



**Δράση «Εμβληματικές δράσεις σε διαθεματικές επιστημονικές περιοχές με ειδικό ενδιαφέρον για την σύνδεση με τον παραγωγικό ιστό» ID 16618**

Εθνικό δίκτυο έρευνας για την ανάδειξη της γενετικής βάσης των νευροεκφυλιστικών νόσων Alzheimer και Parkinson, την ανίχνευση αξιόπιστων βιοδεικτών και την ανάπτυξη καινοτόμων υπολογιστικών τεχνολογιών και θεραπευτικών στρατηγικών στη βάση της ιατρικής ακριβείας (BRAIN PRECISION, TAEDR-0535850)

**ΤΙΤΛΟΣ ΠΑΡΑΔΟΤΕΟΥ: Ανάδειξη νέων βιοδεικτών των ενδοθηλιακών κυττάρων, στη νόσο Αλτσχάιμερ.**

**ΕΝΟΤΗΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 4: Ανάπτυξη κυτταρικών και ζωικών μοντέλων, καθώς και νέων βιοδεικτών για τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες Alzheimer και Parkinson.**

**ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΟΜΑΔΑ (ΦΟΡΕΑΣ): ΣΑΒΒΑΣ ΧΡΙΣΤΟΦΟΡΙΔΗΣ (ΙΤΕ)**

## Ανάδειξη νέων βιοδεικτών των ενδοθηλιακών κυττάρων, στη νόσο Αλτσχάιμερ.

### ΣΥΝΤΟΜΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Πρόσφατες μελέτες κατέδειξαν ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού απομακρύνουν το πεπτίδιο Αβ μέσω ενδοκυττάρωσης και ότι πιθανές βλάβες στην λειτουργία αυτή προκαλούν ανάπτυξη της νόσου Αλτσχάιμερ. Ωστόσο, η ακριβής συμβολή των διαφορετικών οδών ενδοκυττάρωσης, καθώς και οι εμπλεκόμενοι μοριακοί μηχανισμοί, παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστα. Έτσι, χρησιμοποιώντας το μοντέλο που αναπτύχθηκε στο προηγούμενο παραδοτέο, μελετήσαμε συνολικά τις οδούς ενδοκυττάρωσης και σηματοδότησης των ενδοθηλιακών κυττάρων που εμπλέκονται στην απομάκρυνση του αμυλοειδούς ώστε να αναδείξουμε νέους βιοδείκτες της νόσου που εντοπίζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των ασθενών.

### **Συνοπτική περιγραφή του έργου που υλοποιήθηκε**

Στο παραδοτέο αυτό διερευνήσαμε συστηματικά τις ενδοκυτταρικές οδούς πρόσληψης του Αβ σε HUVEC και σε Ενδοθηλιακά Κύτταρα Μικροαγγείων του Ανθρώπινου Εγκεφάλου (HBMVEC).

### **Μελέτη σε κύτταρα HUVEC, με χρήση χημικών αναστολέων και πεπτίδιο Αβ42**

Τα HUVEC στερήθηκαν ορό για 1 ώρα και τα προεπεξεργαστήκαμε με αναστολείς για 30 λεπτά. Τα μέσο αναρροφήθηκε και αντικαταστάθηκε με μέσο χωρίς ορό που περιείχε τους αναστολείς EIPA (για την αναστολή της μακροπιννοκυττάρωσης) και/ή τη dynasore (για την αναστολή της ενδοκυττάρωσης με διαμεσολάβηση κλαθρίνης) αραιωμένους στις επιθυμητές τελικές συγκεντρώσεις. Για τις ομάδες ελέγχου δεν έγινε καμία αλλαγή σε αυτό το στάδιο. Μετά την 30λεπτη προεπεξεργασία με αναστολείς, τα μέσα απομακρύνθηκαν και αντικαταστάθηκαν με φρέσκα πλήρη μέσα που περιείχαν πεπτίδιο Αβ ή/και δεξτράνη 70 / τρανσφερίνη μαζί με τους αναστολείς EIPA ή/και dynasore. Για την ομάδα ελέγχου, τα μέσα περιείχαν μόνο πεπτίδιο Αβ ή/και δεξτράνη/τρανσφερίνη. Μετά από 15 λεπτά επώασης, τα κύτταρα είτε σταθεροποιήθηκαν και υποβλήθηκαν σε χρώση ανοσοφθορισμού, είτε λύθηκαν και τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με τη χρήση έμμεσης ELISA.

