

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Diana BARAGA

**UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI MEMBRANSKIH  
NANOCEVK MED RAKAVIMI IN NORMALNIMI  
UROTELIJSKIMI CELICAMI**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Diana BARAGA

**UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI MEMBRANSKIH NANOCEVK  
MED RAKAVIMI IN NORMALNIMI UROTELIJSKIMI CELICAMI**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja

**DETECTION OF MEMBRANE NANOTUBES BETWEEN CANCER  
CELLS AND NORMAL UROTHELIAL CELLS**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključno delo študija 2. stopnje Strukturne in funkcionalne biologije na Biotehniški fakulteti, Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Inštitutu za biologijo celice Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je 21. 2. 2014 odobrila naslov magistrskega dela ter za mentorico imenovala prof. dr. Matejo Erdani Kreft in za recenzenta prof. dr. Petra Veraniča.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Damjana DROBNE

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Peter VERANIČ

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice

Članica: prof. dr. Mateja ERDANI KREFT

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice

Datum zagovora: 21. 12. 2015

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Diana Baraga

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 577.2:616(043.2)=163.6
KG	membranske nanocevke/medcelična komunikacija/urotelijske celice/rak
AV	BARAGA, Diana, diplomirana biologinja (UN)
SA	ERDANI KREFT, Mateja (mentorica)/VERANIČ, Peter (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij strukturne in funkcionalne biologije
LI	2015
IN	UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI MEMBRANSKIH NANOCEVK MED RAKAVIMI IN NORMALNIMI UROTELIJSKIMI CELICAMI
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	XIV, 88 str., 6 pregl., 25 sl., 10 pril., 113 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Celice komunicirajo na različne načine, eden izmed njih so membranske nanocevke (angl. <i>tunneling nanotubes</i> , TnT). TnT so cevaste strukture, ki povezujejo različno oddaljene celice. Preko njih potujejo organeli, membranske komponente, citoplazemske in membranske molekule in celo patogeni. TnT so našli že v različnih tipih celic, med drugim tudi pri rakavih celicah. V magistrski nalogi smo želeli raziskati morfološke in strukturne lastnosti TnT, tako da smo gojili monokulture rakavih urotelijskih celic T24 in normalnih urotelijskih celic NPU. V monokulturi obeh tipov celic smo prešteli TnT in jim izmerili dolžino ter premer. Pri rakavih urotelijskih celicah je bilo največ TnT med celicami, ki so rasle v manjših otočkih, pri normalnih urotelijskih celicah pa je bilo več TnT med celicami, ki so rasle v večjih otočkih. Ugotovili smo, da so TnT rakavih urotelijskih celic krajše in tanjše od TnT normalnih urotelijskih celic. Rakave urotelijske celice in normalne urotelijske celice smo snemali s svetlobnim mikroskopom in ugotovili, da TnT rakavih urotelijskih celic lahko nastanejo z oddaljevanjem tesno stikajočih se celic, TnT normalnih urotelijskih celic pa z rastjo izrastka podobnega filopodiju. Celice smo fluorescenčno označili in dokazali, da nekatere TnT gradijo vsi trije elementi citoskeleta. Želeli smo tudi ugotoviti, ali med normalnimi in rakavimi urotelijskimi celicami nastanejo TnT. Rakave urotelijske celice in normalne urotelijske celice smo nasadili v kokulturi in dokazali, da se TnT tvorijo med rakavimi in normalnimi urotelijskimi celicami. V monokulturi rakavih in normalnih urotelijskih celic smo imunooznačili proteina celičnih stikov N- in E-kadherin. Dokazali smo, da se N-kadherin nahaja v TnT rakavih urotelijskih celic, E-kadherin pa v TnT normalnih urotelijskih celic. Nadaljne raziskave na področju povezovanja rakavih celic ter rakavih in normalnih celic s TnT bi pripomogle k boljšemu razumevanju biologije raka in k razvoju učinkovitejših zdravil za zdravljenje rakavih obolenj.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2

DC UDC 577.2:616(043.2)=163.6

CX membrane nanotubes/intercellular communication/urothelial cells/cancer

AU BARAGA, Diana

AA ERDANI KREFT, Mateja (supervisor)/VERANIČ, Peter (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study Programme in Structural and Functional Biology

