



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: Εγκαθίδρυση κυτταρικού μοντέλου απομάκρυνσης αμυλοειδούς, με ενδοθηλιακά κύτταρα ασθενών με Alzheimer.

ΕΝΟΤΗΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 4: Ανάπτυξη καινοτόμων προκλινικών θεραπευτικών παρεμβάσεων κατά της πρόωρης εμφάνισης νευροεκφυλιστικών νοσημάτων Alzheimer και Parkinson..

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

Εγκαθίδρυση κυτταρικού μοντέλου απομάκρυνσης αμυλοειδούς, με ενδοθηλιακά κύτταρα ασθενών με Alzheimer

ΣΥΝΤΟΜΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Το βασικό χαρακτηριστικό της νόσου Αλτσχάιμερ είναι η εξωκυτταρική προσδευτική συσσώρευση του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου (Αβ) στον εγκέφαλο και ο επακόλουθος σχηματισμός αμυλοειδών πλακών. Στη συσσώρευση αμυλοειδούς, αν και η κύρια ερευνητική εστίαση μέχρι τώρα ήταν ο ρόλος των νευρωνικών κυττάρων, και των σχετικών τους νευρογλοιακών κυττάρων και αστροκυττάρων, είναι επίσης γνωστό ότι τα αγγεία του εγκεφάλου, και κυρίως τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της νόσου. Έτσι, το υγιές αγγειακό δίκτυο του εγκεφάλου παίζει καίριο ρόλο στην απομάκρυνση του πεπτιδίου Αβ μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού προς την κυκλοφορία του αίματος, οδηγώντας το έτσι σε αποικοδόμηση σε άλλα όργανα του σώματος. Αντίθετα, σε ασθενείς με νόσο Αλτσχάιμερ, η δυσλειτουργία των αγγείων, και πιο συγκεκριμένα των ενδοθηλιακών κυττάρων, οδηγεί σε αδυναμία απομάκρυνσης του αμυλοειδούς. Λόγω της σημασίας των ενδοθηλιακών κυττάρων στη νόσο Αλτσχάιμερ, σκοπός του παρόντος παραδοτέου ήταν η εγκαθίδρυση ενός in vitro πειραματικού μοντέλου μελέτης της απομάκρυνσης του Αβ αμυλοειδούς, μέσω των ενδοθηλιακών κυττάρων που προέρχονται από ασθενείς. Για το σκοπό αυτό, αναπτύξαμε ένα in vitro μοντέλο αιματοεγκεφαλικού φραγμού σε transwell inserts, χρησιμοποιώντας ενδοθηλιακά κύτταρα που παράχθηκαν από διαφοροποίηση hiPSCs από ασθενείς με νόσο Alzheimer με γονότυπο APOE 4/4. Για σύγκριση χρησιμοποιήθηκαν ισογενή κύτταρα που φέρουν διόρθωση της γονοτυπικής βλάβης.

Συνοπτική περιγραφή του έργου που υλοποιήθηκε

Τα πρωταρχικά βασικά βήματα του μοντέλου αυτού μελετήθηκαν με χρήση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων HUVECs, που είναι ένα εύχρηστο και οικονομικό μοντέλο, με σκοπό στη συνέχεια να επιβεβαιώσουμε τη εφαρμογή του μοντέλου σε κύτταρα ασθενών.

Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα (HUVEC) απομονώθηκαν από τη φλέβα υγιών ομφαλικών λώρων. Τα πρωτογενή απομονωμένα HUVEC είναι από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα ΕΚ στην έρευνα. Η προτίμηση αυτή απορρέει από τη σχετικά άφθονη διαθεσιμότητα των ανθρώπινων ομφαλικών φλεβών σε σύγκριση με άλλους τύπους αιμοφόρων αγγείων, καθιστώντας τα HUVEC μια ευρέως προσβάσιμη πηγή για in vitro μελέτες της αγγειακής βιολογίας (Cao et al., 2017; Kocherova et al., 2019). Τα HUVEC καλλιεργήθηκαν είτε σε μέσο ανάπτυξης ενδοθηλιακών κυττάρων (EGM) συμπληρωμένο με κιτ που περιείχε FCS, γλουταμίνη, ηπαρίνη, VEGF, EGF, bFGF,

