alcoholic, nicotine (5 yrs)	BE	N/A
DA40	Alcoholic, cannabis, nicotine (20+ yrs)	EtOH 0.26 g%	N.D.
DA41	Alcohol, (cocaine) (25+ yrs)	N.D.	(opioids)
DA42	Cannabis ("years")	N.D.	COC 1.2, PCP 0.2, cTHC >5.0, MDMA 0.8

Figura 1. Clustering gerarchico con individuazione di tre gruppi principali di casi di abuso di stupefacenti.

Il clustering gerarchico dei singoli profili di trascrizione dai confronti tra soggetti con abuso di sostanze e i corrispettivi 4 casi di controllo identificava tre gruppi principali di modalità di abuso: gruppo I (DA1-18), gruppo II (DA19-34) e gruppo III (DA35-42). Una sintesi della storia tossicologica e anamnestica per l'abuso di sostanze secondo il dendrogramma indica utilizzo di cocaina nella maggioranza dei casi, mentre la presenza di alcol nel gruppo I, e oppioidi e phencyclidine nel gruppo II può spiegare differenze di base nei soggetti del gruppo I e II. I casi nel gruppo III differivano notevolmente dagli altri, essendo caratterizzati dall'assenza o da bassi livelli di abuso di droga nella maggior parte dei casi, una storia di dipendenza da alcol, o di patologie mediche di base.

Un campionamento insufficiente per l'analisi quantitativa di un test di screening positivo per i capelli è indicato da una parentesi attorno al nome della sostanza; le unità sono in ng / mg, fatta eccezione per cTHC (pg / mg). Abbreviazioni: 6AM - 6-acetil morfina, AEME - anidroecgonine metilico, BE - benzoylcegonine, CE - cocaethylene, COC - cocaina, COD - codeina, cTHC - 11-nor-carbossi-9-tetraidrocannabinolo, EEE - ecgonine etile, EME - Ecgonine metilico, EtOH - alcol, g% - g / dl, MDMA - N-metil-3,4-methylenedioxymphetamine (ecstasy), MOR - morfina, MTD - metadone, N / A - non disponibile, OXYC - ossicodone, PBC - phencyclidine, THC - delta-9-tetraidrocannabinolo.

zata l'analisi tossicologica dei capelli per 31 casi di abuso di droghe e 10 casi controllo, analisi che ha fornito una valutazione retrospettiva di esposizione alla cocaina, phencyclidine, anfetamine, oppiacei e cannabinoidi (Psychemedics Corporation, Culver City, CA) nei mesi precedenti il decesso. I dati tossicologici generali e sui capelli sono riassunti nella tabella 2.

#### Sperimentazioni mediante tecniche microarray

Le sperimentazioni mediante tecniche microarray sono state effettuate essenzialmente come descritto in precedenza [14]. Brevemente, l'RNA è stato estratto da so-

stanza grigia polverizzata da BA10 (aspetto dorsale, polo frontale), utilizzando reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). La qualità e la quantità del campione di RNA è stata valutata mediante elettroforesi Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA). Otto µg in totale di RNA da ogni campione sono stati retro-trascritti in singoli campioni di cDNA <sup>33</sup>P-labeled, e divisi per ibridazioni in duplicato in Mammalian Gene Collection (MGC) arrays contenenti cloni di 9216 cDNA da un clone MGC [19]. Gli array sono stati esposti ad uno schermo a fosforo a bassa energia (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) per 5 giorni, dopo di che lo schermo veniva scansionato (Phosphorimager 860, Molecular Dynamics), e l'intensità di

pixel quantificata mediante ImageQuant (Molecular Dynamics).

### Z-score transformation

La serie di dati dei microarray sono stati analizzati utilizzando il metodo di normalizzazione con trasformazione dei dati grezzi in punti  $z$   $z$ -score transformation normalization method" [20], in cui i valori di intensità di ibri-

dazione, in forma logaritmica, fornivano la base per il test di significatività statistica. Per identificare le trascrizioni con espressione diminuita o aumentata sono stati utilizzati valori di  $p$  a 2 code.

### Clustering gerarchico

È stato utilizzato un clustering gerarchico del  $Z$ -ratio utilizzando il software Genesis [21] per valutare il livello di

EG SYMBOL	ACCESSION	LOCALIZATION AND FUNCTION	GAPs: ALL	COC+	THC+	PCP+	AAM	CVDC
<i>Calmodulin-related signaling</i>								
S100A16	BC019099	Calcium-binding protein	0.02	0.05	0.01	0.00	<u>0.01</u>	<u>0.65</u>
THTPA	BC002984	Phosphatase, cAMP biosynthesis, AC activity	0.05	0.05	0.03	0.01	<u>0.05</u>	<u>0.37</u>
CAMK2B	BC019070	Synaptic function and plasticity, calmodulin-modulated	0.02	0.03	0.01	0.00	<u>0.00</u>	<u>0.55</u>
CALM1	BC000454	Synaptic function and plasticity	0.06	0.01	0.17	0.04	<u>0.00</u>	<u>0.45</u>
CALM2	BC018677	Synaptic function and plasticity	0.04	0.00	0.13	0.01	<u>0.00</u>	<u>0.43</u>
CALM2	BC017385	Synaptic function and plasticity	0.05	0.03	0.13	0.01	<u>0.00</u>	<u>0.47</u>
<i>Golgi/ER-related transcripts</i>								
AAK1	BC002695	Golgi/PM, CC AP2-associated kinase	0.93	1.00	0.86	0.98	<u>0.99</u>	<u>0.32</u>
AP1M2	BC005021	Golgi/PM, clathrin-coat (CC) adaptor protein 1 (AP1)	0.95	1.00	0.86	0.97	<u>0.99</u>	<u>0.48</u>
AP2A1	BC014214	Golgi/PM, CC AP2	0.96	0.95	0.96	0.97	<u>0.95</u>	<u>0.36</u>
AP4B1	BC014146	Golgi/PM, CC AP4	0.96	0.96	0.94	0.94	<u>0.97</u>	<u>0.35</u>
FLOT1	BC001146	Lipid raft/caveola-associated, endocytosis (non-CC)	0.04	0.03	0.10	0.00	<u>0.01</u>	<u>0.37</u>
RIMBP2	BC007632	Golgi, synaptic active zone, Rab3-IM-BP	0.04	0.01	0.13	0.00	<u>0.01</u>	<u>0.55</u>
RAB9A	BC017265	Late endosome/lysosome, GTPase, vesicular trafficking	0.04	0.00	0.11	0.01	<u>0.00</u>	<u>0.38</u>
ASGR2	BC017251	Vesicular transport, Galact-term glycoproteins (lysosome)	0.02	0.01	0.03	0.02	<u>0.01</u>	<u>0.65</u>
ARL6IP4	BC015569	Nuclear, ARL6 GTP-binding IP, vesicular trafficking	0.03	0.02	0.06	0.00	<u>0.00</u>	<u>0.61</u>
NCLN	BC019091	ER, TGFbeta superfamily signal transduction	0.08	0.10	0.01	0.02	<u>0.22*</u>	<u>0.62</u>
YIPF5	BC007829	Golgi/ER, Rab GTPase	0.94	0.95	0.94	0.99	<u>0.96</u>	<u>0.30</u>
GCC1	BC014100	Golgi (TGN)	0.96	0.95	0.95	0.98	<u>0.93</u>	<u>0.42</u>
COG4	BC013347	Golgi, retention and retrieval of Golgi proteins	0.93	1.00	0.81	0.98	<u>1.00</u>	<u>0.47</u>
COPZ1	BC002849	ER-Golgi transport, non-CC vesicle coat	0.95	1.00	0.85	0.98	<u>1.00</u>	<u>0.45</u>
CTSD	BC016320	Lysosome, aspartyl protease	0.95	1.00	0.86	0.99	<u>0.99</u>	<u>0.32</u>
DPP7	BC011907	Lysosome, peptidase	0.95	1.00	0.86	1.00	<u>1.00</u>	<u>0.41</u>
CPVL	BC016838	ER, peptidase	0.94	0.99	0.84	0.99	<u>1.00</u>	<u>0.28</u>
LEPREL1	BC005029	ER/Golgi, protein metabolism	0.94	0.95	0.86	0.97	<u>0.97</u>	<u>0.54</u>
SEMA3B	BC013975	ER, growth cone guidance	0.95	0.99	0.87	0.97	<u>0.99</u>	<u>0.34</u>
CRMP1	BC007898	Semaphorin signal transduction pathway	0.91	0.99	0.71	0.94	<u>0.99</u>	<u>0.31</u>
VPS37C	BC005805	Endosome, sorting ubiquitinated transmembrane proteins	0.92	1.00	0.84	0.97	<u>1.00</u>	<u>0.50</u>
<i>Lipid/cholesterol metabolism</i>								
APOL1	BC017331	HDL complex, cholesterol trafficking, secreted	0.03	0.00	0.09	0.02	<u>0.01</u>	<u>0.65</u>
APOL2	BC004395	HDL complex, cholesterol trafficking, cytoplasmic	0.97	0.99	0.91	0.94	<u>0.98</u>	<u>0.30</u>
SCARB1	NM_005505	HDL receptor	0.93	0.99	0.83	0.99	<u>0.99</u>	<u>0.35</u>
FDFT1	BC003573	ER, first step in cholesterol biosynthesis	0.92	1.00	0.83	0.99	<u>1.00</u>	<u>0.47</u>
PRKAB1	BC001823	Cell energy homeostasis, fatty acid biosynthesis	0.91	0.99	0.83	0.98	<u>0.30**</u>	<u>0.50</u>
LASS4	BC009828	ER, Ceramide synthesis	0.95	0.98	0.90	0.98	<u>0.92</u>	<u>0.61</u>
PTGES	BC018201	Prostaglandin metabolism	0.96	0.96	0.94	0.98	<u>0.91</u>	<u>0.34</u>
ZDHHC1	BC021908	Palmitoyl transferase	0.98	0.98	0.96	0.98	<u>0.96</u>	<u>0.32</u>
ZDHHC8	BC009442	Palmitoyl transferase	0.93	0.99	0.83	1.00	<u>0.89</u>	<u>0.49</u>
PHLDB1	BC013031	PtdIns(3,4,5)P(3) binding, postsynaptic membrane	0.95	0.99	0.88	0.97	<u>1.00</u>	<u>0.28</u>
PXMP4	BC001147	Peroxisomal membrane protein, lipid metabolism	0.94	0.95	0.97	0.96	<u>0.96</u>	<u>0.34</u>
ECHDC1	BC003549	Peroxisomal oxidation of fatty acids	0.06	0.04	0.14	0.00	<u>0.01</u>	<u>0.51</u>