PY 2015

TI DETECTION OF MEMBRANE NANOTUBES BETWEEN CANCER CELLS AND NORMAL UROTHELIAL CELLS

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)

NO XIV, 88 p., 6 tab., 25 fig., 10 ann., 113 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Cells communicate in different ways, one of which is the membrane nanotubes (tunneling nanotubes, TnT). TnTs are tubular structures connecting cells on various distances. Organelles, membrane components, cytoplasmic molecules and even pathogens are carried over TnT. TnT have been found in different types of cells, among which are cancer cells. In this thesis we studied morphological and structural properties of TnT, by growing malignant cancer urothelial cells (T24) and normal urothelial cells (NPU). Cancer urothelial cells had the largest number of TnT between the cells in smaller islands, normal urothelial cells had the largest number of TnT between the cells in larger islands. We have found out that TnT of cancer urothelial cells are shorter and thinner than TnT of normal urothelial cells. We have recorded cancer urothelial cells and normal urothelial cells with light microscope and discovered that TnT of cancer urothelial cells can be created by cell dislodgement, whereas TnT of normal urothelial cells can be created by growth of cell protrusions. We have marked the cells with fluorescent dye and proven that some of the TnT are built by all three elements of the cytoskeleton. We have tried to find out, if TnT are formed between normal and cancer urothelial cells. We have seeded cancer urothelial cells and normal urothelial cells in coculture and proven, that TnT do form between cancer and normal urothelial cells. We have marked N- and E-cadherin in the monoculture of cancer and normal urothelial cells and found N-cadherin in cancer urothelial cells' TnT, whereas E-cadherin is was found in normal urothelial cells' TnTs. Further research in the field of TnT connections between cancer cells, and cancer and normal cells could contribute to better understanding the biology of cancer and to the development of more efficient cancer treatment drugs.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA</b> .....	III
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION</b> .....	IV
<b>KAZALO VSEBINE</b> .....	V
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b> .....	IX
<b>KAZALO SLIK</b> .....	X
<b>KAZALO PRILOG</b> .....	XII
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b> .....	XIII
<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b> .....	<b>3</b>
2.1 UROTELIJ SEČNEGA MEHURJA .....	3
2.2 RAK SEČNEGA MEHURJA .....	4
<b>2.2.1 Epitelijsko-mezenhimski prehod (EMT)</b> .....	<b>5</b>
2.3 KOMUNIKACIJA MED CELICAMI .....	6
2.4 MEMBRANSKE NANOCEVKE (TnT) .....	7
<b>2.4.1 Lastnosti TnT</b> .....	<b>9</b>
<b>2.4.2 Zgradba TnT</b> .....	<b>11</b>
<b>2.4.3 Strukture podobne TnT pri živalskih celicah</b> .....	<b>12</b>
<b>2.4.4 Strukture podobne TnT pri različnih organizmih</b> .....	<b>13</b>
<b>2.4.5 Nastanek TnT</b> .....	<b>15</b>
<b>2.4.6 Funkcija TnT</b> .....	<b>17</b>
<b>2.4.7 Transportni mehanizmi po TnT</b> .....	<b>20</b>
<b>2.4.8 Prenašanje in razširjanje patogenov po TnT</b> .....	<b>21</b>