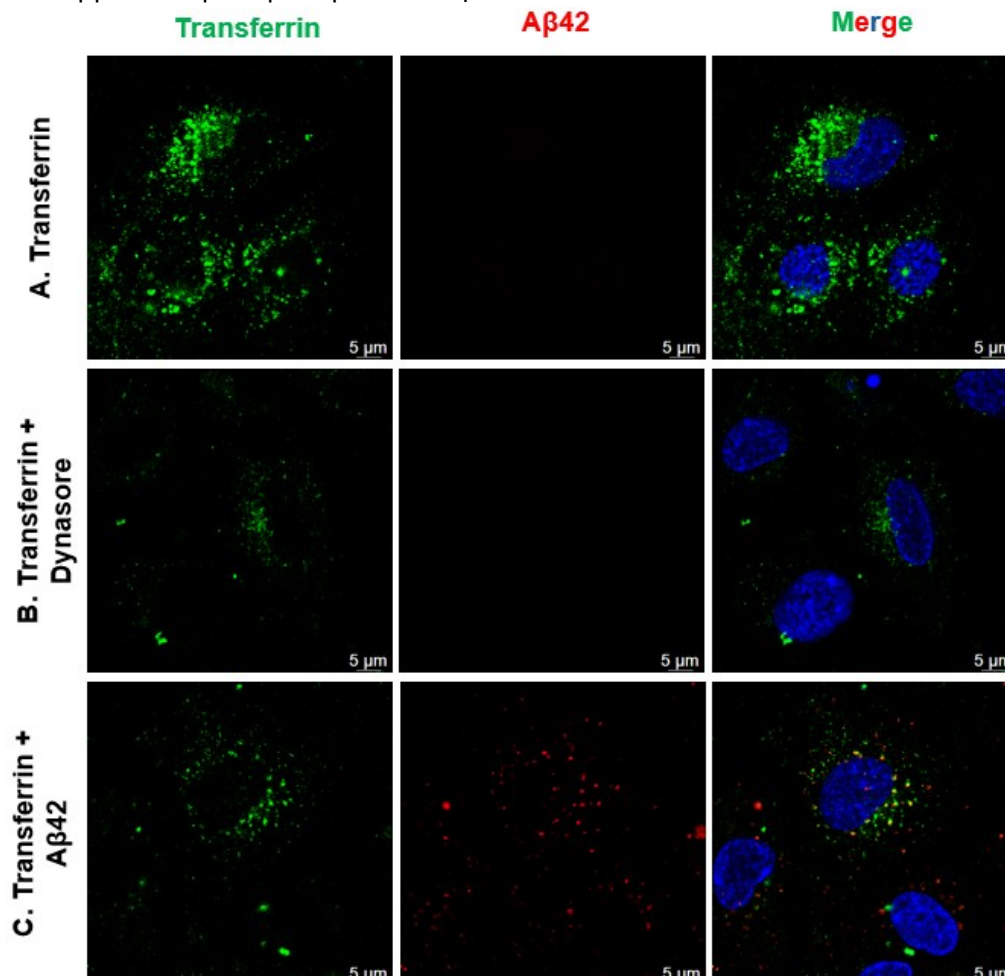
Για να διερευνήσουμε τις ενδοκυτταρικές οδούς μέσω των οποίων το εξωγενώς προστιθέμενο Αβ42 εισέρχεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα, επικεντρωθήκαμε αρχικά στην εξαρτώμενη από τη δυναμίνη οδό, μία από τις πιο καλά μελετημένες οδούς ενδοκυττάρωσης (Prichard et al., 2022). Η πρωτεΐνη δυναμίνη ρυθμίζει το μονοπάτι της ενδοκυττάρωσης με τη μεσολάβηση της κλαθρίνης, καθώς η δυναμίνη είναι απαραίτητη για το σχηματισμό κυστιδίων με επικάλυψη κλαθρίνης (Conner & Schmid, 2003- Macia et al., 2006). Για τη μελέτη αυτής της οδού, χρησιμοποιήσαμε τον δείκτη τρανσφερίνη και τον αναστολέα dynasore. Η τρανσφερίνη χρησιμοποιείται ως δείκτης ενδοκυττάρωσης με τη μεσολάβηση της κλαθρίνης, καθώς εσωτερικεύεται αποκλειστικά μέσω της εξαρτώμενης από τη δυναμίνη οδού μέσω της πρόσδεσής της στον υποδοχέα της (Doherty & McMahon, 2009). Το Dynasore δρα ως ισχυρός αναστολέας των ενδοκυτταρικών οδών που είναι γνωστό ότι εξαρτώνται από τη δυναμίνη, εμποδίζοντας ταχέως το σχηματισμό επικαλυμμένων κυστιδίων εντός δευτερολέπτων από την προσθήκη του (Macia et al., 2006).

Πρώτον, επικυρώσαμε ότι η τρανσφερίνη εσωτερικεύεται στα HUVEC, επιβεβαιώνοντας τη δραστηριότητα του μονοπατιού ενδοκυττάρωσης με τη μεσολάβηση της κλαθρίνης στο κυτταρικό μας μοντέλο (Εικόνα 1, Α). Για να διερευνήσουμε περαιτέρω τη συμμετοχή της ενδοκυττάρωσης με τη μεσολάβηση της κλαθρίνης, χρησιμοποιήσαμε το dynasore, έναν γνωστό αναστολέα της δυναμίνης, η οποία είναι απαραίτητη για τη διάσπαση των κυστιδίων με επικάλυψη κλαθρίνης από την πλασματική μεμβράνη. Όταν προστέθηκε dynasore στις καλλιέργειες HUVEC, τα εσωτερικευμένα επίπεδα τρανσφερίνης ήταν σημαντικά χαμηλότερα, φτάνοντας σχεδόν στο μηδέν (Εικόνα 1, Β). Αυτή η δραματική μείωση επιβεβαιώνει ότι το dynasore αναστέλλει αποτελεσματικά το μονοπάτι

ενδοκυττάρωσης με τη μεσολάβηση κλαθρίνης στα HUVEC και επικυρώνει το ρόλο του στην παρεμπόδιση αυτού του ειδικού ενδοκυτταρικού μηχανισμού.

Έχοντας επιβεβαιώσει ότι η τρανσερρίνη εσωτερικεύεται μέσω ενδοκυττάρωσης διαμεσολαβούμενης από κλαθρίνη στο κυτταρικό μας μοντέλο, προχωρήσαμε στη συνέχεια στην ταυτόχρονη προσθήκη τρανσερρίνης και Αβ42 (Εικόνα 1, Γ). Σε αυτή τη συνθήκη παρατηρείται η συνεντοπισμός της τρανσερρίνης και του Αβ42, υποδεικνύοντας ότι και οι δύο εσωτερικεύονται μέσω της ίδιας οδού. Το εύρημα αυτό ευθυγραμμίζεται με την υπάρχουσα βιβλιογραφία (Ramanathan et al., 2015, Zlokovic, 2008, Tarasoff-Conway et al., 2015), η οποία καταδεικνύει ότι η πρόσληψη της Αβ42 στον BBB περιλαμβάνει κυρίως ενδοκυττάρωση με τη μεσολάβηση της κλαθρίνης.

