



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Fisiologia cellulare e molecolare

**Il ruolo del canale meccanosensibile Piezo1 nella regolazione della
funzione microvascolare dell’endotelio cerebrale umano**

Relatore:

Dr.ssa Giorgia Scarpellino

Correlatore:

Dr.ssa Valentina Brunetti

Tesi Sperimentale di

Martina Chiesa

Anno Accademico 2025/2026

INTRODUZIONE.....	4
1 Unità NeuroVascolare.....	4
1.1 Caratteristiche dell'unità neurovascolare	4
1.2 La Barriera EmatoEncefalica.....	6
2 Accoppiamento NeuroVascolare.....	10
2.1 Il ruolo delle cellule nervose nell'ANV	11
2.2 Il ruolo dell'endotelio nell'ANV	13
3 I segnali di Ca^{2+} nelle cellule endoteliali.....	16
4 La meccanotrasduzione nelle cellule endoteliali.....	19
5 I Canali Piezo.....	20
5.1 Struttura e caratteristiche generali dei canali Piezo	20
5.2 I canali Piezo nelle cellule endoteliali.....	23
6 SCOPO DEL LAVORO.....	25
7 MATERIALI & METODI.....	26
7.1 Coltura cellulare delle cellule hCMEC/D3	26
7.2 Soluzioni utilizzate	26
7.3 Imaging del Ca^{2+} e del NO	26
7.4 Shear Stress	28
7.5 Analisi dati relativi ai segnali di Ca^{2+}	28
7.6 Patch-clamp in configurazione whole-cell.....	29
7.7 Silenziamento genico	30
7.8 Immunoblotting	30
7.9 Immunofluorescenza	31
7.10 Microscopia a fluorescenza.....	31
8 RISULTATI	33
8.1 Il canale meccanosensibile Piezo1 è espresso nelle cellule hCMEC/D3.....	33
8.2 L'attivazione farmacologica di Piezo1 induce un aumento del Ca^{2+} intracellulare nelle cellule hCMEC/D3.....	34
8.3 Lo shear stress stimola un aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} mediato da Piezo1 nelle cellule hCMEC/D3.....	36
8.4 Piezo1 attiva segnali vasomodulatori Ca^{2+} -dipendenti nelle cellule hCMEC/D3.....	37
8.5 L'attivazione di Piezo1 inibisce la migrazione delle cellule hCMEC/D3.....	39
9 DISCUSSIONE.....	41
10 CONCLUSIONI.....	46

11	BIBLIOGRAFIA.....	47
-----------	--------------------------	-----------

INTRODUZIONE

1 Unità NeuroVascolare

1.1 Caratteristiche dell'unità neurovascolare

Negli ultimi decenni, la comunità scientifica ha mostrato un crescente interesse nei confronti della stretta relazione che intercorre tra il cervello e la fitta rete di vasi sanguigni che ne garantisce l'irrorazione. Tale relazione ha acquisito particolare rilevanza a partire dall'introduzione, nel 2001, del concetto di Unità NeuroVascolare (UNV) (*Lecrux & Hamel 2011*). In precedenza, infatti, le cellule cerebrali e il sistema vascolare erano considerate come entità funzionalmente distinte; questa visione dicotomica implicava il presupposto che l'attività neuronale e la vascolarizzazione fossero sostanzialmente indipendenti l'una dall'altra (*Yang et al., 2024*).

Il concetto di UNV ha messo in discussione tale visione, mettendo in luce la relazione simbiotica tra cellule cerebrali e vasi sanguigni cerebrali. L' UNV è definita come l'unità funzionale costituita da cellule nervose (neuroni, interneuroni e astrociti) che si trovano in stretta prossimità anatomica e in accoppiamento funzionale con le componenti vascolari (cellule endoteliali, cellule muscolari lisce e periciti), nonché con gli elementi della matrice extracellulare (*Guerra et., al 2018*).

La stretta e complessa interazione tra queste diverse componenti cellulari è fondamentale per garantire un adeguato apporto di sangue, ossigeno e nutrienti al tessuto cerebrale, nonché l'eliminazione dei prodotti di scarto del metabolismo, modulando il flusso ematico in funzione delle specifiche richieste metaboliche locali (**Figura 1**) (*Yang et al., 2024*).

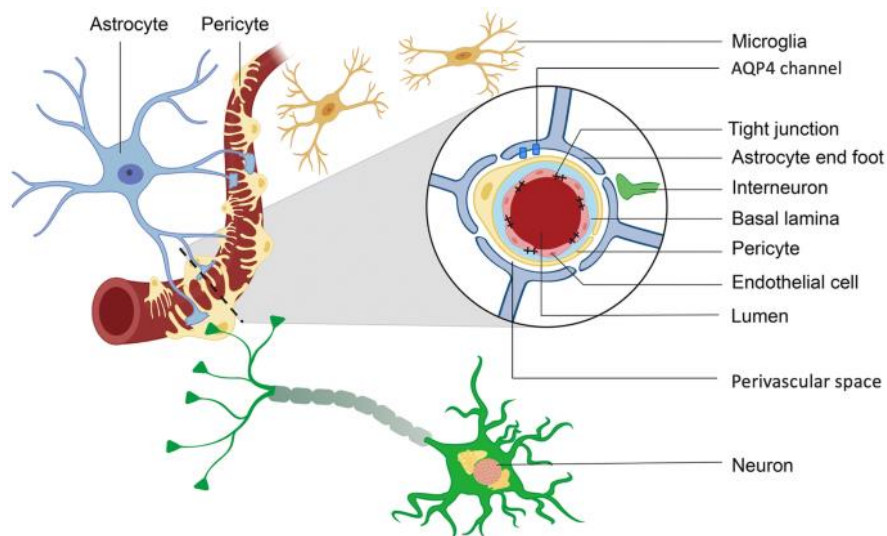


Figura 1. Rappresentazione schematica dell'Unità NeuroVascolare. Le cellule endoteliali capillari e i periciti sono circondati dalla lamina basale e dalle terminazioni perivascolari degli astrociti, che mediano le interazioni cellulari con i neuroni (Rowsthorn et al., 2023).

La rete vascolare cerebrale presenta un'organizzazione anatomica specifica e differente rispetto alla rete vascolare di altri distretti corporei. La complessa architettura, costituita da una fitta rete di vasi capillari, garantisce un flusso sanguigno adeguato e continuo a tutte le aree del cervello. Inoltre, l'interazione tra le differenti tipologie di cellule può variare lungo l'albero cerebrovascolare (Guerra et al., 2018). Dal Circolo di Willis (o poligono di Willis), situato alla base del cervello, si ramificano le tre arterie cerebrali principali (interna, media e posteriore) che si distribuiscono alle diverse regioni encefaliche garantendo il mantenimento di pressione e flusso sanguigno relativamente costanti (Longden et al., 2017). Da queste originano arterie e arteriole piali, che decorrono sulla superficie del cervello nello spazio subaracnoideo e si connettono al letto capillare tramite le arteriole parenchimali negli spazi perivascolari di Virchow-Robin (Moccia et al., 2022).

I vasi cerebrali sono costituiti da tre strati concentrici. Lo strato più interno, la tunica intima, è formato da un singolo strato di cellule endoteliali. La tunica media, lo strato intermedio, è costituita da uno strato di cellule muscolari lisce responsabili della modulazione del diametro vascolare in risposta a stimoli fisiologici e patologici. Infine, la tunica avventizia rappresenta lo strato più esterno ed è composta principalmente da fibre di collagene, fibroblasti e nervi perivascolari (Guerra et al., 2018).

Le cellule endoteliali estendono protrusioni attraverso la lamina basale fino alle cellule muscolari lisce, formando le cosiddette proiezioni mio-endoteliali, che consentono la comunicazione diretta tra i due tipi cellulari (Longden et al., 2017). Tali proiezioni sono ricche di giunzioni comunicanti (*gap junction*) che consentono il trasferimento bidirezionale di segnali e informazioni tra endotelio e cellule muscolari lisce (Guerra et al., 2018). Lo strato muscolare delle arterie cerebrali risulta più sottile rispetto ad altri distretti corporei e si assottiglia progressivamente nel passaggio tra arterie e capillari cerebrali. A livello dei capillari, infatti, le cellule muscolari lisce vengono completamente sostituite dai periciti, cellule murali incorporate nella membrana basale endoteliale, che contribuiscono al mantenimento dell'integrità strutturale del capillare e alla regolazione del flusso sanguigno cerebrale (FSC) (Damisah et al., 2017; Girouard & Iadecola, 2006).

La zona di transizione arteriolare-capillare, dalla quale originano i capillari dal primo al quarto ordine, svolge un ruolo centrale nella regolazione del FSC. I capillari, infatti, sono in grado di dilatarsi in risposta a stimoli sensoriali, contribuendo all'aumento della perfusione cerebrale in modo localizzato (Moccia et al., 2022). Inoltre, i neuroni attivati, si trovano molto più vicini ai capillari (8-23 μm) rispetto alle arteriole (70-160 μm); tale organizzazione permette un controllo selettivo e localizzato del flusso, adattandolo in modo preciso alle richieste locali (Guerra et al., 2018).

In conclusione, l'UNV svolge un ruolo cruciale nella regolazione del FSC: la stretta prossimità tra le cellule nervose e endoteliali permette a queste ultime di percepire tempestivamente e in modo diretto le variazioni dell'attività neuronale e sinaptica e di regolare di conseguenza il flusso sanguigno attraverso il meccanismo dell'accoppiamento neurovascolare (ANV) (Moccia et al., 2022).

1.2 La Barriera EmatoEncefalica

Nei mammiferi vi sono numerose barriere biologiche che separano il sangue dal liquido interstiziale che circonda i tessuti; tra queste, la Barriera EmatoEncefalica (BEE) rappresenta la struttura più selettiva e finemente controllata, garantendo un controllo rigoroso degli scambi tra il sangue e il SNC (Keaney & Campbell, 2015).

L'integrità funzionale e strutturale della BEE è alla base del mantenimento dell'omeostasi del microambiente cerebrale (Abbott et al., 2010). Data l'importanza della BEE, le cellule endoteliali cerebrali, che come già anticipato nel paragrafo 1.1, costituiscono le pareti

interne dei vasi sanguigni, possiedono proprietà differenti rispetto alle cellule endoteliali di altri tessuti: costituiscono un unico strato che forma capillari continui e non fenestrati, una peculiarità che consente loro di svolgere un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi del microambiente cerebrale, regolando il bilancio ionico e il trasporto selettivo dei nutrienti (*Daneman e Prat, 2015*). A differenza degli altri distretti corporei, infatti, le cellule endoteliali cerebrali sono strettamente connesse tra loro mediante giunzioni strette (TJ) e giunzioni aderenti (AJ), che limitano il trasporto paracellulare e contribuiscono all'elevata selettività della BEE (*Daneman & Prat, 2015*), che permette, infatti, solo la diffusione passiva di gas o molecole lipofile con un peso molecolare inferiore a 400-600 Da.

Le cellule endoteliali cerebrali, il cui numero aumenta progressivamente all'aumentare del diametro vascolare (*Daneman & Prat, 2015*), presentano una marcata polarizzazione strutturale e funzionale. In particolare, è possibile distinguere una membrana luminale, rivolta verso il lume vascolare, e una membrana abluminale, rivolta verso il parenchima cerebrale e strettamente associata ai periciti. Il trasporto di sostanze e nutrienti attraverso l'endotelio cerebrale, è mediato da specifici trasportatori espressi su entrambe le membrane, che appartengono a due tipologie di trasportatori: trasportatori di efflusso, responsabili dell'estrusione di numerose molecole lipofile e potenzialmente tossiche, e i trasportatori di nutrienti, deputati all'ingresso di composti essenziali per il metabolismo cerebrale (*Zlokovic et al., 2011*) (**Figura 2**). La marcata selettività della BEE rende pertanto necessari meccanismi di trasporto specializzati, che permettano il passaggio regolato di molecole di grandi dimensioni e di sostanze che non possono diffondere liberamente attraverso l'endotelio.

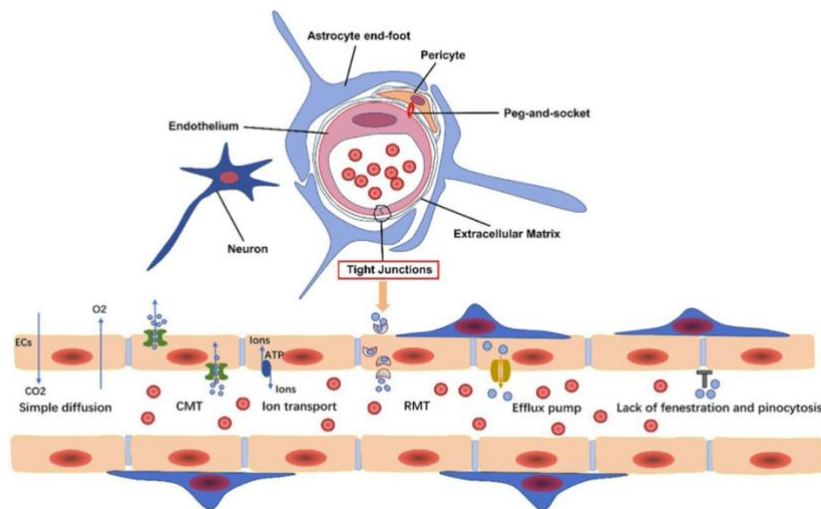


Figura 2. Organizzazione e meccanismi di trasporto della BBE. I meccanismi di trasporto attraverso la BEE comprendono il trasporto mediato da trasportatori (CMT), quello mediato da recettori (RMT), sistemi di efflusso attivo (proteine ABC) e trasporto di ioni. Molecole con PM inferiore a 400 Da e lipofile (gas, ossigeno, CO₂) attraversano la BBE per diffusione semplice (Xiao et al., 2020).

Sulla membrana plasmatica luminale (verso il sangue) sono espresse diverse proteine ABC (*ATP-binding cassette*), ovvero dei trasportatori che utilizzano l'energia ottenuta dall'idrolisi di ATP per trasportare attivamente un'ampia varietà di molecole attraverso le membrane biologiche. Tra questi rientrano xenobiotici, farmaci e metaboliti endogeni, che vengono riversati nel sangue, limitandone l'accumulo nel parenchima cerebrale e conferendo alla BEE un'elevata capacità di protezione nei confronti di sostanze potenzialmente tossiche, compresi gli agenti terapeutici (Ostergaard L., 2020). L'elevata espressione di tali trasportatori è alla base della marcata farmacoresistenza del SNC. Al contrario, una riduzione della loro espressione e/o attività funzionale è stata osservata in diverse condizioni patologiche, tra cui la malattia di Alzheimer e la malattia di Parkinson (Kierdorf et al., 2019).

Sulla membrana abluminale sono inoltre espresse le pompe Na⁺/K⁺-ATPasi, che, attraverso un meccanismo di trasporto attivo promuovono l'uscita di Na⁺ e l'ingresso di K⁺ al fine di mantenere il gradiente elettrochimico della membrana (Zlokovic et al., 2011). Tutti questi meccanismi di trasporto richiedono un dispendio energetico importante

sottoforma di ATP, a cui le cellule endoteliali cerebrali riescono a far fronte grazie all'elevato numero di mitocondri presenti al loro interno (*Zlokovic et al., 2011*).

I trasporti mediati da carrier (CMT) sono, invece, una grande famiglia, che comprende più di 300 geni, che codificano proteine legate alla membrana che facilitano il trasporto di un'ampia gamma di substrati attraverso le membrane biologiche (*Gutteridge et al., 2022*). I trasportatori CMT facilitano il passaggio selettivo, secondo gradiente di concentrazione di molecole idrosolubili fondamentali per il metabolismo cerebrale: aminoacidi, carboidrati, acidi monocarbossilici, acidi grassi, ormoni, nucleotidi, anioni organici, ammine, colina e vitamine.

Un ulteriore meccanismo di trasporto cellulare è rappresentato dalla transcitosi, un processo di endocitosi che permette di trasferire molecole di grandi dimensioni da un versante all'altro della cellula, senza che queste vengano degradate in seguito all'endocitosi. Tra le sostanze trasportate per transcitosi ci sono l'insulina, la transferrina e le apolipoproteine E e J (*Zlokovic et al., 2011*). La transcitosi mediata da recettore (RMT), invece, sfrutta specifici recettori espressi sulla superficie luminale delle cellule endoteliali per consentire il trasporto selettivo di determinate macromolecole (*Zhao & Zlokovic., 2014; Sweeney et al., 2019*).

Altri trasportatori fondamentali, espressi sulla membrana delle cellule endoteliali cerebrali sono: GLUT-1, fondamentale per il trasporto di glucosio, Mfsd2a e trasportatori in grado di regolare l'entrata e l'uscita di molecole dannose, come il peptide β -amiloide ($A\beta$), la principale molecola responsabile della malattia di Alzheimer (*Zlokovic et al., 2018*).

La distribuzione asimmetrica di questi trasportatori sulle membrane luminale e abluminale delle cellule endoteliali cerebrali, conferisce loro il caratteristico comportamento polarizzato: alcune proteine di trasporto sono infatti espresse solo su una delle due membrane, mentre altre sono presenti su entrambe (*McDonald et al., 2017*). L'orientamento di questi trasportatori determina un trasporto preferenziale di substrati all'interno o all'esterno della cellula endoteliale (dal cervello al sangue o viceversa).

Le giunzioni strette, infine, preservano la polarità e l'integrità della BEE, la cui compromissione, in concomitanza con altre alterazioni neuropatologiche, rappresenta un *biomarker* precoce del deterioramento cognitivo umano con effetti come infiammazione, stress ossidativo, disfunzione metabolica e alterazione del trasporto di molecole tra il

compartimento vascolare e quello cerebrale necessario per mantenere l'omeostasi cellulare (Che *et al.*, 2024). Il fattore principale alla base della rottura fisica della BEE è la degenerazione delle componenti cellulari dei capillari con conseguente perdita delle TJ e AJ e aumento della transitosi (Zlokovic *et al.*, 2011).

2 Accoppiamento NeuroVascolare

L'ANV, noto anche come iperemia funzionale, è il meccanismo mediante il quale un aumento dell'attività neuronale determina un incremento locale del FSC, al fine di soddisfare le aumentate richieste metaboliche dei neuroni in attività (Guerra *et al.*, 2018). Tra le numerose funzioni attribuite all'UNV, la relazione tra attività neuronale e regolazione del FSC rappresenta uno degli aspetti maggiormente studiati. Il FSC è infatti estremamente sensibile alle variazioni di O₂ e nutrienti e viene mantenuto entro limiti relativamente costanti nonostante le fluttuazioni della pressione arteriosa. Uno dei principali meccanismi coinvolti in tale regolazione è la risposta miogena, che contribuisce a preservare l'omeostasi emodinamica cerebrale e a distribuire il flusso in funzione delle richieste energetiche regionali: esso risulta infatti maggiore nelle aree caratterizzate da un elevato consumo metabolico, come il collico inferiore, e minore nelle regioni a ridotta attività metabolica, quali la sostanza bianca (Meng *et al.*, 2024).

