

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Biomediche

Ciclo 29°

Settore Concorsuale di afferenza: 05/D1

Settore Scientifico disciplinare: BIO/09

TITOLO TESI

**STUDIO DEL RUOLO FUNZIONALE DEL NEUROPEPTIDE S
NEI NUCLEI DEL RAFFA DORSALE E TEGMENTALI
LATERODORSALI.**

Presentata da: Dott. Vincenzo Roncacè

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. Lucio Ildebrando Cocco

Prof. Giorgio Aicardi

Esame finale anno 2017

INTRODUZIONE

Il Neuropeptide S (NPS) è una proteina costituita da 20 amminoacidi la cui caratterizzazione funzionale è iniziata nel decennio passato, quando nel 2001 si è scoperta la sua affinità per il recettore NPSR1 (fino a quel momento considerato orfano), grazie alla tecnica dello screening molecolare su recettori cosiddetti “orfani di ligandi” (Patent: Syuji Sato, Yasushi Shintani, Nobuyuki Miyajima, 2001).

Fin dalla scoperta dell'esistenza di questa nuova proteina in grado di attivare un recettore accoppiato a proteina G (Fig. 1: A, B, C) si è cercato di individuare la sua distribuzione endogena nonché l'espressione genica del suo recettore NPSR. Inizialmente l'espressione di NPS e NPSR, che costituiscono un vero e proprio sistema peptidergico (sistema NPS/NPSR), è stata mappata nei roditori mediante studi di ibridizzazione in situ (Xu *et al*, 2004, 2007). In seguito, tale mappatura è stata estesa anche ad altre specie tra cui l'uomo, consentendo studi di tipo filogenetico che hanno rivelato che: a) entrambe queste proteine, precursori compresi, vengono espresse in tutti i vertebrati eccetto i pesci (Adori *et al*, 2015; Reinscheid, 2007); b) nonostante il NPS sia uno dei neuropeptidi meno abbondanti nel cervello, l'mRNA codificante per il suo NPSR è largamente distribuito in vari distretti cerebrali (Clark *et al*, 2011; Xu *et al*, 2004). Nonostante questa massiccia presenza di mRNA e fibre positive al NPS, i precursori del peptide NPS sono stati trovati solamente nel nucleo di Kolliker-Fuse e in un gruppo di neuroni adiacenti alle fibre noradrenergiche del Locus Coeruleus (LC) (Clark *et al*, 2011), rendendo ad oggi ancora più difficile la soluzione dell'enigma sul ruolo funzionale del sistema NPS/NPSR nel sistema nervoso centrale (SNC) (Fig. 1: D).

Il primo passo verso la caratterizzazione funzionale di questo sistema peptidergico è stato compiuto nel 2004 da Xu e dai suoi collaboratori, che hanno iniziato ad indagare gli effetti comportamentali dell'attivazione e dell'inattivazione di tale sistema nel topo e nel ratto. A questo scopo sono stati usati paradigmi per

l'indagine del comportamento come il “*test dell’open field*”, il “*test del labirinto sopraelevato*”, il “*test della preferenza per zone di luce o ombra*” e il “*test dell’interramento del marmo*”, e tutti hanno mostrato che la somministrazione centrale di NPS produce effetti ansiolitici; inoltre il “*test dell’attività locomotoria*” e il monitoraggio dell’attività corticale hanno reso possibile rilevare un incremento del tono di veglia attiva, detta “arousal”, ed una diminuzione di tutte le fasi del sonno anche a basse dosi del peptide (Xu *et al*, 2004). In seguito altri laboratori hanno raggiunto risultati simili a quelli ottenuti da Xu e colleghi, anche utilizzando altri paradigmi di indagine del comportamento, come ad esempio il “*test dei quattro piatti*” e il “*test dello stress indotto da ipotermia*”, consolidando e rinforzando i dati riguardo il profondo effetto ansiolitico svolto dal NPS a livello del SNC (Leonard *et al*, 2008; Lukas and Neumann, 2012; Pulga *et al*, 2012; Rizzi *et al*, 2008; Vitale *et al*, 2008). Anche l’attività sul ciclo sonno-veglia è stata confermata da un ulteriore studio condotto nel ratto da Kushikata e colleghi, in cui si descrivono gli effetti di una somministrazione intracerebroventricolare di NPS in concomitanza dell’anestetico ketamina, dimostrando che questo trattamento è in grado di diminuire efficacemente la durata dell’anestesia (Kushikata *et al*, 2011). Successivi studi hanno evidenziato anche altre azioni del NPS nel SNC. Nel topo, la somministrazione intra-amigdala del NPS, oltre a risultare in una riduzione generale dell’ansia acuta, provoca un’accelerazione nell’estinzione della paura condizionata, riducendo il tempo dell’immobilità nel paradigma di imprinting uditivo per il condizionamento della paura (Jüngling *et al*, 2008). Diametralmente opposti agli effetti della somministrazione del NPS sono invece gli effetti prodotti dall’inibizione del sistema NPS/NPSR mediante antagonisti selettivi del NPSR. Per esempio l’iniezione nel topo dell’antagonista non peptidergico SHA 68 è in grado di indurre un aumento del tempo di immobilità nel paradigma della paura condizionata (Jüngling *et al*, 2008), così come nel ratto la somministrazione centrale di un altro antagonista del NPSR, il [D-Cys(tBu) (5)]NPS, diminuisce lo

stato di veglia e aumenta la quantità del sonno non REM (*non-rapid eye movement*) (Oishi *et al*, 2014a).

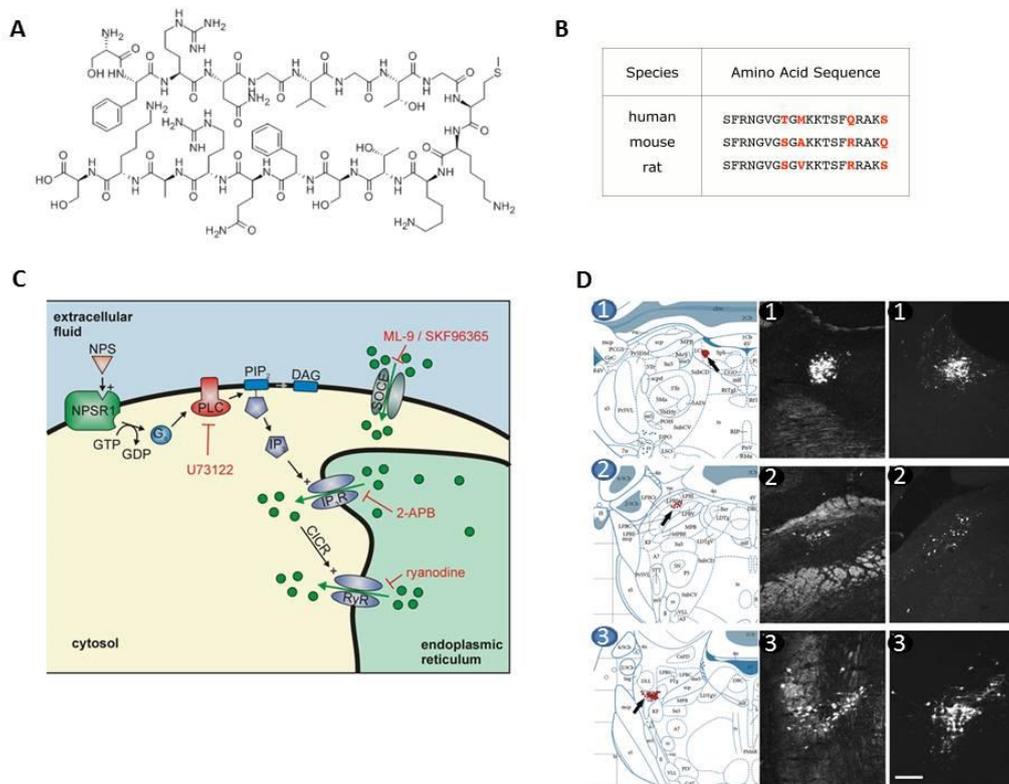
Uno studio di genomica nell'uomo ha evidenziato interessanti connessioni tra il polimorfismo di un singolo nucleotide (SNP re324981) della tripletta 107 nel gene che esprime il NPSR1 ed il condizionamento dell'attività del sistema limbico nel codificare sensazioni di paura (Dannowski *et al*, 2011). Una successiva indagine genomica nell'uomo ha rivelato che un corredo genetico omozigote per il NPSR1 e la contemporanea presenza del SNP re324981, condizione che comporta l'espressione della variante genetica di tale recettore, sono associati ad una significativa riduzione della durata del sonno e del riposo giornaliero; questo potrebbe generare lo stress e l'ansia spesso riscontrati negli individui omozigoti per la mutazione del NPSR1 (Spada *et al*, 2014).

Ad oggi, le conoscenze sul sistema NPS/NPSR si sono arricchite di nuove informazioni, che spaziano dal condizionamento all'abuso di sostanze stupefacenti (Cannella *et al*, 2016; Kallupi *et al*, 2010) all'influenza sulle risposte adattative a stress di tipo post traumatico (Jüngling *et al*, 2008), fino ad arrivare ad interessare patologie come l'asma (Acevedo *et al*, 2013; Hamsten *et al*, 2016) e disturbi nel comportamento alimentare (Beck *et al*, 2005; Smith *et al*, 2006).

Tuttavia, nonostante la relativa ricchezza di dati che riguardano gli aspetti di tipo comportamentale, le azioni cellulari mediate dal NPSR, che una volta attivato è in grado di provocare un aumento di calcio intracellulare (Fig. 1: C) tramite percorsi trasduzionali propri delle sub-unità G_q e/o G_α (Bernier *et al*, 2006; Erdmann *et al*, 2015; Gupte *et al*, 2004; Reinscheid *et al*, 2005; Tancredi *et al*, 2007; Xu *et al*, 2004), sono state studiate in poche regioni del SNC. Inoltre, questi studi pionieristici, che certamente hanno fornito una prima descrizione degli effetti cellulari del NPS, sono stati in larga parte condotti in amigdala, dove l'attivazione del sistema NPS/NPSR causa una potente modulazione della trasmissione glutammatergica, la quale, in questi circuiti neuronali, è a sua volta responsabile delle variazioni dell'attività sinaptica di tipo GABAergico (Jüngling *et al*, 2008; Meis *et al*, 2008, 2011; Zhang *et al*, 2016). Oltre all'amigdala, le azioni del NPS a

livello cerebrale sono state studiate solamente in altre due aree: ipotalamo e LC. Nei nuclei ipotalamici, il NPS si dimostra in grado di modulare la conduttanza ionica di membrana, inducendo effetti depolarizzanti o iperpolarizzanti (Yoshida *et al*, 2010). Nel LC invece è stato possibile studiare l'interazione tra fattore di rilascio della corticotropina (CRF), ormone secreto durante risposte di stress, ed il sistema NPS/NPSR in quei neuroni dov'esso è costitutivamente espresso. Qui l'applicazione locale di CRF provoca una depolarizzazione di membrana in grado di sviluppare potenziali d'azione, dimostrando che il sistema NPS/NPSR viene attivato in maniera fisiologica durante l'esperienza di eventi stressanti agendo da feedback negativo per l'adeguamento delle risposte adattative alle situazioni di stress (Jüngling *et al*, 2012). Tuttavia, al di là di questi interessanti risultati non vi sono altri studi che riguardano azioni del NPS in altri distretti del SNC, il che rende incompleto il quadro per cercare di comprendere fino in fondo la vastità degli effetti e le aree di influenza del sistema NPS/NPSR, nonché le strutture nelle quali le azioni cellulari modulate da queste proteine vengono integrate e tradotte macroscopicamente nella manifestazione dei comportamenti.

Figura 1



(A) Struttura chimica del Neuropeptide S (fonte immagine: © ChemicalBook). (B) Sequenza aminoacidica del NPS nell'uomo e nei principali roditori utilizzati in ambito di ricerca (topo e ratto), in cui è evidente l'elevata omologia molecolare e sequenziale. Da notare anche la conservazione del residuo di serina da cui il NPS prende il nome, anch'esso conservato in tutte le specie in cui questo peptide è stato fin ora rilevato (fonte immagine: Girolamo Caló, Chiara Ruzza. IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY). (C) Schema riassuntivo degli effetti dell'attivazione del NPS: a seguito di stimolazione da parte del suo agonista diretto si ha una mobilitazione del Ca^{2+} dal reticolo endoplasmatico e un flusso di Ca^{2+} extracellulare attraverso la membrana esterna (neuroni ippocampali umani coltivati in vitro; Erdmann et al, 2015). (D) mRNA codificante per il sistema NPS/NPSR presente in cellule situate tra il nucleo di Barrington e il locus coeruleus nella regione pontina del tronco cerebrale, nel locus coeruleus, nel nucleo laterale parabrachiale e nel nucleo di Kölliker-Fuse (Adori et al, 2015).

Poiché molti degli effetti comportamentali ascrivibili alla somministrazione in vivo del NPS sono in larga parte controllati non solo dall'amigdala, dal talamo o dal LC, ma anche da elementi della cosiddetta "formazione reticolare del tronco encefalico", che comprende anche la porzione dorsale del raphe magnus (DR) ed il nucleo tegmentale laterodorsale (LDT), questo studio è stato condotto in questi due nuclei per verificare se il sistema NPS/NPSR è presente ed eventualmente identificare le azioni svolte.

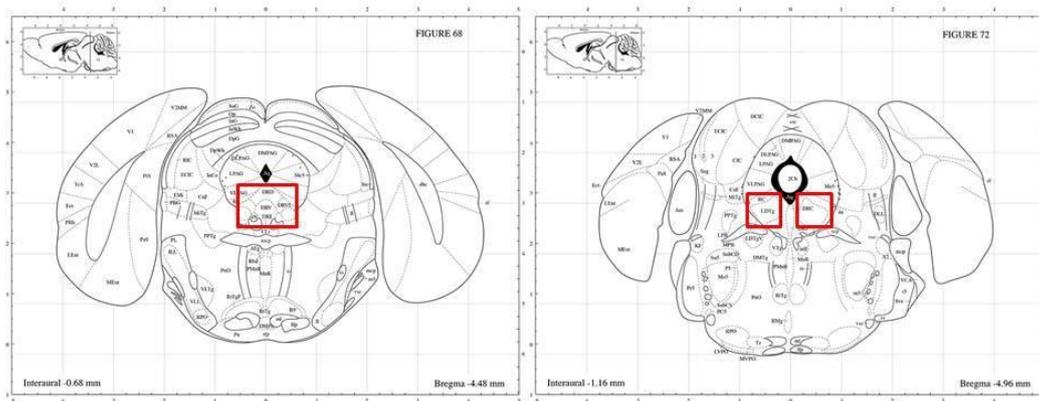
Strutturalmente, il DR (Fig. 2: pannello a sinistra, box rosso) è un nucleo serotonergico allocato tra il tegmento rostro-pontino e la zona mesencefalica caudale. Esso contiene il più ampio gruppo di cellule serotonergiche tra i nuclei del mesencefalo e il complesso del rafe pontino (Vertes and Crane, 1997). Il suo intricato sistema di fibre prende parte ad una vasta gamma di funzioni fisiologiche quali il controllo motorio (Waterhouse *et al*, 1986), l'appetito (Weitemier and Ryabinin, 2006), l'alternanza dei cicli sonno-veglia (Monti, 2010; Sakai, 2011), il controllo degli stati emotivi (Teissier *et al*, 2015), i comportamenti legati alle emozioni e quelli legati a ricompense (Li *et al*, 2016).

Il nucleo del LDT (Fig. 2: pannello di destra, box rossi) è invece un nucleo colinergico del tronco encefalico che si estende dal bordo caudale della substantia nigra pars reticulata fino alla parte laterale della materia grigia dell'area periventricolare adiacente al confine con il quarto ventricolo (Mena-Segovia, 2016). Le sue fibre colinergiche mandano proiezioni ad un vasto numero di aree cerebrali e giocano un ruolo fondamentale nel modulare svariate funzioni come il sonno REM (Van Dort *et al*, 2015; Kohlmeier and Leonard, 2006), i cicli sonno-veglia e la veglia attiva o arousal (Kohlmeier *et al*, 2013), l'apprendimento degli stimoli collegati alla ricompensa (Lodge and Grace, 2006; Xiao *et al*, 2016) e le predisposizioni a comportamenti dettati da tossicodipendenza (Christensen *et al*, 2015; Christensen and Kohlmeier, 2016; McNair and Kohlmeier, 2015a).

Partendo dal razionale fin qui esposto, è molto interessante notare che i risultati ottenuti da questo studio mostrano per la prima volta forti effetti cellulari indotti dal NPS in entrambi i nuclei DR e LDT; questi effetti risultano sensibili all'antagonista del NPSR SHA 68, suggerendo dunque un'attivazione diretta del NPSR da parte del peptide. Nello specifico, il NPS è risultato in grado di modulare l'eccitabilità cellulare in entrambi i nuclei presi in esame, tramite una combinazione di azioni su conduttanze ioniche e neurotrasmissione, che insieme sono in grado di modificare le proprietà e la frequenza di scarica dei potenziali d'azione di questi neuroni. Tale modulazione diretta dell'eccitabilità dei singoli neuroni che compongono DR ed LDT e dunque delle loro efferenze potrebbe

essere di cruciale importanza nella regolazione dell'articolato bilanciamento di tutti quei comportamenti complessi come l'umore, l'ansia, il mantenimento dei cicli sonno-veglia e l'eccitazione cerebrale di cui questi nuclei sono largamente responsabili. Considerati nel loro complesso, questi dati, uniti alle osservazioni fin qui riportate, aggiungono un nuovo ed importante tassello alla comprensione del ruolo esercitato dal sistema del NPS/NPSR nel SNC. Queste nuove informazioni potranno inoltre essere utili nell'eventuale sviluppo di nuovi agenti farmacologici mirati ad ottenere terapie sempre più mirate per la cura/controllo di tutti gli aspetti comportamentali non fisiologici in cui è coinvolto il sistema NPS/NSPR.

Figura 2



Coordinate stereotassiche delle regioni di interesse dello studio: raphe dorsale (DR), 0 mm ML; -4,45 mm AP; 2,8 mm DV (pannello di sinistra, DR evidenziato dal rettangolo rosso); nucleo tegmentale laterodorsale LDT, +/-0,5 mm ML; -4,96 mm AP; 3,25 mm DV (pannello di destra, nuclei bilaterali evidenziati dai rettangoli rossi). Fonte immagini: Paxinos, George, and Keith B.J. Franklin (The mouse brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition).

MATERIALI E METODI

Animali

Per condurre questo studio, che prevedeva di monitorare l'attività cellulare del NPS nei neuroni di DR e LDT, mediante l'uso della tecnica del patch-clamp e quella del calcium-imaging, sono stati scelti topi NMRI (HsdWin:NMRI) (Harlan Mice Laboratories, Danimarca) largamente usati in ambito di ricerche farmacologiche. Infatti i topi NMRI presentano un grado di variabilità genetica simile a quella che ci si aspetta dalla popolazione umana, in quanto originati da incroci di individui non strettamente imparentati tra loro. Una volta consegnati presso il Dipartimento di Progettazione dei farmaci e farmacologia dell'Università di Copenaghen, questi animali venivano stabulati in nidi di circa 10 unità. Le stanze di stabulazione erano mantenute ad una temperatura di 22 ± 2 °C e 50% di umidità, con un ciclo luce/buio di 12:12 ore; gli animali venivano alimentati ad libitum con mangime commerciale e acqua di rubinetto. Durante il periodo di allevamento non ricevevano alcun trattamento farmacologico. Tutti gli studi sono stati condotti in pieno rispetto delle direttive della Comunità Europea (2010/63/EU) e delle leggi danesi in merito alle regolamentazioni sulla sperimentazione animale. L'utilizzo degli animali inseriti in questo studio è stato autorizzato dalla Commissione per il benessere animale designato dal Ministro della giustizia danese.

Preparazione delle fettine contenenti DR ed LDT

Prima di essere utilizzati per il prelievo di fettine coronali di tessuto cerebrale, gli animali provenienti dalla Harlan Mice Laboratories venivano lasciati riposare almeno 24 ore per permettere di eliminare l'eventuale fattore di stress dovuto al trasporto. Gli animali, di entrambi i sessi, venivano sacrificati ad un'età compresa tra i 10 e i 25 giorni in una fascia oraria compresa tra le ore 09:00 e le 11:00. L'intervallo di età è stato selettivamente scelto per due motivi: in primo luogo per permettere una buona resa del "loading cellulare" con le molecola sonda durante

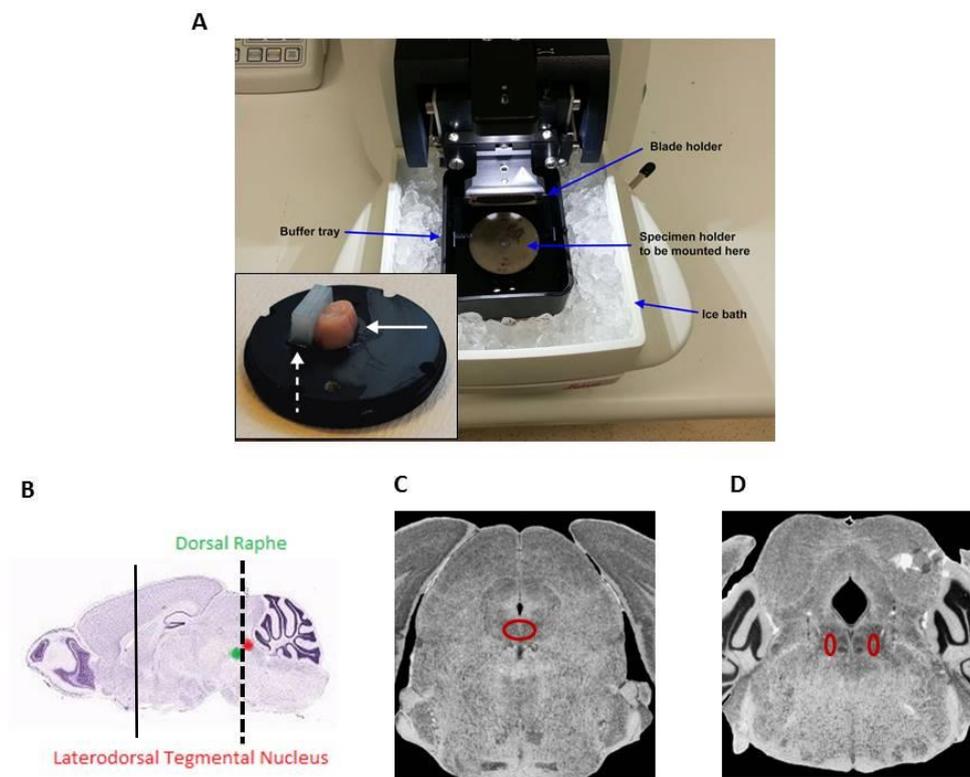
gli esperimenti di calcium-imaging, difficilmente ottenibile in animali meno giovani; in secondo luogo per assicurare una buona vitalità cellulare e favorire una migliore stabilità di registrazioni di patch-clamp prolungate nel tempo e permettere così l'applicazione di tutti i protocolli di registrazione necessari per assicurare una buona condotta degli esperimenti e una buona qualità dei dati.

Per l'induzione di anestesia, procedura condotta all'interno di una cappa a flusso laminare, veniva utilizzato isofluorano al 100% (Intervet int. ltd, Olanda). L'efficacia dell'induzione veniva testata mediante la valutazione dei riflessi non spontanei a seguito di stimoli pressori applicati alla punta della coda. Accertata la mancanza di tali riflessi, gli animali venivano decapitati con forbici chirurgiche. Il cranio veniva esposto utilizzando un bisturi e in seguito tagliato in senso rostro-caudale, sfruttando la punta di micro-forbici per facilitare la rimozione del cervello dalla scatola cranica. Una volta rimosso, il cervello veniva velocemente posto in liquido cerebrospinale artificiale (ACSF) a circa 0 °C contenente in mM: 124 NaCl; 5 KCl; 1,2 Na₂HPO₄; 2,7 CaCl₂; 1,2 MgSO₄, 10 glucosio; 2,6 NaHCO₃; saturato con 95% O₂ + 5% CO₂ e aggiustato a pH 7,4.

Una volta eseguita la procedura di rimozione cerebrale, generalmente in un tempo compreso tra 1 e 2 minuti, il cervello veniva ulteriormente processato rimuovendo la sua parte rostrale mediante un taglio coronale netto per mezzo di un bisturi. La parte caudale del cervello, contenente i nuclei del DR e dell'LDT, veniva montata su un disco, fissandolo dalla parte rostrale con una quantità minima di cianoacrilato. Un supporto di gel di Agar (2%) veniva incollato sul disco di acciaio assieme al tessuto, nelle immediate vicinanze della zona ventrale del blocco cerebrale, per facilitare le operazioni di taglio e preservare l'integrità delle fibre dei nuclei di nostro interesse. Il disco così preparato veniva poi alloggiato nella cameretta di taglio del vibratomo (Leica 2000) contenente liquido ACSF ossigenato ad una temperatura vicina allo zero, che oltre a permettere una migliore conservazione delle strutture e delle architetture cerebrali rende il cervello più solido facilitandone il taglio (Fig. 3: A).

Una volta preparato secondo questo protocollo, il cervello veniva tagliato in sezioni coronali di 250 μm e processato dalla parte caudale a quella rostrale fino ad ottenere fettine contenenti LDT e DR (Fig. 3: B, C, D). Generalmente, seguendo tale procedura era possibile ottenere da ogni animale 2 fettine di LDT e 3 fettine di DR che poi venivano lasciate riequilibrare a temperatura ambiente per circa 1 ora prima di utilizzarle per registrazioni elettrofisiologiche o per “bulk loading” di molecole fluorescenti per il calcium-imaging.

Figura 3



(A) Immagine rappresentativa del “setting-up” per la preparazione del tessuto cerebrale destinato agli esperimenti di calcium imaging o elettrofisiologia. (B) Sezione trasversale di cervello murino processata mediante la tecnica “Nissl staining” in cui sono indicate le zone di interesse per le sperimentazioni di questo studio (verde DR; rosso LDT). La linea continua indica la zona in cui veniva eseguito il taglio per la rimozione della parte frontale e conseguentemente formare il piano d'appoggio per il montaggio del blocco cerebrale sul disco di supporto per le ulteriori procedure di sezionamento condotte mediante un vibratomo. La linea tratteggiata indica l'asse seguito dalla lama per il taglio coronale delle fettine cerebrali dello spessore di 250 μm , contenenti i nuclei del DR e del LDT. Fonte immagine: ALLEN BRAIN ATLAS (copyright ©2017 Allen Institute for Brain Science). Le fettine così ottenute venivano confrontate con sezioni coronali standard di cervello di topo (ceppo C57BL/6J) usate come riferimento per l'identificazione del DR (C; Interaurale: -0,80

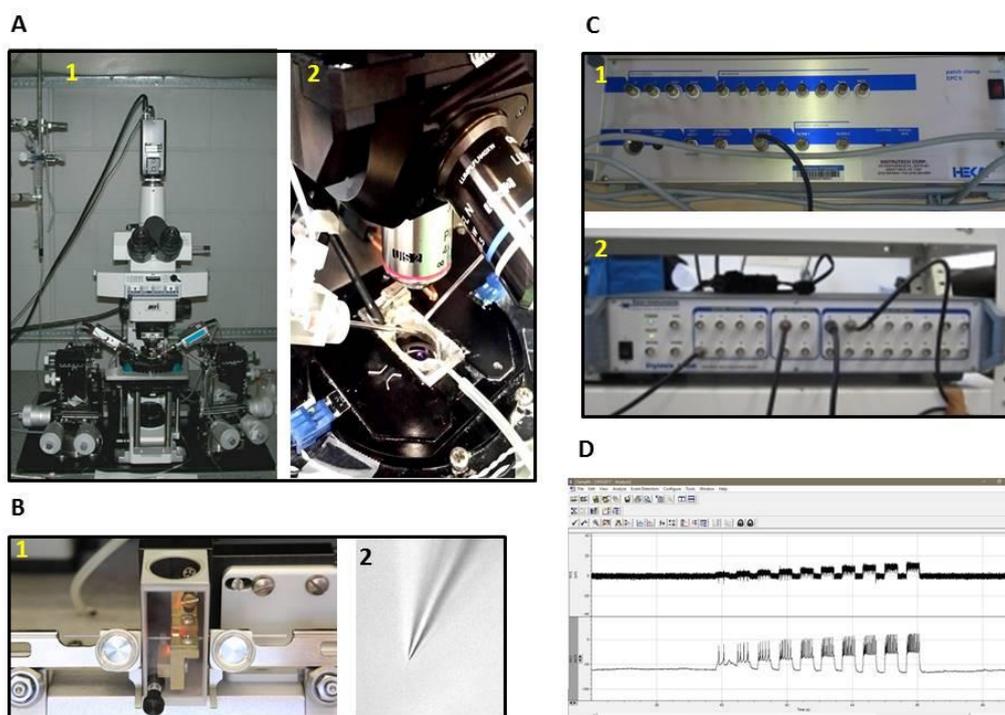
mm, Bregma: -4,60 mm) e dei nuclei del LDT (D; Interaurale: -1,31 mm, Bregma: -5,09 mm).
Fonte immagine: Neurogenetics at UT Health Science Center (©1999 RW Williams, design by AG Williams, atlas by T Capra); contenute in: "The Mouse Brain Library" (Copyright 2003 mbl.org A Human Brain Project/Neuroinformatics program funded by the National Institute of Mental Health, National Institute on Drug Abuse, and the National Science Foundation P20-MH 62009).

Patch-clamp set up

La composizione del "rig" utilizzato per l'ottenimento dei dati elettrofisiologici consta di una serie di strumentazioni posizionate all'interno di una gabbia di Farady che permette di ottenere un isolamento elettrico e magnetico durante l'utilizzo. La gabbia di Faraday infatti previene che il rumore elettrico dell'equipaggiamento strumentale di laboratorio venga rilevato dall'ultrasensibile elettrodo capillare di vetro. Inoltre, per avere un isolamento dalle vibrazioni, che potrebbero danneggiare il sigillo elettrodo-cellula, il sistema di registrazione è montato su un tavolo anti-vibrante, sempre contenuto dalla gabbia di Farady (Fig. 4: A1), che a sua volta sostiene un microscopio verticale (Olympus BX50WI, USA), una cameretta di vetro con un *pellet* cilindrico di argento (Ag/AgCl) che svolge la funzione di elettrodo di riferimento, e dei micromanipolatori a codificazione rotazionale ottico (MP-285, Sutter Instrument Co, Novato, CA, USA). Il microscopio verticale era abbinato ad un obiettivo (40X) a lunga distanza di lavoro in maniera tale da poter avere abbastanza spazio tra microscopio e condensatore, e rendere così possibile il posizionamento e il movimento degli elettrodi di vetro lungo i 3 assi X, Y e Z (Fig. 4: A2). Gli elettrodi di vetro per le registrazioni in singola cellula venivano prodotti usando un *puller orizzontale* (Sutter P-97, Sutter Instrument Co, Novato, CA, USA), in grado di tirare il vetro di borosilicato (diametro esterno 1,5 mm, World Precision Instruments, UK) fino ad ottenere una punta di diametro minore di 1 μm (Fig. 4: B1, 2). I capillari così ottenuti venivano poi riempiti con una soluzione, in maniera tale da ottenere una resistenza finale compresa tra 8 e 10 MOhm. Nelle maggior parte delle registrazioni cellulari, tale soluzione interna era composta, in mM, da: K-gluconato 144; KCl 2; HEPES 10; EGTA (Etilen-glicol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) 0,2; Mg-ATP 5 e Na-GTP 0,3. Per le

registrazioni delle correnti post sinaptiche inibitorie (IPSCs) invece, per compensare la forza elettromotrice dell'anione Cl^- , il capillare veniva riempito con una soluzione che in mM conteneva: KCl 144; EGTA 0,2; MgCl_2 3; HEPES 10; NaGTP 0,3; Na_2ATP 4. Poiché tutti i tessuti cerebrali utilizzati durante gli esperimenti elettrofisiologici sono stati successivamente processati immunohistochimicamente per determinare quale neurotrasmettitore era contenuto all'interno delle cellule registrate, in entrambe le soluzioni interne dei capillari veniva inclusa Alexa-594 (25 μM , Molecular Probes). Questa molecola diffonde in maniera passiva dai capillari all'interno del citoplasma permettendo l'identificazione post-hoc delle cellule rilevate immunohistochimicamente. Una volta riempito con 3–4 μL della soluzione desiderata, il capillare di vetro veniva posizionato sull'head stage (CV 203BU, Molecular Devices, USA; Fig. 4: A1, 2) connesso ad un amplificatore EPC9 (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht/Pfalz, Germania) a sua volta collegato ad un digitalizzatore Digi-Data 1440A (Axon Instruments, Molecular Devices, USA; Fig. 4: C1, 2); i segnali venivano campionati ad una frequenza di 20 kHz e filtrati con un filtro lower-pass da 2 kHz (Fig. 4: D).