R3-IGF-1, γενταμικίνη/αμφοτερικίνη υδροκορτιζόνη (PELOBiotech, PB-SH-100-2199), είτε με M199 (PAN Biotech, P04-07500) εμπλουτισμένο με 20% εμβρυϊκό ορό βοοειδών (FBS) (BioSera, FB-1001B/500), 0.035 mg/ml ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement) που απομονώθηκε από τον εγκέφαλο βοοειδών, 0,05 IU ηπαρίνη/ml (Merck, H3149 - 100KU), 1% L-γλουταμίνη (PAA Cell Culture Company, M11-004) και 1% πενικιλίνη/στρεπτομικίνη (ThermoFisher Scientific, Invitrogen, Antimycotic-Antibiotic, 15240062). Σε όλες τις πειραματικές διατάξεις χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα με περάσματα μεταξύ 1-8. Συγκεκριμένα, τα HUVEC διατηρήθηκαν μέχρι το πέρασμα 4 όταν καλλιεργήθηκαν σε M199, ενώ χρησιμοποιήθηκαν μέχρι το πέρασμα 8 όταν καλλιεργήθηκαν σε EGM.

Προκειμένου να αυξήσουμε τον φραγμό μεταξύ των HUVECs, ώστε να προσομοιάζουν καλύτερα το BBB, χρησιμοποιήσαμε ενώσεις που αυξάνουν την ενδοκυτταρική cAMP. Η ενδοκυτταρική cAMP μειώνει τη διαπερατότητα των μικροαγγείων αυξάνοντας τον αριθμό των κλώνων TJ μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων (Viña et al., 2021), οπότε η αύξηση της συγκέντρωσης cAMP με τη επώαση με αυτές τις ενώσεις αναμένεται να ενισχύσει τις λειτουργίες φραγμού στα HUVEC και να προκαλέσει φαινότυπο που μοιάζει με BBB.

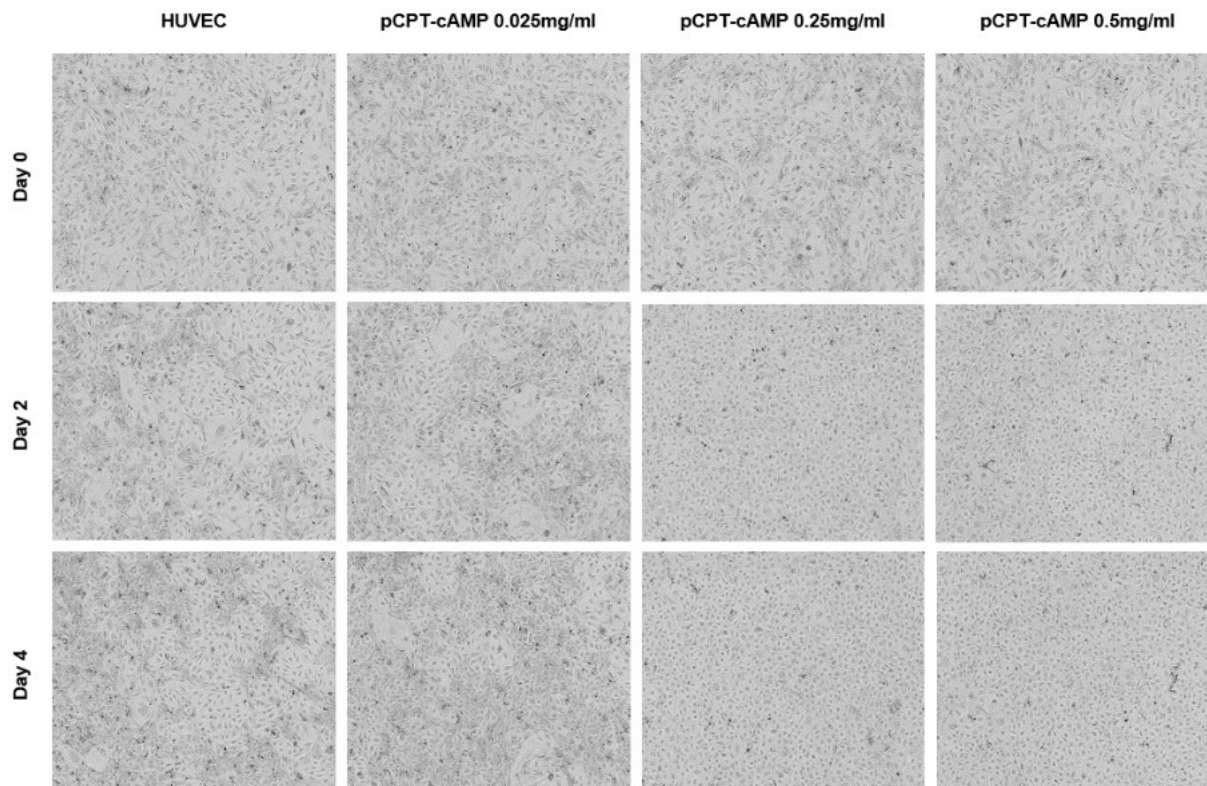
Οι ενώσεις που δοκιμάστηκαν είναι το pCPT-cAMP και το Ro 20-1724. Το pCPT-cAMP είναι ένα διαπερατό από τη μεμβράνη ανάλογο cAMP, το οποίο ενεργοποιεί επιλεκτικά την εξαρτώμενη από το cAMP PKA και αναστέλλει την εξαρτώμενη από το cAMP φωσφοδιεστεράση (PDE), αυξάνοντας έτσι τα επίπεδα cAMP στο εσωτερικό του κυττάρου (Chavis et al., 1998; Martinez & Gil, 2014). Το Ro 20-1724 είναι ένας εκλεκτικός αναστολέας της PDE4 και η αναστολή της PDE4 έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει τη σηματοδότηση cAMP (Nunes et al., 2010- Fertig & Baillie, 2018). Η προσέγγισή μας περιλαμβάνει τον χαρακτηρισμό των επιδράσεων αυτών των ενώσεων στη μορφολογία των HUVEC, στις στενές συνδέσεις (TJ) και στις συνδέσεις προσκόλλησης (AJ), στην κυτταροτοξικότητα των κυττάρων και στον ρυθμό πολλαπλασιασμού. Στη συνέχεια, αξιολογήσαμε κατά πόσον είναι εφαρμόσιμες σε ένα σύστημα transwell για την επίτευξη υψηλότερης διαενδοθηλιακής ηλεκτρικής αντίστασης (TEER) και χαμηλότερης παρακυτταρικής διαπερατότητας.

