ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

FORTH
BIOMEDICAL RESEARCH INSTITUTE

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών
'Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες'

Εγκαθίδρυση δοκιμασίας μελέτης της ενδοκυττάρωσης, με σκοπό την σάρωση χημικών μορίων για την ανακάλυψη νέων αναστολέων αυξητικών παραγόντων

Establishment of an endocytosis assay, for screening chemical compounds to identify novel growth factor inhibitors

Σοφία Πελώνη

Επιβλέπων: Σάββας Χριστοφορίδης, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ιωάννινα 2026

Στην οικογένειά μου…

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας πραγματοποιήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Ιούλιος 2025-Σεπτέμβριος 2026, στο Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών Ιωαννίνων (BRI). Την επίβλεψη και καθοδήγηση της ερευνητικής εργασίας ανέλαβε ο Καθηγητής κ. Σάββας Χριστοφορίδης.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Σάββα Χριστοφορίδη, για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την παρούσα ερευνητική εργασία, καθώς και για την πολύτιμη επιστημονική καθοδήγηση και υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησής της. Η συμβολή του υπήρξε καθοριστική, τόσο στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας όσο και στην απόκτηση νέων γνώσεων και την εξέλιξή μου σε επιστημονικό και προσωπικό επίπεδο.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω και στα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Γεώργιο Λεονταρίτη και τον Επίκουρο Καθηγητή Πέτρο Μποζίδη, για την αποδοχή τους να συμμετέχουν στην αξιολόγηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, καθώς και για τον χρόνο και την προσοχή που αφιέρωσαν.

Θα ήθελα επίσης, να ευχαριστήσω θερμά την κα Αλεξάνδρα Παπαφωτίκα, Διδακτορική Ερευνήτρια και μέλος του εργαστηρίου, για την ουσιαστική βοήθειά της στη προετοιμασία μου στη διεξαγωγή των πειραμάτων, αλλά και την καθοδήγηση και συμπαράστασή της. Η συμβολή της στην διεξαγωγή της ερευνητικής μου εργασίας είναι ανεκτίμητη, καθώς μου προσέφερε πολλές γνώσεις και έδινε λύση σε κάθε πρόβλημα που προέκυπτε. Ιδιαίτερα ευχαριστώ και την Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Ευαγγελία Γούλα, η οποία μου προσέφερε γνώσεις που με συνόδευσαν καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής μου εργασίας.

Φυσικά, ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου, τη Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Εύη Βασίλη, τους Διδακτορικούς φοιτητές Μάρθα Κοντοστάθη και Παναγιώτη Λέντζαρη, τις Μεταπτυχιακές φοιτήτριες Αριάδνη Βαρδάκη και Έλενα Σακά και τους Προπτυχιακούς φοιτητές Ναταλία Καραθανάση και Γιώργο Καφαντάρη, για την εξαιρετική συνεργασία και το όμορφο κλίμα που υπήρχε.

Θα ήθελα ακόμη, να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλα τα μέλη του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών Ιωαννίνων για τη στήριξη και συμβολή τους στη δημιουργία ενός φιλικού και συνεργατικού περιβάλλοντος.

Ευχαριστώ επίσης, τον Καθηγητή Ανδρέα Τζάκο και το εργαστήριό του, που μας προσέφεραν τις χημικές ενώσεις, καθώς και για την πολύτιμη συνεργασία μας.

Τέλος, οφείλω ένα ξεχωριστό ευχαριστώ και απέραντη ευγνωμοσύνη στην οικογένειά μου και στους ανθρώπους που στάθηκαν δίπλα μου καθ' όλη τη διάρκεια της ακαδημαϊκής μου πορείας. Ευχαριστώ από καρδιάς τους γονείς μου, Βασίλη και Ελένη, για την αμέριστη αγάπη, στήριξη και ενθάρρυνσή τους, καθώς και την αδελφή μου, Χριστίνα, για τη συμπαράστασή της σε κάθε μου βήμα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ 7

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 9

ABSTRACT 11

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 13

1.1 Καρκίνος 13

1.1.1 Βιολογικά Χαρακτηριστικά 13

1.1.2 Στοχευμένες Θεραπείες 15

1.2 Κυτταρική Ενδοκυττάρωση 15

1.2.1 Χαρακτηριστικά Ενδοκυττάρωσης 15

1.2.2 Είδη Ενδοκυττάρωσης 17

1.2.2.1 Ενδοκυττάρωση Εξαρτώμενη από την Caveolae 17

1.2.2.2 Ενδοκυττάρωση CLIC/GEEC (Clathrin-Independent Carriers/GPI-anchored protein-Enriched Early Endosomal Compartments) 18

1.2.2.3 Ενδοκυττάρωση Μέσω του Μονοπατιού IL2Rβ (Interleukin-2 Receptor beta chain) 19

1.2.2.4 Ενδοκυττάρωση Εξαρτώμενη από την Arf6 20

1.2.2.5 Ενδοκυττάρωση Εξαρτώμενη από την Φλοτιλλίνη 21

1.2.2.6 Φαγοκυττάρωση 22

1.2.2.7 Μακροπινοκυττάρωση 23

1.2.2.8 Ταχεία Ενδοκυττάρωση με τη Μεσολάβηση της Ενδοφυλίνης (FEME: Fast Endophilin-Mediated Endocytosis) 24

1.2.3 Ενδοκυττάρωση Εξαρτώμενη από την Κλαθρίνη (CME: Clathrin-Mediated Endocytosis) 25

1.3 Δυναμίνη: Βασικά Χαρακτηριστικά, Δομή και Λειτουργία 28

1.3.1 Βασικά Χαρακτηριστικά 28

1.3.2 Δομή 28
1.3.3 Λειτουργία 29
1.4 Τρανσφερρίνη (Tf: Transferrin) 29
1.4.1 Γενικά Χαρακτηριστικά 29
1.4.2 Ενδοκυττάρωση Τρανσφερρίνης 30
1.4.3 Υποδοχείς Τρανσφερρίνης (TfR: Transferrin Receptor) 32
1.4.3.1. TfR1 32
1.4.3.2 TfR2 33
1.5 Σηματοδοτικά Μονοπάτια που Σχετίζονται με τον Καρκίνο 34
1.5.1 Σηματοδοτικό Μονοπάτι AKT/PI3K 34
1.5.2 Σηματοδοτικό Μονοπάτι MAPK/ERK (Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular signal-Regulated Kinase) 35
1.5.3 Σηματοδοτικό Μονοπάτι Wnt/β-κατενίνη (Wingless-Integrated/β-κατενίνη) 35
1.6 Αναστολείς Ενδοκυττάρωσης 36
1.6.1 Dynasore 36
1.6.2 Άλλοι Αναστολείς Ενδοκυττάρωσης 39
1.6.3 Off-target Effects 40
1.7 Σκοπός της Μεταπτυχιακής Διατριβής 41
2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ 42
2.1 Αντιδραστήρια και Αντισώματα 42
2.2 Καλλιέργεια Κυττάρων 42
2.2.1 Καλλιέργεια Καρκινικών Κυττάρων HeLa 42
2.2.2 Καλλιέργεια Ενδοθηλιακών Κυττάρων HUVEC 42
2.3 Ανοσοφθορισμός 43
2.4 Μέτρηση Συγκέντρωσης Πρωτεΐνης 43

2.5 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε Πήκτωμα Πολυακρυλαμιδίου κατά Western.....44

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....45

3.1 Έλεγχος του Ποσοστού Αναστολής των Χημικών Αναστολέων με Ανοσοφθορισμό.....48

3.1.1 Έλεγχος Αναστολής του Χημικού Αναστολέα Dynasore.....48

3.1.2 Έλεγχος Αναστολής του Χημικού Αναστολέα MDY-1.....49

3.1.3 Έλεγχος Αναστολής του Χημικού Αναστολέα MDY-2.....51

3.1.4 Έλεγχος Αναστολής του Χημικού Αναστολέα MDY-3.....54

3.1.5 Έλεγχος Αναστολής του Χημικού Αναστολέα MDY-4.....56

3.1.6 Έλεγχος Αναστολής του Χημικού Αναστολέα MDY-5.....58

3.2 Έλεγχος του Ποσοστού Αναστολής των Χημικών Αναστολέων με SDS-PAGE.....60

3.2.1 Έλεγχος Αναστολής του Χημικού Αναστολέα Dynasore.....61

3.2.2 Έλεγχος Αναστολής του Χημικού Αναστολέα MDY-1.....64

3.2.3 Έλεγχος Αναστολής του Χημικού Αναστολέα MDY-3.....68

3.2.4 Έλεγχος Αναστολής του Χημικού Αναστολέα MDY-4.....70

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....73

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....77

ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

AP-1,2: Adaptor Protein complex 1,2

BCA: Bicinchoninic Acid Assay

Cav-1: Caveolin-1

CCP: Clathrin-Coated Pit

CCV: Clathrin-Coated Vesicle

CK1a: Casein Kinase 1 alpha

CLIC: Clathrin-Independent Carriers

CME: Clathrin-Mediated Endocytosis

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

DMT1: Divalent Metal Transporter 1

ECL: Enhanced Chemiluminescence

EGF: Epidermal Growth Factor

EHBP1: EH Domain-Binding Protein 1

EHD2: EH-Domain containing protein 2

ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase

FBS: Fetal Bovine Serum

FEME: Fast Endophilin-Mediated Endocytosis

GAPs: GTPase-Activating Proteins

GED: GTPase Effector Domain

GEEC: GPI-anchored protein-Enriched Early Endosomal Compartments

GPCRs: G Protein-Coupled Receptors

GPI-APs: Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins

GSK3: Glycogen Synthase Kinase 3

GTP: Guanosine Triphosphate

HeLa: Henrietta Lacks

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells

IL-2Rβ: Interleukin-2 Receptor beta chain

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

MD: Middle Domain

MiTMAB: Mitochondrial Targeting Motif-Associated Blocker

mTORC1, 2: Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1,2

PBS: Phosphate-Buffered Saline

PDGF: Platelet-Derived Growth Factor

PDK1: 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase-1

PFA: Paraformaldehyde

PH domain: Pleckstrin Homology domain

$PI(4,5)P_2$: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PI3K: Phosphoinositide 3-Kinase

PIP3: Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate

PRD: Proline-Rich Domain

PTEN: Phosphatase and Tensin homolog

Rho: Ras homologous

RT: Room Temperature

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophorisis

SVR: Stimulated Vesicle Recycling

Tf: Transferrin

TfR: Transferrin Receptor

TSC1, 2: Tuberous Sclerosis Complex 1

Wnt: Wingless-Integrated

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος συνεχίζει να αποτελεί μια ασθένεια με μεγάλο ποσοστό θνησιμότητας, παρόλο που τα τελευταία χρόνια αυτό το ποσοστό έχει μειωθεί. Ένα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά του είναι ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των κυττάρων. Η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία συνεχίζουν να είναι βασικές αντικαρκινικές θεραπείες, αν και η 'στοχευμένη θεραπεία' φαίνεται να εξελίσσεται και να αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη αντικαρκινική θεραπεία.

Η ενδοκυττάρωση, η πρόσληψη δηλαδή μορίων και υλικών από την πλασματική μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη καρκινικών όγκων, καθώς η αναστολή της μπορεί να καταστήσει τα καρκινικά κύτταρα ευαίσθητα στις αντικαρκινικές θεραπείες. Υπάρχουν πολλά διαφορετικά είδη ενδοκυττάρωσης, με την ενδοκυττάρωση εξαρτώμενη από την κλαθρίνη (CME) να είναι η πιο καλά μελετημένη.

Κατά την CME, γίνεται επιλογή του φορτίου που θα μεταφερθεί στο εσωτερικό του κυττάρου, στρατολογείται η κλαθρίνη, η οποία οργανώνεται σε ένα πολυμερισμένο πλέγμα δημιουργώντας την περιοχή CCP και στη συνέχεια, στρατολογείται η δυναμίνη που σχηματίζει έναν ελικοειδή δακτύλιο γύρω από τον αυχένα του υπό σχηματισμό κυστιδίου και το αποκόπτει από τη πλασματική μεμβράνη. Τέλος, απομακρύνεται η κλαθρίνη από το κυστίδιο.

Η τρανσφερρίνη (Tf) είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που μεταφέρει σίδηρο στον ορό του αίματος. Η πρόσληψη του σιδήρου μέσω της Tf πραγματοποιείται με CME. Η Tf που φέρει σίδηρο συνδέεται με τον υποδοχέα (TfR) και ξεκινά η CME. Το σύμπλοκο Tf-TfR εισέρχεται, στη συνέχεια, στα στατικά ή τα δυναμικά ενδοσώματα και ακολουθεί την οδό της ανακύκλωσης ή της αποδόμησης.

Το Dynasore αποτελεί έναν από τους ευρέως πιο γνωστούς αναστολείς της δυναμίνης, η δράση του οποίου έχει επιβεβαιωθεί από τους Macia et al., αν και έχουν αναπτυχθεί κι άλλοι αναστολείς, Όλοι όμως, απαιτούν προσοχή, καθώς μπορούν να εμφανίσουν επιδράσεις εκτός στόχου.

Για το λόγο αυτό, εγκαθιδρύσαμε δοκιμασία μελέτης της ενδοκυττάρωσης που ελέγχεται από την κλαθρίνη, με σκοπό την ανεύρεση νέων χημικών αναστολέων του μονοπατιού ενδοκυττάρωσης, με εξιδείκευση έναντι της δυναμίνης.

Πραγματοποιήσαμε το πρωτόκολλο ‘Pulse-chase’ και ελέγξαμε την αναστολή του μονοπατιού ενδοκυττάρωσης μέσω κλαθρίνης, με τη μέθοδο ανοσοφθορισμού και την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου κατά Western (SDS-PAGE).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρέχουν αρχικές ενδείξεις ότι ορισμένοι από τους υπό μελέτη χημικούς αναστολείς μπορούν να επηρεάσουν την ενδοκυττάρωση της Tf. Ωστόσο, τα διαθέσιμα δεδομένα δεν επαρκούν για την οριστική και σαφή αξιολόγηση όλων των αναστολέων. Η σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των πειραμάτων και η παρουσία προβλημάτων σε ορισμένες συνθήκες, όπως το μη-ειδικό σήμα και ο περιορισμένος αριθμός ανεξάρτητων επαναλήψεων, καθιστούν αναγκαία την περαιτέρω διερεύνηση.

Λέξεις κλειδιά: Καρκίνος, ενδοκυττάρωση, σηματοδότηση, αναστολείς, δυναμίνη, τρανσφερρίνη

ABSTRACT

Cancer continues to be a disease associated with high mortality rates, although these rates have declined in recent years. One of its main characteristics is the uncontrolled proliferation of cells. Chemotherapy and radiotherapy remain major anticancer treatments, although targeted therapy is continuously evolving and appears to be a promising approach in cancer treatment.

Endocytosis, namely the uptake of molecules and materials from the plasma membrane into the cytoplasm, plays an important role in the development and progression of cancerous tumors, as its inhibition can increase the sensitivity of cancer cells to anticancer therapies. There are several different types of endocytosis, with clathrin-mediated endocytosis (CME) being the most extensively studied. During CME, the cargo to be internalized is selected, clathrin is recruited and organized into a polymerized lattice, forming a clathrin-coated pit (CCP). Subsequently, dynamin is recruited and forms a helical ring around the neck of the nascent vesicle, leading to its scission from the plasma membrane. Finally, clathrin is removed from the vesicle.

Transferrin (Tf) is a glycoprotein that transports iron in the blood serum. Iron uptake via Tf occurs through CME. Iron-loaded Tf binds to the transferrin receptor (TfR), initiating CME. The Tf–TfR complex is then internalized into either static or dynamic endosomes and follows the recycling or degradation pathway.

Dynasore is one of the most widely known dynamin inhibitors, whose activity was confirmed by Macia et al., although several other inhibitors have also been developed. All of them require careful evaluation, as they may exhibit off-target effects.

For this reason, we established an assay to study CME, with the aim of identifying novel chemical inhibitors of the endocytic pathway, with a specific focus on dynamin.

We performed a ‘Pulse-chase’ assay and investigated the inhibition of the clatrhrin-mediated endocytosis pathway, using immunofluorescence and protein electrophoresis on a polyacrylamide gel by Western (SDS-PAGE).

The results of the present study provide preliminary evidence that some of the chemical inhibitors under investigation may affect Tf internalization. However, the available data are insufficient to allow a definitive and clear evaluation of all the

inhibitors. The substantial variability between experiments, together with issues under certain conditions, such as non-specific signal and the limited number of independent replicates, highlight the need for further investigation.

Keywords: Cancer, endocytosis, signaling, inhibitors, dynamin, transferrin

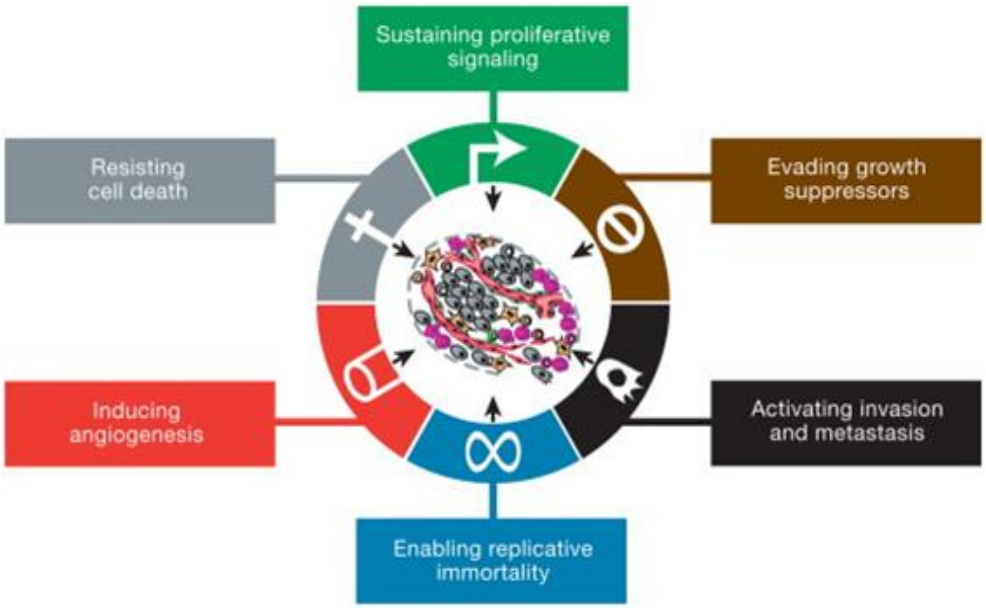
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Καρκίνος

1.1.1 Βιολογικά Χαρακτηριστικά

Ο καρκίνος εξακολουθεί να αποτελεί μια από τις κυριότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως, με πολλούς τύπους όγκων να εμφανίζουν ανθεκτικότητα στις συμβατικές χημειοθεραπείες και ακτινοβολίες. Ωστόσο, την τελευταία δεκαετία έχει μειωθεί το ποσοστό θνησιμότητας, τόσο σε γυναίκες όσο και σε άνδρες [1,2].

Ως καρκινικός όγκος ορίζεται μια αποικία κυττάρων που πολλαπλασιάζεται με ανεξέλεγκτο τρόπο και έχει μεταστατικές ιδιότητες [1,3]. Η αιτία ανάπτυξης του καρκίνου είναι μια γενετική βλάβη σε μια ή περισσότερες πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο, ενώ υπάρχουν περιπτώσεις που οι περιβαλλοντικοί παράγοντες προκαλούν την ανάπτυξη του καρκίνου [1,4,5]. Για παράδειγμα, το οξειδωτικό στρες ή η υπεριώδης ακτινοβολία (UV) καταστρέφουν το DNA του κυττάρου, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των μηχανισμών επισκευής με στόχο την αποκατάσταση της βλάβης. Όταν οι μηχανισμοί αυτοί δεν διορθώνουν επαρκώς τη βλάβη, ενεργοποιούνται μηχανισμοί κυτταρικού θανάτου, οι οποίοι, αν διακοπούν, τα μεταλλαγμένα κύτταρα πολλαπλασιάζονται και σχηματίζουν έναν καρκινικό όγκο [1,6]. Ωστόσο, για την ανάπτυξη του καρκίνου απαιτείται συσσώρευση μεταλλάξεων και συνυπάρχουν τόσο γενετικοί όσο και περιβαλλοντικοί παράγοντες.



Εικόνα 1. ***Χαρακτηριστικές ιδιότητες του καρκίνου.*** *1. Διατήρηση της πολλαπλασιαστικής σηματοδότησης: Τα καρκινικά κύτταρα διατηρούν ενεργά τα σήματα που προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. 2. Αποφυγή των μηχανισμών καταστολής της ανάπτυξης: Αγνοούν σήματα που περιορίζουν την κυτταρική διαίρεση. 3. Ενεργοποίηση της διήθησης και της μετάστασης: Αποκτούν την ικανότητα να εισβάλουν σε γειτονικούς ιστούς. 4. Εξασφάλιση αναπαραγωγικής αθανασίας: Έχουν την ικανότητα να διαιρούνται για μεγάλο αριθμό κυτταρικών γενεών. 5. Πρόκληση αγγειογένεσης: Σχηματίζουν νέα αιμοφόρα αγγεία, ώστε ο όγκος να εξασφαλίζει οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά. 6. Αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο: Αποφεύγουν μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου, όπως η απόπτωση, επιτρέποντας την επιβίωση καρκινικών κυττάρων [7].*

Υπάρχουν δύο κατηγορίες γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη και την εξέλιξη του καρκίνου, τα ογκογονίδια, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που διεγείρουν την ογκογένεση, και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, που αναστέλλουν την ανάπτυξη όγκων [1].

Σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου παίζουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια, δηλαδή διαδικασίες μέσω των οποίων ένα εξωκυτταρικό σήμα μετατρέπεται σε κυτταρική απόκριση. Κάποια από τα σημαντικότερα σηματοδοτικά μονοπάτια είναι τα Ras/ERK και AKT/PI3K–mTOR, τα οποία, υπό φυσιολογικές συνθήκες, ενεργοποιούνται παρουσία αυξητικών παραγόντων, κάτι που δεν ισχύει στα καρκινικά κύτταρα, λόγω γενετικών μεταλλάξεων που υφίστανται [1].

Συγκεκριμένα, στους φυσιολογικούς ιστούς η ανάπτυξη, η είσοδος και η πρόοδος στον κυτταρικό κύκλο ρυθμίζονται από την παραγωγή και την απελευθέρωση σημάτων, τα οποία εξασφαλίζουν τη διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας των κυττάρων. Αντίθετα, τα καρκινικά κύτταρα απορρυθμίζουν αυτά τα σήματα που μεταδίδονται μέσω αυξητικών παραγόντων που προσδένονται σε υποδοχείς, οι οποίοι ενεργοποιούν σήματα μέσω σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και την κυτταρική ανάπτυξη [1,8,9].

1.1.2 Στοχευμένες Θεραπείες

‘Στοχευμένη θεραπεία’ ονομάζεται μια νέα γενιά αντικαρκινικών φαρμάκων που έχουν σχεδιαστεί για να παρεμβαίνουν σε έναν συγκεκριμένο μοριακό στόχο, ο οποίος διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του όγκου. Πολλοί όγκοι προέρχονται από έναν μικρό αριθμό κυττάρων που έχουν χαρακτηριστικά βλαστοκυττάρων, δηλαδή διατηρούν ή αποκτούν την ικανότητα αυτοανανέωσης. Συνεπώς, μια ‘στοχευμένη θεραπεία’ θα πρέπει να εξαλείφει τα καρκινικά βλαστοκύτταρα, με σκοπό την αποτροπή της υποτροπής της νόσου σε μεταγενέστερο στάδιο [10].

Ωστόσο, η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία εξακολουθούν να αποτελούν την βασική αντικαρκινική θεραπεία για όγκους που δεν μπορούν να θεραπευτούν χειρουργικά. Οι συμβατικές αυτές αντικαρκινικές θεραπείες μπορούν να συνδυαστούν με ‘στοχευμένους’ θεραπευτικούς παράγοντες για την επίτευξη εκτενέστερης και πιο πετυχημένης εξάλειψης των καρκινικών κυττάρων [10].

1.2 Κυτταρική Ενδοκυττάρωση

1.2.1 Χαρακτηριστικά Ενδοκυττάρωσης

Η ενδοκυττάρωση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία μέσω της οποίας τα κύτταρα μεταφέρουν μόρια και υλικά από την πλασματική μεμβράνη στο κυτταρόπλασμα [11,12]. Η διαδικασία αυτή διατηρεί την κυτταρική ομοιόσταση και ρυθμίζει τα μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης. Η ρύθμισή της εξαρτάται από τη σύσταση της

κυτταρικής μεμβράνης, τη δυναμική του κυτταροσκελετού και τα μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης. Επηρεάζεται από παθολογικές καταστάσεις, όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, πνευμονικές παθήσεις και ο καρκίνος, όπου η απορρύθμιση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών και οδών ευνοεί την μετάσταση [11,13].

Η αναστολή της ενδοκυττάρωσης έχει αναδειχθεί ως ελκυστικός θεραπευτικός στόχος για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Καθώς πολλά καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν απορρύθμιση των οδών ενδοκυττάρωσης υπερεκφράζοντας υποδοχείς, όπως ο υποδοχέας της τρανσφερρίνης (TfR), συμβάλλουν στην υποστήριξη της ανάπτυξης του όγκου. Η αναστολή της ενδοκυττάρωσης μπορεί να εμποδίσει την ενδοκυττάρια διακίνηση θρεπτικών συστατικών, καθιστώντας τα καρκινικά κύτταρα πιο ευαίσθητα στις αντικαρκινικές θεραπείες.

Η ενδοκυττάρωση αποτελεί σημαντικό μηχανισμό ρύθμισης της σηματοδότησης που μεσολαβείται από υποδοχείς αυξητικών παραγόντων. Η σηματοδότηση και η ενδοκυττάρια διακίνηση των υποδοχέων συνδέονται στενά και αλληλορυθμίζονται. Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση των υποδοχέων από την πρόσδεση των αντίστοιχων προσδετών μπορεί να διεγείρει την ενδοκυττάρωσή τους, η οποία επηρεάζει την ένταση και τη διάρκεια της σηματοδοτικής απόκρισης [14].

Η ενδοκυττάρωση μπορεί να περιορίσει την κυτταρική σηματοδότηση μέσω της μείωσης του αριθμού των υποδοχέων που είναι διαθέσιμοι στην πλασματική μεμβράνη. Αφού ενεργοποιηθούν οι υποδοχείς, μπορούν να ενδοκυτταρωθούν μέσω κυστιδίων και να μεταφερθούν στα πρώιμα ενδοσώματα, ακολουθώντας στη συνέχεια, την οδό της ανακύκλωσης ή της αποδόμησης, η οποία οδηγεί σε μείωση των υποδοχέων και συνεπώς, στον τερματισμό της σηματοδότησης [14].