Figura 4



(A1) Immagine rappresentativa di un rig allestito per sperimentazioni elettrofisiologiche in fettine cerebrali perfuse con ACSF. La strumentazione di supporto è collocata all'interno di una gabbia di Faraday, solidalmente ancorata ad una piattaforma, resa antivibrante da pistoni ad aria compressa che compensano con una spinta uguale e contraria ogni forza applicata al sistema. Questo assetto permette di rendere tutta la strumentazione solidale ad un unico piano ammortizzante con il vantaggio di rendere estremamente stabili i contatti cellula-elettrodo capillare (^{es} Giga sigillo), evitando il rischio separazione tra l'apparato di registrazione e la cellula target. La telecamera montata sulla testa del microscopio (Olympus BX50WI, USA) permette di osservare le cellule in "live acquisition" su uno schermo, ed evitare perturbazioni del sistema dovute all'utilizzo manuale delle lenti binoculari del microscopio stesso. (A2) Due lenti ad ingrandimenti differenti permettono un'accurata localizzazione delle zone target nel tessuto cerebrale appoggiato sul fondo (vetro pirex) di una cameretta in plexiglass, in grado di alloggiare un pellet di Ag/AgCl, che funge da elettrodo di riferimento, e un sistema di inlet-outlet collegato ad una pompa in grado di rendere possibile la perfusione delle fettine, in maniera da mantenere il tessuto vitale durante tutte le fasi sperimentali (8–11 ore). Il tessuto era stabilmente mantenuto sul fondo della cameretta mediante delle arpe di acciaio (SHD-26GH/2, Warner Instrument USA). Due colonne ai lati del microscopio, ancorate alla piastra di base, permettono di sostenere dei micromanipolatori (MP-285, Sutter Instrument Co, Novato, CA, USA) in grado di muovere in maniera ottica la testa del micro-iniettore (Picospritzer II; elettrodo capillare di sx;) e quella del preamplificatore (CV 203BU, Molecular Devices, USA; elettrodo capillare di dx), entrambi in grado di alloggiare capillari di borosilicato (diametro esterno 1,5 mm, World Precision Instruments, UK) forgiati per mezzo di un "puller orizzontale" (B1,2; Sutter P-97, Sutter Instrument Co, Novato, CA, USA). Elettrodo ed head-stage del preamplificatore a loro volta sono collegati all'amplificatore (C1; EPC9, HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht/Pfalz, Germania) connesso ad un digitalizzatore 16 bit (C2; Digi-Data 1440A; Axon Instruments, Molecular Devices, USA) in grado di digitalizzare i segnali analogici e rendere possibile la loro

campionatura mediante il programma di analisi Clampfit 10.3 (D), guidato da un PC remoto, il tutto alloggiato al di fuori della gabbia di Faraday per evitare interferenze elettromagnetiche ed immettere del rumore di fondo nel sistema schermato.

Configurazione whole-cell

Per le registrazioni elettrofisiologiche di questo studio è stata adottata la tecnica del patch-clamp in configurazione “*whole-cell*” (Fig. 5). Questa tecnica consente di creare una continuità compartimentale tra il citosol di una cellula e l’apparato di registrazione, che è in grado di rilevare variazioni ioniche e di voltaggio delle membrane cellulari. La continuità citosolica viene ottenuta mediante la creazione di un sigillo ad alta resistenza (Giga Ohm) tra la punta del microelettrodo (capillare di vetro) e la membrana della cellula da esaminare. Tale sigillo viene poi rotto mediante l’applicazione di una leggera pressione negativa che agisce producendo l’adesione della membrana cellulare alla superficie interna del capillare, permettendo di minimizzare le perdite di ioni tra interno ed esterno della membrana una volta aperta. In questa configurazione è possibile ottenere registrazioni in continuo delle correnti ioniche di membrana mantenendo fisso il voltaggio di quest’ultima o, viceversa, registrare le variazioni di potenziale iniettando una quantità di corrente costante nel tempo (Fig. 5: A).

Proceduralmente, le fettine di cervello venivano poste al centro di una cameretta, tenute aderenti al fondo mediante arpe di acciaio (SHD-26GH/2, Warner Instrument USA) e perfuse da ACSF a temperatura ambiente e continuamente ossigenato durante tutta la durata della registrazione (Fig. 4: A2). In alcuni esperimenti, volti ad esaminare il ruolo del flusso di Ca^{2+} dalle membrane cellulari, la perfusione veniva eseguita con ACSF a basso contenuto di Ca^{2+} (Low Ca^{2+} ACSF; costituita in mM da: NaCl 127; KCl 5; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,2; MgSO_4 1,2; Destrosio 10, NaHCO_3 26). In altri casi, quando era opportuno modificare il potenziale di equilibrio del potassio, nelle cellule veniva usato invece un tipo di ACSF ad alto contenuto di K^+ (costituita in mM da: NaCl 124; KCl 12,6; Na_2HPO_4 1,1; CaCl_2 2,7; MgSO_4 1,1; Destrosio 10; NaHCO_3 26). In tutti i casi, usando un micromanipolatore l’elettrodo veniva posizionato sulla superficie del cervello compensando l’offset del segnale mediante apposita

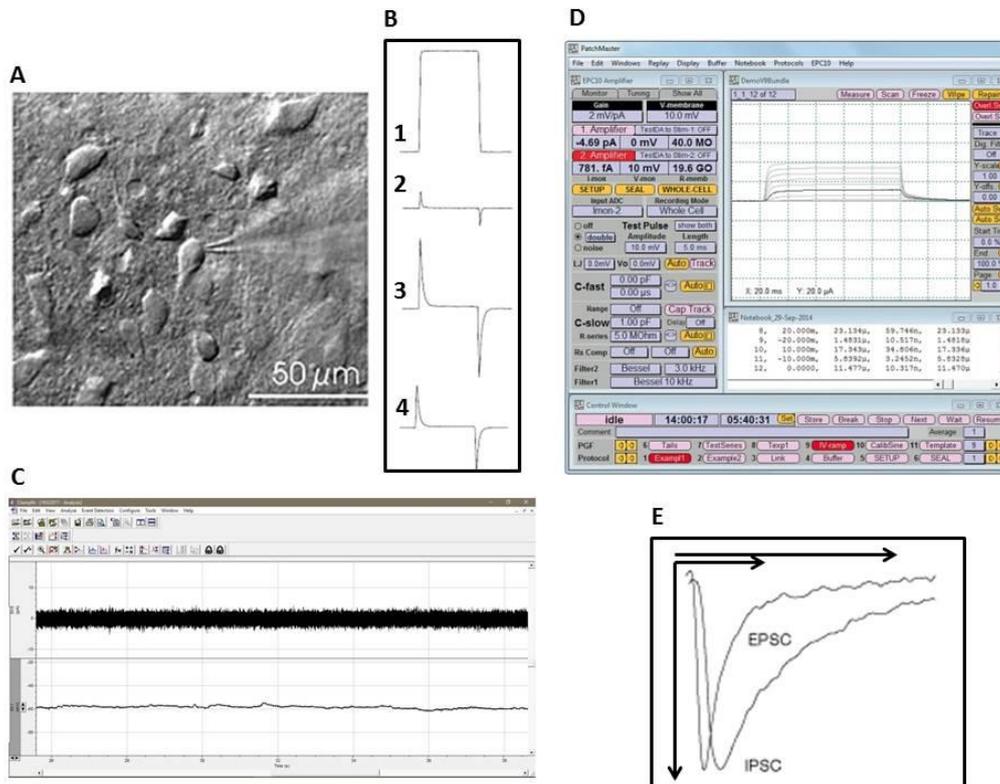
funzione dell'amplificatore (Fig. 5: B1). A questo punto l'elettrodo, attraverso il quale veniva applicata in continuo un'onda quadra a basso voltaggio (5 mV) la cui ampiezza era monitorata durante tutto il periodo di formazione del sigillo (Fig. 5: B), veniva avvicinato verso le superfici cellulari. Una volta nel tessuto cerebrale, mediante una siringa veniva applicata una piccola pressione positiva sulla superficie delle cellule per rimuovere eventuali detriti e pulire il soma del neurone prescelto. Al momento di contatto tra la punta del capillare e la cellula, la diminuzione di corrente dell'onda quadra, dovuta all'aumento della resistenza (Legge di Ohm: $I=V/R$; dove I = corrente; V = voltaggio; R = resistenza), veniva osservata mediante un oscilloscopio (Fig. 5: B2). Una volta raggiunta tale configurazione una leggera pressione negativa permetteva la formazione di un sigillo tra il vetro e la membrana cellulare e il raggiungimento di una resistenza di circa 3–4 GOhm. La formazione di un Giga sigillo è molto importante per minimizzare la corrente dovuta alla perdita ionica, permettendo registrazioni in assenza di rumore di fondo. Incrementando la pressione negativa si procede con la rottura della membrana cellulare, visibile sull'oscilloscopio come un aumento della componente capacitiva della corrente transiente del residuo dell'onda quadra (Fig. 5: B3). Una volta creata la continuità intracellulare con la soluzione del capillare di vetro e l'argento clorurato (AgCl) che permetteva il collegamento all'apparato di registrazione, il potenziale del sistema veniva compensato e aggiustato in maniera tale da ottenere un potenziale di -60 mV (Fig. 5: B4, C).

I protocolli di stimolazione eseguiti in voltage-clamp o in current-clamp venivano lanciati mediante HPC9 e registrati usando il programma di acquisizione Clampex 10.3, in grado anche di offrire gli strumenti per la successiva analisi offline delle registrazioni digitalizzate (Fig. 5: C, D). Nello specifico, in alcune registrazioni sono stati applicati protocolli per la determinazione delle relazioni corrente-voltaggio (IV) per determinare i potenziali di equilibrio delle correnti ioniche attivate dal NPS. Questi protocolli prevedevano la configurazione voltage-clamp e l'applicazione di una serie di gradini di voltaggio della durata di 400 ms ognuno, a partire da un potenziale di -100 mV fino ad arrivare ad un potenziale di -30 mV

con incrementi di 10 mV. Durante lo svolgimento di questi protocolli sperimentali, nella perfusione era presente la tetrodotossina (TTX) per bloccare l'attivazione dei potenziali d'azione (Fig. 5: D). I potenziali di equilibrio delle correnti indotte dal NPS, che è un indice delle unità ioniche che danno vita a tali correnti, sono state determinate dall'intersezione della curva IV di controllo con quella ottenuta durante l'applicazione di NPS. In altre registrazioni invece il monitoraggio dei potenziali d'azione, condotto nella modalità current-clamp (Fig. 4: D), prevedeva l'iniezione di una corrente in grado di depolarizzare i neuroni ad un potenziale di -45 mV, sufficiente ad indurre una scarica sostenuta di potenziali d'azione. Le medie degli eventi spontanei sono state poi ottenute considerando i 30 sec precedenti ed i 30 sec successivi all'applicazione del NPS.

L'analisi delle correnti spontanee eccitatorie (EPSC) o inibitorie (IPSC) è stata condotta mediante il programma Minianalysis. Le tracce registrate in voltage clamp, una volta selezionate della lunghezza desiderata, venivano caricate direttamente in Minianalysis e analizzate utilizzando i parametri di rivelazione integrati per EPSC e IPSC, basati sulle caratteristiche di cinetica intrinseche di questi eventi di membrana spontanei (Fig. 5: E). Nello specifico, le EPSC sono mediate da un aumento della conduttanza al Na^+ o al Ca^{2+} o una diminuzione della conduttanza al K^+ del neurone e aumentano la possibilità di depolarizzare la membrana fino a generare un potenziale d'azione. Le IPSC sono invece dovute all'aumento della conduttanza di Cl^- e K^+ , e per questo motivo riducono la possibilità di depolarizzare la membrana e di generare un potenziale d'azione. Le EPSC e le IPSC differiscono per la loro cinetica: le correnti mediate dai recettori del glutammato hanno una costante di tempo maggiore rispetto alle correnti mediate dai recettori GABA (Edwards *et al*, 1990; Salin and Prince, 1996).

Figura 5



(A) Immagine di tessuto cerebrale in cui si vedono cellule singole (LDT) e il capillare di registrazione, ottenuta mediante il sistema ottico formato da microscopio ad immersione (Olympus BX50WI, USA) e telecamera (Sensicam, PCO Instruments, Germany), controllata dal software ICU operato tramite TILL-VISION (Till Photonics, Germany). (B) Variazioni dell'onda quadra dovuta alla corrente iniettata nel capillare dall'amplificatore, per monitorare tutte le fasi del patch, dall'iniziale immersione del capillare nel bagno (B1) al raggiungimento del contatto con la cellula (B2) alla formazione del Giga-sigillo fino all'apertura della membrana (B3) e la successiva compensazione capacitiva (B4) del sistema capillare-cellula. (C) Configurazione current clamp e rilevamento del segnale dovuto alla corrente iniettata (C; traccia in alto) dall'amplificatore mediante EPC9 (D) per mantenere il potenziale della cellula aperta (C; traccia in basso) vicino a quello standard di riposo (-60 mV), entrambi campionati ad una frequenza di 20 kHz e filtrati con un filtro Lower-pass da 2 kHz, visualizzati e registrati mediante Clampfit 10.6. (E) Ingrandimento di due tracce ottenute in configurazione voltage clamp (segnali filtrati a Lower-pass 2KHz e "levigate" mediante la funzione "smooth x10" del software IGOR PRO) di EPSC e IPSC in cui si evidenziano le differenti cinetiche di questi eventi spontanei.

Calcium-imaging e Fura 2

In questo studio sono stati usati due protocolli sperimentali per le indagini di calcium-imaging a singolo fotone (Fig. 6: A). Entrambi si basano sul Fura 2, colorante fluorescente ideale per un tipo di microscopia raziometrica in cui è più pratico variare le lunghezze d'onda di eccitazione piuttosto che registrare le

variazioni di lunghezza d'onda di emissione. Il Fura 2 ha buon coefficiente di estinzione e di costante di rendimento e una buona fotostabilità, tutti parametri che vanno considerati in questo tipo di microscopia. Nello specifico, il Fura 2 ha un'affinità al calcio ($K_d = 140 \text{ nM}$) comparabile con i livelli di calcio intracellulare a potenziale di riposo (Grynkiewicz *et al*, 1985; Hurley *et al*, 1992; Pesco *et al*, 2001), ha un elevato intervallo di selettività, compreso tra i 100 nM e i 100 μM , e un'altrettanta elevata resistenza al "fotobleaching" (Becker and Fay, 1987) (Fig. 6: D). Meccanicisticamente, la rilevazione delle variazioni di concentrazioni di calcio intracellulare avvengono a seguito del legame tra il calcio citosolico libero e il Fura 2, legame che ne aumenta il segnale di fluorescenza, rilevato a 510 nm, quando il sistema viene stimolato a 340 nm e diminuendolo invece quando viene usata luce a 380 nm. In questa assetto, si osserva dunque un aumento del rapporto della fluorescenza in caso dell'aumento della $[\text{Ca}^{2+}]$ intracellulare e viceversa una diminuzione dei fluorescenza in caso di una diminuzione di quest'ultima (Fig. 6: B, C).

Nello screening iniziale, in cui si voleva determinare se il NPS avesse una qualche azione a livello dell'attività cellulare nei nuclei di DR e LDT, è stata utilizzata la forma del Fura 2 permeabile alle membrane, ovvero il Fura 2-acetossimetil estere (Fura 2-AM). Quando esterificato, il Fura 2 è in grado di permeare la membrana cellulare in maniera non invasiva, e nel compartimento intracellulare le esterasi citosoliche de-esterificano la molecola portando alla formazione di Fura 2 non più in grado di oltrepassare la membrana cellulare (Fig. 6: A) (Tsien, 1980). Proceduralmente, le fettine di cervello contenenti DR o LDT venivano incubate a 31 °C in Fura 2-AM (Molecular Probes, Invitrogen, Denmark) diluita a 15 μM in DMSO/ACSF, saturata con carboxigen. Il tempo di incubazione durava 10 minuti per cervelli di animali di 10 giorni di età (P 10) e veniva aumentato di 1 minuto per ogni giorno di vita in più dell'animale, in quanto tale rapporto 1:1 tra giorni in più rispetto a P10 e minuti aumenta la qualità del riempimento cellulare, che in genere si riduce al crescere dell'età dell'animale (MacLean and Yuste, 2009; McNair and Kohlmeier, 2015b). Per questa ragione gli animali utilizzati sono stati

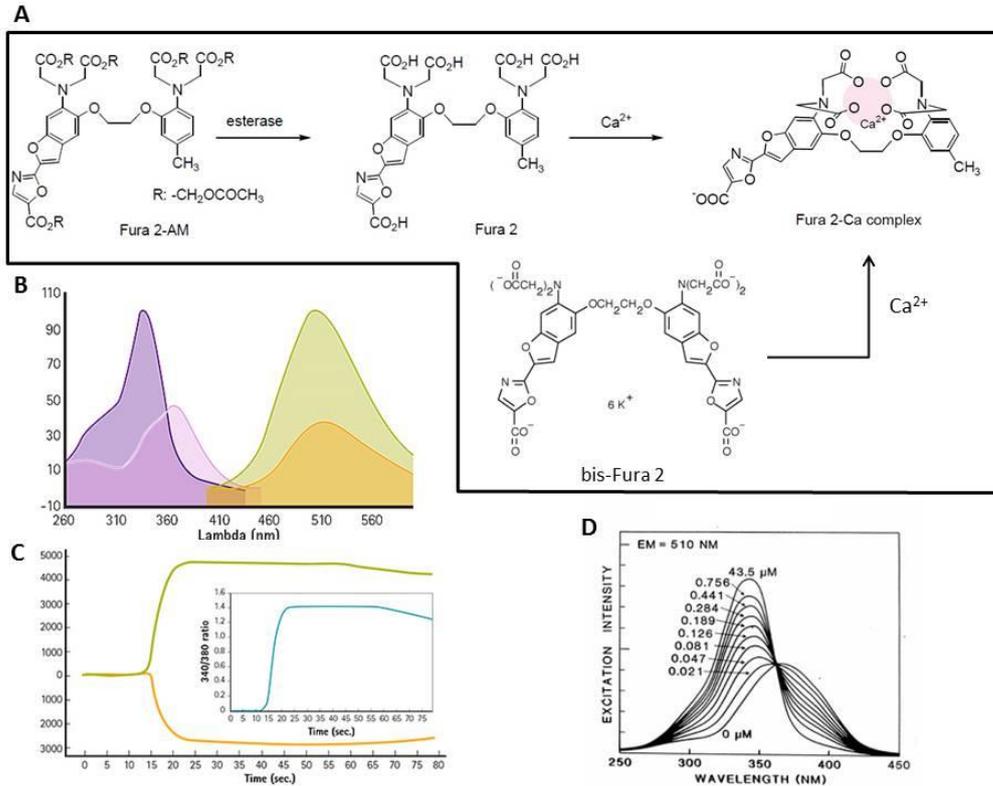
accuratamente scelti tra P10 e P21. Terminato il periodo di incubazione, le fettine venivano trasferite nella cameretta di registrazione e lasciate lavare da ACSF ossigenato per 30 minuti in maniera tale che ogni residuo di Fura 2-AM non incorporato nelle cellule potesse essere lavato via prima della raccolta dei dati.

Diversamente da quanto descritto, nelle indagini di calcium-imaging su singola cellula, in grado di rilevare dinamiche di Ca^{2+} molto più complesse rispetto alla tecnica del “bulk loading”, è stata utilizzata la molecola di bis-Fura 2 (Molecular Probes, Invitrogen, Denmark; Fig. 6: A), ovvero la forma del Fura 2 impermeabile alle membrane cellulari. Il bis-Fura 2 in questo caso veniva introdotto all'interno della cellula in esame mediante il microelettrodo (capillare di vetro) con cui viene creato il contatto con l'interno citosolico della membrana. In questo caso, nella soluzione utilizzata per riempire il capillare, l'EGTA veniva sostituito con una soluzione 25 μM di bis-Fura 2.

Entrambi i protocolli sperimentali di calcium imaging sono stati condotti nel *rig* già descritto per gli esperimenti di elettrofisiologia, sfruttando parte della strumentazione già elencata (Fig. 4). Nello specifico, le variazioni della fluorescenza del Fura 2, indicazione indiretta della variazione di Ca^{2+} intracellulare, sono state monitorate grazie ad una telecamera fluorescente 12 bit CCD con sistema di illuminazione a Xenon e sistema di raffreddamento integrato (Sensicam, PCO Instruments, Germany). Telecamera e sistema di variazione delle lunghezze d'onda (shutter), fissati alla testa del microscopio ad immersione (Fig. 4: A1), venivano controllati mediante il software ICU operato tramite TILL-VISION (Till Photonics, Germany). Le regioni del DR o del LDT venivano identificate mediante alcuni marker ben definiti all'interno della fettina (es. acquedotto per il DR o nucleo peduncolopontino per LDT), usando dapprima un ingrandimento ottico 10X (Fig. 3: C e D, ovali in rosso). Una volta individuata la zona, utilizzando un ingrandimento ottico 40X le singole cellule venivano circoscritte tracciando delle zone di interesse (ROI) grazie all'interfaccia dello stesso programma di analisi in grado di guidare la strumentazione ottica (Fig. 7 e 8: A1). Come descritto in precedenza, le variazioni della fluorescenza venivano

misurate all'interno delle ROI sfruttando l'eccitazione a due diverse lunghezze d'onda: 340 nm e 380 nm. I valori di fluorescenza ottenuti in sequenza in una stessa ROI venivano poi mediati e sottratti per il valore della fluorescenza di base, determinato misurando la fluorescenza di una porzione di tessuto priva di cellule fluorescenti, e infine rapportati ad un valore F adimensionale, frutto del rapporto $F = F_{340}/F_{380}$. Perciò le variazioni di fluorescenza sono state riportate come Delta F/F (DF/F), valore che riflette la massima variazione di fluorescenza durante il picco di attività cellulare divisa per la misura della fluorescenza di base (F), che è calcolata come la media delle fluorescenze raziometriche (340/380 nm) dei 10 frame di esposizione antecedenti all'applicazione del fenomeno perturbante di interesse, in questo caso l'applicazione del NPS. Per ognuna delle lunghezze d'onda, per ridurre i tempi di esposizione e conseguentemente limitare il cosiddetto fenomeno del bleaching del Fura 2 e nel contempo limitare i danni dovuti alla fototossicità, il tempo di esposizione era calcolato come il tempo in grado di mantenere il pixel più luminoso tra le ROI in un range compreso tra il 7 e il 10% del limite massimo dell'intervallo dinamico (4096 livelli di grigio). Soltanto le cellule che mostravano un aumento superiore al 2% della variazione di tale DF/F sono state considerate come responsive al NPS.

Figura 6



(A) La tecnica del calcium imaging prevede l'utilizzo di un colorante fluorescente per la rilevazione del Ca^{2+} intracellulare; in questo studio è stato scelto il colorante sonda Fura 2, che esiste in forma di estere (Fura 2-Am) o in forma di sale (bis-Fura 2). Una volta all'interno delle cellule, la struttura chimica del Fura 2-AM viene de-esterificata a Fura 2, mentre il sale bis-Fura 2 non va in contro a modificazione chimica. La spinta elettrostatica dovuta al legame con il Ca^{2+} citosolico libero provoca una modificazione sterico-conformazionale del Fura 2, che assorbe e riemette luce fluorescente in maniera diversa dal Fura 2 non legato (fonte immagini: © 2017 Dojindo Molecular Technologies, Inc. e © Biotium 2017). (B) Spettro di emissione del Fura-2 che riporta le intensità di eccitazione della sonda libera (massimo a 340 nm) e della sonda legata dal Ca^{2+} (massimo a 380 nm) e conseguenti intensità di emissioni (in entrambe le condizioni, legata e non legata, a 510 nm). (C) Dal momento che il complesso Fura 2- Ca^{2+} presenta un complesso di eccitazione a 340/510 nm, mentre la forma libera a 380/510 nm, in presenza di un flusso di Ca^{2+} , l'aumento di questo ione produce un proporzionale aumento della fluorescenza a 340/510 nm (C, segnale verde), mentre, al contrario, l'intensità di fluorescenza del complesso 380/510 nm (C, segnale giallo) diminuisce contemporaneamente alla diminuzione della concentrazione del Fura 2 in forma libera. La razionalizzazione delle intensità di fluorescenza, prodotta dalle eccitazioni alle due lunghezze d'onda (340/380 nm), permette di minimizzare gli artefatti associati ad una distribuzione non omogenea della sonda e ad una variazione nel numero di cellule, perché tali effetti sono entrambi misurati in misura egualitaria. (D) Tracce dell'eccitazione fluorescente di una titolazione di Fura 2 (fonte immagini: ©2017 Molecular Devices, LLC. e © 2011 by TEFLabs).

Sostanze

Il NPS (Sigma-Aldrich, Danimarca) è stato diluito in H₂O bidistillata e stoccato in aliquote a -20 °C. All'utilizzo, la soluzione stock veniva diluita in ACSF ad una concentrazione finale di 100 nM, nel caso di sperimentazione condotta mediante la tecnica del calcium-imaging a riempimento di cellule multiple. In alternativa, un'aliquota di 10 µL veniva utilizzata direttamente per applicazione pressurizzata mediante picospritzer (20 PSI, durata di applicazione di 500 ms) durante gli esperimenti di calcium-imaging su singola cellula o gli esperimenti di elettrofisiologia.

Per l'inibizione dei canali del Na⁺ voltaggio dipendenti, responsabili delle scariche di potenziali d'azione, ai liquidi di perfusione veniva aggiunta TTX (Tocris Bioscience, Bristol, U.K.) ad una concentrazione finale di 500 nM.

Per bloccare il NPSR è stato utilizzato il noto e ben validato antagonista SHA 68 (Tocris Bioscience, Bristol, U.K.), preparato come riportato da Okamura e colleghi (Okamura *et al*, 2008). Le soluzioni stock di SHA 68 sono state preparate diluendo la polvere in una soluzione 50 mM di DMSO ed etanolo (rapporto 1:1). Le soluzioni stock di SHA 68/DMSO/etanolo sono state diluite in ACSF contenente lo 0,1% di albumina bovina (BSA) per ottenere le concentrazioni finali di 10 µM (rapporto finale 1/1:10000 DMSO/etanolo:ACSF) o di 100 µM (rapporto finale 1/1:1000 DMSO/etanolo:ACSF). Il DMSO a queste concentrazioni non interferisce con la normale fisiologia dei neuroni.

Nelle registrazioni condotte per esaminare gli effetti del NPS sulle IPSC, oltre all'uso di una soluzione per registrazioni intracellulari arricchita di anioni Cl⁻, le correnti sinaptiche eccitatorie dovute all'azione del glutammato sui recettori AMPA, NMDA e Kainato sono state bloccate mediante aggiunta alle soluzioni di perfusione di DNQX (15 µM) e AP5 (50 µM), antagonisti di questi recettori glutammatergici ionotropici.

Per inibire le pompe del calcio sulla membrana del reticolo endoplasmatico, la cui attivazione dipende dall'inositolo trifosfato (IP₃), e di conseguenza ottenere un effetto di svuotamento delle riserve di calcio intracellulare, è stato utilizzato acido

ciclopiazonico (CPA) (Sigma-Aldrich, Danimarca), diluito in DMSO a concentrazioni di 10 mM e stoccato a -20 °C. Al momento di utilizzo, gli stock di CPA in DMSO sono stati diluiti in ACSF sino ad una concentrazione finale 10 μ M (rapporto finale 1:1000 DMSO/ACSF). Per ottenere una deplezione delle riserve di calcio intracellulari dipendenti della rianodina (Ry) è stata invece usata una soluzione di ACSF contenente caffeina ad una concentrazione finale di 20 mM.

Analisi dei dati

La misurazione delle attività modulatorie svolte dal NPS sulle correnti di membrana e sui potenziali d'azione sono state condotte mediante Clampfit 10.3. L'ampiezza delle correnti di membrana è stata misurata come la differenza tra la media di 1 ms di corrente registrata immediatamente prima dell'applicazione del NPS e la media di 1 ms di corrente della fase di picco indotta dall'azione del peptide. La frequenza di scarica dei potenziali d'azione è stata invece calcolata usando la funzione di calcolo della frequenza istantanea, ed è stata riportata come valore medio normalizzato rispetto al controllo. Le variazioni di DF/F delle cellule che rispondono secondo le cinetiche “*smooth-spiker*” e “*plateau*” sono state misurate come la differenza tra i valori medi di 5 coppie di frame (340/380 nm) precedenti all'applicazione del NPS e 5 coppie di frame (340/380 nm) durante l'effetto massimo del peptide. L'ampiezza delle cinetiche di tipo “*spiker*” è stata invece calcolata come la media delle ampiezza delle 3 punte maggiori delle tracce. Le comparazioni statistiche sono state svolte sfruttando il test del T di Student (appaiato o non appaiato) oppure, in caso di significatività tra le varianze delle popolazioni in esame, sfruttando il test non parametrico di Mann-Whitney (Graphpad Prism). La significatività per tutti i test è stata scelta a 0,05. Per lo svolgimento dell'analisi delle EPSC e delle IPSC, così come per le loro miniature, sono state le usate tracce in voltage clamp dei 30 secondi precedenti l'applicazione del NPS e dei successivi 30 secondi, e caricandole nel programma MiniAnalysis (Synaptosoft, USA), mediante il quale è stato possibile determinare

il numero e l'ampiezza degli eventi spontanei e l'intervallo tra tali eventi. La significatività statistica delle distribuzioni cumulative di tali parametri tra la condizione di controllo e la fase di azione del NPS è stata determinata tra le stesse cellule sfruttando la statistica non parametrica del test di Kolmogorov-Smirnov (test di K-S), con un livello di significatività settato al valore 0,05. Tutte le risposte biologiche al NPS non si sono rivelate costanti nel tempo e non si sono caratterizzate come ripetibili; pertanto in questo studio sono state considerate tutte le risposte rilevate nei 20 minuti successivi all'applicazione del peptide. I risultati di questo studio sono presentati come valori medi \pm errori standard. Le figure sono state costruite mediante i software Igor Pro e Prism Graphpad.