Quando aumentano le esigenze metaboliche delle aree cerebrali attive, interviene il meccanismo dell'iperemia funzionale o ANV (Guerra *et al.*, 2018), in cui tutte le componenti dell'UNV collaborano per garantire una significativa vasodilatazione dei microvasi adiacenti, determinando un aumento del FSC locale e garantendo un adeguato apporto di O₂ e nutrienti alle aree cerebrali attive (Iadecola, 2017).

La corrispondenza spaziale e temporale tra l'attività neurale e la relativa risposta emodinamica è sufficientemente precisa da permettere l'utilizzo delle variazioni del FSC come indice indiretto dell'attività cerebrale, costituendo il presupposto fisiologico delle moderne tecniche di neuroimaging funzionale (Raichle & Mintun, 2006).

Il FSC è anche coinvolto nell'eliminazione dei sottoprodotti potenzialmente tossici generati dall'attività cerebrale, come lattato, CO₂, il peptide A β e la proteina tau, nonché per la regolazione della temperatura cerebrale (Tarasoff-Conway *et al.*, 2015). A partire da tali osservazioni, è stato proposto un modello di *feed-back*, secondo il quale l'aumento del flusso ematico è conseguenza diretta delle esigenze metaboliche del tessuto cerebrale.

In tale modello, alcuni sottoprodotti del metabolismo neuronale, tra cui adenosina, CO₂, e lattato, agiscono come potenti vasodilatatori e contribuiscono alla modulazione della risposta emodinamica (Freeman & Li, 2016). Tuttavia, altre evidenze supportano un modello *feed-forward*, in cui la modulazione del FSC non è guidata dallo stato metabolico del tessuto cerebrale. È stato infatti dimostrato che gli aumenti del FSC si verificano anche in condizioni di eccesso di O₂ e glucosio, suggerendo che l'esaurimento di tali substrati energetici non rappresenti l'unica causa dell'aumento del flusso (Atwell & Iadecola, 2002). In questo modello, l'attività neuronale attiva specifiche vie di segnalazione neurovascolare che determinano il rilascio di molecole vasoattive, come l'ossido nitrico (NO) e prostanoïdi, dalle componenti cellulari dell'UNV, in particolare dagli astrociti (Attwell et al., 2010). È importante sottolineare che i due modelli di regolazione del flusso coesistono, non si escludono a vicenda: gli ultimi studi hanno dimostrato, infatti, che all'inizio dell'attività neurale si assiste ad una riduzione di O₂ e/o glucosio che precede l'aumento del FSC (Freeman & Li, 2016), per cui nell'ANV possono essere coinvolti sia meccanismi dipendenti (*feed-back*) che indipendenti (*feed-forward*) dal metabolismo, a seconda del momento, intensità e durata dell'attivazione e in base alla regione cerebrale (Iadecola, 2017). Tali meccanismi di regolazione sono spesso compromessi in diverse malattie cerebrovascolari come ictus (Balbi et al., 2017), emorragia subaracnoidea (Zhang et al., 2024), malattia dei piccoli vasi cerebrali e demenza vascolare (Wang et al., 2023), caratterizzate da disfunzione cerebrale e danno neuronale, sottolineando così l'importanza di mantenere integra e funzionante l'UNV (Yang et al., 2024).

2.1 Il ruolo delle cellule nervose nell'ANV

I meccanismi molecolari attraverso i quali l'attività sinaptica controlla il FSC variano a seconda della struttura cerebrale e possono differire lungo l'albero vascolare (Kisler et al., 2017). I neuroni regolano il FSC generando segnali che, direttamente o indirettamente, mediante cellule interposte, agiscono sui vasi sanguigni locali per modulare la risposta vascolare. In generale, l'aumento della concentrazione intracellulare di Ca²⁺ all'interno dell'albero dendritico rappresenta l'input principale per la sintesi e il rilascio di messaggeri vasoattivi in risposta ai segnali sinaptici eccitatori (Guerra et al., 2018).

L'attività sinaptica glutamatergica attiva i recettori post-sinaptici NMDA (N-metil-D-aspartato) e AMPA (α -amino-3-idrossi-5-metil-4-isossazolo epropionico), promuovendo

l'ingresso di Ca^{2+} extracellulare e l'attivazione di enzimi Ca^{2+} -dipendenti come la sintasi del NO neuronale (nNOS) e la cicloossigenasi-2 (COX-2), che producono importanti molecole vasoattive, rispettivamente NO e prostanoidi (Lecrux & Hamel, 2016). Il rilascio di NO induce l'iperpolarizzazione e rilassamento delle cellule muscolari lisce vascolari attraverso un meccanismo dipendente dalla guanilato ciclastasi solubile/proteina chinasi G (PKG), stimolando così la vasodilatazione arteriosa (Mishra et al., 2016). Negli interneuroni GABAergici dell'ippocampo, ad esempio, il glutammato attiva i recettori NMDA e AMPA, da cui ne consegue l'aumento intracellulare di Ca^{2+} che attiva nNOS con un meccanismo Ca^{2+} /calmodulina (Ca^{2+} /CaM)-dipendente. Il NO, potente vasodilatatore, attiva l'enzima protein-kinasi G solubile che blocca l'ulteriore ingresso di Ca^{2+} con conseguente iperpolarizzazione e vasodilatazione (Guerra et al., 2018). Al contrario, l'ingresso di Ca^{2+} mediato dal recettore NMDA (NMDAR) nei neuroni piramidali attivati sinapticamente della corteccia somatosensoriale coinvolge la COX-2, che catalizza la sintesi del potente vasodilatatore prostaglandina E2 (PGE2), che legando i recettori EP2 ed EP4 sulle cellule muscolari lisce vascolari, ne induce il rilassamento e quindi la vasodilatazione (Lecrux et al., 2016). (Figura 3).

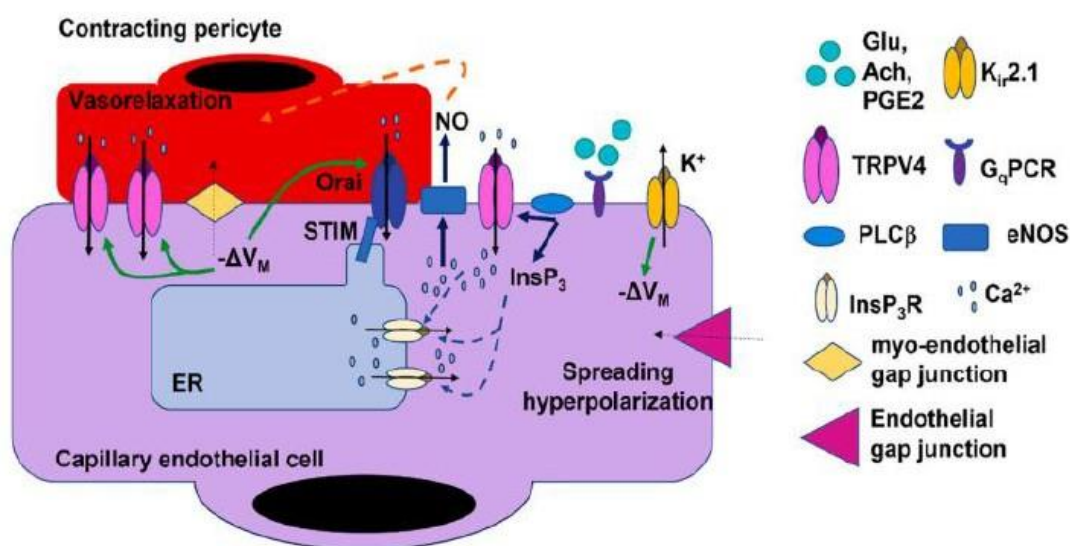


Figura 3. Rappresentazione schematica dei meccanismi molecolari che modulano il FSC nell'endotelio capillare (Moccia et al., 2022).

Il meccanismo o i meccanismi astrocitari non sono ancora chiari. Il glutammato aumenta il Ca^{2+} degli astrociti legandosi ai recettori metabotropici del glutammato (mGluR) 1 e 5 (mGluR1 e mGluR5), che stimolano la fosfolipasi $\text{C}\beta$ ($\text{PLC}\beta$) attraverso il monomero Gq. L'attivazione della PLC comporta la produzione di InsP_3 (inositolo-1,4,5-trifosfato) che, legandosi ai recettori presenti sul reticolo endoplasmatico (RE), induce il rilascio di Ca^{2+} dal reticolo endoplasmatico (RE) (Attwell et al., 2010). L'aumento di Ca^{2+} intracellulare promuove l'attivazione della fosfolipasi-A2 (PLA_2), con conseguente rilascio di acido arachidonico (AA) a partire dai fosfolipidi di membrana e produzione di PGE_2 (Guerra et al., 2018).

Inoltre, vi sono dei meccanismi alternativi che possono guidare la segnalazione del Ca^{2+} negli astrociti, come i recettori NMDA, i recettori metabotropici purinergici P_2Y_2 e P_2Y_4 , attivati dall'ATP rilasciato a livello sinaptico, e molteplici canali *Transient Receptor Potential* (TRP). Gli astrociti sono in grado di percepire le variazioni di pressione vascolare grazie alla mecano-sensibilità dei canali vanilloidi TRP 4 (TRPV_4) (Longden et al., 2016). Una volta che i recettori sono attivati, vi è l'attivazione della PLA_2 dipendente dal Ca^{2+} , rilascio di AA e produzione di PGE_2 con conseguente vasodilatazione, oltre che aumento di Ca^{2+} intracellulare. Tale aumento porta all'attivazione dei canali del K^+ Ca^{2+} -dipendenti (KCa), in particolare *Small Conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels* (SK), a bassa conduttanza, con conseguente rilascio di K^+ extracellulare (fino a ~ 10 mM) nella fessura sinaptica. A questo punto, si verifica un aumento della conduttanza dei canali del K^+ a rettificazione entrante $\text{K}_{ir2.1}$, presenti prevalentemente sulle cellule endoteliali (Longden et al., 2017), e conseguente iperpolarizzazione, che riduce l'ingresso di Ca^{2+} mentre induce la vasodilatazione delle arteriole e dei capillari (Attwell et al., 2010).

In conclusione, gli astrociti svolgono un ruolo dinamico nel regolare il tono vascolare e il flusso sanguigno cerebrale, regolando la vasodilatazione in risposta all'attività neuronale (Guerra et al., 2018).

2.2 Il ruolo dell'endotelio nell'ANV

Le cellule endoteliali vascolari, così come gli astrociti, controllano il tono vascolare attraverso il rilascio di mediatori vasoattivi che avviene principalmente in risposta a un aumento della concentrazione di Ca^{2+} indotto sia da stimoli chimici sia meccanici

(Khaddaj et al., 2017). La perfusione luminale di neurotrasmettitori e neuromodulatori, come acetilcolina, ATP, ADP e bradichinina, provoca la dilatazione delle arteriole cerebrali inducendo l'attivazione di specifici recettori accoppiati a proteine Gq (GPCR), che si trovano sulla membrana endoteliale (Hamel et al., 2006). L'attivazione di tali recettori stimola la PLC β , che catalizza la produzione di InsP $_3$. Quest'ultimo promuove il rilascio di Ca $^{2+}$ dal RE, innescando una cascata di segnalazione Ca $^{2+}$ -dipendente che culmina nella sintesi e nel rilascio dei principali mediatori vasoattivi derivati dall'endotelio (Guerra et al., 2018).

Tra i principali effettori attivati dall'aumento del Ca $^{2+}$ intracellulare vi sono la sintasi endoteliale dell'NO (eNOS) e la fosfolipasi A2 (PLA2). L'attivazione della eNOS determina la produzione di NO, mentre l'attivazione della PLA2, induce il rilascio di acido arachidonico (AA) e la successiva sintesi di prostaglandine vasoattive (Guerra et al., 2018). Sebbene numerosi studi abbiano dimostrato il coinvolgimento della eNOS nella produzione di NO in risposta all'attivazione dei recettori per diversi neurotrasmettitori e neuromodulatori, tra cui acetilcolina, glutammato, ATP e istamina (Guerra et al., 2018), il ruolo della NOS endoteliale nella regolazione del FSC umano non è ancora completamente chiarito (Moccia et al., 2023).

Le cellule endoteliali microvascolari cerebrali esprimono inoltre recettori ionotropici e metabotropici per il glutammato, ovvero NMDAR (Stobart et al., 2013) e mGluR1 (Lv et al. 2016). In particolare, è stato dimostrato che l'attivazione degli NMDAR endoteliali partecipa alla vasodilatazione indotta dal glutammato nelle arteriole intraparenchimali, promuovendo l'ingresso di Ca $^{2+}$ e la successiva attivazione di eNOS (Villanueva C. & Giulivi C., 2010).

L'aumento della concentrazione intracellulare di Ca $^{2+}$ può portare anche all'attivazione di canali al KCa, a bassa e intermedia conduttanza, localizzati sulla membrana endoteliale, dando origine al fenomeno dell'iperpolarizzazione endotelio-dipendente (dall'inglese *Endothelial-Dependent Hyperpolarization*, EDH), un ulteriore meccanismo coinvolto nella vasodilatazione cerebrale. Il segnale iperpolarizzante, dovuto alla fuoriuscita di K $^{+}$ dalla cellula, può propagarsi alle cellule muscolari lisce attraverso le giunzioni mio-endoteliali, determinando la chiusura dei canali del Ca $^{2+}$ voltaggio-dipendenti di tipo L, la riduzione del Ca $^{2+}$ intracellulare e il conseguente rilassamento della parete vascolare (Garland & Dora, 2017; Ledoux et al., 2008).

Il meccanismo dell'EDH potrebbe essere potenziato dall'adenosina che può essere rilasciata dai neuroni o dagli astrociti durante la normale attività cerebrale per attivare i canali K^+ sensibili all'ATP, che si trovano anche nelle cellule endoteliali dei capillari cerebrali (Sancho *et al.*, 2022). Nelle cellule endoteliali dei capillari cerebrali l'attività del $K_{ir2.1}$ è regolata finemente dal fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PIP_2), un componente fosfolipidico minore del foglietto interno della membrana plasmatica (Harraz *et al.*, 2018). Il PIP_2 ha un duplice ruolo: da un lato è necessario per mantenere l'attivazione del canale endoteliale $K_{ir2.1}$ (Harraz *et al.*, 2018), mentre dall'altro esercita un'inibizione su TRPV4, un canale cationico non selettivo che si trova sulla membrana plasmatica (Negri *et al.*, 2019) ed è sensibile a molteplici segnali, come l'AA e la deplezione di PIP_2 (Berra-Romani *et al.*, 2019) (**Figura 4**).

Figura 4. *Rappresentazione schematica dei canali ionici nelle cellule endoteliali cerebrali e coinvolti nell'ANV. L'apertura dei canali TRPV4, TRPA1, Kir2.1 e dei recettori NMDAR, stimolato dall'attività neuronale, regola le risposte vascolari. Sono raffigurati meccanismi attivati sia in condizioni fisiologiche che patologiche (Moccia et al., 2022).*

attivabile da specie reattive dell'ossigeno (ROS), consentono alle cellule endoteliali di percepire le variazioni dell'attività neuronale e di contribuire alla risposta emodinamica (Thakore et al., 2021, Negri et al., 2021). L'attivazione di TRPA1 determina un ingresso locale di Ca^{2+} , che induce l'attivazione della pannexina 1 (Panx1) e il rilascio di ATP nello spazio extracellulare. L'ATP, a sua volta, attiva i recettori purinergici delle cellule endoteliali adiacenti, generando un'onda di Ca^{2+} che si propaga lungo il letto capillare fino alla zona ACT e contribuisce alla vasodilatazione dei vasi a monte (Thakore et al., 2021).

Nel complesso, l'endotelio cerebrovascolare rappresenta un elemento dinamico dell'UNV, in grado di integrare segnali neuronali e metabolici e di convertirli in risposte vasodilatorie che contribuiscono alla regolazione fine del FSC.

3 I segnali di Ca^{2+} nelle cellule endoteliali

Il Ca^{2+} rappresenta il principale secondo messaggero coinvolto nella regolazione delle funzioni endoteliali e costituisce il segnale che induce la sintesi e il rilascio di numerosi mediatori vasoattivi (Guerra et al., 2018). Le cellule endoteliali sono dotate di un complesso sistema di canali ionici, pompe, scambiatori e proteine leganti il Ca^{2+} , che consente la generazione di segnali intracellulari altamente organizzati nello spazio e nel tempo.

Nelle cellule endoteliali cerebrali, il RE rappresenta il principale deposito intracellulare di Ca^{2+} (Moccia et al., 2022). L'attivazione dei GPCR induce la produzione di InsP_3 che si lega ai suoi recettori localizzati sulla membrana del RE, determinando un rapido rilascio di Ca^{2+} nel citoplasma. Inoltre, gli InsP_3R sono in grado di amplificare il segnale mediante il meccanismo del rilascio di Ca^{2+} indotto dal Ca^{2+} (dall'inglese *Calcium Induced Calcium Release*; CICR), permettendo la propagazione del segnale a livello dell'intera cellula (Guerra et al., 2018).

I mitocondri contribuiscono in maniera significativa alla regolazione dell'omeostasi del Ca^{2+} . Grazie all'interazione fisica tra InsP_3Rs e i canali anionici voltaggio-dipendenti permeabili al Ca^{2+} (VDAC), incorporati nella membrana mitocondriale esterna, il Ca^{2+} mobilizzato dal RE può essere trasferito allo spazio intermembrana e successivamente alla matrice mitocondriale attraverso l'uniporto mitocondriale del Ca^{2+} (MCU) (Dong et

al., 2017). A loro volta, i mitocondri possono rilasciare Ca^{2+} mediante lo scambiatore mitocondriale $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, contribuendo al riempimento delle riserve del RE e al mantenimento della segnalazione intracellulare (Malli et al., 2007).

Un ulteriore compartimento coinvolto nella regolazione del Ca^{2+} nelle cellule endoteliali è rappresentato dal sistema endolisosomiale (Guerra et al., 2018). Il secondo messaggero nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NAADP) induce il rilascio di Ca^{2+} dai depositi endolisosomiali attraverso l'attivazione dei canali a due pori TPC1 e TPC2 (Favia et al., 2016; Di Nezza et al., 2017). Tale rilascio di Ca^{2+} può attivare successivamente gli InsP_3R localizzati sul RE adiacente, determinando un'amplificazione del segnale mediante CICR (Zuccolo et al., 2015). Tuttavia, il ruolo della segnalazione del Ca^{2+} lisosomiale nelle cellule endoteliali microvascolari cerebrali umane, non è ancora stato completamente chiarito.