Επιπλέον, σε αυτή τη συνθήκη (Εικόνα 1, Γ), παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων ενδοκυτταροποιημένης τρανσερρίνης σε σύγκριση με την πρώτη συνθήκη (Εικόνα 1, Α). Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι η Αβ42 και η τρανσερρίνη μπορεί να ανταγωνίζονται για τον ίδιο υποδοχέα για την εσωτερίκευση. Αυτό θα μπορούσε να σημαίνει ότι είτε η τρανσερρίνη μπορεί να συνδεθεί με την LDL Receptor Related Protein 1 (LRP-1), έναν υποδοχέα που έχει αποδειχθεί ότι χρησιμοποιείται από την Αβ42 (Deane et al., 2009), είτε η Αβ42 μπορεί να είναι σε θέση να συνδεθεί με τον υποδοχέα τρανσερρίνης (TfR), ο οποίος παραδοσιακά χρησιμοποιείται από τη τρανσερρίνη (Cheng et al., 2004). Μια άλλη πιθανότητα είναι ότι όταν το Αβ42 είναι παρών, μπορεί να καταλαμβάνει ένα τμήμα του ενδοκυτταρικού μηχανισμού με τη μεσολάβηση της κλαθρίνης, μειώνοντας την αποτελεσματικότητα της εσωτερίκευσης της τρανσερρίνης και οδηγώντας σε μείωση των επιπέδων τρανσερρίνης στο εσωτερικό του κυττάρου. Η ακριβής εξήγηση ξεφεύγει από το πεδίο εφαρμογής της παρούσας μελέτης και δεν θα εμβαθύνουμε περαιτέρω σε αυτήν.

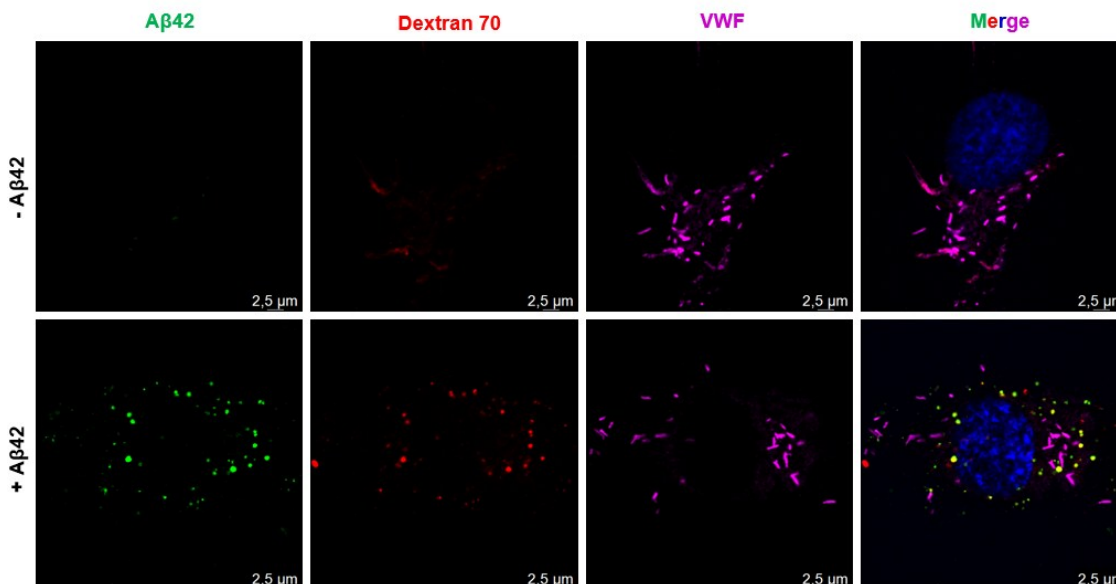


*Εικόνα 1: Ανάλυση της ενδοκυττάρωσης της τρανσφερρίνης και του Αβ42. Τα HUVEC στερήθηκαν ορό για 1 ώρα, υποβλήθηκαν σε προεπεξεργασία με 100  $\mu\text{mol/l}$  Dynasore για 30 λεπτά (μόνο στο Β) και ακολούθησε επώαση για 15 λεπτά με 50  $\mu\text{g/ml}$  τρανσφερρίνης (πράσινο) ή/και 2  $\mu\text{mol/l}$  Αβ42 (κόκκινο). Οι πυρήνες χρωματίστηκαν με Hoechst (μπλε). Μπάρα κλίμακας = 5  $\mu\text{m}$ .*

Ωστόσο, ο συνεντοπισμός της τρανσφερρίνης και της Αβ42 δεν είναι πλήρης (Εικόνα 1, Γ), υποδεικνύοντας ότι η Αβ42 μπορεί να εσωτερικευθεί μέσω εναλλακτικών οδών εκτός από την ενδοκυττάρωση με τη μεσολάβηση της κλαθρίνης. Στην πραγματικότητα, η ενδοκυττάρωση με τη μεσολάβηση της κλαθρίνης είναι μόνο μία και όχι η κυριότερη από τις πολλές διαφορετικές ενδοκυτταρικές οδούς που χρησιμοποιούνται από τα ΕΚ (Villaseñor et al., 2019). Είναι ενδιαφέρον ότι πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι στη ΝΑ υπάρχουν αυξημένα επίπεδα του VEGF (Cho et al., 2017), ενός αυξητικού παράγοντα που επάγει την εσωτερικευση μέσω της μακροπινικοκυττάρωσης (Basagiannis et al., 2016). Ως εκ τούτου, αυτό μας οδήγησε να προτείνουμε την υπόθεση ότι η μακροπινικοκυττάρωση μπορεί να συμβάλλει στη διακύτωση του Αβ42 διαμέσου του ΕΚ στον BBB, λειτουργώντας ενδεχομένως ως μηχανισμός κάθαρσης του Αβ42 στον εγκέφαλο (βλέπε πιο κάτω).