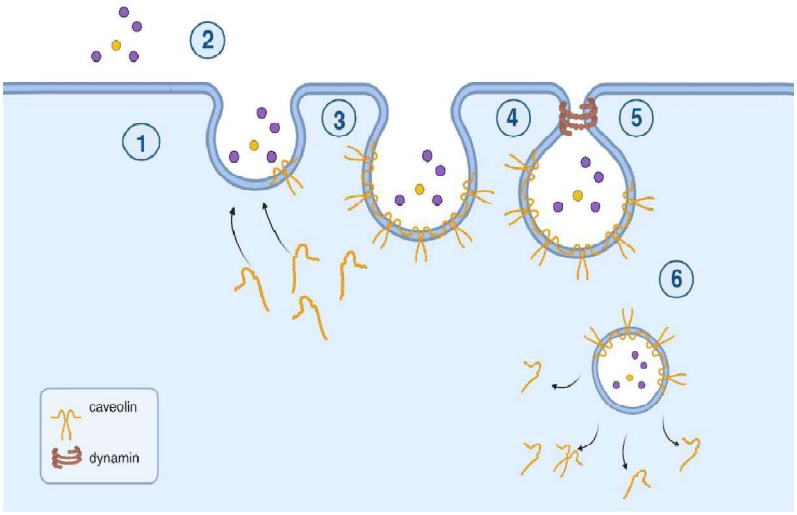
Ωστόσο, η ενδοκυττάρωση δεν αναστέλλει πάντα η σηματοδότηση, καθώς στα ενδοσώματα οι υποδοχείς μπορούν να διατηρούν τη δραστηριότητά τους και να αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια, ενώ παράλληλα η ανακύκλωση των υποδοχέων προς την πλασματική μεμβράνη, μπορεί να διατηρήσει την ικανότητα του κυττάρου να ανταποκρίνεται σε επόμενα ερεθίσματα [14].

1.2.2 Είδη Ενδοκυττάρωσης

Παρόλο που το μεγαλύτερο μέρος της έρευνας έχει επικεντρωθεί στην ενδοκυττάρωση μέσω κλαθρίνης (CME) και λανθασμένα υπάρχει η πεποίθηση ότι είναι ο μόνος σημαντικός μηχανισμός ενδοκυττάρωσης, υπάρχουν αρκετοί άλλοι τρόποι ενδοκυττάρωσης. Η αναλογία μεταξύ εξαρτώμενης από την κλαθρίνη και ανεξάρτητης από την κλαθρίνη ενδοκυττάρωσης μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου**,** τις συγκεκριμένες κυτταρικές λειτουργίες και ορισμένες σηματοδοτικές οδούς**.** Αυτό οδηγεί σε διαφορετική ρύθμιση των ενδοκυττάριων διεργασιών, ανάλογα με τα σήματα που λαμβάνει το κύτταρο.

1.2.2.1 Ενδοκυττάρωση Εξαρτώμενη από την Caveolae

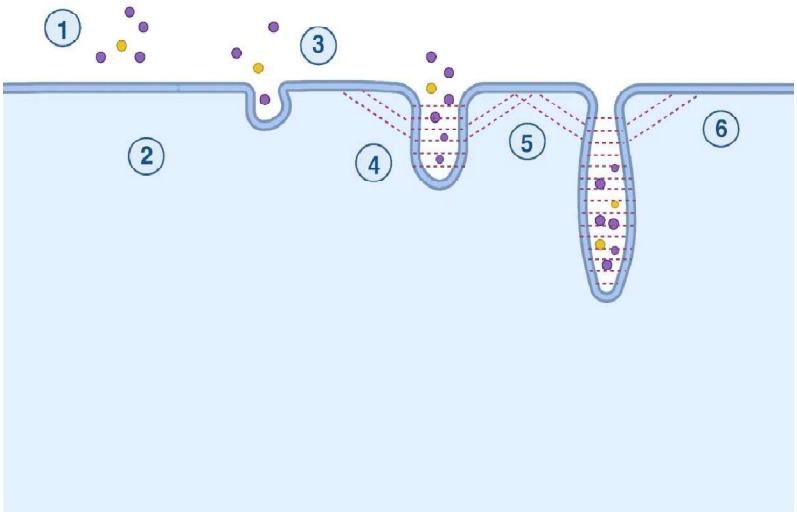
Οι καβεόλες (caveolae) είναι μικρές κοιλότητες της πλασματικής μεμβράνης που χαρακτηρίζονται από την παρουσία της καβεολίνη-1 (Cav-1: Caveolin-1) (περίπου 100-200 μόρια Cav-1 περιλαμβάνονται σε ένα περίβλημα caveola) και σχηματίζονται στο σύμπλεγμα Golgi. Η καμπύλωση της πλασματικής μεμβράνης και η σταθεροποίηση των κοιλοτήτων caveolae εξαρτώνται από τις πρωτεΐνες πακσίνη2 (pacsin2), EHBP1 (EH Domain-Binding Protein 1) και την ATPάση EHD2 (EH-Domain containing protein 2), ενώ η αποκόλληση των caveolae και η ενδοκυττάρια μεταφορά τους υποστηρίζονται από την απομάκρυνση της EHD2 και τη συμμετοχή της δυναμίνης και της ιντερσεκτίνης [11, 15, 16] (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. ***Ενδοκυττάρωση εξαρτώμενη από την Caveolae.*** *1. Παρουσία φορτίου έξω από το κύτταρο. 2. Σχηματισμός των caveolae παρουσίαση της Caveolin-1.. 3. Καμπύλωση της μεμβράνης προς το εσωτερικό. 4. Σχηματισμός της περιοχής του 'αυχένα'. 5. Αποκοπή του κυστιδίου. 6. Ενδοκυττάρια μεταφορά [11].*

1.2.2.2 Ενδοκυττάρωση CLIC/GEEC (Clathrin-Independent Carriers/GPI-anchored protein-Enriched Early Endosomal Compartments)

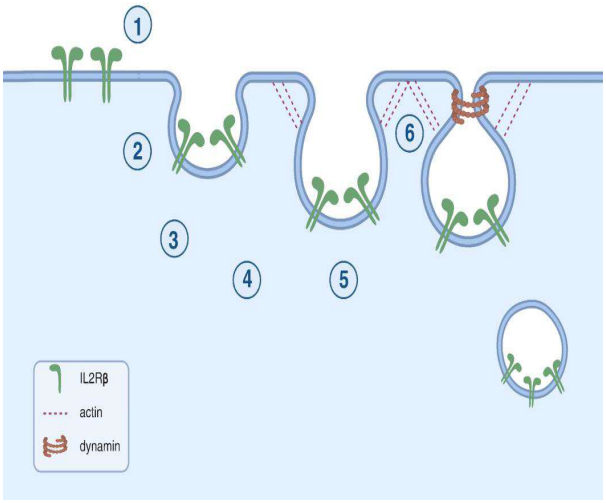
Η ενδοκυττάρωση CLIC/GEEC αποτελεί έναν μηχανισμό ανεξάρτητο της κλαθρίνης και της δυναμίνης. Συμμετέχει στην πρόληψη πρωτεϊνών που είναι αγκυρωμένες μέσω γλυκοζυλοφωσφατιδυλινοσιτόλης GPI-APs (Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins), οι οποίες μεταφέρονται σε ειδικό πρώιμο ενδοσωματικό διαμέρισμα σχηματίζοντας τα GEECs (Εικόνα 3). Η διαδικασία αυτή απαιτεί την πρωτεΐνη Cdc42, ενώ μέλη της οικογένειας Rho (Ras homologous) ρυθμίζουν την ενδοκυττάρωση [11, 17].



Εικόνα 3. ***Ενδοκυττάρωση CLIC/GEEC.*** *1. Παρουσία του φορτίου που θα ενδοκυτταρωθεί. 2. Ενεργοποίηση της οδού. 3. Έναρξη παραμόρφωσης της μεμβράνης. 4. Περαιτέρω καμπύλωση. 5. Δημιουργία σωληνοειδούς δομής. 6. Ενδοκυττάρια μεταφορά [11].*

1.2.2.3 Ενδοκυττάρωση Μέσω του Μονοπατιού IL2Rβ (Interleukin-2 Receptor beta chain)

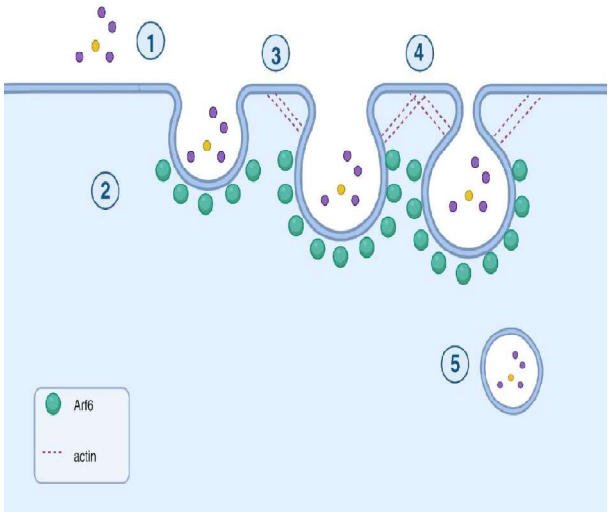
Η ενδοκυττάρωση μέσω του μονοπατιού IL2Rβ αποτελεί μηχανισμό ανεξάρτητο από την κλαθρίνη, αλλά εξαρτώμενο από τη δυναμίνη. Το φορτίο εισέρχεται μέσω μικρών μη επενδυμένων κοιλοτήτων της μεμβράνης και στην διαδικασία συμμετέχουν οι GTPάσες RhoA και Rac1 [18] (Εικόνα 4). Το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3P, που ρυθμίζει την διαδικασία, ενεργοποιείται από τον IL-2R και οδηγεί στην ενεργοποίηση των RhoA και Rac1. Ακολούθως, η Pac1 φωσφορυλιώνει την κορτακτίνη, προάγοντας τη σύνδεσή της με την N-WASP. Το σύμπλοκο κορτακτίνη–N-WASP–Arp2/3 στρατολογείται και ενεργοποιείται μέσω αυτού του σηματοδοτικού μονοπατιού, πραγματοποιώντας τον σχηματιαμό της F-ακτίνης [11].



Εικόνα 4. ***Ενδοκυττάρωση μέσω του μονοπατιού IL2Rβ.*** *1. Αναγνώριση του φορτίου. 2. Ενεργοποίηση της PI3K. 3. Ενεργοποίηση της Rac1. 4. Στρατολόγηση της ακτίνης. 5. Καμπύλωση της μεμβράνης και δημιουργία εσοχής. 6. Αναδιοργάνωση της ακτίνης και αποκοπή του κυστιδίου [11].*

1.2.2.4 Ενδοκυττάρωση Εξαρτώμενη από την Arf6

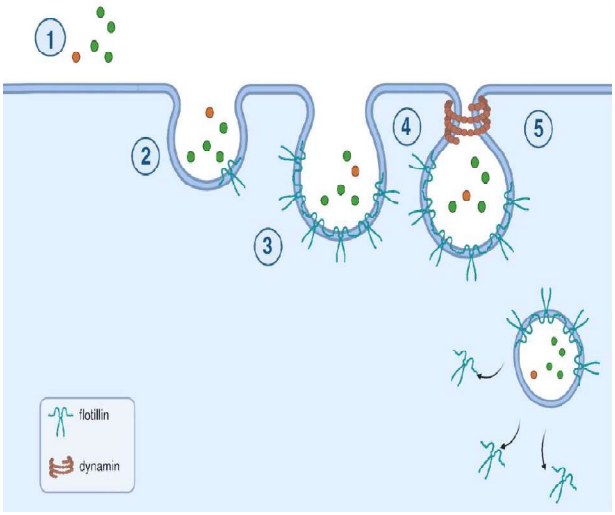
Η Arf6 είναι μια GTPάση που ρυθμίζει την ενδοκυττάρωση και την ενδοσωματική μεταφορά. Ο μηχανισμός αυτός συνδέεται με την αναδιαμόρφωση της ακτίνης και την εσωτερίκευση μορίων από την κυτταρική επιφάνεια. Τα ενδοσώματα οδηγούνται είτε σε ανακύκλωση είτε σε καταστροφή του φορτίου [11] (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. ***Ενδοκυττάρωση εξαρτώμενη από την Arf6.*** *1. Παρουσία φορτίου. 2. Ενεργοποίηση της Arf6. 3. Καμπύλωση μεμβράνης. 4. Κλείσιμο μεμβράνης που περιέχει το φορτίο. 5. Αποκοπή κυστιδίου [11].*

1.2.2.5 Ενδοκυττάρωση Εξαρτώμενη από την Φλοτιλλίνη

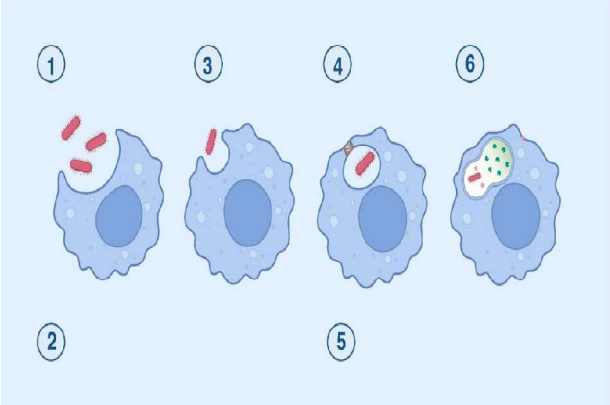
Η ενδοκυττάρωση εξαρτώμενη από την φλοτιλλίνη εξαρτάται από τη δυναμίνη, αλλά είναι ανεξάρτητη από την κλαθρίνη και την καβεολίνη. Οι πρωτεΐνες φλοτιλλίνες συμβάλλουν στη δημιουργία κυρτότητας και εγκολπώσεων της κυτταρικής μεμβράνης (Εικόνα 6), ενώ η Fyn και ο EGF (Epidermal Growth Factor) συμμετέχουν στη ρύθμιση αυτής της οδού [11].



Εικόνα 6. ***Ενδοκυττάρωση εξαρτώμενη από την Φλοτιλλίνη.*** *1. Παρουσία του φορτίου. 2. Στρατολόγηση της flotillin. 3. Καμπύλωση μεμβράνης. 4. Αποκοπή του κυστιδίου. 5. Ενδοκυττάρια μεταφορά [11].*

1.2.2.6 Φαγοκυττάρωση

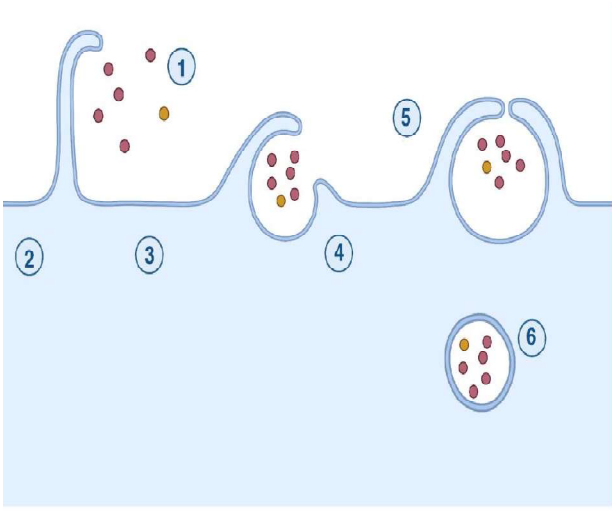
Η φαγοκυττάρωση αφορά την πρόσληψη μεγάλων σωματιδίων ή μικροοργανισμών. Η σύνδεση του σωματιδίου με υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας προκαλεί πολυμερισμό της ακτίνης και προεκβολές της μεμβράνης, οι οποίες περιβάλλουν το σωματίδιο. Μόλις το σωματίδιο αποσχιστεί από την πλασματική μεμβράνη, τα νημάτια ακτίνης αρχίζουν να αποπολυμερίζονται, δημιουργώντας το φαγόσωμα. Έπειτα, το ώριμο φαγόσωμα συντήκεται με τα λυσοσώματα και σχηματίζει ένα φαγολυσόσωμα [11, 19, 20] (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. ***Φαγοκυττάρωση.*** *1. Αναγνώριση του σωματιδίου ή μικροοργανισμού. 2. Πρόσληψη σωματιδίου ή μικροοργανισμού. 3. Επέκταση της κυτταρικής μεμβράνης γύρω από το σωματίδιο ή τον μικροοργανισμό. 4. Εγκλεισμός του σωματιδίου ή του μικροοργανισμού. 5. Σχηματισμός φαγοσώματος. 6. Ωρίμανση του φαγοσώματος, δημιουργία φαγολυσοσώματος και διάσπαση σωματιδίου ή μικροοργανισμού [11].*

1.2.2.7 Μακροπινοκυττάρωση

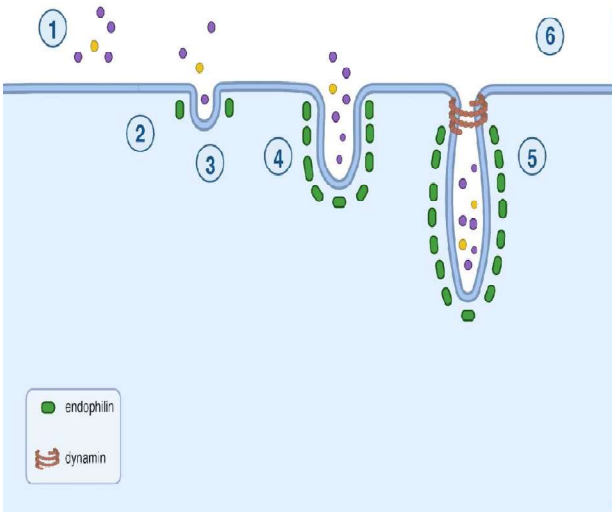
Η μακροπινοκυττάρωση είναι μια διαδικασία πρόσληψης εξωκυττάριου υγρού και διαλυμένων μορίων, που εξαρτάται από την ακτίνη και την Rac1. Ο πολυμερισμός της ακτίνης προκαλεί προώθηση της μεμβράνης προς τα εμπρός και δημιουργία προεκβολών αυτής, οι οποίες αναδιπλώνονται και σχηματίζουν κυστίδια που παγιδεύουν το εξωκυττάριο υγρό [11] (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. ***Μακροπινοκυττάρωση.*** *1. Παρουσία διαλυμένων μορίων. 2. Ενεργοποίηση της διαδικασίας. 3. Σχηματισμός κυματισμών της μεμβράνης. 4. Αναδίπλωση προεκβολών και εγκλεισμός του εξωκυττάριου υγρού. 5. Σχηματισμός κυστιδίου. 6. Ενδοκυττάρια μεταφορά [11].*

1.2.2.8 Ταχεία Ενδοκυττάρωση με τη Μεσολάβηση της Ενδοφυλίνης (FEME: Fast Endophilin-Mediated Endocytosis)

Η FEME είναι ένας μηχανισμός ενδοκυττάρωσης ανεξάρτητος της κλαθρίνης. Ενεργοποιείται μετά από διέγερση συγκεκριμένων υποδοχέων και οδηγεί γρήγορα στο σχηματισμό σωληνοκυστιδίων. Η ενδοφιλίνη προκαλεί καμπύλωση της μεμβράνης και συμβάλλει στην αποκοπή των κυστιδίων, με τη βοήθεια της δυναμίνης και της ακτίνης [11] (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. ***Ταχεία ενδοκυττάρωση με τη μεσολάβηση της ενδοφυλίνης (FEME Fast Endophilin-Mediated Endocytosis).*** *1. Παρουσία φορτίου. 2. Ενεργοποίηση υποδοχέων. 3. Στρατολόγηση της ενδοφιλίνης. 4. Διαμόρφωση του κυστιδίου. 5. Επιμήκυνση και αποκοπή του κυστιδίου. 6. Ενδοκυττάρια μεταφορά.*

1.2.3 Ενδοκυττάρωση Εξαρτώμενη από την Κλαθρίνη (CME: Clathrin-Mediated Endocytosis)

Η ενδοκυττάρωση μέσω κλαθρίνης (CME) αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μηχανισμούς με τους οποίους τα ευκαρυωτικά κύτταρα εσωτερικεύουν συστατικά της πλασματικής μεμβράνης και του εξωκυττάριου περιβάλλοντος [21, 22]. Μέσω αυτής της διαδικασίας, μόρια συνδεδεμένα με διάφορους υποδοχείς συγκεντρώνονται σε περιοχές της πλασματικής μεμβράνης, οι οποίες παραμορφώνονται και αποκόπτονται με τη μορφή κυστιδίων (CCV: Clathrin-Coated Vesicle), μεταφέροντας το φορτίο στο εσωτερικό του κυττάρου [21] (Εικόνα 10).

Ο βασικός μηχανισμός της CME μπορεί να περιγραφεί ως μια ακολουθία γεγονότων που περιλαμβάνει την επιλογή του φορτίου, τη δημιουργία της κλαθρίνης, την παραμόρφωση και εμβάθυνση της μεμβράνης, τον σχηματισμό του ‘αυχένα’, την αποκοπή του κυστιδίου και την απομάκρυνση του περιβλήματος κλαθρίνης [11, 21] (Εικόνα 10).

Ως πρώτο στάδιο της CME θεωρείται η επιλογή του φορτίου που θα μεταφερθεί στο εσωτερικό του κυττάρου. Πολλοί υποδοχείς διαθέτουν αλληλουχίες που

αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες-adaptors, όπως είναι η οικογένεια AP [11]. Συγκεκριμένα, τα μέλη AP-1 και AP-2 (Adaptor Protein complex 1,2) συνεργάζονται με την κλαθρίνη για τον σχηματισμό CCP (Clathrin-Coated Pit). Η AP-2 αναγνωρίζει συγκεκριμένα μοτίβα στις κυτταροπλασματικές περιοχές των υποδοχέων και τις στρατολογεί στην πλασματική μεμβράνη, ενώ ταυτόχρονα, στρατολογεί και την κλαθρίνη, οδηγώντας στον σχηματισμό CCP [21] (Εικόνα 10).

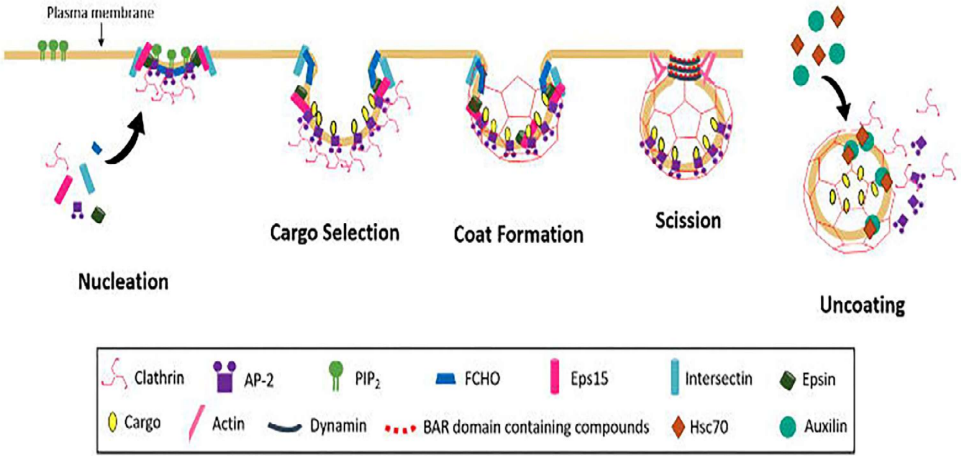
Αναλυτικότερα, τα μόρια της κλαθρίνης οργανώνονται σε ένα πολυμερισμένο πλέγμα δημιουργώντας την περιοχή CCP. Η πλασματική μεμβράνη αρχίζει να καμπυλώνεται προς το εσωτερικό του κυττάρου με τη βοήθεια διαφόρων πρωτεϊνών, όπως η εψίνη και οι πρωτεΐνες FCHO, ενώ οι πρωτεΐνες που διαθέτουν BAR συμβάλλουν στη διαμόρφωση και σταθεροποίηση της περιοχής του αυχένα [21, 22] (Εικόνα 10).

Στο επόμενο στάδιο, το στάδιο της αποκοπής, όπου το CCP έχει αποκτήσει σημαντική καμπυλότητα και έχει σχηματιστεί ένας στενός αυχένας που συνδέει το υπό σχηματισμό κυστίδιο με την πλασματική μεμβράνη, σημαντικό ρόλο παίζει η GTPάση δυναμίνη [21, 22, 23]. Η δυναμίνη σχηματίζει έναν ελικοειδή δακτύλιο γύρω από τον 'αυχένα' του υπό σχηματισμό κυστιδίου, ενώ παράλληλα, η υδρόλυση του GTP (Guanosine Triphosphate) αποκόπτει το CCV από τη μεμβράνη και το απελευθερώνει στο κυτταρόπλασμα [21] (Εικόνα 10).

Στο τελικό στάδιο, στην απομάκρυνση δηλαδή του περιβλήματος κλαθρίνης, το κυστίδιο 'απογυμνώνεται', ώστε να συνεχίσει την ενδοκυτταρική του πορεία. Στο στάδιο αυτό, η αυξιλίνη στρατολογεί την Hsc70 για να διευκολυνθεί η αποσυναρμολόγηση του περιβλήματος κλαθρίνης [21, 22] (Εικόνα 10).

Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι η CME δεν ακολουθεί πάντοτε ένα απολύτως προκαθορισμένο και ίδιο μονοπάτι. Μελέτες που χρησιμοποιούν απεικονιστικές τεχνικές υψηλής ανάλυσης έχουν δείξει ότι το πλέγμα κλαθρίνης υφίσταται δυναμικές αναδιαμορφώσεις κατά τη διάρκεια δημιουργίας του κυστιδίου [24, 25]. Συνεπώς, η μετάβαση από CCP σε ένα πλήρως καμπυλωμένο κυστίδιο δεν θεωρείται απαραίτητα ως μια γραμμική ακολουθία σταθερών ενδιάμεσων σταδίων [22, 24, 25]. Ακόμη, έχει αποδειχθεί ότι η CME προσαρμόζεται στις μηχανικές συνθήκες που επικρατούν στο κύτταρο, καθώς η μηχανική τάση της πλασματικής μεμβράνης αποτελεί σημαντικό ρυθμιστικό παράγοντα της CME, ενώ και οι μηχανισμοί που οδηγούν στην καμπύλωση της μεμβράνης παρουσιάζουν διαφορές [26, 27].

Ιδιαίτερη σημασία στη CME έχει η ακτίνη, η οποία μπορεί να συμβάλλει στη δημιουργία των δυνάμεων που απαιτούνται για την παραμόρφωση της μεμβράνης (Εικόνα 10), δεν έχει τον ίδιο ρόλο σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και όλα τα συστήματα. Η πιο σύγχρονη βιβλιογραφία δείχνει ότι η σχέση ακτίνης και CME είναι πιο σύνθετη απ' ότι θεωρούνταν παλαιότερα, καθώς η σημασία της ακτίνης εξαρτάται από το κυτταρικό περιβάλλον και τις μηχανικές απαιτήσεις της μεμβράνης. Έχει αποδειχθεί από νεότερα δεδομένα ότι η ακτίνη μπορεί να λειτουργεί ως ενεργό μηχανικό στοιχείο της CME και ότι ένα διακλαδισμένο δίκτυο ακτίνης μπορεί να παράγει δυνάμεις ικανές να εσωτερικεύσουν το CCP [26, 28].