Poiché il rilascio di Ca^{2+} dal RE determina la progressiva deplezione delle riserve intracellulari, è necessario un successivo ingresso di Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare. Tale processo avviene attraverso il meccanismo dello *Store Operated Ca^{2+} Entry* (SOCE), il principale sistema di ingresso del Ca^{2+} nelle cellule endoteliali in seguito alla stimolazione da parte di agonisti. Il SOCE è mediato dalle molecole di interazione stromale 1 (Stim1) e 2 (Stim2), ovvero le proteine sensore localizzate sulla membrana del RE, e dai canali Orai1 e Orai2, sulla membrana plasmatica (Lodola et al., 2012; Li et al., 2011). In condizioni di riposo, Stim1 e Orai1 sono spazialmente separati; la diminuzione della concentrazione di Ca^{2+} nel RE ($< \text{circa } 400 \mu\text{M}$) induce invece l'attivazione di Stim1, che migra verso le giunzioni tra RE e membrana plasmatica e interagisce con Orai1, determinandone l'apertura e l'attivazione della corrente Ca^{2+} *Release-Activated Ca^{2+}* (iCRAC) (Lewis, 2020). Una volta ripristinati i livelli di Ca^{2+} nel RE, Stim1 si dissocia da Orai1 e il sistema ritorna allo stato basale (Prakriya & Lewis, 2015).

Oltre ai canali CRAC, anche i canali TRPC, appartenenti alla sottofamiglia dei canali cationici non selettivi TRP, possono contribuire al SOCE endoteliale formando complessi molecolari con Stim1 e Orai1 (Blatter et al., 2017) (**Figura 5**).

Nel complesso, il segnale di Ca^{2+} nelle cellule endoteliali è caratterizzato da un rapido aumento iniziale dovuto al rilascio di Ca^{2+} dal RE, seguito da un ingresso sostenuto di Ca^{2+} extracellulare attraverso il SOCE. L'aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} attiva quindi numerose vie di segnalazione, tra cui la eNOS Ca^{2+} /CaM-dipendente e la

PLA2 Ca^{2+} -dipendente, determinando la produzione di NO e prostaglandine, mediatori fondamentali per la regolazione del tono vascolare e del FSC (Guerra *et al.*, 2018).

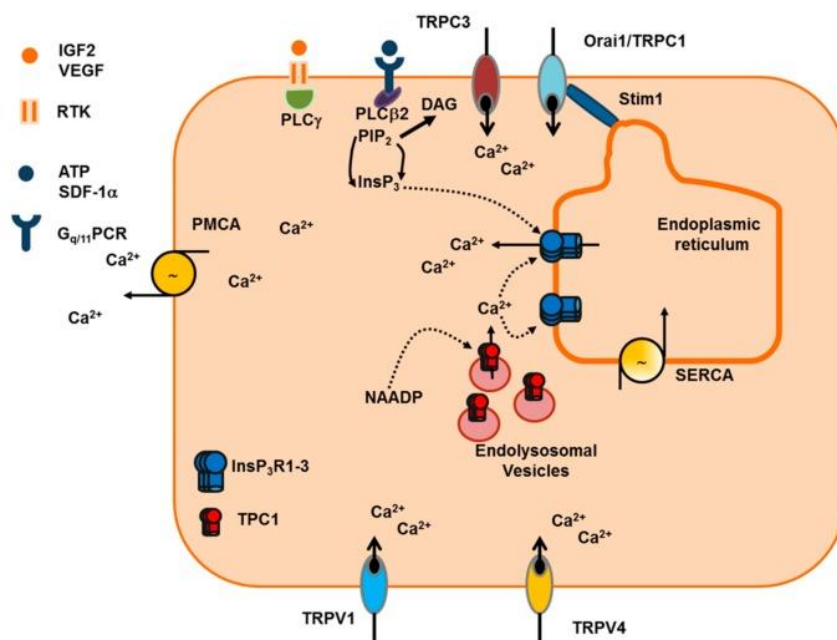


Figura 5. Rappresentazione schematica dei canali, recettori e dei meccanismi molecolari responsabili delle risposte di Ca^{2+} nella cellula endoteliale. Tali canali e recettori sono espressi sia a livello della membrana plasmatica sia a livello di organelli intracellulari (Moccia *et al.*, 2019).

Nelle cellule endoteliali cerebrali, i segnali intracellulari di Ca^{2+} sono attivati da diversi stimoli fisiologici che contribuiscono alla regolazione del FSC. Tra questi, l'acetilcolina (ACh) rilasciata dai neuroni colinergici del proencefalo basale agisce sui recettori muscarinici di tipo M5 (M5-mAChR) espressi dall'endotelio cerebrale (Guerra *et al.*, 2018). I recettori M5 appartengono alla famiglia dei recettori muscarinici accoppiati a proteine G e sono prevalentemente associati alla proteina G_{q/11} (Guerra *et al.*, 2018). Nell'encefalo, essi rappresentano il principale sottotipo di recettore muscarinico coinvolto nella regolazione del tono vascolare e della perfusione cerebrale. La loro attivazione promuove la produzione di NO da parte dell'endotelio, determinando la vasodilatazione delle arteriole cerebrali e l'aumento del FSC (Guerra *et al.*, 2018).

Anche il glutammato partecipa alla regolazione del microcircolo cerebrale e dell'ANV. Sebbene i suoi effetti siano tradizionalmente associati alla trasmissione sinaptica neuronale, recenti evidenze indicano che il glutammato è in grado di agire direttamente sulle cellule endoteliali cerebrali attraverso l'attivazione di recettori glutammatergici espressi a livello endoteliale. Tra questi, i recettori NMDA sembrano svolgere un ruolo particolarmente importante. I recettori NMDA sono recettori ionotropici appartenenti alla famiglia degli iGluR e sono costituiti da differenti combinazioni delle subunità GluN1, GluN2 (A-D) e GluN3 (A-B), la cui composizione determina le proprietà biofisiche e farmacologiche del recettore (Negri, Faris, Maniezzi, *et al.*, 2021). A differenza degli altri recettori ionotropici del glutammato, i recettori NMDA presentano un'elevata permeabilità al Ca^{2+} e richiedono, oltre al legame del glutammato, anche quello di un co-agonista, quale glicina o D-serina, per la loro completa attivazione (Lu *et al.*, 2019).

L'attivazione dei recettori NMDA endoteliali induce il rilascio di NO e la conseguente vasodilatazione arteriolare, contribuendo alla regolazione locale del FSC. Pertanto, oltre al loro consolidato ruolo nella trasmissione sinaptica, i recettori NMDA espressi dall'endotelio cerebrale sembrano rappresentare un importante meccanismo attraverso cui l'attività neuronale viene tradotta in una risposta vascolare appropriata durante l'ANV (Guerra *et al.*, 2018).

4 La meccanotrasduzione nelle cellule endoteliali

La meccanotrasduzione è il meccanismo attraverso cui le cellule percepiscono stimoli di natura meccanica e li convertono in segnali biochimici intracellulari (Monshausen *et al.*, 2009). Tale meccanismo è fondamentale in numerosi processi biologici, tra cui lo sviluppo embrionale o la percezione tattile e uditiva (Coste *et al.*, 2011), e riveste un ruolo particolarmente importante nella fisiologia endoteliale, dove consente alle cellule di rilevare e rispondere alle forze emodinamiche generate dal flusso sanguigno (Deng & Yan, 2025). La meccanotrasduzione comporta molto spesso l'attivazione di canali ionici meccanosensibili, ovvero proteine di membrana capaci di convertire gli stimoli meccanici in segnali biochimici ed elettrici, in grado di innescare risposte funzionali (Tschumperlin D. J., 2011). Un esempio paradigmatico è rappresentato dalle cellule ciliate dell'orecchio, in cui la meccanotrasduzione avviene in tempi estremamente rapidi, suggerendo l'esistenza di un canale ionico attivato direttamente dalle forze meccaniche. In diversi tipi

cellulari meccanosensibili sono state infatti descritte correnti cationiche attivate meccanicamente, molte delle quali presentano una significativa permeabilità al Ca^{2+} e svolgono un ruolo cruciale nella conversione degli stimoli meccanici in segnali intracellulari (*Chalfie et al., 2009*).

I canali ionici meccanosensibili condividono alcune caratteristiche fondamentali che ne determinano l'identità funzionale: devono essere espressi in cellule o tessuti meccanosensibili; devono essere direttamente o indirettamente responsabili della risposta allo stimolo; alterazioni genetiche o funzionali del canale devono modificare la risposta allo stimolo; infine, la capacità di rispondere agli stimoli meccanici deve dipendere da una proprietà intrinseca della proteina canale e non dal contesto cellulare in cui è inserita (*Arnadóttir, J. & Chalfie et al, 2010*).

Tra le varie famiglie di canali ionici mecano-sensibili ci sono i canali polimodali TRP, una superfamiglia di canali ionici non selettivi ed evolutivamente conservati, attivati da numerosi stimoli di natura diversa come ad esempio il voltaggio, la temperatura o la pressione (*Ranade SS et al, 2015*).

I canali mecano-sensibili scoperti e studiati più recentemente sono i canali Piezo: essi rappresentano una delle scoperte più significative degli ultimi anni nel campo della fisiologia sensoriale (*Patapoutian et al, 2010*). Nei mammiferi, la famiglia dei canali Piezo è formata da due membri, Piezo1 e Piezo2, responsabili della percezione tattile, della propriocezione e dello sviluppo vascolare (*Saotome, K et al., 2018*).

5 I Canali Piezo

5.1 Struttura e caratteristiche generali dei canali Piezo

I canali Piezo costituiscono una famiglia di canali cationici meccanosensibili identificata nel 2010 dal gruppo di ricerca di Ardem Patapoutian, scoperta che ha contribuito all'assegnazione del Premio Nobel per la Fisiologia o Medicina nel 2021 (*Coste et al., 2010*). Il nome "Piezo" deriva dal termine greco *πίεση* (*piesi*), che significa "pressione", e riflette la capacità di questi canali di rispondere a stimoli meccanici.

Nei mammiferi sono presenti due membri della famiglia, Piezo1 e Piezo2, codificati rispettivamente dai geni Fam38A e Fam38B. Sebbene le due isoforme presentino una

distribuzione tissutale e funzioni fisiologiche differenti, entrambe agiscono come trasduttori di stimoli meccanici, convertendo le forze fisiche in segnali intracellulari.

I canali Piezo sono attivati da diversi stimoli meccanici, tra cui lo *shear stress*, la compressione cellulare, la tensione della membrana, il rigonfiamento cellulare e gli ultrasuoni (Syeda *et al.*, 2016; Cox *et al.*, 2016; Renade SS *et al.*, 2014). Essi mostrano generalmente una rapida cinetica di attivazione e inattivazione, sebbene quest'ultima possa variare in funzione del tipo cellulare e delle proprietà biomeccaniche della membrana plasmatica (Lewis & Grandi 2020; Wu *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2023).

La sensibilità meccanica dei canali Piezo è modulata dall'interazione con diversi componenti cellulari, tra cui il citoscheletro, la matrice extracellulare e alcune proteine regolatorie, comprese le proteine inibitrici della famiglia MyoD che ne modulano le proprietà di *gating* (Wang *et al.*, 2022). Ad oggi non è stato segnalato alcun agonista chimico endogeno in grado di attivare direttamente i canali Piezo; tuttavia, sono stati sviluppati alcuni modulatori farmacologici, tra cui Yoda1/2 e Jedy1/2, che hanno rappresentato strumenti fondamentali per lo studio delle loro funzioni biologiche (Zhou *et al.*, 2023).

La struttura dei canali Piezo è stata chiarita grazie agli studi di microscopia crioelettronica (crio-EM), che hanno evidenziato un'organizzazione strutturale unica rispetto agli altri canali meccanosensibili. I canali Piezo sono costituiti da tre subunità che si assemblano per formare una struttura a spirale a tre pale, simile ad una triscele (Zhou & Martinac, 2023) (**Figura 6**).

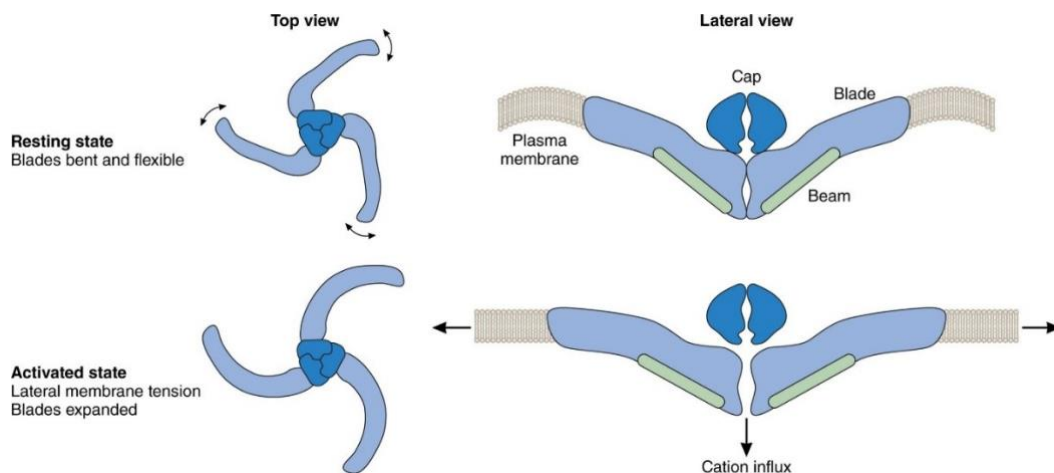


Figura 6. Rappresentazione schematica dei canali Piezo in una membrana cellulare. Nel canale in condizioni di riposo (in alto) a riposo, le lamelle del canale omotrimerico mostrano flessibilità, ma in seguito a stimolazione meccanica (in basso), le lamelle si espandono determinando l'attivazione del canale (Coste & Delmas, 2024).

Ogni subunità di Piezo1 è composta da 2521 amminoacidi e contiene 38 domini transmembrana. La regione periferica del canale costituisce il dominio di meccanotrasduzione, mentre la porzione C-terminale forma il poro centrale ed è composta dal dominio extracellulare (*cap*), dalle eliche transmembrana interna ed esterna e da un dominio intracellulare C-terminale (Saotome et al., 2018; Zhou & Martinac, 2023). La caratteristica conformazione curva del complesso proteico induce una deformazione locale della membrana plasmatica, proprietà ritenuta essenziale per la sua capacità di rilevare le forze meccaniche.

Piezo2 presenta una struttura generale simile a quella di Piezo1 e condivide circa il 42% della sequenza amminoacidica. Tuttavia, possiede alcune differenze strutturali, in particolare a livello del dominio del poro, che ne influenzano la sensibilità meccanica e le proprietà di permeabilità ionica (Wang et al., 2019).

L'espressione di Piezo1 è stata documentata in numerosi tessuti non neuronali soggetti a stimoli meccanici, tra cui vescica, colon, rene, polmone e cute (Satoh et al., 2006). Più recentemente, la sua espressione è stata dimostrata anche nelle cellule endoteliali, nei cardiomiociti, nei fibroblasti cardiaci e nelle cellule muscolari lisce vascolari (Coste & Delmas, 2024). Al contrario, Piezo2 è espresso prevalentemente in cellule sensoriali, quali i neuroni dei gangli della radice dorsale, i neuroni trigeminali e le cellule di Merkel,

dove svolge un ruolo fondamentale nella percezione tattile e nella propriocezione (Ranade SS et al., 2015).

5.2 I canali Piezo nelle cellule endoteliali

Tra i due membri della famiglia, Piezo1 riveste un ruolo particolarmente importante nella fisiologia endoteliale. Le cellule endoteliali sono costantemente esposte alle forze emodinamiche generate dal flusso sanguigno, in particolare allo shear stress, ossia la forza tangenziale esercitata dal sangue sulla superficie luminale del vaso (Krüger-Genge et al., 2019). Piezo1 agisce come un sensore di tali stimoli meccanici e, in risposta allo *shear stress*, si attiva consentendo un rapido ingresso di Ca^{2+} nella cellula.

L'aumento del Ca^{2+} intracellulare innesca numerose vie di segnalazione coinvolte nella regolazione delle funzioni endoteliali, tra cui l'angiogenesi, il rimodellamento vascolare e il controllo del tono vascolare. Diversi studi hanno dimostrato che l'attivazione di Piezo1 promuove la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali, favorendo la formazione di nuovi vasi sanguigni (Kang et al., 2019). Durante lo sviluppo embrionale, Piezo1 è inoltre essenziale per il corretto sviluppo della rete vascolare e per l'organizzazione dei vasi in risposta alle forze emodinamiche (Li et al., 2014).

L'importanza di Piezo1 nell'angiogenesi è stata ulteriormente dimostrata in modelli murini, nei quali il silenziamento del gene mediante siRNA determina una ridotta sensibilità delle cellule endoteliali al VEGF e un'anomala organizzazione della rete vascolare (Li et al., 2014; Swain et al., 2021).

Recenti evidenze indicano inoltre che Piezo1 possa cooperare con altri canali ionici. In particolare, l'attivazione prolungata di Piezo1 da parte di elevati livelli di *shear stress* induce l'attivazione della PLA2 e la successiva apertura del canale TRPV4, amplificando l'incremento del Ca^{2+} intracellulare. Il segnale mediato da TRPV4 promuove il rimodellamento del citoscheletro e la riorganizzazione delle giunzioni aderenti, aumentando la plasticità delle cellule endoteliali e favorendo il processo angiogenico (Coste & Delmas, 2024; Swain et al., 2021).

L'ingresso di Ca^{2+} mediato da Piezo1 contribuisce inoltre alla regolazione del tono vascolare attraverso l'attivazione della eNOS e la produzione di NO. Tale effetto può avvenire mediante diversi meccanismi, tra cui il rilascio Ca^{2+} -dipendente di ATP e l'attivazione dei recettori purinergici P2Y2, l'attivazione della CaMKII e la stimolazione

di vie di segnalazione cAMP/PKA, che convergono nella fosforilazione attivante della eNOS (Wang *et al.*, 2016). La conseguente produzione di NO promuove la vasodilatazione e contribuisce al mantenimento dell'omeostasi vascolare.

Tuttavia, le conseguenze funzionali dell'attivazione di Piezo1 non sono univoche e sembrano dipendere dal distretto vascolare considerato, dalla natura dello stimolo meccanico e dal contesto fisiopatologico. Ad esempio, nelle arterie mesenteriche murine è stato dimostrato che l'attivazione di Piezo1 può promuovere la depolarizzazione delle cellule endoteliali e indurre una risposta vasocostritttrice durante l'attività fisica (Rode *et al.*, 2017). Queste osservazioni suggeriscono che gli effetti di Piezo1 sul tono vascolare siano altamente dipendenti dal contesto e dalle specifiche vie di segnalazione intracellulari reclutate.

Recenti studi condotti su modelli murini hanno inoltre evidenziato un ruolo specifico di Piezo1 nell'endotelio cerebrale. In particolare, Harraz e collaboratori hanno dimostrato che, nelle cellule endoteliali dei capillari cerebrali murini, l'attivazione di Piezo1 da parte delle forze emodinamiche generate durante l'iperemia funzionale induce un segnale depolarizzante che si propaga retrogradamente lungo l'albero vascolare, promuovendo la vasocostrizione delle arteriole a monte. Questo meccanismo contribuisce al ripristino del tono vascolare e del FSC ai livelli basali al termine dell'ANV. Tali evidenze suggeriscono che Piezo1 agisca come un sensore emodinamico fondamentale per la risoluzione della risposta iperemica e per il mantenimento dell'omeostasi cerebrovascolare (Harraz *et al.*, 2022).