Tabella 3. Le trascrizioni regolate in maniera significativa identificavano tre gruppi funzionali come condivisi tra casi di abuso di cocaina, cannabis e phencyclidine

correlazione tra le modifiche trascrizionali per tutti i casi di abuso di stupefacenti.

#### Gruppi definiti da profili trascrizionali globali: selezione e criteri GAP.

Trascrizioni per la quale uno (o più) GAP è risultato  $\leq 0.01$  ( $\geq 0,99$ ) sono stati inclusi per selezionare le trascrizioni fortemente diminuite (o aumentate, rispettivamente) nei singoli gruppi, mentre le trascrizioni in cui uno (o più) GAP presentava valori  $\leq 0.05$  ( $\geq 0,95$ ), e uno (o più) GAP  $\leq 0.10$  ( $\geq 0,90$ ), sono stati selezionati in modo da includere le trascrizioni comuni a due (o più) gruppi. I casi DA 17-18 sono stati omessi dal gruppo I GAP per questo calcolo in quanto rappresentavano un gruppo intermedio tra I e II gruppo (Fig. 1).

#### Gruppi definiti in base agli esami tossicologici: selezione e criteri GAP

I dati tossicologici generali (ad eccezione dei test su capelli) hanno rilevato sostanze d'abuso in 26 casi nei Gruppi I-II. Sono stati esclusi due casi con storie tossicologiche sconosciute e test tossicologici su capelli negativi o non disponibili. I restanti 24 casi erano suddivisi in 12 casi di abuso di cocaina (COC +), 9 di cannabis (THC +), e 3 di phencyclidine (PBC +). La probabilità di una ridotta o aumentata espressione è stata selezionata sulla base di un GAP  $\leq 0,10$  e  $\geq 0,90$ , rispettivamente.

Per selezionare le trascrizioni che erano cambiate in modo analogo nei gruppi definiti dai profili tossicologici descritti sopra ed anche in tutti i 34 casi nei Gruppi I-II i, sono state selezionate le trascrizioni con valori medi di  $p \leq 0.10$  ( $\geq 0,90$ ) per tutti i casi se (i), almeno 30 casi ( $\approx 90\%$ ) aveva un punteggio GAP  $\leq 0.10$  ( $\geq 0,90$ ), e (ii) un GAP  $\leq 0,06$  ( $\geq 0,94$ ), per due (o tre) dei gruppi definiti dalla tossicologia generale.

#### Specificità dei risultati

##### *Etnia*

La valutazione del GAP in sei afro-americani di sesso maschile (AAM) con problemi di abuso di sostanze (casi DA3, 4, 5, 14, 20, 26), che sono stati appaiati ciascuno esclusivamente a quattro AAM casi controllo, è stata impiegata per esaminare se le differenze di etnia svolgevano un ruolo significativo nella selezione della trascrizione. Gli score GAP per casi AAM sono inclusi nella tabella 3.

##### *Malattie cardiovascolari*

Ognuno dei sei casi-controllo in sovrappeso/obesi e con malattie cardiovascolari (CTR 5, 7, 10, 11, 14, 26) veniva confrontato con i migliori tre casi appaiati da un

gruppo di sei casi controllo in sovrappeso ma senza storia di malattia cardiovascolare (CTR 12, 23, 27, 30, 31, 32), come indicato nella tabella S1. I Microarray sono state eseguiti contemporaneamente sia per questi casi che per quelli con abuso di droghe. I punteggi GAP sono inclusi per trascrizioni selezionate per i casi di tossicodipendenza (tabella 3, tabella S2).

#### Annotazione e nomenclatura

I dati sono stati annotati utilizzando Source BatchSearch (<http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/source//sourceBatchSearch>), ed EntrezGene cross-database search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Gquery/gquery.fcgi>). I nomi dei geni e i simboli sono in accordo con la nomenclatura HGNC impiegata da EntrezGene.

#### PCR Real-time quantitativa (QPCR)

L'RNA da una dissezione separata del tessuto corticale aPFC da tutti i soggetti con abuso di droghe e da tutti i casi controllo è stato trattato con DNase (Qiagen Inc, Valencia, CA) e valutato utilizzando il Bioanalyzer. As previously described, L'RNA è stato retro-trascritto utilizzando trascrittasi inversa AMV (Roche Molecular Biologicals, Indianapolis, IN) come precedentemente descritto. Per quantificare il cDNA esaminato, è stato utilizzato un kit commerciale 18S RNA (Ambion, Austin, TX). I Primers sono stati progettati utilizzando MacVector software (Accelrys, San Diego, CA), e sintetizzati da Gene Probe Technology (Gaithersburg, MD): APOL2 (F): aac gcg cac gat aaa gac cag; APOL2 (B): cac cca caa atto cct Tca tca cc; CALM2 (F): gca gaa tcc cac aga aga agc g, CALM2 (B): gcc gcc atto atc atc ctt aaa; SEMA3B (F): ma la ctt tca gcc tgg agc gaa c, SEMA3B (B): Gca aat ggg tgc ggt tgt ag.