Immunoistochimica

Al fine di verificare se le cellule registrate durante gli esperimenti di calcium imaging fossero effettivamente localizzate all'interno dei confini del DR e del LDT, e allo stesso tempo per cercare di identificarne il fenotipo, sono stati utilizzati marcatori immunoistochimici per TpH e bNOS, i primi espressi in cellule serotoninergiche e i secondi in cellule colinergiche. Per queste finalità, al termine delle registrazioni le fettine venivano poste in una soluzione di paraformaldeide al 4% per almeno 24 ore e successivamente trasferite in una soluzione tampone di fosfato con saccarosio al 30%. In seguito le fettine di cervello così conservate sono state nuovamente sezionate mediante un criostato (Leica CM 3050S, Leica Biosystems, Germany) per ottenere sezioni di uno spessore di 40 μ m, e successivamente incubate o con anticorpi anti-triptofano idrossilasi, oppure con anticorpi anti-bNOS (TpH: policlonale di coniglio per TPH2, cat # ab111828, abcam; bNOS: policlonale di coniglio, cat # N7280, Sigma-Aldrich, Danimarca-Aldrich, Danimarca).

Dopo incubazione di 24 ore a temperatura ambiente nell'appropriato anticorpo primario e successivo accurato risciacquo delle fettine, è stato applicato un anticorpo secondario fluorescente per un periodo di 30 minuti (capra, anti-coniglio, cat # A11008, Molecular probes, Danimarca). Le cellule così marcate

sono in seguito state ricercate nelle fettine mediante tecniche ottiche ottimizzate per la rilevazione di Alexa-594 (lunghezza d'onda di 560 nm), che entra nei neuroni per diffusione passiva attraverso il microelettrodo (capillare di vetro) durante le registrazioni elettrofisiologiche e quelle di calcium imaging in singola cellula. L'identificazione delle cellule contenenti Alexa-594 è stata condotta mediante la ricerca della copresenza, o dell'assenza, dell'anticorpo secondario sfruttando il corretto assetto ottico per la rilevazione (lunghezza d'onda di 488 nm).

RISULTATI

Calcium imaging

Poiché in letteratura viene descritta in maniera piuttosto dettagliata la capacità del NPS di aumentare il Ca^{2+} citosolico in vari sistemi cellulari (Bernier *et al*, 2006; Erdmann *et al*, 2015; Gupte *et al*, 2004; Liao *et al*, 2016; Reinscheid *et al*, 2005; Tancredi *et al*, 2007; Xu *et al*, 2004) ricollegabili alla presenza del sistema NPS/NPSR nel DR o in LDT, i primi esperimenti di questo studio si sono stati condotti in questi nuclei usando la tecnica del calcium-imaging a riempimento multicellulare. Questa tecnica rende fluorescenti un gran numero di cellule, permettendo così di determinare in maniera veloce ed affidabile una eventuale variazione del Ca^{2+} libero intracellulare. Questo ha consentito di rilevare che l'applicazione del NPS (3 mL, 100 nM) fa aumentare il $[\text{Ca}^{2+}]$ intracellulare (Fig. 7 e 8: A3) in entrambi i nuclei. Inizialmente sono state testate 39 fettine cerebrali contenenti DR e 40 fettine contenenti LDT, tutte ottenute da topi di età P10-P20; non sono state evidenziate differenze tra sesso o età. Alla fine di ogni sessione di registrazione le fettine di cervello sono state processate immunostochimicamente, usando anticorpi anti-TpH per rivelare i neuroni serotoninergici del DR, e anti-bNOS per rivelare i neuroni colinergici in LDT (Fig.7 e 8: pannelli nei riquadri).

Effetti del NPS nelle cellule del DR

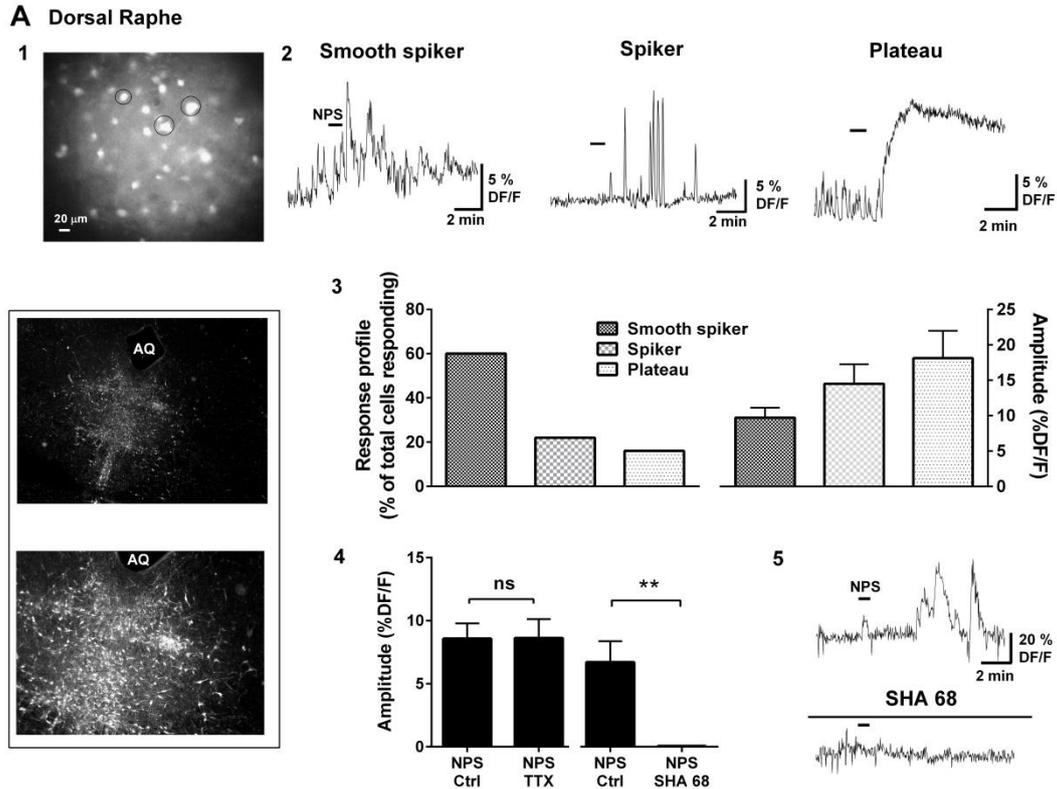
Nel DR il 36% delle cellule rese fluorescenti dal Fura 2 ($n = 104/298$) ha riportato una variazione della fluorescenza (DF/F) a seguito dell'esposizione al NPS. Come osservato in altri studi sulle variazioni di Ca^{2+} nel DR e nel LDT modulate da peptidi come oressina e grelina (Hauberg and Kohlmeier, 2015; Kohlmeier *et al*, 2004), anche gli aumenti di Ca^{2+} intracellulare indotti dal NPS mostravano delle differenze nella loro cinetica. Questa caratteristica ha permesso una suddivisione delle risposte in tre differenti gruppi: “*smooth-spiker*”, “*spiker*” e “*plateau*” (Fig. 7 e 8: A2). Seguendo questo criterio di classificazione, è stato possibile notare che le risposte più comuni sono quelle di tipo “*smooth-spiker*”, dal momento che il

60% delle cellule attivate dal NPS nel DR seguivano una cinetica di questo tipo (n = 62/104), con una variazione media in DF/F pari a $9,1 \pm 1,4\%$ (Fig. 7: A3). Le risposte di tipo “*spiker*” si sono presentate con un’incidenza del 24% (n = 25/104) e un incremento di DF/F del $14,5 \pm 2,8\%$ (Fig. 7: A3). Le cinetiche di incremento di calcio che raggiungono un “*plateau*” sono state le meno comuni: solo nel 16% delle cellule del DR attivate dal peptide (n = 16/104), seppure mostrando il maggior incremento di DF/F ($8,1 \pm 3,8\%$ (Fig. 7: A3).

Il passo successivo è stato quello di testare la ripetibilità degli effetti. Dopo un wash-out di 30 minuti, la seconda applicazione di NPS si è dimostrata ancora in grado di indurre un aumento di $[Ca^{2+}]$ in quelle stesse cellule che avevano risposto alla prima somministrazione, mostrando profili di risposta simili da un punto di vista cinetico e non statisticamente differenti in termini di ampiezza (n = 25; p = 0,3387; test disaccoppiato del T di Student). In base a questa caratteristica è stato possibile condurre uno studio sull’efficacia del NPS nell’indurre variazioni della $[Ca^{2+}]$ in presenza di TTX o SHA 68, usando la prima risposta cellulare come controllo interno. Dunque nello studio si è proceduto esaminando la persistenza della risposta a seguito del blocco dei potenziali d’azione nella fettina mediante TTX, che non è risultata in grado di ridurre gli effetti sulla $[Ca^{2+}]$ citosolico indotti dal NPS (n = 13; p = 0,95; test accoppiato del T di Student; Fig. 7: A4), suggerendo quindi che tali incrementi siano indipendenti dall’attività dei canali del Na^+ voltaggio-dipendenti.

Infine, poiché i peptidi possono agire anche su siti diversi da quelli del proprio recettore, le seconde applicazioni di NPS sono state testate in presenza di SHA 68, antagonista selettivo per il NPSR1 (Okamura et al., 2011, 2008; Patnaik et al., 2013; Ruzza et al., 2012; Thorsell et al., 2013; Trapella et al., 2011). In queste condizioni l’applicazione del NPS non si è rivelata in grado di indurre un aumento di DF/F, indicando che l’azione del NPS è mediata dal proprio recettore (n = 16; p < 0,01; test accoppiato del T di Student; Fig. 7: A4,5).

Figura 7



Il NPS induce cambiamenti nella fluorescenza (DF/F) indicativi dell'aumento di Ca^{2+} nelle cellule del DR. (A1) Immagine fluorescente (380 nm lunghezza d'onda di illuminazione) di cellule di DR contenenti la forma AM del rivelatore del Ca^{2+} , Fura 2. Le regioni di interesse (ROI, cerchi scuri) mostrano le cellule selezionate in cui è stata monitorata la variazione di DF/F (ingrandimento 40×, scala 20 μ m). (A2) Monitoraggio dell'aumento della $[Ca^{2+}]$ nelle ROI a seguito dell'applicazione di NPS mediante perfusione (3 mL, 100 nM, rettangolo nero). Le variazioni di DF/F mostrano tre differenti cinetiche definite come: "smooth-spiker", "spiker", "plateau" (A3, istogrammi). Di queste, la cinetica maggiormente presente è la variazione DF/F smooth-spiker, come mostrato dagli istogrammi delle distribuzioni di risposta (che mostrano anche le ampiezze associate ai tre diversi tipi di variazioni di fluorescenza della popolazione cellulare presa in esame). (A4) Le variazioni di DF/F indotte dal NPS risultano indipendenti dalla generazione dei potenziali d'azione nella fettina, come mostrato da questi istogrammi che comparano le ampiezze delle risposte tra le popolazioni cellulari esaminate in condizioni di controllo (Ctrl) ed in presenza di TTX. (A5) La presenza di SHA 68, antagonista del NPSR, previene la risposta del NPS come mostrato in questa traccia ottenuta da una singola cellula prima e dopo l'applicazione dell'antagonista, o (A4) dagli istogrammi anch'essi ottenuti da 2 applicazioni consecutive nella popolazione cellulare osservata. Il processamento post-hoc delle fettine utilizzate durante gli esperimenti di calcium imaging rivela che questi sono stati condotti nei nuclei appropriati. (immagini nel riquadro a sinistra) Fettina rappresentativa in cui il DR viene identificato da

raggruppamenti neuronali serotoninergici positivi al TpH, principale fenotipo cellulare di questo nucleo (in alto ingrandimento 5×; in basso ingrandimento 10×; lunghezza d'onda di illuminazione di 480 nm). In questa e nelle successive figure, AQ indica l'acquedotto, * denota un valore di $p < 0,05$, ** denotano un valore di $p < 0,01$, *** denotano un valore di $p < 0,001$ e **** denotano un valore di $p < 0,0001$.

Effetti del NPS nelle cellule del LDT

Nei neuroni del LDT l'applicazione di NPS induce effetti sulle dinamiche del Ca^{2+} simili a quelli ottenuti nel DR; è stata ottenuta una risposta nel 45% delle cellule caricate con Fura 2-AM ($n = 134/299$). Comparando le percentuali di attivazione cellulare tra i due nuclei si nota che nel LDT i neuroni coinvolti in un aumento di $[Ca^{2+}]$ sono un numero significativamente maggiore rispetto a quelli che rispondono nel DR ($p < 0,05$; test esatto di Fisher). Anche in questo nucleo è comunque possibile raggruppare gli incrementi di $[Ca^{2+}]$ in tre categorie, seguendo le cinetiche delle variazioni di DF/F (Fig. 1: B2). Nello specifico, il 65% dei neuroni risponde seguendo una cinetica di variazione di fluorescenza che si può definire “*smooth-spiker*” con un aumento di DF/F pari a $7,9 \pm 0,9\%$ (Fig. 8: A3). La seconda cinetica di risposta più abbondante è nuovamente quella definita risposta “*spiker*”, che si presenta con una frequenza del 24% e un aumento di DF/F di $19 \pm 2,2\%$ (Fig. 8: A3). Come accade anche per il DR, le risposte che seguono una risposta di tipo “*plateau*” sono le meno abbondanti e si registrano nel 10% dei neuroni attivati presentando un aumento di DF/F pari a $12,8 \pm 3,7\%$ (Fig. 8: A3). Secondo queste proporzioni, anche se il numero totale di neuroni che risponde nel LDT è maggiore rispetto ai neuroni attivati nel DR, la distribuzione delle cinetiche di risposta e le relative ampiezze non sono significativamente differenti tra i due nuclei (risposte della popolazione: “*Smooth-spikers*” $p = 0,24$; “*Spikers*” $p = 0,10$; “*Plateau*” $p = 0,48$; test esatto di Fisher; Ampiezza: “*Smooth-spikers*” $p = 0,5$; “*Spikers*”: $p = 0,2$; “*Plateau*”: $p = 0,33$; test disaccoppiato del T di Student).

Come osservato nel DR, una seconda applicazione di NPS dopo 30 minuti (e wash-out) dalla prima, è in grado di promuovere una seconda risposta anche nei

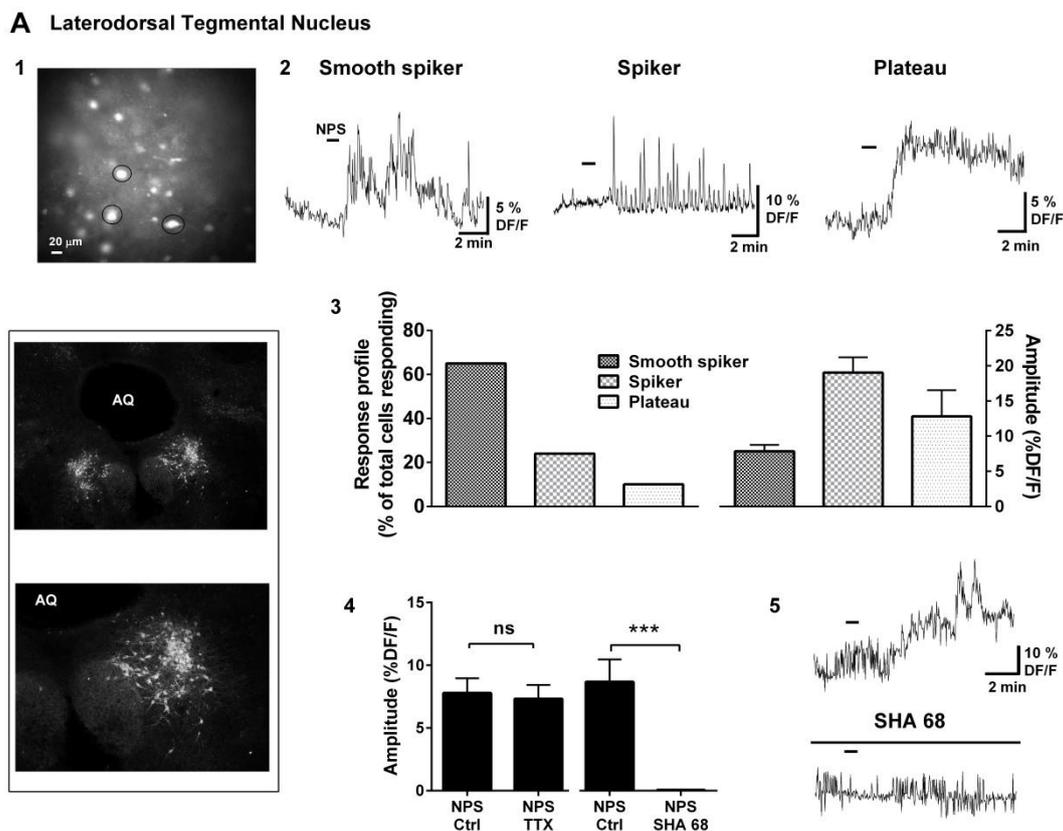
neuroni del LDT, con una variazione di DF/F non diversa dalla prima applicazione (31 neuroni; $p = 0,53$; test accoppiato del T di Student).

Stabilita la ripetibilità dell'azione del NPS anche nei neuroni del LDT, si è di nuovo potuto osservare che l'applicazione del peptide in presenza di TTX non altera né l'aumento né la cinetica di DF/F delle seconde applicazioni rispetto alle prime ($n = 16$; $p = 0,5$; test accoppiato del T di Student; Fig. 8: A4).

Infine, esaminando le seconde applicazioni del NPS in presenza di SHA 68, si osserva che l'aumento del Ca^{2+} intracellulare è completamente prevenuto in tutti i neuroni che avevano evidenziato una robusta variazione di DF/F dopo NPS ($n = 14$; $p < 0,001$; test accoppiato del T di Student; Fig. 8: A4, 5).

Considerando queste evidenze sperimentali, si può concludere che il NPS svolge un'azione di attivazione cellulare che coinvolge un aumento del Ca^{2+} citosolico sia nei neuroni del DR sia in quelli del LDT. Tali effetti sono ripetibili, non vengono prevenuti dall'eliminazione dei potenziali d'azione mediante TTX e dipendono da una interazione diretta del NPS con il proprio recettore, come evidenziato dalla scomparsa di risposta in presenza di SHA 68, antagonista selettivo del NPSR.

Figura 8



Il NPS induce cambiamenti nella fluorescenza (DF/F) indicativi dell'aumento di Ca^{2+} nelle cellule del LDT. (A1) Immagine fluorescente (380 nm lunghezza d'onda di illuminazione, ingrandimento 40 \times , scala 20 μ m) di cellule del LDT contenenti Fura 2-AM per la rilevazione dei movimenti del Ca^{2+} citosolico, in cui il monitoraggio delle ROI (cerchi scuri) circoscritte sulle cellule selezionate (A2) mostra anche in questo nucleo le cinetiche "smooth-spiker", "spiker", "plateau" con cui avvengono le variazioni di DF/F a seguito dell'applicazione di NPS mediante perfusione (3 mL, 100 nM, rettangolo nero). (A3) Anche in LDT la cinetica maggiormente presente è la variazione DF/F smooth-spiker, come mostrano gli istogrammi (associati alle ampiezze di DF/F della popolazione osservata). (A4) Comparando le ampiezze di DF/F ottenute in un campione di cellule in ACSF e in TTX si deduce che i potenziali d'azione non risultano fondamentali per la generazione delle risposte al NPS. Gli istogrammi comparano anche la duplice applicazione di NPS su un campione di cellule prima in ACSF e poi in ACSF+SHA 68, mostrando che la presenza dell'antagonista previene le variazioni di DF/F dopo perfusione con NPS (A5, tracce rappresentative delle due condizioni di applicazione del NPS). (Immagini nel riquadro a sinistra) Fettina rappresentativa del processamento immunostochimico che rivela il nucleo di cellule colinergiche bNOS⁺ proprie del LDT e indica l'esattezza della zona in cui sono state condotte le rilevazioni sperimentali (in alto ingrandimento 5 \times ; in basso ingrandimento 10 \times ; lunghezza d'onda di illuminazione di 480 nm).

Elettrofisiologia

Il NPS induce correnti di membrana nelle cellule del DR e del LDT

Dopo aver utilizzato la tecnica del calcium-imaging a caricamento di massa che permette di ottenere informazioni preliminari rapide e affidabili, per meglio determinare le azioni del NPS sulle cellule del DR e del LDT sono state usate tecniche elettrofisiologiche in grado di indagare più nel dettaglio le azioni cellulari di questo peptide. A tale scopo sono stati condotti esperimenti di registrazione patch-clamp in singole cellule, per cercare di individuare eventuali azioni pre/post sinaptiche del NPS in neuroni del DR e del LDT. I dati raccolti in questa seconda parte dello studio indicano che il NPS è in grado di indurre correnti ioniche di membrana sia nei neuroni del DR che in quelli del LDT.

Effetti del NPS in neuroni serotoninergici e non-serotoninergici del DR

Nel nucleo del DR, l'applicazione locale del NPS (10 μ M), mediante una pipetta di vetro posta nelle immediate vicinanze della cellula in registrazione, è in grado di indurre un'alterazione della "corrente di holding" nel 70% dei neuroni testati (n = 32/46). Nello specifico, nel 71,9% (n = 23/32 su un totale di 46 neuroni; Fig. 9: A1, B) delle cellule il NPS è in grado di evocare una corrente ionica diretta verso l'interno della cellula (corrente inward) di ampiezza media pari a $-14,9 \pm 2,8$ pA (Fig. 9: B). Nel rimanente 30% dei neuroni l'applicazione locale di NPS induce la comparsa di una corrente ionica diretta verso l'esterno delle cellule (corrente outward) di circa $5,4 \pm 1$ pA di ampiezza (n = 9/32 su un totale di 46 neuroni; Fig. 9: A2, B).

Una serie di esperimenti elettrofisiologici preliminari ha dimostrato che questi effetti sono ripetibili a seguito di una seconda applicazione di NPS solo nel 45% dei casi, indipendentemente dal fatto che le prime risposte si presentassero con delle cinetiche di correnti inward o outward (% di risposta rispetto al controllo: $54,9 \pm 5,4\%$; n = 4; p < 0,01; test accoppiato del T di Student). Questo effetto, se comparato con la ripetibilità ottenuta negli esperimenti di calcium-imaging a

riempimento di massa, può essere spiegato dal possibile effetto “dializzante” del microelettrodo di registrazione, che può alterare la funzionalità di messaggeri intracellulari coinvolti negli effetti del NPS. Tuttavia non è possibile escludere che questa differenza nella ripetibilità dell’effetto dipenda da differenze nel metodo di applicazione, che possono influenzare la concentrazione effettiva del peptide nei neuroni in esame. Al di là dell’interpretazione più stringente per questo fenomeno, i test che prevedevano l’uso di bloccanti, antagonista e soluzioni diverse da ACSF sono stati condotti tra popolazioni cellulari separate.

Per valutare se le correnti ioniche di membrana indotte dal NPS sono dipendenti dalla generazione dei potenziali d’azione nella fettina, l’applicazione del peptide è stata testata in presenza del bloccante dei canali del Na⁺, TTX (500 nM). Anche in questo caso il NPS si è rivelato in grado di attivare il 70% dei neuroni testati (n = 21/30). Di queste cellule, l’81% ha risposto con una corrente inward di ampiezza media pari a $-13,1 \pm 2,8$ pA (n = 17/21 su un totale di 30 neuroni; Fig. 9: A3,B), mentre il restante 19% ha risposto con una corrente outward di $4,1 \pm 1,6$ pA (n = 4/21 su un totale di 30 neuroni; Fig. 9: A4, B). Dunque in presenza di TTX le risposte che il NPS è in grado di generare a livello delle membrane cellulari non sono statisticamente differenti da quelle evocate in condizioni di controllo (correnti inward: ACSF vs TTX, p = 0,65; correnti outward: ACSF vs TTX, p = 0,51; test disaccoppiato del T di Student; Fig. 9: B). Inoltre non sono state evidenziate differenze significative neppure per quanto concerne le proporzioni delle cellule attivate dal NPS in quanto non vi sono differenze nella distribuzione delle polarità delle correnti di membrana evocate nelle due condizioni. (Totale delle cellule attivate: ACSF vs TTX, p = 0,5; cellule che rispondono con correnti inward: ACSF vs TTX, p = 0,41; cellule che rispondono con correnti outward: ACSF vs TTX, p = 0,41; test esatto di Fisher).

Poiché la TTX non è in grado di alterare né l’ampiezza né la distribuzione delle polarità delle correnti, è possibile ipotizzare che l’effetto del NPS sulle correnti di membrana sia dovuto ad una interazione diretta con la cellula in esame o con degli effettori presenti sul terminale assonico. Per questo motivo, per meglio

caratterizzare la localizzazione degli effettori del NPS si è proceduto applicando il NPS in LowCa²⁺ ACSF. La quasi assenza di Ca²⁺ dal medium extracellulare è in grado di ridurre il flusso di Ca²⁺ attraverso le membrane, limitandone la trasmissione sinaptica. Anche in questa condizione gli effetti di membrana evocati dal NPS si sono dimostrati persistenti: la maggior parte delle cellule ha risposto al peptide con correnti ioniche di membrana (68,8% dei neuroni testati, n = 11/16), le cui ampiezze non differiscono da quelle evocate in condizioni fisiologiche di Ca²⁺ (correnti inward: $-13,5 \pm 2,9$ pA; n = 8/11 su un totale di 16 neuroni; correnti outward: $5,9 \pm 1,9$ pA; n = 3/11 su un totale di 16 neuroni; correnti inward: ACSF vs TTX vs LowCa²⁺, p = 0,88; correnti outward: ACSF vs TTX vs LowCa²⁺, p = 0,73; One way ANOVA; Fig. 9: A5, 6; B). Anche il numero di cellule attivate dal NPS non è statisticamente differente tra le due condizioni di Ca²⁺ (totale di cellule attivate: ACSF vs TTX vs LowCa²⁺, p = 0,99; cellule che rispondono con correnti inward: ACSF vs TTX vs LowCa²⁺, p = 0,74; cellule che rispondono con correnti outward: ACSF vs TTX vs LowCa²⁺, p = 0,74; test esatto di Fisher).

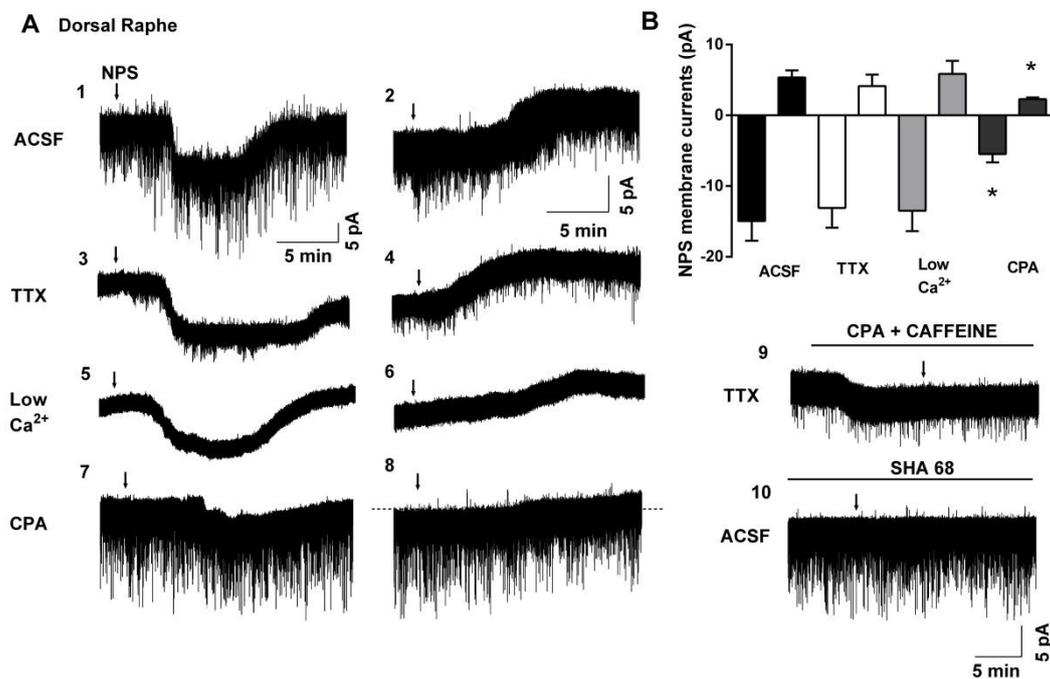
Poiché nel DR le risposte al NPS persistono anche durante il blocco sinaptico e non sembrano essere influenzate dal flusso di Ca²⁺ tra le membrane, si è proceduto a verificare se le riserve di Ca²⁺ intracellulare potessero avere un ruolo nelle risposte di membrana, considerando la nota capacità del NPS di promuovere il rilascio di Ca²⁺ da questi depositi (Erdmann *et al*, 2015). Per verificare se le riserve di Ca²⁺ dipendenti dalle pompe SERCA sono necessarie per sviluppare le azioni sulle membrane da parte del NPS si è esaminato l'effetto della sua applicazione dopo deplezione del Ca²⁺ dai siti intracellulari sensibili all'IP₃, ottenuta mediante CPA. I risultati indicano che in presenza di CPA (10 μM) il NPS è ancora in grado di indurre correnti di membrana nella maggior parte delle cellule del DR (70,6%; n = 12/17). Il 66,7% delle cellule attivate risponde con una corrente inward ($-5,5 \pm 1,2$ pA; n = 8/12; su un totale di 17 neuroni; Fig. 9: A7, B), mentre nel rimanente 33,3% delle cellule il NPS induce delle correnti outward ($-2,3 \pm 0,3$ pA; n = 4/12; su un totale di 17 neuroni; Fig. 9: A8, B). Anche le proporzioni delle cellule che rispondono al peptide non risultano essere differenti

in presenza e in assenza di CPA (totale delle cellule attivate: ACSF vs CPA, $p = 0,53$; cellule che rispondono con correnti inward: ACSF vs CPA, $p = 0,44$; cellule che rispondono con correnti outward: ACSF vs CPA, $p = 0,44$; test esatto di Fisher). Mentre il numero di cellule attivate non è sensibile alla presenza del CPA, l'ampiezza di entrambi i tipi di correnti ioniche di membrana risultano essere significativamente diversi rispetto alle correnti ottenute in condizioni di controllo (ampiezza: ACSF vs CPA, $p < 0,05$; test di Mann-Whitney).

Come si nota, l'ampiezza delle correnti risulta diminuita quando le riserve di Ca^{2+} intracellulari dipendenti dalla pompa SERCA vengono svuotate, ma non eliminate. Per cui, dal momento che il Ca^{2+} può originare anche da altre fonti intracellulari, si è esaminata l'eventuale capacità del NPS di indurre effetti di membrana quando applicato contemporaneamente alla deplezione delle riserve di Ca^{2+} sensibili all' IP_3 e a quelle sensibili alla Ry. I risultati ottenuti indicano che in presenza di TTX (500 nM), CPA (10 μM) e caffeina (20 mM) il NPS non è più in grado di attivare correnti ioniche di membrana nei neuroni del DR. Infatti in questo mezzo le correnti evocate dall'applicazione del NPS risultano formalmente abolite in tutte le cellule testate nel DR ($n = 5$ su un totale di 5 neuroni; $p < 0,01$; test esatto di Fisher; Fig 9: A9). Questi dati suggeriscono che l'effetto del NPS sulle correnti di membrana sia mediato a livello post-sinaptico e dipenda dal Ca^{2+} intracellulare di entrambi i depositi intracellulari: quelli sensibili all' IP_3 e quelli sensibili alla Ry.

Infine, per esaminare la specificità del NPS, si sono testati gli effetti in presenza di SHA 68, antagonista competitivo per il suo recettore. Come previsto, quando applicato in presenza di SHA 68 il NPS non è in grado di indurre alcun effetto sulle membrane cellulari ($n = 3/3$; $p < 0,05$; test esatto di Fisher; Fig. 9: A10), il che suggerisce che l'induzione delle correnti dipenda da un'azione specifica del NPS sul proprio recettore.