Εικόνα 10. ***Ενδοκυττάρωση εξαρτώμενη από την κλαθρίνη (CME).*** *Αρχικά, γίνεται επιλογή του φορτίου που θα μεταφερθεί στο εσωτερικό του κυττάρου. Έπειτα, στρατολογείται η κλαθρίνη, η οποία οργανώνεται σε ένα πολυμερισμένο πλέγμα δημιουργώντας την περιοχή CCP. Στη συνέχεια, στρατολογείται η δυναμίνη που σχηματίζει έναν ελικοειδή δακτύλιο γύρω από τον αυχένα του υπό σχηματισμό κυστιδίου και το αποκόπτει από τη πλασματική μεμβράνη. Τέλος, απομακρύνεται η κλαθρίνη από το κυστίδιο.* (Σημειώνεται ότι όλες οι βασικές ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη διαδικασία διαθέτουν περιοχές πρόσδεσης για το $PI(4,5)P_2$, το οποίο συμβάλλει στην προσέλκυση των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών στη μεμβράνη) [29].

1.3 Δυναμίνη: Βασικά Χαρακτηριστικά, Δομή και Λειτουργία

1.3.1 Βασικά Χαρακτηριστικά

Η δυναμίνη είναι μια μεγάλη GTPάση με μοριακό βάρος 100kDa και απαντάται σε πολλά είδη, από τα βακτήρια μέχρι τον άνθρωπο [29, 30]. Διαφέρουν από τις κλασσικές GTPάσες, καθώς το μέγεθος της περιοχής GTPάσης είναι μεγαλύτερο και έχουν την ικανότητα να αυτοσυναρμολογούνται και αποσυναρμολογούνται [29].

Στα θηλαστικά υπάρχουν τρία γονίδια δυναμίνης, Δυναμίνη 1, Δυναμίνη 2 και Δυναμίνη 3, γνωστά ως κλασσικές δυναμίνες [29, 31]. Η Δυναμίνη 1 εκφράζεται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα και συγκεντρώνεται στις προσυναπτικές νευρικές απολήξεις, ενώ η Δυναμίνη 2 εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς και παίζει σημαντικό ρόλο στη μίτωση και η Δυναμίνη 3 εντοπίζεται κυρίως στον εγκέφαλο και στους όρχεις [29].

1.3.2 Δομή

Οι κλασσικές δυναμίνες αποτελούνται από πέντε περιοχές, την αμινοτελική περιοχή υδρόλυσης (GTPase domain), τη ‘μεσαία’ περιοχή (MD: Middle domain), την περιοχή ομολογίας με πλεκστρίνη (PH domain: Pleckstrin Homology domain), την περιοχή-τελεστή της GTPάσης (GED: GTPase Effector Domain) και την καρβοξυτελική περιοχή πλούσια σε προλίνη (PR domain: Proline-Rich Domain) [29, 32, 33] (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. ***Δομή των κλασσικών δυναμινών. G-domain:*** *Δεσμεύει και υδρολύει το GTP.* ***BSE:*** *Συνδέει την G-domain με το stalk (στέλεχος που αποτελείται από την MD και GED).* ***MD:*** *Συμμετέχει στη συναρμολόγηση των μορίων δυναμίνης.* ***PH:*** *Βοηθά τη δυναμίνη να προσδένεται στη μεμβράνη.* ***GED:*** *Ενισχύει τη δραστικότητα της GTPάσης.* ***PRD:*** *Συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες και βοηθά στην τοποθέτηση της δυναμίνης στις θέσεις ενδοκυττάρωσης [29].*

1.3.3 Λειτουργία

Η βασική λειτουργία της δυναμίνης είναι η αποκοπή του κυστιδίου από τη μεμβράνη στην CME. Ωστόσο, συμμετέχει επίσης, στην ανακύκλωση των συναπτικών κυστιδίων (SVR: Stimulated Vesicle Recycling), στην εσωτερίκευση των καβεολέων και στη μεταφορά κυστιδίων από και προς τη συσκευή Golgi [29].

Πιο συγκεκριμένα, η Δυναμίνη 1 συμμετέχει σε οδούς ανακύκλωσης SVR ανεξάρτητες από την κλαθρίνη, όπως η FEME, στην αποκοπή των κυστιδίων και στη διαμόρφωση της καμπυλότητας της μεμβράνης [29, 34, 35]. Η Δυναμίνη 2 παίζει σημαντικό ρόλο στην ανακύκλωση των SVR, συμμετέχει στο σχηματισμό των καβεολέων, στη φαγοκυττάρωση και σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες, όπως η μίτωση, και τέλος, η Δυναμίνη 3 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη νευροδιαβίβαση [29].

1.4 Τρανσφερρίνη (Tf: Transferrin)

1.4.1 Γενικά Χαρακτηριστικά

Η Tf είναι μια μονομερής γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 76kDa, η οποία παράγεται κυρίως στο ήπαρ και έχει χρόνο ημίσειας ζωής περίπου οκτώ ημέρες στον ορό. Αποτελεί σημαντικό χημικό παράγοντα, με κύρια λειτουργία τη μεταφορά του σιδήρου στον ορό του αίματος [36, 37]. Συγκεκριμένα, συμμετέχει στη ρύθμιση και την κατανομή του κουκλοφορούντος σιδήρου και η ικανότητά της να εσωτερικεύεται μετά τη σύνδεσή της με έναν υποδοχέα τρανσφερρίνης βοηθά στη διατήρηση της ομοιόστασης τόσο σε συστηματικό όσο και σε κυτταρικό επίπεδο [38]. Η συγκέντρωσή της στον ορό είναι περίπου 200–300mg/dL και μειώνεται σε περιπτώσεις ηπατικής δυσλειτουργίας ή φλεγμονής [36].

Αποτελείται από δύο λοβούς, στο N- και στο C- τελικό άκρο αντίστοιχα, παρουσιάζοντας υψηλή ομολογία μεταξύ τους [36, 39]. Κάθε λοβός μπορεί να δεσμεύσει ένα μεταλλικό ιόν (σίδηρο, αλουμίνιο, γάλλιο κλπ.) με διαφορετική συγγένεια. Ως εκ τούτου, ένα μόριο Tf μπορεί να μεταφέρει δύο ιόντα τρισθενούς σιδήρου (Fe^{3+}), η αλληλεπίδραση με τον οποίο εξαρτάται από το pH [36]. Σε pH=7.4

ο Fe^{3+} συνδέεται αποτελεσματικά με την Tf, ενώ σε όξινο περιβάλλον αποδεσμεύεται από αυτή [36, 40].

1.4.2 Ενδοκυττάρωση Τρανσφερρίνης

Ο κύριος μηχανισμός που εμπλέκεται στην κυτταρική πρόσληψη του σιδήρου μέσω της Tf είναι η CME. Το σύμπλοκο Tf-TfR (TfR: Transferrin Receptor) ακολουθεί μια από τις δύο οδούς, είτε ανακυκλώνεται και επιστρέφει στην κυτταρική επιφάνεια είτε αποικοδομείται στα λυσοσώματα [38, 41] (Εικόνα 12).

Μετά τη δέσμευση της Tf που φέρει σίδηρο με τον TfR, ξεκινά η CME (Εικόνα 12). Αρχικά, πραγματοποιείται η δημιουργία CCP και κατά την ολοκλήρωση της ενδοκυττάρωσης η δυναμίνη διαχωρίζει τα κυστίδια από την κυτταρική μεμβράνη και τα μεταφέρει στο κυτταρόπλασμα, όπου απομακρύνεται το περίβλημα της κλαθρίνης, επιτρέποντας την επαναχρησιμοποίηση της από το κύτταρο [38] (Εικόνα 10). (Η διαδικασία αναλυτικά παρουσιάζεται παραπάνω στην ενότητα 1.2.3).

Το σύμπλοκο Tf-TfR εισέρχεται σε δύο πληθυσμούς πρώιμων ενδοσωμάτων, η μόνη διαφορά των οποίων είναι η κινητική της ωρίμανσής τους. Οι πληθυσμοί αυτοί χαρακτηρίζονται ως δυναμικά και στατικά ενδοσώματα (Εικόνα 12). Τα δυναμικά ενδοσώματα ωριμάζουν σε όψιμα ενδοσώματα μέσα σε περίπου 30sec από τον σχηματισμό τους, ενώ τα στατικά ενδοσώματα χρειάζονται πάνω από 100sec για να ωριμάσουν σε όψιμα ενδοσώματα [38, 42].

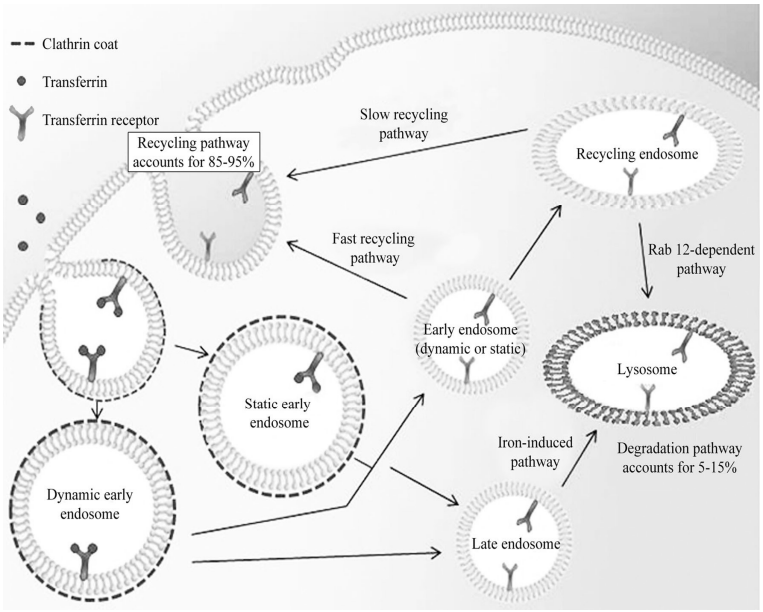
Η διαδικασία κατά την οποία το σύμπλοκο Tf-TfR κατευθύνεται σε έναν από τους δύο αυτούς πληθυσμούς συμβαίνει στην κυτταρική επιφάνεια και πραγματοποιείται χωρίς προτίμηση για τα δυναμικά ή τα στατικά ενδοσώματα. Ωστόσο, μεγαλύτερη συγκέντρωση της Tf παρατηρείται στα στατικά ενδοσώματα, εξαιτίας του μεγαλύτερου αριθμού των ενδοσωμάτων αυτών [38].

Στο εσωτερικό του πρώιμου ενδοσώματος το σύμπλοκο Tf-TfR ταξινομείται σε δύο οδούς, αυτόν της ανακύκλωσης ή της αποικοδόμησης. Το μεγαλύτερο μέρος του συμπλόκου ακολουθεί την οδό της ανακύκλωσης, η οποία περιλαμβάνει περεταίρω δύο οδούς, τη ταχεία και τη βραδεία. Κατά τη ταχεία οδό, ο TfR μεταφέρεται απευθείας στην πλασματική μεμβράνη, ενώ κατά τη βραδεία οδό, μεταφέρεται πρώτα στο ενδόσωμα ανακύκλωσης και στη συνέχεια επιστρέφει στην κυτταρική επιφάνεια.

Η ανακύκλωση μέσω της ταχείας οδού διαμεσολαβείται από τις GTPάσες Rab8 και Rab35, ενώ η ανακύκλωση μέσω της βραδείας οδού από τη Rab4 [38] (Εικόνα 12).

Μετά την επιστροφή του TfR στην κυτταρική επιφάνεια, η συγγένειά του για την Tf μειώνεται κατά προσέγγιση 50 φορές. Μετά την αποδέσμευση του TfR από την Tf, ο TfR είναι διαθέσιμος για να επαναλάβει νέο κύκλο ενδοκυττάρωσης [38].

Κατά την οδό της αποικοδόμησης, ο TfR απομακρύνεται από το κύτταρο. Υπάρχουν δύο οδοί αποικοδόμησης ανάλογα την κατάσταση του κυττάρου. Η πρώτη οδός επάγεται από αύξηση της κυτταρικής πρόσληψης σιδήρου, κυρίως υπό παθολογικές συνθήκες. Ο TfR μεταφέρεται στο λυσόσωμα και αποικοδομείται, ώστε να μειωθεί η ποσότητα του σιδήρου στο εσωτερικό του κυττάρου. Η δεύτερη οδός πραγματοποιείται υπό φυσιολογικές συνθήκες και ρυθμίζεται από τη Rab12 [38] (Εικόνα 12).



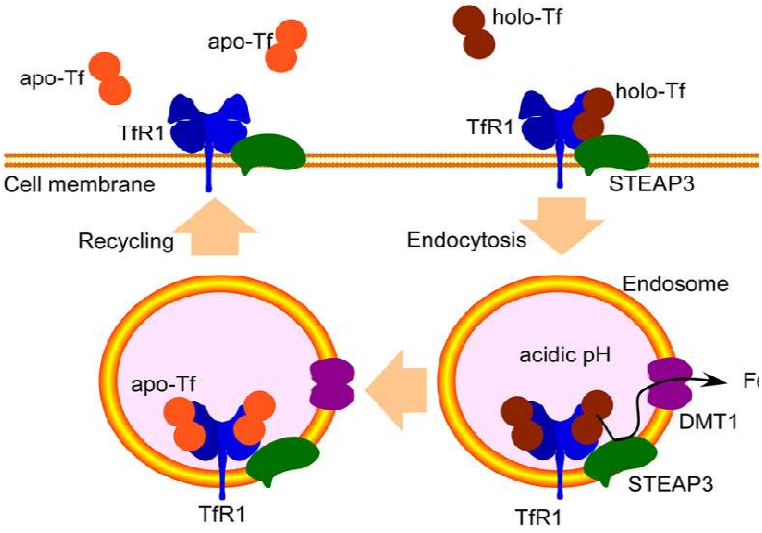
Εικόνα 12. ***Ενδοκυττάρωση Tf.*** *Αρχικά, δεσμεύεται η Tf με τον TfR και λαμβάνει χώρα η CME. Έπειτα, ένα ποσοστό της Tf εισέρχεται στα δυναμικά πρώιμα ενδοσώματα και ένα ποσοστό στα στατικά πρώιμα ενδοσώματα, όπου ταξινομούνται στην οδό της ανακύκλωσης ή της αποδόμησης. Κατά την ταχεία οδό ανακύκλωσης ο TfR μεταφέρεται απευθείας στη πλασματική μεμβράνη, ενώ κατά τη βραδεία οδό μεταφέρεται πρώτα στο ενδόσωμα ανακύκλωσης και έπειτα στη πλασματική μεμβράνη. Κατά την αποδόμηση ο TfR απομακρύνεται από το κύτταρο [38].*

1.4.3 Υποδοχείς Τρανσφερρίνης (TfR: Transferrin Receptor)

1.4.3.1. TfR1

Ο TfR1, μια πρωτεΐνη της κυτταρικής μεμβράνης μοριακού βαρους 97kDa, λειτουργεί ως υποδοχέας για την πρόσληψη σιδήρου από τα κύτταρα. Η έκφρασή του ρυθμίζεται από την κατάσταση του κυτταρικού σιδήρου. Υψηλή έκφραση του TfR1 παρατηρείται σε καταστάσεις κυτταρικής έλλειψης σιδήρου, ενώ σε καταστάσεις περίσσειας σιδήρου εμφανίζεται μείωση της έκφρασής του. Συγκεκριμένοι τύποι κυττάρων, όπως τα καρκινικά κύτταρα και οι οστεοκλάστες, εκφράζουν υψηλά επίπεδα TfR1, λόγω των αυξημένων αναγκών τους για σίδηρο [36].

Η αλληλεπίδραση του TfR1 και της Tf εξαρτάται από το pH. Σε pH=7.4, ο TfR1 συνδέεται με την holo-Tf και σε χαμηλότερο pH συνδέεται με την apo-Tf. Στην κυτταρική επιφάνεια, η holo-Tf συνδέεται με τον TfR1 και ακολουθεί η ενδοκυττάρωση του συμπλέγματος μέσω CME. Στο όξινο περιβάλλον του ενδοσώματος ο Fe^{3+} αποδεσμεύεται από την Tf, μετατρέπεται σε Fe^{2+} με τη βοήθεια μεταλλοαναγωγασών, όπως το STEAP3 και μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα μέσω του μεταφορέα δισθενών μετάλλων 1 (DMT1: Divalent Metal Transporter 1) [36, 43, 44, 45]. Το σύμπλεγμα Tf-TfR1 μεταφέρεται στην κυτταρική επιφάνεια μέσω του ενδοσώματος ανακύκλωσης και απελευθερώνεται η apo-Tf στην κυκλοφορία του αίματος [36, 46] (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. ***Πρόσληψη Tf μέσω TfR.*** *Στην κυτταρική επιφάνεια, η holo-Tf συνδέεται με τον TfR1 και το σύμπλεγμα ενδοκυτταρώνεται μέσω CME. Στο ενδόσωμα ο* Fe^{3+} *αποδεσμεύεται από την Tf και ανάγεται σε* Fe^{2+}*. Ο* Fe^{2+} *μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα και το σύμπλεγμα Tf-TfR μεταφέρεται στην κυτταρική επιφάνεια μέσω του ενδοσώματος ανακύκλωσης και η apo-Tf απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος [36].*

1.4.3.2 TfR2

Η ύπαρξη του TfR2 ανακαλύφθηκε πιο πρόσφατα. Μέχρι τότε θεωρούνταν ότι ο μόνος υποδοχέας της Tf είναι ο TfR1 [35, 46]. Ο TfR2 έχει δύο ισομορφές, TfR2-α και TfR2-β. Ο TfR2-α είναι μια πρωτεΐνη της κυτταρικής μεμβράνης μοριακού βάρους 90-105kDa και εκφράζεται στα ηπατοκύτταρα και τα πρόδρομα ερυθροειδή κύτταρα, ενώ ο TfR2-β βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και εκφράζεται σε διάφορους τύπους κυττάρων, όπως του σπλήνα, της καρδιάς και διάφορων καρκινικών κυττάρων [36, 47, 48, 49, 50].

Ο TfR2-α προσλαμβάνει σίδηρο συνδεδεμένο με την Tf στα κύτταρα με παρόμοια αποτελεσματικότητα με εκείνη του TfR1 [36, 47]. Όπως ισχύει με τον TfR1, η σύνδεση του TfR2-α εξαρτάται από το pH. Ο TfR2-α συνδέεται με την holo-Tf σε ουδέτερο pH και με την apo-Tf σε όξινο pH [36, 51] .

Ο TfR2-β θεωρείται κυτταροπλασματική πρωτεΐνη και πιθανώς, σύμφωνα με μελέτες, παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση του σιδήρου στα μακροφάγα.

1.5 Σηματοδοτικά Μονοπάτια που Σχετίζονται με τον Καρκίνο

1.5.1 Σηματοδοτικό Μονοπάτι AKT/PI3K

Το μονοπάτι αυτό μπορεί να ενεργοποιηθεί από υποδοχείς συζευγμένους με πρωτεΐνη G (GPCRs: G Protein-Coupled Receptors), υποδοχείς τυροσινικής κινάσης και υποδοχείς κυτταροκινών. Η πρόσδεση του προσδέτη, ενός αυξητικού παράγοντα για παράδειγμα, εκκινεί μια σειρά γεγονότων που ενεργοποιούν την PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase), η οποία προκαλεί παραγωγή της PIP3. Με την πρόσδεση της AKT στη PIP3 (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate), η PDK1 (3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase-1) φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την AKT, η οποία μπορεί επίσης, να φοσφωριλιωθεί από την mTORC2 (Mechanistic Target of Rapamycin Complex 2) [1,9] (Εικόνα 14).

Η AKT αναστέλλει τη δράση του συμπλέγματος TSC1-TSC2 (TSC1, 2: Tuberous Sclerosis Complex 1, 2: αναστολέας του mTORC1), οδηγώντας στην ενεργοποίηση του mTORC1 και κατά συνέπεια, την ενίσχυση της κυτταρικής ανάπτυξης [1, 52]. Ακόμη, διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω της φωσφορυλίωσης και αναστολής των P21 και P27 (πρωτεΐνες που καταστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο) [1, 53, 54], ενώ αναστέλλει τη δράση ορισμένων προαποπτωτικών, όπως η Bad, και του ογκοκατασταλτικού παράγοντα p53, προκαλώντας αντίσταση στην απόπτωση [1, 55, 56, 57] (Εικόνα 14).

Λόγω αυτών, θεωρείται ότι η παρατεταμένη ενεργοποίηση του συγκεκριμένου σηματοδοτικού μονοπατιού οδηγεί στην ανάπτυξη καρκίνου και σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση και μειωμένη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία. Ωστόσο, ο περιορισμός του μπορεί να επιτευχθεί με τη δράση ορισμένων φωσφατασών, όπως η PTEN, οι οποίες υδρολύουν το PIP3 αναστέλλοντας τη σηματοδότηση που προκαλείται από την PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase) [1].

1.5.2 Σηματοδοτικό Μονοπάτι MAPK/ERK (Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular signal-Regulated Kinase)

Διάφοροι αυξητικοί παράγοντες, όπως οι EGF και PDGF, ενεργοποιούν αυτό το σηματοδοτικό μονοπάτι, μέσω της πρόσδεσης τους στους υποδοχείς, εκκινώντας μια σειρά γεγονότων που οδηγούν στην ενεργοποίηση της Ras, πρωτεΐνη σημαντική στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασισμού και της απόπτωσης [1, 58].

Η Ras ενεργοποιεί τη Raf και εν τέλει, την ERK, η οποία στοχεύει διάφορα μόρια, όπως το πρωτοογκογονίδιο Myc (μεταγραφικός παράγοντας, η έκφραση του οποίου αυξάνει στην πλειοψηφία των καρκίνων, με αποτέλεσμα την αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού), και διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [1, 59, 60] (Εικόνα 14). Συνεπώς, η συνεχής ενεργοποίηση του μονοπατιού οδηγεί σε ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ανάπτυξη καρκίνου.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο έλεγχος αυτού του μονοπατιού πραγματοποιείται με τη χρήση των πρωτεϊνών GAPs (GTPase-Activating Proteins), οι οποίες διεγείρουν την υδρόλυση του GTP που είναι συνδεδεμένο με τη Ras. Επομένως, μεταλλάξεις των GAPs οδηγούν σε ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του μονοπατιού και ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό [1, 61].

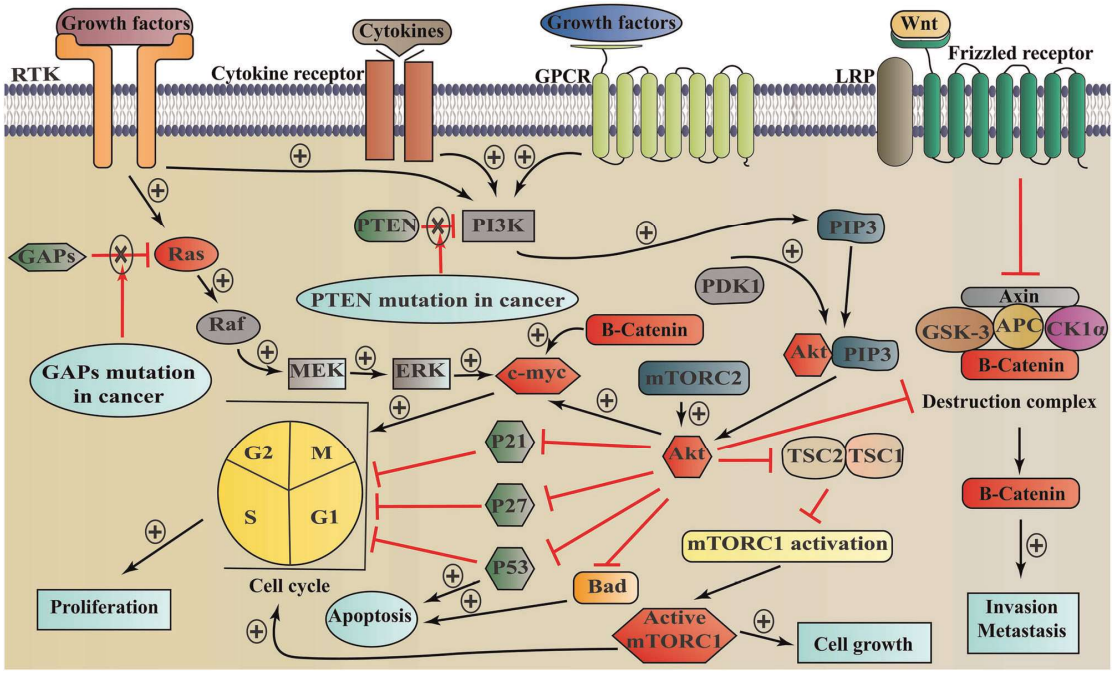
1.5.3 Σηματοδοτικό Μονοπάτι Wnt/β-κατενίνη (Wingless-Integrated/β-κατενίνη)

Η έναρξη του μονοπατιού πραγματοποιείται με την πρόσδεση μιας από τις πρωτεΐνες Wnt στους υποδοχείς της οικογένειας Frizzled, προκαλώντας συσσώρευση β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα και μετακίνησης της στον πυρήνα [1] (Εικόνα 14).

Το σύμπλεγμα αποδόμησης, αποτελούμενο από την κινάση GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3), την CK1α (Casein Kinase 1 alpha) και την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη APC, ρυθμίζει το μονοπάτι αυτό προάγοντας την ουβικιτινίωση και την αποδόμηση της β-κατενίνης (Εικόνα 14). Επομένως, μεταλλάξεις του συμπλέγματος αυτού μπορούν να οδηγήσουν σε εμφάνιση καρκίνου [1, 62].

Το σηματοδοτικό αυτό μονοπάτι έχει ‘επικοινωνία’ με το σηματοδοτικό μονοπάτι AKT/PI3K. Συγκεκριμένα, μέσω της αναστολής της GSK3, η AKT

προκαλεί διαταραχή στη λειτουργία του συμπλέγματος αποδόμησης της β-κατενίνης [1, 63] (Εικόνα 14).