Nel complesso, le evidenze ottenute nei modelli animali sottolineano la complessità delle funzioni svolte da Piezo1 e suggeriscono un ruolo cruciale del canale nella regolazione del FSC. Tuttavia, nonostante i recenti progressi compiuti nello studio di Piezo1 nell'endotelio cerebrale murino, il suo ruolo nelle cellule endoteliali dei microvasi cerebrali umani rimane ancora scarsamente caratterizzato. In particolare, i meccanismi mediante i quali l'attivazione di Piezo1 modula la segnalazione del Ca^{2+} , la produzione di NO e la regolazione del FSC nell'uomo non sono stati ancora completamente chiariti. Pertanto, ulteriori studi sono necessari per definire il contributo di questo canale alla fisiologia e alla fisiopatologia del microcircolo cerebrale umano.

6 SCOPO DEL LAVORO

Il presente lavoro di Tesi si propone di studiare il ruolo fisiologico del canale meccanosensibile Piezo1 nell'endotelio dei microvasi cerebrali umani, con particolare attenzione ai meccanismi di segnalazione del Ca^{2+} e alle loro implicazioni funzionali nella fisiologia cerebrovascolare.

È noto che Piezo1 svolge un ruolo fondamentale nelle cellule endoteliali contribuendo allo sviluppo e all'omeostasi vascolare promuovendo la vasodilatazione attraverso l'attivazione di vie di segnalazione Ca^{2+} -dipendenti che culminano con la produzione del mediatore vasoattivo NO. Inoltre, recenti studi condotti su microvasi cerebrali murini hanno dimostrato che Piezo1 partecipa alla regolazione del FSC, fungendo da sensore delle forze emodinamiche e innescando segnali di meccano-*feedback* negativo durante l'iperemia funzionale (Harraz *et al.* 2022).

Nonostante tali evidenze, il ruolo di Piezo1 nelle cellule endoteliali dei microvasi cerebrali umani rimane ancora poco caratterizzato. Pertanto, in questo studio è stata innanzitutto analizzata la localizzazione e l'espressione funzionale di Piezo1 nella linea cellulare hCMEC/D3, un modello ampiamente utilizzato per lo studio *in vitro* della BEE umana, al fine di valutare il coinvolgimento del canale meccanosensibile nella genesi di segnali di Ca^{2+} . Successivamente, sono stati investigati i potenziali meccanismi attraverso cui Piezo1 potrebbe contribuire alla regolazione del FSC, con particolare riferimento alla produzione di NO e all'EDH, due importanti meccanismi Ca^{2+} -dipendenti coinvolti nel controllo del tono vascolare cerebrale. Infine, è stato valutato il ruolo di Piezo1 nella migrazione delle cellule endoteliali, un processo essenziale per l'angiogenesi e il rimodellamento del microcircolo cerebrale.

7 MATERIALI & METODI

7.1 Coltura cellulare delle cellule hCMEC/D3

Le cellule endoteliali microvascolari cerebrali umane (Human Cerebral Microvascular Endothelial cells - hCMEC/D3) rappresentano il modello più idoneo per gli studi in vitro della barriera ematoencefalica. Le colture cellulari sono ottenute dall'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM, Parigi, Francia) (*Berra-Romani et al., 2023*).

Le cellule sono state utilizzate tra il passaggio 25 e 35, sono coltivate ad una concentrazione di circa 27.000 cellule/cm² in fiasche per colture tissutali depositate poi in incubatore a 37°C e al 5% di umidità satura di CO₂ per permettere la crescita della coltura. Per permettere l'adesione delle cellule alle fiasche, a quest'ultime sono aggiunti 0,1 mg/mL di collagene di ratto di tipo 1 per permettere l'adesione delle cellule alla superficie della fiasca stessa. Successivamente si aggiunge il terreno di coltura appropriato, l'EBM-2 (Lonza, Basilea, Svizzera): un terreno contenente 5% di siero fetale bovino, 1% di penicillina-streptomina, 1,4 µM di idrocortisone, 5 µg/mL di acido ascorbico, 1% di concentrato lipidico chimicamente definito (Life Technologies, Milano, Italia), 10 mM di HEPES e 1 ng/mL di fattore di crescita dei fibroblasti di base.

7.2 Soluzioni utilizzate

Durante la registrazione dei segnali di Ca²⁺ si sono utilizzate due differenti soluzioni. La soluzione extracellulare, definita come Physiological salt solution (PSS) è composta da: 150 mM NaCl, 6 mM KCl, 1.5 mM di CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM Glucosio e 10 mM Hepes. La PSS senza Ca²⁺ (0Ca²⁺), invece, ha la seguente composizione: 150 mM NaCl, 6 mM KCl, 10 mM Glucosio, 10 mM Hepes e 0.5 mM EGTA. Ciascuna soluzione è stata portata a un pH di 7.4 mediante NaOH.

7.3 Imaging del Ca²⁺ e del NO

Ai fini degli esperimenti le cellule coltivate sono state seminate su vetrini pre-trattati con gelatina ad una densità di 5000 cellule/cm² e incubate per 24-48 ore a 37°C e 5% CO₂ (*Mussano et al., 2020*). Ogni vetrino in esame, poi, è stato caricato con 2 µM di Fura-2 acetossimetil estere (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, USA), un fluoroforo raziometrico Ca²⁺ - selettivo, in PSS per 30 minuti a 37°C e 5% CO₂. Al termine del

tempo di incubazione, le cellule sono state lavate in PSS e i vetrini fissati sul fondo di piastre Petri per passare poi all'osservazione al microscopio a epifluorescenza verticale Axiolab (Carl Zeiss, Oberkochen, Germania) tramite un obiettivo Zeiss x40 Achroplan (immersione in acqua, distanza di lavoro 2,0 mm, NA 0,9) (Negri *et al.*, 2022; Berra-Romani *et al.*, 2023). Le cellule sono state eccitate a 340 e 380 nm, mentre la fluorescenza emessa è stata registrata a 510 nm. Un primo filtro a densità neutra (densità ottica 1 o 0,3) è stato utilizzato per ridurre l'intensità della luce di eccitazione mentre un secondo filtro (densità ottica 0,3), accoppiato a quello da 380 nm, ha eguagliato l'intensità della luce a 340 nm; per migliorare il contrasto è presente un diaframma circolare mentre i filtri di eccitazione sono montati su una ruota portafiltri (Lambda 10, Sutter Instrument, Novato, CA, USA).

L'acquisizione e analisi quantitativa e qualitativa, in tempo reale, delle immagini sono affidate ad un software personalizzato in ambiente LINUX: l'analisi avviene in 10-40 regioni d'interesse rettangolari (ROI), ciascuna contrassegnata da un numero identificativo. Una ROI poteva racchiudere solo una parte della cellula o sovrapporsi parzialmente a quella adiacente in quanto i contorni cellulari non sempre erano definiti; è stato accertato, però, che le ROI non si sovrapponevano tra loro.

Le registrazioni delle concentrazioni di Ca^{2+} intracellulare sono state acquisite ogni 3 secondi a temperatura ambiente (22°C) e quantificate calcolando il rapporto tra le fluorescenze media a 510 nm, come descritto precedentemente. Ad un aumento di Ca^{2+} intracellulare corrispondeva un aumento del rapporto F340/F380 (Negri *et al.*, 2022; Berra-Romani *et al.*, 2023).

Per le registrazioni di NO rilasciato, invece, ogni vetrino è stato caricato con 1 μM del fluorocromo 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluorescina diacetato (DAF-FM DA) in PSS per 60 minuti a 37°C e 5% CO_2 . La fluorescenza di DAF-FM è stata registrata con la stessa configurazione ottica delle analisi del Ca^{2+} ma variando il filtro di eccitazione a 495 nm e quello di emissione a 535 nm. Le misurazioni sono state registrate ogni 5 secondi e sono state espresse come rapporto F/F0 tra l'intensità relativa durante la stimolazione (F) e quella basale (F0).

7.4 Shear Stress

Per gli esperimenti di stimolazione mediante *shear stress*, le cellule hCMEC/D3 sono state piastrate all'interno di camere per microfluidica μ -Slide I^{0.4} Luer (Ibidi, Germania), preventivamente trattate con collagene per favorire l'adesione cellulare. Una volta raggiunta la confluenza desiderata, le cellule sono state caricate con la sonda fluorescente Fura-2 AM secondo il protocollo descritto nel paragrafo precedente. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state sottoposte a lavaggio per rimuovere la sonda in eccesso e consentire la completa de-esterificazione intracellulare del colorante. Successivamente, le camere microfluidiche sono state collegate a un sistema di perfusione costituito da una pompa peristaltica (Ibidi Pump System), impostando una velocità di flusso pari a 10 RPM sia in ingresso che in uscita, al fine di generare uno shear stress controllato sulle cellule endoteliali. L'attivazione della pompa, e quindi l'applicazione del flusso di soluzione fisiologica salina (PSS), è stata considerata come l'inizio del trattamento sperimentale. Le variazioni della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} sono state quindi monitorate mediante imaging ratiometrico del Ca^{2+} , come descritto nel paragrafo precedente.

7.5 Analisi dati relativi ai segnali di Ca^{2+}

Sono stati raccolti tutti i dati delle misurazioni di Ca^{2+} ottenuti da un minimo di tre esperimenti indipendenti effettuato sulle cellule hCMEC/D3. I dati raccolti sono espressi come media $\pm$ SE (errore standard) e la significatività statistica ($p < 0.05$) è stata valutata con il test t-Student per osservazioni non appaiate. L'ampiezza del picco del segnale di Ca^{2+} ottenuta in seguito ad una stimolazione con un agonista, sia in assenza di Ca^{2+} nella soluzione di registrazione che in seguito al ripristino del Ca^{2+} extracellulare, è stata quantificata calcolando la differenza tra il valore massimo del rapporto di fluorescenza (F340/F380) e il valore medio del rapporto di base ottenuto nei 30 secondi antecedenti al picco. I dati sono stati analizzati con il *software* GraphPad Prism versione 7 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). I dati di elettrofisiologia sono stati analizzati usando software specifici: Nest-o-patch e Clampfit 11.2: sono stati presi in considerazione solo i dati con una corrente significativa. I singoli picchi di ampiezza ottenuti e i valori sono stati misurati con il software Clampfit 11.2, i valori sono stati riportati in un apposito foglio di Excel, dove sono riportati i dati relativi alla singola cellula analizzata.

7.6 Patch-clamp in configurazione whole-cell

Gli esperimenti di elettrofisiologia sono stati eseguiti su cellule endoteliali cerebrali umane della linea hCMEC/D3, utilizzate tra i passaggi P8 e P35. Prima delle registrazioni, le cellule sono state coltivate per 48-72 ore nel mezzo di coltura per cellule endoteliali EBM-2, con l'aggiunta del fattore di crescita FGF-2/bFGF alla concentrazione finale di 1 ng/mL, e quindi sottoposte a misure di patch-clamp in configurazione whole-cell. Le registrazioni sono state effettuate utilizzando un amplificatore Axopatch 200B accoppiato a digitalizzatori Digidata 1440A e MiniDigi 1A (precedentemente Axon Instruments, ora Molecular Devices, LLC., San Jose, CA 95134 USA), controllati mediante i software AxoScope e Clampex della suite pCLAMP (versione 10.7). Capillari in vetro borosilicato di diametro esterno pari a 1.5 mm sono stati tirati a caldo utilizzando un puller verticale Narishige PP-83 (Narishige Japan). Le pipette da patch-clamp così ottenute presentavano una resistenza compresa tra 7 e 8 M Ω quando riempite con la soluzione intracellulare. La capacità della pipetta è stata compensata prima della rottura della membrana, e sono state accettate solo registrazioni con resistenza di sigillo superiore a 1 G Ω . Dopo l'accesso alla configurazione whole-cell, è stata compensata la capacità di membrana cellulare e sono state incluse nell'analisi solo cellule con resistenza di accesso inferiore a 20 M Ω . La soluzione extracellulare utilizzata era una Tyrode Standard contenente 154 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 5.5 mM glucosio e 5 mM HEPES, con pH aggiustato a 7.34 mediante NaOH (osmolarità finale reale: 312.2 mOsm/L). La soluzione intracellulare, denominata SIKa 0 EGTA, conteneva 118 mM KAsp, 15 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 5 mM Na₂ATP e 5 mM HEPES, con pH aggiustato a 7.0 mediante KOH (osmolarità reale finale: 278.3 mOsm/L); tale soluzione era priva di EGTA e conteneva calcio contaminante. Gli esperimenti sono stati condotti in modalità current-clamp a corrente iniettata nulla ($I = 0$). Il segnale di uscita—rappresentante il potenziale di membrana—è stato filtrato con un filtro passa-basso di Bessel con una frequenza di taglio compatibile con la velocità di acquisizione (frequenza di campionamento di 1 kHz) e registrato in continuo mediante acquisizione gap-free. La sostituzione delle soluzioni extracellulari è stata effettuata tramite perfusione locale: le cellule sono state inizialmente perfuse con Tyrode Standard per circa 1 minuto, quindi esposte per circa 1 minuto a Tyrode Standard contenente 10 μ M Yoda1 (attivatore farmacologico del canale PIEZO1) e infine nuovamente perfuse con Tyrode Standard per il lavaggio. I file di registrazione

generati in formato ABF sono stati successivamente analizzati e rappresentati graficamente mediante script R customizzati.

7.7 Silenziamento genico

I siRNA (small interfering RNA o short interfering RNA) sono piccole molecole di RNA a doppio filamento, la cui funzione principale è il silenziamento genico: bloccano l'espressione di specifici geni legandosi ai relativi promotori e impedendo la produzione delle relative proteine.

Per la trasfezione delle hCMEC/D3 sono stati utilizzati siRNA specifici per il riconoscimento di Piezo1 (EHU062561, MISSION siRNA, concentrazione finale 100 nM) acquistati da Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germania) e utilizzati secondo il protocollo LipofectamineTM RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in Opti-MEMTM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). 4 ore dopo la trasfezione il complesso siRNA-Lipofectamin è stato eliminato e le cellule sono state inserite in mezzo di coltura nuovo contenente il 5% di FBS e incubate a 37°C e 5% di CO₂ per la crescita. Si è confermata la riuscita del silenziamento con immunoblotting. Le cellule silenziate sono state utilizzate dopo 24 e 48 ore la trasfezione.

7.8 Immunoblotting

Per la tecnica dell'immunoblotting le cellule hCMEC/D3 sono state piastrate e lasciate crescere su una piastra di coltura a 6 pozzetti fino al raggiungimento di una confluenza del 70-80%. Si è eseguita la lisi cellulare, ponendo le piastre sul ghiaccio e sono stati effettuati due lavaggi in PBS ghiacciato; successivamente le cellule sono state raschiate in tampone RIPA (Pierce® RIPA Buffer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e con il cocktail di inibitori delle proteasi (HaltTM Protease Inhibitor Cocktail, 1:100, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). I lisati sono stati passati al vortex, e infine tenuti in ghiaccio per 10 minuti e poi centrifugati a 4°C per 15 minuti a 13.000x g. Si è usato il kit dell'acido bicinconinico (BCA) (Merck KGaA, Darmstadt, Germania) per quantificare le concentrazioni proteiche ottenute dalla lisi: sono stati prelevati 20 µg di lisato per ciascun campione e sono stati risospesi nel tampone SDS, riscaldati per 30 minuti a 37 °C e poi separati con il gel precast 4%-15% Mini- PROTEAN TGX Precast Protein Gels Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA; USA).

Le proteine ottenute sono state trasferite dal gel alla membrana in PVDF (Trans-BlotTurbo Transfer Pack, Bio-Rad, Hercules, CA; USA) mediante il Trans-Blot Turbo Transfer (BioRad, Hercules, CA; USA). Le membrane ottenute sono state bloccate con soluzione BSA al 5% in TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,6) per 1 ora a temperatura ambiente per bloccare i siti a-specifici. Successivamente queste sono state incubate overnight, in agitazione, a 4°C con l'anticorpo anti-Piezo1 (#ACC-081, 1:200 in TBST 5% BSA 0,02% azide di sodio; Proteintech,15939-1-AP) e l'anticorpo anti- β -Actin-perossidasi (#A385416, 1:5.000 in TBST 5% BSA 0,02% sodio azide; Merck KGaA, Darmstadt, Germania). Le membrane sono state infine lavate con TBST e incubate con opportuno anticorpo secondario coniugato con HRP (#31460, 1:2000 in TBST 5% BSA; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Le differenze nell'espressione proteica sono state valutate utilizzando un pacchetto di elaborazione di immagini quale Fiji (software ImageJ).

7.9 Immunofluorescenza

Le cellule sono state coltivate su vetrini da 9 mm di diametro, rivestiti di collagene di tipo I (#C3867, Merck KGaA, Darmstadt, Germania) e utilizzate dopo aver raggiunto una confluenza di circa l'80-90%. Le cellule sono state lavate due volte con Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), fissate in paraformaldeide al 4% a temperatura ambiente per 10 minuti e permeabilizzate con Triton X-100 allo 0,1% in PBS per 10 minuti. Le cellule sono state bloccate con 1% BSA in PBS e incubate per una notte a 4 °C con l'anticorpo primario anti-Piezo1 (#15939-1-AP, Proteintech Group Inc, Rosemont, USA) 1:200 in TBST 1% BSA. L'anticorpo legato è stato rilevato con l'anticorpo secondario Alexa Fluor 488 (#A11008, :500, Alexa FluorTM 488; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Infine, è stata effettuata la colorazione dei nuclei con DAPI (2 μ g/ μ l, 1:5000.) Le immagini sono state raccolte su un microscopio a scansione confocale Leica SP8 utilizzando obiettivi a immersione in olio 60x (HC PL APO 63x/1.40 OIL CS2 UV, Leica, Wetzlar, Germania).

7.10 Microscopia a fluorescenza

Il microscopio a fluorescenza è un microscopio ottico utilizzato per studiare campioni biologici fluorescenti, basandosi sul fenomeno fisico della fluorescenza. La fluorescenza è il fenomeno fisico in cui alcune molecole, come i fluorocromi, emettono luce di breve durata dopo essere state eccitate dalla luce (o da diverse forme di energia). I fluorocromi, dunque, sono sostanze che colpite da una radiazione, in parte l'assorbono,

in parte la restituiscono: la radiazione emessa ha energia minore di quella incidente e quindi una lunghezza d'onda maggiore. Tale principio è alla base del funzionamento di tale microscopio. La tecnica della epifluorescenza prevede l'utilizzo di un microscopio ottico con l'aggiunta di componenti specifiche. Il microscopio è dotato di due fonti di energia: una lampada bianca che permette di visualizzare il preparato e cercare l'oggetto in esame, una lampada a vapori di mercurio che emette nella regione bassa del visibile e nel vicino ultravioletto. Vi sono le lenti del condensatore che focalizzano, condensano i raggi emessi e i filtri atermici che riducono la temperatura del fascio per non bruciare il preparato. Infine la radiazione viene filtrata da uno o più filtri per far passare una sola lunghezza d'onda, si utilizzano filtri diversi a seconda del fluorocromo utilizzato.