Μορφολογικές αλλαγές σε HUVEC που διεγείρονται με pCPT-cAMP

Οι καλλιέργειες HUVEC διατηρήθηκαν για τέσσερις ημέρες στο σύστημα ανάλυσης ζωντανών κυττάρων Incucyte ZOOM, το οποίο παρέχει ένα βελτιστοποιημένο περιβάλλον κυτταρικής καλλιέργειας και ένα ολοκληρωμένο αυτοματοποιημένο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης. Η ανάπτυξη και η ωρίμανση της μορφολογίας των κυττάρων παρακολουθήθηκαν σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (ημέρα 0, ημέρα 2, ημέρα 4) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις pCPT-cAMP (0,025 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml). Μέχρι την ημέρα 2, τα κύτταρα που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με 0,25 mg/ml ή 0,5 mg/ml pCPT-cAMP σχημάτισαν ένα μοτίβο ομοιόμορφα

καταμετρημένο σε όλη την επιφάνεια της καλλιέργειας (Εικόνα 1- pCPT-cAMP 0,25 mg/ml, pCPT-cAMP 0,5 mg/ml). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι συγκεντρώσεις αυτές μείωσαν σημαντικά την εξάπλωση των κυττάρων και προώθησαν μια στρογγυλεμένη μορφολογία. Αντίθετα, τα κύτταρα ελέγχου και εκείνα που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με τη χαμηλότερη συγκέντρωση pCPT-cAMP (0,025 mg/ml) παρουσίασαν μια λιγότερο συνεκτική μονοστιβάδα με αξιοσημείωτες ασυνέχειες (Εικόνα 1- HUVEC, pCPT-cAMP 0,025 mg/ml).

Ως εκ τούτου, η μικροσκοπία αντίθεσης φάσης αποκάλυψε ότι η μονοστιβάδα κυττάρων έφτασε σε ωριμότητα με τις μεσαίες και υψηλές συγκεντρώσεις pCPT-cAMP έως την ημέρα 2. Κατά συνέπεια, αποφασίσαμε να επώασουμε τα κύτταρα με pCPT-cAMP για 2 ημέρες από εδώ και στο εξής, καθώς αυτή η διάρκεια διατήρησε αποτελεσματικά ένα συνεχές ενδοθηλιακό στρώμα και ήταν η ελάχιστη απαιτούμενη για την επίτευξη αυτού του αποτελέσματος.