<b>2.4.9</b>	<b>TnT v normalnih (zdravih) tkivih.....</b>	<b>22</b>
<b>2.4.10</b>	<b>TnT v tumorskih tkivih.....</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE.....</b>	<b>24</b>
3.1	GOJENJE CELIC.....	24
<b>3.1.1</b>	<b>Gojenje monokultur .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Gojenje kokultur .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Hranilni medij.....</b>	<b>26</b>
3.2	BARVANJE KOKULTUR Z DiI IN DiO .....	27
3.3	(IMUNO)OZNAČEVANJE MONOKULTUR IN KOKULTUR RAKAVIH IN NORMALNIH UROTELIJSKIH CELIC .....	29
<b>3.3.1</b>	<b>Dvojno označevanje F-aktina in CK7.....</b>	<b>29</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Dvojno označevanje F-aktina in <math>\alpha</math>-tubulina .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Dvojno imunooznačevanje <math>\alpha</math>-tubulina in CK7 .....</b>	<b>31</b>
<b>3.3.4</b>	<b>Dvojno imunooznačevanje N-kadherina in E-kadherina .....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.5</b>	<b>Trojno označevanje F-aktina, <math>\alpha</math>-tubulina in CK7 .....</b>	<b>33</b>
3.4	PRIPRAVA VZORCEV ZA VRSTIČNO ELEKTRONSKO MIKROSKOPIJO ... .....	34
3.5	MIKROSKOPIRANJE ŽIVIH CELIC .....	37
3.6	ŠTETJE CELIC V PETRIJEVKAH .....	37
3.7	ANALIZA SLIK IN STATISTIČNA ANALIZA.....	37
<b>3.7.1</b>	<b>Indeks celične oblike .....</b>	<b>37</b>
<b>3.7.2</b>	<b>TnT v monokulturi in kokulturi rakavih in normalnih urotelijskih celic .....</b> .....	<b>37</b>
<b>3.7.3</b>	<b>Konfluentnost celic v petrijevki .....</b>	<b>38</b>
<b>3.7.4</b>	<b>Statistična analiza podatkov.....</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>39</b>

4.1	LASTNOSTI TnT V MONOKULTURI RAKAVIH ALI NORMALNIH UROTELIJSKIH CELIC .....	39
4.1.1	<b>Vpliv TnT na obliko rakavih urotelijskih celic in normalnih urotelijskih celic .....</b>	<b>39</b>
4.1.2	<b>Število TnT v monokulturi rakavih urotelijskih celic in normalnih urotelijskih celic .....</b>	<b>40</b>
4.1.3	<b>Dolžina in premer TnT rakavih urotelijskih celic in normalnih urotelijskih celic .....</b>	<b>48</b>
4.2	LASTNOSTI TnT V KOKULTURI RAKAVIH IN NORMALNIH UROTELIJSKIH CELIC .....	52
4.2.1	<b>Nastajanje TnT med rakavimi urotelijskimi celicami in normalnimi urotelijskimi celicami .....</b>	<b>52</b>
4.3	CITOSKELETNA ZGRADBA TnT RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC IN NORMALNIH UROTELIJSKIH CELIC .....	56
4.3.1	<b>Ugotavljanje prisotnosti aktina, intermediarnih filamentov in mikrotubulov v parnih kombinacijah v TnT rakavih urotelijskih celic in normalnih urotelijskih celic.....</b>	<b>56</b>
4.3.2	<b>Ugotavljanje prisotnosti aktina, intermediarnih filamentov in mikrotubulov v TnT rakavih urotelijskih celic in normalnih urotelijskih celic .....</b>	<b>62</b>
4.4	PRISOTNOST STIČNIH PROTEINOV N-KADHERINA IN E-KADHERINA V TnT RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC IN NORMALNIH UROTELIJSKIH CELIC .....	64
4.5	NASTAJANJE TnT V ŽIVIH RAKAVIH UROTELIJSKIH CELICAH IN NORMALNIH UROTELIJSKIH CELICAH .....	65
4.5.1	<b>Nastanek TnT med celicami T24 .....</b>	<b>65</b>
4.5.2	<b>Nastanek TnT med celicami NPU .....</b>	<b>66</b>
4.6	POVZETEK REZULTATOV .....	68
5	<b>RAZPRAVA.....</b>	<b>69</b>



5.1	TnT V MONOKULTURI RAKAVIH ALI NORMALNIH UROTELIJSKIH CELIC .....	69
5.1.1	TnT ne vplivajo na obliko celic .....	69
5.1.2	Število TnT je odvisno od števila celic .....	69
5.1.3	TnT celic T24 so krajše in tanjše od TnT celic NPU .....	70
5.1.4	V TnT so prisotni aktinski filamenti, intermediarni filamenti in mikrotubu.... .....	71
5.1.5	TnT nastanejo z oddaljevanjem celic in rastjo filopodiju podobnega izrastka .....	73
5.2	TnT V KOKULTURI RAKAVIH IN NORMALNIH UROTELIJSKIH CELIC .... .....	74
5.2.1	TnT se tvorijo med rakavimi in normalnimi urotelijskimi celicami .....	74
5.2.2	TnT rakavih urotelijskih celic vsebujejo N-kadherin, TnT normalnih urotelijskih celic vsebujejo E-kadherin.....	75
6	SKLEPI .....	77
7	POVZETEK.....	78
8	VIRI .....	80