8 RISULTATI

8.1 Il canale meccanosensibile Piezo1 è espresso nelle cellule hCMEC/D3

L'espressione di Piezo1 nella linea cellulare hCMEC/D3 è stata valutata mediante Western Blot (**Figura 8.1A**), confrontando cellule di controllo (hCMEC/D3 CTR) e cellule sottoposte a silenziamento di Piezo1 tramite l'utilizzo di RNA interferenti (siRNA). La quantificazione dell'espressione proteica è stata effettuata mediante analisi densitometrica delle bande utilizzando il software ImageJ, normalizzando i valori rispetto alla proteina housekeeping β -Actina. I risultati hanno evidenziato una significativa diminuzione dei livelli di Piezo1 nelle cellule silenziate rispetto ai controlli, confermando l'efficacia della procedura di knockdown (**Figura 8.1B**). Inoltre, l'espressione e la distribuzione cellulare di Piezo1 sono state investigate mediante immunofluorescenza, che ha mostrato una localizzazione diffusa della proteina nelle cellule hCMEC/D3, suggerendo un'ampia distribuzione subcellulare del canale (**Figura 8.1C**).

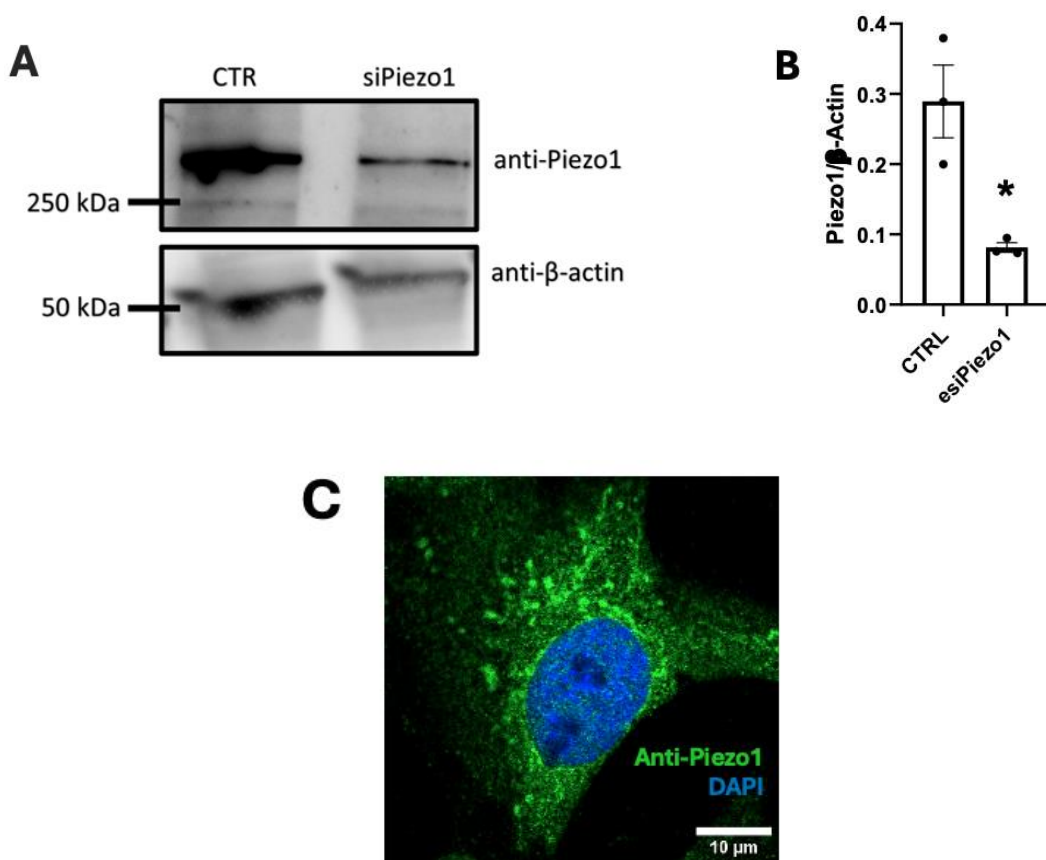


Figura 8.1A. Immagine rappresentativa dell'esperimento di Western Blot eseguito su lisati cellulari di hCMEC/D3 di controllo (CTR) e silenziate per Piezo1 (esiPiezo1), che mostra la presenza di una banda in corrispondenza del peso molecolare atteso per il canale Piezo1 (≈ 250 kDa) e della proteina housekeeping β -actina (≈ 50 kDa), utilizzata come controllo di caricamento. **B.** Quantificazione dei risultati ottenuti dall'esperimento di Western Blot. **C.** Immagine rappresentativa di immunofluorescenza eseguita su cellule hCMEC/D3 mediante anticorpo primario diretto contro Piezo1. I nuclei cellulari sono stati marcati con DAPI.

8.2 L'attivazione farmacologica di Piezo1 induce un aumento del Ca^{2+} intracellulare nelle cellule hCMEC/D3

Dopo aver confermato l'espressione di Piezo1 nelle hCMEC/D3, abbiamo valutato la sua attività funzionale mediante lo studio dei segnali di Ca^{2+} . A tale scopo, le cellule sono state stimulate utilizzando due concentrazioni di Yoda1 (2 e 10 μM), principale agonista selettivo del canale meccanosensibile, ampiamente utilizzato in letteratura come strumento farmacologico per studiare la funzionalità di Piezo1 (Zhou *et al.*, 2023) (**Figura 8.2A-B**). Il trattamento con entrambe le concentrazioni di Yoda1 ha indotto un aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} (**Figura 8.2A-C**). Tale risposta è risultata significativamente ridotta sia nelle cellule hCMEC/D3 sottoposte a silenziamento genico per Piezo1 (esiPiezo1), sia nelle cellule pretrattate con GSMTx4 e Gd^{3+} , due inibitori farmacologici del canale ampiamente descritti in letteratura (Alcaino *et al.*, 2017) (**Figura 8.2A-B, 8.2D-E**). Inoltre, considerando la possibile localizzazione subcellulare di Piezo1, abbiamo studiato i segnali di Ca^{2+} evocati da Yoda1 in assenza di Ca^{2+} extracellulare nella soluzione di registrazione ($0\text{Ca}^{2+}_{\text{out}}$). In queste condizioni, abbiamo osservato un aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} evocato da Yoda1 10 μM (**Figura 8.2C, F**), suggerendo il coinvolgimento delle riserve intracellulari di Ca^{2+} nella genesi dei segnali di Ca^{2+} globali evocati da Piezo1 nelle hCMEC/D3.

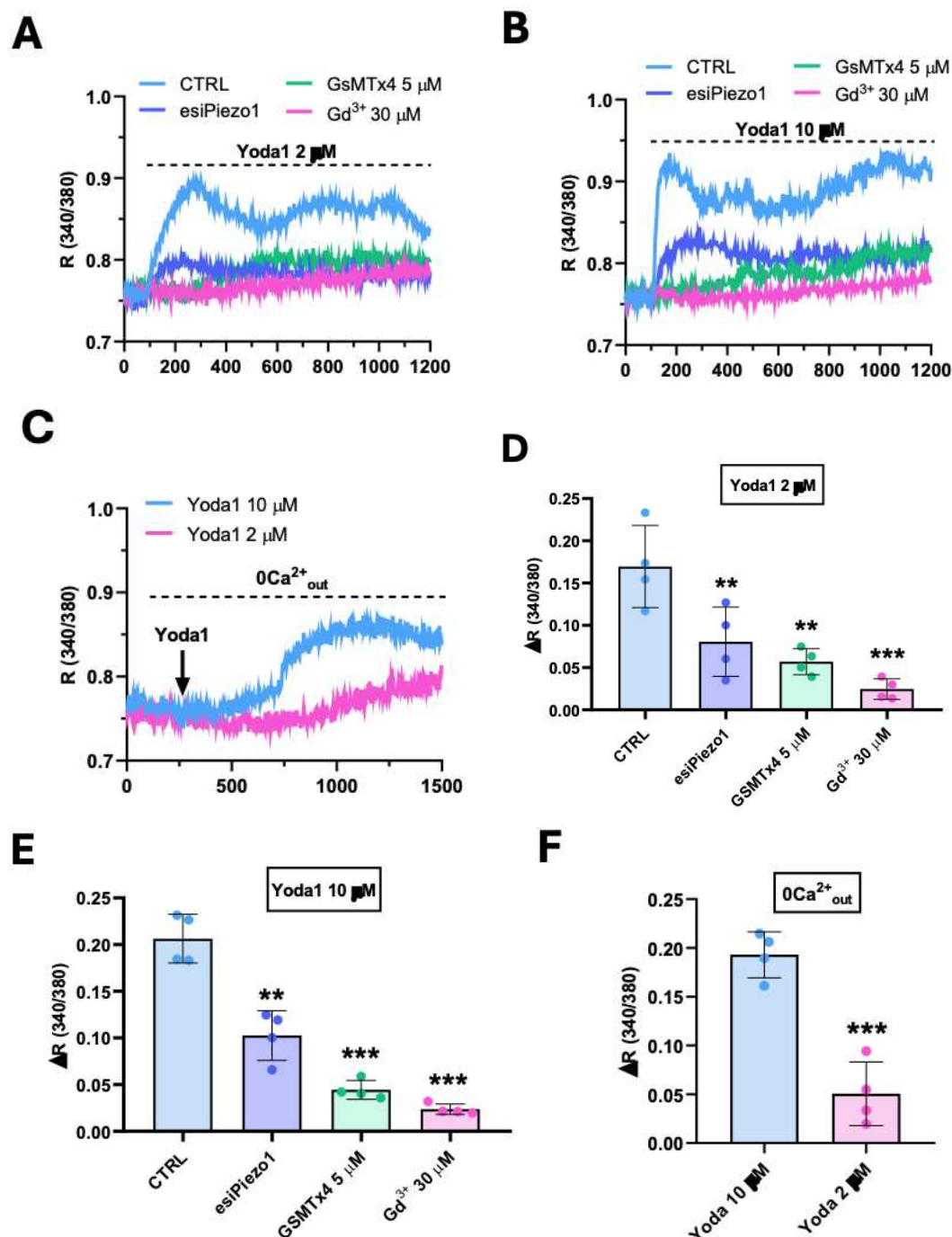


Figura 8.2A. Tracce rappresentative dei segnali di Ca^{2+} ottenuti stimolando le cellule con Yoda1 2 μM in assenza (CTRL) o in presenza di inibitori farmacologici (GSMTx4 5 μM ; Gd^{3+} 30 μM) e genetici (esiPiezo1) del canale Piezo1. **B.** Tracce rappresentative dei segnali di Ca^{2+} ottenuti stimolando le cellule con Yoda1 10 μM in assenza (CTRL) o in presenza degli stessi inibitori farmacologici (GSMTx4 5 μM ; Gd^{3+} 30 μM) e genetici (esiPiezo1) del canale Piezo1. **C.** Tracce rappresentative dei segnali di Ca^{2+} ottenuti stimolando le cellule con Yoda1 10 μM e Yoda1 2 μM in assenza di Ca^{2+} extracellulare ($0\text{Ca}^{2+}_{\text{out}}$). **D-E.** Quantificazione dell'ampiezza del picco dei segnali di Ca^{2+} indotti da Yoda1 2 μM (**D**) e 10 μM (**E**) in presenza di inibitori farmacologici (GSMTx4 5 μM ; Gd^{3+} 30 μM) e genetici (esiPiezo1) del canale Piezo1. Sono stati eseguiti almeno 4 replicati

biologici per ciascuna condizione (numero di cellule analizzate per replicato biologico: $n \geq 20$). Nel grafico sono riportate la media (barre), la distribuzione dei replicati biologici (punti) e la deviazione standard (barre di errore). L'analisi statistica è stata effettuata mediante Student's *t* test confrontando ciascuna condizione sperimentale (esiPiezo1, GSMTx4, Gd^{3+}) con il rispettivo controllo (Yoda1 2 μM o Yoda1 10 μM). Gli asterischi indicano il livello di significatività statistica: ***p*Value $\leq 0,005$; ****p*Value $\leq 0,0005$. **F.** Quantificazione dell'ampiezza del picco dei segnali di Ca^{2+} indotti da Yoda1 2 μM 10 μM in assenza di Ca^{2+} extracellulare ($0Ca^{2+}_{out}$). Nel grafico sono riportate la media (barre), la distribuzione dei replicati biologici (punti) e la deviazione standard (barre di errore). L'analisi statistica è stata effettuata mediante Student's *t* test confrontando tra loro le condizioni sperimentali. Gli asterischi indicano il livello di significatività statistica: ***p*Value $\leq 0,005$; ****p*Value $\leq 0,0005$.

8.3 Lo shear stress stimola un aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} mediato da Piezo1 nelle cellule hCMEC/D3

Considerata la natura meccanosensibile di Piezo1, abbiamo valutato la sua attivazione in condizioni più fisiologiche rispetto alla stimolazione farmacologica, mimando gli stimoli meccanici presenti nel contesto dei microvasi cerebrali. A tale scopo, sono stati eseguiti esperimenti di Ca^{2+} imaging sottoponendo le cellule a shear stress mediante perfusione con soluzione salina fisiologica (PSS) attraverso un sistema a pompa peristaltica. Le cellule sono state coltivate in micro-slide IBIDI VI, che consentono l'applicazione controllata del flusso, come descritto nella sezione Materiali e Metodi. L'attivazione del flusso ha determinato un rapido aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} nelle cellule di controllo, osservabile immediatamente dopo l'inizio della perfusione (**Figura 8.3A**). Per confermare il coinvolgimento di Piezo1 nella generazione di tale risposta, gli esperimenti sono stati ripetuti in cellule hCMEC/D3 sottoposte a silenziamento genico per Piezo1 (esiPiezo1). In queste condizioni, l'aumento del Ca^{2+} intracellulare evocato dallo shear stress è risultato significativamente ridotto rispetto alle cellule di controllo, indicando che Piezo1 rappresenta un mediatore chiave della trasduzione dei segnali meccanici indotti dal flusso nelle cellule endoteliali cerebrali (**Figura 8.3A-B**). Tuttavia, il segnale di Ca^{2+} non è risultato completamente abolito nelle cellule silenziate per Piezo1, suggerendo che altri canali meccanosensibili espressi nelle hCMEC/D3 possano contribuire, almeno in parte, alla trasduzione del segnale evocato dallo shear stress.

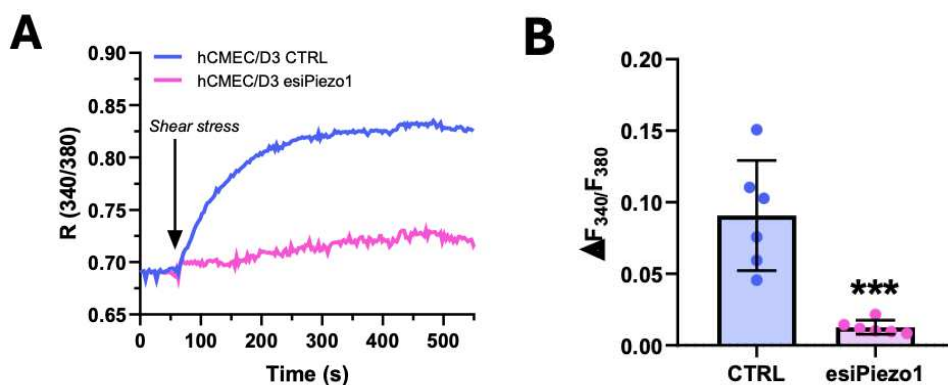


Figura 8.3A. Stimolazione con shear stress su hCMEC/D3. *A* Le cellule hCMEC/D3 sono state sottoposte a shear stress dove l'attivazione del flusso ha determinato un rapido aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} nelle cellule di controllo (CTRL), mentre si è registrata una netta diminuzione del flusso nelle cellule silenziate con esiPiezo1. *B* Quantificazione ampiezza del picco di Ca^{2+} misurato in cellule di controllo (CTRL) e in cellule silenziate con esiPiezo1. L'analisi statistica è stata effettuata mediante Student's *t* test confrontando tra loro le condizioni sperimentali. Gli asterischi indicano il livello di significatività statistica: ****p*Value $\leq 0,0005$.

8.4 Piezo1 attiva segnali vasomodulatori Ca^{2+} -dipendenti nelle cellule hCMEC/D3

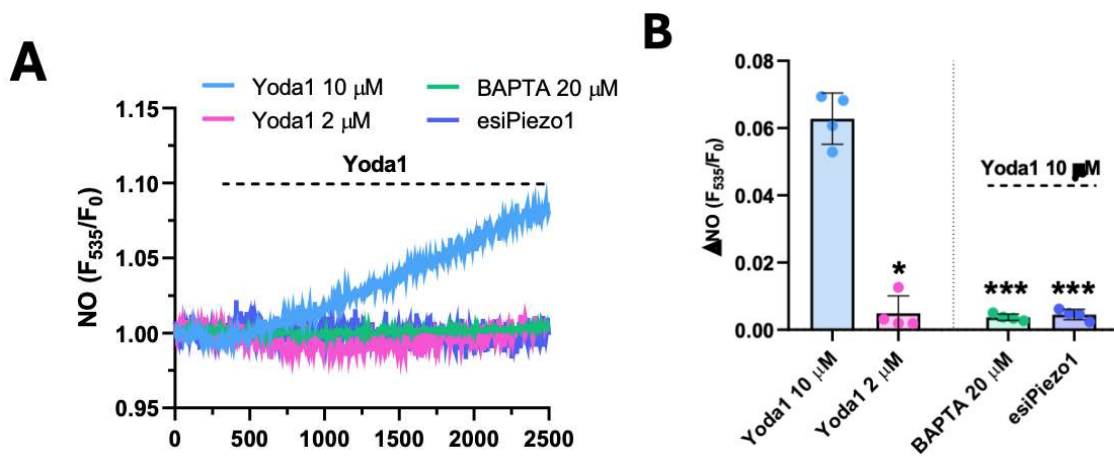
L'ANV rappresenta un meccanismo fondamentale attraverso cui l'attività neuronale viene tradotta in variazioni del FSC. Tale processo può essere mediato sia dal rilascio di fattori vasoattivi diffusibili, quali NO, sia da meccanismi di segnalazione elettrica endotelio-dipendenti, basati sulla propagazione dell'iperpolarizzazione lungo il rivestimento endoteliale fino alle cellule contrattili della parete vascolare. In particolare, l'aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} generato dall'attivazione di Piezo1 nelle hCMEC/D3, potrebbe essere associato sia all'attivazione dell'enzima eNOS che all'attivazione dei canali KCa, già dimostrati essere espressi nelle hCMEC/D3 (Scarpellino *et al.*, 2025; Villanueva C. & Giulivi C., 2010; Longden *et al.*, 2016; Attwell *et al.*, 2010). Sulla base di queste evidenze, abbiamo quindi valutato sia la produzione di NO sia la capacità di Yoda1 di modulare il potenziale di membrana attraverso la generazione di segnali elettrici.