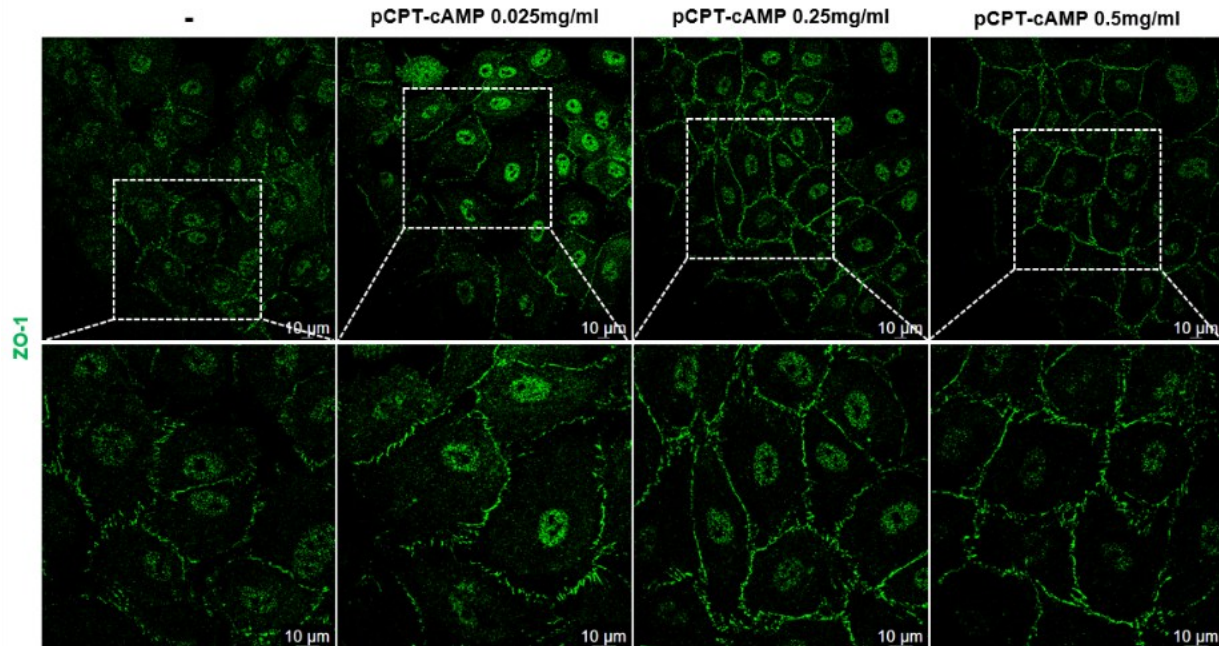
Εικόνα 1: Μικροσκοπία αντίθεσης φάσης των HUVEC που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με διάφορες συγκεντρώσεις pCPT-cAMP. Τα HUVEC σπάρθηκαν σε πλάκα 96 πηγαδιών σε πυκνότητα 2×10^4 κυττάρων/πηγάδι, ακολουθούμενη από επεξεργασία με διάφορες συγκεντρώσεις pCPT-cAMP. Τα HUVEC καλλιεργήθηκαν και παρακολούθηθηκαν με τη χρήση του συστήματος ανάλυσης ζωντανών κυττάρων Incucyte ZOOM. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές μικροφωτογραφίες τριών πειραμάτων. Φακός: 10x.

Επώαση με ενώσεις που αυξάνουν το ενδοκυτταρικό cAMP μεταβάλλει τις στενές και προσκολλητικές συνδέσεις

Στη συνέχεια, εξετάσαμε πώς η θεραπεία με ενώσεις που αυξάνουν το ενδοκυτταρικό cAMP (pCPT-cAMP ή/και Ro 20-1724) επηρέασε τις συνδέσεις κυττάρων-κυττάρων. Αυτό είναι σημαντικό, διότι η ακεραιότητα της ενδοθηλιακής μονοστιβάδας, η οποία αποτελεί βασικό δείκτη του BBB, εξαρτάται από την ακριβή ρύθμιση των συνδέσεων κυττάρων-κυττάρων (στενές συνδέσεις και συνδέσεις adherens).