### Ο ρόλος της μακροπινικοκυττάρωσης στην πρόσληψη του Αβ42 στα ενδοθηλιακά κύτταρα

Για να διερευνήσουμε κατά πόσον η μακροπινικοκυττάρωση εμπλέκεται στην πρόσληψη του Αβ42 από τα ΕΚ, εξετάσαμε αρχικά τον πιθανό συνεντοπισμό του Αβ42 με δεξτράνη υψηλού μοριακού βάρους (δεξτράνη 70 kDa) στα ενδοσώματα. Η δεξτράνη 70 kDa χρησιμεύει ως δείκτης για τα ενδοκυτταρικά κυστίδια που σχηματίζονται μέσω της μακροπινικοκυττάρωσης (μακροπινισώματα) (Dharmawardhane et al., 2000). Υπό συνθήκες όπου υπάρχει τόσο η Αβ42 όσο και η Dextran 70 kDa, η Αβ42 συγκεντρώνεται αποτελεσματικά σε ενδοσώματα θετικά στη δεξτράνη (Εικόνα 2). Αυτό παρέχει πρώτες ενδείξεις ότι η μακροπινικοκυττάρωση χρησιμεύει ως οδός για την είσοδο του Αβ42 στο ΕΚ, μια πολύ ενδιαφέρουσα παρατήρηση που δεν είναι γνωστή μέχρι σήμερα.

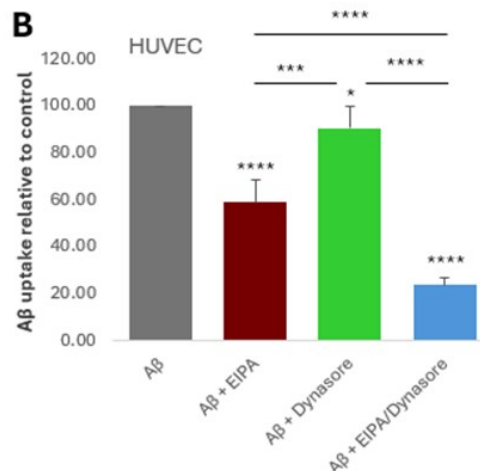
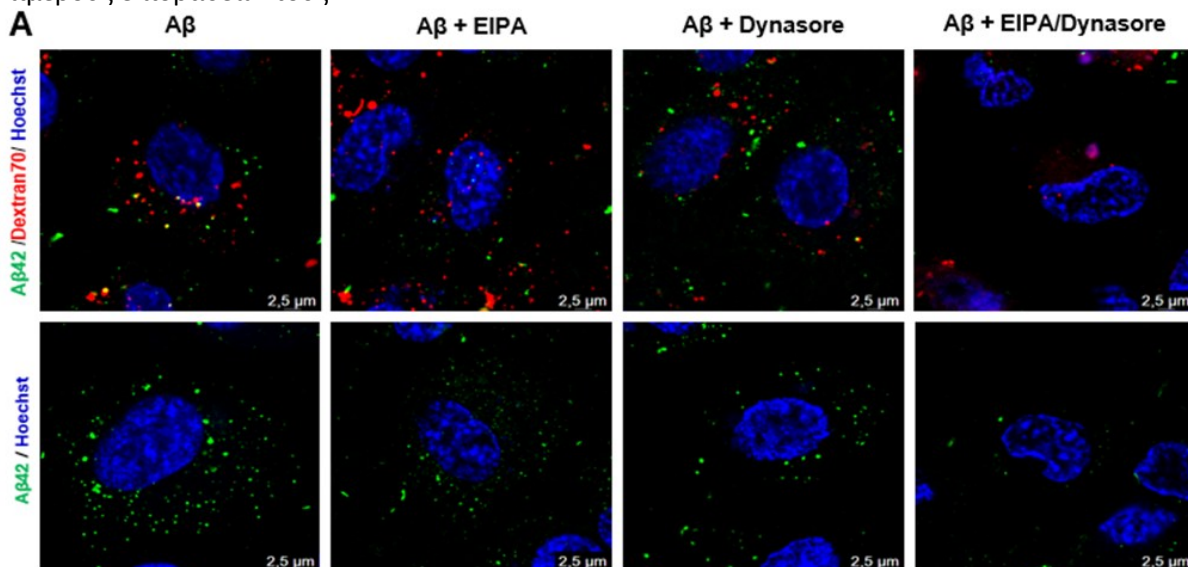


*Εικόνα 2: Μελέτη συνεντοπισμού του Αβ42 με τον δείκτη μακροπινικοκυττάρωσης Dextran. Τα HUVEC στερήθηκαν ορό για 1 ώρα και στη συνέχεια επώαστηκαν για 15 λεπτά με 1,5  $\text{mg/ml}$  Dextran 70 kDa (κόκκινο) και 2  $\mu\text{mol/L}$  Αβ42 (πράσινο) μόνο στη δεύτερη συνθήκη. Οι πυρήνες χρωματίστηκαν με Hoechst (μπλε). Μπάρα κλίμακας = 2,5  $\mu\text{m}$ .*

Επιπλέον, χρησιμοποιήσαμε έναν χημικό αναστολέα της μακροπικοκυττάρωσης, προκειμένου να επιβεβαιώσουμε τα πιο πάνω ευρήματα. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήσαμε τον χημικό αναστολέα EIPA, ο οποίος είναι ειδικός αναστολέας της μακροπικοκυττάρωσης (Mercer & Helenius, 2009). Η μακροπικοκυττάρωση και η ενδοκυττάρωση με τη μεσολάβηση της κλαθρίνης παρεμποδίστηκαν είτε μεμονωμένα, χρησιμοποιώντας τους αναστολείς EIPA και dynasore αντίστοιχα, είτε ταυτόχρονα χρησιμοποιώντας και τους δύο αναστολείς μαζί (Εικόνα 3, Α). Στην πρώτη συνθήκη (Εικόνα 3, Α), όπου προστέθηκαν Αβ42 και Dextran 70, η επεξεργασία με EIPA είχε ως αποτέλεσμα μια αξιοσημείωτη μείωση του συνεντοπισμού μεταξύ Αβ42 και Dextran 70 kDa. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι η μακροπικοκυττάρωση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόσληψη του Αβ42. Επιπλέον, τα επίπεδα ενδοκυττάρωσης για την Αβ42 μειώθηκαν όταν προστέθηκε είτε EIPA είτε dynasore. Η πιο δραματική μείωση παρατηρήθηκε όταν οι δύο αναστολείς εφαρμόστηκαν μαζί, καταργώντας σχεδόν πλήρως την ενδοκυττάρωση τόσο της Αβ42 όσο και της δεξτράνης 70 kDa (Εικόνα 3, Α).