La stimolazione con Yoda1 2 μM non ha determinato variazioni significative nella produzione di NO, mentre il trattamento con Yoda1 10 μM ha indotto un aumento nella produzione di NO (Figura 8.4A-B), sebbene la cinetica di questo segnale risulta particolarmente lenta e sostenuta nel tempo, differendo da quella tipicamente osservata

nelle hCMEC/D3 in seguito alla stimolazione con neurotrasmettitori coinvolti nell'ANV, quali Ach e glutammato che inducono generalmente risposte rapide e transitorie (Guerra *et al.*, 2018; Moccia *et al.*, 2023). Per verificare il coinvolgimento di Piezo1 in tale risposta, gli esperimenti sono stati ripetuti in cellule silenziate per Piezo1, confermando il coinvolgimento del canale nella produzione di NO mediata da Yoda1 10 μ M (**Figura 8.4A-B**). Analogamente, il pretrattamento con BAPTA-AM, un chelante del Ca^{2+} intracellulare, ha ridotto significativamente la produzione di NO indotta da Yoda1 10 μ M, confermando che la produzione di NO dipende dall'ingresso di Ca^{2+} mediato da Piezo1 (**Figura 8.4A-B**).

Infine, mediante esperimenti di elettrofisiologia in current-clamp, una tecnica utilizzata per monitorare le variazioni del potenziale di membrana, abbiamo osservato che la stimolazione con Yoda1 10 μ M induce un'iniziale depolarizzazione seguita da una successiva iperpolarizzazione della membrana, suggerendo che l'ingresso di Ca^{2+} mediato da Piezo1 possa attivare i canali KCa nelle hCMEC/D3 (**Figura 8.4C**).

Nell'insieme, questi risultati indicano che l'attivazione di Piezo1 nelle cellule hCMEC/D3 possa contribuire alla generazione di segnali vasomodulatori Ca^{2+} -dipendenti coinvolti nella regolazione del FSC.



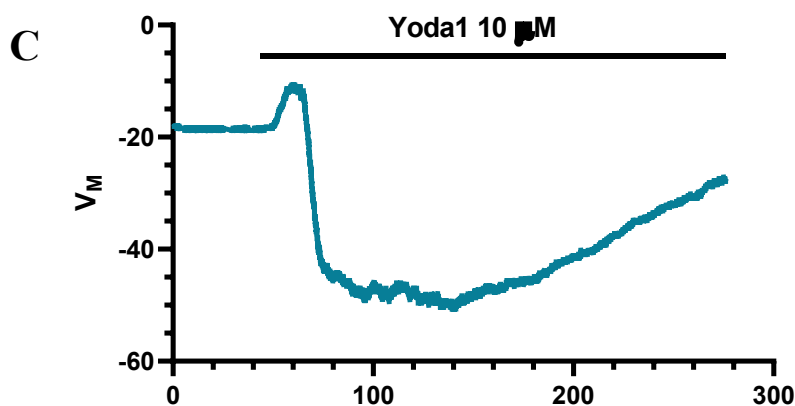


Figura 8.4A. Tracce rappresentative della produzione di NO in cellule hCMEC/D3 di controllo e silenziate geneticamente per Piezo1 (*esiPiezo1*) in seguito al trattamento con Yoda1 10 μ M). Sono inoltre riportate tracce rappresentative del segnale di NO ottenute in seguito al trattamento con Yoda1 10 μ M in presenza del chelante del Ca^{2+} intracellulare BAPTA 20 μ M e in seguito al trattamento con Yoda1 2 μ M. **B.** Quantificazione dell'ampiezza del picco del segnale fluorescente di NO in seguito al trattamento con Yoda1 10 μ M, in presenza di BAPTA 20 μ M o dopo silenziamento genetico di Piezo1 (*esiPiezo1*). È inoltre riportata la quantificazione dell'ampiezza del picco del segnale fluorescente ottenuto in seguito al trattamento con Yoda1 2 μ M. L'analisi statistica è stata effettuata mediante Student's *t* test, o Mann-Whitney test (in accordo con la distribuzione normale dei dati), confrontando ciascuna condizione sperimentale (*esiPiezo1*, BAPTA, Yoda 2 μ M) con il rispettivo controllo (Yoda1 10 μ M). Gli asterischi indicano il livello di significatività statistica: **p*Value $\leq 0,05$; ****p*Value $\leq 0,0005$. **C.** Traccia rappresentativa di esperimento di elettrofisiologia in current clamp. La stimolazione con Yoda1 10 μ M ha indotto una breve depolarizzazione iniziale seguita da una iperpolarizzazione nelle cellule hCMEC/D3.

8.5 L'attivazione di Piezo1 inibisce la migrazione delle cellule hCMEC/D3

Considerato che l'attivazione di Piezo1 nelle cellule hCMEC/D3 determina un aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} e l'attivazione di pathway vasomodulatori Ca^{2+} -dipendenti, abbiamo indagato se tale segnale potesse influenzare altre proprietà funzionali dell'endotelio, tra cui la migrazione cellulare, una funzione Ca^{2+} -dipendente fondamentale nei processi angiogenici e nel rimodellamento vascolare. A tale scopo sono stati eseguiti saggi di migrazione, mediante la tecnica wound healing, sulle cellule hCMEC/D3 trattate con Yoda1 2 e 10 μ M. Dopo l'applicazione dei trattamenti, le immagini sono state acquisite al tempo 0 e dopo 16 h (**Figura 8.5A**), per poi quantificare il tasso di chiusura della ferita misurandone l'area e normalizzandola rispetto alla

corrispondente area iniziale al tempo 0 (**Figura 8.5B**). L'analisi ha mostrato che il trattamento con Yoda1 2 μM non determina variazioni significative della capacità migratoria rispetto le cellule controllo (non trattate). Al contrario, la stimolazione con Yoda1 10 μM riduce significativamente il processo migratorio. Per verificare il coinvolgimento di Piezo1 in tale effetto, le cellule sono state pretrattate con GSMTx4 e in queste condizioni, l'effetto inibitorio di Yoda1 10 μM sulla migrazione è risultato significativamente attenuato, con un recupero della capacità migratoria rispetto alle cellule trattate con il solo agonista.

Nell'insieme, questi risultati suggeriscono che l'attivazione di Piezo1 possa modulare negativamente la migrazione delle cellule hCMEC/D3, indicando un possibile ruolo del canale nel controllo delle proprietà dinamiche dell'endotelio cerebrale.

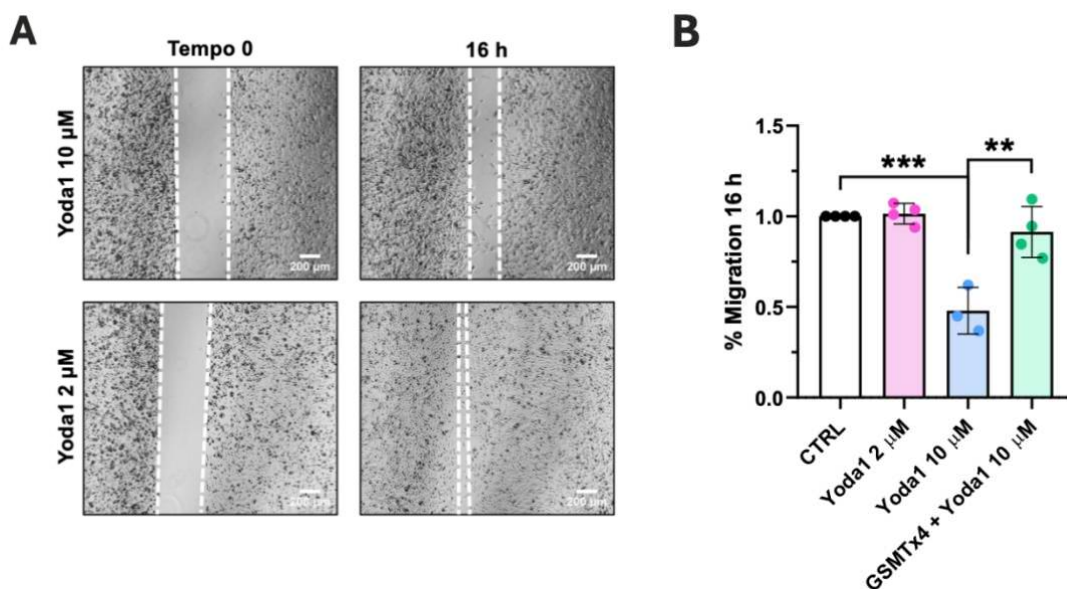


Figura 8.5A. Immagini rappresentative dell'esperimento di wound healing eseguito su cellule hCMEC/D3 al tempo 0 e dopo 16 h di trattamento con Yoda1 (2 μM o 10 μM). **B.** Quantificazione della chiusura della "ferita" dopo 16 h di trattamento nelle condizioni di controllo (CTRL, in assenza di trattamento), Yoda1 2 μM e Yoda1 10 μM in presenza o assenza dell'antagonista del canale Piezo1 GSMTx4 5 μM . L'analisi statistica è stata effettuata mediante Student's *t* test o Mann–Whitney test, in base alla distribuzione dei dati, confrontando ciascuna condizione sperimentale con il rispettivo controllo indicato. Gli asterischi indicano il livello di significatività statistica: ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,0005$.

9 DISCUSSIONE

Il presente lavoro di Tesi ha indagato il ruolo fisiologico dei canali meccanosensibili Piezo1 nel contesto della vascolarizzazione cerebrale, conducendo gli studi sulla linea endoteliale di microvasi cerebrali umani, hCMEC/D3, un modello ampiamente impiegato per gli studi *in vitro* della BEE (Guerra *et al.*, 2018). Nello specifico si è indagata l'espressione e la funzionalità di Piezo1, con il fine di chiarirne il possibile coinvolgimento in processi di rilevanza fisio-patologica, come la regolazione del FSC e la migrazione cellulare.

Come già ampiamente noto in letteratura, Piezo1 è un canale cationico meccanosensibile non selettivo, attivato da *shear stress*, diffusamente distribuito in diverse tipologie cellulari, come cellule endoteliali (Li *et al.*, 2014), cellule muscolari lisce vascolari (Wang *et al.*, 2015) e fibroblasti cardiaci (Jiang *et al.*, 2023). Negli ultimi anni, numerosi studi condotti in differenti modelli cellulari hanno contribuito a ridefinire la visione tradizionale di Piezo1 come canale esclusivamente localizzato sulla membrana plasmatica. In particolare, diverse evidenze hanno dimostrato la presenza di Piezo1 anche a livello intracellulare, suggerendo che il canale possa svolgere funzioni aggiuntive rispetto al suo consolidato ruolo di sensore meccanico e mediatore dell'ingresso di Ca^{2+} (Ye *et al.*, 2022; Jiang *et al.*, 2023; Braidotti *et al.*, 2024). Ad esempio, nella linea cellulare di mioblasti indifferenziati C2C12, Piezo1 è stato identificato a livello del centrosoma, dove sembra partecipare alla regolazione della funzione centrosomiale e della progressione mitotica (David *et al.*, 2023). Analogamente, la localizzazione di Piezo1 in compartimenti intracellulari quali il RE (Bautista *et al.*, 2025) i mitocondri (Jiang *et al.*, 2023) e il nucleo (Ye *et al.*, 2022), osservata in altri modelli cellulari, supporta l'ipotesi di un'ampia distribuzione subcellulare del canale e di una potenziale partecipazione alla regolazione di processi quali l'omeostasi del Ca^{2+} , il metabolismo energetico e la segnalazione intracellulare (Liao *et al.*, 2021).

In accordo con i dati presenti in letteratura, nel presente lavoro di Tesi abbiamo confermato l'espressione di Piezo1 nella linea cellulare hCMEC/D3 mediante analisi di Western blot. Inoltre, gli esperimenti di immunofluorescenza hanno evidenziato una distribuzione subcellulare diffusa del canale, non limitata alla membrana plasmatica e

coerente con quanto osservato in altri modelli cellulari (*Jiang et al., 2023*). Sebbene l'identificazione precisa dei compartimenti intracellulari richieda ulteriori studi di colocalizzazione con specifici marcatori subcellulari, questi risultati suggeriscono che Piezo1 possa essere localizzato anche a livello di organelli intracellulari e, di conseguenza, svolgere funzioni aggiuntive rispetto al suo ruolo canonico di canale meccanosensibile di membrana anche nelle hCMEC/D3.

Successivamente, l'attività funzionale di Piezo1 nelle hCMEC/D3 è stata valutata mediante lo studio dei segnali di Ca^{2+} , utilizzando sia la stimolazione farmacologica con l'agonista selettivo Yoda1, sia lo *shear stress* come stimolo meccanico più fisiologico. In entrambe le condizioni sperimentali abbiamo osservato un aumento significativo della concentrazione di Ca^{2+} attribuibile a Piezo1. Tale risposta, infatti, è risultata significativamente ridotta o abolita in seguito sia al silenziamento farmacologico che genetico di Piezo1, confermando il ruolo causale di Piezo1 nella genesi del segnale Ca^{2+} -dipendente nelle hCMEC/D3. Tuttavia, il segnale di Ca^{2+} non è risultato completamente abolito nelle cellule silenziate per Piezo1, suggerendo che altri canali meccanosensibili espressi nelle cellule hCMEC/D3 possano contribuire, almeno in parte, alla trasduzione del segnale evocato dallo *shear stress*. Recenti studi, infatti, hanno rivelato una possibile cooperazione tra Piezo1 e un altro canale meccanosensibile, TRPV4, che talvolta è attivato in seguito all'attivazione di Piezo1 (*Swain & Liddle, 2020*). L'attivazione di Piezo1, indotta dalla pressione continua del flusso sanguigno lungo i vasi, innesca anche l'apertura PLA2-dipendente di TRPV4, canale cationico non selettivo con ingresso di Ca^{2+} e Na^+ . L'attivazione di TRPV4 può contribuire ad amplificare l'entrata di Ca^{2+} innescata da Piezo1 (*Moccia et al., 2022*).

È interessante notare che, in condizioni di assenza di Ca^{2+} extracellulare ($0\text{Ca}^{2+}_{\text{out}}$), l'applicazione di Yoda1 10 μM induce comunque un aumento della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare. Tale evidenza suggerisce la mobilitazione di riserve intracellulari di Ca^{2+} , coerentemente con la possibile localizzazione intracellulare di Piezo1 nelle hCMEC/D3. Tuttavia, non può essere escluso che tale incremento derivi dall'attivazione dei InsP3R localizzati sul RE. In particolare, l'attivazione di Piezo1 potrebbe promuovere il rilascio di Ca^{2+} dal RE sia attraverso l'attivazione della adenilato ciclasi solubile, come già dimostrato avvenire nelle cellule endoteliali (*Nunez et al., 2023*) sia mediante un meccanismo di CICR (*Guerra et al., 2018; Zuccolo et al., 2018; Zuccolo et al., 2017*).

Dopo aver dimostrato l'espressione e la funzionalità di Piezo1 nelle hCMEC/D3, abbiamo studiato il significato funzionale della sua attivazione nel contesto dei microvasi cerebrali umani. In particolare, sono stati investigati i potenziali meccanismi attraverso cui Piezo1 potrebbe contribuire alla regolazione del FSC, con particolare riferimento alla produzione di NO e all'EDH, due importanti meccanismi Ca^{2+} -dipendenti coinvolti nel controllo del tono vascolare cerebrale. La stimolazione farmacologica delle hCMEC/D3 con Yoda1 ha evidenziato un aumento della produzione di NO esclusivamente alla concentrazione di 10 μM . Il coinvolgimento di Piezo1 è stato confermato dal significativo effetto inibitorio del silenziamento genico del canale, mentre il trattamento con BAPTA-AM ha dimostrato che la produzione di NO è dipendente dall'aumento del Ca^{2+} intracellulare indotto dall'attivazione di Piezo1. Tuttavia, la risposta si è sviluppata in maniera lenta e sostenuta nel tempo, differendo dai segnali rapidi tipicamente evocati dai neurotrasmettitori coinvolti nell'ANV (Negri *et al.*, 2020; Zuccolo *et al.*, 2019). Questo dato suggerisce che la produzione di NO mediata da Piezo1, da sola, potrebbe non essere sufficiente a sostenere efficacemente una vasodilatazione funzionale nei microvasi cerebrali umani. Pertanto, alla luce di precedenti evidenze che dimostrano l'espressione dei canali KCa nelle hCMEC/D3 (Nunez *et al.*, 2023; Zuccolo *et al.*, 2019; Negri *et al.*, 2020) abbiamo ipotizzato che Piezo1 potesse contribuire alla regolazione del FSC anche attraverso il meccanismo dell'EDH, ovvero il meccanismo tale per cui un segnale iperpolarizzante a livello endoteliale può propagarsi lungo il rivestimento endoteliale attraverso *gap junctions* e trasferirsi alle cellule contrattili della parete vascolare (periciti nei capillari e cellule muscolari lisce nelle arteriole) contribuendo alla vasodilatazione e alla conduzione del segnale vascolare (Garland & Dora, 2017; Ledoux *et al.*, 2008). A tale scopo, sono stati condotti esperimenti di patch clamp in modalità current-clamp a corrente iniettata nulla, per registrare il potenziale di membrana in seguito al trattamento con Yoda1 10 μM . In queste condizioni abbiamo osservato che il trattamento con Yoda1 induce una corrente depolarizzante, probabilmente dovuta all'ingresso di Ca^{2+} nella cellula, seguita immediatamente da una corrente iperpolarizzante, potenzialmente ascrivibile all'attivazione dei KCa, precedentemente identificati nelle hCMEC/D3 (Scarpellino *et al.*, 2025). Tale segnale potrebbe promuovere il rilassamento dei periciti e, di conseguenza, la vasodilatazione dei microvasi cerebrali, contribuendo così alla regolazione del FSC. Questo scenario si discosterebbe da ruolo prevalentemente

vasocostrittore attribuito a Piezo1 nei microvasi cerebrali murini, suggerendo possibili differenze specie-specifiche. Tuttavia, il coinvolgimento diretto dei canali KCa in questo processo richiede ulteriori approfondimenti sperimentali. Inoltre, non si può escludere che le risposte osservate nel modello *in vitro* delle hCMEC/D3 differiscano da quelle che si verificano *in vivo*, dove la complessità dell'UNV potrebbe modulare in maniera significativa gli effetti dell'attivazione di Piezo1.