## PRILOGE

## KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1:	Primeri TnT pri različnih tipih celic in njihove lastnosti.....	8
Pregl. 2:	Primeri struktur podobnih TnT, ki so jih odkrili <i>in vivo</i> .....	22
Pregl. 3:	Štiri kokulture NPU celic in celic T24, z različnimi kombinacijami nasaditvenih gostot. ....	26
Pregl. 4:	Sestavine hranilnega medija za gojenje celic T24.....	26
Pregl. 5:	Sestavine hranilnega medija za gojenje celic NPU. ....	27
Pregl. 6:	Štiri kokulture celic T24 in celic NPU z različnimi kombinacijami nasaditvenih gostot. ....	52

## KAZALO SLIK

Sl. 1:	Shematski prikaz zgradbe epitelija sečnega mehurja – urotelija .....	3
Sl. 2:	Dva načina nastanka TnT .....	15
Sl. 3:	Shematski prikaz prenosa tovora med celicama preko TnT z odprtim koncem... .....	20
Sl. 4:	Barvanje kokultur celic T24 in NPU z zelenim fluorescenčnim barvilom DiO in rdečim fluorescenčnim barvilom DiI.....	28
Sl. 5:	Postopek priprave vzorcev za vrstično elektronsko mikroskopijo .....	36
Sl. 6:	Indeks celične oblike (ICO).....	40
Sl. 7:	Število TnT/cm <sup>2</sup> v monokulturi celic T24 in celic NPU z združenimi podatki prvega in drugega dne gojenja.....	42
Sl. 8:	Graf konfluentnosti (odstotka preraščenostigojilne površine s celicami).....	43
Sl. 9:	TnT med rakavimi urotelijskimi celicami T24 pri različnih nasaditvenih gostotah, prvi in drugi dan gojenja .....	46
Sl. 10:	TnT med normalnimi urotelijskimi celicami NPU pri različnih gostotah nasaditve, prvi in drugi dan gojenja.....	47
Sl. 11:	Število TnT med rakavimi urotelijskimi celicami T24 in med normalnimi urotelijskimi celicami NPU glede na število celic.....	48
Sl. 12:	Graf povprečnih dolžin (μm) TnT med rakavimi urotelijskimi celicami T24 in med normalnimi urotelijskimi celicami NPU.....	49
Sl. 13:	Graf povprečnega premera TnT med rakavimi urotelijskimi celicami T24 in TnT med normalnimi urotelijskimi celicami NPU.....	50
Sl. 14:	TnT, posnete z vrstičnim elektronskim mikroskopom .....	51
Sl. 15:	Število TnT pri posameznih kokulturah .....	53
Sl. 16:	Kokulture rakavih urotelijskih celic T24 in normalnih urotelijskih celic NPU, prvi in drugi dan gojenja.....	55
Sl. 17:	Odstotek posameznih sestavnih delov citoskeletnih elementov, ki so sestavljali TnT fluorescenčno označene z dvojnimi (imuno)označevanjem F-aktina in CK7, F-aktina in α-tubulina, α-tubulina in CK7 .....	57
Sl. 18:	Dvojno (imuno)označevanje rakavih urotelijskih celic T24 s kombinacijami F-aktina in CK7, F-aktina in α-tubulina ter α-tubulina in CK7 .....	59