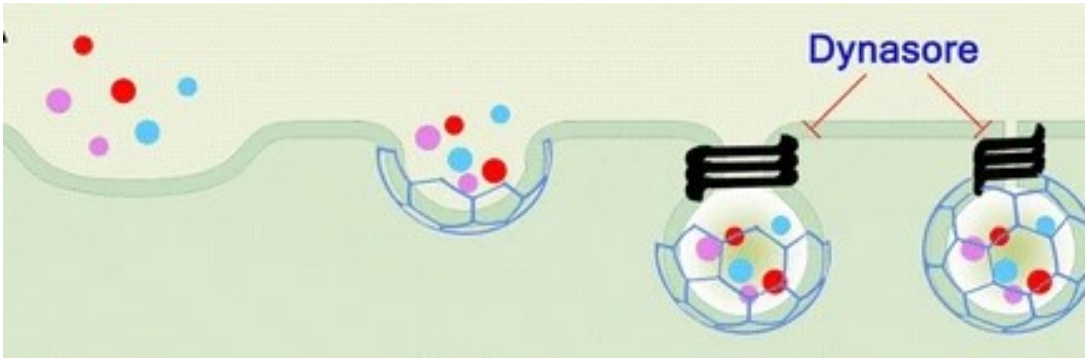
Εικόνα 14. ***Σηματοδοτικά μονοπάτια AKT/PI3K, MAPK/ERK και Wnt/β-κατενίνη.*** *Τα σηματοδοτικά αυτά μονοπάτια συμμετέχουν σε κυτταρικές διεργασίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, μεταλλάξεις των οποίων οδηγούν σε ανεξέλεγκτη ενεργοποίησή τους και ανάπτυξη καρκίνου. Μεταλλάξεις στα πρωτοογκογονίδια Ras και c-Myc, όπως και στον απενεργοποιητή της PI3K, PTEN, έχουν σοβαρές συνέπειες. Η PI3K ενεργοποιεί την AKT, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί το c-Myc και το mTORC1 και καταστέλλει τη δράση των p53 και Bad, ενώ ενισχύει τη σηματοδότηση του μονοπατιού Wnt/β-κατενίνη [1].*

1.6 Αναστολείς Ενδοκυττάρωσης

1.6.1 Dynasore

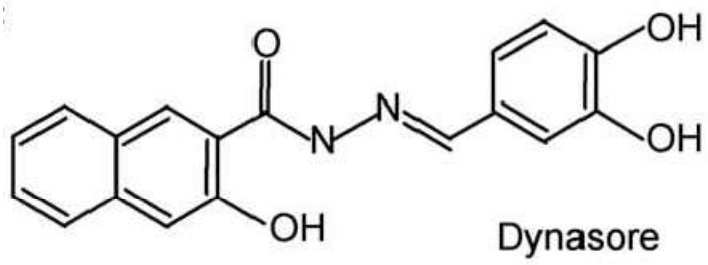
Το Dynasore (Εικόνα 16), ένα μικρό μόριο ταχείας δράσης με την ικανότητα να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη, θεωρείται ένας από τους ισχυρότερους αναστολείς των ενδοκυτταρώσεων που εξαρτώνται από τη δυναμίνη. Δρα ως αναστολέας της GTPάσης δραστηριότητας της δυναμίνης και μόλις λίγα

δευτερόλεπτα μετά την προσθήκη του, εμποδίζεται ο σχηματισμός των CCV (Εικόνα 15). Σε αυτό το συμπέρασμα κατέληξαν τα πειράματα των Macia et al. [64].



Εικόνα 15. ***Αναστολτική δράση του Dynasore.*** *Αρχικά, σχηματίζεται CCP και έπειτα, προσλαμβάνεται κλαθρίνη, η οποία πολυμερίζεται σε πεντάγωνα και εξάγωνα, σχηματίζοντας το περίβλημα κλαθρίνης. Η δυναμίνη προσλαμβάνεται στον 'αυχένα' του σχηματιζόμενου CCV και προκαλεί την αποκοπή του από τη μεμβράνη, σχηματίζοντας ένα ενδοκυτταρικό κυστίδιο. Το Dynasore αναστέλλει τη δράση της GTPάσης δραστηριότητας της δυναμίνης, εμποδίζοντας το σχηματισμό του CCV [65].*

Το Dynasore επιλέχθηκε από τους Macia et al. μεταξύ 16000 μορίων και χαρακτηρίστηκε ως αναστολέας των Δυναμίνη 1 και Δυναμίνη 2, κάτι που παρεμποδίζει τη φυσιολογική εξέλιξη του σχηματισμού CCV.

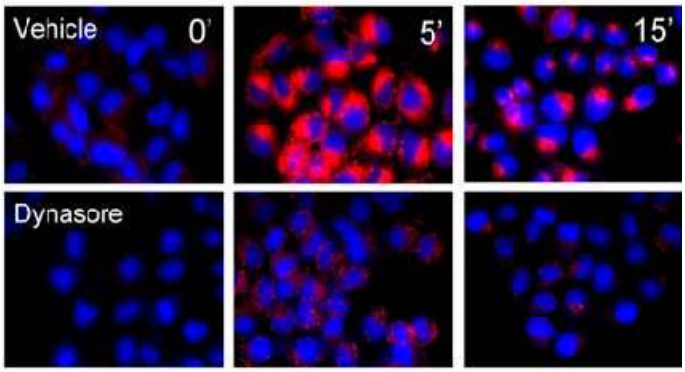


Εικόνα 16. ***Χημική δομή του Dynasore*** *[64]***.**

Για να καταλήξουν στο συμπέρασμα αυτό οι Macia et al. ακολούθησαν το εξής πείραμα:

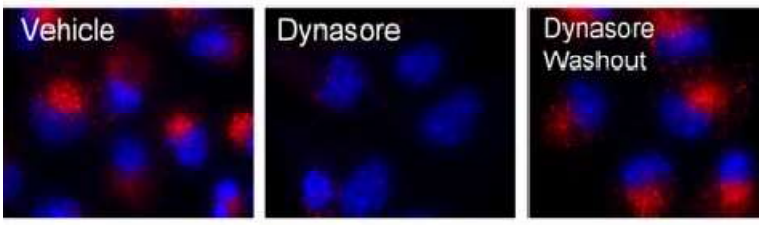
1. Επώαση των κυττάρων HeLa (Henrietta Lacks) κατά τη διάρκεια της νύχτας σε DMEM με 5% FBS (Fetal Bovine Serum) (μέχρι να είναι 50% confluent).

2. Επώαση των κυττάρων για 30 λεπτά στους 37°C με 80μM Dynasore ή μόνο με 0.8% DMSO (Dimethyl Sulfoxide) (vehicle).
3. Επώαση των κυττάρων για 2 λεπτά στους 20°C με το ίδιο μέσο που περιείχε Alexa-568 Tf.
4. 3 πλύσεις με το αντίστοιχο μέσο.
5. Επώαση των κυττάρων στους 37°C.
6. Όξινη πλύση, μονιμοποίηση των κυττάρων και χρώση των πυρήνων με Hoechst.



Εικόνα 17. ***Ανασταλτική δράση του Dynasore.*** *Μείωση της πρόσληψης της Tf, λόγω του Dynasore, το οποίο οδηγεί σε ταχεία παρεμπόδιση του σχηματισμού των CCV, με αποτέλεσμα την αναστολή της ενδοκυττάρωσης της Tf [64]. (Κόκκινο: Tf, Μπλε: Πυρήνες)*

Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι η ανασταλτική δράση του Dynasore είναι πλήρως αναστρέψιμη (Εικόνα 18), καθώς 20 λεπτά μετά την απομάκρυνση του Dynasore από το μέσο καλλιέργειας, η μεταφορά προς τα ενδοσώματα επανήλθε σε φυσιολογικά επίπεδα.



Εικόνα 18. ***Αναστρέψιμη δράση του Dynasore.*** *Μετά την απομάκρυνση του Dynasore, παρατηρείται Tf, καθώς επανέρχεται η μεταφορά προς τα ενδοσώματα [64].*

1.6.2 Άλλοι Αναστολείς Ενδοκυττάρωσης

Εκτός το Dynasore, που είναι ένας από τους πρώτους και ευρέως χρησιμοποιούμενους αναστολείς της δυναμίνης, έχουν αναπτυχθεί νεότεροι, όπως το Dyngo-4a. Ο αναστολέας αυτός χρησιμοποιήθηκε σε ανθρώπινα κύτταρα HeLa, όπου η επίδρασή του στην ενδοκυττάρωση αξιολογήθηκε μέσω της ενδοκυττάρωσης της Tf. Σύμφωνα με τα πειράματα, ο αναστολέας προκάλεσε σημαντική μείωση ενδοκυττάρωσης της Tf, καθιστώντας τον χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της Dynamin-Dependent Endocytosis [29].

Το MiTMAB (Mitochondrial Targeting Motif-Associated Blocker) αποτελεί έναν ακόμη αναστολέα της δυναμίνης, το οποίο επηρεάζει την αλληλεπίδρασή της με τα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης και συνεπώς, τη λειτουργία της κατά την ενδοκυττάρωση. Η δράση του έχει τεκμηριωθεί σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, όπως HeLa και A431, όπου παρατηρήθηκε μείωση της ενδοκυττάρωσης της Tf και του EGF [29].

Ο αναστολέας Pitstop 2 χρησιμοποιείται για την αναστολή της CME. Σε ανθρώπινα κύτταρα HeLa προκαλεί δοσοεξαρτώμενη αναστολή της ενδοκυττάρωσης της Tf με IC_{50}=12-15μM, ενώ στα κύτταρα U2OS IC_{50}=9.7μM [29, 66]. Η δράση του είναι αναστρέψιμη.

Ο αναστολέας χλωροπρομαζίνη (Chlorpromazine: τυπικό αντιψυχωσικό φάρμακο της ομάδας των φαινοθειαζινών) συνδέεται με διαταραχή της φυσιολογικής οργάνωσης και κατανομής της κλαθρίνης κατά τη CME. Η ενδοκυττάρωση της Tf σε κύτταρα HeLa χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης της αποτελεσματικότητας του αναστολέα [29].

Πίνακας Ι: Συνοπτική παρουσίαση των αναστολέων σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές [29, 67, 68].

Αναστολέας	Στόχος	Ανθρώπινη Κυτταρική Σειρά	Αξιολόγηση
Dynasore	Δυναμίνη	HeLa	Αναστολή της ενδοκυττάρωσης της Tf
Dyngo-4a	Δυναμίνη	HeLa	Αναστολή της CME
MiTMAB	Δυναμίνη	HeLa, A431	Μείωση της ενδοκυττάρωσης της Tf και του EGF
Pitstop 2	Κλαθρίνη	HeLa, U2OS	Μείωση της ενδοκυττάρωσης της Tf
Chlorpromazine	CME	HeLa	Παρεμπόδιση της CME

1.6.3 Off-target Effects

Η χρήση των αναστολέων της ενδοκυττάρωσης απαιτεί προσοχή ως προς την ειδικότητά τους, καθώς έχουν τη δυνατότητα να εμφανίσουν επιδράσεις εκτός στόχου (off-target effects), δηλαδή αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες ή διαφορετικές κυτταρικές διεργασίες από εκείνες που αποτελούν τον αρχικό στόχο, ακόμη και οι ενώσεις που έχουν χαρακτηριστεί ως ειδικοί αναστολείς [29, 69, 70].

Οι αναστολείς Dynasore και Dyngo-4a προκαλούν αναστολή της πινοκυττάρωσης σε κύτταρα στα οποία η δυναμίνη έχει εξαλειφθεί πλήρως, επιβεβαιώνοντας ότι πρόκειται για off-target effect. Επίσης, έχουν ισχυρή ανασταλτική επίδραση στον κυματισμό της μεμβράνης, δράση ανεξάρτητη από τη δυναμίνη [71]. Ακόμη, έχει βρεθεί ότι το Dynasore προκαλεί μη εξειδικευμένη αναστολή της VEGF-επαγόμενης έκκρισης του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} [72].

Ο αναστολέας Pitstop 2 παρουσιάζει σημαντικό περιορισμό όσον αφορά την ειδικότητά του. Σε κύτταρα HeLa βρέθηκε ότι, εκτός από την αναστολή της ενδοκυττάρωσης της Tf, αναστέλλει και την ενδοκυττάρωση μορίων, όπως MHCI, CD59, CD44, CD98 και CD147, τα οποία θεωρούνται ‘φορτία’ της ενδοκυττάρωσης ανεξάρτητη της κλαθρίνης [29, 68].

Για τον περιορισμό αυτών των πιθανών επιδράσεων και την ενίσχυση της δράσης των αναστολέων, συνιστάται να χρησιμοποιούνται στη βιοχημική μελέτη περισσότερα από ένα chemical scaffolds που αναστέλλουν την πρωτεΐνη-στόχο, καθώς είναι απίθανο δύο ή περισσότερα διαφορετικά chemical scaffolds να

εμφανίζουν τις ίδιες επιδράσεις εκτός στόχου, και να χρησιμοποιούνται ανενεργές ενώσεις ελέγχου, με όσο το δυνατόν πιο κοντινό δομικό ανάλογο προς την υπό μελέτη ένωση, οι οποίες είναι χημικά παρόμοιες, αλλά δεν παρουσιάζουν αποτελεσματικότητα έναντι του στόχου in vitro. Ο συνδυασμός αυτών των δύο προσεγγίσεων μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την επικύρωση του θεραπευτικού-μοριακού στόχου [29].

1.7 Σκοπός της Μεταπτυχιακής Διατριβής

Οι τρέχουσες στρατηγικές αντιμετώπισης του καρκίνου δεν επαρκούν για την αποτελεσματική θεραπεία κακοηθειών που χαρακτηρίζονται από πολλαπλούς περιοριστικούς παράγοντες ως προς τη δοσολογία, όπως η τοξικότητα, περιορίζοντας το θεραπευτικό όφελος, την ποιότητα ζωής και τα ποσοστά πλήρους και μακροχρόνιας ύφεσης.

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας ήταν η εγκαθίδρυση δοκιμασίας μελέτης της ενδοκυττάρωσης που ελέγχεται από την κλαθρίνη. Η δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε για την σάρωση βιβλιοθήκης χημικών μορίων (της οικογένειας Dynasore-like), με σκοπό την ανεύρεση νέων χημικών αναστολέων του μονοπατιού ενδοκυττάρωσης, πιο ειδικών από τους γνωστούς αναστολείς, που να είναι απαλλαγμένοι από off-target effects. Οι αναστολείς αυτοί ελέγχθηκαν για την επίδραση που επιφέρουν στην ενδοκυττάρωση, με σκοπό την εύρεση νέων αντικαρικινικών φαρμάκων με εξειδικευμένη-στοχευμένη δράση επί του μονοπατιού ενδοκυττάρωσης που ελέγχεται από την κλαθρίνη.

2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

2.1 Αντιδραστήρια και Αντισώματα

Η πρωτεΐνη FITC-Tf (5mg/ml) από ανθρώπινο ορό συζευγμένη με φλουορεσκεΐνη (Cat. Number T2871), καθώς και η Alexa-Tf (5mg/ml) από ανθρώπινο ορό συζευγμένη με Alexa Fluor^{TM} 488 (Cat. Number T13342) αποκτήθηκαν από την εταιρεία Invitrogen. Ο αναστολέας Dynasore (20mM) αποκτήθηκε από την εταιρεία Sigma (Cat. Number D7693).

Για την ανίχνευση της ακτίνης σε καρκινικά κύτταρα HeLa ή ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC χρησιμοποιήθηκαν το πρωτογενές μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικιού (DSHB, JLA20) και το δευτερογενές αντίσωμα αίγας (Peroxidase AffiniPure® Goat Anti-Mouse IgG (H+L)) (Jackson, 115-035-146).

2.2 Καλλιέργεια Κυττάρων

2.2.1 Καλλιέργεια Καρκινικών Κυττάρων HeLa

Καρκινικά κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία επιφάνειας 100mm. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (ThermoFisher, 41966029), εμπλουτισμένο με High Glucose, L-glutamine, Phenol Red, Sodium Pyruvate, 10% FBS και 1% Pen/Strep, σε θερμοκρασία 37°C και 5% CO_2. Άλλαζαν γενιά κάθε 3^{η} ημέρα με αναλογία 1:4 και κάθε 4^{η} ημέρα με αναλογία 1:10. Σύμφωνα με τις συνθήκες του εκάστοτε πειράματος, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε πιάτα 24 θέσεων είτε με είτε χωρίς υάλινες καλυπτρίδες.

2.2.2 Καλλιέργεια Ενδοθηλιακών Κυττάρων HUVEC

Ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), προερχόμενα από φλέβα ομφάλιου λώρου, καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία επιφάνειας 60mm με θρεπτικό Cellovations® Endothelial Cell Growth Medium Kit enhanced (gfp/rfp) (PELOBiotech, PB-MH-100-2199-GFP), τα οποία είχαν

προηγουμένως επωαστεί με κολλαγόνο για 20-30 λεπτά στους 37°C. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό σε θερμοκρασία 37°C και 5% CO_2. Τα κύτταρα άλλαζαν γενιά (passage) περίπου κάθε $3^{η}$ ημέρα με αναλογία διασποράς 1:4. Σύμφωνα με τις συνθήκες του εκάστοτε πειράματος, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε πιάτα 24 θέσεων.

2.3 Ανοσοφθορισμός

Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν σε πιάτα 24-well που περιείχαν υάλινες καλυπτρίδες. Με το πέρας των εκάστοτε πειραματικών συνθηκών, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα παραφορμαλδεΰδης (PFA: Paraformaldehyde) 3.7% σε PBS για 20 λεπτά. Το μέσο μονιμοποίησης εξουδετερώθηκε με 50mM NH_4Cl σε PBS μετά από επώαση των κυττάρων για 30 λεπτά. Έπειτα, τα κύτταρα επωάστηκαν με 0.1% Trion σε PBS για 3-4 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί η διαπερατότητα της μεμβράνης, προκειμένου να είναι δυνατή η βαφή των πυρήνων. Με την ολοκλήρωση κάθε σταδίου ακολουθούσαν 3 πλύσεις με PBS (Phosphate-Buffered Saline). Για τη βαφή των πυρήνων, τα κύτταρα επωάστηκαν με Hoechst (1:1000) για 10 λεπτά και ακολούθησαν 3 πλύσεις με PBS για 5 λεπτά η καθεμία. Τέλος, οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες με χρήση Mowiol/Dabco και αφέθηκαν να στεγνώσουν σε RT (Room Temperature) για 24 ώρες. Τα δείγματα παρατηρήθηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης (Confocal).

2.4 Μέτρηση Συγκέντρωσης Πρωτεΐνης

Για τον υπολογισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης στα κυτταρικά εκχυλίσματα, χρησιμοποιήθηκε BCA (Bicinchoninic Acid Assay) (BCA™ Protein Assay Kit της εταιρείας Pierce), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, σε 1ml αντιδραστηρίου BCA, προστέθηκαν 20μl από τα κυτταρικά εκχυλίσματα. Το μείγμα της αντίδρασης επωάστηκε για 30 λεπτά στους 60°C και φωτομετρήθηκε σε μήκος κύματος 562nm. Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα λύσης σε ίδιο όγκο δείγματος.

2.5 Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών σε Πήκτωμα Πολυακρυλαμιδίου κατά Western

Κύτταρα HeLa ή HUVEC καλλιεργήθηκαν σε πιάτα 24-well. Με το πέρας των εκάστοτε πειραματικών συνθηκών, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS – PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophorisis) και μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Millipore).

Για την ανίχνευση της Tf δεν χρησιμοποιήθηκε κάποιο αντίσωμα, καθώς είναι συζευγμένη με φθοριόχρωμα, και πραγματοποιήθηκε απευθείας εμφάνιση σήματος.

Για την ανίχνευση της ακτίνης πραγματοποιήθηκε επώαση των μεμβρανών για 1 ώρα σε RT με διάλυμα δέσμευσης (5% γάλα σε διάλυμα 0.1% Tween20 σε 1% PBS) για τη δέσμευση των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων.

Ακολούθως, οι μεμβράνες επωάστηκαν με πρωτογενή αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης στόχου. Συγκεκριμένα, για την ανίχνευση της πρωτεΐνης ακτίνη, πραγματοποιήθηκε επώαση των μεμβρανών με το πρωτογενές μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικιού (DSHB, JLA20, 1:5000) για 1 ώρα υπό ανάδευση σε RT. Η αραίωση του πρωτογενούς αντισώματος πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα 2% ζελατίνης + 0.1% Tween20 + 1% PBS + 0.05% NaN_3.

Στη συνέχεια, οι μεμβράνες πλύθηκαν 3 φορές για 5 λεπτά με διάλυμα 1% PBS + 0.1% Tween και επωάστηκαν με το δευτερογενές αντίσωμα (Jackson, 115-035-146, 1:500) για 1 ώρα υπό ανάδευση σε RT. Ακολούθησαν 3 πλύσεις για 5 λεπτά με PBS + 0.1% Tween, επώαση για 2 λεπτά με αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας ECL (Enhanced Chemiluminescence) και εμφάνιση του σήματος.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

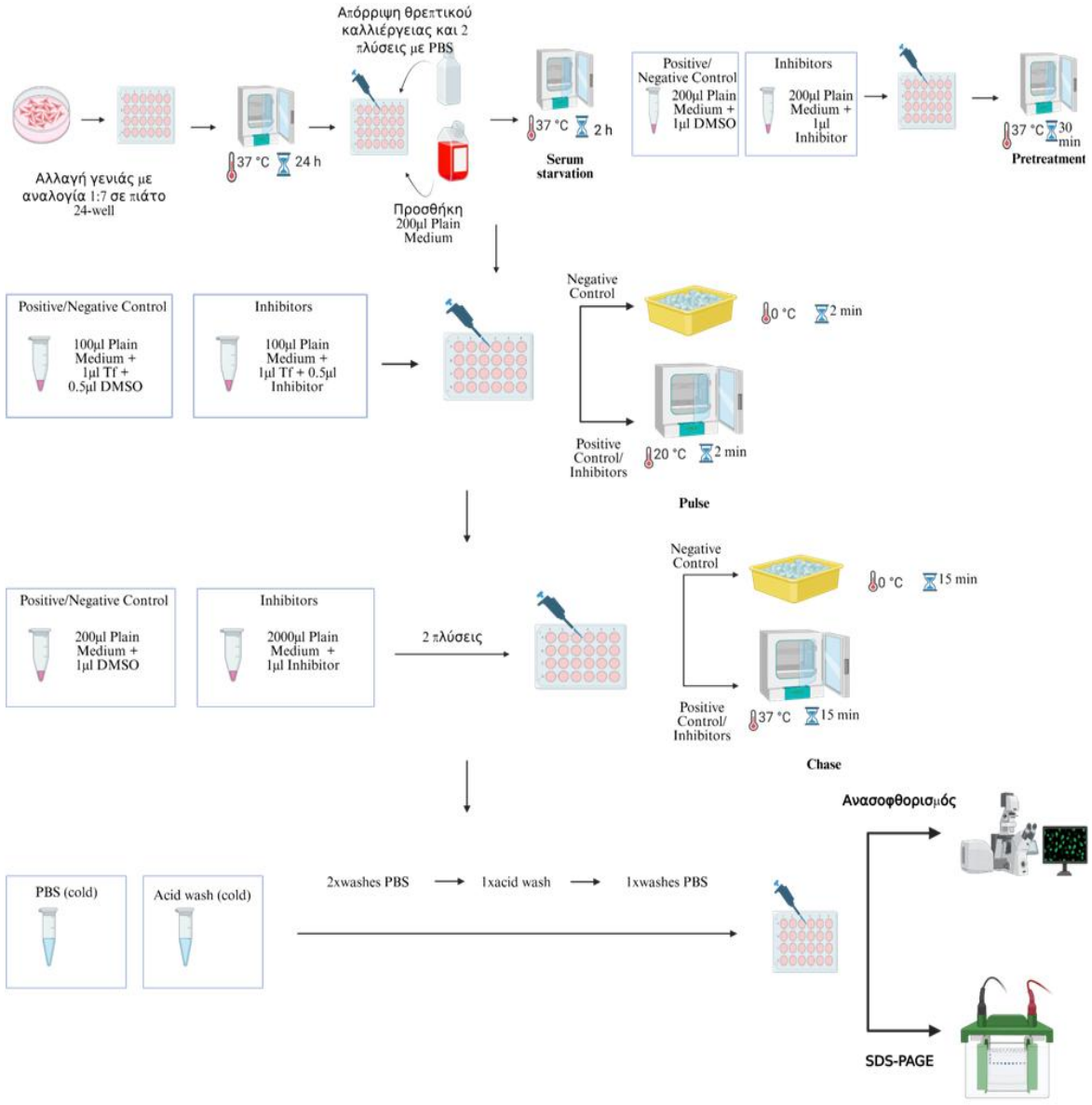
Προκειμένου να ελέγξουμε αν οι χημικοί αναστολείς (συντέθηκαν και μας προσφέρθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων από το εργαστήριο του Καθηγητή Ανδρέα Τζάκου, Τμήμα Χημείας) αναστέλλουν τη δράση της δυναμίνης και σε ποιο βαθμό, μελετήσαμε την ενδοκυττάρωση της Tf, τόσο με χρήση των χημικών αναστολέων όσο και χωρίς (Control).

Θέλοντας να μελετήσουμε το ποσοστό της Tf της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που ενδοκυτταρώνεται, εφαρμόσαμε το λεγόμενο πείραμα 'Pulse-chase', σύμφωνα με τους Macia et al [64].

Από την προηγούμενη μέρα τα κύτταρα άλλαξαν γενιά με αναλογία συνήθως 1:7 (εξαρτάται από το πόσο confluent ήταν τα κύτταρα) και αναπτύχθηκαν σε πιάτο 24 θέσεων. Επωάστηκαν για 1 ημέρα στους 37°C, ώστε το ποσοστό τους να είναι 50-70%. Την επόμενη μέρα, απορρίφθηκε το θρεπτικό και ακολούθησαν 2 πλύσεις με PBS (Dulbecco's PBS, without Ca & Mg, without Phenol Red, CAPRICORN SCIENTIFIC, PBS-1A) (warm) (500μl/πλύση). Έπειτα, υποβλήθηκαν σε στέρηση ορού από το θρεπτικό καλλιέργειας (warm) (Plain Medium) για 2 ώρες στους 37°C (serum starvation). Με το πέρας των δύο ωρών, τα κύτταρα επωάστηκαν με 200μl Plain Medium + 1μl DMSO (Positive Control, Negative Control) (RT) και 200μl Plain Medium + 1μl Dynasore ή άλλο χημικό αναστολέα (MDY-1, MDY-2, MDY-3, MDY-4 ή MDY-5) (RT), ανάλογα τις συνθήκες του πειράματος, για 30 λεπτά στους 37°C (Pretreatment). Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάστηκαν με 100μl Plain Medium + 1μl Tf + 0.5μl DMSO (Positive Control, Negative Control) και 100μl Plain Medium + 1μl Tf + 0.5μl Dynasore ή κάποιο από τους άλλους αναστολείς, σύμφωνα με το κάθε πείραμα. Το Positive Control και το Dynasore (ή άλλος χημικός αναστολέας) επωάστηκαν για 2 λεπτά στους 20°C, ενώ το Negative Control επωάστηκε για 2 λεπτά σε πάγο, ώστε να επιβεβαιώσουμε ότι η Tf δεν ενδοκυτταρώνεται στους 0°C. Αυτό είναι το λεγόμενο Pulse, κατά το οποίο η Tf προσδένεται στην κυτταρική επιφάνεια. Ακολούθησαν δύο πλύσεις με 200μl Plain Medium + 1μl DMSO (Positive Control, Negative Control) και 200μl Plain Medium + 1μl Dynasore (ή τον αντίστοιχο χημικό αναστολέα) και επώαση με 200μl Plain Medium + 1μl DMSO (Positive Control) και 200μl Plain Medium + 1μl Dynasore (ή τον αντίστοιχο χημικό αναστολέα) για 15 λεπτά στους 37°C, ενώ το Negative Control παρέμεινε στον πάγο.