Infine, alla luce del ruolo di Piezo1 nella regolazione di processi pro-angiogenici, abbiamo indagato il suo possibile coinvolgimento della migrazione cellulare, un processo fondamentale per l'angiogenesi e il rimodellamento vascolare. A tale scopo, sono stati eseguiti saggi di migrazione con la tecnica wound healing sulle cellule hCMEC/D3 trattate con Yoda1 a concentrazione 2 e 10 μ M. I nostri risultati hanno evidenziato che il trattamento con Yoda1 10 μ M determina una significativa riduzione della capacità migratoria delle hCMEC/D3 rispetto alle cellule di controllo. Inoltre, il pre-trattamento con GSMTx4 ha attenuato l'effetto inibitorio di Yoda1, determinando un recupero, almeno parziale, della capacità migratoria. Queste osservazioni indicano che l'attivazione di Piezo1 modula negativamente la migrazione delle cellule endoteliali cerebrali umane. Tale risultato appare in parziale contrasto con quanto riportato in altri modelli endoteliali, nei quali Piezo1 promuove la migrazione cellulare e l'angiogenesi (Kang *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2022). Questa discrepanza potrebbe riflettere caratteristiche peculiari dell'endotelio microvascolare cerebrale, la cui funzione primaria è preservare l'integrità della barriera emato-encefalica e mantenere l'omeostasi del microambiente cerebrale piuttosto che sostenere un fenotipo fortemente migratorio. Tuttavia, saranno necessari ulteriori studi per chiarire i meccanismi molecolari alla base di questo effetto e per determinare se l'azione anti-migratoria di Piezo1 osservata nelle hCMEC/D3 sia conservata anche in modelli *in vivo*.

Nel complesso, i nostri dati suggeriscono un nuovo potenziale ruolo fisiologico di Piezo1 nell'endotelio dei microvasi cerebrali umani. Da un lato, l'attivazione del canale potrebbe contribuire alla regolazione locale del FSC attraverso meccanismi Ca^{2+} -dipendenti, quali la produzione di NO e l'attivazione dell'EDH, favorendo una risposta vasodilatatoria. Dall'altro, in condizioni caratterizzate da un aumento delle forze emodinamiche, come durante l'iperemia funzionale, l'attivazione di Piezo1 potrebbe limitare la migrazione

delle cellule endoteliali, contribuendo al mantenimento dell'omeostasi vascolare e prevenendo un eccessivo rimodellamento del microcircolo cerebrale.

I dati ottenuti in questo lavoro di Tesi, quindi, evidenziano la rilevanza fisiologica di Piezo1 nei microvasi cerebrali umani, ma sottolineano al contempo la necessità di ulteriori studi per definire con maggiore precisione il ruolo del canale nei processi di regolazione vascolare e di rimodellamento angiogenico.

10 CONCLUSIONI

Il presente lavoro di Tesi ha dimostrato, per la prima volta, l'espressione e la funzionalità del canale meccanosensibile Piezo1 nelle cellule dei microvasi cerebrali umani hCMEC/D3. I risultati ottenuti indicano che l'attivazione di Piezo1, sia mediante stimolazione farmacologica con Yoda1 sia in risposta allo *shear stress*, induce un significativo aumento della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare nelle hCMEC/D3.

I dati ottenuti evidenziano inoltre che Piezo1 potrebbe contribuire alla regolazione del FSC attraverso meccanismi Ca^{2+} -dipendenti. In particolare, l'attivazione del canale promuove la produzione di NO e potrebbe attivare meccanismi di EDH, suggerendo un possibile ruolo nella modulazione del tono vascolare cerebrale. Infine, il presente studio ha evidenziato che l'attivazione di Piezo1 riduce la capacità migratoria delle hCMEC/D3, indicando un potenziale coinvolgimento del canale nel controllo del rimodellamento vascolare e nel mantenimento dell'omeostasi del microcircolo cerebrale.

Nel complesso, questi risultati identificano Piezo1 come un nuovo regolatore della fisiologia dell'endotelio dei microvasi cerebrali umani, fornendo le basi per futuri studi volti a chiarirne il ruolo nella regolazione del flusso sanguigno cerebrale e nelle patologie cerebrovascolari associate ad alterazioni della meccanotrasduzione endoteliale.

11 BIBLIOGRAFIA

- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010 Jan;37(1):13-25. doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.030. Epub 2009 Aug 5. PMID: 19664713.
- Acuna-Goycolea C, Li Y, Van Den Pol AN. Group III metabotropic glutamate receptors maintain tonic inhibition of excitatory synaptic input to hypocretin/orexin neurons. *J Neurosci.* 2004 Mar 24;24(12):3013-22. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5416-03.2004. PMID: 15044540; PMCID: PMC6729849.
- Alcaïno C, Knutson K, Gottlieb PA, Farrugia G, Beyder A. Mechanosensitive ion channel Piezo2 is inhibited by D-GsMTx4. *Channels (Austin).* 2017 May 4;11(3):245-253. doi: 10.1080/19336950.2017.1279370. Epub 2017 Jan 13. Erratum for: Addendum to: F Wang, K Knutson, C Alcaïno, DR Linden, SJ Gibbons, PK Kashyap, M Grover, R Oeckler, PA Gottlieb, HJ Li, et al. Mechanosensitive ion channel Piezo2 is important for enterochromaffin cell response to mechanical forces. *J Physiol.* 2017; 595(1):79-91; <https://doi.org/10.1113/JP272718>. PMID: 28085630; PMCID: PMC5463886.
- Arnadóttir J, Chalfie M. Eukaryotic mechanosensitive channels. *Annu Rev Biophys.* 2010;39:111-137. doi:10.1146/annurev.biophys.37.032807.125836
- Attwell D, Buchan AM, Chrapak S, Lauritzen M, Macvicar BA, Newman EA. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature.* 2010;468(7321):232-243. doi:10.1038/nature09613
- Attwell D, Iadecola C. The neural basis of functional brain imaging signals. *Trends Neurosci.* 2002 Dec;25(12):621-5. doi: 10.1016/s0166-2236(02)02264-6. PMID: 12446129.
- Balbi M., Koide M., Schwarzmaier S.M., Wellman G.C., Plesnila N. Acute changes in neurovascular reactivity after subarachnoid hemorrhage in vivo. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2017;37:178–187. doi: 10.1177/0271678X15621253.
- Bautista GM, Santana LF, Martin MG. Piezo1 in intestinal smooth muscle cells: Emerging perspectives. *J Physiol.* 2026 Jan;604(1):129-144. doi:

- 10.1113/JP287636. Epub 2025 Nov 13. PMID: 41231209; PMCID: PMC12783945.
- Berra-Romani R, Brunetti V, Pellavio G, et al. Allyl Isothiocyanate Induces Ca^{2+} Signals and Nitric Oxide Release by Inducing Reactive Oxygen Species Production in the Human Cerebrovascular Endothelial Cell Line hCMEC/D3. *Cells*. 2023;12(13):1732. Published 2023 Jun 27. doi:10.3390/cells12131732
 - Blatter LA. Tissue Specificity: SOCE: Implications for Ca^{2+} Handling in Endothelial Cells. *Adv Exp Med Biol*. 2017;993:343-361. doi: 10.1007/978-3-319-57732-6_18. PMID: 28900923.
 - Botello-Smith WM, Jiang W, Zhang H, Ozkan AD, Lin YC, Pham CN, Lacroix JJ, Luo Y. A mechanism for the activation of the mechanosensitive Piezo1 channel by the small molecule Yoda1. *Nat Commun*. 2019 Oct 3;10(1):4503. doi: 10.1038/s41467-019-12501-1. PMID: 31582801; PMCID: PMC6776524.
 - Braidotti N, Demontis G, Conti M, et al. The local mechanosensitive response of primary cardiac fibroblasts is influenced by the microenvironment mechanics. *Sci Rep*. 2024;14(1):10365. Published 2024 May 6. doi:10.1038/s41598-024-60685-4
 - Chalfie M. Neurosensory mechanotransduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 Jan;10(1):44-52. doi: 10.1038/nrm2595. PMID: 19197331.
 - Che J, Sun Y, Deng Y, Zhang J. Blood-brain barrier disruption: a culprit of cognitive decline? *Fluids Barriers CNS*. 2024 Aug 7;21(1):63. doi: 10.1186/s12987-024-00563-3. PMID: 39113115; PMCID: PMC11305076.
 - Coste B, Delmas P. PIEZO Ion Channels in Cardiovascular Functions and Diseases. *Circ Res*. 2024 Mar;134(5):572-591. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.123.322798. Epub 2024 Feb 29. PMID: 38422173.
 - Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science*. 2010 Oct 1;330(6000):55-60. doi: 10.1126/science.1193270. Epub 2010 Sep 2. PMID: 20813920; PMCID: PMC3062430.

- Cox CD, Bae C, Ziegler L, Hartley S, Nikolova-Krstevski V, Rohde PR, Ng CA, Sachs F, Gottlieb PA, Martinac B. Removal of the mechanoprotective influence of the cytoskeleton reveals PIEZO1 is gated by bilayer tension. *Nat Commun*. 2016 Jan 20;7:10366. doi: 10.1038/ncomms10366. PMID: 26785635; PMCID: PMC4735864.
- Damisah EC, Hill RA, Tong L, Murray KN, Grutzendler J. A fluoro-Nissl dye identifies pericytes as distinct vascular mural cells during in vivo brain imaging. *Nat Neurosci*. 2017 Jul;20(7):1023-1032. doi: 10.1038/nn.4564. Epub 2017 May 15. PMID: 28504673; PMCID: PMC5550770.
- Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Jan 5;7(1):a020412. doi: 10.1101/cshperspect.a020412. PMID: 25561720; PMCID: PMC4292164
- David L, Martinez L, Xi Q, et al. Piezo mechanosensory channels regulate centrosome integrity and mitotic entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2023;120(1):e2213846120. doi:10.1073/pnas.2213846120
- Deng S, Yan Z. TMC1 and TMC2 function as the mechano-electrical transduction ion channel in hearing. *Curr Opin Neurobiol*. Published online April 24, 2025. doi:10.1016/j.conb.2025.103026
- Di Nezza F, Zuccolo E, Poletto V, Rosti V, De Luca A, Moccia F, Guerra G, Ambrosone L. Liposomes as a Putative Tool to Investigate NAADP Signaling in Vasculogenesis. *J Cell Biochem*. 2017 Nov;118(11):3722-3729. doi: 10.1002/jcb.26019. Epub 2017 May 16. PMID: 28374913.
- Dong Z, Shanmughapriya S, Tomar D, Siddiqui N, Lynch S, Nemani N, Breves SL, Zhang X, Tripathi A, Palaniappan P, Riitano MF, Worth AM, Seelam A, Carvalho E, Subbiah R, Jaña F, Soboloff J, Peng Y, Cheung JY, Joseph SK, Caplan J, Rajan S, Stathopoulos PB, Madesh M. Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter Is a Mitochondrial Luminal Redox Sensor that Augments MCU Channel Activity. *Mol Cell*. 2017 Mar 16;65(6):1014-1028.e7. doi: 10.1016/j.molcel.2017.01.032. Epub 2017 Mar 2. PMID: 28262504; PMCID: PMC5357178.
- Favia A, Pafumi I, Desideri M, Padula F, Montesano C, Passeri D, Nicoletti C, Orlandi A, Del Bufalo D, Sergi M, Ziparo E, Palombi F, Filippini A. NAADP-Dependent Ca(2+) Signaling Controls Melanoma Progression, Metastatic

- Dissemination and Neoangiogenesis. *Sci Rep.* 2016 Jan 6;6:18925. doi: 10.1038/srep18925. PMID: 26733361; PMCID: PMC4702115.
- Freeman RD, Li B. Neural-metabolic coupling in the central visual pathway. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2016;371(1705):20150357. doi:10.1098/rstb.2015.0357
 - Garland CJ, Dora KA. EDH: endothelium-dependent hyperpolarization and microvascular signalling. *Acta Physiol (Oxf).* 2017;219(1):152-161. doi:10.1111/apha.12649
 - Girouard H, Iadecola C. Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *J Appl Physiol* (1985). 2006;100(1):328- 335. doi:10.1152/japplphysiol.00966.2005
 - Guerra G, Lucariello A, Perna A, Botta L, De Luca A, Moccia F. The Role of Endothelial Ca²⁺ Signaling in Neurovascular Coupling: A View from the Lumen. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4):938. Published 2018 Mar 21. doi:10.3390/ijms19040938
 - Gutteridge DS, Tully PJ, Ghezzi ES, Jamadar S, Smith AE, Commerford T, Keage HAD. Blood pressure variability and structural brain changes: a systematic review. *J Hypertens.* 2022 Jun 1;40(6):1060-1070. doi:10.1097/HJH.0000000000003133. PMID: 35703873.
 - Hamel E. Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J Appl Physiol* (1985). 2006 Mar;100(3):1059-64. doi:10.1152/japplphysiol.00954.2005. PMID: 16467392.
 - Harraz OF, Klug NR, Senatore AJ, Hill-Eubanks DC, Nelson MT. Piezo1 Is a Mechanosensor Channel in Central Nervous System Capillaries. *Circ Res.* 2022 May 13;130(10):1531-1546. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.122.320827. Epub 2022 Apr 6. PMID: 35382561; PMCID: PMC9106929.
 - Harraz OF, Longden TA, Hill-Eubanks D, Nelson MT. PIP₂ depletion promotes TRPV4 channel activity in mouse brain capillary endothelial cells. *Elife.* 2018 Aug 7;7:e38689. doi: 10.7554/eLife.38689. PMID: 30084828; PMCID: PMC6117155.

- Iadecola C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2004 May;5(5):347-60. doi: 10.1038/nrn1387. PMID: 15100718.
- Iadecola C. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron.* 2017;96(1):17-42. doi:10.1016/j.neuron.2017.07.030
- Jiang M, Zhang YX, Bu WJ, et al. Piezo1 channel activation stimulates ATP production through enhancing mitochondrial respiration and glycolysis in vascular endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 2023;180(14):1862-1877. doi:10.1111/bph.16050
- Kang H, Hong Z, Zhong M, et al. Piezo1 mediates angiogenesis through activation of MT1-MMP signaling. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2019;316(1):C92-C103. doi:10.1152/ajpcell.00346.2018
- Kang H, Hong Z, Zhong M, Klomp J, Bayless KJ, Mehta D, Karginov AV, Hu G, Malik AB. Piezo1 mediates angiogenesis through activation of MT1-MMP signaling. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2019 Jan 1;316(1):C92-C103. doi: 10.1152/ajpcell.00346.2018. Epub 2018 Nov 14. PMID: 30427721; PMCID: PMC6383143.
- Keaney J, Campbell M. The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J.* 2015 Nov;282(21):4067-79. doi: 10.1111/febs.13412. Epub 2015 Sep 8. PMID: 26277326.
- Khaddaj Mallat R, Mathew John C, Kendrick DJ, Braun AP. The vascular endothelium: A regulator of arterial tone and interface for the immune system. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2017 Nov-Dec;54(7-8):458-470. doi: 10.1080/10408363.2017.1394267. Epub 2017 Oct 30. PMID: 29084470.
- Kierdorf K, Masuda T, Jordão MJC, Prinz M. Macrophages at CNS interfaces: ontogeny and function in health and disease. *Nat Rev Neurosci.* 2019 Sep;20(9):547-562. doi: 10.1038/s41583-019-0201-x. Epub 2019 Jul 29. PMID: 31358892.
- Kisler K, Nelson AR, Montagne A, Zlokovic BV. Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci.* 2017

- Jul;18(7):419-434. doi: 10.1038/nrn.2017.48. Epub 2017 May 18. PMID: 28515434; PMCID: PMC5759779.
- Krüger-Genge A, Blocki A, Franke RP, Jung F. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18):4411. Published 2019 Sep 7. doi:10.3390/ijms20184411
 - Lecrux C, Hamel E. Neuronal networks and mediators of cortical neurovascular coupling responses in normal and altered brain states. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2016 Oct 5;371(1705):20150350. doi: 10.1098/rstb.2015.0350. PMID: 27574304; PMCID: PMC5003852.
 - Lecrux C, Hamel E. The neurovascular unit in brain function and disease. *Acta Physiol (Oxf).* 2011 Sep;203(1):47-59. doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02256.x. Epub 2011 Mar 22. PMID: 21272266.
 - Ledoux J, Taylor MS, Bonev AD, et al. Functional architecture of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in restricted spaces of myoendothelial projections. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(28):9627-9632. doi:10.1073/pnas.0801963105
 - Lewis AH, Grandl J. Inactivation Kinetics and Mechanical Gating of Piezo1 Ion Channels Depend on Subdomains within the Cap. *Cell Rep.* 2020 Jan 21;30(3):870-880.e2. doi: 10.1016/j.celrep.2019.12.040. PMID: 31968259; PMCID: PMC7021530.
 - Lewis RS. Store-Operated Calcium Channels: From Function to Structure and Back Again. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2020;12(5):a035055. Published 2020 May 1. doi:10.1101/cshperspect.a035055
 - Li J, Cubbon RM, Wilson LA, Amer MS, McKeown L, Hou B, Majeed Y, Tumova S, Seymour VA, Taylor H, Stacey M, O'Regan D, Foster R, Porter KE, Kearney MT, Beech DJ. Orai1 and CRAC channel dependence of VEGF-activated Ca²⁺ entry and endothelial tube formation. *Circ Res.* 2011 May 13;108(10):1190-8. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243352. Epub 2011 Mar 24. PMID: 21441136; PMCID: PMC3512576.