Πρώτον, οι συνεχείς μονοστρώσεις ενδοθηλιακών κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε πλάκες ibidi εκτέθηκαν σε επεξεργασία 2 ημερών με ποικίλες συγκεντρώσεις pCPT-cAMP (0,025mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5mg/ml). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανοσοχρωματισμός για την πρωτεΐνη ZO-1 που σχετίζεται με τη στεγανή σύνδεση, προκειμένου να αναλυθεί η κυτταρική κατανομή της ως απόκριση στη θεραπεία με pCPT-cAMP. Τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν χωρίς την προσθήκη pCPT-cAMP μαζί με εκείνα που καλλιεργήθηκαν με τη μικρότερη συγκέντρωση pCPT-cAMP (0,025mg/ml), παρουσίασαν ασυνεχείς κλώνους ZO-1 και μεσοκυττάρια κενά (Εικόνα 2). Αυτό υποδηλώνει ότι τα μη επεξεργασμένα HUVEC ή εκείνα που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με 0,025mg/ml pCPT-cAMP, δεν κατάφεραν να προκαλέσουν τη σωστή συναρμολόγηση του συνεχούς δικτύου στενών συνδέσεων. Αντίθετα, η προσθήκη 0,25mg/ml ή 0,5mg/ml pCPT-cAMP για δύο ημέρες προώθησε το σχηματισμό συνεχών κλώνων συνδέσεων ZO-1 και οδήγησε σε μια πιο γραμμική μορφολογία (Εικόνα 2). Τα ευρήματα αυτά συνάδουν με το σχηματισμό και την ωρίμανση μιας μονοστρωμάτωσης κυττάρων όταν αντιμετωπίστηκαν με 0,25mg/ml ή 0,5mg/ml pCPT-cAMP για 2 ημέρες (Εικόνα 2).

Έτσι, αποφασίσαμε από εδώ και στο εξής να επωάζουμε τα HUVEC με 0,25mg/ml pCPT-cAMP για 2 ημέρες, καθώς είναι η ελάχιστη συγκέντρωση που απαιτείται για να προκληθεί ο εντοπισμός της πρωτεΐνης ZO-1 που σχετίζεται με τη στεγανή σύνδεση στην περιοχή των επαφών κυττάρου-κυττάρου, σχηματίζοντας μια συνεχή ζώνη που ακολουθεί το όριο του κυττάρου.

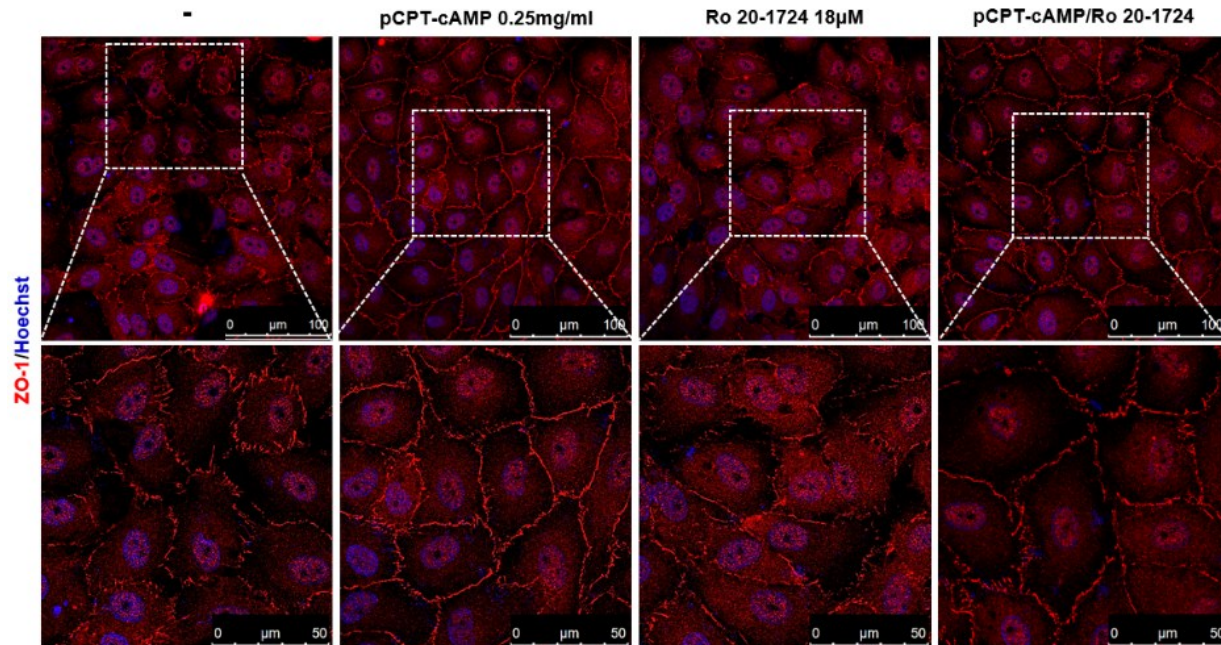


Εικόνα 2: Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων pCPT-cAMP στο σχηματισμό του ZO-1. Τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν για 2 ημέρες με διαφορετικές συγκεντρώσεις pCPT-cAMP (0,025mg/ml, 0,25mg/ml, 0,5mg/ml), χρωματίστηκαν για την πρωτεΐνη ZO-1 (πράσινη) που σχετίζεται με τη στεγανή σύνδεση και αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία λέιζερ. Απεικονίζονται αντιπροσωπευτικές μικρογραφίες από δύο ανεξάρτητα πειράματα. Μπάρα κλίμακας = 10μm.