Το στάδιο αυτό ονομάζεται Chase, όπου η Tf, που βρίσκεται στην κυτταρική επιφάνεια, ενδοκυτταρώνεται. Έπειτα, ακολούθησαν 2 πλύσεις με PBS (cold) (200μl/πλύση), μια πλύση για 2 λεπτά με 200μl όξινο διάλυμα (pH=2.2) (cold), ώστε να απομακρυνθεί η Tf που είναι δεσμευμένη στην επιφάνεια των κυττάρων και μια τελευταία πλύση με PBS (cold) (Εικόνα 19).

Για τον έλεγχο του ποσοστού αναστολής των χημικών αναστολέων με ανοσοφθορισμό, ακολούθησε μονιμοποίηση των κυττάρων, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.5 και παρατήρηση τους στο Confocal, ενώ για τον έλεγχο του ποσοστού αναστολής με SDS-PAGE, ακολούθησε προσθήκη 150μl PBS + 1% Triton για τη λύση των κυττάρων, sonication με ένταση 10% και 1 κύκλο για κάθε δείγμα και φυγοκέντρηση των κυτταρικών εκχυλισμάτων για 10 λεπτά στους 4°C και 14000rpm. Στη συνέχεια, μετρήθηκε η συγκέντρωση πρωτεΐνης (Ενότητα 2.5). Έπειτα, σε 20μl κάθε δείγματος προστέθηκαν 7μl 4xSB (250mM Tris, pH=6.8, Sigma-Aldrich, 9.2% SDS, Sigma-Aldrich, 40% Glycerol, Fisher Chemical, 0.2% w/v Bromophenol Blue, Riedel-de Haën) και τα δείγματα έβρασαν για 5 λεπτά στους 95°C. Τέλος, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS – PAGE) και μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για 1 ώρα, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.6, και εμφάνιση σήματος.

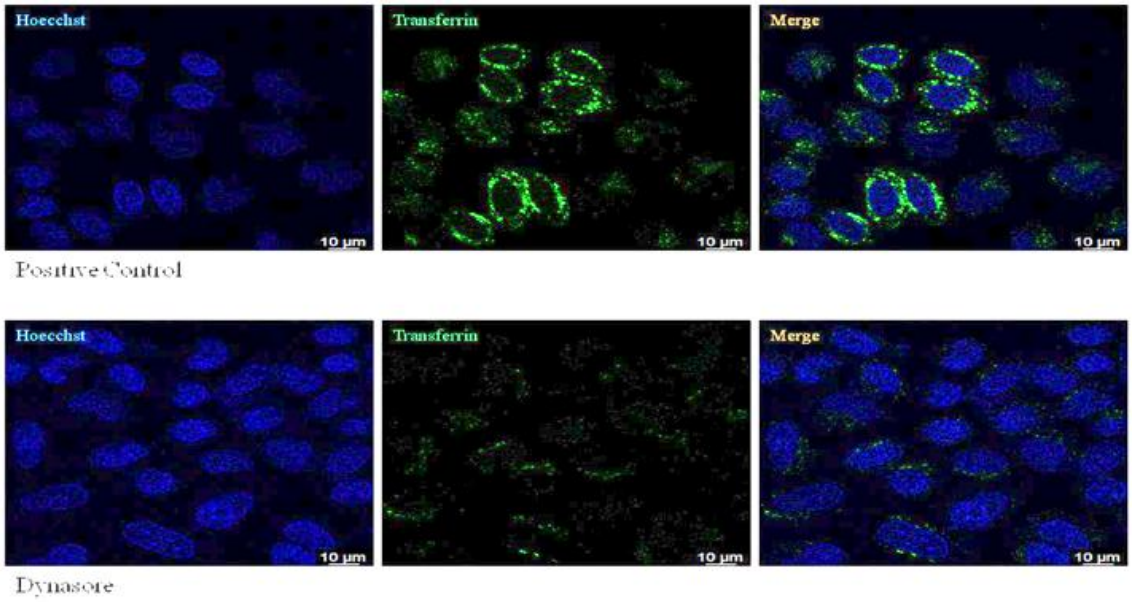


Εικόνα 19. ***Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διαδικασίας Pulse-chase.*** *Παρουσιάζονται όλα τα βήματα που ακολουθήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Macia et al. 1. Αλλαγή γενιάς κυττάρων. 2. Πλύσεις με PBS. 3. Serum starvation. 4. Pretreatment. 5. Pulse. 6. Πλύσεις. 7. Chase. 8. Πλύσεις με PBS και όξινο διάλυμα. 9. Έλεγχος ποσοστού αναστολής των χημικών αναστολέων με τη χρήση ανασοφθορισμού ή SDS-PAGE [BioRender].*

3.1 Έλεγχος του Ποσοστού Αναστολής των Χημικών Αναστολέων με Ανοσοφθορισμό

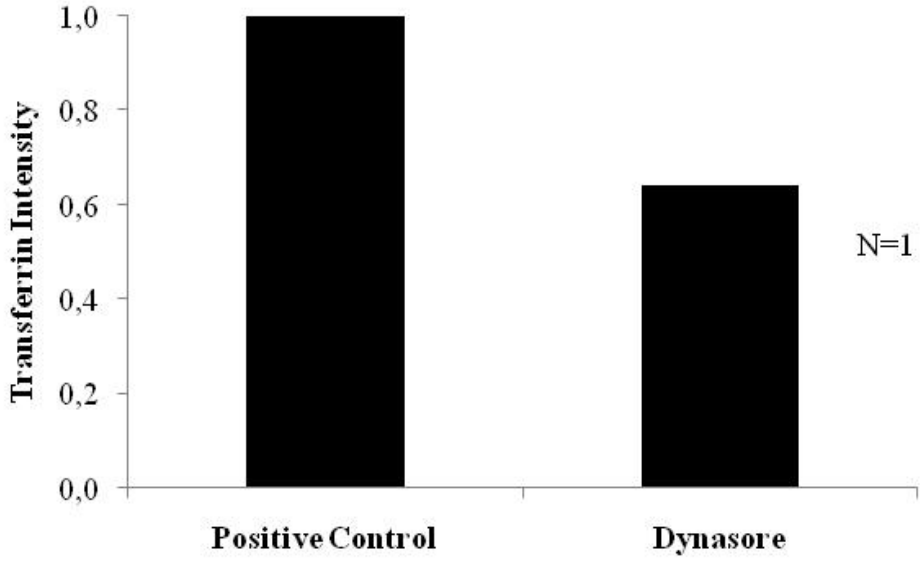
3.1.1 Έλεγχος Αναστολής του Χημικού Αναστολέα Dynasore

Χρησιμοποιήσαμε τον γνωστό αναστολέα της δυναμίνης, Dynasore, ώστε να επιβεβαιώσουμε την αναστολή που προκαλεί στη δράση της (Εικόνα 20). Πράγματι, παρατηρήσαμε ότι με χρήση του Dynasore προκαλείται αναστολή του ποσοστού ενδοκυττάρωσης της Tf, γεγονός που υποδεικνύει την αναστολή της δυναμίνης.



Εικόνα 20. ***Ενδοκυττάρωση της Tf χωρίς χρήση αναστολέα (Positive Control) και με τη χρήση του αναστολέα Dynasore.*** *Καρκινικά κύτταρα HeLa επωάστηκαν απουσία ορού για 2 ώρες. Στη συνέχεια, επωάστηκαν με DMSO (Positive Control) ή τον αναστολέα Dynasore για 30 λεπτά στους 37°C. Έπειτα, επωάστηκαν παρουσία Tf για 2 λεπτά στους 20°C και μετά από τις αντίστοιχες πλύσεις επωάστηκαν για 15 λεπτά στους 37°C. Ακολούθησαν δύο πλύσεις με PBS, μια πλύση με όξινο διάλυμα, μια πλύση με PBS και μονιμοποίηση των κυττάρων. (Μπλε: Πυρήνες, Πράσινο:Tf).*

Ωστόσο, για να ποσοτικοποιήσουμε την αναστολή, πήραμε εικόνες από 44 διαφορετικά πεδία για κάθε συνθήκη και με τη βοήθεια του λογισμικού Fiji, προέκυψαν τα αποτελέσματα.

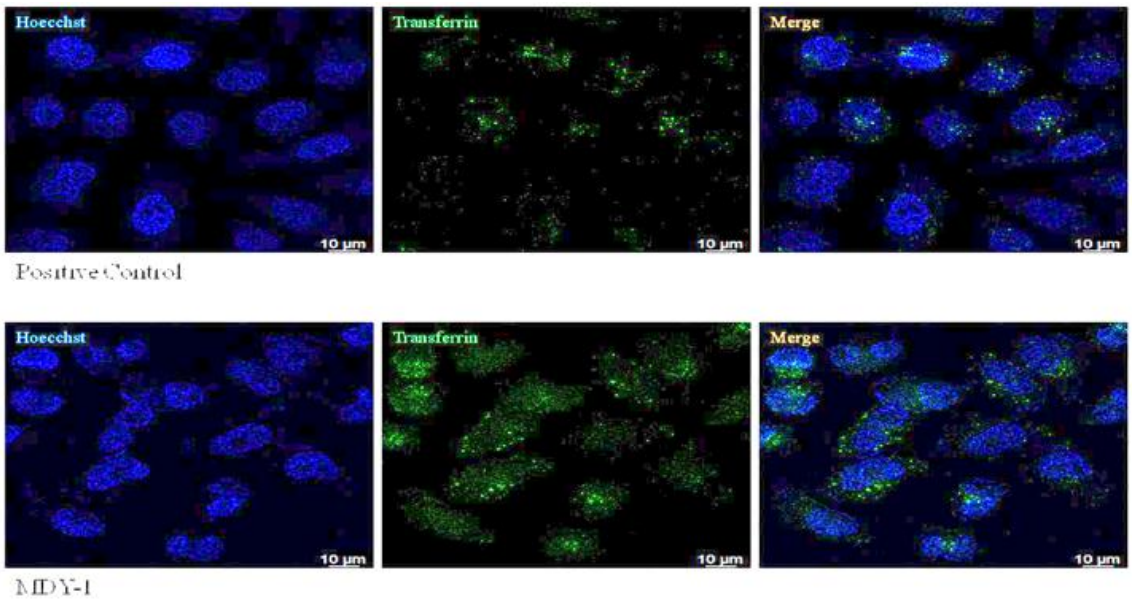


Εικόνα 21. ***Ένταση της ενδοκυτταρωμένης Tf χωρίς χρήση αναστολέα (Positive Control) και με τη χρήση του αναστολέα Dynasore.*** *Τα αποτελέσματα που απεικονίζονται προέρχονται από N=1 πειράματα.*

Θεωρώντας την ένταση της Tf του Positive Control ίση με 1 (ποσοστό 100%), δηλαδή πλήρη ενδοκυττάρωση της Tf, η ένταση της ενδοκυτταρωμένης Tf σε κύτταρα που επωάστηκαν παρουσία του αναστολέα Dynasore, προκύπτει 0.64 (ποσοστό 64%). Αυτό σημαίνει ότι το Dynasore ανέστειλε την ενδοκυττάρωση της Tf κατά 36% (Εικόνα 21).

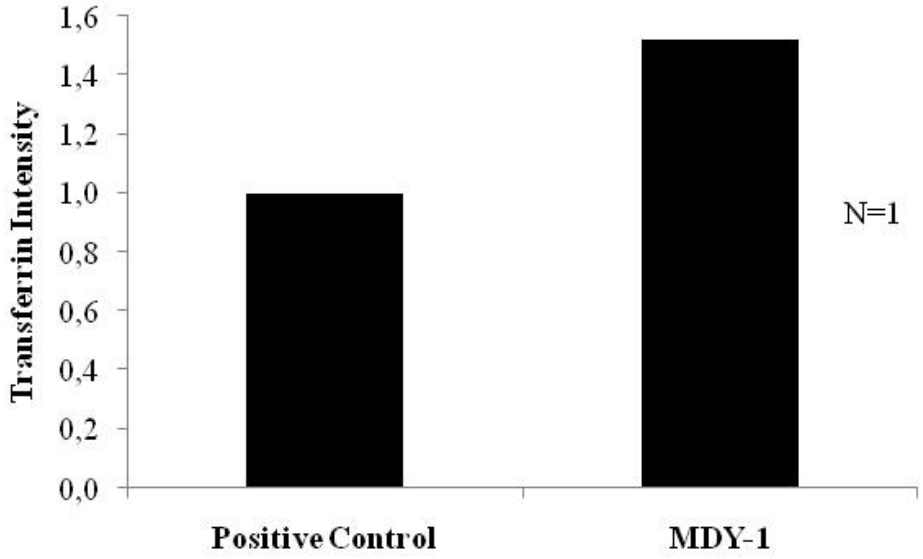
3.1.2 Έλεγχος Αναστολής του Χημικού Αναστολέα MDY-1

Όπως προκύπτει από την παρακάτω εικόνα, ο αναστολέας MDY-1 δεν προκαλεί αναστολή, καθώς βλέπουμε ότι το σήμα είναι πιο έντονο, σε σύγκριση με το Positive Control (Εικόνα 22), για το οποίο θεωρούμε το ποσοστό της Tf που ενδοκυτταρώνεται ίσο με 100%.



Εικόνα 22. ***Ενδοκυττάρωση της Tf χωρίς χρήση αναστολέα (Positive Control) και με χρήση του αναστολέα MDY-1.*** *Καρκινικά κύτταρα HeLa επωάστηκαν απουσία ορού για 2 ώρες. Στη συνέχεια, επωάστηκαν με DMSO (Positive Control) ή τον αναστολέα MDY-1 για 30 λεπτά στους 37°C. Έπειτα, επωάστηκαν παρουσία Tf για 2 λεπτά στους 20°C και μετά από τις αντίστοιχες πλύσεις επωάστηκαν για 15 λεπτά στους 37°C. Ακολούθησαν δύο πλύσεις με PBS, μια πλύση με όξινο διάλυμα, μια πλύση με PBS και μονιμοποίηση των κυττάρων. (Μπλε: Πυρήνες, Πράσινο:Tf).*

Για την ποσοστικοποίηση της αναστολής που επιφέρει ο αναστολέας MDY-1, πήραμε 30 διαφορετικά πεδία και με τη χρήση του λογισμικού Fiji, προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα.



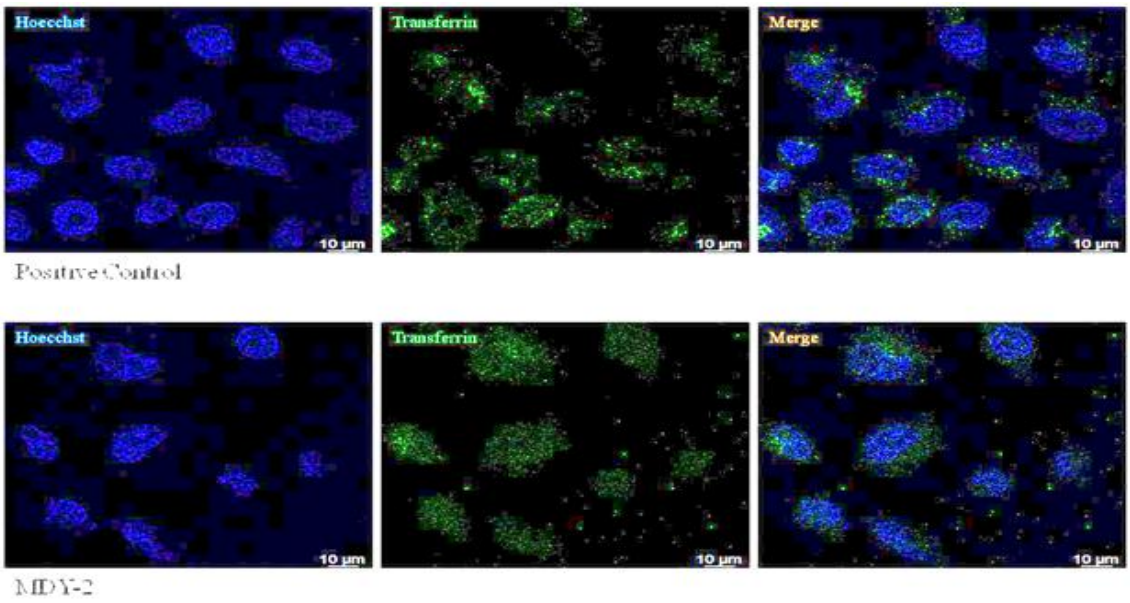
Εικόνα 23. ***Ένταση της ενδοκυτταρωμένης Tf χωρίς χρήση αναστολέα (Positive Control) και με τη χρήση του αναστολέα MDY-1.*** *Τα αποτελέσματα που απεικονίζονται προέρχονται από N=1 πειράματα.*

Από την παραπάνω εικόνα παρατηρούμε ότι ο αναστολέας MDY-1 δεν προκαλεί καμία αναστολή. Αντιθέτως, η Tf που ενδοκυτταρώνεται παρουσία του αναστολέα είναι κατά 52% περισσότερη, σε σχέση με το Positive Control (Εικόνα 23). Ωστόσο, παρατηρώντας την Εικόνα 22, βλέπουμε ότι το σήμα στο Positive Control δεν είναι έντονο. Θα μπορούσαμε να πούμε ότι το πείραμα δεν ήταν επιτυχές, καθώς το Positive Control θα πρέπει να δίνει έντονο σήμα ενδοκυτταρωμένης Tf, αφού δεν χρησιμοποιείται κάποιος αναστολέας και η Tf ενδοκυτταρώνεται πλήρως.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, για να αποφανθούμε αν ο αναστολέας MDY-1 δεν είναι αποτελεσματικός θα πρέπει να επαναλάβουμε το πείραμα και το Positive Control να εμφανίζει πλήρη ενδοκυττάρωση της Tf, αφού χρησιμοποιείται ως μέτρο σύγκρισης.

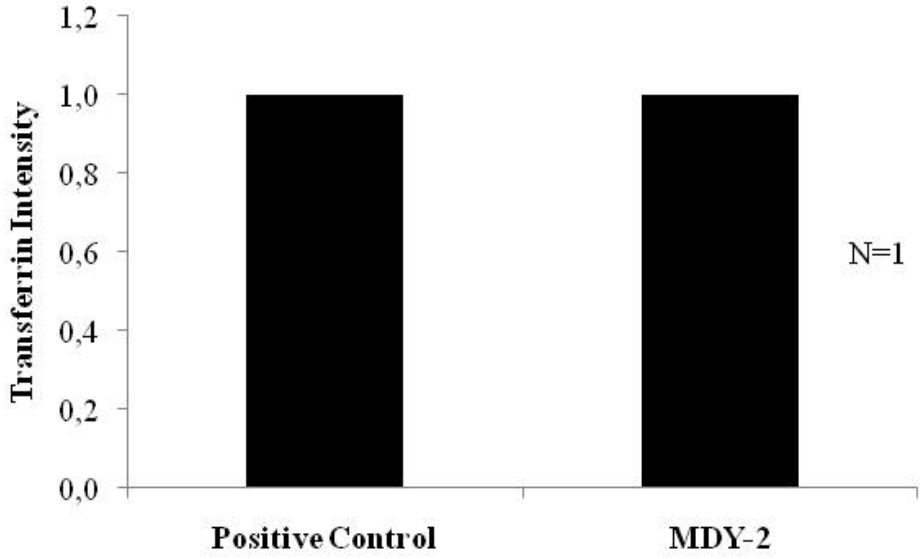
3.1.3 Έλεγχος Αναστολής του Χημικού Αναστολέα MDY-2

Ως προ την αναστολή του ελέγχθηκε και ο αναστολέας MDY-2, προκύπτοντας τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω (Εικόνα 24).



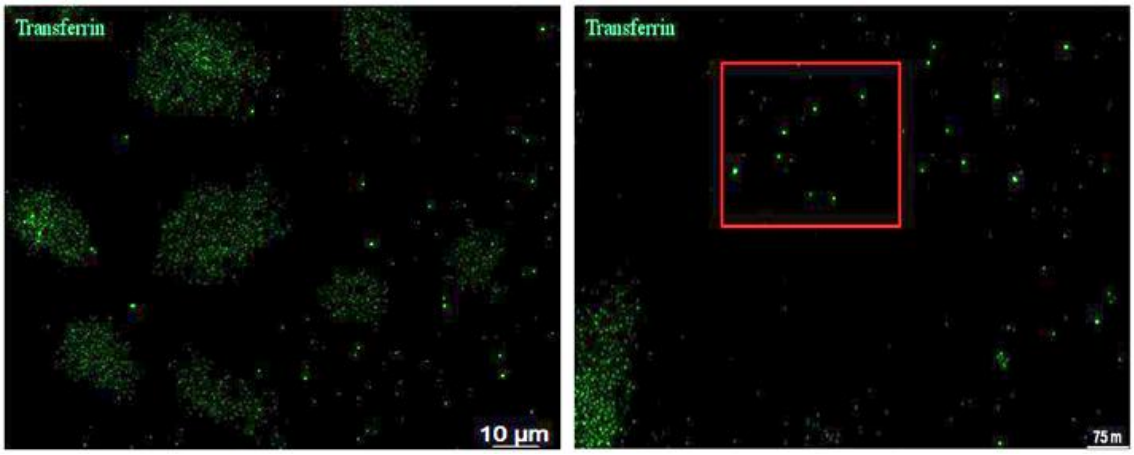
Εικόνα 24. ***Ενδοκυττάρωση της Tf χωρίς χρήση αναστολέα (Positive Control) και με χρήση του αναστολέα MDY-2.*** *Καρκινικά κύτταρα HeLa επωάστηκαν απουσία ορού για 2 ώρες. Στη συνέχεια, επωάστηκαν με DMSO (Positive Control) ή τον αναστολέα MDY-2 για 30 λεπτά στους 37°C. Έπειτα, επωάστηκαν παρουσία Tf για 2 λεπτά στους 20°C και μετά από τις αντίστοιχες πλύσεις επωάστηκαν για 15 λεπτά στους 37°C. Ακολούθησαν δύο πλύσεις με PBS, μια πλύση με όξινο διάλυμα, μια πλύση με PBS και μονιμοποίηση των κυττάρων. (Μπλε: Πυρήνες, Πράσινο:Tf).*

Παίρνοντας 16 διαφορετικά πεδία και με τη χρήση του λογισμικού Fiji, υπολογίσαμε το ποσοστό αναστολής του MDY-2.



Εικόνα 25. ***Ένταση της ενδοκυτταρωμένης Tf χωρίς χρήση αναστολέα (Positive Control) και με τη χρήση του αναστολέα MDY-2.*** *Τα αποτελέσματα που απεικονίζονται προέρχονται από N=1 πειράματα.*

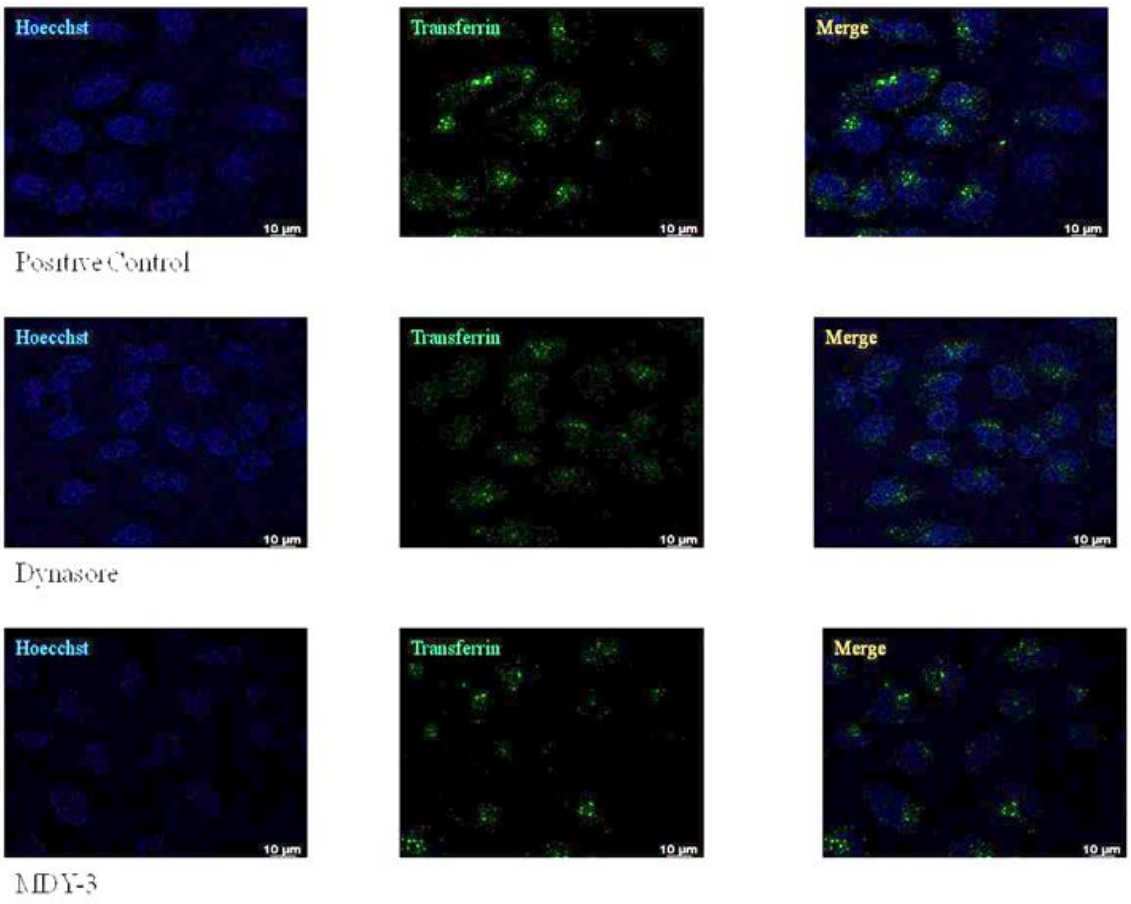
Από την Εικόνα 25, βλέπουμε ότι ο αναστολέας MDY-2 δεν προκαλεί καμία αναστολή. Ωστόσο, από την Εικόνα 24, φαίνεται να υπάρχει, έστω σε μικρό βαθμό, αναστολή. Έπειτα από παρατήρηση των εικόνων που πάρθηκαν από το Confocal, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η Tf έχει προσδεθεί μη-ειδικά (Εικόνα 26) και το γεγονός αυτό, λαμβάνεται ως σήμα από το λογισμικό. Ακόμη, λόγω αυτής της παρατήρησης, πήραμε φωτογραφίες μόνο από 16 διαφορετικά πεδία, αριθμός μη αντιπροσωπευτικός για ασφαλή δεδομένα, καθώς βλέπουμε την επίδραση του αναστολέα μόνο σε έναν μικρό αριθμό κυττάρων.