Figura 9



Il NPS produce un effetto sulle correnti di membrana nella maggioranza delle cellule del DR. (A) Registrazioni rappresentative di singole cellule condotte in configurazione "whole-cell" che mostrano l'induzione di correnti inward (A1) e correnti outward (A2) entrambe mediate dal NPS in condizioni di controllo. Le correnti inward (A3) e outward (A4) indotte dal NPS non sono alterate dalla presenza di TTX o dalla soluzione esterna con bassa [Ca²⁺] (A5, A6), ma vengono significativamente ridotte da CPA, che elimina il Ca²⁺ dalle riserve dipendenti da IP₃, suggerendo un ruolo di questo Ca²⁺ nelle azioni di membrana svolte dal NPS. (A9) Eliminazione delle correnti mediante CPA e caffeina che indica anche una partecipazione del Ca²⁺ proveniente dalle riserve intracellulari influenzate da Ry per l'evoluzione degli effetti del NPS sulle membrane cellulari. Notabili sono le correnti inward indotte dal mix di CPA e caffeina sulle membrane cellulari del DR. (A10) L'eliminazione degli effetti di membrana in presenza di SHA 68 dimostra che il NPS attiva specificamente il suo recettore NPSR. (B) Gli istogrammi mostrano l'ampiezza media delle correnti inward (pA, barre dirette verso il basso) o outward (pA, barre dirette verso l'alto) indotte dal NPS sulle popolazioni cellulari del DR in differenti condizioni sperimentali.

Il passo successivo del nostro studio ha riguardato l'identificazione dei canali e degli ioni coinvolti nella variazione del potenziale di membrana e l'approfondimento dello studio delle variazioni di conduttività delle membrane durante le fasi attive delle risposte cellulari. Per questo motivo, durante le fasi di picco delle risposte al NPS, è stata applicata una serie di voltaggi per costruire una curva corrente-voltaggio (IV). Questo tipo di protocollo è stato applicato in

presenza di TTX per evitare la generazione di potenziali d'azione che sarebbero potuti scaturire durante l'applicazione dei voltaggi più positivi.

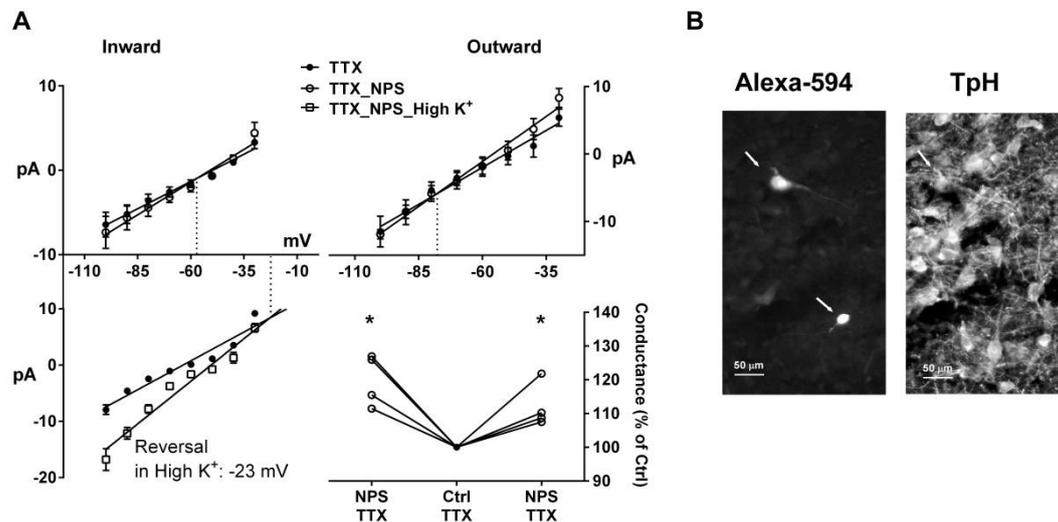
Un primo esame sui rapporti delle resistenze di membrana prima e dopo l'applicazione di NPS ha evidenziato che entrambe le correnti sono associate ad una variazione della conduttività delle membrane cellulari. Precisamente, l'aumento della conducibilità risulta di circa il 20% durante lo sviluppo di correnti inward, e di circa il 12% durante le fasi di picco delle correnti outward, indicando un coinvolgimento dei canali ionici di membrana durante le risposte al peptide (valori normalizzati di conducibilità dopo l'applicazione di NPS; correnti inward: $119,9 \pm 3,8\%$; $n = 4/4$; $p < 0,05$; outward: $112,1 \pm 3,3\%$; $n = 4/4$; $p < 0,05$; test accoppiato del T di Student; Fig. 10: A).

L'ulteriore valutazione delle relazioni IV rivelano che nei neuroni del DR in cui il NPS genera correnti inward, il potenziale ad esse associato è di circa -58 mV ($-57,7 \pm 5,8$ mV; Fig. 10: A). Tale potenziale di equilibrio è compatibile con una conduttanza ionica mista tra correnti positive direzionate in maniera opposta. Dal momento che, tra le cariche positive responsabili di questo fenomeno, si può ipotizzare anche il coinvolgimento dello ione K^+ , le relazioni IV sono state costruite in presenza di trietil ammonio (TEA), in grado di bloccare alcuni dei principali canali di membrana del K^+ . Il TEA (10 mM) non si è però rivelato efficace nell'alterare il potenziale di equilibrio associato alle correnti inward generate dal NPS. Per questo motivo è stata applicata una soluzione di ACSF arricchita di K^+ che durante l'attivazione delle correnti inward ha rivelato un potenziale di equilibrio medio di circa -23 mV ($-23,1 \pm 4,5$ mV; $n = 3$; Fig. 10: A), compatibile con la possibilità di attivazione di una corrente cationica non specifica (NSCC). Dall'altro lato, l'esame delle curve IV associate alle correnti outward generate dal NPS ha rivelato un potenziale di equilibrio di circa -79 mV ($-78,4 \pm 0,8$ mV; $n = 3$; Fig. 10: A), del tutto compatibile con una conduttanza del K^+ . Questi dati dunque supportano l'ipotesi di una possibile apertura dei canali del K^+ a seguito dell'interazione del NPS con i propri effettori, generando una corrente outward, mentre la concomitante apertura di NSCC e di canali del K^+ dà

origine a correnti di tipo inward. In entrambi i casi le correnti ioniche sembrano essere dipendenti dal Ca^{2+} intracellulare per la loro attivazione.

L'immunoistochimica condotta sulle fettine contenenti le cellule esaminate ha rivelato che gli effetti mediati dal NPS interessano neuroni sia positivi che negativi allo staining per TpH (Fig. 10: B). Complessivamente in questo studio è stato possibile processare immunoistochimicamente e recuperare 26 cellule contenenti Alexa-594, delle quali il 46% è risultato positivo per la presenza di TpH ($n = 7/15$). Tra le cellule responsive al NPS positive per TpH, questo neuropeptide è risultato in grado di indurre correnti inward nel 71% dei neuroni di questa popolazione ($n = 5/7$), mentre nel restante 29% l'NPS ha indotto correnti outward ($n = 2/7$). Considerati nel loro insieme, questi dati indicano che in questo nucleo rispondono al NPS sia neuroni serotoninergici che non serotoninergici, e che l'induzione di correnti inward è l'effetto prevalente per quanto riguarda le risposte di membrana al NPS.

Figura 10



Il NPS produce un'apertura dei canali ionici di membrana nella maggioranza delle cellule del DR. (A) Curve IV (media di 3 cellule) durante le correnti inward rivelano un potenziale di -57 mV (in alto a sx) che scende a -24 mV ($n = 3$) a seguito di un incremento di K^+ nella soluzione esterna, rivelando la presenza di una conduttanza al K^+ in questo effetto di membrana svolto dal NPS (in basso a dx). Curve IV (media di 3 cellule) durante correnti outward che rivelano un potenziale di equilibrio di -79 mV, suggeriscono il ruolo chiave di una conduttanza al K^+ in queste azioni (in alto a dx). Le risposte normalizzate ottenute dall'applicazione di voltaggi con un $\Delta = -20$

mV (da -60 mV a -80 mV) in presenza di TTX mostrano che nel DR le cellule aumentano la conduttanza ionica durante le correnti inward (in basso a dx, colonna di sx; n = 4) o outward (colonna di dx; n = 4). (B) L'immunoistochimica per TpH rivela che le azioni di membrana del NPS avvengono in cellule serotoninergiche e non-serotoninergiche. Come mostrato in questa immagine rappresentativa di una fettina cerebrale contenente il DR, delle due cellule registrate elettrofisiologicamente (positive ad Alexa-594, pannello di sx) che hanno risposto al NPS, solo una risulta positiva per TpH (cellula in alto).

Effetti del NPS sui neuroni colinergici e non colinergici del LDT

Poiché i risultati del calcium-imaging indicano che il NPS agisce anche sulle cellule del LDT, anche in questo nucleo sono stati condotti studi elettrofisiologici per determinare le caratteristiche cellulari di tale attivazione. I risultati indicano che il NPS è in grado di indurre correnti di membrana anche nella maggior parte dei neuroni del LDT (74%; n = 37/50). All'interno di questa popolazione neuronale attivata dal peptide, le correnti inward sono state indotte nel 73% dei casi, mentre il restante 27% delle correnti era di tipo outward (ampiezza media delle correnti inward: $-22,1 \pm 4,5$ pA; n = 27/37; Fig. 11: A1, B; ampiezza media delle correnti outward: $6,9 \pm 1,2$ pA; n = 10/37; Fig. 11: A2, B).

Inoltre, analogamente a quanto osservato nel DR, gli effetti di membrana indotti dal NPS sono risultano ripetibili, sia che essi fossero associati a correnti negative, che a correnti positive (% delle risposte rispetto al controllo: $52,2 \pm 3,2\%$; n = 5; p < 0,001; test accoppiato del T di Student).

Tuttavia nel LDT il NPS induce correnti ioniche significativamente ridotte in presenza di TTX, senza che però questa interferisca con il numero di neuroni attivati dal peptide o con il tipo di risposta ottenuta (67,6%; n = 25/37; ACSF vs TTX, p = 0,34; proporzione inward/outward: 72% e 32%; ACSF vs TTX, p = 0,48; test esatto di Fisher). Come anticipato, l'ampiezza media delle correnti sia per le inward, sia per le outward è ridotta rispettivamente del 50% e del 46,7% (media delle correnti inward in TTX: $-11,1 \pm 2,9$ pA; n = 18/25 su un totale di 37 neuroni; p < 0,05; test di Mann-Whitney; Fig. 11: A3, B; media delle correnti outward in TTX: $3,7 \pm 0,4$ pA; n = 8/25 su un totale di 37 neuroni; p < 0,05; test di Mann-Whitney; Fig. 11: A4, B). Questi dati suggeriscono che anche i recettori

del NPS al di fuori delle sinapsi contribuiscono alle risposte di membrana nei neuroni del LDT.

Anche le registrazioni delle correnti ioniche indotte dal NPS in LowCa²⁺ACSF risentono della diminuzione delle componenti presinaptiche in LDT, senza però influire sul numero dei neuroni coinvolti. In queste condizioni il NPS induce azioni di membrana nel 65,2% dei neuroni esaminati (n = 15/23), percentuale non significativamente diversa dall'attivazione cellulare in condizioni di controllo (totale di cellule attivate: ACSF vs LowCa²⁺, p = 0,3; test esatto di Fisher). Allo stesso modo, non risente della minor concentrazione di Ca²⁺ neppure la polarità in cui le correnti evocate dal NPS sono distribuite (correnti inward: 73,3% delle cellule attivate; correnti outward: 26,7% delle cellule attivate; test esatto di Fisher tra inward e outward: ACSF vs LowCa²⁺, p = 0,63). D'altro canto però, la diminuita [Ca²⁺] extracellulare riduce significativamente l'ampiezza sia delle correnti inward che di quelle outward rispetto alle condizioni di Ca²⁺ fisiologico, rispettivamente del 64,7% e del 56,5% (ampiezza delle correnti inward: $-7.8 \pm 3,4$ pA; n = 11/15 su un totale di 23 neuroni; Fig. 11: A5, B; ampiezza delle correnti outward: $3 \pm 0,4$ pA; n = 4/15 su un totale di 23 neuroni; Fig. 11: A6, B; p < 0,01 e p < 0,05; test di Mann-Whitney). Inoltre è osservabile che il numero di eventi di membrana e le loro ampiezze non risultano differire significativamente in presenza di TTX o in condizioni di ridotta [Ca²⁺] extracellulare (totale delle cellule attivate: TTX vs LowCa²⁺, p = 0,55; proporzione inward/outward: TTX vs LowCa²⁺, p = 0,53; test esatto di Fisher; ampiezza delle correnti di membrana: TTX_inward vs LowCa²⁺ inward, p = 0,4; TTX_outward vs LowCa²⁺ outward, p = 0,24; test disaccoppiato del T di Student).

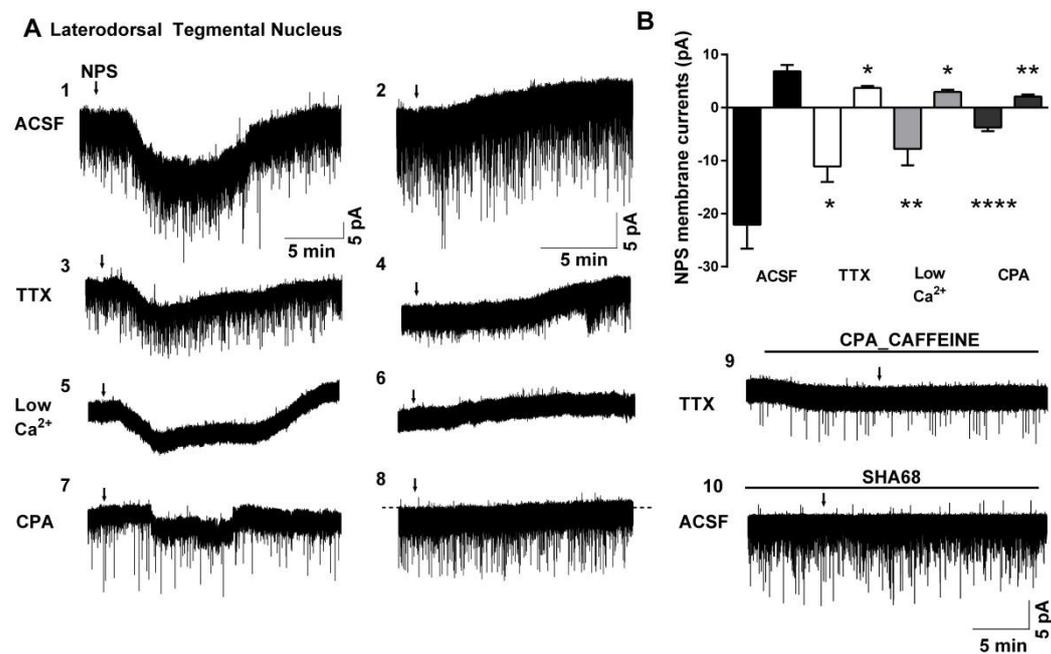
Anche in questo nucleo si è indagato il ruolo della pompa SERCA nelle risposte di membrana al NPS dei neuroni del LDT, visto che questo sistema è implicato nella mediazione delle risposte di membrana nel DR. Come evidenziato nel DR, il CPA riduce l'ampiezza sia delle correnti inward sia delle correnti outward nei neuroni del LDT (ampiezza media delle correnti inward: $-3,8 \pm 0,7$ pA; n = 12/16 su un totale di 19 neuroni; p < 0,0001; Fig. 11: A7, B; ampiezza media delle

correnti outward: $2,1 \pm 0,4$ pA; $n = 4/16$ su un totale di 19 neuroni; $p < 0,01$; test di Mann-Whitney; Fig. 2: A8, B). La distribuzione delle risposte, anche in questo caso, non risulta significativamente alterata (84,2%; $n = 16/19$; totale delle cellule attivate: ACSF vs CPA, $p = 0,28$; test esatto di Fisher) così come la proporzione delle polarità delle correnti (inward/outward: 75% e 25%; proporzione inward/outward: ACSF vs CPA, $p = 0,58$; test esatto di Fisher).

Poiché neppure in questo caso la diminuzione della $[Ca^{2+}]$ extracellulare abolisce interamente le correnti ioniche di membrana, l'effetto del NPS è stato testato dopo la deplezione delle riserve del Ca^{2+} dipendenti dalla Ry. In presenza di TTX, CPA e caffeina il NPS non è più in grado di indurre alcuna variazione di corrente di membrana ($n = 5/5$; $p < 0,01$; test esatto di Fisher; Fig. 11: A9). Alla luce di questi dati si evince che le risposte di membrana evocate dal NPS nei neuroni del LDT sono il risultato di meccanismi pre/postsinaptici che coinvolgono le riserve di Ca^{2+} intracellulare dipendenti sia dall' IP_3 sia dalla Ry.

Infine, la specificità di azione del NPS nei confronti del NPSR nel LDT è stata anche in questo caso determinata dalla constatazione che il peptide non è in grado di generare effetti sulle membrane cellulari in presenza di SHA 68 ($n = 3/3$; $p < 0,05$; test esatto di Fisher; Fig. 11: A10).

Figura 11



NPS ha anche effetti sulle membrane della maggior parte dei neuroni del LDT in maniera sensibile al blocco sinaptico. (A) NPS induce correnti inward (A1) outward (A2) in condizioni di controllo. Le correnti risultano attenuate dalla presenza di TTX (A3, A4) e dalla riduzione del Ca²⁺ nella soluzione esterna (A5, A6), suggerendo che il NPS induce effetti che si estendono al di là dei terminali sinaptici della cellula postsinaptica. Anche il LDT gli store cellulari di Ca²⁺ dipendenti da IP₃ mediano un effetto importante dal momento che le azioni di membrana del NPS risultano ridotte dalla presenza di CPA (A7, A8). (A9) quando la caffeina viene aggiunta al CPA, le risposte al NPS vengono eliminate, indicando un ruolo fondamentale del Ca²⁺ rilasciato dalle riserve intracellulari dipendenti da IP₃ e Ry. Come notato in DR anche il LDT il mix di CPA e caffeina induce correnti depolarizzanti per se. (A10) gli effetti osservati sono specifici al NPS dato che la presenza di SHA 68 elimina qualsiasi inflessione sulle correnti di membrana. (B, istogrammi) media delle correnti di membrana (pA) delle popolazioni cellulari del LDT registrate nelle diverse condizioni sperimentali.

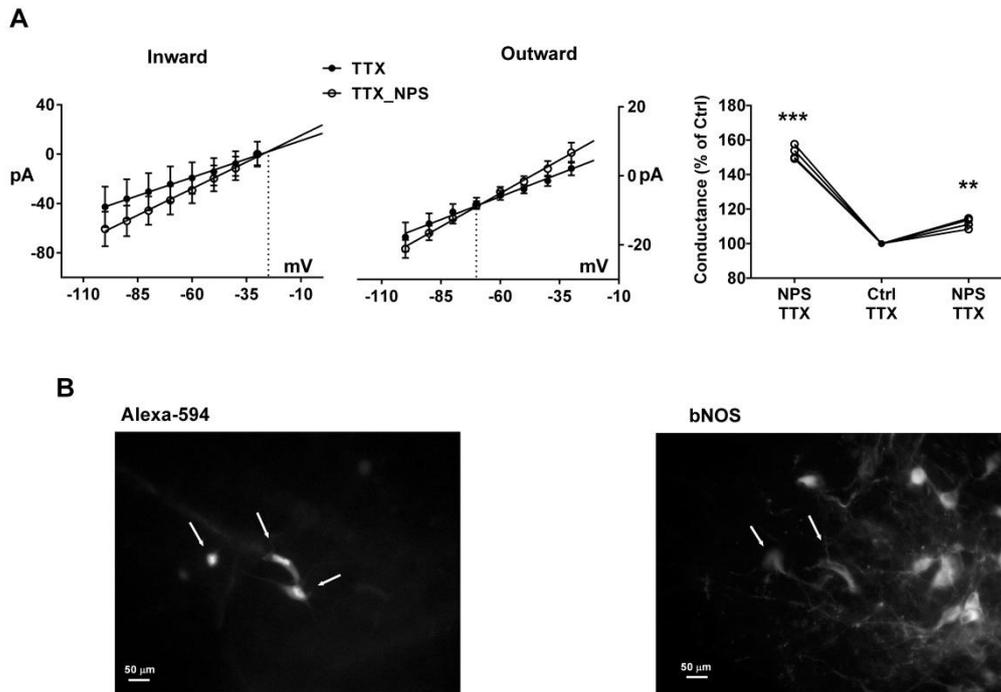
Anche nei neuroni del LDT, al fine di comparare i meccanismi ionici che sono alla base delle correnti indotte dal NPS sulle membrane cellulari sono state analizzate le curve IV delle risposte indotte in presenza di TTX.

In prima analisi si evince che le correnti evocate dal NPS sono accompagnate da un aumento della conducibilità di membrana, sia in caso di correnti inward (53%) che in caso di correnti outward (12%) (valori normalizzati della conducibilità; inward: $152,6 \pm 1,9\%$, $n = 4/4$, $p < 0,001$; outward: $112,1 \pm 1,4\%$, $n = 4/4$, $p < 0,01$; test disaccoppiato del T di Student; Fig. 12: A).

L'ulteriore analisi delle relazioni IV porta alla luce interessanti differenze tra i due nuclei, quando le cellule rispondono al NPS con una corrente inward. In questo caso infatti il potenziale di equilibrio è di circa -27 mV ($26,9 \pm 7,3$ mV; n = 4; Fig. 12: A), caratteristico di una NSCC. In maniera simile al DR invece rispondono le cellule che, a seguito di applicazione di NPS, generano una corrente outward. In questi casi infatti il potenziale di equilibrio si avvicina a quello dello ione K^+ ($-69 \pm 3,5$ mV; n = 3; Fig. 12: A), suggerendo l'attivazione di una sua conduttanza alla base delle correnti outward. La precisa identificazione dei canali ionici non specifici e dei canali del potassio coinvolti rimangono comunque obbiettivi per studi futuri.

In questo studio 36 delle cellule testate in LDT sono state recuperate immunostochimicamente, rivelando che gli effetti del NPS interessano sia neuroni di tipo colinergico sia di tipo non colinergico (Fig. 12: A). Di queste cellule responsive al NPS, il 48% è risultato bNOS⁺ (n = 10/21). Nell'80% delle cellule bNOS⁺ il NPS ha indotto correnti inward (n = 8/10), mentre nel restante 20% ha indotto correnti outward (n = 2/10).

Figura 12



NPS ha anche effetti sui canali ionici di membrane nella maggior parte dei neuroni del LDT. (A) le relazioni IV delle correnti inward indicano un equilibrio a -27 mV ($n = 4$), molto vicino al potenziale di equilibrio del NSCC presente nelle cellule del LDT (pannello di sx). Plot delle relazioni IV costruite durante le correnti outward ($n = 3$) mostrano un equilibrio a -69 mV (pannello di mezzo). Le misurazioni della conduttanza ionica ($\Delta = -20$ mV, da -60 mV a -80 mV) in presenza di TTX mostrano un aumento di quest'ultima durante le svolgimenti delle correnti inward (pannello di dx, colonna di sx, $n = 4$), consistente con l'attivazione di NSCC e durante le correnti outward (colonna di dx, $n = 4$). (B) immagini fluorescenti di 3 cellule registrate in LDT, contenenti Alexa-594 (sinistra), e immagini fluorescenti della stessa porzione di fettina dopo il processamento del tessuto mediante bNOS (destra). Tutte e 3 le cellule hanno risposto al NPS ma solo due sono cellule colinergiche $bNOS^+$ (cellule in alto) mentre la terza risulta negativa (cellula in basso). Questi dati indicano che il NPS svolge le sue azioni su una popolazione cellulare eterogenea.

Nel loro complesso questi dati indicano che il NPS, agendo tramite il proprio recettore, induce correnti ioniche di membrana mediante l'attivazione di un NSCC o di un canale del K^+ , in entrambi i casi mediante una modulazione del Ca^{2+} intracellulare. Tuttavia diversamente da quanto accade nel DR le correnti inward non sono compensate da concomitanti correnti del K^+ . Inoltre, sempre in contrasto con quanto osservato nel DR, la sensibilità alla TTX suggerisce che nel LDT le

azioni cellulari del NPS non sono generate solamente dall'attivazione postsinaptica del NPSR, ma che queste sono anche il risultato di contributi presinaptici distinti dai terminali assonici.

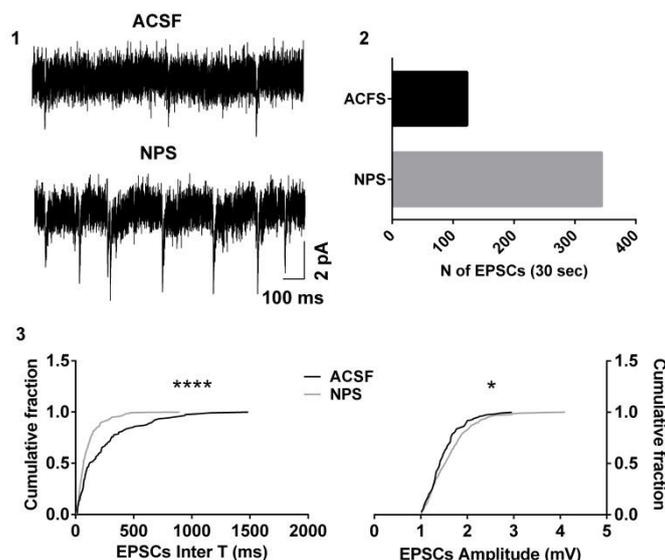
Il NPS altera l'attività sinaptica nel DR e nel LDT

Il NPS incrementa la frequenza delle correnti eccitatorie postsinaptiche (EPSC) nei neuroni del DR

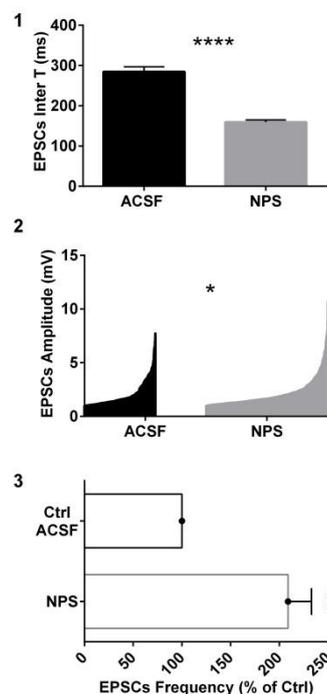
In circa il 77% delle cellule registrate nel DR, l'applicazione locale del NPS (Fig. 13: A1) induce una diminuzione significativa dell'intervallo tra due EPSC consecutive (Inter-T) (Ctrl: $284,5 \pm 12,4$ ms; NPS: $159,2 \pm 5,5$ ms; $n = 10/13$; test di K-S; $p < 0,0001$; Fig. 13: A3; B1). In queste cellule, la frequenza delle EPSC aumenta del 109% (valore normalizzato della media: $208,9 \pm 24,1\%$; $n = 10/13$; $p < 0,01$; test accoppiato del T di Student; Fig. 13: A2, B3). Nella maggior parte delle risposte anche l'ampiezza delle correnti spontanee risulta alterata. Il NPS infatti aumenta l'ampiezza delle EPSC del 4,8%; seppur piccolo, tale aumento si verifica nel 66,7% di queste cellule (Ctrl: $2 \pm 0,1$ mV; NPS: $2,1 \pm 0,04$ mV; test di K-S; $p < 0,05$; $n = 6/9$; Fig. 13: A3, B2). L'aumento di frequenza di EPSC a promosso dal NPS nelle cellule del DR indica un aumento di rilascio del glutammato dai terminali presinaptici eccitatori.

Figura 13

A Dorsal Raphe



B

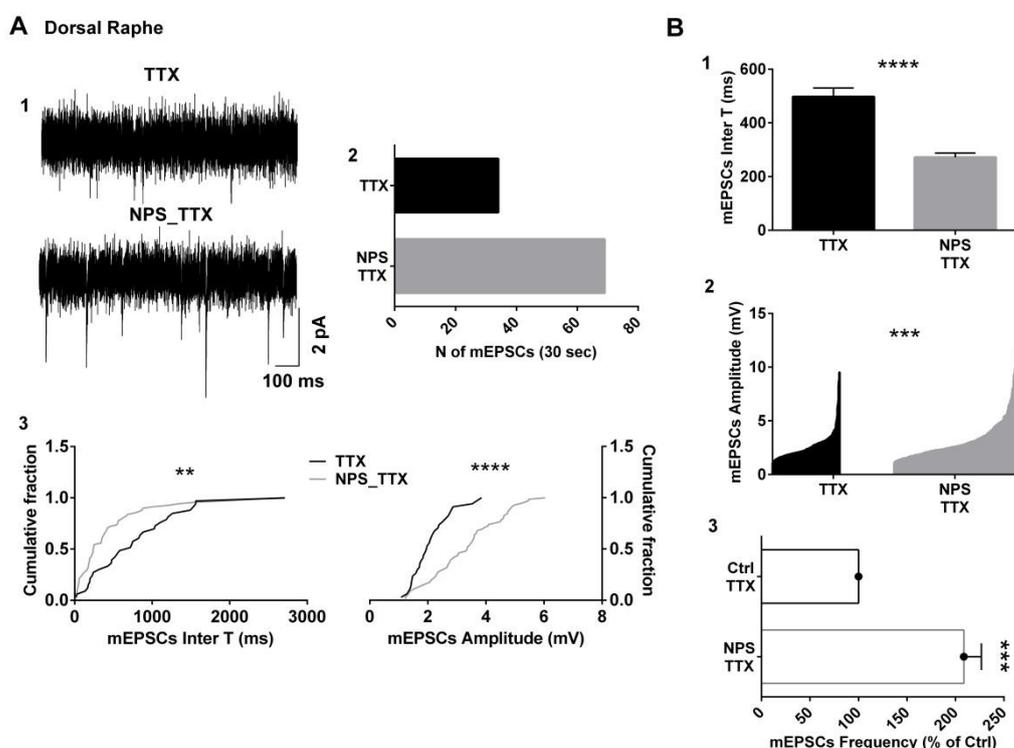


Il NPS aumenta la frequenza di eventi sinaptici (EPSC) nella maggior parte dei neuroni del DR, inducendo anche un aumento di ampiezza. (A1) Registrazioni condotte in voltage-clamp mostrano gli eventi sinaptici in un neurone del DR, illustrando un aumento dell'attività delle sinapsi eccitatorie (deflessioni dirette verso il basso) a seguito dell'applicazione del NPS. Il numero degli eventi (N) di questa cellula (30 sec di registrazione), come mostrato in A2, aumenta di due volte rispetto al controllo. (A3) Le frazioni cumulative ne rivelano anche il decremento significativo negli intervalli tra EPSC, nonché l'aumento di ampiezza. (B) Gli istogrammi costruiti sulle popolazioni cellulari registrate rivelano una diminuzione significativa degli intervalli tra EPSC (B1). In alcune di queste cellule, anche l'ampiezza delle EPSC viene aumentata in maniera significativa dal NPS (B2). L'aumento di frequenza delle EPSC nella popolazione cellulare è mostrato in B3.