Στη συνέχεια προχωρήσαμε στην ποσοτικοποίηση της πρόσληψης του Αβ42 μετά από επεξεργασία των κυττάρων με αυτούς τους αναστολείς. Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση της πρόσληψης Αβ42 και στις τρεις συνθήκες (επώαση με EIPA, με dynasore, με EIPA/Dynasore). Ειδικότερα, ο συνδυασμός των δύο αναστολέων οδήγησε στη μεγαλύτερη μείωση, με την πρόσληψη του Αβ42 να μειώνεται κατά 80% (Εικόνα 3, Β).

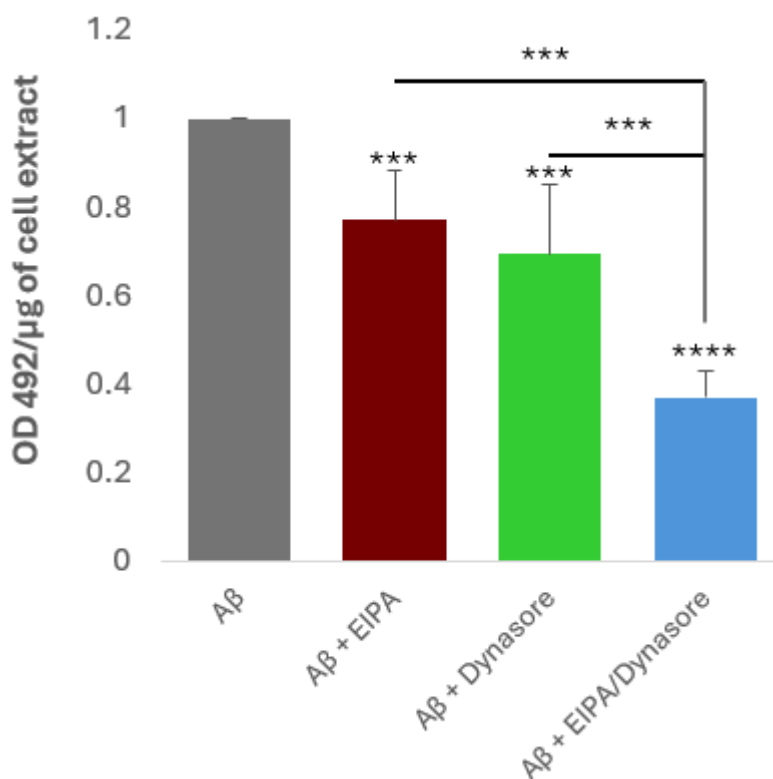
Η σημαντική μείωση της πρόσληψης του Αβ42 όταν χρησιμοποιήθηκαν τόσο η EIPA όσο και η dynasore μαζί υποδηλώνει ισχυρή συνεργιστική επίδραση στην ενδοκυττάρωση του Αβ42. Αυτό σημαίνει ότι η συνδυασμένη επίπτωση στην πρόσληψη Αβ42 όταν αναστέλλεται τόσο η μακροπικοκυττάρωση όσο και η ενδοκυττάρωση με τη μεσολάβηση της κλαθρίνης είναι μεγαλύτερη από το άθροισμα των επιμέρους επιδράσεών τους.



**Εικόνα 3: Οι επιδράσεις των αναστολέων EIPA και/ή Dynasore στην πρόσληψη Dextran70 και/ή Αβ42.**

(Α) Τα HUVEC στερήθηκαν ορό για 1 ώρα, στη συνέχεια προεπεξεργάστηκαν για 30 λεπτά με τους αναστολείς EIPA ή/και Dynasore και ακολούθησε επώαση 15 λεπτών με 2 μmol/L Αβ42 (πράσινο) και 1,5 mg/ml Dextran 70 kDa (κόκκινο) μόνο στην πρώτη συνθήκη. Οι πυρήνες χρωματίστηκαν με Hoechst (μπλε). Μπάρα κλίμακας = 2,5 μm. (Β) Ποσοτικοποίηση της πρόσληψης του Αβ42 με συνεστιακή μικροσκοπία παρουσία των αναστολέων EIPA και/ή Dynasore. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος φθορισμός κανονικοποιημένος σε σχέση με τον έλεγχο (HUVEC) (n = 4, μέσος όρος ± S.D., \*p ≤ 0,05- \*\*p ≤ 0,01- \*\*\*p ≤ 0,001- \*\*\*\*p ≤ 0,0001, t-test του φοιτητή).