Εικόνα 26. ***Μη ειδικό σήμα της Tf.*** *Με μεγέθυνση της εικόνας κατά 7.5x10^{6}x, φαίνεται το μη-ειδικό σήμα που εμφανίζεται στις εικόνες ανασοφθορισμού για τον αναστολέα MDY-2, το οποίο λαμβάνεται ως σήμα από το λογισμικό και είναι ο λόγος για τον οποίο ο αναστολέας φαίνεται να μην είναι αποτελεσματικός.*

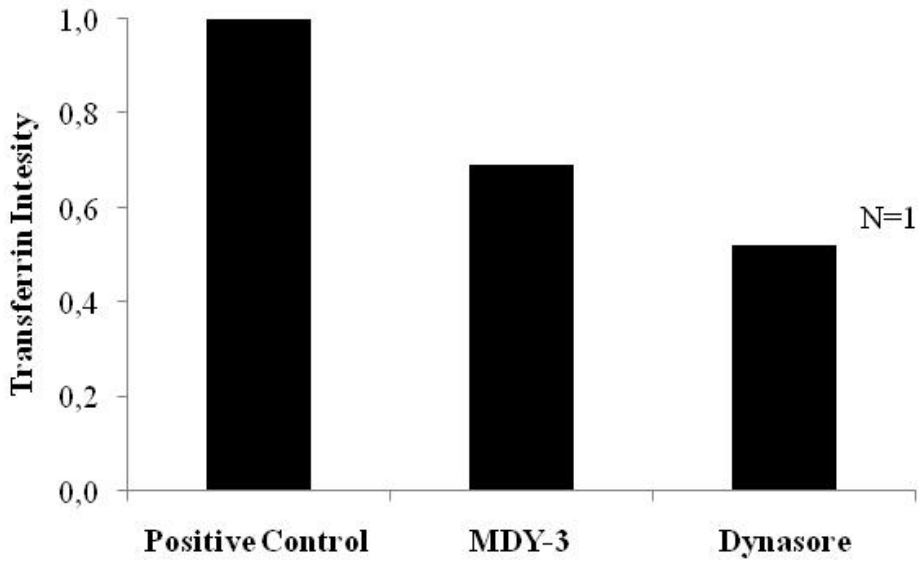
3.1.4 Έλεγχος Αναστολής του Χημικού Αναστολέα MDY-3

Ο αναστολέας MDY-3 φαίνεται να προκαλεί αναστολή της δυναμίνης, καθώς μειώνεται το σήμα σε σύγκριση με το Positive Control. Ως Control χρησιμοποιήσαμε και το Dynasore (Εικόνα 27), καθώς είχαμε παρατηρήσει ότι προκαλεί αναστολή της δυναμίνης, όπως περιγράφουν οι Macia et al.



Εικόνα 27. ***Ενδοκυττάρωση της Tf χωρίς χρήση αναστολέα (Positive Control) και με χρήση των αναστολέων MDY-3 και Dynasore.*** *Καρκινικά κύτταρα HeLa επωάστηκαν απουσία ορού για 2 ώρες. Στη συνέχεια, επωάστηκαν με DMSO (Positive Control) ή τους αναστολείς MDY-3 και Dynasore για 30 λεπτά στους 37°C. Έπειτα, επωάστηκαν παρουσία Tf για 2 λεπτά στους 20°C και μετά από τις αντίστοιχες πλύσεις επωάστηκαν για 15 λεπτά στους 37°C. Ακολούθησαν δύο πλύσεις με PBS, μια πλύση με όξινο διάλυμα, μια πλύση με PBS και μονιμοποίηση των κυττάρων. (Μπλε: Πυρήνες, Πράσινο:Tf).*

Για την ποσοτικοποίηση της αναστολής, πήραμε 29 διαφορετικά πεδία από κάθε συνθήκη και με τη βοήθεια του λογισμικού Fiji υπολογίσαμε την αναστολή.

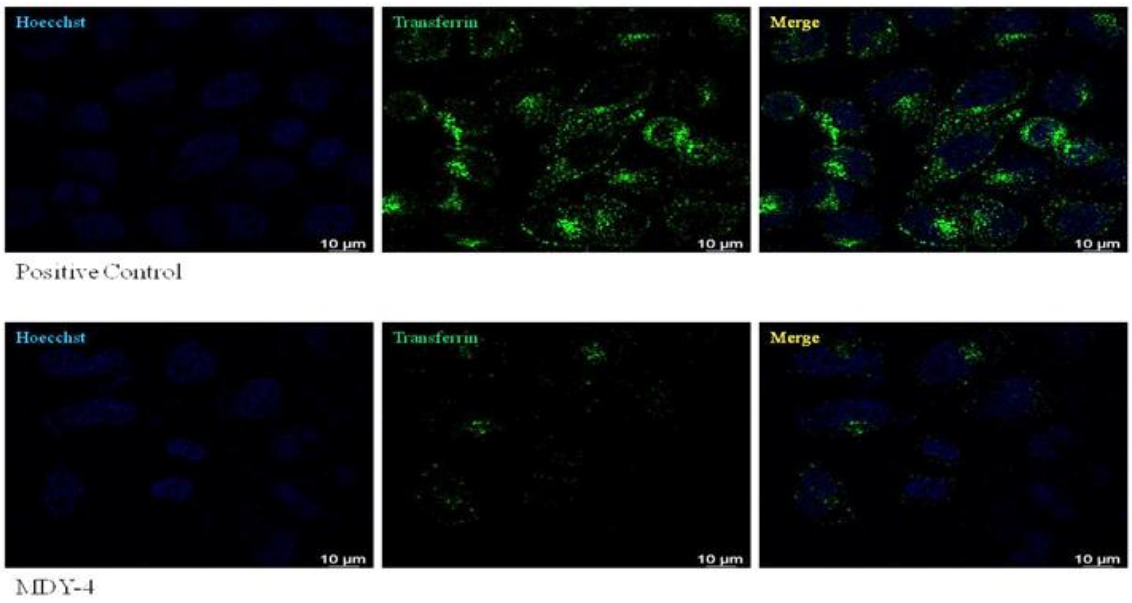


Εικόνα 28. ***Ένταση της ενδοκυτταρωμένης Tf χωρίς χρήση αναστολέα (Positive Control) και παρουσία των αναστολέων MDY-3 και Dynasore.*** *Στο συγκεκριμένο πείραμα ο αναστολέας Dynasore λειτουργεί ως Control, καθώς το Dynasore αναστέλλει επιτυχώς τη δράση της δυναμίνης και μπορεί να θεωρηθεί ως μέτρο σύγκρισης. Τα αποτελέσματα που απεικονίζονται προέρχονται από N=1 πειράματα.*

Σύμφωνα με την παραπάνω εικόνα, τα κύτταρα που επωάστηκαν με τον αναστολέα MDY-3 ενδοκυττάρωσαν την Tf σε ποσοστό 69%. Αυτό σημαίνει ότι η αναστολή που προκαλεί ο συγκεκριμένος αναστολέας είναι 31%. Αντίστοιχα, το Dynasore αναστέλλει την ενδοκυττάρωση της Tf κατά 48% (Εικόνα 28). Ωστόσο, δεν μπορούμε να θεωρήσουμε ως αποκλειστικά τα αποτελέσματα, καθώς χρειάζονται τουλάχιστον 2-3 ανεξάρτητα πειράματα, ώστε να προκύπτει ένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα.

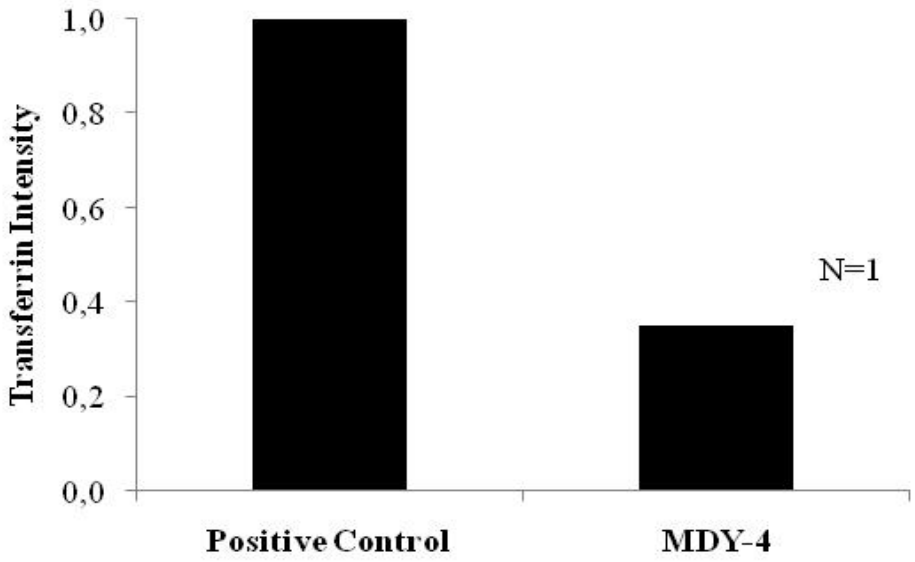
3.1.5 Έλεγχος Αναστολής του Χημικού Αναστολέα MDY-4

Ο χημικός αναστολέας MDY-4, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα, προκαλεί μεγάλη αναστολή, καθώς παρατηρείται μεγάλη μείωση στην ένταση του σήματος (Εικόνα 29).



Εικόνα 29. ***Ενδοκυττάρωση της Tf χωρίς χρήση αναστολέα (Positive Control) και με χρήση του αναστολέα MDY-4.*** *Καρκινικά κύτταρα HeLa επωάστηκαν απουσία ορού για 2 ώρες. Στη συνέχεια, επωάστηκαν με DMSO (Positive Control) ή τον αναστολέα MDY-4 για 30 λεπτά στους 37°C. Έπειτα, επωάστηκαν παρουσία Tf για 2 λεπτά στους 20°C και μετά από τις αντίστοιχες πλύσεις επωάστηκαν για 15 λεπτά στους 37°C. Ακολούθησαν δύο πλύσεις με PBS, μια πλύση με όξινο διάλυμα, μια πλύση με PBS και μονιμοποίηση των κυττάρων. (Μπλε: Πυρήνες, Πράσινο:Tf).*

Πήραμε 20 διαφορετικά πεδία και με τη βοήθεια του λογισμικού Fiji, υπολογίσαμε το ποσοστό της αναστολής που προκαλεί ο χημικός αναστολέας MDY-4.

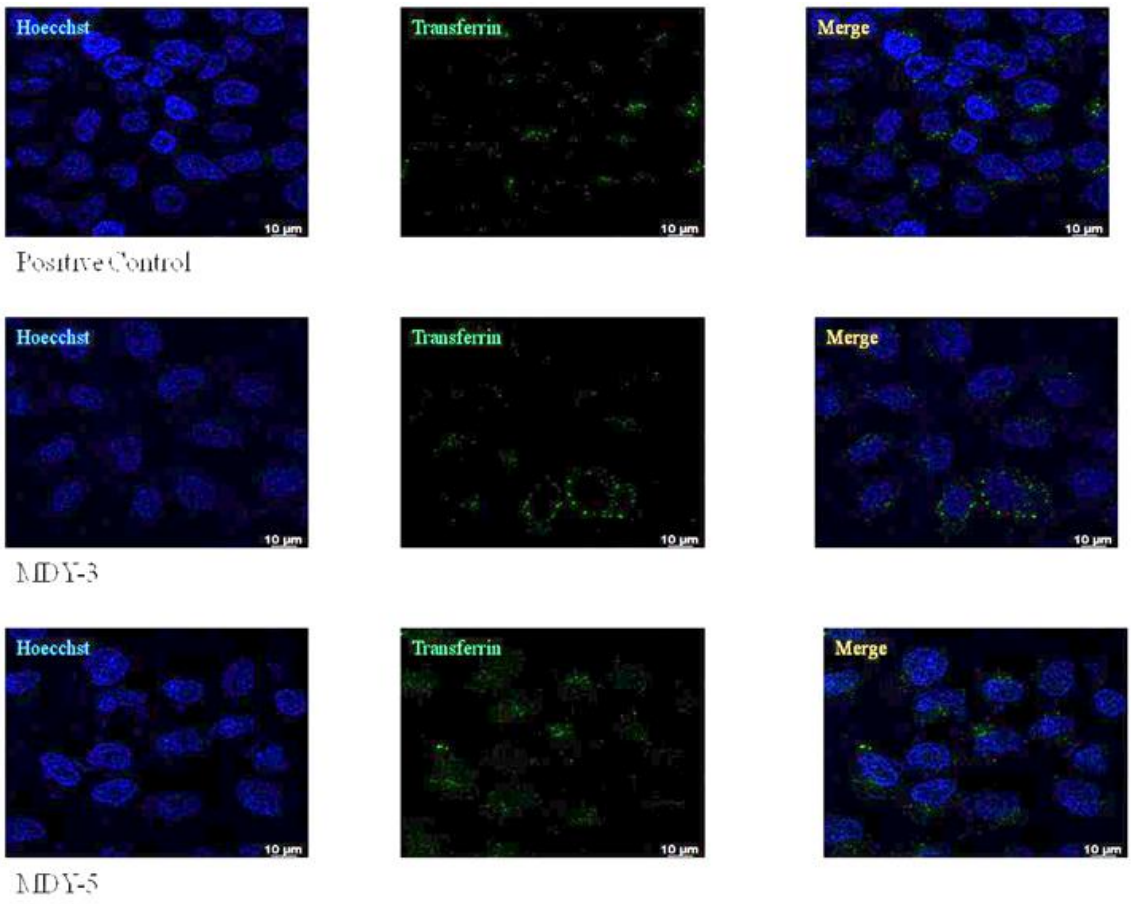


Εικόνα 30. ***Ένταση της ενδοκυτταρωμένης Tf χωρίς χρήση αναστολέα (Positive Control) και με τη χρήση του αναστολέα MDY-4.*** *Τα αποτελέσματα που απεικονίζονται προέρχονται από N=1 πειράματα.*

Από την παραπάνω εικόνα παρατηρούμε ότι η ένταση της Tf παρουσία του αναστολέα MDY-4 είναι 0.35, δηλαδή το ποσοστό της Tf που έχει ενδοκυτταρωθεί είναι 35%. Αυτό σημαίνει ότι ο αναστολέας MDY-4 προκαλεί αναστολή κατά 65%, αρκετά μεγάλο ποσοστό, που μπορεί να θεωρηθεί ένας σχετικά ισχυρός αναστολέας (Εικόνα 30). Εντούτοις, για να υπάρχουν ασφαλή συμπεράσματα και να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα αυτό, θα πρέπει να επαναληφθεί η δοκιμή άλλες τουλάχιστον 2-3 φορές και τα αποτελέσματα που θα προκύψουν να συμφωνούν με το συγκεκριμένο.

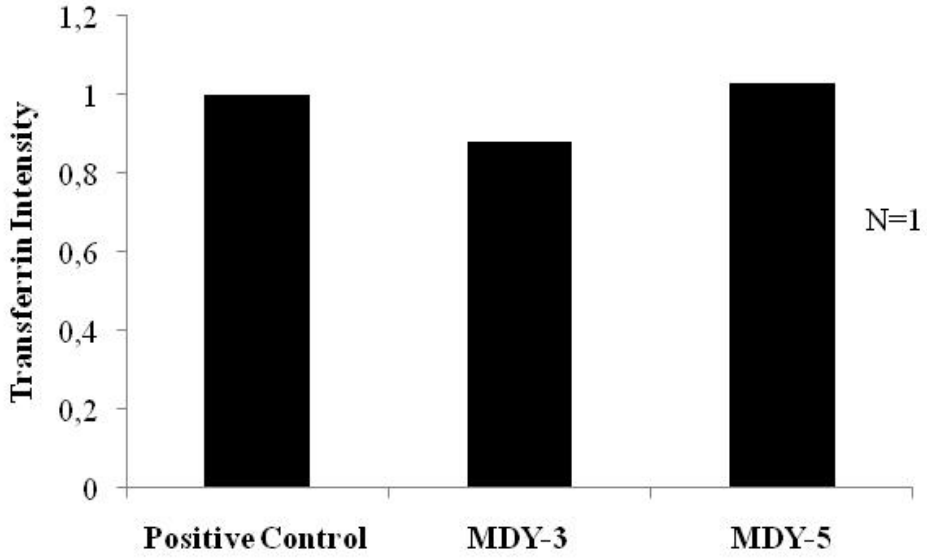
3.1.6 Έλεγχος Αναστολής του Χημικού Αναστολέα MDY-5

Ο χημικός αναστολέας MDY-5, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα, δεν προκαλεί μεγάλη αναστολή. Σαν επιπλέον Control θεωρήθηκε ο αναστολέας MDY-3, ο οποίος είχαμε δει, όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.1.4, ότι προκαλεί αναστολή στην ενδοκυττάρωση της Tf (Εικόνα 31).



Εικόνα 31: ***Ενδοκυττάρωση της Tf χωρίς χρήση αναστολέα (Positive Control) και με χρήση των αναστολέων MDY-3 και MDY-5.*** *Καρκινικά κύτταρα HeLa επωάστηκαν απουσία ορού για 2 ώρες. Στη συνέχεια, επωάστηκαν με DMSO (Positive Control) ή τους αναστολείς MDY-3 και MDY-5 για 30 λεπτά στους 37°C. Έπειτα, επωάστηκαν παρουσία Tf για 2 λεπτά στους 20°C και μετά από τις αντίστοιχες πλύσεις επωάστηκαν για 15 λεπτά στους 37°C. Ακολούθησαν δύο πλύσεις με PBS, μια πλύση με όξινο διάλυμα, μια πλύση με PBS και μονιμοποίηση των κυττάρων. (Μπλε: Πυρήνες, Πράσινο:Tf).*

Παρατηρούμε ότι το σήμα της ενδοκυτταρωμένης Tf είναι παρόμοιο και στο Positive Control και στα δείγματα με τους αναστολείς. Ωστόσο, δεν παρατηρείται έντονο σήμα στο Positive Control, όπως θα αναμενόταν. Έτσι, δεν μπορούμε να συμπεράνουμε με βεβαιότητα ότι οι αναστολείς δεν είχαν ανασταλτική δράση.



Εικόνα 32. ***Ένταση της ενδοκυτταρωμένης Tf χωρίς χρήση αναστολέα (Positive Control) και παρουσία των αναστολέων MDY-3 και MDY-5.*** *Τα αποτελέσματα που απεικονίζονται προέρχονται από N=1 πειράματα.*

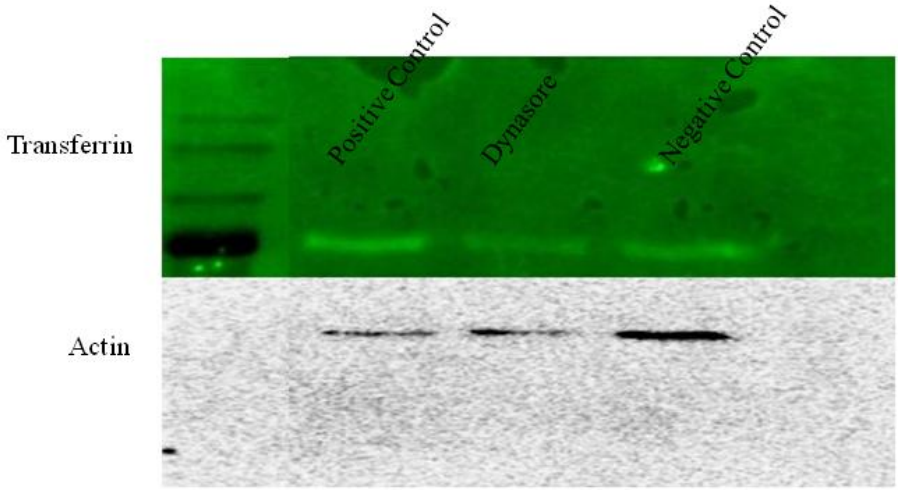
Η παραπάνω εικόνα επιβεβαιώνει όσα παρουσιάζονται ποιοτικά στην Εικόνα 31. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε ότι το MDY-3 αναστέλλει μόνο κατά 12% την ενδοκυττάρωση της Tf, ενώ το MDY-5 φαίνεται να ενδοκυτταρώνει μεγαλύτερη ποσότητα Tf, σε σχέση με το Positive Control (Εικόνα 32). Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε, δεν μπορούμε να ισχυριστούμε ότι το αποτέλεσμα αυτό είναι ασφαλές, καθώς το Positive Control δεν έχει 'δουλέψει' σωστά και επομένως, απαιτούνται επαναλήψεις του συγκεκριμένου πειράματος.

3.2 Έλεγχος του Ποσοστού Αναστολής των Χημικών Αναστολέων με SDS-PAGE

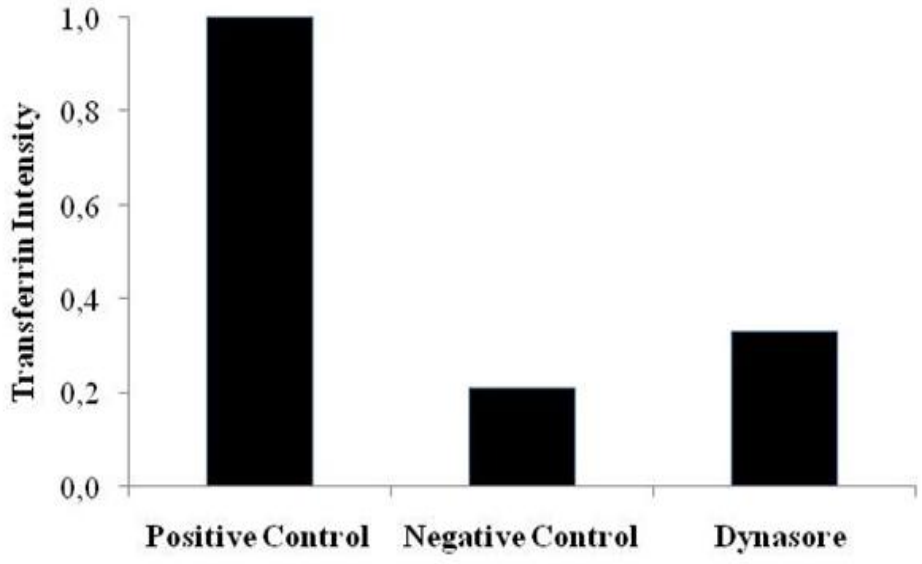
Σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν γίνεται εμφάνιση του σήματος της ακτίνης. Η Tf είναι συζευγμένη με φθοριόχρωμα και μπορούμε να εμφανίσουμε απευθείας το σήμα. Ωστόσο, σε όλα τα πειράματα εμφανίσαμε και το σήμα της ακτίνης, ως έναν εσωτερικό μάρτυρα, ώστε να επιβεβαιώσουμε ότι είχαμε ισοφορτώσει τα δείγματα και είχαμε ισοποσότητες.

3.2.1 Έλεγχος Αναστολής του Χημικού Αναστολέα Dynasore

Αρχικά, πραγματοποιήσαμε 2 ξεχωριστά πειράματα για να ελέγξουμε την αναστολή του γνωστού αναστολέα Dynasore, ώστε να επιβεβαιώσουμε ότι προκαλεί αναστολή της δράσης της δυναμίνης και επομένως, την αναστολή της ενδοκυττάρωσης της Tf. Το σήμα που προέκυψε εμφανίζεται στις παρακάτω εικόνες (Εικόνες 33, 35).



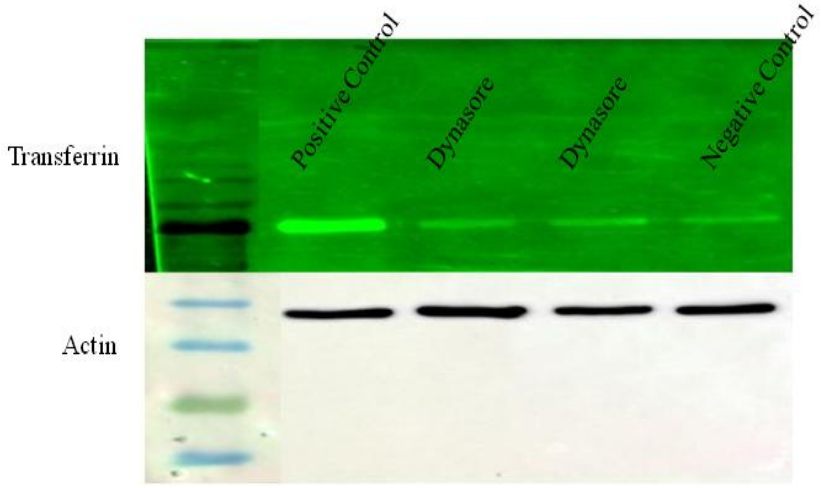
Εικόνα 33. ***Σήμα ενδοκυτταρωμένης Tf.*** *Καρκινικά κύτταρα HeLa επωάστηκαν απουσία ορού για 2 ώρες. Στη συνέχεια, επωάστηκαν με DMSO (Positive Control, Negative Control) ή τον αναστολέα Dynasore για 30 λεπτά στους 37°C. Έπειτα, το Positive Control και το Dynasore επωάστηκαν παρουσία Tf για 2 λεπτά στους 20°C, ενώ το Negative Control παρέμεινε στον πάγο και μετά από τις αντίστοιχες πλύσεις, το Positive Control και το Dynasore επωάστηκαν για 15 λεπτά στους 37°C, ενώ το Negative Control παρέμεινε στον πάγο. Ακολούθησαν δύο πλύσεις με PBS, μια πλύση με όξινο διάλυμα, μια πλύση με PBS, λύση κυττάρων και SDS-PAGE. Η ένταση της κάθε μπάντας αντιπροσωπεύει την Tf που έχει ενδοκυτταρωθεί.*



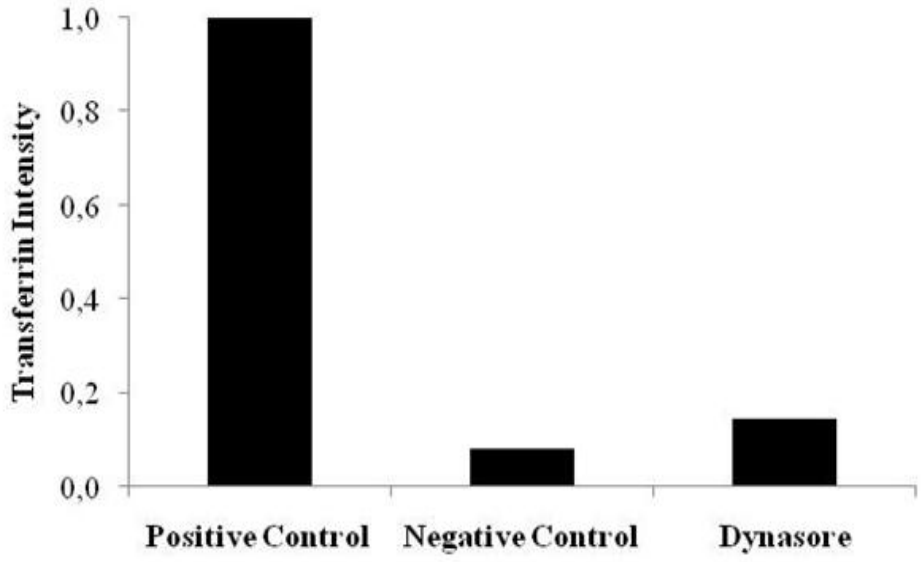
Εικόνα 34. ***Ένταση της ενδοκυτταρωμένης Tf χωρίς χρήση αναστολέα (Positive Control, Negative Control) και με τη χρήση του αναστολέα Dynasore.***

Από την παραπάνω εικόνα παρατηρούμε ότι η Tf που ενδοκυτταρώνεται είναι 33%, δηλαδή το Dynasore προκαλεί αναστολή κατά 67%. Επίσης, η Tf που ενδοκυτταρώνεται στο Negative Control είναι μόλις 21% (Εικόνα 34). Αυτό σημαίνει ότι στους 0°C η Tf δεν ενδοκυτταρώνεται. Το ποσοστό που προκύπτει ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι υπήρχε Tf προσκολλημένη στην κυτταρική επιφάνεια, η οποία δεν απομακρύνθηκε με τις πλύσεις. Τα αποτελέσματα προέκυψαν με τη χρήση του λογισμικού Fiji.