La presenza del bloccante dei canali del sodio a carico delle miniatures delle EPSC promosse dal NPS (Fig. 14: A1, 2, 3). In presenza di TTX infatti il NPS induce una significativa riduzione dell'inter-T delle mEPSC nella maggior parte delle cellule del DR (60% delle cellule; Ctrl: 497 ± 33 ms; NPS: $271,9 \pm 15,7$ ms; $n = 9/15$; $p < 0,0001$; test di K-S; Fig. 14: A3, B1). Come ci si aspettava, la frequenza media delle mEPSC è ridotta rispetto alla frequenza registrata in condizioni di controllo. Tuttavia il NPS è in grado di aumentare tale frequenza residua del 109% in maniera simile a

quanto accade nella popolazione di cellule di controllo (valore normalizzato della media: $208,7 \pm 18,1\%$; $n = 9/15$; $p < 0,001$; test accoppiato del T di Student; Fig. 14: A2, B3). Inoltre, in maniera simile al controllo, il NPS in presenza del blocco sinaptico aumenta anche l'ampiezza delle mEPSCs di un valore percentuale pari a circa il 18,3% (Ctrl: $2,6 \pm 0,1$ mV; NPS: $3,1 \pm 0,1$; $n = 4/9$; $p < 0,001$; test di K-S; Fig. 4: A3; B2). La persistenza degli effetti sulle mEPSC delle cellule del DR mediati dal NPS suggerisce che tale peptide agisca a livello di target localizzati nel terminale sinaptico.

Figura 14



Il NPS aumenta la frequenza delle miniature degli eventi sinaptici (mEPSC) nella maggior parte dei neuroni del DR, inducendo anche un aumento di ampiezza. (A1) Registrazioni condotte in voltage-clamp mostrano gli eventi sinaptici eccitatori (deflessioni dirette verso il basso) in un neurone del DR in assenza di potenziali d'azione nella fettina, ottenuto mediante il bloccante TTX, e il loro aumento di attività a seguito dell'applicazione del NPS. (A2) Questo provoca un aumento del numero dei mini eventi (N) di questa cellula (30 sec di registrazione) di ben due volte rispetto al controllo. (A3) In questo neurone il NPS produce una diminuzione significativa degli intervalli tra le mEPSC accompagnata da un aumento della loro ampiezza. (B) Gli istogrammi costruiti sulle popolazioni cellulari registrate rispecchiano tale diminuzione significativa degli intervalli tra mEPSC (B1). In alcune di queste cellule, anche l'ampiezza delle mEPSC viene aumentata in maniera significativa dal NPS (B2). La diminuzione degli Inter T e l'aumento del numero di mini

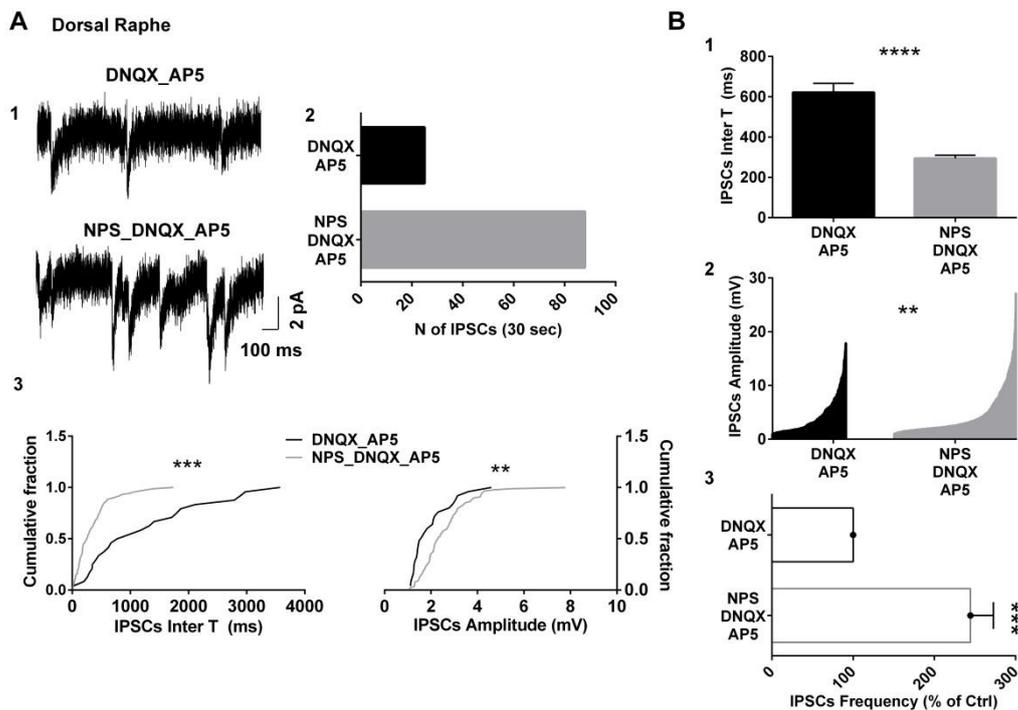
eventi si traducono in un aumento di frequenza di questi ultimi nella popolazione cellulare, come mostrato in B3.

Il NPS incrementa la frequenza delle correnti inibitorie postsinaptiche (IPSC) nel DR

Per verificare se l'effetto del NPS è in grado di interessare anche la trasmissione inibitoria nel DR, le registrazioni in modalità voltage clamp sono state condotte usando elettrodi capillari contenenti una soluzione interna ad alto contenuto di anione Cl⁻. In questo modo è stato possibile alterare la forza motrice per gli anioni Cl⁻ e di conseguenza invertire la direzione delle IPSC per una migliore rivelazione e caratterizzazione. Per poter scindere la componente eccitatoria degli eventi spontanei, le registrazioni sono state condotte in presenza degli antagonisti dei recettori del glutammato AP5 e DNQX, in maniera tale da poter bloccare rispettivamente i recettori NMDA e AMPA e in questo modo silenziare gli eventi spontanei dovuti al rilascio di glutammato.

In queste condizioni il NPS risulta significativamente efficace nel mediare eventi inibitori spontanei nelle cellule del DR (Fig. 15: A1, 2, 3). Esso infatti riduce l'inter-T delle IPSC nel 56,3% dei neuroni registrati (Ctrl: $621,7 \pm 44,6$ ms; NPS: $294,6 \pm 15,9$ ms; n = 9/16; p < 0,0001; test di K-S; Fig. 15: A3; B1) e la frequenza degli eventi risulta aumentata del 145% (valori normalizzati della media: $244,5 \pm 28,4\%$; n = 9/16; p < 0,001; test accoppiato del T di Student; Fig. 15: A2, B3). Nel 66,7% di queste cellule il NPS è anche in grado di aumentare l'ampiezza delle IPSC di un piccolo ma significativo 1,7% (Ctrl: $4,1 \pm 0,2$ mV ; NPS: $4,2 \pm 0,2$ mV; test di K-S; p < 0,01; n = 6/9, Fig. 15: A3, B2). Questi dati dunque suggeriscono che il NPS sia in grado di aumentare anche la trasmissione GABAergica nelle cellule del DR.

Figura 15

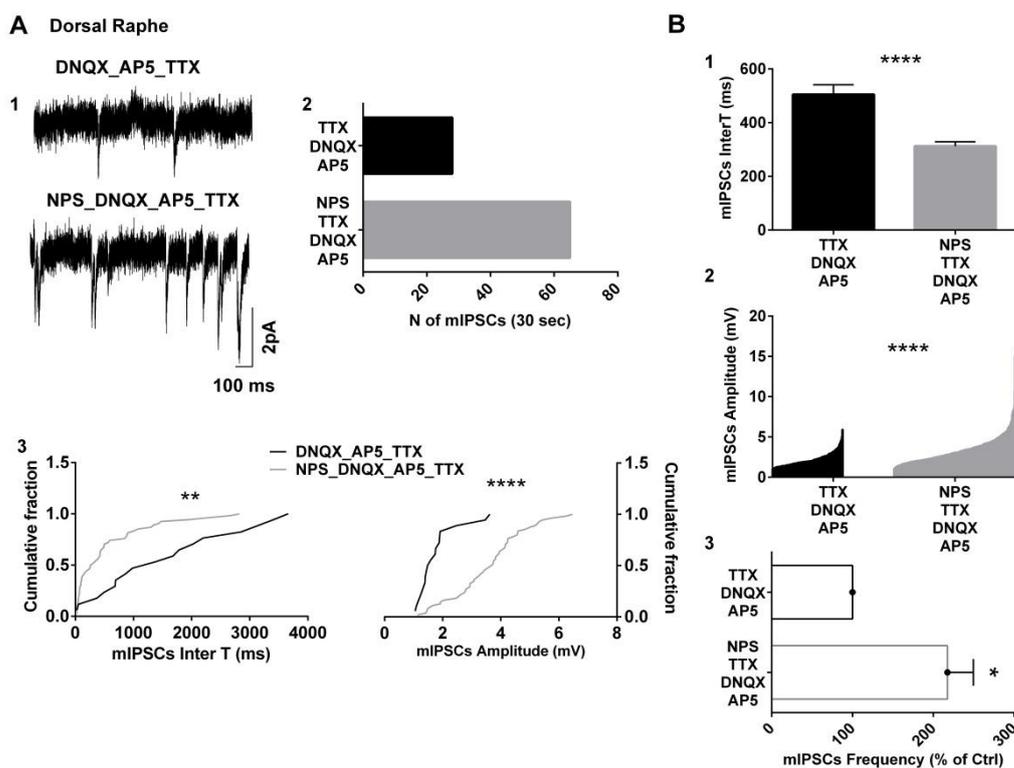


Il NPS aumenta frequenza ed ampiezza delle IPSC nel DR. (A1) Registrazioni in modalità voltage-clamp di una cellula, condotte mediante un capillare ad alta [Cl] ed in presenza dei bloccanti dei recettori del glutammato (DNQX e AP5), mostrano che il NPS aumenta la frequenza e l'ampiezza delle IPSC (in queste condizioni sperimentali espresse da inflessioni di membrana rivolte verso il basso). (A2) Il plot del numero degli eventi (N) in questa cellula rappresentativa, durante il campionamento di 30 sec di registrazione in DNQX e AP5, rivela un aumento degli eventi superiore a due volte dopo NPS rispetto alla situazione di controllo. Inoltre, in questo neurone, le frazioni cumulative mostrano un decremento significativo e un contemporaneo aumento delle ampiezze delle IPSC (A3) dopo NPS. (B) Gli istogrammi delle popolazioni cellulari del DR che rispondono al NPS mostrano un cambiamento significativo riportando una diminuzione degli intervalli ed un aumento delle ampiezze di queste IPSC (B1, B2). La variazione media della frequenza nella popolazione cellulare del DR è mostrata in B3, dove appare chiaro che le frequenze delle IPSC dopo NPS è più che raddoppiata.

Il blocco dei canali del Na⁺ voltaggio dipendenti non previene le azioni del NPS né sulla frequenza né sull'ampiezza degli eventi inibitori (Fig. 16: A1, 2, 3). Nel 42,9% dei neuroni testati nel DR in presenza di TTX si riscontra infatti una diminuzione dell'inter-T delle mIPSC (Ctrl: 505,3 ± 35,9 ms; NPS: 312,9 ± 15,8 ms; n = 6/14; p < 0,0001; test di K-S; Fig. 16: A3, B1) e si evidenzia un aumento significativo della loro frequenza del 118% (valore normalizzato della media: 217,5 ± 32,1%; n = 6/14; p < 0,05; test accoppiato del T di Student; Fig. 16: A2,

B3). Questi effetti sono simili a quelli riscontrati in assenza di TTX. Inoltre nella maggior parte delle cellule in cui si registra un effetto (83%) si nota anche un aumento dell'ampiezza delle mIPSC del 55,3% in seguito all'applicazione locale di NPS (Ctrl: $2,2 \pm 0,1$ mV; NPS: $3,4 \pm 0,1$ mV; n = 5/6; test di K-S; p < 0,0001; Fig. 16: A3, B2).

Figura 16



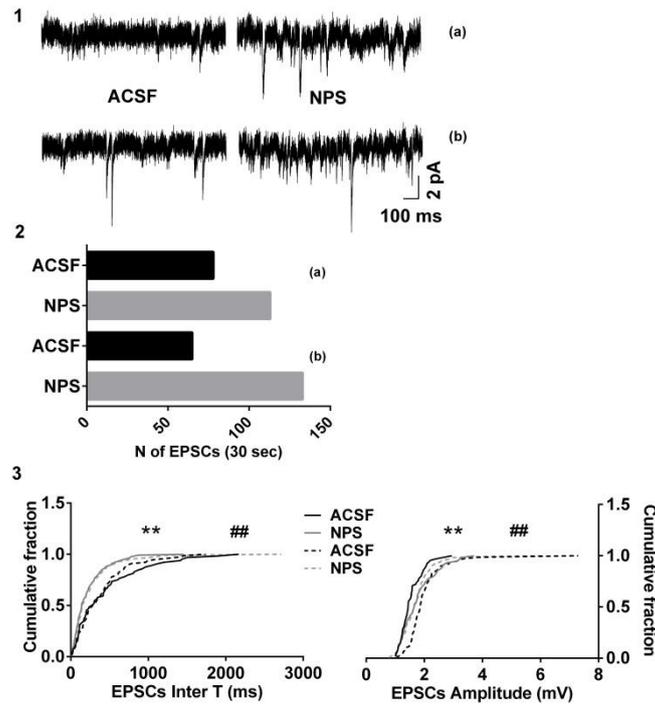
Il NPS aumenta frequenza ed ampiezza delle miniature delle IPSC nel DR. (A1) Regrazioni in modalit  voltage-clamp di una cellula, condotte in condizioni sperimentali di elevato contenuto di anione Cl⁻ intracellulare ed in presenza dei bloccanti dei recettori del glutammato (DNQX e AP5), mostrano che il NPS aumenta la frequenza e l'ampiezza delle mIPSC (inflexioni di membrana rivolte verso il basso). (A2) In questa cellula rappresentativa, gli N eventi (30 sec di registrazione) in DNQX e AP5, aumentano di due volte dopo NPS. Le frazioni cumulative ricavate dall'analisi degli intervalli e delle ampiezze delle mIPSC di questo neurone (A3) mostrano un significativo decremento dei primi ed un significativo aumento delle seconde dopo NPS. (B) Tali variazioni si ritrovano anche espresse negli istogrammi della popolazione neuronale del DR che risponde al NPS, i quali mostrano la significativit  nella diminuzione degli intervalli e nell'aumento di ampiezza delle mIPSC in alcuni di questi neuroni (B1, B2). Di questa popolazione   anche espressa la variazione media della frequenza delle mIPSC (B3), la quale anche in questo caso   pi  che raddoppiata dopo NPS.

Il NPS incrementa la frequenza delle correnti eccitatorie postsinaptiche (EPSC) nel LDT

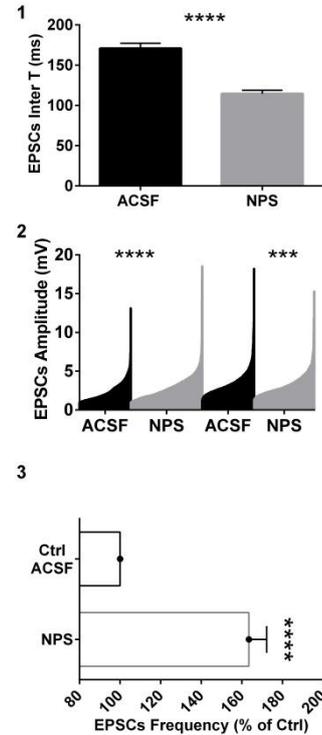
L'indagine sugli effetti del NPS sull'attività sinaptica delle cellule del LDT, seppur con qualche differenza, rivela caratteristiche simili a quelle osservate nelle cellule del DR. In LDT il NPS è in grado di aumentare la frequenza delle EPSC in maniera simile a quanto osservato in DR, mentre l'effetto sull'ampiezza di tali EPSC è diverso (Fig. 17: A1a, A1b). Nello specifico, nel 76,5% delle cellule prese in considerazione l'inter-T risulta ridotto (Ctrl: $170,7 \pm 6,6$ ms; NPS: $114,7 \pm 4,2$ ms; $n = 13/17$; $p < 0,0001$; test di K-S; Fig. 17: A3, B1) con un conseguente aumento della frequenza di EPSC pari al 64% (valore normalizzato della media: $163,5 \pm 8,7\%$; $n = 13/17$; $p < 0,0001$; studio accoppiato del T di Student; Fig. 17: A2, B3). La differenza tra questi eventi rispetto a quelli osservati nel DR sta nel fatto che: nel 38,5% di queste cellule attivate dal NPS si registra un aumento significativo di ampiezza del 20% (Ctrl: $2,5 \pm 0,04$ mV; NPS: $3 \pm 0,04$; $n = 5/13$; $p < 0,0001$; test di K-S; Fig. 17: A1a, A3, B2), mentre nell'altro 38,5% dei casi l'aumento di frequenza è associato ad una diminuzione dell'ampiezza dell'8,4% (Ctrl: $3,6 \pm 0,1$ mV; NPS: $3,3 \pm 0,04$; $n = 5/13$; $p < 0,0001$; studio K-S; Fig. 17: A1b, A3, B2).

Figura 17

A Laterodorsal Tegmental Nucleus



B

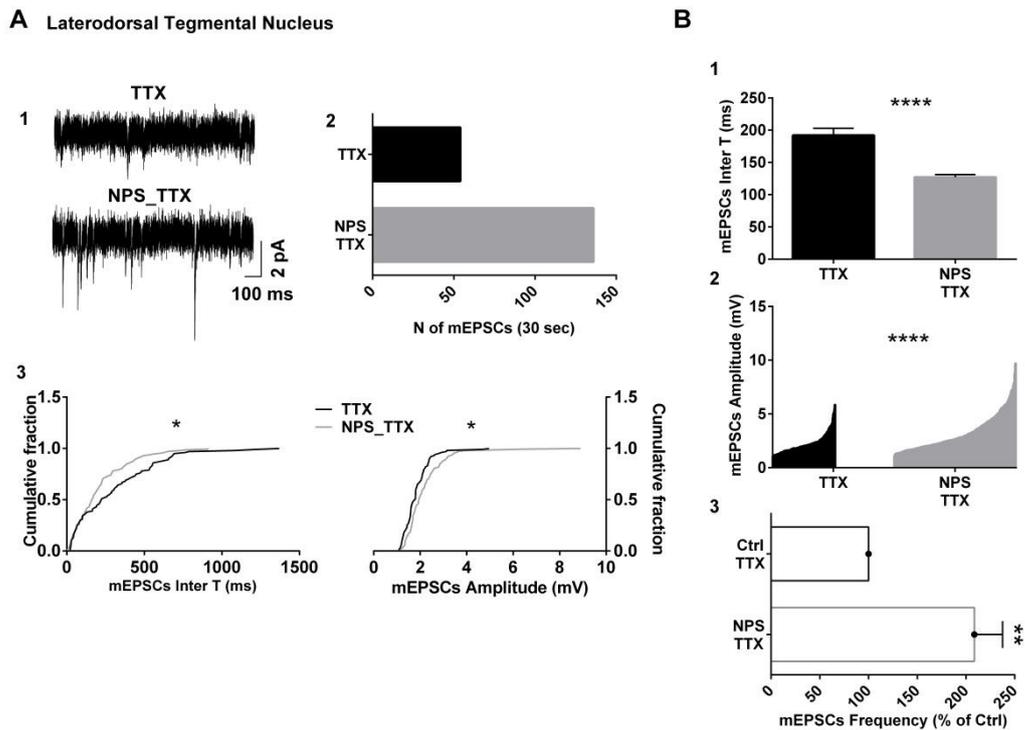


Similmente a quanto accade nel DR, il NPS aumenta la frequenza delle EPSC nei neuroni del LDT anche se in questo nucleo, gli effetti sulle loro ampiezze risultano bifasiche. (A1) registrazioni voltage-clamp di due cellule nel LDT in cui il NPS aumenta la frequenza delle EPSC: nella cellula (a) l'ampiezza delle EPSC viene concomitantemente aumentata alla frequenza; nella cellula (b) l'ampiezza delle EPSC viene invece significativamente diminuita. (A2) gli istogrammi che riportano il numero degli eventi riflettono l'aumento di frequenza delle EPSC in entrambe le cellule. (A3) le frazioni cumulative degli intervalli (A3, pannello sx) e delle ampiezze delle EPSC (A3, pannello dx) di ambo le cellule mostrano che le variazioni di entrambi i parametri risultano significativi (** e ## in questi pannelli indicano i risultati ottenuti rispettivamente dalla cellula a e b). (B) analisi della popolazione cellulare che mostra la diminuzioni degli intervalli delle EPSC (B1), il doppio effetto sulla loro ampiezza (B2) e gli effetti sulla frequenza (B3) tutti statisticamente significativi.

Quando il NPS viene applicato in presenza di TTX per determinare se gli effetti sulle EPSC dipendono dalla generazione dei potenziali d'azione (Fig. 18: A1) si osservano nuovamente analogie con quanto osservato nel DR. Infatti l'applicazione di NPS in queste condizioni fa diminuire l'inter-T delle mEPSC (61,5% delle cellule; Ctrl: $192,3 \pm 10,8$ ms; NPS: $127,1 \pm 4$ ms; $n = 8/13$; $p < 0,0001$; test di K-S; Fig. 18: A3, B1), promuovendo un conseguente aumento di frequenza pari al 109% (valore normalizzato della media: $208,7 \pm 28,8\%$; $n =$

8/13; $p < 0,01$; test accoppiato del T di Student; Fig. 18: A2, B3). In TTX il NPS continua a mostrare attività anche nei confronti dell'ampiezza delle mEPSC in maniera simile alle condizioni di controllo (senza TTX). Nel 37.5% delle cellule attivate si registra un incremento del 39% dell'ampiezza delle mEPSC (Ctrl: $2,3 \pm 0,1$ mV; NPS: $3,2 \pm 0,1$ mV; $n = 3/8$; $p < 0,0001$; test di K-S; Fig. 18: A3, B2); in una cellula il NPS riduce in maniera significativa l'ampiezza delle mEPSC (12%; $n = 1/8$). Questa riduzione non risulta significativamente diversa in termini di distribuzione rispetto alla distribuzione di incremento/decremento delle ampiezze in condizioni di controllo (test esatto di Fisher: due code, $p = 0,3359$; una coda, $p = 0,2$). Tutte queste evidenze rivelano quindi che l'effetto del NPS non dipende dai canali del Na^+ voltaggio-dipendenti per la modulazione della trasmissione eccitatoria delle cellule del LDT.

Figura 18



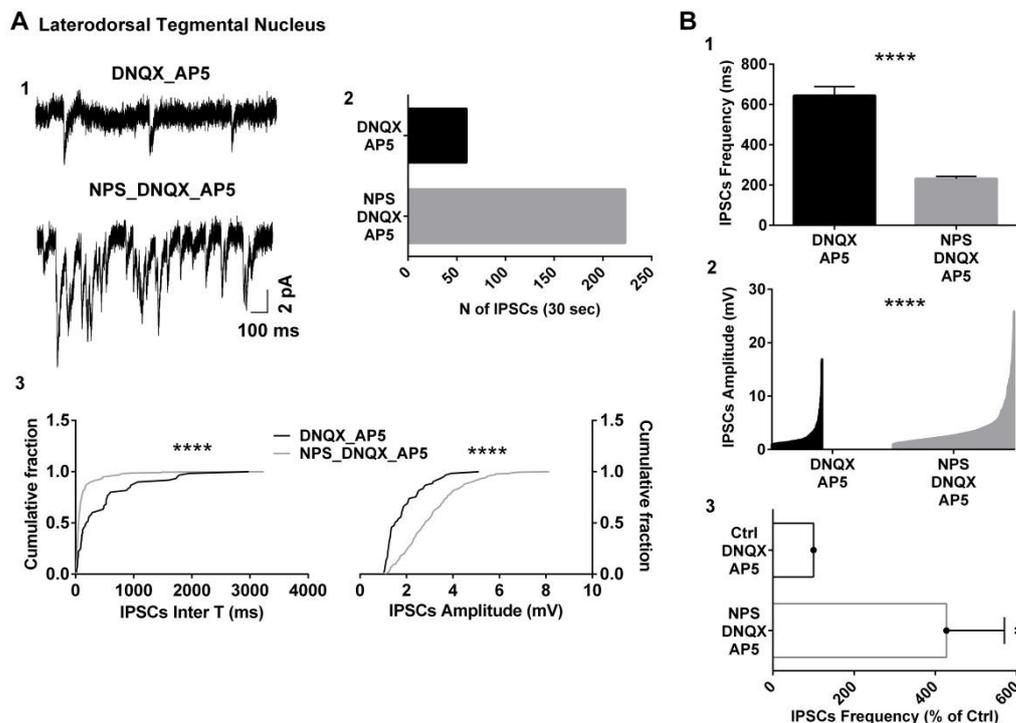
Similmente a quanto accade nel DR, il NPS risulta aumentare la frequenza e le ampiezze delle mEPSC. In presenza di TTX il NPS induce i suoi effetti più comuni sui neuroni del LDT, come si nota dalla registrazione in voltage-clamp di una cellula rappresentativa (A1) e dagli istogrammi che riportano il numero delle miniature in 30 secondi di traccia prima e dopo il peptide (A2).

Questo effetto è significativo come si nota dalle frazioni cumulative degli intervalli tra le mEPSC (A3, pannello di sx). L'analisi della popolazione rivela una variazione significativa degli intervalli tra le mEPSC nella maggior parte delle cellule del LDT (B1). In questa cellula, il NPS aumenta l'ampiezza delle mEPSC (A3) e come si evince dall'istogramma che riporta le ampiezze mEPSC di tutta la popolazione studiata, il blocco dei potenziali d'azione previene non crea le condizioni per una risposta bifasica sulle ampiezze, come accade invece in condizioni di normale ACSF. (B3) l'aumento significativo della frequenza delle mEPSC indotta dal NPS è mostrata dai dati normalizzati della popolazione cellulare.

Il NPS incrementa la frequenza delle correnti inibitorie postsinaptiche (IPSC) nel LDT

Poiché il NPS risulta efficace nella modulazione della trasmissione GABAergica nel DR, è stata esaminata questa eventualità anche nelle cellule del LDT. Anche in questo nucleo il NPS è stato applicato in presenza di DNQX e AP5 per inibire la componente eccitatoria della trasmissione sinaptica, e le registrazioni elettrofisiologiche sono state effettuate con microelettrodi (capillari) contenente una soluzione arricchita di anioni Cl⁻ per invertire la polarità delle IPSC. In queste condizioni di registrazione le azioni del peptide non si sono rivelate differenti rispetto a quelle ottenute nel DR (Fig. 19: A1). Infatti nel 62,5% dei neuroni considerati, l'NPS è in grado di diminuire significativamente l'inter-T delle IPSC (Ctrl: $644,3 \pm 44,7$ ms; NPS: $231,3 \pm 11,9$ ms; $n = 10/16$; $p < 0,0001$; test di K-S; Fig. 19: A3, B1) assieme ad un aumento della frequenza del 327% di IPSC, media in cui sono inclusi anche i valori di un "outlier" che raggiunge un aumento del 1641% (valore normalizzato della media: $427,4 \pm 142,9\%$; $n = 10/16$; $p < 0,05$; studio accoppiato del T di Student; Fig. 19: A2, B3). Inoltre la maggioranza di queste cellule attivate risponde anche aumentando del 52% l'ampiezza delle IPSC (70% delle cellule attivate; Ctrl: $2,5 \pm 0,1$ mV; NPS: $3,8 \pm 0,1$ mV; $n = 7/10$; $p < 0,0001$; K-S test; Fig. 19: A3, B2).

Figura 19



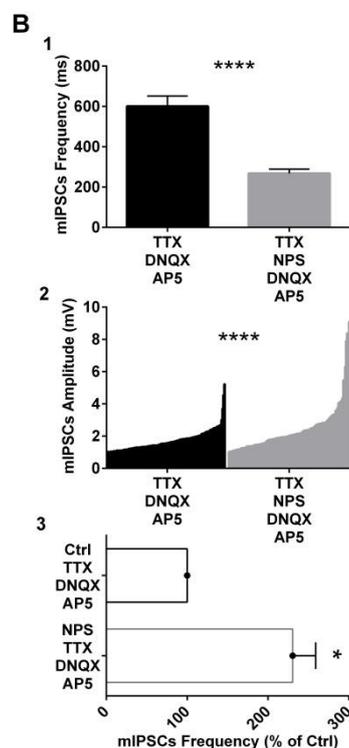
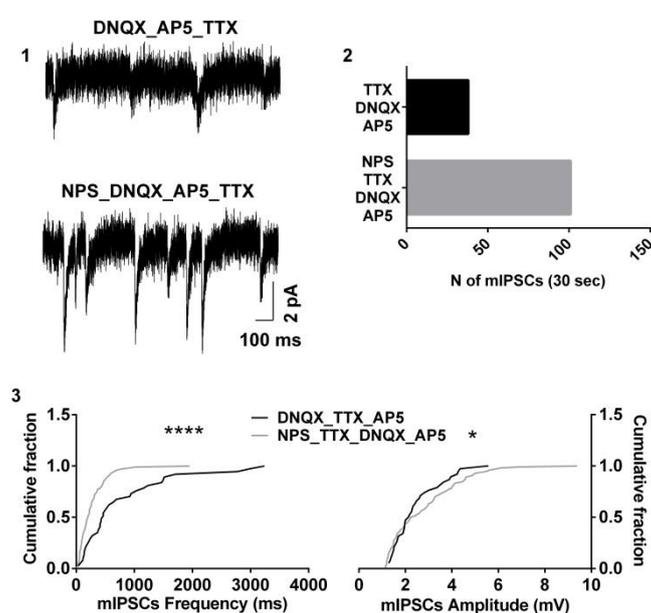
Il NPS induce anche un aumento di frequenza degli eventi inibitori così come un aumento dell'ampiezza nella maggioranza delle cellule del LDT. (A) Registrazioni rappresentative voltage-clamp di una cellula del LDT, effettuate mediante elevata [Cl⁻] nella soluzione destinata al capillare ed inibizione dei recettori per il glutammato (aggiunta di DNQX e AP5 all'ACSF), mostrano un aumento della frequenza delle IPSC (A1) mediato da NPS. Il numero delle IPSC (A2) in questa cellula in 30 sec di registrazione, campionati prima e dopo l'applicazione del peptide, viene mostrato nel rispettivo istogramma, in cui si può notare che gli eventi spontanei vengono quasi raddoppiati dal NSP. Le frazioni cumulative mostrano una diminuzione significativa degli intervalli e un altrettanto significativo aumento dell'ampiezza delle IPSC (A3, pannelli sx e dx) dovuto al NPS. (B) analisi della popolazione che mostra un effetto significativo del NPS nel diminuire gli intervalli (1), aumentare le ampiezza (2) e le frequenze (3) delle IPSC.

In presenza di TTX gli effetti del NPS sugli eventi inibitori non risultano alterati rispetto alle registrazioni in condizioni di controllo (Fig. 20: C1). La figura 20 mostra che l'esposizione a NPS induce una diminuzione significativa dell'inter-T delle mIPSC (Ctrl: $600,9 \pm 50,7$ ms; NPS: $267,7 \pm 21$ ms; $n = 5/13$; $p < 0,0001$; test di K-S; Fig. 20: A3, B1), accompagnata da un aumento di frequenza del 131% (valore normalizzato della media: $230,6 \pm 28,4\%$; $n = 5/13$; $p < 0,05$; test accoppiato del T di Student; Fig. 20: A2, B3). Anche se la percentuale delle cellule che vengono attivate in presenza di TTX è minore rispetto alle condizioni

di controllo (38,5% rispetto a 62,5%), la proporzione di cellule che aumentano la frequenza delle mIPSC non risulta essere statisticamente differente (test esatto di Fisher; $p = 0,53$). Inoltre il 60% delle cellule attivate dal NPS risponde anche con un aumento del 47% dell'ampiezza delle mIPSC (Ctrl: $1,7 \pm 0,1$; NPS-TTX: $2,5 \pm 0,2$; $n = 3/5$; $p < 0,0001$; test di K-S; Fig. 20: A3, B2). Da questi dati si evince dunque che anche la trasmissione inibitoria locale nel LDT è modulata efficacemente dal NPS.