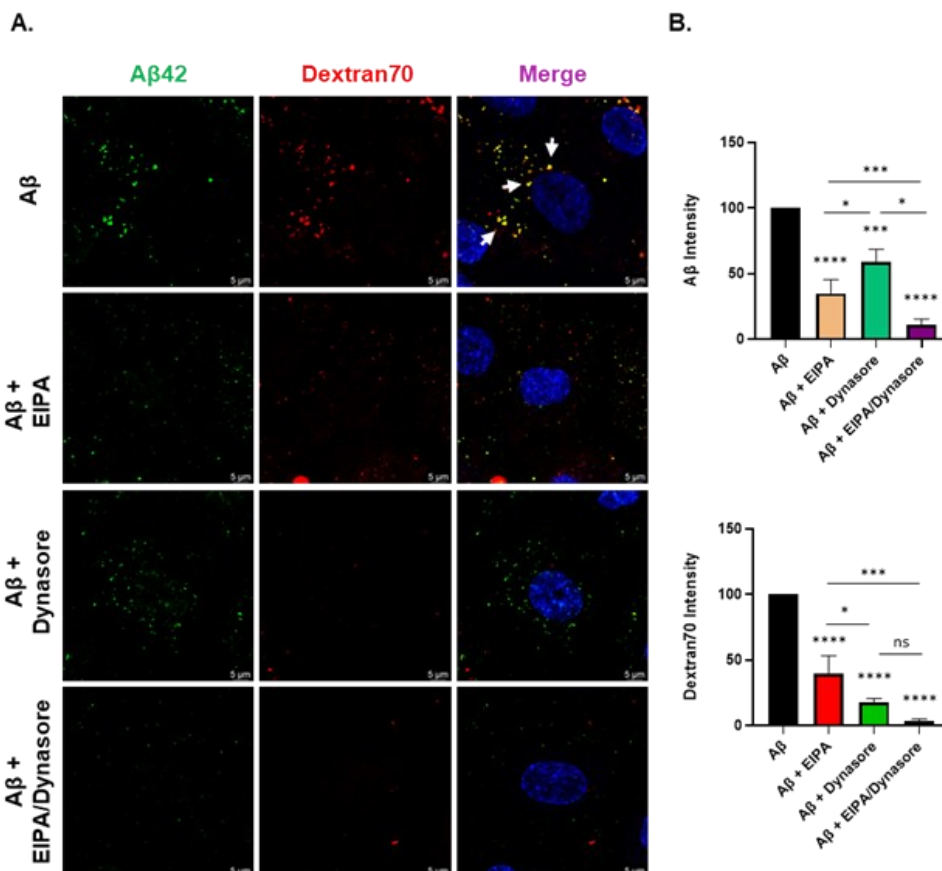
Ταυτόχρονα, επαναλάβαμε το πείραμα με δοκιμασία ELISA για να ποσοτικοποιήσουμε το Αβ42 που ενδοκυττάρωθηκε από τα HUVEC, έτσι ώστε να αξιολογήσουμε το ρόλο της μακροπυκνωτικής, της ενδοκυττάρωσης με διαμεσολάβηση της κλαθρίνης και του συνδυασμού τους στην πρόσληψη του Αβ42 (Εικόνα 4). Παρατηρήθηκε ότι η αναστολή κάθε μονοπατιού ξεχωριστά οδήγησε σε στατιστικά σημαντική μείωση της πρόσληψης του Αβ42. Και πάλι, η συνδυασμένη αναστολή της ενδοκυττάρωσης με τη μεσολάβηση της κλαθρίνης (μέσω του dynasore) και της μακροπυκνωτικής (μέσω της EIPA) οδήγησε στη μεγαλύτερη μείωση της πρόσληψης Αβ42, καταδεικνύοντας μια συνεργιστική επίδραση.



Εικόνα 4: Δοκιμή ELISA για το Αβ42 υπό την αναστολή της μακροπυκνωτικής και/ή της ενδοκυττάρωσης με τη μεσολάβηση της κλαθρίνης. Τα HUVEC στερήθηκαν ορό για 1 ώρα, στη συνέχεια προεπεξεργάστηκαν για 30 λεπτά με τους αναστολείς EIPA ή/και Dynasore και ακολούθησε 15λεπτη επώαση με 2 μmol/L Αβ42. Η επίδραση της αναστολής της ενδοκυττάρωσης στην πρόσληψη του Αβ42 αναλύθηκε με τη χρήση δοκιμασίας ELISA σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (n = 5, μέσος όρος ± S.D., \*p ≤ 0,05- \*\*p ≤ 0,01- \*\*\*p ≤ 0,001- \*\*\*\*p ≤ 0,0001, t-test του φοιτητή).

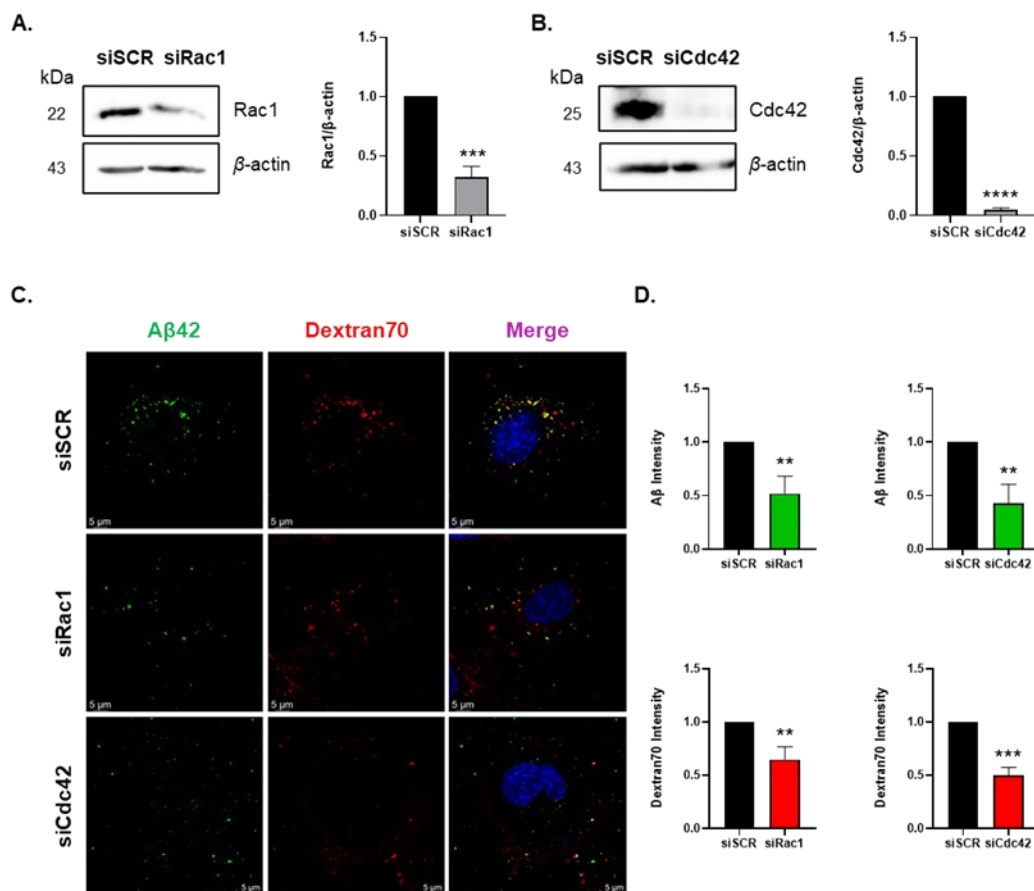
Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι τόσο η μακροπινουκτάρωση όσο και η ενδοκυττάρωση με τη μεσολάβηση της κλαθρίνης εμπλέκονται στην εσωτερίκευση του Αβ42 στα ΕΚ και υπογραμμίζουν την πολυπλοκότητα των μηχανισμών εσωτερίκευσης του Αβ42. Στους επόμενους μήνες του έργου θα προχωρήσουμε στην μελέτη των μονοπατιών ενδοκυττάρωσης σε ενδοθηλιακά κύτταρα ασθενών, ώστε να αναδείξουμε τις επιπτώσεις που επιφέρει η νόσος στην κάθαρση του αμυλοειδούς.