- Li J, Hou B, Tumova S, Muraki K, Bruns A, Ludlow MJ, Sedo A, Hyman AJ, McKeown L, Young RS, Yuldasheva NY, Majeed Y, Wilson LA, Rode B, Bailey MA, Kim HR, Fu Z, Carter DA, Bilton J, Imrie H, Ajuh P, Dear TN, Cubbon RM, Kearney MT, Prasad RK, Evans PC, Ainscough JF, Beech DJ. Piezo1 integration of vascular architecture with physiological force. *Nature*. 2014 Nov 13;515(7526):279-282. doi: 10.1038/nature13701. Epub 2014 Aug 10. PMID: 25119035; PMCID: PMC4230887.
- Li M, Zhang X, Wang M, Wang Y, Qian J, Xing X, Wang Z, You Y, Guo K, Chen J, Gao D, Zhao Y, Zhang L, Chen R, Cui J, Ren Z. Activation of Piezo1 contributes to matrix stiffness-induced angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Commun (Lond)*. 2022 Nov;42(11):1162-1184. doi: 10.1002/cac2.12364. Epub 2022 Oct 1. PMID: 36181398; PMCID: PMC9648387.
- Liao J, Lu W, Chen Y, et al. Upregulation of Piezo1 (Piezo Type Mechanosensitive Ion Channel Component 1) Enhances the Intracellular Free Calcium in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells From Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension Patients. *Hypertension*. 2021;77(6):1974-1989. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.16629
- Lin L, Yee SW, Kim RB, Giacomini KM. SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2015 Aug;14(8):543-60. doi: 10.1038/nrd4626. Epub 2015 Jun 26. PMID: 26111766; PMCID: PMC4698371.
- Lodola F, Laforenza U, Bonetti E, Lim D, Dragoni S, Bottino C, Ong HL, Guerra G, Ganini C, Massa M, Manzoni M, Ambudkar IS, Genazzani AA, Rosti V, Pedrazzoli P, Tanzi F, Moccia F, Porta C. Store-operated Ca²⁺ entry is remodelled and controls in vitro angiogenesis in endothelial progenitor cells isolated from tumoral patients. *PLoS One*. 2012;7(9):e42541. doi: 10.1371/journal.pone.0042541. Epub 2012 Sep 25. PMID: 23049731; PMCID: PMC3458053.
- Longden TA, Dabertrand F, Koide M, et al. Capillary K⁺-sensing initiates retrograde hyperpolarization to increase local cerebral blood flow. *Nat Neurosci*. 2017;20(5):717-726. doi:10.1038/nn.4533

- Longden TA, Hill-Eubanks DC, Nelson MT. Ion channel networks in the control of cerebral blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016 Mar;36(3):492-512. doi: 10.1177/0271678X15616138. Epub 2015 Nov 9. PMID: 26661232; PMCID: PMC4794103.
- Lu, L., Hogan-Cann, A. D., Globa, A. K., Lu, P., Nagy, J. I., Bamji, S. X., & Anderson, C. M. (2019). Astrocytes drive cortical vasodilatory signaling by activating endothelial NMDA receptors. *J Cereb Blood Flow Metab*, 39(3), 481-496. doi:10.1177/0271678X17734100
- Lv JM, Guo XM, Chen B, Lei Q, Pan YJ, Yang Q. The Noncompetitive AMPAR Antagonist Perampanel Abrogates Brain Endothelial Cell Permeability in Response to Ischemia: Involvement of Claudin-5. *Cell Mol Neurobiol.* 2016 Jul;36(5):745-53. doi: 10.1007/s10571-015-0257-8. Epub 2015 Aug 26. PMID: 26306919; PMCID: PMC11482450.
- Malli R, Frieden M, Hunkova M, Trenker M, Graier WF. Ca²⁺ refilling of the endoplasmic reticulum is largely preserved albeit reduced Ca²⁺ entry in endothelial cells. *Cell Calcium.* 2007 Jan;41(1):63-76. doi:10.1016/j.ceca.2006.05.001. Epub 2006 Jul 7. PMID: 16824596; PMCID: PMC4060231.
- McDonald MK, Fritz JA, Jia D, Scheuchner D, Snyder FF, Stanislaus A, Curle J, Li L, Stabler SP, Allen RH, Mains PE, Gravel RA. Identification of ABC transporters acting in vitamin B₁₂ metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Genet Metab.* 2017 Dec;122(4):160-171. doi: 10.1016/j.ymgme.2017.11.002. Epub 2017 Nov 11. PMID: 29153845.
- Meng L, Rasmussen M, Meng DM, White FA, Wu LJ. Integrated Feedforward and Feedback Mechanisms in Neurovascular Coupling. *Anesth Analg.* 2024;139(6):1283- 1293. doi:10.1213/ANE.0000000000006891
- Mishra A, Reynolds JP, Chen Y, Gourine AV, Rusakov DA, Attwell D. Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles. *Nat Neurosci.* 2016 Dec;19(12):1619-1627. doi: 10.1038/nn.4428. Epub 2016 Oct 24. Erratum in: *Nat Neurosci.* 2017 Jul 26;20(8):1189. doi:

- 10.1038/nn0817-1189a. Erratum in: *Nat Neurosci.* 2020 Sep;23(9):1176. doi: 10.1038/s41593-020-0680-0. PMID: 27775719; PMCID: PMC5131849.
- Moccia F, Berra-Romani R, Tanzi F. Update on vascular endothelial Ca(2+) signalling: A tale of ion channels, pumps and transporters. *World J Biol Chem.* 2012 Jul 26;3(7):127-58. doi: 10.4331/wjbc.v3.i7.127. PMID: 22905291; PMCID: PMC3421132.
 - Moccia F, Brunetti V, Soda T, Berra-Romani R, Scarpellino G. Cracking the Endothelial Calcium (Ca²⁺) Code: A Matter of Timing and Spacing. *Int J Mol Sci.* 2023;24(23):16765. Published 2023 Nov 26. doi:10.3390/ijms242316765
 - Moccia F, Fiorio Pla A, Lim D, Lodola F, Gerbino A. Intracellular Ca²⁺ signalling: unexpected new roles for the usual suspect. *Front Physiol.* 2023 Jul 27;14:1210085. doi: 10.3389/fphys.2023.1210085. PMID: 37576340; PMCID: PMC10413985.
 - Moccia F, Negri S, Faris P, Angelone T. Targeting endothelial ion signalling to rescue cerebral blood flow in cerebral disorders. *Vascul Pharmacol.* 2022;145:106997. doi:10.1016/j.vph.2022.106997
 - Negri S, Faris P, Berra-Romani R, Guerra G, Moccia F. Endothelial Transient Receptor Potential Channels and Vascular Remodeling: Extracellular Ca²⁺ Entry for Angiogenesis, Arteriogenesis and Vasculogenesis. *Front Physiol.* 2020 Jan 21;10:1618. doi: 10.3389/fphys.2019.01618. PMID: 32038296; PMCID: PMC6985578.
 - Negri S, Faris P, Maniezzi C, Pellavio G, Spaiardi P, Botta L, Laforenza U, Biella G, Moccia DF. NMDA receptors elicit flux-independent intracellular Ca²⁺ signals via metabotropic glutamate receptors and flux-dependent nitric oxide release in human brain microvascular endothelial cells. *Cell Calcium.* 2021 Nov;99:102454. doi: 10.1016/j.ceca.2021.102454. Epub 2021 Aug 17. PMID: 34454368.
 - Negri S, Faris P, Soda T, Moccia F. Endothelial signaling at the core of neurovascular coupling: The emerging role of endothelial inward-rectifier K⁺ (Kir2.1) channels and N-methyl-d-aspartate receptors in the regulation of cerebral blood flow. *Int J Biochem Cell Biol.* 2021 Jun;135:105983. doi: 10.1016/j.biocel.2021.105983. Epub 2021 Apr 21. PMID: 33894355.

- Østergaard L. Blood flow, capillary transit times, and tissue oxygenation: the centennial of capillary recruitment. *J Appl Physiol* (1985). 2020 Dec 1;129(6):1413-1421. doi: 10.1152/japplphysiol.00537.2020. Epub 2020 Oct 8. PMID: 33031017.
- Prakriya M, Lewis RS. Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev*. 2015 Oct;95(4):1383-436. doi: 10.1152/physrev.00020.2014. PMID: 26400989; PMCID: PMC4600950.
- Raichle ME, Mintun MA. Brain work and brain imaging. *Annu Rev Neurosci*. 2006;29:449-76. doi: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.112819. PMID: 16776593.
- Ranade SS, Qiu Z, Woo SH, Hur SS, Murthy SE, Cahalan SM, Xu J, Mathur J, Bandell M, Coste B, Li YS, Chien S, Patapoutian A. Piezo1, a mechanically activated ion channel, is required for vascular development in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jul 15;111(28):10347-52. doi: 10.1073/pnas.1409233111. Epub 2014 Jun 23. PMID: 24958852; PMCID: PMC4104881.
- Ranade SS, Syeda R, Patapoutian A. Mechanically Activated Ion Channels [published correction appears in *Neuron*. 2015 Oct 21;88(2):433]. *Neuron*. 2015;87(6):1162-1179. doi:10.1016/j.neuron.2015.08.032
- Rode B, Shi J, Endesh N, Drinkhill MJ, Webster PJ, Lotteau SJ, Bailey MA, Yuldasheva NY, Ludlow MJ, Cubbon RM, Li J, Futers TS, Morley L, Gaunt HJ, Marszalek K, Viswambharan H, Cuthbertson K, Baxter PD, Foster R, Sukumar P, Weightman A, Calaghan SC, Wheatcroft SB, Kearney MT, Beech DJ. Piezo1 channels sense whole body physical activity to reset cardiovascular homeostasis and enhance performance. *Nat Commun*. 2017 Aug 24;8(1):350. doi: 10.1038/s41467-017-00429-3. PMID: 28839146; PMCID: PMC5571199.
- Rowsthorn, E., Pham, W., Nazem-Zadeh, MR. *et al*. Imaging the neurovascular unit in health and neurodegeneration: a scoping review of interdependencies between MRI measures. *Fluids Barriers CNS* 20, 97 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12987-023-00499-0>
- Sancho M, Klug NR, Mughal A, Koide M, Huerta de la Cruz S, Heppner TJ, Bonev AD, Hill-Eubanks D, Nelson MT. Adenosine signaling activates ATP-

- sensitive K⁺ channels in endothelial cells and pericytes in CNS capillaries. *Sci Signal*. 2022 Mar 29;15(727):eabl5405. doi: 10.1126/scisignal.abl5405. Epub 2022 Mar 29. PMID: 35349300; PMCID: PMC9623876.
- Santana Nunez D, Malik AB, Lee Q, Ahn SJ, Coctecon-Murillo A, Lazarko D, Levitan I, Mehta D, Komarova YA. Piezo1 induces endothelial responses to shear stress via soluble adenylyl Cyclase-IP₃R2 circuit. *iScience*. 2023 Apr 11;26(5):106661. doi: 10.1016/j.isci.2023.106661. Erratum in: *iScience*. 2023 Dec 08;27(1):108633. doi: 10.1016/j.isci.2023.108633. PMID: 37168565; PMCID: PMC10164902.
 - Saotome K, Murthy SE, Kefauver JM, Whitwam T, Patapoutian A, Ward AB. Structure of the mechanically activated ion channel Piezo1. *Nature*. 2018;554(7693):481–486. doi:10.1038/nature25453.
 - Satoh K, et al. *Brain Res*. 2006 Sep 7;1108:19. doi: 10.1016/j.brainres.2006.06.050.
 - Saunders NR, Liddelow SA, Dziegielewska KM. Barrier mechanisms in the developing brain. *Front Pharmacol*. 2012 Mar 29;3:46. doi: 10.3389/fphar.2012.00046. PMID: 22479246; PMCID: PMC3314990.
 - Scarpellino G, Brunetti V, Scolari F, Visentin L, Biella GR, Ruffinatti FA, Moccia F. The ion transport, GPCR, and RTK toolkit expression in the human cerebrovascular endothelial cell line, hCMEC/D3: an Omics perspective. *Front Physiol*. 2025 Dec 18;16:1733266. doi: 10.3389/fphys.2025.1733266. PMID: 41488927; PMCID: PMC12756094.
 - Stobart JL, Lu L, Anderson HD, Mori H, Anderson CM. Astrocyte-induced cortical vasodilation is mediated by D-serine and endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Feb 19;110(8):3149-54. doi: 10.1073/pnas.1215929110. Epub 2013 Feb 5. PMID: 23386721; PMCID: PMC3581926.
 - Swain SM, Liddle RA. Mechanosensing Piezo channels in gastrointestinal disorders. *J Clin Invest*. 2023;133(19):e171955. Published 2023 Oct 2. doi:10.1172/JCI171955

- Swain SM, Liddle RA. Piezo1 acts upstream of TRPV4 to induce pathological changes in endothelial cells due to shear stress. *J Biol Chem*. 2021;296:100171. doi:10.1074/jbc.RA120.015059
- Sweeney MD, Zhao Z, Montagne A, Nelson AR, Zlokovic BV. Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol Rev*. 2019 Jan 1;99(1):21-78. doi: 10.1152/physrev.00050.2017. PMID: 30280653; PMCID: PMC6335099.
- Syeda R, Florendo MN, Cox CD, Kefauver JM, Santos JS, Martinac B, Patapoutian A. Piezo1 Channels Are Inherently Mechanosensitive. *Cell Rep*. 2016 Nov 8;17(7):1739-1746. doi: 10.1016/j.celrep.2016.10.033. PMID: 27829145; PMCID: PMC5129625.
- Tarasoff-Conway JM, Carare RO, Osorio RS, Glodzik L, Butler T, Fieremans E, Axel L, Rusinek H, Nicholson C, Zlokovic BV, Frangione B, Blennow K, Ménard J, Zetterberg H, Wisniewski T, de Leon MJ. Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2015 Aug;11(8):457-70. doi: 10.1038/nrneurol.2015.119. Epub 2015 Jul 21. Erratum in: *Nat Rev Neurol*. 2016 Apr;12(4):248. doi: 10.1038/nrneurol.2016.36. PMID: 26195256; PMCID: PMC4694579.
- Thakore P, Alvarado MG, Ali S, Mughal A, Pires PW, Yamasaki E, Pritchard HA, Isakson BE, Tran CHT, Earley S. Brain endothelial cell TRPA1 channels initiate neurovascular coupling. *Elife*. 2021 Feb 26;10:e63040. doi: 10.7554/eLife.63040. PMID: 33635784; PMCID: PMC7935492.
- Tschumperlin DJ. Mechanotransduction. *Compr Physiol*. 2011 Apr;1(2):1057-73. doi: 10.1002/cphy.c100016. PMID: 23737212.
- Villanueva C, Giulivi C. Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. *Free Radic Biol Med*. 2010 Aug 1;49(3):307-16. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.004. Epub 2010 Apr 11. PMID: 20388537; PMCID: PMC2900489.
- Wang H, Yuan Z, Wang B, Li B, Lv H, He J, Huang Y, Cui Z, Ma Q, Li T, Fu Y, Tan X, Liu Y, Wang S, Wang C, Kong W, Zhu Y. COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein), a Novel PIEZO1 Regulator That Controls Blood Pressure.

- Hypertension. 2022 Mar;79(3):549-561. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.17972. Epub 2022 Jan 5. PMID: 34983194.
- Wang L, Zhou H, Zhang M, Liu W, Deng T, Zhao Q, Li Y, Lei J, Li X, Xiao B. Structure and mechanogating of the mammalian tactile channel PIEZO2. *Nature*. 2019 Sep;573(7773):225-229. doi: 10.1038/s41586-019-1505-8. Epub 2019 Aug 21. PMID: 31435011.
 - Wang P, Wang C, Zhang Y, Miao P, Liu J, Wei S, Wei Y, Han S, Wang X, Wang Y, Wu L, Wang K, Cheng J, Wei Y. Altered resting-state neurovascular coupling in patients with pontine infarction. *Exp Gerontol*. 2023 Aug;179:112241. doi: 10.1016/j.exger.2023.112241. Epub 2023 Jun 29. PMID: 37329964.
 - Wang S, Chennupati R, Kaur H, Iring A, Wettschureck N, Offermanns S. Endothelial cation channel PIEZO1 controls blood pressure by mediating flow-induced ATP release. *J Clin Invest*. 2016 Dec 1;126(12):4527-4536. doi: 10.1172/JCI87343. Epub 2016 Oct 31. PMID: 27797339; PMCID: PMC5127677.
 - Wu J, Young M, Lewis AH, Martfeld AN, Kalmeta B, Grandl J. Inactivation of Mechanically Activated Piezo1 Ion Channels Is Determined by the C-Terminal Extracellular Domain and the Inner Pore Helix. *Cell Rep*. 2017 Nov 28;21(9):2357-2366. doi: 10.1016/j.celrep.2017.10.120. PMID: 29186675; PMCID: PMC5938756.
 - Xiao M, Xiao ZJ, Yang B, Lan Z, Fang F. Blood-Brain Barrier: More Contributor to Disruption of Central Nervous System Homeostasis Than Victim in Neurological Disorders. *Front Neurosci*. 2020 Aug 6;14:764. doi: 10.3389/fnins.2020.00764. PMID: 32903669; PMCID: PMC7438939.
 - Yang L, Zhao W, Kan Y, Ren C, Ji X. From Mechanisms to Medicine: Neurovascular Coupling in the Diagnosis and Treatment of Cerebrovascular Disorders: A Narrative Review. *Cells*. 2024 Dec 27;14(1):16. doi: 10.3390/cells14010016. PMID: 39791717; PMCID: PMC11719775.
 - Ye Y, Barghouth M, Dou H, Luan C, Wang Y, Karagiannopoulos A, Jiang X, Krus U, Fex M, Zhang Q, Eliasson L, Rorsman P, Zhang E, Renström E. A critical role of the mechanosensor PIEZO1 in glucose-induced insulin secretion in

- pancreatic β -cells. *Nat Commun.* 2022 Jul 22;13(1):4237. doi: 10.1038/s41467-022-31103-y. PMID: 35869052; PMCID: PMC9307633.
- Zhang D, Ruan J, Peng S, Li J, Hu X, Zhang Y, Zhang T, Ge Y, Zhu Z, Xiao X, Zhu Y, Li X, Li T, Zhou L, Gao Q, Zheng G, Zhao B, Li X, Zhu Y, Wu J, Li W, Zhao J, Ge WP, Xu T, Jia JM. Synaptic-like transmission between neural axons and arteriolar smooth muscle cells drives cerebral neurovascular coupling. *Nat Neurosci.* 2024 Feb;27(2):232-248. doi: 10.1038/s41593-023-01515-0. Epub 2024 Jan 2. PMID: 38168932; PMCID: PMC10849963.
 - Zhao Q, Wu K, Geng J, Chi S, Wang Y, Zhi P, Zhang M, Xiao B. Ion Permeation and Mechanotransduction Mechanisms of Mechanosensitive Piezo Channels. *Neuron.* 2016 Mar 16;89(6):1248-1263. doi: 10.1016/j.neuron.2016.01.046. Epub 2016 Feb 25. PMID: 26924440.
 - Zhao Z, Zlokovic BV. Blood-brain barrier: a dual life of MFSD2A? *Neuron.* 2014 May 21;82(4):728-30. doi: 10.1016/j.neuron.2014.05.012. PMID: 24853933; PMCID: PMC4114515.
 - Zhou Z, Ma X, Lin Y, Cheng D, Bavi N, Secker GA, Li JV, Janbandhu V, Sutton DL, Scott HS, Yao M, Harvey RP, Harvey NL, Corry B, Zhang Y, Cox CD. MyoD-family inhibitor proteins act as auxiliary subunits of Piezo channels. *Science.* 2023 Aug 18;381(6659):799-804. doi: 10.1126/science.adh8190. Epub 2023 Aug 17. PMID: 37590348.
 - Zhou Z, Martinac B. Mechanisms of PIEZO Channel Inactivation. *Int J Mol Sci.* 2023 Sep 14;24(18):14113. doi: 10.3390/ijms241814113. PMID: 37762415; PMCID: PMC10531961.
 - Zlokovic BV. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2011 Nov 3;12(12):723-38. doi: 10.1038/nrn3114. PMID: 22048062; PMCID: PMC4036520.
 - Zuccolo E, Laforenza U, Negri S, Botta L, Berra-Romani R, Faris P, Scarpellino G, Forcaia G, Pellavio G, Sancini G, Moccia F. Muscarinic M5 receptors trigger acetylcholine-induced Ca^{2+} signals and nitric oxide release in human brain

microvascular endothelial cells. *J Cell Physiol.* 2019 Apr;234(4):4540-4562. doi: 10.1002/jcp.27234. Epub 2018 Sep 7. PMID: 30191989.

- Zuccolo E, Lim D, Kheder DA, Perna A, Catarsi P, Botta L, Rosti V, Riboni L, Sancini G, Tanzi F, D'Angelo E, Guerra G, Moccia F. Acetylcholine induces intracellular Ca^{2+} oscillations and nitric oxide release in mouse brain endothelial cells. *Cell Calcium.* 2017 Sep;66:33-47. doi: 10.1016/j.ceca.2017.06.003. Epub 2017 Jun 12. PMID: 28807148.