La QPCR è stata eseguita utilizzando il DyNAmo® HotStart SYBR Green QPCR kit e la Opticon DNA Engine (MJ Research, Waltham, MA), con 15 minuti di pre-incubazione e 40 cicli di denaturazione a 95 ° C, annealing a 60 ° C, ed estensione a 72 ° C (per 30 secondi ciascuno). Sono stati utilizzati solo i dati all'interno della gamma lineare del test. Un unico prodotto della dimensione prevista è stato confermato dall'analisi della curva di fusione e dall'elettroforesi in gel. I singoli campioni sono stati selezionati sulla base dei valori di  $p$ -. Il rapporto tra i singoli casi di abuso di droghe e i corrispettivi quattro migliori controlli sono stati calcolati sia per gli esperimenti QPCR che per dati microarray. Per questi ultimi dati, il numero di modifiche è stato calcolati dai dati bilanciati sulla stessa media di intensità di ibridazione. I dati rappresentano una media di tre esperimenti indipendenti. Il fattore limitante del numero di individui e di trascrizioni esaminate è stata la quantità di cDNA di controllo disponibile.

## RISULTATI

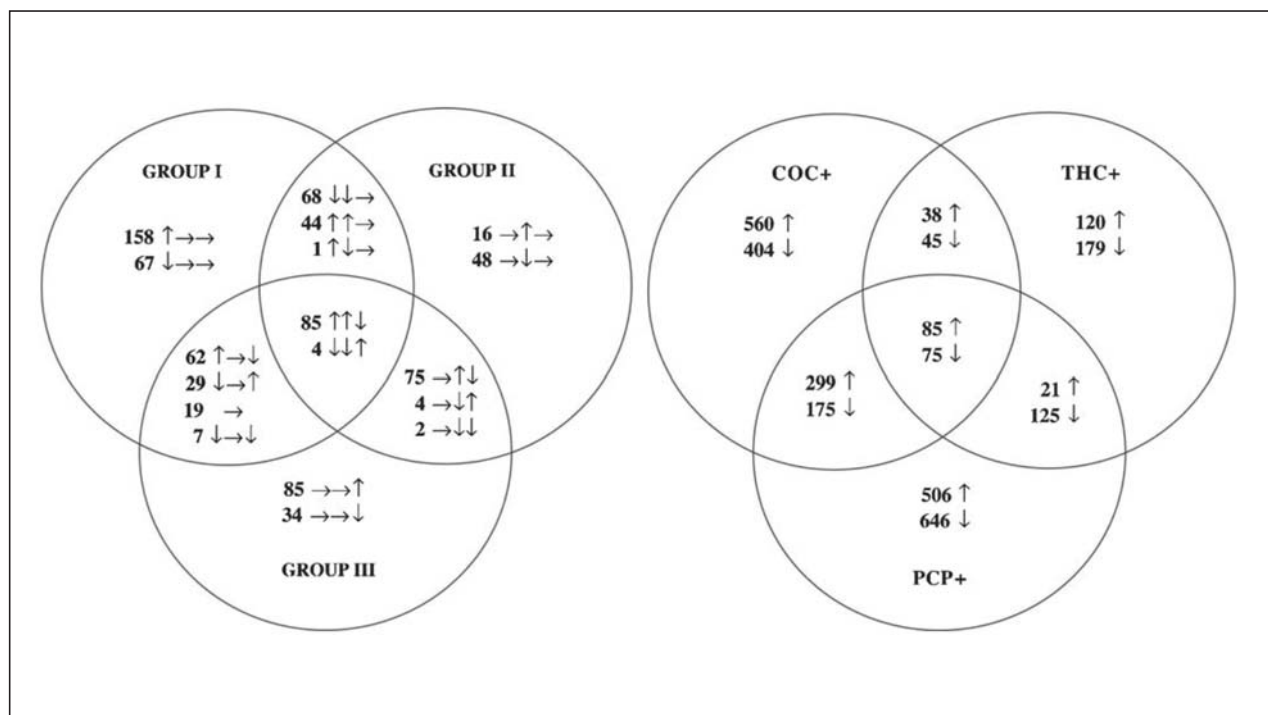
### Gruppi definiti dal clustering gerarchico dei profili trascrizionali globali

Il clustering gerarchico è un primo passo naturale nell'analisi del microarray, dal momento che consente una visione globale del complesso dei dati microarray. Queste informazioni sulle somiglianze e le differenze globali nell'espressione genica rivela raggruppamenti intrinseci con somiglianze nei profili di trascrizione. Per i casi autoptici, che si basano in gran parte su informazioni aneddotiche da parenti stretti, l'anamnesi medica e dell'abuso di sostanze non può essere pienamente conosciuta o evidenziata, con possibilità di influenzare in maniera significativa il profilo di trascrizione, e con possibilità che il clustering gerarchico possa fornire un ulteriore controllo di qualità prima di una analisi comparativa completa.

In primo grado, sono stati discriminati 8 casi di abuso di sostanze [DA(DA35-DA42, Gruppo 3)], il che suggerisce che questi casi erano nettamente differenti dai 34 casi rimanenti, separabili in un gruppo I (DA1-DA18) e un gruppo II (DA19-DA34).

Il confronto in ogni singolo caso dell'anamnesi sull'abuso di sostanze ed i dati tossicologici con il dendrogramma del clustering non distingueva chiaramente i gruppi in base a differenze nella storia d'abuso o della natura della droga presente alla morte. Non è stato possibile attuare una chiara distinzione tra casi di abuso di "cocaina", "Cannabis" e "phencyclidine" sulla base del profilo globale di trascrizione, in quanto una parte significativa di poliabuso di sostanze, per la maggior parte cocaina, cannabis e/o phencyclidine, non era stato identificato in base all'anamnesi ed ai dati tossicologici. Tuttavia, sottogruppi appartenenti ai Gruppi I-III appaiono in qualche modo collegati alla storia di abuso di sostanze o alla tossicologia, come illustrato da un raggruppamento di sei casi con anamnesi positiva per abuso di cocaina / crack- cocaina (DA 2-7), e di due casi con livelli di alcoolemia simili (DA12-13).

Nel complesso, nella maggior parte dei casi (32/42, 76%) l'abuso di cocaina precedente o attuale veniva indicato dall'anamnesi e / o dalla tossicologia generale o del capello (Fig. 1, tabella 2, tabella S1). Livelli di alcoolemia significativi [ $\geq 0,05$  g / dl (g%)] erano maggior-



**Figura 2. Diagrammi di Venn che illustrano la distribuzione delle trascrizioni significativamente alterate in gruppi definiti da profili di espressione globale (A) o dalle sostanze d'abuso (B).**

A. Ottanta-nove trascrizioni sono state regolate in tutti e tre i gruppi definiti da profili di espressione globale. Tutte queste trascrizioni sono state regolate nella stessa direzione (aumentata o diminuita) per il gruppo I (DA1-18) e per il gruppo II (DA19-34), e in direzione opposta per il gruppo III (DA35-42). In tutto, 201/202 trascrizioni condivise tra gruppo I e gruppo II sono stati regolate nella stessa direzione. Per il III Gruppo, 91 di 115 trascrizioni condivise con il gruppo I, e 79 di 81 trascrizioni condivise con il gruppo II, erano regolate nella direzione opposta. Questi dati evidenziano le analogie nel gruppo I e nel gruppo II, e le marcate differenze nei casi del gruppo III. Ogni gruppo di tre frecce indica la direzione del cambiamento nei gruppi I, II e III, rispettivamente. L'aumentata espressione è indicato da ↑, una diminuzione da ↓, mentre → indica nessun cambiamento significativo.