Στη συνέχεια διερευνήσαμε αν μια άλλη ένωση που αυξάνει την ενδοκυτταρική cAMP, η Ro 20-1724, θα μπορούσε να προκαλέσει παρόμοια αποτελέσματα. Δημιουργήσαμε τέσσερις πειραματικές συνθήκες: HUVEC χωρίς επώαση, ή κύτταρα που υποβλήθηκαν σε επώαση με 0,25 mg/ml pCPT-cAMP, με 18 μM Ro 20-1724 ή με συνδυασμό και των δύο για 2 ημέρες (Εικόνα 3). Η συνεστιακή απεικόνιση αποκάλυψε ότι η επώαση με pCPT-cAMP παρήγαγε σταθερά αποτελέσματα, ενισχύοντας τον εντοπισμό του ZO-1 στις επαφές κυττάρου-κυττάρου. Είναι ενδιαφέρον ότι η επώαση με Ro 20-1724 έδειξε αποτελέσματα παρόμοια με τα μη επεξεργασμένα HUVEC, παρουσιάζοντας ασυνεχείς επαφές της ZO-1 και διακυτταρικά κενά. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν με χρήση μόνο της pCPT-cAMP ήταν ανώτερα από εκείνα που παρατηρήθηκαν με τη συνδυασμένη επώαση και των δύο ενώσεων, επειδή ο σχηματισμός του ZO-1 ήταν πιο ομοιόμορφος.

Συνολικά, η ανάλυση ανοσοφθορισμού των HUVEC που υποβλήθηκαν σε επώαση με τις ενώσεις pCPT-cAMP και/ή Ro 20-1724, αποκάλυψε ότι μόνο η pCPT-cAMP αύξησε τη συνέχεια της χρώσης του μορίου ZO-1 που σχετίζεται με τη στενή σύνδεση των κυττάρων. Με βάση αυτά

τα ευρήματα, αποφασίσαμε να προχωρήσουμε σε επώσεις αποκλειστικά με pCPT-cAMP σε συγκέντρωση 0,25 mg/ml για 2 ημέρες στα επόμενα πειράματα.



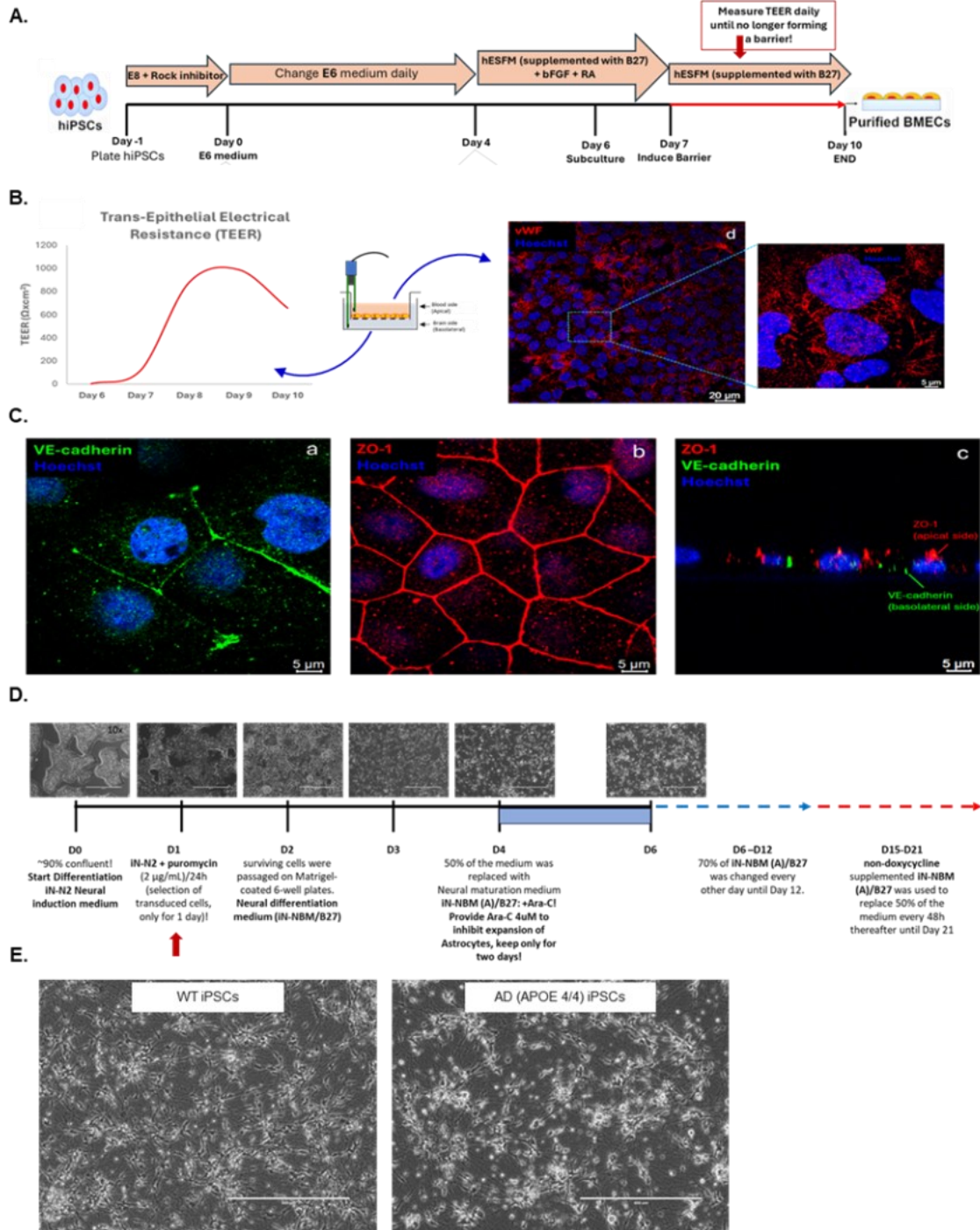
Εικόνα 3: Επίδραση του pCPT-cAMP και του Ro 20-1724 στο σχηματισμό του ZO-1. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 2 ημέρες με 0,25 mg/ml pCPT-cAMP και/ή 18μM Ro 20-1724, χρωματίστηκαν για την πρωτεΐνη ZO-1 (κόκκινο) που σχετίζεται με τη στενή σύνδεση και αναλύθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία λέιζερ. Οι πυρήνες χρωματίστηκαν με Hoechst (μπλε). Απεικονίζονται αντιπροσωπευτικές μικροφωτογραφίες δύο ανεξάρτητων πειραμάτων. Μπάρα κλίμακας = 100μm (πάνω), 50μm (κάτω).