Sl. 19:	Dvojno (imuno)označevanje normalnih urotelijskih celic NPU s kombinacijami F-aktina in CK7, F-aktina in $\alpha$ -tubulina ter $\alpha$ -tubulina in CK7.....	61
Sl. 20:	Odstotek posameznih sestavnih delov citoskeletnih elementov, ki so sestavljali TnT pri rakavih urotelijskih celicah T24 in normalnih urotelijskih celicah NPU .....	62
Sl. 21:	Trojno označevanje rakavih urotelijskih celic T24 in normalnih urotelijskih celic NPU z $\alpha$ -tubulinom, CK7 in F-aktinom .....	63
Sl. 22:	Monokultura rakavih urotelijskih celic T24 imunooznačenih z N-kadherinom in monokultura normalnih urotelijskih celice NPU imunooznačenih z E-kadherinom .....	64
Sl. 23:	Kokulture rakavih urotelijskih celic T24 z nasaditveno gostoto $5 \times 10^3$ c/cm <sup>2</sup> in normalnih urotelijskih celic NPU z nasaditveno gostoto $2 \times 10^5$ c/cm <sup>2</sup> , imunooznačenih z N- in E-kadherinom.....	65
Sl. 24:	Nastanek TnT z oddaljevanjem rakavih urotelijskih celic T24.....	66
Sl. 25:	Nastanek TnT normalnih urotelijskih celic NPU z rastjo izrastka podobnega filopodiju.....	67

## KAZALO PRILOG

- PRIL. A: Povprečno število celic s posamezno vrednostjo indeksa celične oblike (CSI)
- PRIL. Ba: Število TnT celic T24 in celic NPU, s štirimi nasaditvenimi gostotami ( $c/cm^2$ ), prvi in drugi dan po nasaditvi
- PRIL. Bb: Graf povprečnega števila TnT celic T24 in celic NPU, s štirimi nasaditvenimi gostotami ( $c/cm^2$ ), prvi in drugi dan po nasaditvi
- PRIL. C: Število TnT celic T24 in celic NPU, s štirimi nasaditvenimi gostotami ( $c/cm^2$ ), z združenim prvim in drugim dnem po nasaditvi
- PRIL. D: Povprečna konfluentnost (%) celic T24 in NPU, s štirimi nasaditvenimi gostotami ( $c/cm^2$ ), prvi in drugi dan po nasaditvi
- PRIL. E: Povprečno število celic T24 in NPU na petrijevki ( $9,4\text{ cm}^2$ ), s štirimi nasaditvenimi gostotami ( $c/cm^2$ ), prvi in drugi dan po nasaditvi
- PRIL. Fa: Povprečna dolžina ( $\mu\text{m}$ ) TnT celic T24 in NPU, s štirimi nasaditvenimi gostotami ( $c/cm^2$ ), prvi in drugi dan po nasaditvi
- PRIL. Fb: Graf povprečnih dolžin ( $\mu\text{m}$ ) TnT celic T24 in celic NPU, s štirimi nasaditvenimi gostotami ( $c/cm^2$ ), prvi in drugi dan po nasaditvi
- PRIL. G: Povprečna dolžina ( $\mu\text{m}$ ) TnT celic T24 in celic NPU, s štirimi nasaditvenimi gostotami ( $c/cm^2$ ), z združenim prvim in drugim dnem po nasaditvi
- PRIL. Ha: Število TnT iz celic T24 na celice NPU in iz celic NPU na celice T24, v kokulturi, s štirimi kombinacijami nasaditvenih gostot ( $c/cm^2$ ), prvi in drugi dan po nasaditvi
- PRIL. Hb: Graf povprečnega števila TnT iz celic T24 na celice NPU in iz celic NPU na celice T24, v kokulturi s štirimi kombinacijami nasaditvenih gostot ( $c/cm^2$ ), prvi in drugi dan po nasaditvi
- PRIL. I: Povprečna dolžina ( $\mu\text{m}$ ) TnT celic T24 in celic NPU, glede na citoskeletno sestavo
- PRIL. J: Število TnT celic T24 in celic NPU s posameznimi sestavnimi deli citoskeletnih elementov pri trojnem označevanju F-aktina,  $\alpha$ -tubulina in CK7