B. I casi con storia clinica di abuso di sostanze e positività tossicologica per la cocaina, cannabinoidi o phencyclidine su sangue, cervello od urine sono stati raggruppati nei seguenti gruppi: COC +, PCP THC + +. Mentre non vi sono state significative differenze nelle trascrizioni di questi gruppi, un totale di 160 trascrizioni (≈ 2% di tutte le trascrizioni) erano ripartite nei tre gruppi. Da notare che un numero molto minore di trascrizioni sono stati identificate per il gruppo THC + (264 aumenti, 424 diminuzioni) rispetto a COC + (982 aumenti, 699 diminuzioni) e PBC + (911 aumenti, 1021 diminuzioni) gruppi. L'aumentata espressione è indicato da ↑, l'espressione diminuita da ↓.

mente rappresentati nel gruppo I (9 / 18, 50%) rispetto al gruppo II (3/16, 19%). Al contrario, non sono stati trovati oppiacei nel gruppo I, presenti invece in 5 / 16 (31%) casi nel gruppo II. Inoltre, nel gruppo II erano presenti 5 dei 9 (56%) casi di abuso di phencyclidine, mentre i gruppi I e II ne avevano due casi ciascuno (22%).

I casi nel gruppo III apparivano differenti da quelli nei gruppi I e II, dal momento che rappresentavano casi caratterizzati da assenza o presenza residua di cocaina, cannabis o phencyclidine e rispettivi metaboliti, contemporaneamente però a condizioni patologiche significative, quali shock anafilattico, depressione maggiore, atteggiamento suicida, e patologie organiche legate ad alcolismo cronico. Cinque pazienti (DA36, DA38-41) sono stati principalmente descritti come alcol dipendenti. I tre casi restanti (DA35, DA37, DA42) venivano caratterizzati da storia di abuso di cannabis, ma gli esami tossicologici generali e quelli sui capelli rivelavano ulteriore abuso di sostanze, mentre gli esami neuropatologici rivelavano alterazioni cerebrali su base ischemica e / o edema cerebrale.

#### Distribuzione delle variazioni individuali in gruppi definiti da profili globali di trascrizione

Le sopracitate differenze nel gruppo III rispetto ai gruppi I e II sono state ulteriormente confermate dall'esame delle variazioni in trascrizioni singole per questi gruppi (Fig. 2A). Per individuare le trascrizioni individuali caratterizzate da espressione aumentata o diminuita in almeno uno dei gruppi identificati in base al clustering gerarchico, è stato utilizzato il criterio del valore medio di  $p$  nei gruppi (GAP), calcolato sulla base del test  $z$  a due code e dal confronto dei valori di  $z$  per ciascun caso di abuso di sostanze rapportato a 4 controlli idealmente matched.

Di 808 trascrizioni singole identificate (Fig. 2A), 89 erano significativamente cambiate in tutti e tre i gruppi. Tutte erano regolate nella stessa direzione per Gruppi I-II, e nella direzione opposta per il Gruppo III. L'espressione di 85 trascrizioni, comprese APOL2, GCC1, PTGES, erano aumentate nei gruppi I-II e diminuite nel gruppo III. TYMS, C5orf3, PTRF e KLF5 erano diminuite nei gruppi I e II e aumentate nel gruppo III.

113 ulteriori trascrizioni erano notevolmente cambiate limitatamente ai Gruppi I-II; 44 trascrizioni, con l'inclusione di FIBP, VTN, STOM, ICAM1, SEMA3B, RARG, RARA, erano aumentate, e 68 trascrizioni, con l'inclusione di APOL1, CALM1, CALM2, CAMK2B, GNB2L1, HINT1, RAB9A, CHEK1, PPP2CA e NFKBIA, erano diminuite. Solo una trascrizione, SP100, era aumentata nel gruppo I e diminuita nel gruppo II. Di conseguenza, 201 delle 202 trascrizioni variavano notevolmente nei gruppi I e II avevano subito modifiche nella stessa direzione.

In conclusione, rispetto ai gruppi I e II, gli 8 casi nel gruppo III rappresentavano differenti storie di abuso di sostanze e di profili tossicologici (Fig. 1). Sebbene l'esatta natura di queste differenze non poteva essere legata causalmente a fattori specifici presenti ante- o post-mortem, la dipendenza da alcol risultava una diagnosi primaria in 5 degli 8 casi nel gruppo III e, insieme con basse o assenti concentrazioni di cocaina, cannabis o phencyclidine ed in assenza di altri problemi medici, poteva avere portato ad una regolazione opposta delle 89 trascrizioni nel gruppo III condivise tra tutti e tre i gruppi, di 91/115 trascrizioni mutate sia nel gruppo I che nel gruppo III, e di 79/81 trascrizioni mutate in entrambi i gruppi II e III.

Dal momento che i casi nel gruppo III rappresentavano una piccola minoranza, con caratteristiche nettamente diverse, ci siamo concentrati sullo studio del gruppo di 34 casi nei gruppi I e II.

#### Regolazione della trascrizione in gruppi definiti da tossicologia e storia di abuso

Per identificare le trascrizioni che erano regolate analogamente da cocaina, cannabis e phencyclidine, abbiamo nuovamente utilizzato la valutazione GAP per esaminare 24 casi nei Gruppi I-II con conferma anamnestica di abuso di sostanze ed evidenza tossicologica al momento del decesso di presenza di cocaina, cannabis o phencyclidine (COC +, il THC+ e PBC +, rispettivamente). Tutto questo ha portato all'identificazione di 160 trascrizioni condivise nei gruppi COC +, THC+ e PBC + (Fig. 2B). Inoltre, 474 trascrizioni erano condivise tra i gruppi COC+ e PBC +, 83 trascrizioni tra i gruppi COC+ e THC +, e 146 trascrizioni tra i gruppi PCP+ e THC +. Un totale di 964, 299 e 1152 trascrizioni erano mutate esclusivamente nei gruppi COC +, THC+ e PBC +, rispettivamente. Degno di nota è il basso numero totale di trascrizioni individuate per i casi di abuso di cannabis.

*In conclusione*, mentre vi erano differenze significative nella regolazione trascrizionale tra casi caratterizzati da abuso di cocaina, cannabis o phencyclidine, una regolazione simile della trascrizione era presente all'interno delle classi di droghe e di casi per un totale di 160 trascrizioni.

#### Selezione e annotazione funzionale di trascrizioni condivise in base all'abuso di sostanze specifiche

Per selezionare le trascrizioni che riflettono gli effetti del consumo di droga, indipendentemente da quale farmaco specifico venisse utilizzato, sono state utilizzate solo trascrizioni che venivano identificate come mutate significativamente in base ai criteri GAP nella maggioranza dei casi (30/34) nei gruppi I-II di abuso, ed in due gruppi di abuso su tre (COC +, THC + e PBC+). Dopo l'esclusione di cloni cDNA rimossi da GenBank, rimaneva una



lista di 139 trascrizioni, che sono stati ordinate in base alla funzione e alla posizione (tab. S2). Tre gruppi funzionali, che comprendono 39 trascrizioni (Tabella 3), sono discussi di seguito.

Un generale decremento è stato osservato per le trascrizioni calcio/calmodulina-regolate (CALM1, CALM2, CAMK2B, S100A16), e per una trascrizione che codifica per un fosfatasi che si ritiene coinvolta nella biosintesi del cAMP e nell'attività dell'adenilato ciclici (AC) (THTPA).