Πειράματα confocal μικροσκοπίας έδειξαν ότι η πρόσληψη του Αβ παρουσιάζει χρόνο- και δόσο-εξαρτώμενο χαρακτήρα. Το σύνολο των πειραμάτων που παρουσιάζονται εδώ αφορούν χρόνο επώαση κυττάρων σε συγκέντρωση Αβ 2 μΜ για 15 λεπτά. Προκειμένου να γίνει ποσοτική αξιολόγηση, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 2 μΜ Αβ για 15 λεπτά, συνθήκη στην οποία παρατηρήθηκε ισχυρή πρόσληψη Αβ. Όπως είναι ήδη γνωστό, η ενδοθηλιακή πρόσληψη του Αβ αποτελεί βασικό μηχανισμό κάθαρσης μέσω του BBB. Ενώ η κλαθρίνο-εξαρτώμενη ενδοκύτωση (clathrin mediated endocytosis - CME) μέσω υποδοχέων όπως LRP1 και RAGE έχει μελετηθεί εκτενώς, αποτελεί μόνο μία από τις διαθέσιμες οδούς. Προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανή συμβολή της μακροπινουκτάρωσης, ως μηχανισμός πρόσληψης του Αβ, αξιολογήθηκε ο βαθμός συγκατανομής μεταξύ Αβ και Dextran-Texas Red (70 kDa), κλασικού δείκτη μακροπινουκταρικών κυστιδίων. Τα πειράματα μικροσκοπίας, όπως ενδεικτικά απεικονίζονται στην Εικόνα 5 έδειξαν μερική επικάλυψη, υποδεικνύοντας ότι μέρος του Αβ εισέρχεται μέσω μακροπινουκτάρωσης. Περαιτέρω φαρμακολογική αναστολή κατέδειξε ότι: ο αναστολέας EIPA μείωσε την πρόσληψη Αβ κατά ~65% στα BECs και ~46% στα HUVECs, ο αναστολέας του μονοπατιού CME dynasore μείωσε την πρόσληψη κατά 40% και 16% αντίστοιχα, ενώ ο συνδυασμός των δύο αναστολών μείωσε την πρόσληψη κατά ~85% (Εικόνα 5 A και B). Τα αποτελέσματα αυτά υπογραμμίζουν τον συμπληρωματικό ρόλο της μακροπινουκτάρωσης και της CME στην πρόσληψη και κάθαρση του Αβ από ενδοθηλιακά κύτταρα του BBB.



**Εικόνα 5.** Η μακροπινोकυττάρωση και η ενδοκυττάρωση μέσω κλαθρίνης συμβάλλουν στην πρόσληψη του Αβ από ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου. (Α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες confocal από HBMEC δείχνουν συνεντοπισμό του Αβ (πράσινο) και της Dextran 70 kDa (κόκκινο) μετά από 15 λεπτά συνεπάωσης, υποδεικνύοντας πρόσληψη μέσω μακροπινोकυτταρικών κυστιδίων. Οι εικόνες δείχνουν επίσης εσωτερίκευση του Αβ μετά από 30 λεπτά προ-επεξεργασίας με 50  $\mu$ M EIPA, 100  $\mu$ M Dynasore ή τον συνδυασμό τους. Γραμμή κλίμακας: 5  $\mu$ m. (Β) Ποσοτικοποίηση της ενδοκυτταρικής έντασης φθορισμού του Αβ ανά κύτταρο. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή  $\pm$  SD από τουλάχιστον 20 κύτταρα ανά συνθήκη σε τρία ανεξάρτητα πειράματα.  $p < 0.05$ , one-way ANOVA. ns: μη σημαντικές διαφορές. \*  $p < 0.05$ . \*\*  $p < 0.01$ . \*\*\*  $p < 0.001$ . \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Προς περαιτέρω επιβεβαίωση αυτών των ευρημάτων, προχωρήσαμε σε καταστολή της έκφρασης των πρωτεϊνών Rac1 και Cdc42 μέσω siRNA, οι οποίες αποτελούν βασικούς ρυθμιστές της μακροπινोकυττάρωσης. Η αποτελεσματική καταστολή αυτών των γονιδίων επιβεβαιώθηκε με πειράματα western blotting, Εικόνα 6Α. Η καταστολή της έκφρασης των Rac1 και Cdc42 οδήγησε σε σημαντική μείωση στην πρόσληψη του Αβ κατά περίπου 50% και 40% αντίστοιχα (Εικόνα 6C και D). Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν ότι η μακροπινोकυττάρωση, μαζί με την ενδοκυττάρωση μέσω κλαθρίνης (CME), ως κύριες οδούς που διευκολύνουν τη μεταφορά και κάθαρση του Αβ διαμέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού.