Figura 20

A Laterodorsal Tegmental Nucleus



L'aumento di frequenza degli eventi inibitori così come l'aumento dell'ampiezza indotto dal NPS nella maggioranza delle cellule del LDT non viene prevenuto dalla TTX. (A) registrazioni rappresentative voltage-clamp di un neurone del LDT, effettuate in elevata [Cl⁻] intracellulare ed inibizione dei recettori per il glutammato mediante DNQX e AP5, mostra un aumento della frequenza delle (A1) dopo NPS. Il numero delle mIPSC (A2) in questa cellula (30 sec di registrazione), mostrato in A2 rivela un raddoppiamento degli eventi spontanei a seguito di perfusione con NPS. Le frazioni cumulative mostrano una diminuzione significativa degli intervalli e un altrettanto significativo aumento dell'ampiezza delle mIPSC (A3, pannelli sx e dx) eventi entrambi scaturiti dal NPS. (B, D) analisi della popolazione che mostra un effetto significativo del NPS nel diminuire gli intervalli (1), aumentare le ampiezza (2) e le frequenze (3) delle mIPSC.

Complessivamente questi dati indicano che il NPS ha effetti significativi sulla frequenza di EPSC e IPSC sia nel DR che nel LDT, interessando anche l'ampiezza di tali eventi in alcune sottopopolazioni cellulari. La persistenza di questi effetti in presenza di TTX indica che il NPS agisce a livello dei terminali assonici glutammatergici e GABAergici in sede locale sia nel DR che nel LDT.

Il NPS induce movimenti di Ca^{2+} in neuroni singoli di DR e LDT

Il NPS induce un aumento di Ca^{2+} intracellulare nei neuroni del DR

Nella serie finale di esperimenti sono state condotte contemporaneamente registrazioni elettrofisiologiche e registrazioni di calcium-imaging in singole cellule, per definire meglio l'eventuale relazione tra l'aumento di Ca^{2+} intracellulare e gli eventi di membrana, entrambi mediati dal NPS. In questo tipo di registrazioni di calcium-imaging, il bis-Fura-2 (sale non in grado di attraversare le membrane cellulari) entra direttamente nella cellula dopo la formazione del sigillo e la rottura della membrana cellulare (whole-cell patch-clamp), sfruttando la diffusione dalla soluzione interna del capillare di vetro. Il NPS, come in precedenza, è stato applicato mediante un capillare di vetro posizionato nelle immediate vicinanze della cellula di interesse. In queste condizioni il NPS induce forti cambiamenti di DF/F nella maggior parte dei neuroni registrati nel DR (87,5% dei neuroni; n = 14/16). La media dell'aumento di DF/F è del $29,6 \pm 6,8\%$ (Fig. 21: A1, 5). Anche in questo assetto investigativo, le risposte al peptide non sono risultate ripetibili: una seconda applicazione non è in grado di indurre una seconda risposta di intensità pari alla prima (prima applicazione di NPS: $20,5 \pm 3,8\%$ DF/F; seconda applicazione di NPS: $7,9 \pm 1,3\%$ DF/F; n=11; $p < 0,05$; test accoppiato del T di Student).

Anche in questo caso è ragionevole supporre che la mancanza di ripetibilità sia dovuta alla diluizione di costituenti intracellulari nel microelettrodo di registrazione. Indipendentemente dalle cause di questa diminuzione, in questa serie di studi non è stato possibile comparare nella stessa cellula due risposte consecutive; pertanto è stato condotto uno studio di popolazione per testare il NPS

in presenza di TTX, di SHA 68 o di soluzioni differenti rispetto all'ACSF di controllo.

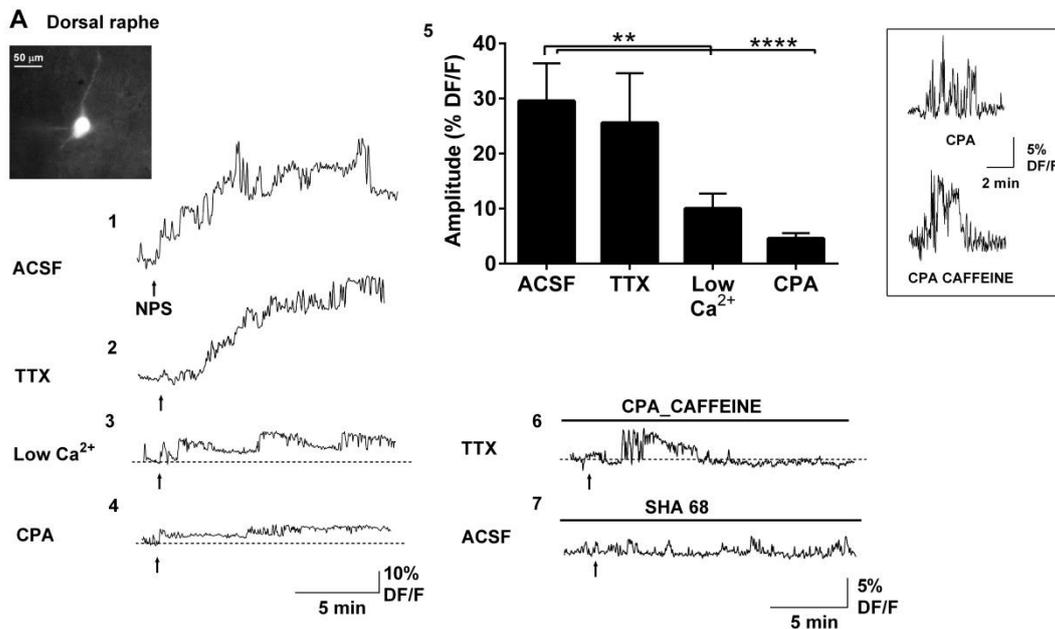
I dati ottenuti permettono di affermare che le variazioni di DF/F rimangono persistenti anche in presenza di TTX. Infatti la media delle variazioni di DF/F indotte dal NPS in queste condizioni è del $25,6 \pm 9,0\%$, non significativamente differente dalle condizioni di controllo ($n = 9/11$; $p = 0,9$; test di Mann-Whitney; Fig. 21: A2, 5). Inoltre anche la proporzione delle cellule che rispondono al NPS in presenza di TTX non è diversa dal controllo (81,8% dei neuroni; $p = 0,4$; test esatto di Fisher).

Al contrario, le variazioni di DF/F sono significativamente alterate quando viene utilizzata una soluzione LowCa^{2+} ACSF. In ambiente extracellulare quasi privo di Ca^{2+} infatti, la variazione di DF/F è circa il 34% della risposta ottenuta in condizioni di $[\text{Ca}^{2+}]$ fisiologiche ($10 \pm 2,6\%$; $p < 0,01$; test di Mann-Whitney; Fig. 21: A3, 5). Anche se l'ampiezza è significativamente ridotta, l'ambiente extracellulare quasi privo di Ca^{2+} non influenza la frequenza della risposta (76.9% dei neuroni; $n = 10/13$; $p = 0,4$; test esatto di Fisher).

La deplezione delle riserve di Ca^{2+} intracellulari dipendenti dalla pompa SERCA mediante l'utilizzo di CPA risulta in piccolo aumento di calcio: $4,6 \pm 1\%$ di DF/F ($p < 0,0001$; test di Mann-Whitney; Fig. 21: A4, 5). Il numero di neuroni attivati non risulta invece significativamente differente dal controllo: il 70% delle cellule testate, nonostante la deplezione delle riserve di Ca^{2+} sensibili all' IP_3 , risponde all'applicazione del NPS ($n = 7/10$; $p = 0,18$; test di Fisher). Poiché né la bassa $[\text{Ca}^{2+}]$ extracellulare, né il CPA sono in grado di prevenire l'aumento di Ca^{2+} citosolico, l'applicazione di NPS è stata condotta in presenza di CPA e caffeina, combinazione che risulta in grado di eliminare le correnti ioniche di membrana. Nell'80% dei neuroni testati CPA e caffeina eliminano il segnale di aumento del Ca^{2+} intracellulare tipico delle altre condizioni di applicazione del NPS, rivelando solo un aumento transitorio di Ca^{2+} intracellulare, non significativamente differente in ampiezza o in percentuale di risposta rispetto alle variazioni di DF/F ottenuta in condizione di CPA ($5,6 \pm 1,5\%$ DF/F; $n = 4/5$; $p = 0,58$; test esatto di

Fisher). In tutte le registrazioni condotte in CPA e caffeina, l'incremento di Ca^{2+} raggiunge il suo massimo per poi tornare ai valori basali entro i 10 minuti dall'applicazione di NPS (Fig. 21: A6); nelle registrazioni condotte in assenza di questi composti, il Ca^{2+} risulta ancora elevato dopo 10 minuti dall'applicazione di NPS, e spesso rimane elevato molto più a lungo. Tale segnale è probabilmente dovuto all'apertura di altre riserve di Ca^{2+} che però, non trovando le riserve di calcio IP_3 e Ry dipendenti, non sono in grado di propagare il meccanismo detto "calcium induced calcium release" (CICR), risultando in un troncamento dell'onda di Ca^{2+} . Ad indicazione del fatto che l'induzione di aumento del Ca^{2+} intracellulare è dovuto dall'interazione del NPS con il proprio recettore, vi è l'evidenza che SHA 68 previene completamente l'aumento di DF/F ($n = 3/3$; $p < 0,05$; test esatto di Fisher; Fig. 21: A7).

Figura 21



Il NPS provoca un aumento del Ca^{2+} citosolico dei neuroni del DR. Immagine fluorescente ottenuta dall'illuminazione di luce modulata ad una lunghezza d'onda di 380 nm di un neurone del DR riempito mediante il capillare di registrazione con l'indicatore del Ca^{2+} bis-Fura 2, il quale altera le sue proprietà spettroscopiche al momento e per tutta la durata del legame con il Ca^{2+} (A; ingrandimento 40 \times ; scala di 50 μm). I dati di questa figura, riportati come percentuale della variazione relativa della fluorescenza (% DF/F; inflessioni positive = aumento del Ca^{2+} citosolico) suggeriscono che tali variazioni di DF/F indotte dal NPS siano il risultato di un

aumento di Ca^{2+} intracellulare (A1). Gli aumenti di fluorescenza indotti dal NPS sono presenti nel DR anche in ACSF contenente TTX (A2). Tuttavia, essi sono minori in $LowCa^{2+}$ (A3) e ulteriormente ridotti in presenza di CPA (A4), indicando che gli aumenti di Ca^{2+} indotti dal NPS non necessitano della generazione dei potenziali d'azione ma coinvolgono un flusso di questo ione attraverso la membrana cellulare e le sue riserve intracellulari. Gli istogrammi della variazione di DF/F indotta dal NPS in presenza dell'antagonista TTX e della $LowCa^{2+}$ ACSF mostrano gli effetti del peptide sulla popolazione neuronale del DR (A5). Le cinetiche di risposta al NPS vengono alterate in presenza di CPA e caffeina come mostrato nella registrazione di DF/F in una cellula del DR. Mentre l'ampiezza massima delle risposte in CPA non differisce significativamente in presenza del cocktail CPA + caffeina, la variazione massima di DF/F in quest'ultimo mezzo avviene con una latenza minore e la durata dell'intera risposta di Ca^{2+} è molto più ridotta rispetto agli eventi di lunga durata che persistono per più di 15 minuti in CPA o in tutte le altre condizioni analizzate (A6). L'effettività del CPA e della caffeina nell'innescare il rilascio di Ca^{2+} dalle riserve intracellulari dipendenti da IP_3 e Ry è mostrata nel pannello inserito a dx, in cui è evidente che questi composti provocano un aumento di DF/F. Le risposte del Ca^{2+} al NPS sono abolite in presenza dell'antagonista del NPSR(A7).

Il NPS induce un aumento di Ca^{2+} intracellulare nei neuroni del LDT

Il NPS presenta effetti simili sul calcio anche nei neuroni del LDT. Infatti la sua applicazione induce una variazione di DF/F del $18,8 \pm 3\%$ nella maggior parte dei neuroni di questo nucleo (88,9%; n = 16/18; Fig. 22: A1, 5). Anche in questo nucleo gli effetti sul Ca^{2+} prodotti dal NPS non sono risultati ripetibili (DF/F della prima applicazione: $18,5 \pm 2,4\%$; DF/F della seconda applicazione: $7,4 \pm 1,9\%$; n = 12; p < 0,01; test accoppiato del T di Student). La TTX non è in grado di modificare il grado di variazione di DF/F ($13,6 \pm 1,8\%$ DF/F; p = 0,1128; test di Mann-Whitney; Fig. 22: A2, 5) né la percentuale di risposte indotte dal NPS rispetto alle condizioni di controllo (85,7%; n = 12/14; p = 0,6; test esatto di Fisher).

Procedendo come per il DR, l'applicazione del NPS in una soluzione di $LowCa^{2+}$ ACSF induce anche in questo caso una diminuzione significativa della variazione del DF/F rispetto alle condizioni di base ($8,9 \pm 1,7\%$ DF/F; p < 0,01; test di Mann-Whitney; Fig. 22: A3, 5). Come nel DR, la condizione di bassa $[Ca^{2+}]$ extracellulare non ha effetto sulla popolazione di neuroni responsivi al NPS (88,9%; n = 16/18; p = 0,5; test esatto di Fisher).

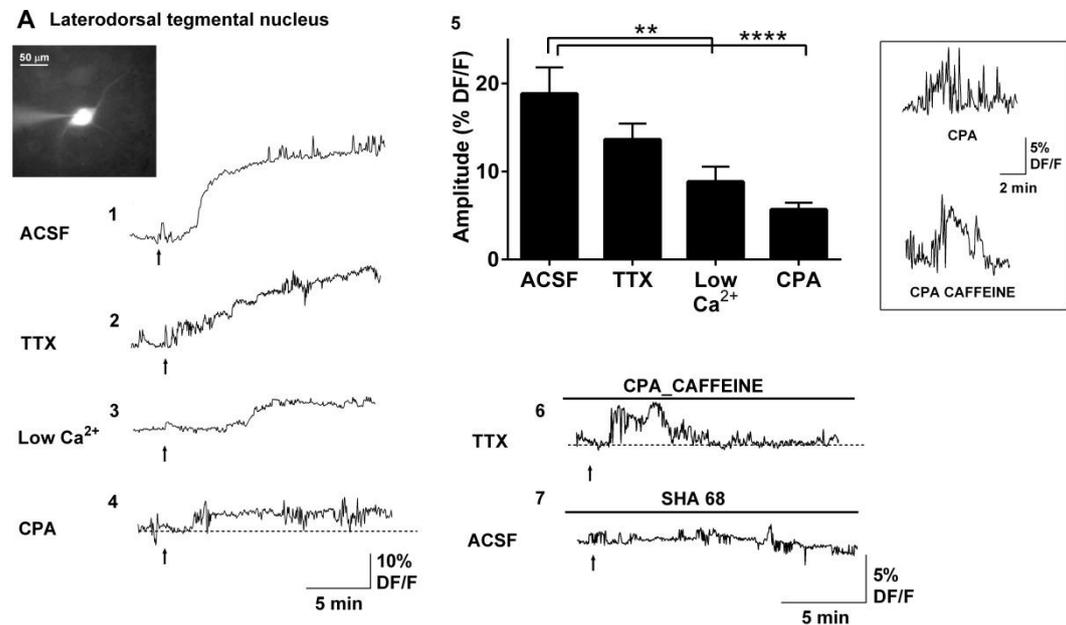
La deplezione del Ca^{2+} dai siti di stoccaggio sensibili all' IP_3 risulta in una variazione molto piccola del DF/F ($5,7 \pm 0,8\%$ DF/F; p < 0,0001; test di Mann-Whitney; Fig. 22: A4, 5) senza però indurre significative variazioni sul numero di

cellule coinvolte nella risposta, quando paragonata alle condizioni di assenza di CPA (81,8%; n = 9/11; p = 0,49; test esatto di Fisher).

Il NPS applicato in assenza di Ca^{2+} dal reticolo endoplasmatico e dalle riserve dipendenti dalla Ry, se da un lato è in grado di attivare un numero di cellule simile alle condizioni di controllo (66,7% n = 4/6; p = 0,25; test esatto di Fisher), dall'altro ripropone nuovamente un effetto di aumento transitorio di Ca^{2+} di $6,2 \pm 1,3\%$ di DF/F, non paragonabile per cinetica all'effetto ottenuto in condizioni di normale ACSF o in tutte le altre condizioni in cui non è stato condotto lo svuotamento delle riserve di Ca^{2+} dipendenti dalla Ry (Fig. 22: A6).

Per concludere lo studio sulla specificità di azione del NPS sui neuroni del LDT, questo è stato applicato in presenza dell'antagonista selettivo del proprio recettore SHA 68 e, come ci si aspettava, non è stato rilevato alcun aumento del Ca^{2+} cellulare (n = 3/3; p < 0,01; test esatto di Fisher; Fig. 22: A7), rinforzando le evidenze di un'azione specifica del NPS sul recettore NPSR.

Figura 22



Il NPS provoca un aumento del Ca^{2+} citosolico dei neuroni del del LDT. Immagine fluorescente di un neurone dell'LDT (A; lunghezza d'onda di 380 nm; ingrandimento 40×; scala di 50 μm), contenente l'indicatore di Ca^{2+} bis-Fura 2, diffuso direttamente dal capillare durante la registrazione. Le alterazioni delle proprietà spettroscopiche del bis-Fura 2 a seguito del legame

con il Ca^{2+} liberato dal NPS, sono rivelate come variazioni raziometriche della fluorescenza ($DF = F_{340}/F_{380}$). I dati sono riportati come percentuale della variazione relativa della fluorescenza (% DF/F), le cui inflessioni positive indicano un aumento del Ca^{2+} citosolico (A1). Anche in LDT gli aumenti di fluorescenza indotti dal NPS sono si mantengono simili al controllo anche in presenza di TTX (A2). Tuttavia, gli aumenti di DF/F sono minori in $LowCa^{2+}$ (A3) e ulteriormente ridotti in presenza di CPA (A4), indicando che gli aumenti di Ca^{2+} avvengono attraverso le membrane extra ed intracellulari senza la mediazione di potenziali d'azione. Gli istogrammi della variazione di DF/F indotta dal NPS in presenza di TTX e della $LowCa^{2+}$ ACSF mostrano gli effetti del peptide sulle popolazioni neuronali del LDT (A5). Anche in questo nucleo le cinetiche di risposta al NPS vengono alterate in presenza di CPA e caffeina come mostrato in una traccia di DF/F registrata da una cellula del LDT in cui si evince che la variazione massima di fluorescenza ha latenza e durata minori rispetto alle risposta di Ca^{2+} ottenute nelle altre condizioni sperimentali (A6). Le deplezioni del Ca^{2+} intracellulare dalle riserve dipendenti da IP_3 e Ry mediante CPA e caffeina sono mostrate nel pannello inserito a dx, in cui è evidente che questi composti provocano un aumento di DF/F . Le risposte del Ca^{2+} al NPS sono abolite in presenza dell'antagonista del NPSR (A7).

Il NPS influenza la frequenza della scarica dei potenziali d'azione dei neuroni del DR e del LDT

Il NPS induce alterazioni delle correnti di membrana e degli eventi sinaptici sia nei neuroni del DR sia del LDT. Per questo motivo ci si è chiesto se esso fosse anche in grado di alterare la frequenza di scarica dei potenziali d'azione di queste cellule. Per verificare tale ipotesi i neuroni sono registrati in modalità current clamp, mantenendoli ad un potenziale sufficientemente positivo (-45 mV) tale da indurre treni di potenziali d'azione.

Nella maggior parte delle cellule del DR (72,7%; n = 8/11), l'applicazione del NPS altera la frequenza di scarica di potenziali d'azione. Nel 62,5% delle cellule attivate, il NPS è in grado di ridurre tale frequenza di scarica del 10,5% (Ctrl: $4,1 \pm 0,1$ Hz; NPS: $3,7 \pm 0,1$ Hz; n = 5/8; $p < 0,0001$; test di Mann-Whitney; Fig. 23: A1, 2, C1). Nel rimanente 37,5% dei neuroni il NPS aumenta la frequenza di scarica dei potenziali d'azione del 23,2% (Ctrl: $6,9 \pm 0,2$ Hz; NPS: $8,5 \pm 0,1$ Hz; n = 3/8; $p < 0,0001$; test di Mann-Whitney; Fig. 23: A3, 4, C1).

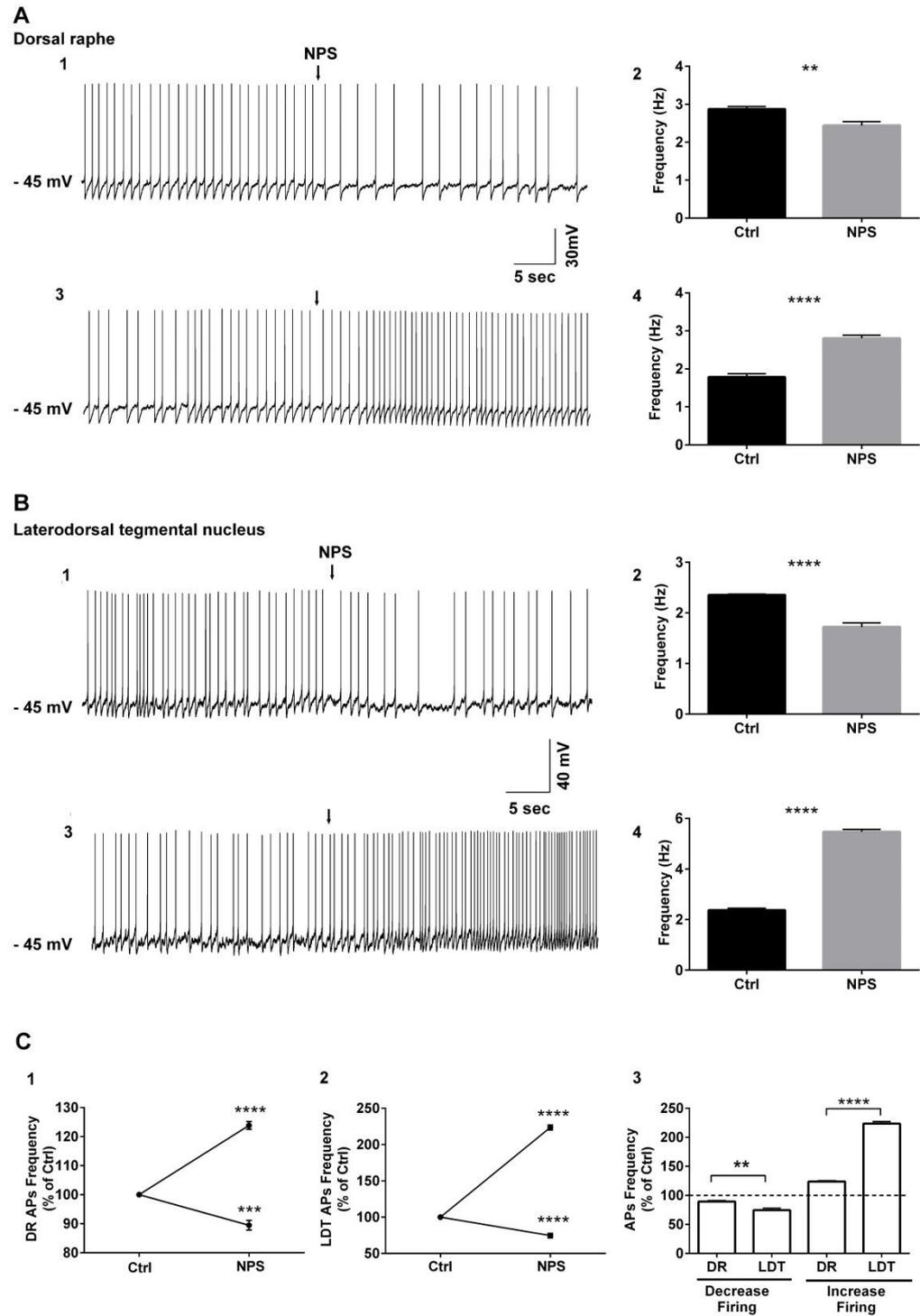
Il NPS è in grado di promuovere simili effetti anche nelle cellule del LDT, sortendo un effetto significativo sulle scariche dei potenziali d'azione nella maggioranza dei neuroni di questo nucleo (76,9%; n = 10/13). Nel 60% dei neuroni attivati il NPS risulta diminuire la frequenza dei potenziali d'azione del 26,9% (Ctrl: $2,6 \pm 0,1$ Hz; NPS: $1,9 \pm 0,1$ Hz; n = 6/10; $p < 0,0001$; test di Mann-

Whitney; Fig. 23: B1, 2, C2). Al contrario, invece, nel restante 40% il NPS aumenta in maniera significativa la frequenza dei potenziali d'azione con una quota di scarica maggiorata del 119,4% rispetto al controllo (Ctrl: $3,6 \pm 0,1$ Hz; NPS: $7,9 \pm 0,3$ Hz; $n=4/10$; $p < 0,0001$; test di Mann-Whitney; Fig. 23: B3, 4, C2).

In maniera simile a quanto osservato per le correnti di membrana e per gli eventi sinaptici, il NPS è in grado di generare un duplice risposta significativa per entrambe le polarità delle risposte riguardanti i potenziali d'azione, sia nel DR che nel LDT. Tra i due nuclei non si evidenziano differenze importanti tra le proporzioni delle cellule che rispondono al NPS ($p = 0,6$; test esatto di Fisher) né tra le distribuzioni della risposta (decremento: $p = 0,6$; incremento: $p = 0,7$; test esatto di Fisher). Si registra invece una differenza significativa tra i due nuclei riguardo il grado di aumento e diminuzione dell'attività di scarica dei AP. In entrambi i casi infatti, in tutte quelle cellule in cui il NPS è in grado di modulare la frequenza di AP, si evidenziano risposte significativamente più intense nel LDT rispetto al DR (decremento: $p < 0,01$; incremento: $p < 0,0001$; test disaccoppiato del T di Student; Fig. 23: C3).

Considerando questi dati nel loro insieme si evidenzia come il NPS sia efficace nello svolgere un'azione modulatoria sulle cellule del DR e del LDT, in grado di alterare la frequenza di scarica dei loro potenziali d'azione, effetto che *in vivo* può modificare l'output di questi nuclei verso le loro strutture target ed essere responsabile dei macroscopici effetti di modulazione del NPS sugli aspetti comportamentali.

Figura 23



Il NPS induce variazioni nella frequenza delle scariche di AP nella maggioranza dei neuroni del DR e del LDT. (A1, A3, B1, B3) le registrazioni svolte in modalità current-clamp mostrano 4 neuroni rappresentativi (2 del DR e 2 del LDT) di questo studio, mantenuti ad un potenziale di -

45mV sufficiente ad indurre AP. In queste tracce si possono notare: la diminuzione delle scariche di AP in uno dei due neuroni del DR (A1) e in uno dei due neuroni del LDT (A2) a seguito del NPS; l'aumento delle scariche di AP in uno dei due neuroni del DR (A3) e in uno dei due neuroni del LDT (A3) a seguito del NPS. Le variazioni nelle scariche indotte dal NPS risultano significative, come mostrato negli istogrammi che riportano le frequenze dei AP delle 4 cellule in condizioni di controllo e dopo NPS (A2, A4, B2 e B4). (C) plot che accoppia eventi riguardanti i dati sui AP nelle popolazioni di DR (1) e LDT (2) illustrando le variazioni delle loro frequenze di scarica dei AP, riportando i valori percentualizzati degli aumenti o delle diminuzioni di queste ultime indotte dal NPS. (C3) istogrammi riassuntivi degli effetti del NPS sulle frequenze di scarica che mostrano un effetto significativo nella differenza di aumento o diminuzione delle frequenze di AP tra i due nuclei indicando effetti di maggiore magnitudo nel LDT rispetto al nucleo del DR.

DISCUSSIONE

Poiché test comportamentali mostrano che il NPS ha effetti ansiolitici ed è in grado di aumentare lo stato di arousal, in questo studio è stata presa in considerazione l'ipotesi che questo peptide possa avere effetti modulatori sull'attività funzionale dei neuroni del DR e del LDT coinvolti nella mediazione di ansia e arousal. La veridicità di tale ipotesi è supportata dai dati presentati, che mostrano che l'applicazione di NPS in fettine di cervello murino induce modificazioni cellulari mediate a livello pre- e post-sinaptico dei neuroni di DR e LDT. Considerati nel loro insieme, questi dati rappresentano la prima evidenza che il sistema del NPS/NPSR può essere attivato in questi due nuclei del tronco encefalico e supportano l'interessante possibilità che tale sistema giochi un ruolo di mediazione nell'ansia e nella regolazione degli stati di arousal.

Gli effetti del NPS nel DR e nel LDT sono mediati dal NPSR e richiedono il calcio dei depositi intracellulari

Mediante studi di ibridazione *in situ* e studi immunohistochimici è stato possibile rivelare la presenza del recettore accoppiato a proteina G per il NPS in vari gruppi neuronali del SNC di roditori nonché nell'umano (Adori *et al*, 2015; Leonard and Ring, 2011; Xu *et al*, 2007). Comunque, la presenza di tale NPSR nel DR e nel LDT non è mai stata evidenziata. Nel presente studio, utilizzando la tecnica del calcium-imaging a riempimento di massa, è stato possibile rivelare l'aumento del Ca^{2+} intracellulare nelle cellule del DR e del LDT a in seguito all'applicazione di NPS, effetto questo che viene completamente prevenuto in presenza di SHA 68 (Okamura *et al*, 2008, 2011; Patnaik *et al*, 2013; Ruzza *et al*, 2012; Thorsell *et al*, 2013; Trapella *et al*, 2011), antagonista competitivo per il NPSR, dimostrando così per la prima volta la presenza di tale recettore nei neuroni del DR e LDT. In colture cellulari che esprimono NPSR è stato osservato che il legame ad alta affinità (≈ 1 nM) con il suo agonista NPS promuove l'attivazione delle subunità Gs e Gq, le quali stimolano adenilato ciclastasi (AC) e fosfolipasi C (PLC)

producendo l'accumulo di cAMP e aumento del Ca^{2+} intracellulare (Erdmann *et al*, 2015; Reinscheid *et al*, 2005). Nei nuclei del DR e LDT gli effetti riguardanti il Ca^{2+} intracellulare non sono risultati sensibili al blocco dei potenziali d'azione: gli aumenti del Ca^{2+} intracellulare non sono diversi in presenza di TTX; questa caratteristica è stata descritta precedentemente in neuroni ippocampali in coltura (Erdmann *et al*, 2015). La capacità del NPS di indurre tali aumenti della $[\text{Ca}^{2+}]$ nei neuroni del DR e LDT è stata confermata usando anche la tecnica del calcium-imaging in cellule singole, anche se in questa configurazione le risposte non risultano ripetibili dopo una seconda applicazione del peptide probabilmente a causa della dialisi di molecole segnale intracellulari, fondamentali per la risposta NPS-dipendente. La specificità di azione del NPS sul NPSR è ulteriormente confermata dall'assenza di aumento di $[\text{Ca}^{2+}]$ intracellulare in presenza dell'antagonista SHA 68. Inoltre la comparazione delle risposte di calcium-imaging indotte dal NPS tra popolazioni neuronali in assenza e in presenza di TTX non evidenzia una differenza statistica in entrambi i nuclei, da cui si può evincere che l'aumento di Ca^{2+} intracellulare sia conseguenza diretta della stimolazione del NPSR allocato nei terminali sinaptici o sulle membrane post-sinaptiche.