**Trascrizioni legate all'apparato del Golgi / ER**

Erano aumentate le trascrizioni coinvolte in vari aspetti delle funzioni dell'apparato del Golgi / ER (YIPF5, GCC1, COG4, COPZ1, VPS37C, LEPREL1, CPVL, SEMA3B). Inoltre, erano aumentate le trascrizioni di codifica delle adaptine e una adaptino-chinasi (AP1M2, AP2A1, AP4B1, AAK1) associata a vescicola di endocitosi "clathrin-coated" sulla membrana plasmatica e al trasporto tra l'apparato di Golgi ed il sistema endosomale. Mentre le trascrizioni di codifica per gli enzimi lisosomiali (CTSD, DPP7) erano aumentate, erano diminuite le trascrizioni di codifica delle proteine coinvolte nel traffico vescicolare a livello sinaptico (RIMBP2, ARL6IP4), quelle per il trasporto dall'endosoma al lisosoma (ASGR2, RAB9A), e un indicatore coinvolto nell'endocitosi clathrin-indipendente (FLOT1).

**Metabolismo dei Lipidi/colesterolo**

La maggior parte delle trascrizioni di regolazione della biosintesi del colesterolo (FDFT1, PRKAB1) e del trafficking (SCARB1, APOL2) erano aumentate, mentre erano diminuite la trascrizione dell'apolipoproteina secreta APOL1 e di una proteina peroximale (ECHDC1) coinvolta nella beta-ossidazione del colesterolo. L'espressione delle trascrizioni LASS4, PTGES, ZDHHC1 e ZDHHC8, coinvolte nella biosintesi, metabolismo e nella modifica di lipidi, erano tutte aumentate.

**Polymerase Chain Reaction quantitativa (QPCR)**

Sono state esaminate mediante QPCR le trascrizioni rap-

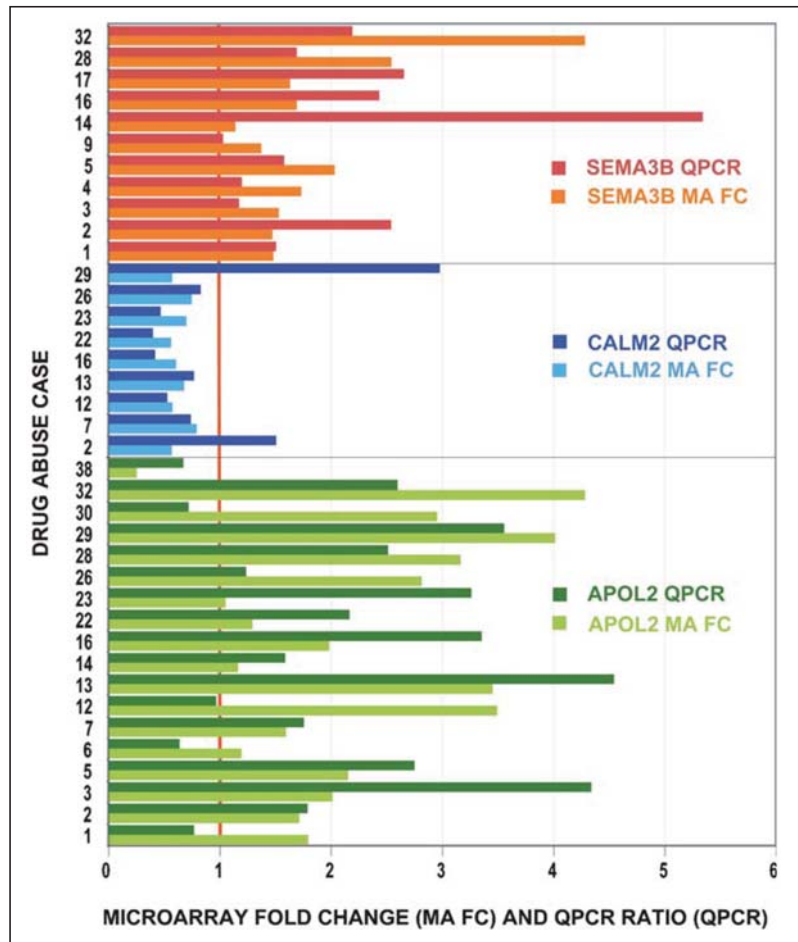


Figura 3. Validazione dei dati del microarray mediante PCR quantitativa (QPCR).

Sono stati esaminati mediante QPCR 3 rappresentanti di gruppi funzionali costantemente modificati (Tabella 3): calmodulina 2 (CALM2, barre blu), apolipoproteina 2 (APOL2, barre verdi), e semaphorina 3B (SEMA3B, barre arancio). I numeri sull'asse delle x rappresentano sia il numero di fold-change nel microarray (FC, barre blu, verdi o arancio pallido) per ogni singolo caso di abuso di sostanze rispetto ai 4 controlli appaiati, o il rapporto QPCR (QPCR, barre blu, verdi o arancione scuro), mentre i numeri sull'asse delle y rappresentano i singoli casi di abuso esaminati. L'analisi mediante QPCR ha convalidato in 32 dei 38 casi (84%) i dati dei microarray, eseguiti utilizzando distinti set di sezioni di cervello e di estrazioni di RNA, da ciascuno dei casi di abuso di sostanze e dai corrispettivi 4 controlli appaiati.

presentanti tre classi funzionali consistentemente modificate (Fig. 3). Questi esperimenti sono stati eseguiti in triplice copia per ogni caso di abuso di sostanze e per i 4 controlli matched, utilizzando dissezioni aPFC ed estrazioni di RNA differenti da quelle utilizzati per gli esperimenti di microarray. I dati microarray sono stati espressi come cambiamenti nel numero di volte tra casi individuali di abuso di sostanze e controlli al fine di facilitare un più diretto rapporto tra i dati da QPCR analisi per i casi con il medesimo tipo di abuso.

L'espressione della Calmodulin 2 (CALM2) (Fig. 3, barre blu), era ridotta in due cloni microarray CALM2. La QPCR confermava la diminuzione dell'espressione di CALM2 in 7 dei 9 casi di abuso di stupefacenti.

L'espressione dell'Apolipoproteina L, 2 (APOL2) (Fig. 3, barre verdi), era aumentata mediante l'analisi microarray. La QPCR ne confermava l'aumento in 13 dei

17 casi. Per esaminare se la diminuzione rilevata dall'analisi microarray era dimostrabile mediante QPCR, è stato utilizzato un caso (DA38) nel gruppo III. Per questo, la diminuita espressione caso veniva convalidata mediante QPCR.

L'espressione della Semaphorina 3B (SEMA3B) (Fig. 3, barre arancione) era aumentata mediante l'analisi microarray, e veniva convalidata in tutti gli 11 casi esaminati mediante QPCR.

Nonostante ci si aspettasse una certa variabilità, legata all'utilizzo di differenti dissezioni per i microarray e la QPCR, il pattern generale e il livello di differenze rilevate mediante le due tecniche era molto simile, con una concordanza di risultati in 32/38 casi (84%).

#### Specificità di questi risultati rispetto alla etnia

Mentre si osservava corrispondenza tra gruppo di abuso di sostanze e gruppi di controllo per 5 dei potenziali fattori di confondimento (pH del cervello, PMI, età, sesso e storia di fumo) (Tabella 1), un sesto fattore di corrispondenza (etnia) risultava discrepante, al punto da richiedere un'analisi separata per risolvere il problema.