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A-DMEM	kemijsko definiran hranilni medij
ATP	molekula adenzin trifosfat, ki v celici služi kot vir energije
BSA	serumski albumin pridobljen iz krav
CK7	protein citokeratin 7, ki gradi intermediarne filamente citoskeleta
DAPI	fluorescenčno barvilo, ki se veže v DNA
DiI	rdeče fluorescenčno barvilo, ki se veže na celične membrane (1,1'-Diiodo-3,3,3'-tetrametilindocarbocyanine Perchlorate ('DiI', DiIC <sub>18</sub> (3)))
DiO	zeleno fluorescenčno barvilo, ki se veže na celične membrane (Benzoxazolium, 3-octadecyl-2-(3-(3-octadecyl-2(3H)-benzoxazolylidene)-1-propenyl)-, perchlorate 34215-57-1 (DiOC <sub>18</sub> (3)))
EGFP-aktin	na aktin vezan zelen fluorescenčni protein EGFP
EMT	epitelijsko-mezenhimski prehod
F12	kemijsko definirana hranilna mešanica
Faloidin FITC	faloidin je molekula, ki se veže na aktin, in je označena z zelenim fluorescenčnim barvilom FITC
FBS	fosfatna puferna raztopina, ki vsebuje natrijev fosfat in natrijev klorid
GA	glutaraldehyd
HIV-1	človeški virus imunske pomanjkljivosti tipa 1
HMDS	raztopina, ki se uporablja pri sušenju preparatov za elektronsko mikroskopijo
ICO	indeks celične oblike
Ligand Fas	transmembranski protein, vezava liganda FAS z receptorjem sproži apoptozo
LPS	lipopolisaharid
MCDB 153	kemijsko definiran hranilni medij
HLA	človeški levkocitni antigeni, ki se nahajajo na površini večine celic in vplivajo na imunski odziv
M-sec	sesalčni protein, ki je bil najprej opisan kot tumorski nekrozni faktor, kasneje so dokazali, da lahko sproži nastanek TnT

NK	naravne celice ubijalke
NPU	normalne prašičje urotelijske celice
NRK	normalne celice ledvic podgane
PA	paraformaldehid
PBS	fosfatni pufer
PC12	celična linija, ki izvira iz feokromocitoma podgane
Ral	protein, ki spada med monomerne G-proteine (majhne GTPaze) in sodeluje v mnogih bioloških procesih
Receptor InsP <sub>3</sub>	receptor inozitol trifosfat je membranski glikoproteinski kompleks, ki ga aktivira InsP <sub>3</sub> , in deluje kot kalcijev kanal
RT4	trajna celična linija, ki izvira iz benignega karcinoma humanega urotelija
T24	trajna celična linija, ki izvira iz visoko malignega karcinoma humanega urotelija
TnT	membranske nanocevke ( <i>angl. Tunneling nanotubes</i> )
TnT/cm <sup>2</sup>	število membranskih nanocevk na cm <sup>2</sup>
TS	Triple Select je proteolitični encim, ki cepi medcelične stike

## 1 UVOD

Za razvoj večceličnih organizmov je ključnega pomena komunikacija med celicami. Membranske nanocevke (angl. *tunneling nanotubes*, TnT) so kot nov način komunikacije med celicami prvič opisali Rustom in sod. (2004). Od tedaj so TnT predmet mnogih raziskav in so jih odkrili pri različnih tipih celic. TnT so cevasti citoplazemski izrastki, ki povezujejo različno oddaljene celice in se ne dotikajo gojilne podlage (Rustom in sod., 2004). Njihova dolžina lahko znaša od 10  $\mu\text{m}$  pa do nekaj dolžin celice, premer pa od 50 do 200 nm, v nekaterih primerih tudi več kot 700 nm (Onfelt in sod., 2006; Rustom in sod., 2004; Sowinski in sod., 2011).

V Sloveniji rak sečnega mehurja predstavlja 3,2 % vseh rakavih obolenj (Register raka Republike Rak v Sloveniji 2011, 2015). Raziskave na področju biologije raka sečnega mehurja so zato izrednega pomena v razumevanju razvoja in širjenja raka, saj se s tem odpirajo nove možnosti za razvoj učinkovitega zdravljenja. Dosedanje raziskave so pokazale, da se TnT tvorijo med rakavimi urotelijskimi celicami (Veranic in sod., 2008). Ni pa bilo še raziskano, ali se TnT tvorijo tudi med normalnimi urotelijskimi celicami v monokulturi ter med rakavimi in normalnimi urotelijskimi celicami v kokulturi.