Από το δεύτερο ανεξάρτητο πείραμα προέκυψαν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες (Εικόνες 35, 36).



Εικόνα 35. ***Σήμα ενδοκυτταρωμένης Tf.*** *Καρκινικά κύτταρα HeLa επωάστηκαν απουσία ορού για 2 ώρες. Στη συνέχεια, επωάστηκαν με DMSO (Positive Control, Negative Control) ή τον αναστολέα Dynasore για 30 λεπτά στους 37°C. Έπειτα, το Positive Control και το Dynasore επωάστηκαν παρουσία Tf για 2 λεπτά στους 20°C, ενώ το Negative Control παρέμεινε στον πάγο και μετά από τις αντίστοιχες πλύσεις, το Positive Control και το Dynasore επωάστηκαν για 15 λεπτά στους 37°C, ενώ το Negative Control παρέμεινε στον πάγο. Ακολούθησαν δύο πλύσεις με PBS, μια πλύση με όξινο διάλυμα, μια πλύση με PBS, λύση κυττάρων και SDS-PAGE. Η ένταση της κάθε μπάντας ανιπροσωπεύει την Tf που έχει ενδοκυτταρωθεί.*



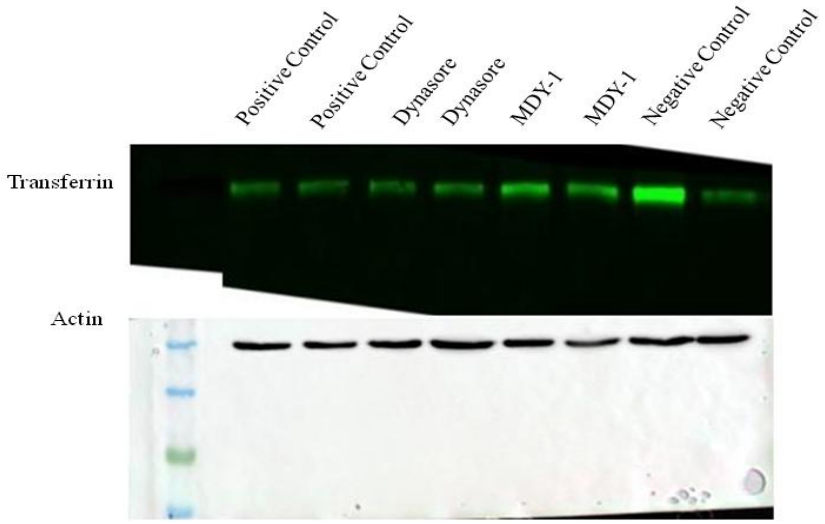
Εικόνα 36. ***Ένταση της ενδοκυτταρωμένης Tf χωρίς χρήση αναστολέα (Positive Control, Negative Control) και με τη χρήση του αναστολέα Dynasore.***

Παρατηρούμε ότι η ένταση της Tf που ενδοκυτταρώνεται παρουσία του αναστολέα Dynasore είναι 0.15. Οπότε, το Dynasore προκαλεί αναστολή κατά 85%, ενώ στο Negative Control η Tf που ενδοκυτταρώνεται είναι μόνο 8% (Εικόνα 36).

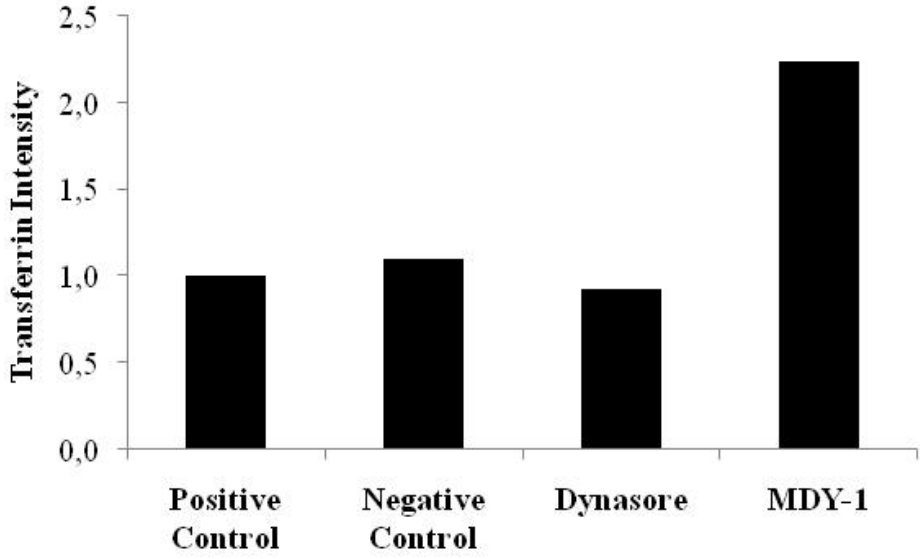
Έχοντας πραγματοποιήσει 2 ξεχωριστά πειράματα και παρατηρώντας ότι τα αποτελέσματα συμφωνούν, μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι το Dynasore είναι ένας ισχυρός αναστολέας της δυναμίνης, προκαλώντας κατά συνέπεια, αναστολή στην ενδοκυττάρωση της Tf. Επιπλέον, επιβεβαιώνεται ότι η Tf δεν ενδοκυτταρώνεται σε πολύ χαμηλή θερμοκρασία, κάτι που φαίνεται από τα αποτελέσματα των Negative Controls.

3.2.2 Έλεγχος Αναστολής του Χημικού Αναστολέα MDY-1

Πραγματοποιήθηκαν 2 ξεχωριστά πειράματα για τον έλεγχο της αναστολής του MDY-1, χρησιμοποιώντας επίσης, το Dynasore ως ένα επιπλέον Control, καθώς είχε επιβεβαιωθεί η αναστολή που προκαλεί. Ωστόσο, όπως φαίνεται από τις παρακάτω εικόνες, το Dynasore, όπως και το Negative Control, δεν εμφανίζουν αναστολή (Εικόνες 37, 38).



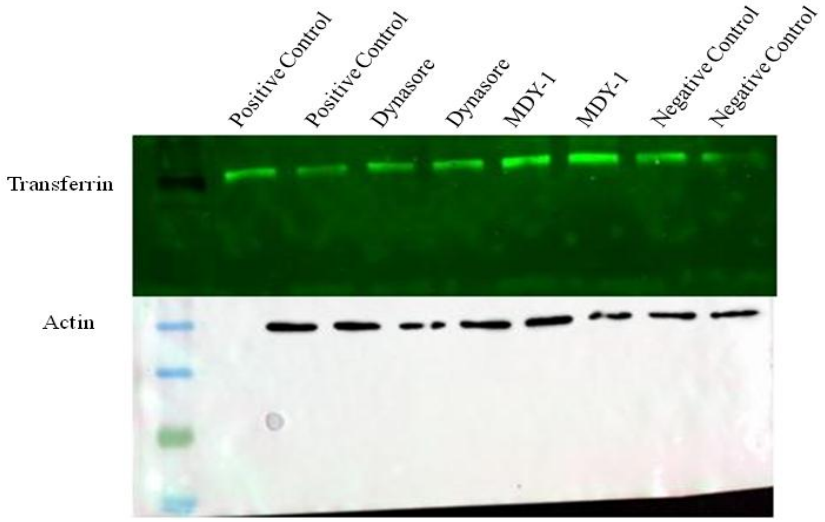
Εικόνα 37. ***Σήμα ενδοκυτταρωμένης Tf.*** *Καρκινικά κύτταρα HeLa επωάστηκαν απουσία ορού για 2 ώρες. Στη συνέχεια, επωάστηκαν με DMSO (Positive Control, Negative Control) ή τον αναστολέα Dynasore ή MDY-1 για 30 λεπτά στους 37°C. Έπειτα, το Positive Control, το Dynasore και το MDY-1 επωάστηκαν παρουσία Tf για 2 λεπτά στους 20°C, ενώ το Negative Control παρέμεινε στον πάγο και μετά από τις αντίστοιχες πλύσεις, το Positive Control, το Dynasore και το MDY-1επωάστηκαν για 15 λεπτά στους 37°C, ενώ το Negative Control παρέμεινε στον πάγο. Ακολούθησαν δύο πλύσεις με PBS, μια πλύση με όξινο διάλυμα, μια πλύση με PBS, λύση κυττάρων και SDS-PAGE. Η ένταση της κάθε μπάντας ανιπροσωπεύει την Tf που έχει ενδοκυτταρωθεί.*



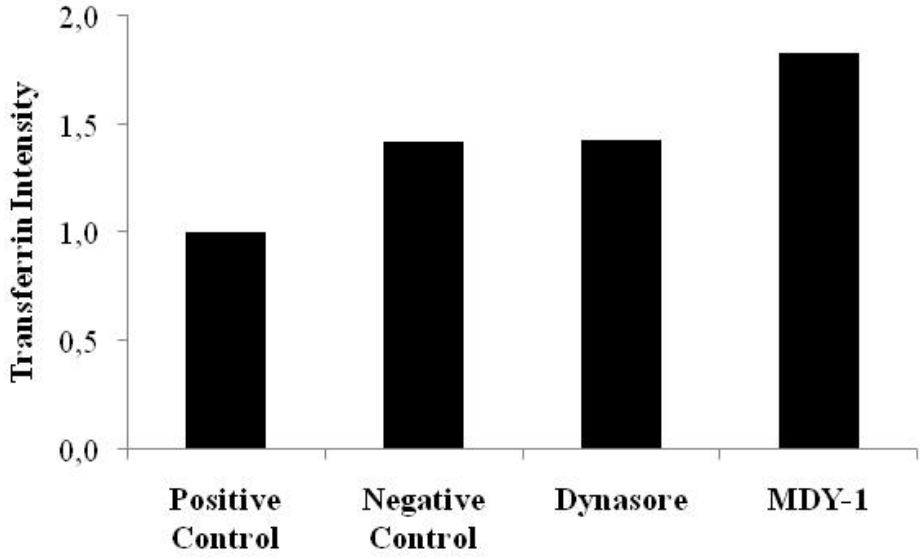
Εικόνα 38. ***Ένταση της ενδοκυτταρωμένης Tf χωρίς χρήση αναστολέα (Positive Control, Negative Control) και με τη χρήση των αναστολέων Dynasore και MDY-1.***

Από τις 2 παραπάνω εικόνες, φαίνεται ότι κανένας από τους δύο αναστολείς δεν έχει αναστείλει την ενδοκυττάρωση της Tf, όπως και ότι η Tf έχει ενδοκυτταρωθεί κανονικά στο δείγμα που παρέμεινε στους 0°C κατά τα στάδια Pulse και Chase. Συγκεκριμένα, από την Εικόνα 38 βλέπουμε ότι παρουσία Dynasore η Tf ενδοκυτταρώθηκε κατά 93%, παρουσία MDY-1 ενδοκυτταρώθηκε κατά 124 φορές παραπάνω σε σύγκριση με το δείγμα απουσία αναστολέα και στο Negative Control ενδοκυτταρώθηκε κατά 10 φορές παραπάνω.

Έχοντας προκύψει αυτά τα αποτελέσματα, πραγματοποιήσαμε το ίδιο πείραμα για να επιβεβαιώσουμε αν το πείραμα έχει δουλέψει ή όχι, καθώς τα αποτελέσματα για το Dynasore δεν συνάδουν με τη βιβλιογραφία, αλλά και ούτε με αυτό που παρουσιάστηκαν στην ενότητα 3.2.1.



Εικόνα 39. ***Σήμα ενδοκυτταρωμένης Tf.*** *Καρκινικά κύτταρα HeLa επωάστηκαν απουσία ορού για 2 ώρες. Στη συνέχεια, επωάστηκαν με DMSO (Positive Control, Negative Control) ή τον αναστολέα Dynasore ή MDY-1 για 30 λεπτά στους 37°C. Έπειτα, το Positive Control, το Dynasore και το MDY-1 επωάστηκαν παρουσία Tf για 2 λεπτά στους 20°C, ενώ το Negative Control παρέμεινε στον πάγο και μετά από τις αντίστοιχες πλύσεις, το Positive Control, το Dynasore και το MDY-1επωάστηκαν για 15 λεπτά στους 37°C, ενώ το Negative Control παρέμεινε στον πάγο. Ακολούθησαν δύο πλύσεις με PBS, μια πλύση με όξινο διάλυμα, μια πλύση με PBS, λύση κυττάρων και SDS-PAGE. Η ένταση της κάθε μπάντας ανιπροσωπεύει την Tf που έχει ενδοκυτταρωθεί.*



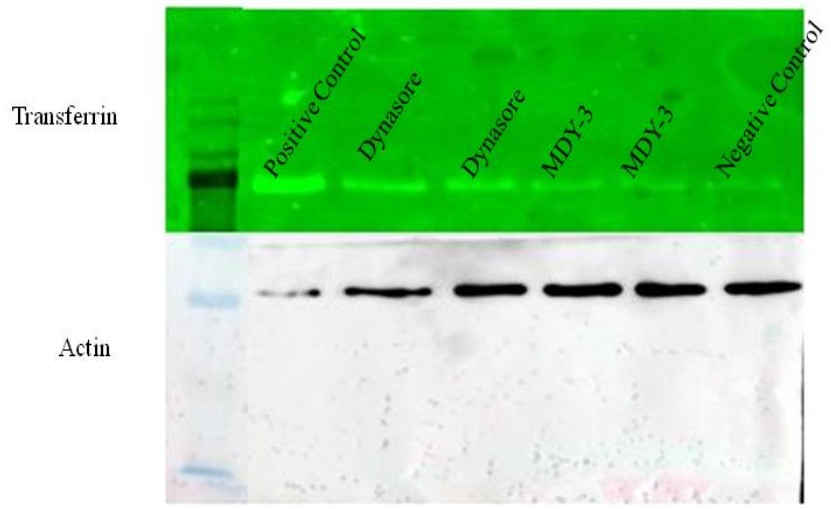
Εικόνα 40. ***Ένταση της ενδοκυτταρωμένης Tf χωρίς χρήση αναστολέα (Positive Control, Negative Control) και με τη χρήση των αναστολέων Dynasore και MDY-1.***

Τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος συμφωνούν με αυτά του προηγούμενου, καθώς παρατηρούμε και εδώ ότι ούτε το Dynasore ούτε το Negative Control ανέστειλαν την ενδοκυττάρωση της Tf. Επίσης, βλέπουμε ότι και ο αναστολέας MDY-1 δεν επέφερε κάποιο θετικό αποτέλεσμα, αφού η Tf ενδοκυτταρώθηκε κατά 83 φορές περισσότερο, σε σχέση με το Positive Control.

3.2.3 Έλεγχος Αναστολής του Χημικού Αναστολέα MDY-3

Αφού παρατηρήσαμε ότι το πείραμα δεν δούλεψε, αποφασίσαμε να κάνουμε τη δοκιμή του αναστολέα MDY-3 σε κύτταρα HUVEC.

Όπως παρουσιάζεται από τις παρακάτω εικόνες, φαίνεται ότι ο αναστολέας MDY-3 αναστέλλει σε μεγάλο βαθμό την ενδοκυττάρωση της Tf. Το Dynasore χρησιμοποιήθηκε και σε αυτό το πείραμα ως ένα επιπλέον Control (Εικόνες 41, 42).

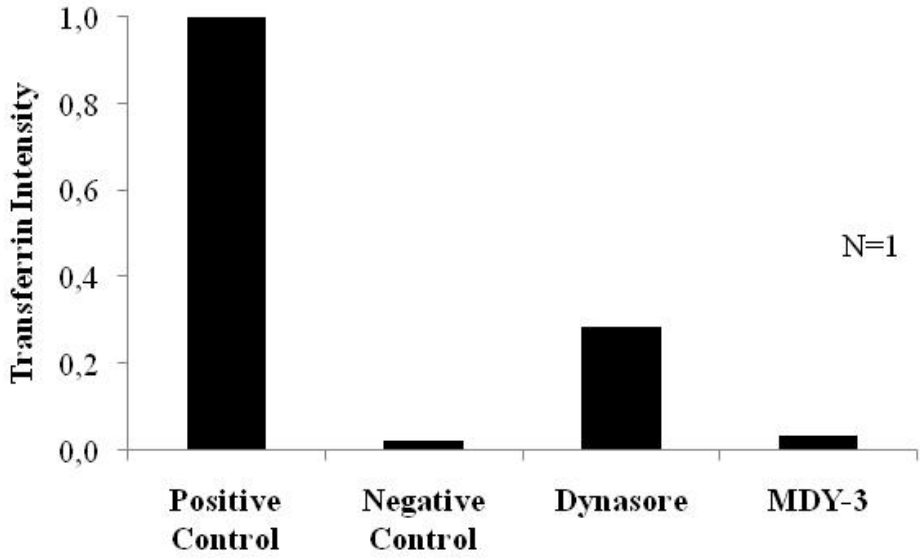


Εικόνα 41. ***Σήμα ενδοκυτταρωμένης Tf.*** *Επιθηλιακά κύτταρα HUVEC επωάστηκαν απουσία ορού για 2 ώρες. Στη συνέχεια, επωάστηκαν με DMSO (Positive Control, Negative Control) ή τον αναστολέα Dynasore ή MDY-3 για 30 λεπτά στους 37°C. Έπειτα, το Positive Control, το Dynasore και το MDY-3 επωάστηκαν παρουσία Tf για 2 λεπτά στους 20°C, ενώ το Negative Control παρέμεινε στον πάγο και μετά από τις αντίστοιχες πλύσεις, το Positive Control, το Dynasore και το MDY-3 επωάστηκαν για 15 λεπτά στους 37°C, ενώ το Negative Control παρέμεινε στον πάγο. Ακολούθησαν δύο πλύσεις με PBS, μια πλύση με όξινο διάλυμα, μια πλύση με PBS, λύση κυττάρων και SDS-PAGE. Η ένταση της κάθε μπάντας ανιπροσωπεύει την Tf που έχει ενδοκυτταρωθεί.*

Από την παραπάνω εικόνα είναι εμφανές ότι και το Dynasore και το MDY-3 προκαλούν μεγάλη αναστολή στην ενδοκυττάρωση της Tf, ενώ στο Negative Control δεν υπάρχει σχεδόν καθόλου ενδοκυτταρωμένη Tf (Εικόνα 41).

Η ακτίνη εμφανίζει μικρότερη ποσότητα φόρτωσης από το δείγμα Positive Control κατά τη διαδικασία SDS-PAGE, κάτι που επιβεβαιώνει την ισχυρή αναστολή των δύο ανατολέων, καθώς, παρ' ότι στην εμφάνιση του σήματος της Tf η μπάντα που εμφανίζεται είναι ήδη έντονη, σε συνδυασμό με το σήμα που δίνει η εμφάνιση της ακτίνης ενισχύει το γεγονός ότι οι αναστολείς ήταν αποτελεσματικοί (Εικόνα 41).

Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Fiji και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.

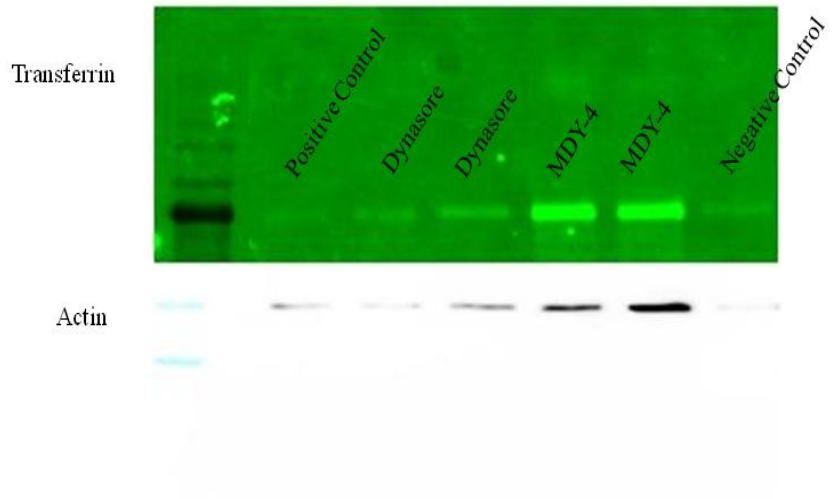


Εικόνα 42. ***Ένταση της ενδοκυτταρωμένης Tf χωρίς χρήση αναστολέα (Positive Control, Negative Control) και με τη χρήση των αναστολέων Dynasore και MDY-3.*** *Τα αποτελέσματα που απεικονίζονται προέρχονται από N=1 πειράματα.*

Η αναστολή που προκαλεί το Dynasore είναι 71%, ενώ ο αναστολέας MDY-3 αναστέλλει την ενδοκυττάρωση της Tf 96%, κατατάσσοντας τον έναν ισχυρό αναστολέα. Στο Negative Control το ποσοστό της ενδοκυτταρωμένης Tf είναι μόνο 2% (Εικόνα 42).

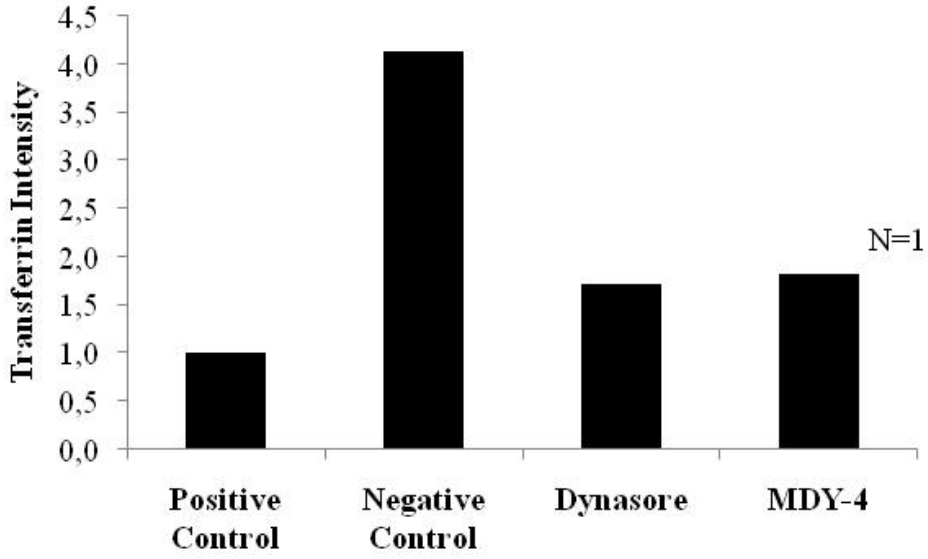
3.2.4 Έλεγχος Αναστολής του Χημικού Αναστολέα MDY-4

Το πείραμα που πραγματοποιήθηκε, σε κύτταρα HUVEC, για τον έλεγχο της αναστολής που προκαλεί το MDY-4 φαίνεται να μην έχει λειτουργήσει, καθώς παρατηρούμε ότι το Dynasore δεν αναστέλλει την ενδοκυττάρωση της Tf (Εικόνες 43, 44).



Εικόνα 43. ***Σήμα ενδοκυτταρωμένης Tf.*** *Επιθηλιακά κύτταρα HUVEC επωάστηκαν απουσία ορού για 2 ώρες. Στη συνέχεια, επωάστηκαν με DMSO (Positive Control, Negative Control) ή τον αναστολέα Dynasore ή MDY-4 για 30 λεπτά στους 37°C. Έπειτα, το Positive Control, το Dynasore και το MDY-4 επωάστηκαν παρουσία Tf για 2 λεπτά στους 20°C, ενώ το Negative Control παρέμεινε στον πάγο και μετά από τις αντίστοιχες πλύσεις, το Positive Control, το Dynasore και το MDY-4 επωάστηκαν για 15 λεπτά στους 37°C, ενώ το Negative Control παρέμεινε στον πάγο. Ακολούθησαν δύο πλύσεις με PBS, μια πλύση με όξινο διάλυμα, μια πλύση με PBS, λύση κυττάρων και SDS-PAGE. Η ένταση της κάθε μπάντας ανιπροσωπεύει την Tf που έχει ενδοκυτταρωθεί.*

Από το σήμα της Tf και της ακτίνης που παρουσιάζονται στην παραπάνω εικόνα, φαίνεται ότι δεν έχει λειτουργήσει κανένας από τους 2 αναστολείς, αλλά ούτε το Negative Control. Από την εμφάνιση του σήματος της Tf για το Negative Control δεν είναι έντονο το σήμα, αλλά από την ακτίνη φαίνεται ότι η φόρτωση αυτών των δειγμάτων ήταν σημαντικά μικρότερη συγκριτικά με τα υπόλοιπα (Εικόνα 43).



Εικόνα 44. ***Ένταση της ενδοκυτταρωμένης Tf χωρίς χρήση αναστολέα (Positive Control,Negative Control) και με τη χρήση των αναστολέων Dynasore και MDY-4.*** *Τα αποτελέσματα που απεικονίζονται προέρχονται από N=1 πειράματα.*

Η Tf που ενδοκυτταρώνεται παρουσία των αναστολέων Dynasore και MDY-4 είναι 72 και 83 φορές αντίστοιχα, από την Tf που ενδοκυτταρώνεται στο Positive Control. Μεγάλη διαφορά όμως, παρατηρείται στο Negative Control, το οποίο ενδοκυτταρώνει την Tf κατά 4 φορές περισσότερο, σε σύγκριση με το Positive Control (Εικόνα 44).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η εγκαθίδρυση δοκιμασίας μελέτης της ενδοκυττάρωσης που ελέγχεται από την κλαθρίνη, με στόχο την εύρεση του ποσοστού αναστολής της ενδοκυττάρωσης της Tf διαφορετικών χημικών αναστολέων (Dynasore-like). Για την αξιολόγηση της αναστολής τους εγκαθιδρύσαμε το πρωτόκολλο 'Pulse-chase', βασιζόμενοι στη δημοσίευση των Macia et al., και για τον έλεγχο του ποσοστού αναστολής κάθε χημικού αναστολέα, χρησιμοποιήσαμε τον ανοσοφθορισμό και το SDS-PAGE.