Από το σύνολο των πειραμάτων αυτών προκύπτουν οι συνθήκες που απαιτούνται για την καλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων ώστε να έχουν ισχυρούς συνδέσμους που να προσομοιάζουν τον BBB. Έχοντας φτάσει στα ικανοποιητικά αυτά αποτελέσματα, προχωρήσαμε στην εφαρμογή του μοντέλου αυτού σε κύτταρα ασθενών με NA.

Για το σκοπό αυτό, αρχικά πραγματοποιήθηκε η διαφοροποίηση ανθρώπινων κυτταρικών σειρών iPSC σε λειτουργικά εγκεφαλικά ενδοθηλιακά κύτταρα, με επιβεβαίωση του φαινοτύπου τους μέσω της έκφρασης δεικτών στενών συνδέσεων και μετρήσεων διαδιαμεμβρανικής ηλεκτρικής αντίστασης (Trans epithelial/Trans endothelial Electrical Resistance- TEER), εικόνα 4. Με τη χρήση αυτών των κυττάρων δημιουργήθηκε ένα αναπαραγωγίμο in vitro μοντέλο αιματοεγκεφαλικού φραγμού (blood-brain barrier -BBB), στο οποίο πραγματοποιήθηκαν

δοκιμές διαπερατότητας, καταδεικνύοντας ότι η έκθεση σε Αβ επηρεάζει την ακεραιότητα του φραγμού. Επιπλέον, διαφοροποιήθηκαν iPSCs από υγιείς δότες και ασθενείς με AD σε εγκεφαλικά ενδοθηλιακά κύτταρα (BECs) και διεγερτικούς νευρώνες. Τα διαφοροποιημένα BECs παρουσίασαν χαρακτηριστικά BBB, επιβεβαιωμένα από αύξηση στις μετρήσεις TEER και έκφραση του ενδοθηλιακού δείκτη vWF. Η ακεραιότητα των συνδέσεων επαληθεύτηκε με χρώση VE-cadherin και ZO-1, υποδηλώνοντας πολικότητα και σχηματισμό μονοστιβάδας. Ωστόσο, η βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου διαφοροποίησης των iPSCs προς BECs αποδείχθηκε πιο απαιτητική από το αναμενόμενο, οδηγώντας σε καθυστέρηση στη δημιουργία σταθερών, αναπαραγωγίμων μονοστρωμάτων iPSC-BECs. Για την απρόσκοπτη συνέχιση της υλοποίησης και την τήρηση του χρονοδιαγράμματος, χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα Human Brain Microvascular Endothelial Cells (HBMVECs) και Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs). Τα κύτταρα αυτά επέδειξαν κατάλληλα ενδοθηλιακά χαρακτηριστικά και χρησιμοποιήθηκαν για τα περαιτέρω πειράματα διαπερατότητας και μεταφοράς αμυλοειδούς - Αβ. Με τα κυτταρικά αυτά μοντέλα αυτά μελετήθηκε με επιτυχία η πρόσληψη και μεταφορά του Αβ μέσω του ενδοθηλιακού στρώματος, επιβεβαιώνοντας την καταλληλότητά τους για την περαιτέρω διερεύνηση των μηχανισμών κάθαρσης.