Namen magistrske naloge je bil raziskati morfološke in strukturne lastnosti TnT, ki se tvorijo v monokulturah in kokulturah rakavih urotelijskih celic (T24), ki izvirajo iz visoko malignega karcinoma humanega urotelija in normalnih urotelijskih celic (NPU), ki izvirajo iz normalnega prašičjega urotelija. Želeli smo ugotoviti, ali se TnT med rakavimi in normalnimi urotelijskimi celicami razlikujejo. TnT smo zato v kulturah celic prešteli, jim izmerili dolžino in premer ter raziskali, kateri citoskeletni in stični proteini so udeleženi pri nastajanju in ohranjanju morfologije TnT. Način nastajanja TnT v rakavih in normalnih urotelijskih celicah smo proučili s fazno-kontrastno mikroskopijo živih celic. Na podlagi dobljenih rezultatov smo izdelali model nastajanja TnT med rakavimi in normalnimi urotelijskimi celicami, kar bo glede na splošno razširjenost teh komunikacijskih struktur med celicami pomembno doprineslo k razumevanju te relativno novo poznane oblike medcelične komunikacije tudi v drugih tipih celic ter prispevalo k razvoju novih pristopov zdravljenja raka sečnega mehurja.



## 1.1 DELOVNE HIPOTEZE

H1: Rakave urotelijske celice tvorijo več TnT kot normalne urotelijske celice.

H2: TnT rakavih in normalnih urotelijskih celic se med seboj morfološko razlikujejo.

H3: V TnT urotelijskih celic so prisotni različni citoskeletni elementi.

H4: Pri vzpostavljanju TnT med rakavimi urotelijskimi celicami sodeluje stični protein N-kadherin. Pri vzpostavljanju TnT med normalnimi urotelijskimi celicami pa stični protein E-kadherin.

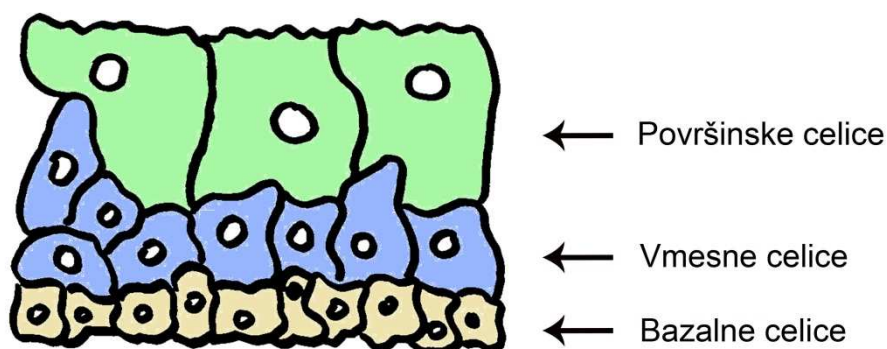
H5: Rakave in normalne urotelijske celice se v kokulturi med seboj povezujejo s TnT.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 UROTELIJ SEČNEGA MEHURJA

Glavna vloga sečnega mehurja je, da za določen čas shranjuje urin, med tem pa ohranja njegovo sestavo karseda enako tisti, ki jo izločijo ledvice (Lewis, 2000). Možnost shranjevanja urina izboljša higienske razmere okolja, v katerem živali živijo, kontrolirano praznjenje mehurja pa poleg tega igra pomembno vlogo pri označevanju teritorija (Lewis, 2000). Sečni mehur sesalcev je kroglaste oblike. Njegovo steno gradi več plasti, in sicer mukoza (epitelij, imenovan urotelij), submukoza (vezivno in mišično tkivo, v katerem se med drugim nahajajo krvne žile, senzorične in motorične živčne celice ter celice imunskega sistema) (Hossler in Monson, 1995) ter seroza (najbolj zunanja plast enoskladnega epitelijskega sistema) (Hossler in Monson, 1995) ter seroza (najbolj zunanja plast enoskladnega epitelijskega sistema) (Hossler in Monson, 1995) ter seroza (najbolj zunanja plast enoskladnega epitelijskega sistema), ki meji na trebušno votlino).