Dal momento che 36 soggetti con problemi di abuso di sostanze erano afro-americani (86%) e per la maggior parte di sesso maschile (33/42, 79%), abbiamo esaminato la significatività statistica media delle differenze (valore medio di  $p$ , per il gruppo, GAP, mediante test  $Z$  a due code) tra casi di abuso e controlli per 6 casi di abuso di droghe per i quali sia i casi di abuso che i corrispettivi 4 controlli erano di sesso maschile e di origine afro-americano (AAM). Anche se questa analisi impiegava solo 1 / 6 dei 34 casi di abusi di sostanze analizzati (Tabella 3), 37 delle 39 trascrizioni analizzate rimanevano significative ad un livello simile. Per NCLN, la media del valore di  $p$  è stata pari a 0,22, a causa di uno outlier, mentre la mediana era di 0,00 per i sei casi AAM, ad indicare che questa trascrizione mutava in modo analogo per la maggior parte dei casi. Per PRKAB1, la media del valore di  $p$  era diminuito da  $p = 0,91$  per tutti i 34 casi, ad un valore di  $p = 0,30$  per i sei casi di abuso di droga AAM (mediana del  $p = 0,03$ ). Pertanto, 38 delle 39 trascrizioni erano variate in modo analogo quando si confrontavano tutti i casi con i sei casi AAM. Di conseguenza, l'etnia dei casi non esercitava una notevole influenza sull'identificazione delle trascrizioni cambiate significativamente tra i casi di abuso di sostanze.

#### Specificità di questi risultati rispetto all'abuso di sostanze

Al fine di determinare se tali modifiche erano specifiche per la droga di abuso o potevano riflettere una comune risposta fisiologica a malattie cardiovascolari, come complicità comune nei casi di abuso di sostanze, o di stress ossidativo secondario all'uso di droghe, abbiamo esami-

nato i casi controllo, con o senza malattia cardiovascolare. Sono stati confrontati 6 casi controllo in soprappeso/obesi con malattia cardiovascolare e 6 casi controllo/sovrapeso senza storia di malattia cardiovascolare. Il valore di GAP valutazione non raggiungeva la significatività statistica per alcuna delle trascrizioni identificate come aumentate o diminuite in casi di abuso di stupefacenti (Tabella 3, Tabella S2).

## DISCUSSIONE

La corteccia prefrontale è coinvolta direttamente nel circuito neurobiologico che facilita l'uso di droghe e il comportamento compulsivo di ricerca di droghe, e sembra essere coinvolta allo stesso modo per le varie sostanze d'abuso. Abbiamo quindi ipotizzato che differenti tipi di abuso di sostanze potevano condividere mutazioni trascrizionali simili, secondari a cambiamenti simili della funzione cellulare. Abbiamo testato questa ipotesi utilizzando la tecnologia microarray su campioni aPFC autoptici in 42 casi con anamnesi positiva per abuso di differenti sostanze, sulla base della revisione di storie cliniche o di colloqui con parenti stretti e sui risultati degli esami tossicologici.

#### Cambiamenti Trascrizionali globali

Il clustering gerarchico dei profili di trascrizione globale e la valutazione dei cambiamenti nelle trascrizioni individuali dimostrava cambiamenti costanti nell'espressione genica nella maggior parte dei casi ( $N = 34$ ). Un sottogruppo di otto casi di soggetti con abuso di sostanze mostrava modifiche nell'espressione genica marcatamente differenti, e per la maggior parte di segno opposto, che riflettevano evidenti differenze nella storia di abuso nel corso della vita, della tossicologia e di altre condizioni mediche.

#### Annotazione Funzionale

Sulla base di una coorte di 34 casi di soggetti con abuso di sostanze, abbiamo individuato e assegnato una funzione e / o una locazione a 139 trascrizioni (tab. S2). Nessuna di queste trascrizioni risultava significativamente alterata dalla combinazione di stress cellulari in corso di malattie cardiovascolari e dall'elevato indice di massa corporea (Tabella 3, Tabella S2). Sono state selezionate 3 distinte categorie funzionali (Tabella 3) per ulteriori approfondimenti nel quadro del loro potenziale impatto sulla funzione aPFC.

#### Il sistema di signaling della calmodulina

Erano diminuite le trascrizioni che codificavano segnali legati al sistema calcio/ calmodulin; questi dati sono stati

convalidati dall'analisi per CALM2 mediante QPCR (Fig. 3). In precedenza, studi autoptici sul cervello umano hanno dimostrato una generale diminuzione della trascrizione dei segnali calcio / cAMP-correlati nella corteccia frontale e motoria di alcolisti [13], una diminuzione nei livelli e nell'attività di adenilato ciclasi (AC) di tipo I (AC-I) nella corteccia frontale e temporale di alcolisti [22] - [23], e di AC-I mRNA e di proteine nella corteccia temporale di tossicodipendenti da eroina [24]. Mentre i livelli di proteine AC-I sono rimasti invariati nella corteccia prefrontale di tossicodipendenti da oppiacei, non si sono osservate riduzioni significative nel flusso MAPK nella sistema di segnalazione a cascata [25]. Inoltre, la somministrazione di metanfetamine diminuisce l'attività calcio/calmodulina-dipendente della proteina chinasi II (CAMKII) e il CAMKII ? fosforilato (ma non il totale) nella corteccia frontale e parietale del ratto [26].

Dal momento che è stato ipotizzato che la calmodulina possa essere un integratore centrale della plasticità sinaptica [27] ed essere in grado di modulare l'attività e la sensibilità al calcio di molecole di segnalazione fondamentali, come ad esempio AC, CAMKII e IV (CAMKIV) e la via di segnalazione Ras-MAPK, si ritiene che questo effetto potrebbe avere un impatto significativo su una serie di percorsi di segnalazione. Uno di questi target è rappresentato da CAMKII, che è fondamentale per la creazione di plasticità e memoria sinaptica, e nella stabilizzazione dell'architettura dendritica [28], con un ruolo specifico per CAMKIIB nell'indirizzare l'isoforma alfa CAMKII nelle spine dendritiche e nelle cellule corticali [29]. La diminuzione significativa di trascrizioni CALM1, CALM2 e CAMKIIB suggerisce che una alterata regolazione della neuroplasticità e dell'architettura dendritica mediata dalla via metabolica della calmodulina potrebbe rappresentare un tema comune dell'abuso di cocaina, cannabis e/o phencyclidine nell'uomo.

#### Metabolismo dei lipidi e del colesterolo: famiglia dell'Apolipoproteina L

Un aumento della trascrizione è stato dimostrato per le trascrizioni relative al metabolismo dei lipidi e del colesterolo, ad eccezione di due trascrizioni di codifica delle proteine che riducono il colesterolo disponibile nella cellula mediante escrezione o metabolismo. Era aumentata l'espressione di trascrizioni di codifica per il primo passo specifico nel percorso biosintetico del colesterolo (FDFT1), del recettore (SCARB1) lipoproteico ad alta densità (HDL), e di un inibitore della biosintesi del colesterolo (PRKAB1). Da notare in particolare che erano aumentate le trascrizioni dell'apolipoproteina L (APOL), come anche convalidato mediante metodiche QPCR (Fig. 3). La famiglia di proteine APOL è rappresentata da HDLs, che svolgono un ruolo centrale nel trasporto del colesterolo e nell'omeostasi. I sei geni APOL conosciuti sono presenti esclusivamente nei primati, con i

geni APOL1-4 che formano un grappolo serrato sul cromosoma umano 22q13.1 [30]. La trascrizione APOL2 è espressa in maggior parte nel cervello, mentre la trascrizione APOL1 differisce da altre trascrizioni APOL per un ulteriore esone che produce una proteina secreta APOL [30]. Queste differenze possono anche essere alla base delle opposte modifiche nelle trascrizioni APOL1 e APOL2 in casi di abuso di stupefacenti. APOL4 era significativamente aumentata solo in casi di soggetti con problemi di abuso di cocaina.