Παράλληλα, διαφοροποιήθηκαν διεγερτικοί νευρώνες από iPSCs WT και AD, οι οποίοι εμφάνισαν χαρακτηριστική νευρωνική μορφολογία μετά από 21 ημέρες διαφοροποίησης. Οι τρέχουσες προσπάθειες επικεντρώνονται στην ολοκλήρωση του συστήματος συν-καλλιέργειας στο σύστημα transwell, το οποίο συνδυάζει το ενδοθηλιακό και το νευρωνικό διαμέρισμα για την προσομοίωση φυσιολογικών αλληλεπιδράσεων BBB. Σε επόμενο στάδιο, αυτή η συν-καλλιέργεια θα χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση του τρόπου με τον οποίο το Αβ που εκκρίνεται από νευρώνες προερχόμενους από AD προσλαμβάνεται από τα εγκεφαλικά ενδοθηλιακά κύτταρα, καθώς και την αποσαφήνιση των ειδικών μηχανισμών που διέπουν τη διαδικασία αυτή.



Εικόνα 4. Διαφοροποίηση iPSC σε ενδοθηλιακά κύτταρα εγκεφάλου (BECs) και διεγερτικούς νευρώνες.

A. Σχηματική επισκόπηση του πρωτοκόλλου διαφοροποίησης που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία ενδοθηλιακών κυττάρων εγκεφάλου από iPSC υγιών δοτών και ασθενών με AD.

B. Επικύρωση των ιδιοτήτων του αιματοεγκεφαλικού φραγμού των διαφοροποιημένων BECs μέσω μετρήσεων διαδιαμεμβρανικής ηλεκτρικής αντίστασης (TEER) και αντιπροσωπευτικών εικόνων confocal έπειτα από ανοσοφθορισμό για τον ενδοθηλιακό δείκτη von Willebrand factor

(vWF).

C. Ακραιότητα ενδοθηλιακών συνδέσεων, αντιπροσωπευτικές εικόνες μικροσκοπίας *confocal* που δείχνουν την έκφραση VE-cadherin και ZO-1, επιβεβαιώνοντας την πόλωση και τον σχηματισμό μονοστρώματος.

D. Σχηματική επισκόπηση του πρωτοκόλλου διαφοροποίησης που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία διεγερτικών νευρώνων. E. Ενδεικτικές εικόνες νευρώνων μετά από 21 ημέρες διαφοροποίησης από iPSC τύπου WT και ασθενών με AD.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα υποενότητα εγκαθιδρύθηκε ένα λειτουργικό ενδοθηλιακό σύστημα φραγμού χρησιμοποιώντας πρωτογενή/εμπορικά BECs, ολοκληρώθηκαν οι απαιτούμενες αναλύσεις πρόσληψης και διαπερατότητας, η διαφοροποίηση των iPSC-BECs έχει πλέον βελτιστοποιηθεί, με αναπαραγωγίμες παρτίδες σε παραγωγή, ενώ τα πειράματα συνεκτροφής AD-νευρώνων με iPSC-BECs βρίσκονται σε εξέλιξη και αναμένεται να ολοκληρωθούν σύντομα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 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)
- 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., Mozdzia, P., Angelova Volponi, A., Dyszkiewicz-Konwińska, M., Piotrowska-Kempisty, H., Antosik, P., Bukowska, D., Bruska, M., Izycki, 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>
- 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>

- 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>
- Viña, D., Seoane, N., Vasquez, E. C., & Campos-Toimil, M. (2021). cAMP Compartmentalization in Cerebrovascular Endothelial Cells: New Therapeutic Opportunities in Alzheimer’s Disease. *Cells*, 10(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/cells10081951>