Παρόλο που ο ανασοφθορισμός θεωρείται ως ασφαλής και ποσοτική μέθοδος, είναι χρονοβόρα και απαιτεί αυστηρότητα και ιδιαίτερη προσοχή καθ' όλη τη διαδικασία των πειραμάτων. Για το λόγο αυτό, προσπαθήσαμε να εγκαθιδρύσουμε τη δοκιμασία μελέτης με SDS-PAGE. Ωστόσο, όπως φαίνεται και παραπάνω στα αποτελέσματα, διακρίνεται από διακυμάνσεις, χωρίς να δίνει τη δυνατότητα ασφαλών συμπερασμάτων.

Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν καρκινικά κύτταρα HeLa, εκτός από δύο πειράματα, στα οποία χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC. Τα HUVEC χρησιμοποιήθηκαν στη δοκιμασία μελέτης με SDS-PAGE για τους αναστολείς MDY-3 και MDY-4, καθώς υπήρχαν διακυμάνσεις και θελήσαμε να επιβεβαιώσουμε ότι δεν οφείλονται στην κυτταρική σειρά που χρησιμοποιούσαμε.

Αρχικά, ελέγξαμε την αναστολή του Dynasore, γνωστός και επιβεβαιωμένος αναστολέας της δράσης της δυναμίνης και κατ' επέκταση της ενδοκυττάρωσης της Tf, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το οποίο αποτέλεσε σημείο αναφοράς για την αξιολόγηση των υπό μελέτη χημικών αναστολέων. Στα πειράματα ανοσοφθορισμού παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του σήματος της ενδοκυτταρωμένης Tf (Εικόνα 20), με το ποσοστό αναστολής να ανέρχεται στο 36% (Εικόνα 21).

Ωστόσο, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση με SDS-PAGE ήταν ακόμη πιο έντονα (Εικόνες 33, 35). Πραγματοποιώντας δύο ανεξάρτητα πειράματα, είδαμε ότι το ποσοστό της αναστολής που προκαλεί το Dynasore είναι 67% και 85% αντίστοιχα (Εικόνες 34, 36). Το γεγονός ότι τα αποτελέσματα των δύο πειραμάτων συμφωνούν, ενισχύει την αξιοπιστία τους.

Όσον αφορά τον αναστολέα MDY-1, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού, δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση (Εικόνα 22). Αντιθέτως, το

ποσοστό της ενδοκυτταρωμένης Tf ήταν κατά 52% μεγαλύτερο από αυτό του Positive Control (Εικόνα 23). Ωστόσο, το Positive Control δεν εμφάνισε έντονο σήμα έτσι όπως αναμενόταν, καθώς δεν χρησιμοποιήθηκε κάποιος αναστολέας και η Tf θα έπρεπε να ενδοκυτταρωθεί πλήρως. Συνεπώς, το αποτέλεσμα δεν μπορεί να θεωρηθεί επαρκές για την αποτελεσματικότητα του αναστολέα MDY-1.

Για τον έλεγχο της αναστολής του MDY-1 με τη μέθοδο SDS-PAGE, πραγματοποιήθηκαν δύο ξεχωριστά πειράματα, τα οποία εμφάνισαν αυξημένο σήμα, όπως και τα Negative Controls (Εικόνες 37, 39), τα οποία χρησιμοποιούνται για να επιβεβαιωθεί το γεγονός ότι η Tf δεν ενδοκυτταρώνεται σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες. Αλλά, ούτε το Dynasore εμφάνισε την αναμενόμενη αναστολή, παρόλο που σε προηγούμενα πειράματα είχε χαρακτηριστεί ως αποτελεσματικός αναστολέας της ενδοκυττάρωσης της Tf. Η ασυμφωνία αυτή αποτελεί ένδειξη ότι δεν μπορούμε να καταλήξουμε σε ασφαλές συμπέρασμα για τη δράση του αναστολέα MDY-1.

Η αξιολόγηση του αναστολέα MDY-2 έγινε μόνο με τη μέθοδο ανοσοφθορισμού (Εικόνα 24). Ούτε και το MDY-2 εμφάνισε κάποια αναστολή (Εικόνα 25), γεγονός που αποδόθηκε στο ότι η Tf είχε προσδεθεί μη-ειδικά (Εικόνα 26) και από το λογισμικό λαμβανόταν ως σήμα. Ακόμη, τα πεδία που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση ήταν μόνο 16, λόγω αυτών των μη-ειδικών σημάτων, κάτι που αντιστοιχεί σε μικρό αριθμό κυττάρων και συνεπώς, εξαγωγή μη ασφαλών αποτελεσμάτων.

Το πείραμα ανοσοφθορισμού για τον αναστολέα MDY-3 έδειξε ότι προκαλεί αναστολή κατά 31%, ενώ και το Dynasore, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως επιπλέον Control, ανέστειλε την ενδοκυττάρωση της Tf κατά 48% (Εικόνες 27, 28). Ωστόσο, τα αποτελέσματα προέρχονται από N=1 ανεξάρτητα πειράματα, γεγονός που περιορίζει τη δυνατότητα για εξαγωγή ασφαλών αποτελεσμάτων.

Η μέθοδος SDS-PAGE για τον έλεγχο του ίδιου αναστολέα, παρουσίασε μεγάλη ανασταλτική δράση, η οποία ανέρχεται στο 96%, ενώ ταυτόχρονα το Dynasore παρουσίασε αναστολή 71%. Στο ίδιο πείραμα επιβεβαιώθηκε ότι η Tf δεν ενδοκυτταρώνεται στους 0°C, καθώς εμφάνισε ενδοκυττάρωση κατά μόνο 2% (Εικόνες 41, 42), το οποίο μπορεί να οφείλεται σε δεσμευμένη στην κυτταρική επιφάνεια Tf, η οποία δεν απομακρύνθηκε με τις πλύσεις.

Παρόλο που οι δύο μέθοδοι παρουσίασαν συμφωνία και έδειξαν ότι συγκλίνουν στο ίδιο αποτέλεσμα, το ποσοστό αναστολής που προέκυψε για το MDY-3 μεταξύ των δύο μεθόδων διέφερε σημαντικά, το οποίο πρέπει να ληφθεί υπόψη.

Τα αποτελέσματα για την ανασταλτική δράση του MDY-4 που προέκυψαν από τον ανοσοφθορισμό ήταν θετικά. Φαίνεται ότι ο συγκεκριμένος αναστολέας προκαλεί αναστολή της τάξης του 65%, κατατάσσοντας τον έναν ικανοποιητικό αναστολέα (Εικόνες 29, 30). Εντούτοις, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν τουλάχιστον 2-3 επιπλέον πειράματα, ώστε να δούμε ότι τα αποτελέσματα είναι επαναλήψιμα για να αποφανθούμε με βεβαιότητα ότι πρόκειται για έναν ισχυρό αναστολέα.

Αντίθετα, η αξιολόγηση του αναστολέα MDY-4 με SDS-PAGE δεν παρείχε τα ίδια αποτελέσματα. Το MDY-4 δεν παρουσίασε ανασταλτική δράση, αλλά και το Dynasore, όπως και το Negative Control, δεν εμφάνισαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα (Εικόνες 43, 44). Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το πείραμα δεν λειτούργησε και επομένως, δε μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τα αποτελέσματα αυτά για επιβεβαίωση ή απόρριψη της ανασταλτικής δράσης του MDY-4.

Τέλος, αξιολογήθηκε ο αναστολέας MDY-5, μόνο με τη μέθοδο ανοσοφθορισμού. Δεν εμφάνισε κάποια ανασταλτική δράση (Εικόνες 31, 32), χωρίς να είναι ασφαλές το συμπέρασμα αυτό. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι το Positive Control δεν εμφάνισε το αναμενόμενο έντονο σήμα.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις δύο μεθόδους αξιολόγησης αναδεικνύουν τόσο τη χρησιμότητά τους όσο και τους περιορισμούς τους. Περιορισμοί, όπως ανεπαρκής αριθμός κυττάρων, εμφάνιση μη-ειδικού σήματος ή μη ικανοποιητικός αριθμός ανεξάρτητων πειραμάτων, μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τον ανοσοφθορισμό. Αντίστοιχα, η σωστή φόρτωση των δειγμάτων και η αξιοπιστία των Controls στη μέθοδο SDS-PAGE, μπορούν να οδηγήσουν σε λανθασμένα αποτελέσματα.

Συνεπώς, μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να επικεντρωθούν, σε πρώτο στάδιο, στη βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου, με στόχο τη μείωση της πειραματικής μεταβλητότητας και την αύξηση της επαναληψιμότητας των πειραμάτων.

Επιπλέον, σημαντικό είναι να πραγματοποιηθούν 2-3 ανεξάρτητα πειράματα, ιδιαιτέρως για τους αναστολείς MDY-3 και MDY-4, οι οποίοι παρουσίασαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Με τον τρόπο αυτό, θα επιτραπεί η στατιστική ανάλυση και η αξιολόγηση της αναπαραγωγιμότητας των παρατηρούμενων ποσοστών αναστολής.

Ιδιαίτερη σημασία θα είχε και η επιβεβαίωση της ανασταλτικής δράσης των συγκεκριμένων χημικών μορίων με μια διαφορετική πειραματική προσέγγιση. Η παράλληλη αξιολόγηση των αναστολέων με διαφορετικές μεθόδους θα ενίσχυε την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων και θα μπορούσε να διευκρινίσει τις διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ ανοσοφθορισμού και SDS-PAGE. Ακόμη, η διεύρυνση της ειδικότητας των αναστολέων σε διαφορετικές μορφές ενδοκυττάρωσης θα μπορούσε να συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού δράσης τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[1] Vaghari-Tabari, M., Ferns, G. A., Qujeq, D., Nosrati Andevari, A., Sabahi, Z., & Moein, S. (2021). Signaling, metabolism, and cancer: An important relationship for therapeutic intervention. *Journal of Cellular Physiology, 236*(7), 4693–4705. https://doi.org/10.1002/jcp.30276

[2] Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians, 68*(1), 7–30. https://doi.org/10.3322/caac.21442

[3] Roy, P. S., & Saikia, B. J. (2016). Cancer and cure: A critical analysis. *Indian Journal of Cancer, 53*(3), 441–442. https://doi.org/10.4103/0019-509X.200658

[4] Iranzo, J., Martincorena, I., & Koonin, E. V. (2018). Cancer-mutation network and the number and specificity of driver mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 115*(26), E6010–E6019. https://doi.org/10.1073/pnas.1800045115

[5] Zhu, K., Liu, Q., Zhou, Y., Tao, C., Zhao, Z., Sun, J., & Xu, H. (2015). Oncogenes and tumor suppressor genes: Comparative genomics and network perspectives. *BMC Genomics, 16*(Suppl. 7), S8. https://doi.org/10.1186/1471-2164-16-S7-S8

[6] Torgovnick, A., & Schumacher, B. (2015). DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. *Frontiers in Genetics, 6*, 157. https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00157

[7] Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell, 144*(5), 646–674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013

[8] Martin, G. S. (2003). Cell signaling and cancer. *Cancer Cell, 4*(3), 167–174. https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00275-8

[9] Porta, C., Paglino, C., & Mosca, A. (2014). Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Frontiers in Oncology, 4*, 64. https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00064

[10] Sawyers, C. L. (2004). Targeted cancer therapy. *Nature, 432*(7015), 294–297. https://doi.org/10.1038/nature03095

[11] Szewczyk-Roszczenko, O. K., Roszczenko, P., Shmakova, A., Finiuk, N., Holota, S., Lesyk, R., Bielawska, A., Vassetzky, Y., & Bielawski, K. (2023). The chemical inhibitors of endocytosis: From mechanisms to potential clinical applications. *Cells, 12*(18), 2312. https://doi.org/10.3390/cells12182312

[12] Sorkin, A. (2004). Cargo recognition during clathrin-mediated endocytosis: A team effort. *Current Opinion in Cell Biology, 16*(4), 392–399. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.06.005

[13] Khan, I., & Steeg, P. S. (2021). Endocytosis: A pivotal pathway for regulating metastasis. *British Journal of Cancer, 124*(1), 66–75. https://doi.org/10.1038/s41416-020-01102-3

[14] Sorkin, A., & von Zastrow, M. (2009). Endocytosis and signalling: Intertwining molecular networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology, 10*, 609–622. https://doi.org/10.1038/nrm2748

[15] Pelkmans, L., & Zerial, M. (2005). Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature, 436*(7047), 128–133. https://doi.org/10.1038/nature03866

[16] Richter, T., Floetenmeyer, M., Ferguson, C., Galea, J., Goh, J., Lindsay, M. R., Morgan, G. P., Marsh, B. J., & Parton, R. G. (2008). High-resolution 3D quantitative analysis of caveolar ultrastructure and caveola–cytoskeleton interactions. *Traffic, 9*(6), 893–909. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00733.

[17] Gundu, C., Arruri, V. K., Yadav, P., Navik, U., Kumar, A., Amalkar, V. S., Vikram, A., & Gaddam, R. R. (2022). Dynamin-independent mechanisms of endocytosis and receptor trafficking. *Cells, 11*(16), 2557. https://doi.org/10.3390/cells11162557

[18] Grassart, A., Dujeancourt, A., Lazarow, P. B., Dautry-Varsat, A., & Sauvonnet, N. (2008). Clathrin-independent endocytosis used by the IL-2 receptor is regulated by Rac1, Pak1 and Pak2. *EMBO Reports, 9*(4), 356–362. https://doi.org/10.1038/embor.2008.27

[19] Marion, S., Mazzolini, J., Herit, F., Bourdoncle, P., Kambou-Pene, N., Hailfinger, S., Sachse, M., Ruland, J., Benmerah, A., & Echard, A. (2012). The NF-κB signaling protein Bcl10 regulates actin dynamics by controlling AP1- and OCRL-bearing vesicles. *Developmental Cell, 23*(5), 954–967. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.09.012

[20] Masters, T. A., Pontes, B., Viasnoff, V., Li, Y., & Gauthier, N. C. (2013). Plasma membrane tension orchestrates membrane trafficking, cytoskeletal remodeling, and biochemical signaling during phagocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110*(30), 11875–11880. https://doi.org/10.1073/pnas.1305045110

[21] Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annual Review of Biochemistry, 78*, 857–902. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540

[22] Kaksonen, M., & Roux, A. (2018). Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology, 19*(5), 313–326. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.132

[23] Mettlen, M., Chen, P. H., Srinivasan, S., Danuser, G., & Schmid, S. L. (2018). Regulation of clathrin-mediated endocytosis. *Annual Review of Biochemistry, 87*, 871–896. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012644

[24] Hoppe, A. D., et al. (2018). Membrane bending occurs at all stages of clathrin-coat assembly and defines endocytic dynamics. *Nature Communications, 9*, 419. https://doi.org/10.1038/s41467-018-02818-8

[25] Smith, S. M., & Smith, C. J. (2022). Capturing the mechanics of clathrin-mediated endocytosis. *Current Opinion in Structural Biology, 75*, 102427. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102427

[26] Djakbarova, U., Madraki, Y., Chan, E. T., & Kural, C. (2021). Dynamic interplay between cell membrane tension and clathrin-mediated endocytosis. *Biology of the Cell, 113*(8), 344–373. https://doi.org/10.1111/boc.202000110

[27] Liu, J. (2024). Roles of membrane mechanics-mediated feedback in membrane traffic. *Current Opinion in Cell Biology, 89*, 102401. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2024.102401

[28] Akamatsu, M., Vasan, R., Serwas, D., Ferrin, M. A., Rangamani, P., & Drubin, D. G. (2020). Principles of self-organization and load adaptation by the actin cytoskeleton during clathrin-mediated endocytosis. *eLife, 9*, e49840. https://doi.org/10.7554/eLife.49840

[29] Prichard, K. L., O'Brien, N. S., Murcia, S. R., Baker, J. R., & McCluskey, A. (2022). Role of clathrin and dynamin in clathrin mediated endocytosis/synaptic vesicle recycling and implications in neurological diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience, 15*, 754110. https://doi.org/10.3389/fncel.2021.754110

[30] Ramachandran, R., & Schmid, S. L. (2018). The dynamin superfamily. *Current Biology, 28*(8), R411–R416. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.12.013

[31] Praefcke, G. J. K., & McMahon, H. T. (2004). The dynamin superfamily: Universal membrane tubulation and fission molecules? *Nature Reviews Molecular Cell Biology, 5*(2), 133–147. https://doi.org/10.1038/nrm1313

[32] Kong, L., Sochacki, K. A., Wang, H., Fang, S., Canagarajah, B., Kehr, A. D., et al. (2018). Cryo-EM of the dynamin polymer assembled on lipid membrane. *Nature, 560*(7720), 258–262. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0378-6

[33] Jimah, J. R., & Hinshaw, J. E. (2019). Structural insights into the mechanism of dynamin superfamily proteins. *Trends in Cell Biology, 29*(3), 257–273. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.11.003

[34] Chanaday, N. L., Cousin, M. A., Milosevic, I., Watanabe, S., & Morgan, J. R. (2019). The synaptic vesicle cycle revisited: New insights into the modes and mechanisms. *The Journal of Neuroscience, 39*(42), 8209–8216. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1158-19.2019

[35] Renard, H. F., & Boucrot, E. (2021). Unconventional endocytic mechanisms. *Current Opinion in Cell Biology, 71*, 120–129. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2021.03.001

[36] Kawabata, H. (2019). Transferrin and transferrin receptors update. *Free Radical Biology and Medicine, 133*, 46–54.

[37] Knoll, A. H., & Nowak, M. A. (2017). The timetable of evolution. *Science Advances, 3*(5), e1603076. https://doi.org/10.1126/sciadv.1603076

[38] Tortorella, S., & Karagiannis, T. C. (2014). Transferrin receptor-mediated endocytosis: A useful target for cancer therapy. *Journal of Membrane Biology, 247*, 291–307. https://doi.org/10.1007/s00232-014-9637-0

[39] Gomme, P. T., McCann, K. B., & Bertolini, J. (2005). Transferrin: Structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discovery Today, 10*(4), 267–273.

[40] Princiotto, J. V., & Zapolski, E. J. (1976). Functional heterogeneity and pH-dependent dissociation properties of human transferrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure, 428*(3), 766–771.

[41] Mayle, K. M., Le, A. M., & Kamei, D. T. (2012). The intracellular trafficking pathway of transferrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1820*(3), 264–281.

[42] Lakadamyali, M., Rust, M. J., & Zhuang, X. (2006). Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. *Cell, 124*(5), 997–1009. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.037

[43] Ohgami, R. S., Campagna, D. R., Greer, E. L., Antiochos, B., McDonald, A., Chen, J., Sharp, J. J., Fujiwara, Y., Barker, J. E., & Fleming, M. D. (2005). Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron

uptake in erythroid cells. *Nature Genetics, 37*(11), 1264–1269. https://doi.org/10.1038/ng1658

[44] Andrews, N. C. (1999). The iron transporter DMT1. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 31*(10), 991–994. https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00064-5

[45] Tabuchi, M., Yoshimori, T., Yamaguchi, K., Yoshida, T., & Kishi, F. (2000). Human NRAMP2/DMT1, which mediates iron transport across endosomal membranes, is localized to late endosomes and lysosomes in HEp-2 cells. *Journal of Biological Chemistry, 275*(29), 22220–22228. https://doi.org/10.1074/jbc.M000864200

[46] De Domenico, I., McVey Ward, D., & Kaplan, J. (2008). Regulation of iron acquisition and storage: Consequences for iron-linked disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology, 9*(1), 72–81. https://doi.org/10.1038/nrm2295

[47] Kawabata, H., Yang, R., Hirama, T., Vuong, P. T., Kawano, S., Gombart, A. F., & Koeffler, H. P. (1999). Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *Journal of Biological Chemistry, 274*(30), 20826–20832. https://doi.org/10.1074/jbc.274.30.20826

[48] Deaglio, S., Capobianco, A., Cali, A., Bellora, F., Alberti, F., Righi, L., Sapino, A., Camaschella, C., & Malavasi, F. (2002). Structural, functional, and tissue distribution analysis of human transferrin receptor-2 by murine monoclonal antibodies and a polyclonal antiserum. *Blood, 100*(10), 3782–3789. https://doi.org/10.1182/blood.V100.10.3782

[49] Roetto, A., Di Cunto, F., Pellegrino, R. M., Hirsch, E., Azzolino, O., Bondi, A., Defilippi, I., Carturan, S., Miniscalco, B., Riondato, F., Cilloni, D., Silengo, L., Altruda, F., Camaschella, C., & Saglio, G. (2010). Comparison of 3 Tfr2-deficient murine models suggests distinct functions for Tfr2-alpha and Tfr2-beta isoforms in different tissues. *Blood, 115*(16), 3382–3389. https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-239095

[50] Boero, M., Pagliaro, P., Tullio, F., Pellegrino, R. M., Palmieri, A., Ferbo, L., Saglio, G., De Gobbi, M., Penna, C., & Roetto, A. (2015). A comparative study of myocardial molecular phenotypes of two Tfr2beta null mice: Role in ischemia/reperfusion. *BioFactors, 41*(5), 360–371.

[51] Kawabata, H., Germain, R. S., Vuong, P. T., Nakamaki, T., Said, J. W., & Koeffler, H. P. (2000). Transferrin receptor 2-alpha supports cell growth both in iron-

chelated cultured cells and in vivo. *Journal of Biological Chemistry, 275*(22), 16618–16625. https://doi.org/10.1074/jbc.275.22.16618

[52] Manning, B. D., & Toker, A. (2017). AKT/PKB signaling: Navigating the network. *Cell, 169*(3), 381–405. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001

[53] Liang, J., Zubovitz, J., Petrocelli, T., Kotchetkov, R., Connor, M. K., Han, K., Lee, J. H., Ciarallo, S., Catzavelos, C., Beniston, R., Franssen, E., & Slingerland, J. M. (2002). PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nature Medicine, 8*, 1153–1160. https://doi.org/10.1038/nm761

[54] Rossig, L., Jadidi, A. S., Urbich, C., Badorff, C., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2001). Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Molecular and Cellular Biology, 21*(16), 5644–5657. https://doi.org/10.1128/MCB.21.16.5644-5657

[55] Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., & Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell, 91*(2), 231–241. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80405-5

[56] Gottlieb, T. M., Leal, J. F., Seger, R., Taya, Y., & Oren, M. (2002). Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: Possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene, 21*, 1299–1303. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205179

[57] Ogawara, Y., Kishishita, S., Obata, T., Isazawa, Y., Suzuki, T., Tanaka, K., Masuyama, N., & Gotoh, Y. (2002). Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *The Journal of Biological Chemistry, 277*(24), 21843–21850. https://doi.org/10.1074/jbc.M109745200

[58] Soleimani, A., Rahmani, F., Saeedi, N., Ghaffarian, R., Khazaei, M., Ferns, G. A., Avan, A., & Hassanian, S. M. (2019). The potential role of regulatory microRNAs of RAS/MAPK signaling pathway in the pathogenesis of colorectal cancer. *Journal of Cellular Biochemistry, 120*(11), 19245–19253.

[59] Luke, J. J., Ott, P. A., & Shapiro, G. I. (2014). The biology and clinical development of MEK inhibitors for cancer. *Drugs, 74*(18), 2111–2128. https://doi.org/10.1007/s40265-014-0309-0

[60] Dang, C. V. (2012). MYC on the path to cancer. *Cell, 149*(1), 22–35. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.003

[61] Maertens, O., & Cichowski, K. (2014). An expanding role for RAS GTPase activating proteins (RAS GAPs) in cancer. *Advances in Biological Regulation, 55*, 1–14. https://doi.org/10.1016/j.jbior.2014.01.002

[62] Pai, S. G., Carneiro, B. A., Mota, J. M., Costa, R., Leite, C. A., Barroso-Sousa, R., Kaplan, J. B., Chae, Y. K., & Giles, F. J. (2017). Wnt/beta-catenin pathway: Modulating anticancer immune response. *Journal of Hematology & Oncology, 10*, 101. https://doi.org/10.1186/s13045-017-0471-6

[63] Voskas, D., Ling, L. S., & Woodgett, J. R. (2010). Does GSK-3 provide a shortcut for PI3K activation of Wnt signalling? *F1000 Biology Reports, 2*, 82. https://doi.org/10.3410/B2-82

[64] Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C., & Kirchhausen, T. (2006). Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Developmental Cell, 10*(6), 839–850. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.04.002

[65] Preta, G., Cronin, J. G., & Sheldon, I. M. (2015). Dynasore—not just a dynamin inhibitor. *Cell Communication and Signaling, 13*, 24. https://doi.org/10.1186/s12964-015-0102-1

[66] Von Kleist, L., Stahlschmidt, W., Bulut, H., Gromova, K., Puchkov, D., Robertson, M. J., et al. (2011). Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition. *Cell, 146*(3), 471–484. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.025

[67] McCluskey, A., Daniel, J. A., Hadzic, G., Chau, N., Clayton, E. L., Mariana, A., et al. (2013). Building a better dynasore: The Dyngo compounds potently inhibit dynamin and endocytosis. *Traffic, 14*(12), 1272–1289. https://doi.org/10.1111/tra.12119

[68] Dutta, D., Williamson, C. D., Cole, N. B., & Donaldson, J. G. (2012). Pitstop 2 is a potent inhibitor of clathrin-independent endocytosis. *PLoS ONE, 7*(10), e45799. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045799

[69] Hafner, M., Mills, C. E., Subramanian, K., Chen, C., Chung, M., Boswell, S. A., et al. (2019). Multiomics profiling establishes the polypharmacology of FDA-approved CDK4/6 inhibitors and the potential for differential clinical activity. *Cell Chemical Biology, 26*(8), 1067–1080.e8. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.05.005

[70] Oña, G., & Bouso, J. C. (2021). Therapeutic potential of natural psychoactive drugs for central nervous system disorders: A perspective from polypharmacology.

Current Medicinal Chemistry, 28(1), 53–68. https://doi.org/10.2174/0929867326666191212103330

[71] Park, R. J., Shen, H., Liu, L., Liu, X., Ferguson, S. M., & De Camilli, P. (2013). Dynamin triple knockout cells reveal off-target effects of commonly used dynamin inhibitors. *Journal of Cell Science, 126*(22), 5305–5312. https://doi.org/10.1242/jcs.138578

[72] Basagiannis, D., Zografou, S., Galanopoulou, K., & Christoforidis, S. (2017). Dynasore impairs VEGFR2 signalling in an endocytosis-independent manner. *Scientific Reports, 7*, 45035. https://doi.org/10.1038/srep45035