Il colesterolo è indispensabile per il funzionamento neuronale, la plasticità sinaptica e la mielinizzazione del CNS [31] - [32]. Funzionalmente, questa osservazione può essere messa in relazione al calo di volume della sostanza bianca frontale osservati in tossicodipendenti [33]. La normale maturazione della sostanza bianca frontale sembra essere arrestata nei lobi frontali e temporali di soggetti che abusano di cocaina [34]. Studi con metodologia microarray hanno dimostrato cambiamenti nelle trascrizioni di mielina nel nucleo accumbens e nella corteccia prefrontale di soggetti che abusano di cocaina [14], [16]. Queste osservazioni ricordano la situazione della corteccia prefrontale in soggetti schizofrenici, dove l'espressione di trascrizioni APOL1, 2 e 4 sono aumentate [35], e le trascrizioni di mielina diminuite [9]. Variazioni in questi geni che codificano per il metabolismo lipidico, specifiche dei primati, sottolineano le differenze intrinseche tra modelli in non primati e l'abuso di sostanze nell'uomo a livello cellulare, e sottolineano l'importanza di studi autoptici sul cervello umano.

#### "Trafficking" intracellulare e compartimenti ER / Golgi

Si osservavano modifiche in un certo numero di trascrizioni di codifica delle proteine che regolano il traffico intracellulare di vie secretorie, con un aumento predominante di trascrizione per trascrizioni connesse a ER / Golgi connessi. Un aumento della trascrizione della proteina ER-residente semaphorin 3B (SEMA3B) è stato convalidato mediante QPCR (Fig. 3). Questo aumento riflette i significativi aumenti di SEMA3B mRNA nell'ippocampo e nel nucleo accumbens indotti da cocaina in animali cocaina-sensibilizzati o trattati cronicamente con cocaina [36]. Le semaphorine secrete svolgono ruoli critici per la crescita della zona di orientamento, di posizionamento assonale e nella modulazione dei dendriti apicali corticali [37] - [39], nella maturazione delle ramificazioni dendritiche e spinali [39], e sono in grado di modulare la trasmissione sinaptica nel cervello adulto [40]. Trascrizioni di adattatori di clatrina e una chinasi associata all'adattatore funzionante in vescicole carrier di clatrina fra il network trans-Golgi e il sistema endosomiale e vescicole endocitiche di membrana plasmatica sono risultate aumentate. Trascrizioni per le quali era diminuita l'espressione erano rappresentate principalmente associate al traffico vescicolare a livello sinaptico, all'en-

docitosi clathrin-indipendente o al trasporto dall'endosome al lisosoma.

I neuroni hanno un'unica organizzazione delle loro vie secretorie, con la trasformazione di membrane e di lipidi nel Golgi, e ulteriori trasporti tra ER e Golgi in dendriti [41], che consente ai dendriti con apparato di Golgi di essere più lunghi e complessi [42]. In tale contesto, l'aumento nella trascrizione di geni relativi a processi di sintesi e trasformazione di ER e Golgi, e la diminuzione della trascrizione dei geni coinvolti in altre funzioni di trasporto è interessante, e suggerisce che i cambiamenti nella funzione dendritica e della plasticità della PFC è condivisa tra i soggetti con abuso di stupefacenti.

### Implicazioni

È stato accertato che l'abuso di droghe, come la cocaina, anfetamine e morfina impartisce una plasticità strutturale dipendente dall'esperienza e che altera la lunghezza e le complessità dendritiche in aree cerebrali associate con modifiche persistenti farmaco-indotte [43] - [45], e che le modifiche possono ulteriormente limitare in seguito la plasticità strutturale dipendente dall'esperienza. [46].

La regione aPFC si distingue da altre regioni corticali per la sua connettività sinaptica estremamente complessa e per le arborizzazioni dendritiche [5] - [6]. Pertanto, le modifiche specifiche nelle trascrizioni coinvolte nel signaling calmodulina-regolamentato, il metabolismo del colesterolo e le funzioni ER / Golgi possono essere correlate ai cambiamenti indotti dai farmaci nella funzione neuronale e nella plasticità sinaptica che sono condivisi in corso di abuso di cocaina, cannabis e phencyclidine.

## INFORMAZIONI DI SUPPORTO

### *Tabella S1.*

Dati demografici essenziali per la tossicodipendenza. Ciascun caso di abuso di sostanze è stato abbinato a

quattro controlli, come indicato nella colonna del gruppo di controllo, relativi a pH cerebrale, intervallo post-mortem (PMI, ore), età (anni), etnicità (A - asiatici, AA - afro-americani, CAUC - caucasici, HISP -- Ispanici), sesso (F - femmina, M - maschio) e storia di fumo (SI o NO). La modalità di morte è stata accidentale (A), naturale (N), per omicidio (H), o suicidio (S). I casi controllo con CVD (CTR12, 23, 27, 30-32) sono stati confrontati con casi controllo senza CVD (CTR5, 7, 10, 11, 14, 26), come indicato in corsivo nella colonna gruppo di controllo, per esaminare l'effetto di malattie cardiovascolari sulla espressione genica. Altre abbreviazioni: ASCVD - CVD aterosclerotica, CVD - malattie cardiovascolari, GSW - ferita da arma da fuoco, HCVD - CVD ipertensiva, MGSW - trascrizioni di GSWsst multiple. Gene symbols were annotated using GenBank Accession numbers and EntrezGene. I simboli di geni sono stati annotati utilizzando numeri di accesso GenBank e EntrezGene.