La deplezione del Ca^{2+} dalle riserve intracellulari mediata dal CPA (che induce lo svuotamento del Ca^{2+} dal ER per inibizione della pompa SERCA), e della caffeina (che induce la rimozione del Ca^{2+} dai depositi intracellulari sensibili al recettore per la Ry) (Dettbarn and Palade, 1998; Kong *et al*, 2008; Plenge-Tellechea *et al*, 1997) riduce l'ampiezza delle risposte del Ca^{2+} indotte dal NPS in entrambi i nuclei. Dunque è possibile che ci sia un percorso di trasduzione intracellulare comune al NPS in questi due nuclei del tronco encefalico, che coinvolge le riserve di Ca^{2+} sensibili all' IP_3 e alla Ry. I recettori per IP_3 e quelli per la Ry controllano riserve di Ca^{2+} intracellulari separate e la loro attivazione avviene per via di meccanismi diversi. I recettori per l' IP_3 dipendono appunto dall' IP_3 per la loro apertura, mentre invece i recettori per la Ry possono essere attivati da alte $[\text{Ca}^{2+}]$, mediante un processo conosciuto come CICR. CICR è legato all'attivazione del

fenomeno definito come “*store-operated calcium entry*” (SOCE) che include l’attivazione di canali del Ca^{2+} di membrana chiamati “*calcium release-activated channels*” (CRAC) (reviews: Endo, 2007; Putney, 1986; Verkhratsky and Shmigol, 1996). Nelle risposte indotte dal NPS nelle cellule del DR e del LDT un ruolo nel flusso di Ca^{2+} attraverso la membrana plasmatica è evidenziato dagli esperimenti eseguiti in LowCa^{2+} ACSF, nei quali l’aumento di Ca^{2+} intracellulare dopo applicazione di NPS risulta notevolmente ridotto. In colture neuronali è stato dimostrato che l’attivazione del NPSR coinvolge anche un flusso di Ca^{2+} in ingresso mediato da CRAC, anche in questo caso inibito ma non bloccato da una bassa concentrazione di Ca^{2+} extracellulare in maniera simile a quanto osservato nel presente studio (Erdmann *et al*, 2015). Nell’insieme, questi dati supportano l’idea che l’attivazione del NPSR nei neuroni del DR e del LDT induca un rilascio di Ca^{2+} intracellulare mediato dai recettori del IP_3 e della Ry, che induce a sua volta un flusso di Ca^{2+} attraverso la membrana plasmatica. Questa interpretazione è compatibile con il fatto che non si osserva una eliminazione completa della risposta del Ca^{2+} indotta dal NPS in presenza di CPA e caffeina. Tale residuo di risposta può dipendere dal fatto che il NPS può reclutare ed attivare altre riserve di Ca^{2+} intracellulare non sensibili al CPA o alla caffeina, come ad esempio quelli attivati dal “Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate” (NAADP). È stato infatti dimostrato che le riserve di Ca^{2+} intracellulare attivate da NAADP sono localizzate nei lisosomi situati in giustapposizione con il ER/SR; la loro attivazione può evocare il rilascio di Ca^{2+} che agisce come stimolo trigger per il rilascio di ulteriore Ca^{2+} dalle riserve sensibili all’ IP_3 o alla Ry (Cancela *et al*, 1999, 2002; Chameau *et al*, 2001; Churchill and Galione, 2001; Galione, 2015; Genazzani and Galione, 1996; Lee and Aarhus, 2000; Pandey *et al*, 2009). In esperimenti condotti nel bulbo del ratto è stato rilevato che le riserve di Ca^{2+} sensibili al NAADP, strettamente associate a quelle sensibili alla Ry, sono in grado di mediare segnali di Ca^{2+} ed attivare NSCC con conseguente depolarizzazione della membrana (Brailoiu *et al*, 2009). Anche se non ci sono studi che hanno esaminato la presenza di siti di legame del NAADP nel DR o nel

LDT, questi depositi sono largamente presenti nel SNC, in particolare nelle regioni talamiche e nelle aree comprese tra il bulbo e il mesencefalo (Patel *et al.*, 2000). Il potenziale coinvolgimento delle riserve di Ca^{2+} sensibili al NAADP nelle risposte del Ca^{2+} a seguito dell'applicazione del NPS rimane un tema per studi futuri.

L'attivazione del NPSR induce una corrente del potassio e/o di un NSCC.

I risultati ottenuti in singoli neuroni dimostrano un forte effetto del NPS sulle cellule di DR e LDT, che mostrano una reazione al peptide all'interno di due pattern di risposta differenti, ossia correnti inward e outward. In maniera simile a quanto osservato nei singoli neuroni testati mediante la tecnica del calcium-imaging, una seconda applicazione del peptide risulta debolmente efficace nell'indurre una seconda risposta di corrente; per questo motivo le analisi delle correnti di membrana sono state condotte in una popolazione di neuroni. È stato interessante notare che in entrambi i nuclei le risposte di membrana dei neuroni, a seguito di interazione con NPS, risultano persistenti in presenza di TTX o in ACSF a basso contenuto di Ca^{2+} (condizione che previene la fusione delle vescicole con i terminali presinaptici e per questo riduce la quantità di neurotrasmettitore), suggerendo una consistente presenza post-sinaptica del recettore del NPS in quest'area. La persistenza dell'attività del NPS in presenza di TTX e la sua singolare capacità di indurre un doppio effetto sulle membrane neuronali è stato precedentemente osservato da Yoshida e collaboratori, che hanno descritto la capacità di questo peptide di indurre depolarizzazioni o iperpolarizzazioni in neuroni ipotalamici ventromediali di ratto, con un progressivo calo dell'efficacia nello sviluppare risposte reiterando l'applicazione del NPS (Yoshida *et al.*, 2010). Anche se il blocco dei canali del Na^+ a voltaggio dipendenti non influisce con la probabilità del NPS di attivare il proprio recettore, la presenza di TTX o LowCa^{2+} ACSF rivelano una differenza nella distribuzione dei recettori all'interno dei nuclei del DR e LDT. La riduzione dell'ampiezza delle correnti nei neuroni del LDT, suggerisce la possibilità di un'attivazione

presinaptica distinta dai terminali sinaptici, che molto probabilmente contribuisce alla piena azione del NPS nei neuroni del LDT. Al di là di questa evidenza, il NPS sembra avere simili azioni nei neuroni di DR e nel LDT. In entrambi i nuclei, le risposte di membrana al NPS, evidenziano caratteristiche tipiche dell'attivazione di recettori accoppiati a proteine G, i quali, una volta attivati, sono in grado di dare il via a cascate intracellulari che coinvolgono diversi messaggeri secondari in grado di alterare l'eccitabilità cellulare anche per diversi minuti. Come già discusso, i recettori del NPS sono GCPR una volta attivati, stimolano i percorsi di attivazione delle varie isoforme delle PLC e AC (Reinscheid *et al*, 2005; Xu *et al*, 2004). Le prime promuovono l'aumento intracellulare di Ca^{2+} e determinano l'attivazione delle proteine chinasi C (PKC), mentre invece le seconde sono responsabili dell'aumento intracellulare di cAMP. Ca^{2+} e cAMP sono secondi messaggeri ubiquitari che controllano l'omeostasi cellulare in maniera contigua e il più delle volte dipendente dal Ca^{2+} . Infatti è risaputo che lo stesso Ca^{2+} è in grado di agire come messaggero da solo e può giocare un ruolo chiave nella regolazione dei trasduttori enzimatici intracellulari come le AC o le PKC. Assieme alla calmodulina (CaM), il Ca^{2+} è in grado di modulare in maniera diretta le diverse isoforme delle AC oppure può svolgere effetti modulatori su queste ultime tramite CaM chinasi, calcineurina e PKC, unità tutte fortemente attivate da un aumento del Ca^{2+} intracellulare (review: Sadana and Dessauer, 2009). Il Ca^{2+} citosolico è anche in grado di attivare la maggior parte delle PKC, le quali una volta rese attive hanno bisogno di DAG, prodotto dell'attività delle PLC assieme al IP_3 , per poter cambiare la conformazione della struttura molecolare e poter svolgere le loro funzioni fosforilatrici (Huang, 1989). Diversi sono i canali di membrana che risultano attivati e/o bilanciati sia dalle PKC sia dalle AC le cui attività, come già riportato, sono fortemente modulate dal Ca^{2+} (Baraban *et al*, 1985; Beaumont and Zucker, 2000; Li *et al*, 1992; Numann *et al*, 1991) e sono direttamente attivate dalle GCPR senza coinvolgere fattori citoplasmatici idrofili (Huang *et al*, 1995).

Anche se non è stato possibile rilevare l'esatto meccanismo di trasduzione del segnale a seguito dell'interazione del NPS con il proprio recettore, i risultati fin qui ottenuti mostrano una riduzione sostanziale delle correnti di membrana in presenza di CPA e una loro completa prevenzione dopo l'eliminazione del Ca^{2+} dai principali siti intracellulari, quali quelli dipendenti da IP_3 e Ry, evidenza questa che suggerisce fortemente una dipendenza della risposta neuronale al NPS dal Ca^{2+} intracellulare. Per questo motivo, il Ca^{2+} può essere considerato sia come un segnale trigger, sia come un mediatore degli elementi di trasduzione attivati dal recettore del NPS in entrambe le popolazioni neuronali del DR e del LDT esaminate in questo studio.

Sulla base dell'osservazione e dell'interpretazione dei dati fin qui raccolti, il Ca^{2+} extracellulare sembra essere meno influente nelle risposte di membrana dei neuroni del DR e LDT a seguito dell'attivazione del recettore del NPS. Infatti l'applicazione del NPS in presenza di LowCa^{2+} ACSF induce nel DR correnti di membrana simili a quelle osservate in condizioni di controllo, mentre nel LDT tali correnti non sono significativamente diverse da quelle osservate in presenza di TTX, il che può essere interpretato ancora una volta come l'effetto di una diversa distribuzione dei recettori a livello di questo nucleo. Inoltre tali evidenze possono essere completate osservando che il meccanismo SOCE potrebbe non essere il principale meccanismo responsabile dell'apertura dei canali di membrana. Infatti le analisi delle curve IV non hanno rivelato una conduttanza del Ca^{2+} durante lo sviluppo delle correnti a seguito dell'applicazione del NPS né nei neuroni del DR né in quelli del LDT.

Diversamente, le relazioni IV costruite in presenza di TTX durante la generazione delle correnti outward a seguito dell'attivazione dei NPSR, sia nei neuroni del DR che in quelli del LDT, hanno rivelato una pura conduttanza del K^+ dal momento che queste correnti positive non erano precedute da inflessioni negative delle correnti di membrana. In questi neuroni, la persistenza delle correnti outward in presenza di TTX suggerisce che i canali del K^+ voltaggio dipendenti non sono attivati dalla stimolazione del recettore per il NPS. Inoltre, questo tipo di correnti

non è affetto nemmeno dall'isolamento neuronale ottenuto mediante la LowCa²⁺ACSF, rafforzando ulteriormente le basi di esclusione riguardo il possibile coinvolgimento di conduttanze voltaggio dipendenti. Anche altri neuropeptidi sono in grado di modulare le correnti di K⁺ in diverse regioni cerebrali. Il neuropeptide Y ad esempio è in grado di modulare le correnti K⁺ in neuroni ippocampali, talamici e in cellule del complesso basale ventrale (Paredes *et al*, 2003; Sun *et al*, 2001). Anche galanina e leptina sono rispettivamente in grado di indurre correnti outward nel LC e ippocampo (Pieribone *et al*, 1995; Shanley *et al*, 2002) mentre il peptide GRP agisce modulando l'attività neuronale nel nucleo suprachiasmatico mediante l'incremento di una conduttanza del K⁺ nei suoi neuroni (Gamble *et al*, 2011). Oltre che a condividere attività cellulari comuni, la famiglia dei neuropeptidi presenta singolari meccanismi d'azione e non raramente i membri di questa famiglia presentano più di un meccanismo d'azione (Brown *et al*, 2002; Kohlmeier *et al*, 2008; Liu *et al*, 2002). Il NPS non è da meno, visto che si è dimostrato in grado di agire modulando due tipi di correnti differenti all'interno degli stessi nuclei. Infatti, nei neuroni del LDT, mentre l'aumento della conduttanza al K⁺ è responsabile delle correnti outward, le relazioni IV costruite in TTX durante lo svolgimento delle correnti inward rivelano un potenziale di equilibrio che si attesta attorno a -30 mV. Questo potenziale è tipicamente associato ad una conduttanza causata dall'apertura di un NSCC (Hiruma and Bourque, 1995; Kirkpatrick and Bourque, 1995). In maniera simile, l'oressina, un altro peptide della famiglia dei neuropeptidi, si è dimostrata in grado di attivare una conduttanza analoga a seguito della sua applicazione in popolazioni neuronali come quelle del nucleo del tratto solitario del bulbo (Yang and Ferguson, 2003), DR ed LDT (Kohlmeier *et al*, 2008). Anche Yoshida e colleghi (Yoshida *et al*, 2010) hanno descritto un coinvolgimento di una componente di conduttanza NSCC come causa degli effetti depolarizzanti del NPS osservati nei neuroni ipotalamici di ratto. Inoltre, la capacità di sviluppare più di un, e spesso concomitante, meccanismo d'azione da parte dei neuropeptidi è riscontrata anche per il CRF che può svolgere funzioni di

peptide, ormone e neurotrasmettitore (Jüngling *et al*, 2012). In un lavoro del 2012 infatti, Jungling e colleghi hanno osservato come i neuroni del LC che esprimono NPS vengono attivati dal CRF, sviluppando un effetto di modulazione sia nei confronti di una conduttanza al K^+ sia di una conduttanza catione-aspecifica. È pertanto interessante notare che nei neuroni del DR le curve IV hanno evidenziato un potenziale di equilibrio misto di circa -50 mV associato alle correnti inward. Tale potenziale è vicino a quello di una conduttanza dovuta al coinvolgimento di un NSCC con la concomitante presenza di una componente opposta. Nel cercare di distinguere le due componenti è stato aggiunto TEA alla soluzione di ACSF per bloccare la conduttanza del K^+ relativa all'apertura di canali K_v , i quali sono presenti nei nuclei del tronco encefalico (Penington and Kelly, 1993). A seguito del blocco dei canali K_v , il potenziale di equilibrio delle risposte al NPS rimane invariato (dati non mostrati) ma cade drasticamente a -30 mV quando l'ACSF viene arricchito di K^+ in maniera tale da ottenere il blocco non selettivo di tutti i canali del K^+ , svelando nuovamente un potenziale di equilibrio proprio di una conduttanza di NSCC. È noto che TTX e TEA non abbiano effetto sui NSCC attivati dal Ca^{2+} (Adams and Levitan, 1985; Bevan *et al*, 1984), è perciò possibile che entrambe le conduttanze, sia quella NSCC che quella al K^+ possano contribuire al bilanciamento delle correnti inward promosse dal NPS nei neuroni del DR. Come già riportato, Jüngling e collaboratori hanno osservato un incremento in conduttanza cationica non specifica a seguito dell'attivazione del sistema del NPS, precisando che la conduttanza aspecifica è diversa dalla conduttanza I_h legata al canale cationico attivato da iperpolarizzazione (HCN) (Jüngling *et al*, 2012), mentre dall'altro lato Zhang e colleghi, riportano la capacità del NPS di modulare le correnti I_h nei neuroni di amigdala di ratto a seguito dell'inibizione del canale HCN (Zhang *et al*, 2016). Osservando le correnti degli esperimenti di voltage clamp condotti nei neuroni di DR e LDT per la costruzione delle relazioni IV, si nota che una consistente popolazione di questi presentano le caratteristiche correnti inward di tipo I_h voltaggi negativi (Biel *et al*, 2009; Li *et al*, 2001). L'analisi delle correnti

dipendenti da conduttanza I_h ha rivelato che il NPS non è in grado di cambiare la loro ampiezza nei neuroni del DR o del LDT (osservazioni personali). Sulla base di queste evidenze si può concludere che nelle condizioni sperimentali in cui è stato condotto questo studio, i dati supportano fortemente la possibilità di un'attivazione di un NSCC, presumibilmente diverso dal canale HCN, responsabile della manifestazione delle correnti inward indotte da NPS nei neuroni del LDT e del DR. In quest'ultimo, l'aumento di conduttanza di un NSCC risulta accoppiato ad una conduttanza al K^+ mentre un aumento della conduttanza pura di questo catione è responsabile delle correnti outward osservate nei neuroni di questi due nuclei del tronco encefalico a seguito della stimolazione dei NPSR mediante il loro agonista endogeno. Ulteriori studi saranno comunque necessari per chiarire la natura dei canali del K^+ e dell'apparente coinvolgimento di un NSCC, che per la prima volta sono stati osservati in attività dopo stimolazione dei recettori del NPS nei neuroni dei nuclei del DR e del LDT.

NPS e EPSCs/IPSCs

L'applicazione del NPS nei nuclei del DR e del LDT induce una variazione degli eventi spontanei delle membrane neuronali. In altri studi condotti in amigdala, l'esame degli effetti prodotti dalla stimolazione diretta dei NPSR rivela una variazione di EPSC e IPSC e di mEPSC e mIPSC, sia in frequenza che in ampiezza (Jüngling *et al*, 2008; Meis *et al*, 2008, 2011; Zhang *et al*, 2016). I risultati del nostro studio sono in accordo con queste osservazioni precedenti, in quanto il NPS fa aumentare la probabilità del rilascio del neurotrasmettitore sia a livello delle sinapsi glutammatergiche sia in quelle GABAergiche. In maniera più specifica, nei neuroni del DR il NPS fa aumentare in maniera consistente la frequenza delle EPSC e delle IPSC; l'osservazione più importante è che è in grado di aumentare anche le mEPSC e le mIPSC registrate in presenza di TTX, modulando in alcuni casi anche l'ampiezza di tutti questi eventi. La persistenza del NPS nel modulare l'attività spontanea cellulare anche in assenza di potenziali d'azione indica un effetto locale del peptide, a livello del "cliff" presinaptico.

Nel LDT, le EPSC intensificano in maniera considerevole la loro frequenza a seguito dell'applicazione locale di NPS. In alcuni casi questi aumenti di frequenza risultano talmente intensi da incidere anche sull'ampiezza degli eventi che risultano ridotti, probabilmente a seguito di una refrattarietà momentanea del potenziale di membrana. In altri casi invece l'aumento di frequenza è associato ad un aumento di ampiezza degli eventi spontanei. È da notare che in presenza di TTX l'ampiezza delle mEPSC risulta solamente aumentare a seguito dell'intensificazione della frequenza dopo NPS. Questo marcante doppio effetto del NPS sull'ampiezza delle EPSC, e la mancanza della diminuzione di quest'ultima in presenza di TTX, può essere dovuto alla presenza di una sottopopolazione di neuroni in LDT in cui il contributo presinaptico per l'attivazione dei canali del glutammato mediata dal NPS è fortemente rilevante rispetto ad altre popolazioni neuronali di questo nucleo, oppure essere il risultato di una differente innervazione glutammatergica all'interno del nucleo stesso. Diversamente da quanto accade per le sinapsi eccitatorie, il NPS sembra agire in maniera più consistente per quanto riguarda le sinapsi inibitorie, in maniera analoga a quanto osservato nel DR. Infatti, nei neuroni del LDT sia le IPSC che le mIPSC vengono aumentate sia in numero sia in ampiezza dal NPS, confermando la capacità di questo peptide di agire a livello presinaptico locale e modulare il rilascio di GABA dalle sinapsi inibitorie.

Nel loro insieme, queste considerazioni rafforzano l'ipotesi che il NPS possa essere parte di un sistema in grado di formare un circuito modulatorio tra regioni cerebrali in grado di fornire un ulteriore grado di controllo delle trasmissioni neuronali. Infatti le variazioni quantiche del rilascio dei neurotrasmettitori presinaptici, che coinvolgono sia i maggiori circuiti eccitatori sia quelli inibitori, potrebbero giocare un ruolo fondamentale nel bilanciamento del ruolo funzionale di ciascun nucleo responsivo al NPS, e concertare le loro fibre efferenti con una variazione globale dei loro output diretti verso altre regioni cerebrali.

NPS e potenziali d'azione

Funzionalmente l'attivazione dei recettori del NPS nei neuroni del DR e del LDT risulta in una variazione della frequenza di scarica di potenziali d'azione, come già osservato in altri distretti neuronali come amigdala e LC. I dati ottenuti dal presente studio evidenziano un doppio effetto sia nei neuroni del DR sia in quelli del LDT. La diminuzione della frequenza di scarica di potenziali d'azione è simile in entrambi i nuclei, mentre nei neuroni in cui il NPS promuove un aumento di frequenza di potenziali d'azione l'entità dell'aumento è molto maggiore nei neuroni del LDT. Si può ipotizzare che la minore attivazione dei neuroni del DR possa dipendere dall'aumento della conduttanza al K^+ concomitante all'apertura di NSCC, con effetto contrastante rispetto alla depolarizzazione cellulare. Questa condizione di concomitanza non si verifica nei neuroni del LDT, in cui le due componenti di membrana sono ben risolte, evitando così la sovrapposizione delle due correnti. Un'altra interpretazione di questo fenomeno può basarsi sugli effetti che il NPS induce sul rilascio di neurotrasmettitore a livello presinaptico, che si attuano in concomitanza con le aperture dei canali del K^+ e dei NSCC. Anche se l'esatto meccanismo mediante il quale il NPS esercita il proprio effetto modulatorio nei confronti dei potenziali d'azione cellulari non è ancora noto, questi dati mostrano per la prima volta nel DR e nel LDT le evidenze della presenza di un sistema di modulazione NPS/NPSR-dipendente capace di alterare l'eccitabilità dei circuiti neuronali, con conseguenze che possono essere impattanti per la funzionalità neuronale di altre strutture cerebrali, ed essere perciò almeno in parte responsabili degli effetti che l'NPS ha sul comportamento. Poiché dal DR e dal LDT originano diverse fibre efferenti, la possibilità che il NPS/NPSR possa agire da sistema di regolazione della modulazione neuronale in questi nuclei è affascinante ed intrigante.

Significato

Poiché il NPS ha dimostrato di essere in grado di modificare l'eccitabilità delle cellule del DR e del LDT, impattando in maniera decisa sulla loro funzionalità

neuronale, di seguito vengono riportate alcune considerazioni in merito al ruolo che questo neuropeptide svolge a livello comportamentale.

Ad oggi si è a conoscenza del fatto che il sistema NPS/NPSR è coinvolto nella complessa architettura dei cicli fisiologici tra sonno e veglia nei roditori (Ahnaou and Drinkenburg, 2012; Oishi *et al*, 2014b). Tale sistema è altrettanto importante nell'uomo dove il polimorfismo di un singolo nucleotide (rs324981), che comporta la sostituzione di un singolo amminoacido a livello del recettore NPSR1 aumentandone la sensibilità al NPS di 10 volte, è associato ad un effetto macroscopico nel ciclo sonno veglia: l'anticipo dell'ora del riposo (Gottlieb *et al*, 2007) e la riduzione della durata del sonno e del riposo complessivo (Spada *et al*, 2014). Molti dei nuclei locati nella parte prossimale del tronco encefalico, che prendono parte al cosiddetto "*ascending reticular activating system*", fanno da mediatori tra proencefalo e i sistemi corticali che determinano comportamenti relativi alle fasi attive della veglia (Moruzzi and Magoun, 1995). Tra questi nuclei, il nucleo tegmentale peduncolopontino e il LDT forniscono la maggiore afferenza di fibre colinergiche eccitatorie al talamo (Hallanger and Wainer, 1988; Rye *et al*, 1987), principale interruttore tra lo stato di sonno a quello di veglia (Nauta, 1946; Swett and Hobson, 1968). Il talamo inoltre riceve anche altre innervazioni colinergiche associate a fibre di tipo GABAergiche dal prosencefalo basale, le quali contribuiscono al controllo del ciclo sonno-veglia (Lee *et al*, 2004; Xu *et al*, 2015). Sia il talamo che il prosencefalo basale ricevono afferenze serotoninergiche dal DR (Vertes, 1991) che, assieme ad altri nuclei cosiddetti monoamminergici, tende ad avere una frequenza di scarica maggiore durante gli stati di veglia (Fornal *et al*, 1985). In giustapposizione al talamo, l'ipotalamo laterale è composto da almeno tre sottotipi neuronali (LH) che svolgono due funzioni opposte per quanto riguarda il circuito di controllo sonno-veglia rendendo questo nucleo fondamentale per il mantenimento di uno dei due stati. Infatti, il LH è composto da un lato da neuroni contenenti oressina/ipocretina che sono attivi durante gli stati di veglia ed incrementano la frequenza di scarica dei neuroni del DR, i quali appunto hanno efferenze che raggiungono il talamo

rinforzando lo stato di veglia (Takahashi *et al*, 2005; Vertes and Crane, 1997). Dall'altro lato, questo sistema chiamato "arousal system", che si compone tra altri nuclei anche di fibre del LDT, del DR e di proiezioni oressinergiche del LH strettamente collegate tra loro, è inibito da neuroni stessi del LH che contengono l'ormone concentrante la melatonina, di gran lunga più attivi durante il sonno REM, e da neuroni GABAergici; si suppone che entrambi questi due gruppi neuronali inibiscano in maniera sinergica tutti quei nuclei monoamminergici "pro-arousal" come il DR (Boissard *et al*, 2003; Verret *et al*, 2003). Inoltre un altro fondamentale input inibitorio nei confronti dello stato di veglia è fornito dal nucleo preottico ventrolaterale (VLPO), che innerva i nuclei del talamo così come il DR (Lu *et al*, 2002; Sherin *et al*, 1996). Questi due sottosistemi di controllo del più grande e complesso sistema di arousal sono mutualmente inibitori uno dell'altro, in maniera tale da mantenere costante uno dei due stati ed evitare così continue fluttuazioni tra il sonno e la veglia (per una review: Saper *et al*, 2001). In base alla descrizione di questo sistema, una ulteriore spiegazione alla base degli effetti di aumento dello stato attivo di veglia da parte del NPS può essere trovato nell'effetto meccanicistico che questo peptide svolge a livello dei neuroni del DR e del LDT. Infatti l'aumento della scarica dei potenziali d'azione mediato dall'attivazione del recettore del NPS, che avviene nel 40% delle cellule di DR e LDT comprendenti anche neuroni serotonergici e colinergici come evidenziato dalle analisi immunostochimiche, può essere responsabile almeno in parte della disinibizione delle fibre colinergiche del LDT che assieme all'aumentato rilascio di serotonina dalle fibre del DR a livello dei nuclei del talamo contribuiscono ad attivare e mantenere l'interruttore del circuito sonno-veglia nello stato di veglia attiva.

La somministrazione del NPS *in vivo* si è dimostrata in grado di diminuire la paura nei roditori e di svolgere un effetto ansiolitico (Leonard *et al*, 2008; Lukas and Neumann, 2012; Pulga *et al*, 2012; Rizzi *et al*, 2008; Xu *et al*, 2004; Zoicas *et al*, 2016). Anche in questo caso vi può essere una connessione tra l'effetto cellulare del NPS osservato nel DR e nel LDT e gli effetti di modulazione di

questi stati dell'umore. Infatti il DR invia proiezioni serotoninergiche a tutte le strutture limbiche coinvolte nella modulazione della paura e dell'ansia (Vertes, 1991). Anche se ci sono risultati contrastanti per quanto riguarda la serotonina e le sue azioni ansiogene o ansiolitiche (Deakin and Graeff, 1991; Geller and Blum, 1970; Hodges *et al*, 1987; Kiser *et al*, 1980; Nogueira and Graeff, 1995; Tye *et al*, 1977), diversi studi hanno evidenziato un ruolo del DR in questo tipo di modulazione; in particolare, la sua attivazione è stata collegata a comportamenti ansiogeni, mentre una sua inibizione è stata associata all'inibizione di comportamenti tipici delle manifestazioni di panico (Pobbe and Zangrossi, 2005). Inoltre in uno studio recente è stato osservato che la stimolazione profonda del DR, che risulta in un blocco della depolarizzazione, induce l'attivazione di regioni del prosencefalo legate alla modulazione di ansia e panico riducendo entrambi (Wscieklica *et al*, 2017). I nostri risultati indicano che l'attivazione del NPSR non induce solo un aumento della frequenza dei potenziali d'azione, ma anche una diminuzione nel 60% delle cellule del DR. In questo tipo di modulazione dipolare sono coinvolti anche neuroni serotoninergici, come rivelato dalle analisi immunostochimiche. Perciò questa modulazione potrebbe essere responsabile di una diminuzione delle scariche di potenziali d'azione in una porzione di fibre che raggiungono il sistema limbico e in parte risultare nell'effetto ansiolitico svolto dal NPS.

Anche il sistema colinergico è implicato nella modulazione dei comportamenti depressivi e ansiosi e nei roditori: un alto tono colinergico è associato a depressione e ansia (Levin and Rodnitzky, 1976; Mineur *et al*, 2013; Overstreet, 1986), mentre un'attività anticolinergica induce effetti opposti (Rabenstein *et al*, 2006; Voleti *et al*, 2013). In particolare, l'attività colinergica del tronco encefalico modula in maniera diretta il rilascio della dopamina (DA) nel sistema mesolimbico (Forster and Blaha, 2000; Maskos, 2008), che a sua volta risulta in una modulazione dei comportamenti legati ad ansia (Forster and Blaha, 2000; Maskos, 2008; Overstreet, 1986). Lesioni prodotte a livello del LDT riducono l'efflusso di DA dall'area ventrale tegmentale (VTA) nel nucleus accumbens

(NAC) (Blaha *et al*, 1996), a livello del quale un eccesso dopaminergico si associa a comportamenti propri dei disordini depressivi maggiori, stress e comportamenti legati alla dipendenza da sostanze da abuso (Cao *et al*, 2010; Chaudhury *et al*, 2013; You *et al*, 2008; Zhou *et al*, 2007). Poiché l'attivazione del NPSR nei neuroni del LDT comporta un aumento e contemporaneamente una diminuzione dell'attività di scarica di potenziali d'azione rispettivamente del 40% e del 60%, è possibile ipotizzare che una parte dei neuroni colinergici, coinvolti in entrambi i profili di risposta come rivelato dai risultati immunostochimici, potrebbero influenzare le fibre dopaminergiche della VTA e conseguentemente prendere parte al processo ansiolitico concertato dall'attività della DA. Allo stesso tempo, tale modulazione colinergica potrebbe essere responsabile della ricomparsa dei comportamenti di ricerca di sostanze da abuso come spiacevole effetto collaterale mostrato dalla somministrazione del NPS in animali *in vivo* (Schmoutz *et al*, 2012; Ubaldi *et al*, 2016).

In conclusione, poiché che i nuclei del DR e del LDT sono fortemente coinvolti nel controllare ed influenzare una molteplicità di funzioni come arousal, ciclo sonno-veglia, umore e ansia, la possibilità che il sistema NPS/NPSR in questi due nuclei del tronco encefalico possa impattare su tutti questi aspetti dovrebbe essere presa in seria considerazione per lo sviluppo di molecole in grado di agire selettivamente su tale sistema di modulazione cellulare e conseguentemente influenzare gli aspetti comportamentali sopracitati.