**Εικόνα 6.** Η καταστολή της έκφρασης των Rac1 ή Cdc42 μειώνει την πρόσληψη Αβ42 και Dextran70 σε ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου. Α, Β. Ανάλυση Western blot που αποτυπώνει την αποτελεσματική καταστολή της έκφρασης των Rac1 (50 nM siRNA, πεπτίδιο C) και Cdc42 (10 nM siRNA, πεπτίδιο B ή C)

στα BECs, 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ισοφόρτωσης. C. Αντιπροσωπευτικές εικόνες confocal από κύτταρα BECs που επώαστηκαν με 2  $\mu$ M A $\beta$ 42 (πράσινο) και 1.5 mg/mL Texas Red-Dextran70 (κόκκινο) για 15 λεπτά στους 37 °C. Οι πυρήνες χρωματίστηκαν με Hoechst 33342 (μπλε). Τα κύτταρα στα οποία έγινε καταστολή έναντι των Rac1 ή Cdc42 εμφάνισαν μειωμένη πρόσληψη τόσο του A $\beta$ 42 όσο και της Dextran70 σε σύγκριση με τα κύτταρα-μάρτυρες όπου έγινε διαμόλυνση με scramble siRNA. Γραμμή κλίμακας: 5  $\mu$ m. D. Ποσοτικοποίηση της ενδοκυτταρικής έντασης φθορισμού ανά κύτταρο για την πρόσληψη A $\beta$ 42 και Dextran70. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή  $\pm$  SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα ( $\geq 20$  κύτταρα/συνθήκη). Η καταστολή του Rac1 οδήγησε σε ~50% μείωση της πρόσληψης A $\beta$ 42, ενώ η καταστολή του Cdc42 σε ~40% μείωση, σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Παρόμοια πρότυπα παρατηρήθηκαν και για το Dextran70. \*\* $p < 0.01$ . \*\*\* $p < 0.001$ . \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα αυτά ταυτοποιούν τη μακροπinoκυττάρωση ως συμπληρωματικό μηχανισμό της CME στη μεσολάβηση της κάθαρσης του A $\beta$  από τα ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Basagiannis, D., Zografou, S., Goula, E., Gkeka, D., Kolettas, E., & Christoforidis, S. (2021). Chemical Inhibitors of Dynamin Exert Differential Effects in VEGF Signaling. *Cells*, 10. <https://doi.org/10.3390/cells10050997>
- Basagiannis, D., Zografou, S., Murphy, C., Fotsis, T., Morbidelli, L., Ziche, M., Bleck, C., Mercer, J., & Christoforidis, S. (2016). VEGF induces signalling and angiogenesis by directing VEGFR2 internalisation through macropinocytosis. *Journal of Cell Science*, 129(21), 4091–4104. <https://doi.org/10.1242/jcs.188219>
- Cao, Y., Gong, Y., Liu, L., Zhou, Y., Fang, X., Zhang, C., Li, Y., & Li, J. (2017). The use of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) as an in vitro model to assess the toxicity of nanoparticles to endothelium: A review. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 37(12), 1359–1369. <https://doi.org/10.1002/jat.3470>
- Chavis, P., Mollard, P., Bockaert, J., & Manzoni, O. (1998). Visualization of Cyclic AMP–Regulated Presynaptic Activity at Cerebellar Granule Cells. *Neuron*, 20(4), 773–781. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81015-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81015-6)
- Cheng, Y., Zak, O., Aisen, P., Harrison, S. C., & Walz, T. (2004). Structure of the Human Transferrin Receptor-Transferrin Complex. *Cell*, 116(4), 565–576. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00130-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00130-8)
- Cho, S.-J., Park, M. H., Han, C., Yoon, K., & Koh, Y. H. (2017). VEGFR2 alteration in Alzheimer’s disease. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18042-1>
- Conner, S. D., & Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422(6927), 37–44. <https://doi.org/10.1038/nature01451>
- Deane, R., Bell, R., Sagare, A., & Zlokovic, B. (2009). Clearance of amyloid- $\beta$  peptide across the blood-brain barrier: Implication for therapies in Alzheimer’s disease. *CNS & neurological disorders drug targets*, 8(1), 16–30. <https://dx.doi.org/10.2174/187152709787601867>
- Dharmawardhane, S., Schürmann, A., Sells, M. A., Chernoff, J., Schmid, S. L., & Bokoch, G. M. (2000). Regulation of Macropinocytosis by p21-activated Kinase-1. *Molecular Biology of the Cell*, 11(10), 3341–3352.
- Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), 857–902. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540>

- Fertig, B. A., & Baillie, G. S. (2018). PDE4-Mediated cAMP Signalling. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 5(1), 8. <https://doi.org/10.3390/jcdd5010008>
- Kocherova, I., Bryja, A., Mozdziak, P., Angelova Volponi, A., Dyszkiewicz-Konwińska, M., Piotrowska-Kempisty, H., Antosik, P., Bukowska, D., Bruska, M., Iżycki, D., Zabel, M., Nowicki, M., & Kempisty, B. (2019). Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Co-Culture with Osteogenic Cells: From Molecular Communication to Engineering Prevascularised Bone Grafts. *Journal of Clinical Medicine*, 8(10), 1602. <https://doi.org/10.3390/jcm8101602>
- Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C., & Kirchhausen, T. (2006). Dynasore, a Cell-Permeable Inhibitor of Dynamin. *Developmental Cell*, 10(6), 839–850. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.04.002>
- Martinez, A., & Gil, C. (2014). cAMP-specific phosphodiesterase inhibitors: Promising drugs for inflammatory and neurological diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 24(12), 1311–1321. <https://doi.org/10.1517/13543776.2014.968127>
- Mercer, J., & Helenius, A. (2009). Virus entry by macropinocytosis. *Nature Cell Biology*, 11(5), 510–520. <https://doi.org/10.1038/ncb0509-510>
- Nunes, A. R., Batuca, J. R., & Monteiro, E. C. (2010). Acute hypoxia modifies cAMP levels induced by inhibitors of phosphodiesterase-4 in rat carotid bodies, carotid arteries and superior cervical ganglia. *British Journal of Pharmacology*, 159(2), 353–361. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00534.x>
- Prichard, K. L., O'Brien, N. S., Murcia, S. R., Baker, J. R., & McCluskey, A. (2022). Role of Clathrin and Dynamin in Clathrin Mediated Endocytosis/Synaptic Vesicle Recycling and Implications in Neurological Diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.754110>