### *Tabella S2.*

Elenco completo delle trascrizioni regolate in maniera significativa in campioni autoptici aPFC da soggetti con abuso di cocaina, phencyclidine e / o cannabis. 139 trascrizioni erano regolate significativamente da criteri media di valore p- per gruppo (GAP) i. Overweight/obese controls with cardiovascular disease (CVDC) compared to normal/overweight controls () illustrated that drug-induced cellular stress was not an underlying cause in the common transcriptional patterns in the drug abuse cases. Confronto tra controlli in sovrappeso / obesi con malattie cardiovascolari (CVDC) e controlli sovrappeso / obesi in assenza di malattie cardiovascolari (Tabella S1),; il confronto evidenzia che lo stress cellulare indotto dalle droghe non risultava tra le cause responsabili del pattern trascrizionale comune in soggetti con abuso di sostanze. I simboli dei gene sono stati annotati utilizzando numeri di accesso GenBank e EntrezGene.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Rounsaville BJ, Petry NM, Carroll KM (2003) Single versus multiple drug focus in substance abuse clinical trials research. *Drug Alcohol Depend* 70: 117–125.
2. Nestler EJ (2005) Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci* 8: 1445–1449.
3. Goldstein RZ, Volkow ND (2002) Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *Am J Psychiatry* 159: 1642–1652.
4. Spinella M (2003) Relationship between drug use and prefrontal-associated traits. *Addict Biol* 8: 67–74.
5. Jacobs B, Schall M, Prather M, Kapler E, Driscoll L, et al. (2001) Regional dendritic and spine variation in human cerebral cortex: a quantitative Golgi study. *Cereb Cortex* 11: 558–571.
6. Ramnani N, Owen AM (2004) Anterior prefrontal cortex: insights into function from anatomy and neuroimaging. *Nat Rev Neurosci* 5: 184–194.
7. Kufahl PR, Li Z, Risinger RC, Rainey CJ, Wu G, et al. (2005) Neural responses to acute cocaine administration in the human brain detected by fMRI. *NeuroImage* 28: 904–914.
8. Mirnics K, Middleton FA, Marquez A, Lewis DA, Levitt P (2000) Molecular characterization of schizophrenia viewed by microarray analysis of gene expression in prefrontal cortex. *Neuron* 28: 53–67.
9. Hakak Y, Walker JR, Li C, Wong WH, Davis KL, et al. (2001) Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4746–4751.
10. Sokolov BP, Jiang L, Trivedi NS, Aston C (2003) Transcription profiling reveals mitochondrial, ubiquitin and signaling systems abnormalities in post-mortem brains from subjects with a history of alcohol abuse or dependence. *J Neurosci Res* 72: 756–767.
11. Vawter MP, Crook JM, Hyde TM, Kleinman JE, Weinberger DR, et al. (2002) Microarray analysis of gene expression in the prefrontal cortex in schizophrenia: a preliminary study. *Schizophrenia Res* 58: 11–20.
12. Evans SJ, Choudary PV, Neal CR, Li JZ, Vawter MP, et al. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 15506–15511.
13. Mayfield RD, Lewohl JM, Dodd PR, Herlihy A, Liu J, et al. (2002) Patterns of gene expression are altered in the frontal and motor cortices of human alcoholics. *J Neurochem* 81: 802–813. *Gene Expression in Drug Abuse*
14. Lehrmann E, Oyler J, Vawter MP, Hyde TM, Kolachana B, et al. (2003) Transcriptional profiling in the human prefrontal cortex: evidence for two activation states associated with cocaine abuse. *Pharmacogenomics J* 3: 27–40.
15. Tang WX, Fasulo WH, Mash DC, Hemby SE (2003) Molecular profiling of midbrain dopamine regions in cocaine overdose victims. *Molecular profiling of midbrain dopamine regions in cocaine overdose victims. J Neurochem* 85: 911–924.
16. Albertson DN, Pruetz B, Schmidt CJ, Kuhn DM, Kapatos G, et al. (2004) Gene expression profile of the nucleus accumbens of human cocaine abusers: evidence for dysregulation of myelin. *J Neurochem* 88: 1211–1219.
17. Lipska BK, Deep-Soboslay A, Weickert CS, Hyde TM, Martin CE (2006) Critical factors in gene expression in postmortem human brain: focus on studies in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 60: 650–658.
18. Lowe RH, Barnes AJ, Lehrmann E, Freed WJ, Kleinman JE, et al. (2006) A validated positive chemical ionization GC/MS method for the identification and quantification of amphetamine, opiates, cocaine, and metabolites in human postmortem brain. *J Mass Spectrom* 41: 175–184.
19. Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, et al. (2002) Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16899–16903.
20. Cheadle C, Vawter MP, Freed WJ, Becker KG (2002) Analysis of microarray data using Z score transformation. *J Mol Diagn* 5: 73–81.
21. Sturn A, Quackenbush J, Trajanoski Z (2002) Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics* 18: 207–208.
22. Sohma H, Hashimoto E, Shirasaka T, Tsunematsu R, Ozawa H, et al. (1999) *Biochim Biophys Acta* 1454: 11–18.
23. Hashimoto E, Frolich L, Ozawa H, Saito T, Maurer K, et al. (1998) Reduced immunoreactivity of type I adenylyl cyclase in the postmortem brains of alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 22: 88S–92S.
24. Shichinohe S, Ozawa H, Hashimoto E, Tatschner T, Riederer P, et al. (2001) Changes in the cAMP-related signal transduction mechanism in post-mortem human brains of heroin addicts. *J Neural Transm* 108: 335–347.
25. Ferrer-Alco'n MJ, Garcia-Fuster M, La Harpe R, Garcia-Sevilla JA (2004) Longterm regulation of signalling components of adenylyl cyclase and mitogenactivated protein kinase in the pre-frontal cortex of human opiate addicts. *J Neurochem* 90: 220–230.
26. Suemaru J, Akiyama K, Tanabe Y, Kuroda S (2000) Methamphetamine decreases calcium-calmodulin dependent protein kinase II activity in discrete rat brain regions. *Synapse* 36: 155–166.
27. Xia Z, Storm DR (2005) The role of calmodulin as a signal integrator for synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 6: 267–276.
28. Merrill MA, Chen Y, Strack S, Hell JW (2005) Activity-driven postsynaptic translocation of CaMKII. *Trends Pharmacol Sci* 26: 645–653.
29. Shen K, Terul MN, Subramanian K, Meyer T (1998) CaMKIIbeta functions as an F-actin targeting module that localizes CaMKIIalpha/beta heterooligomers to dendritic spines. *Neuron* 21: 593–606.
30. Monajemi H, Fontijn RD, Pannekoek H, Horrevoets AJ (2002) The apolipoprotein L gene cluster has emerged recently in evolution and is expressed in human vascular tissue. *Genomics* 79: 539–546.
31. Pfrieger FW (2003) Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1610: 271–280.
32. Saher G, Brugger B, Lappe-Siefke C, Mobius W, Tozawa R, et al. (2005) High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat Neurosci* 8: 468–475.
33. Schlaepfer TE, Lancaster E, Heidbreder R, Strain EC, Kosel M, et al. (2005) Decreased frontal white-matter volume in chronic substance abuse. *Int J Neuropsychopharmacol* 8: 1–7.
34. Bartzokis G, Beckson M, Lu PH, Edwards N, Bridge P, et al. (2002) Brain maturation may be arrested in chronic cocaine addicts. *Biol Psychiatry* 51:605–611.
35. Mimmack ML, Ryan M, Baba H, Navarro-Ruiz J, Iritani S, et al. (2002) Gene expression analysis in schizophrenia: reproducible up-regulation of several members of the apolipoprotein L family located in a high-susceptibility locus for schizophrenia on chromosome 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 4680–4685.
36. Bahi A, Dreyer JL (2005) Cocaine-induced expression changes of axon guidance molecules in the adult rat brain. *Mol Cell Neurosci* 28:

275–291.

37. Falk J, Bechara A, Fiore R, Nawabi H, Zhou H, et al. (2005) Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure. *Neuron* 48: 63–75.
38. Polleux F, Morrow T, Ghosh A (2000) Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* 404: 567–573.
39. Morita A, Yamashita N, Sasaki Y, Uchida Y, Nakajima O, et al. (2006) Regulation of dendritic branching and spine maturation by semaphorin3A-Fyn signaling. *J Neurosci* 26: 2971–2980.
40. Sahay A, Kim CH, Sepkuty JP, Cho E, Huganir RL, et al. (2005) Secreted semaphorins modulate synaptic transmission in the adult hippocampus. *J Neurosci* 25: 3613–620.
41. Horton AC, Ehlers MD (2003) Dual modes of endoplasmic reticulum-to-Golgi transport in dendrites revealed by live-cell imaging. *J Neurosci* 23: 6188–6199.
42. Horton AC, Racz B, Monson EE, Lin AL, Weinberg RJ, et al. (2005) Polarized secretory trafficking directs cargo for asymmetric dendrite growth and morphogenesis. *Neuron* 48: 757–771.
43. Robinson TE, Gorny G, Mitton E, Kolb B (2001) Cocaine self-administration alters the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and neocortex. *Synapse* 39: 257–266.
44. Robinson TE, Gorny G, Savage VR, Kolb B (2002) Widespread but regionally specific effects of experimenter- versus self-administered morphine on dendritic spines in the nucleus accumbens, hippocampus, and neocortex of adult rats. *Synapse* 46: 271–279.
45. Crombag HS, Gorny G, Li Y, Kolb B, Robinson TE (2005) Opposite effects of amphetamine self-administration experience on dendritic spines in the medial and orbital prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 15: 341–348.
46. Kolb B, Gorny G, Li Y, Samaha AN, Robinson TE (2003) Amphetamine or cocaine limits the ability of later experience to promote structural plasticity in the neocortex and nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10523–10528.