BIBLIOGRAFIA

- Acevedo N, Sääf A, Söderhäll C, Melén E, Mandelin J, Pietras CO, *et al* (2013). Interaction between retinoid acid receptor-related orphan receptor alpha (RORA) and neuropeptide S receptor 1 (NPSR1) in asthma. *PloS one* **8**: e60111.
- Adams WB, Levitan IB (1985). Voltage and ion dependences of the slow currents which mediate bursting in *Aplysia* neurone R15. *The Journal of physiology* **360**: 69–93.
- Adori C, Barde S, Bogdanovic N, Uhlén M, Reinscheid RR, Kovacs GG, *et al* (2015). Neuropeptide S- and Neuropeptide S receptor-expressing neuron populations in the human pons. *Frontiers in neuroanatomy* **9**: 126.
- Ahnaou A, Drinkenburg WHIM (2012). Neuropeptide-S evoked arousal with electroencephalogram slow-wave compensatory drive in rats. *Neuropsychobiology* **65**: 195–205.
- Baraban JM, Snyder SH, Alger BE (1985). Protein kinase C regulates ionic conductance in hippocampal pyramidal neurons: electrophysiological effects of phorbol esters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 2538–42.
- Beaumont V, Zucker RS (2000). Enhancement of synaptic transmission by cyclic AMP modulation of presynaptic Ih channels. *Nature neuroscience* **3**: 133–41.
- Beck B, Fernet B, Stricker-Krongrad A (2005). Peptide S is a novel potent inhibitor of voluntary and fast-induced food intake in rats. *Biochemical and biophysical research communications* **332**: 859–65.
- Becker PL, Fay FS (1987). Photobleaching of fura-2 and its effect on determination of calcium concentrations. *The American journal of physiology* **253**: C613-8.
- Bernier V, Stocco R, Bogusky MJ, Joyce JG, Parachoniak C, Grenier K, *et al* (2006). Structure-function relationships in the neuropeptide S receptor:

- molecular consequences of the asthma-associated mutation N107I. *The Journal of biological chemistry* **281**: 24704–12.
- Bevan S, Gray PT, Ritchie JM (1984). A calcium-activated cation-selective channel in rat cultured Schwann cells. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* **222**: 349–55.
- Biel M, Wahl-Schott C, Michalakis S, Zong X (2009). Hyperpolarization-Activated Cation Channels: From Genes to Function. *Physiological Reviews* **89**: 847–885.
- Blaha CD, Allen LF, Das S, Inglis WL, Latimer MP, Vincent SR, *et al* (1996). Modulation of dopamine efflux in the nucleus accumbens after cholinergic stimulation of the ventral tegmental area in intact, pedunculopontine tegmental nucleus-lesioned, and laterodorsal tegmental nucleus-lesioned rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **16**: 714–22.
- Boissard R, Fort P, Gervasoni D, Barbagli B, Luppi P-H (2003). Localization of the GABAergic and non-GABAergic neurons projecting to the sublaterodorsal nucleus and potentially gating paradoxical sleep onset. *The European journal of neuroscience* **18**: 1627–39.
- Brailoiu GC, Brailoiu E, Parkesh R, Galione A, Churchill GC, Patel S, *et al* (2009). NAADP-mediated channel “chatter” in neurons of the rat medulla oblongata. *The Biochemical journal* **419**: 91–7, 2 p following 97.
- Brown RE, Sergeeva OA, Eriksson KS, Haas HL (2002). Convergent Excitation of Dorsal Raphe Serotonin Neurons by Multiple Arousal Systems (Orexin/Hypocretin, Histamine and Noradrenaline). *Journal of Neuroscience* **22**: .
- Cancela JM, Churchill GC, Galione A (1999). Coordination of agonist-induced Ca²⁺-signalling patterns by NAADP in pancreatic acinar cells. *Nature* **398**: 74–6.
- Cancela JM, Coppenolle F Van, Galione A, Tepikin A V, Petersen OH (2002). Transformation of local Ca²⁺ spikes to global Ca²⁺ transients: the

- combinatorial roles of multiple Ca²⁺ releasing messengers. *The EMBO journal* **21**: 909–19.
- Cannella N, Kallupi M, Li HW, Stopponi S, Cifani C, Ciccocioppo R, *et al* (2016). Neuropeptide S differently modulates alcohol-related behaviors in alcohol-preferring and non-preferring rats. *Psychopharmacology* **233**: 2915–24.
- Cao J-L, Covington HE, Friedman AK, Wilkinson MB, Walsh JJ, Cooper DC, *et al* (2010). Mesolimbic dopamine neurons in the brain reward circuit mediate susceptibility to social defeat and antidepressant action. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**: 16453–8.
- Chameau P, Vrede Y Van de, Fossier P, Baux G (2001). Ryanodine-, IP₃- and NAADP-dependent calcium stores control acetylcholine release. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **443**: 289–96.
- Chaudhury D, Walsh JJ, Friedman AK, Juarez B, Ku SM, Koo JW, *et al* (2013). Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. *Nature* **493**: 532–6.
- Christensen MH, Kohlmeier KA (2016). Age-related changes in functional postsynaptic nicotinic acetylcholine receptor subunits in neurons of the laterodorsal tegmental nucleus, a nucleus important in drug addiction. *Addiction biology* **21**: 267–81.
- Christensen MH, Nielsen ML, Kohlmeier KA (2015). Electrophysiological changes in laterodorsal tegmental neurons associated with prenatal nicotine exposure: implications for heightened susceptibility to addict to drugs of abuse. *Journal of developmental origins of health and disease* **6**: 182–200.
- Churchill GC, Galione A (2001). NAADP induces Ca²⁺ oscillations via a two-pool mechanism by priming IP₃- and cADPR-sensitive Ca²⁺ stores. *The EMBO journal* **20**: 2666–71.
- Clark SD, Duangdao DM, Schulz S, Zhang L, Liu X, Xu Y-L, *et al* (2011). Anatomical characterization of the neuropeptide S system in the mouse brain

- by in situ hybridization and immunohistochemistry. *The Journal of Comparative Neurology* **519**: 1867–1893.
- Dannlowski U, Kugel H, Franke F, Stuhmann A, Hohoff C, Zwanzger P, *et al* (2011). Neuropeptide-S (NPS) receptor genotype modulates basolateral amygdala responsiveness to aversive stimuli. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **36**: 1879–85.
- Deakin JFW, Graeff FG (1991). 5-HT and mechanisms of defence. *Journal of Psychopharmacology* **5**: 305–315.
- Dettbarn C, Palade P (1998). Effects of three sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca⁺⁺ pump inhibitors on release channels of intracellular stores. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **285**: 739–45.
- Dort CJ Van, Zachs DP, Kenny JD, Zheng S, Goldblum RR, Gelwan NA, *et al* (2015). Optogenetic activation of cholinergic neurons in the PPT or LDT induces REM sleep. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: 584–589.
- Edwards FA, Konnerth A, Sakmann B (1990). Quantal analysis of inhibitory synaptic transmission in the dentate gyrus of rat hippocampal slices: a patch-clamp study. *The Journal of physiology* **430**: 213–49.
- Endo M (2007). Calcium-Induced Release of Calcium From the Sarcoplasmic Reticulum. *Regulatory Mechanisms of Striated Muscle Contraction* **592**: 275–285.
- Erdmann F, Kügler S, Blaesse P, Lange MD, Skryabin B V, Pape H-C, *et al* (2015). Neuronal expression of the human neuropeptide S receptor NPSR1 identifies NPS-induced calcium signaling pathways. *PloS one* **10**: e0117319.
- Fornal C, Auerbach S, Jacobs BL (1985). Activity of serotonin-containing neurons in nucleus raphe magnus in freely moving cats. *Experimental neurology* **88**: 590–608.
- Forster GL, Blaha CD (2000). Laterodorsal tegmental stimulation elicits dopamine efflux in the rat nucleus accumbens by activation of acetylcholine

- and glutamate receptors in the ventral tegmental area. *The European journal of neuroscience* **12**: 3596–604.
- Galione A (2015). A primer of NAADP-mediated Ca(2+) signalling: From sea urchin eggs to mammalian cells. *Cell calcium* **58**: 27–47.
- Gamble KL, Kudo T, Colwell CS, McMahon DG (2011). Gastrin-releasing peptide modulates fast delayed rectifier potassium current in Per1-expressing SCN neurons. *Journal of biological rhythms* **26**: 99–106.
- Geller I, Blum K (1970). The effects of 5-HTP on para-chlorophenylalanine (p-CPA) attenuation of “conflict” behavior. *European Journal of Pharmacology* **9**: 319–324.
- Genazzani AA, Galione A (1996). Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate mobilizes Ca²⁺ from a thapsigargin-insensitive pool. *The Biochemical journal* 721–5at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8645149>>.
- Gottlieb DJ, O’Connor GT, Wilk JB (2007). Genome-wide association of sleep and circadian phenotypes. *BMC Medical Genetics* **8**: S9.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry* **260**: 3440–50.
- Gupte J, Cutler G, Chen J-L, Tian H (2004). Elucidation of signaling properties of vasopressin receptor-related receptor 1 by using the chimeric receptor approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 1508–13.
- Hallanger AE, Wainer BH (1988). Ascending projections from the pedunculo-pontine tegmental nucleus and the adjacent mesopontine tegmentum in the rat. *The Journal of comparative neurology* **274**: 483–515.
- Hamsten C, Häggmark A, Grundström J, Mikus M, Lindskog C, Konradsen JR, *et al* (2016). Protein profiles of CCL5, HPGDS, and NPSR1 in plasma reveal association with childhood asthma. *Allergy* **71**: 1357–61.
- Hauberg K, Kohlmeier KA (2015). The appetite-inducing peptide, ghrelin, induces intracellular store-mediated rises in calcium in addiction and arousal-

- related laterodorsal tegmental neurons in mouse brain slices. *Peptides* **65**: 34–45.
- Hiruma H, Bourque CW (1995). P2 purinoceptor-mediated depolarization of rat supraoptic neurosecretory cells in vitro. *The Journal of physiology* 805–11 at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8788944>>.
- Hodges H, Green S, Glenn B (1987). Evidence that the amygdala is involved in benzodiazepine and serotonergic effects on punished responding but not on discrimination. *Psychopharmacology* **92**: 491–504.
- Huang CL, Slesinger PA, Casey PJ, Jan YN, Jan LY (1995). Evidence that direct binding of G beta gamma to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel is important for channel activation. *Neuron* **15**: 1133–43.
- Huang KP (1989). The mechanism of protein kinase C activation. *Trends in neurosciences* **12**: 425–32.
- Hurley TW, Ryan MP, Brinck RW (1992). Changes of cytosolic Ca²⁺ interfere with measurements of cytosolic Mg²⁺ using mag-fura-2. *The American journal of physiology* **263**: C300-7.
- Jüngling K, Liu X, Lesting J, Coulon P, Sosulina L, Reinscheid RK, *et al* (2012). Activation of neuropeptide S-expressing neurons in the locus coeruleus by corticotropin-releasing factor. *The Journal of physiology* **590**: 3701–17.
- Jüngling K, Seidenbecher T, Sosulina L, Lesting J, Sangha S, Clark SD, *et al* (2008). Neuropeptide S-Mediated Control of Fear Expression and Extinction: Role of Intercalated GABAergic Neurons in the Amygdala. *Neuron* **59**: 298–310.
- Kallupi M, Cannella N, Economidou D, Ubaldi M, Ruggeri B, Weiss F, *et al* (2010). Neuropeptide S facilitates cue-induced relapse to cocaine seeking through activation of the hypothalamic hypocretin system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 19567–72.
- Kirkpatrick K, Bourque CW (1995). Effects of neurotensin on rat supraoptic nucleus neurones in vitro. *The Journal of physiology* 373–81 at

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7714828>>.

- Kiser RS, Brown CA, Sanghera MK, German DC (1980). Dorsal raphe nucleus stimulation reduces centrally-elicited fearlike behavior. *Brain research* **191**: 265–72.
- Kohlmeier KA, Inoue T, Leonard CS (2004). Hypocretin/Orexin Peptide Signaling in the Ascending Arousal System: Elevation of Intracellular Calcium in the Mouse Dorsal Raphe and Laterodorsal Tegmentum. *Journal of Neurophysiology* **92**: 221–235.
- Kohlmeier KA, Leonard CS (2006). Transmitter modulation of spike-evoked calcium transients in arousal related neurons: muscarinic inhibition of SNX-482-sensitive calcium influx. *The European journal of neuroscience* **23**: 1151–62.
- Kohlmeier KA, Tyler CJ, Kalogiannis M, Ishibashi M, Kristensen MP, Gumenchuk I, *et al* (2013). Differential actions of orexin receptors in brainstem cholinergic and monoaminergic neurons revealed by receptor knockouts: implications for orexinergic signaling in arousal and narcolepsy. *Frontiers in neuroscience* **7**: 246.
- Kohlmeier KA, Watanabe S, Tyler CJ, Burlet S, Leonard CS (2008). Dual orexin actions on dorsal raphe and laterodorsal tegmentum neurons: noisy cation current activation and selective enhancement of Ca²⁺ transients mediated by L-type calcium channels. *Journal of neurophysiology* **100**: 2265–81.
- Kong H, Jones PP, Koop A, Zhang L, Duff HJ, Chen SRW (2008). Caffeine induces Ca²⁺ release by reducing the threshold for luminal Ca²⁺ activation of the ryanodine receptor. *The Biochemical journal* **414**: 441–52.
- Kushikata T, Yoshida H, Kudo M, Salvadori S, Calo G, Hirota K (2011). The Effects of Neuropeptide S on General Anesthesia in Rats. *Anesthesia & Analgesia* **112**: 845–849.
- Lee HC, Aarhus R (2000). Functional visualization of the separate but interacting calcium stores sensitive to NAADP and cyclic ADP-ribose. *Journal of cell science* **113 Pt 24**: 4413–20.

- Lee MG, Manns ID, Alonso A, Jones BE (2004). Sleep-wake related discharge properties of basal forebrain neurons recorded with micropipettes in head-fixed rats. *Journal of neurophysiology* **92**: 1182–98.
- Leonard SK, Dwyer JM, Sukoff Rizzo SJ, Platt B, Logue SF, Neal SJ, *et al* (2008). Pharmacology of neuropeptide S in mice: Therapeutic relevance to anxiety disorders. *Psychopharmacology* **197**: 601–611.
- Leonard SK, Ring RH (2011). Immunohistochemical localization of the neuropeptide S receptor in the rat central nervous system. *Neuroscience* **172**: 153–163.
- Levin HS, Rodnitzky RL (1976). Behavioral effects of organophosphate in man. *Clinical toxicology* **9**: 391–403.
- Li M, West JW, Lai Y, Scheuer T, Catterall WA (1992). Functional modulation of brain sodium channels by cAMP-dependent phosphorylation. *Neuron* **8**: 1151–9.
- Li Y, Zhong W, Wang D, Feng Q, Liu Z, Zhou J, *et al* (2016). Serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus encode reward signals. *Nature Communications* **7**: 10503.
- Li YQ, Li H, Kaneko T, Mizuno N (2001). Morphological features and electrophysiological properties of serotonergic and non-serotonergic projection neurons in the dorsal raphe nucleus. An intracellular recording and labeling study in rat brain slices. *Brain research* **900**: 110–8.
- Liao Y, Lu B, Ma Q, Wu G, Lai X, Zang J, *et al* (2016). Human Neuropeptide S Receptor Is Activated via a Gαq Protein-biased Signaling Cascade by a Human Neuropeptide S Analog Lacking the C-terminal 10 Residues. *The Journal of biological chemistry* **291**: 7505–16.
- Liu R-J, Pol AN van den, Aghajanian GK (2002). Hypocretins (Orexins) Regulate Serotonin Neurons in the Dorsal Raphe Nucleus by Excitatory Direct and Inhibitory Indirect Actions. *Journal of Neuroscience* **22**: .
- Lodge DJ, Grace AA (2006). The laterodorsal tegmentum is essential for burst firing of ventral tegmental area dopamine neurons. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences* **103**: 5167–5172.
- Lu J, Bjorkum AA, Xu M, Gaus SE, Shiromani PJ, Saper CB (2002). Selective activation of the extended ventrolateral preoptic nucleus during rapid eye movement sleep. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**: 4568–76.
- Lukas M, Neumann ID (2012). Nasal application of neuropeptide S reduces anxiety and prolongs memory in rats: Social versus non-social effects. *Neuropharmacology* **62**: 398–405.
- MacLean JN, Yuste R (2009). Imaging Action Potentials with Calcium Indicators. *Cold Spring Harbor Protocols* **2009**: pdb.prot5316-prot5316.
- Maskos U (2008). The cholinergic mesopontine tegmentum is a relatively neglected nicotinic master modulator of the dopaminergic system: relevance to drugs of abuse and pathology. *British journal of pharmacology* S438-45doi:10.1038/bjp.2008.5.
- McNair LF, Kohlmeier KA (2015a). Prenatal nicotine is associated with reduced AMPA and NMDA receptor-mediated rises in calcium within the laterodorsal tegmentum: a pontine nucleus involved in addiction processes. *Journal of developmental origins of health and disease* **6**: 225–41.
- McNair LF, Kohlmeier KA (2015b). Prenatal nicotine is associated with reduced AMPA and NMDA receptor-mediated rises in calcium within the laterodorsal tegmentum: a pontine nucleus involved in addiction processes. *Journal of developmental origins of health and disease* **6**: 225–41.
- Meis S, Bergado-Acosta JR, Yanagawa Y, Obata K, Stork O, Munsch T (2008). Identification of a neuropeptides S responsive circuitry shaping amygdala activity via the endopiriform nucleus. *PLoS ONE* **3**: .
- Meis S, Stork O, Munsch T (2011). Neuropeptide S-mediated facilitation of synaptic transmission enforces subthreshold theta oscillations within the lateral amygdala. *PLoS ONE* **6**: .
- Mena-Segovia J (2016). Structural and functional considerations of the cholinergic brainstem. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria)* :

- 1996) **123**: 731–6.
- Mineur YS, Obayemi A, Wigstrand MB, Fote GM, Calarco CA, Li AM, *et al* (2013). Cholinergic signaling in the hippocampus regulates social stress resilience and anxiety- and depression-like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 3573–8.
- Monti JM (2010). The role of dorsal raphe nucleus serotonergic and non-serotonergic neurons, and of their receptors, in regulating waking and rapid eye movement (REM) sleep. *Sleep medicine reviews* **14**: 319–27.
- Moruzzi G, Magoun HW (1995). Brain stem reticular formation and activation of the EEG. 1949 [classical article]. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* **7**: 251–267.
- Nauta WJH (1946). Hypothalamic regulation of sleep in rats; an experimental study. *Journal of neurophysiology* **9**: 285–316.
- Nogueira RL, Graeff FG (1995). Role of 5-HT receptor subtypes in the modulation of dorsal periaqueductal gray generated aversion. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **52**: 1–6.
- Numann R, Catterall WA, Scheuer T (1991). Functional modulation of brain sodium channels by protein kinase C phosphorylation. *Science (New York, NY)* **254**: 115–8.
- Oishi M, Kushikata T, Niwa H, Yakoshi C, Ogasawara C, Calo G, *et al* (2014a). Endogenous neuropeptide S tone influences sleep-wake rhythm in rats. *Neuroscience letters* **581**: 94–7.
- Oishi M, Kushikata T, Niwa H, Yakoshi C, Ogasawara C, Calo G, *et al* (2014b). Endogenous neuropeptide S tone influences sleep-wake rhythm in rats. *Neuroscience letters* **581**: 94–7.
- Okamura N, Garau C, Duangdao DM, Clark SD, Jüngling K, Pape H-C, *et al* (2011). Neuropeptide S enhances memory during the consolidation phase and interacts with noradrenergic systems in the brain. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **36**: 744–52.

- Okamura N, Habay SA, Zeng J, Chamberlin AR, Reinscheid RK (2008).
Synthesis and pharmacological in vitro and in vivo profile of 3-oxo-1,1-diphenyl-tetrahydro-oxazolo[3,4-a]pyrazine-7-carboxylic acid 4-fluorobenzylamide (SHA 68), a selective antagonist of the neuropeptide S receptor. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **325**: 893–901.
- Overstreet DH (1986). Selective breeding for increased cholinergic function: Development of a new animal model of depression. *Biological Psychiatry* **21**: 49–58.
- Pandey V, Chuang C-C, Lewis AM, Aley PK, Brailoiu E, Dun NJ, *et al* (2009). Recruitment of NAADP-sensitive acidic Ca²⁺ stores by glutamate. *The Biochemical journal* **422**: 503–12.
- Paredes MF, Greenwood J, Baraban SC (2003). Neuropeptide Y modulates a G protein-coupled inwardly rectifying potassium current in the mouse hippocampus. *Neuroscience letters* **340**: 9–12.
- Patel S, Churchill GC, Sharp T, Galione A (2000). Widespread distribution of binding sites for the novel Ca²⁺-mobilizing messenger, nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, in the brain. *The Journal of biological chemistry* **275**: 36495–7.
- Patnaik S, Marugan JJ, Liu K, Zheng W, Southall N, Dehdashti SJ, *et al* (2013). Structure-activity relationship of imidazopyridinium analogues as antagonists of neuropeptide s receptor. *Journal of medicinal chemistry* **56**: 9045–56.
- Penington NJ, Kelly JS (1993). Ionic dependence of a slow inward tail current in rat dorsal raphe neurones. *The Journal of physiology* **464**: 33–48.
- Pesco J, Salmon J-M, Vigo J, Viallet P (2001). Mag-indo1 Affinity for Ca²⁺, Compartmentalization and Binding to Proteins: The Challenge of Measuring Mg²⁺ Concentrations in Living Cells. *Analytical Biochemistry* **290**: 221–231.
- Pieribone VA, Xu ZQ, Zhang X, Grillner S, Bartfai T, Hökfelt T (1995). Galanin induces a hyperpolarization of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in the brainstem slice. *Neuroscience* **64**: 861–74.

- Plenge-Tellechea F, Soler F, Fernandez-Belda F (1997). On the inhibition mechanism of sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases by cyclopiazonic acid. *The Journal of biological chemistry* **272**: 2794–800.
- Pobbe RLH, Zangrossi H (2005). 5-HT(1A) and 5-HT(2A) receptors in the rat dorsal periaqueductal gray mediate the antipanic-like effect induced by the stimulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Psychopharmacology* **183**: 314–21.
- Pulga A, Ruzza C, Rizzi A, Guerrini R, Calo G (2012). Anxiolytic- and panicolytic-like effects of Neuropeptide S in the mouse elevated T-maze. *European Journal of Neuroscience* **36**: 3531–3537.
- Putney JW (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell calcium* **7**: 1–12.
- Rabenstein RL, Caldarone BJ, Picciotto MR (2006). The nicotinic antagonist mecamylamine has antidepressant-like effects in wild-type but not β 2- or α 7-nicotinic acetylcholine receptor subunit knockout mice. *Psychopharmacology* **189**: 395–401.
- Reinscheid RK (2007). Phylogenetic appearance of neuropeptide S precursor proteins in tetrapods. *Peptides* **28**: 830–7.
- Reinscheid RK, Xu Y-L, Okamura N, Zeng J, Chung S, Pai R, *et al* (2005). Pharmacological Characterization of Human and Murine Neuropeptide S Receptor Variants. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **315**: 1338–1345.
- Rizzi A, Vergura R, Marzola G, Ruzza C, Guerrini R, Salvadori S, *et al* (2008). Neuropeptide S is a stimulatory anxiolytic agent: a behavioural study in mice. *British Journal of Pharmacology* **154**: 471–479.
- Ruzza C, Pulga A, Rizzi A, Marzola G, Guerrini R, Calo' G (2012). Behavioural phenotypic characterization of CD-1 mice lacking the neuropeptide S receptor. *Neuropharmacology* **62**: 1999–2009.
- Rye DB, Saper CB, Lee HJ, Wainer BH (1987). Pedunculopontine tegmental nucleus of the rat: cytoarchitecture, cytochemistry, and some extrapyramidal

- connections of the mesopontine tegmentum. *The Journal of comparative neurology* **259**: 483–528.
- Sadana R, Dessauer CW (2009). Physiological roles for G protein-regulated adenylyl cyclase isoforms: insights from knockout and overexpression studies. *Neuro-Signals* **17**: 5–22.
- Sakai K (2011). Sleep-waking discharge profiles of dorsal raphe nucleus neurons in mice. *Neuroscience* **197**: 200–24.
- Salin PA, Prince DA (1996). Spontaneous GABAA receptor-mediated inhibitory currents in adult rat somatosensory cortex. *Journal of neurophysiology* **75**: 1573–88.
- Saper CB, Chou TC, Scammell TE (2001). The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends in neurosciences* **24**: 726–31.
- Schmoutz CD, Zhang Y, Runyon SP, Goeders NE (2012). Antagonism of the neuropeptide S receptor with RTI-118 decreases cocaine self-administration and cocaine-seeking behavior in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **103**: 332–7.
- Shanley LJ, Irving AJ, Rae MG, Ashford MLJ, Harvey J (2002). Leptin inhibits rat hippocampal neurons via activation of large conductance calcium-activated K⁺ channels. *Nature Neuroscience* **5**: 299–300.
- Sherin JE, Shiromani PJ, McCarley RW, Saper CB (1996). Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science (New York, NY)* **271**: 216–9.
- Smith KL, Patterson M, Dhillo WS, Patel SR, Semjonous NM, Gardiner J V., *et al* (2006). Neuropeptide S Stimulates the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis and Inhibits Food Intake. *Endocrinology* **147**: 3510–3518.
- Spada J, Sander C, Burkhardt R, Häntzsch M, Mergl R, Scholz M, *et al* (2014). Genetic association of objective sleep phenotypes with a functional polymorphism in the neuropeptide S receptor gene. *PloS one* **9**: e98789.
- Sun QQ, Huguenard JR, Prince DA (2001). Neuropeptide Y receptors differentially modulate G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels

- and high-voltage-activated Ca²⁺ channels in rat thalamic neurons. *The Journal of physiology* **531**: 67–79.
- Swett CP, Hobson JA (1968). The effects of posterior hypothalamic lesions on behavioral and electrographic manifestations of sleep and waking in cats. *Archives italiennes de biologie* **106**: 283–93.
- Syuji Sato, Yasushi Shintani, Nobuyuki Miyajima KY (2001). Novel g protein-coupled receptor protein and dna thereof. .
- Takahashi K, Wang Q-P, Guan J-L, Kayama Y, Shioda S, Koyama Y (2005). State-dependent effects of orexins on the serotonergic dorsal raphe neurons in the rat. *Regulatory peptides* **126**: 43–7.
- Tancredi T, Guerrini R, Marzola E, Trapella C, Calo G, Regoli D, *et al* (2007). Conformation-activity relationship of neuropeptide S and some structural mutants: helicity affects their interaction with the receptor. *Journal of medicinal chemistry* **50**: 4501–8.
- Teissier A, Chemiakine A, Inbar B, Bagchi S, Ray RS, Palmiter RD, *et al* (2015). Activity of Raph?? Serotonergic Neurons Controls Emotional Behaviors. *Cell Reports* **13**: 1965–1976.
- Thorsell A, Tapocik JD, Liu K, Zook M, Bell L, Flanigan M, *et al* (2013). A novel brain penetrant NPS receptor antagonist, NCGC00185684, blocks alcohol-induced ERK-phosphorylation in the central amygdala and decreases operant alcohol self-administration in rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **33**: 10132–42.
- Trapella C, Pela M, Zoppo L Del, Calo G, Camarda V, Ruzza C, *et al* (2011). Synthesis and separation of the enantiomers of the neuropeptide S receptor antagonist (9R/S)-3-oxo-1,1-diphenyl-tetrahydro-oxazolo[3,4-a]pyrazine-7-carboxylic acid 4-fluoro-benzylamide (SHA 68). *Journal of medicinal chemistry* **54**: 2738–44.
- Tsien RY (1980). New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* **19**: 2396–404.

- Tye NC, Everitt BJ, Iversen SD (1977). 5-Hydroxytryptamine and punishment. *Nature* **268**: 741–743.
- Ubaldi M, Giordano A, Severi I, Li H, Kallupi M, Guglielmo G de, *et al* (2016). Activation of Hypocretin-1/Orexin-A Neurons Projecting to the Bed Nucleus of the Stria Terminalis and Paraventricular Nucleus Is Critical for Reinstatement of Alcohol Seeking by Neuropeptide S. *Biological psychiatry* **79**: 452–62.
- Verkhatsky A, Shmigol A (1996). Calcium-induced calcium release in neurones. *Cell calcium* **19**: 1–14.
- Verret L, Goutagny R, Fort P, Cagnon L, Salvert D, Léger L, *et al* (2003). A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC Neuroscience* **4**: 19.
- Vertes RP (1991). A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* **313**: 643–668.
- Vertes RP, Crane AM (1997). Distribution, quantification, and morphological characteristics of serotonin-immunoreactive cells of the suprallemniscal nucleus (B9) and pontomesencephalic reticular formation in the rat. *Journal of Comparative Neurology* **378**: 411–424.
- Vitale G, Filaferro M, Ruggieri V, Pennella S, Frigeri C, Rizzi A, *et al* (2008). Anxiolytic-like effect of neuropeptide S in the rat defensive burying. *Peptides* **29**: 2286–91.
- Voleti B, Navarria A, Liu R-J, Banasr M, Li N, Terwilliger R, *et al* (2013). Scopolamine rapidly increases mammalian target of rapamycin complex 1 signaling, synaptogenesis, and antidepressant behavioral responses. *Biological psychiatry* **74**: 742–9.
- Waterhouse BD, Mihailoff GA, Baack JC, Woodward DJ (1986). Topographical distribution of dorsal and median raphe neurons projecting to motor, sensorimotor, and visual cortical areas in the rat. *The Journal of comparative neurology* **249**: 460–76, 478–81.
- Weitemier AZ, Ryabinin AE (2006). Urocortin 1 in the dorsal raphe regulates

- food and fluid consumption, but not ethanol preference in C57BL/6J mice. *Neuroscience* **137**: 1439–45.
- Wscieklica T, Silva MSCF, Lemes JA, Melo-Thomas L, Céspedes IC, Viana MB (2017). Deep brain stimulation of the dorsal raphe inhibits avoidance and escape reactions and activates forebrain regions related to the modulation of anxiety/panic. *Behavioural brain research* **321**: 193–200.
- Xiao C, Cho JR, Zhou C, Treweek JB, Chan K, McKinney SL, *et al* (2016). Cholinergic Mesopontine Signals Govern Locomotion and Reward through Dissociable Midbrain Pathways. *Neuron* **90**: 333–47.
- Xu M, Chung S, Zhang S, Zhong P, Ma C, Chang W-C, *et al* (2015). Basal forebrain circuit for sleep-wake control. *Nature Neuroscience* **18**: 1641–1647.
- Xu YL, Gall CM, Jackson VR, Civelli O, Reinscheid RK (2007). Distribution of neuropeptide S receptor mRNA and neurochemical characteristics of neuropeptide S-expressing neurons in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology* **500**: 84–102.
- Xu YL, Reinscheid RK, Huitron-Resendiz S, Clark SD, Wang Z, Lin SH, *et al* (2004). Neuropeptide S: A neuropeptide promoting arousal and anxiolytic-like effects. *Neuron* **43**: 487–497.
- Yang B, Ferguson A V (2003). Orexin-A depolarizes nucleus tractus solitarius neurons through effects on nonselective cationic and K⁺ conductances. *Journal of neurophysiology* **89**: 2167–75.
- Yoshida K, Kim J, Nakajima K, Oomura Y, Wayner MJ, Sasaki K (2010). Electrophysiological effects of neuropeptide S on rat ventromedial hypothalamic neurons in vitro. *Peptides* **31**: 712–719.
- You Z-B, Wang B, Zitzman D, Wise RA (2008). Acetylcholine release in the mesocorticolimbic dopamine system during cocaine seeking: conditioned and unconditioned contributions to reward and motivation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**: 9021–9.

Zhang S, You Z, Wang S, Yang J, Yang L, Sun Y, *et al* (2016). Neuropeptide S modulates the amygdaloidal HCN activities (I_h) in rats: Implication in chronic pain. *Neuropharmacology* **105**: 420–33.

Zhou W, Liu H, Zhang F, Tang S, Zhu H, Lai M, *et al* (2007). Role of acetylcholine transmission in nucleus accumbens and ventral tegmental area in heroin-seeking induced by conditioned cues. *Neuroscience* **144**: 1209–18.

Zoicas I, Menon R, Neumann ID (2016). Neuropeptide S reduces fear and avoidance of con-specifics induced by social fear conditioning and social defeat, respectively. *Neuropharmacology* **108**: 284–291.