Epitelijske celice mejijo na zunanjo površino telesa ali na notranje telesne votline (Alberts in sod., 2014: 695). Epitelij ima vlogo pregrade, saj preprečuje prehod določenim molekulam, prevzema hranila in izloča odpadne snovi, vsebuje receptorje za zaznavanje zunanjih signalov in ščiti organizem pred vdorom mikroorganizmov in izgubo vode (Alberts in sod., 2014: 695). Urotelij je specializiran večplasten epitelij, ki obdaja svetlino sečnega mehurja (Apodaca, 2004).



Slika 1: Shematski prikaz zgradbe epitelijskega tkiva sečnega mehurja – urotelija (Lewis, 2000: F868). Spodnjo plast urotelija, ki meji na bazalno lamino, gradijo majhne bazalne celice, srednjo plast urotelija gradijo vmesne celice, vrhno plast urotelija gradijo velike površinske celice, ki so medtem, ko je mehur poln, ploščate oblike.

Urotelija gradijo vsaj tri plasti celic (Slika 1). Bazalno plast, ki meji na bazalno lamino, gradijo majhne nediferencirane bazalne urotelijske celice s premerom okoli 10  $\mu\text{m}$ . To so predniške celice vsem ostalim celicam urotelija (Apodaca, 2004; Birder, 2011; Lewis, 2000). Vmesno plast gradi en ali več skladov vmesnih urotelijskih celic s premerom med 10 in 15  $\mu\text{m}$  (Apodaca, 2004; Birder, 2011; Lewis, 2000). Površinsko plast gradijo velike večkotne površinske urotelijske celice s premerom med 25 in 300  $\mu\text{m}$  (Apodaca, 2004; Birder, 2011; Kreft in sod., 2005; Lewis, 2000). Premer površinskih celic je odvisen od napoljenosti sečnega mehurja. Ko je sečni mehur prazen, so površinske celice kubične oblike, ko se sečni mehur polni, postanejo površinske celice ploščate (Hicks, 1975). Površinske celice so med seboj povezane s tesnimi stiki, njihovo apikalno površino pa od 70 do 90 % prekrivajo transmembranski proteini uroplakini, ki se združujejo v urotelijske plake (Hicks, 1975; Kreft in Robenek, 2012; Liang in sod., 2001).

Urotelija preprečuje vdor patogenov, selektivno kontrolira prehod vode, ionov, topnih snovi in makromolekul v tkiva pod njim (Apodaca, 2004). Specifične lastnosti površinskih celic urotelija omogočajo ohranjanje vloge pregrade, kljub velikim in pogostim spremembam v volumnu med polnjenjem ter praznjenjem mehurja (Birder, 2011). Vlogo urotelija kot pregrade omogočajo tesni stiki, ki preprečujejo gibanje ionov in topnih snovi po paracelularni poti med celicami, ter uroplakini na apikalni plazmalemi, ki ji zmanjšajo prepustnost majhnih molekul, kot so voda, urea in protoni (Abraham in sod., 2009; Acharya in sod., 2004; Apodaca, 2004; Khandelwal in sod., 2009). Apikalno površino urotelija pokrivajo še sulfatni polisaharidi – glukoaminoglikani, ki delujejo kot nespecifični faktor proti vezavi patogenov in tako kot obrambni mehanizem proti okužbam (Parsons in sod., 1990; Parsons in sod., 1977).

## 2.2 RAK SEČNEGA MEHURJA

Leta 2011 je v Sloveniji za rakom sečnega mehurja zbolelo 298 ljudi, od tega 226 moških in 72 žensk (Rak v Sloveniji 2011, 2015). Rak sečnega mehurja je pogostejši pri starejših moških in predstavlja 3,2 % vseh rakavih obolenj (Rak v Sloveniji 2011, 2015).

Poznanih je več dejavnikov tveganja za raka sečnega mehurja. Največjo tveganost predstavlja starost, pogosteje pa se pojavlja pri kadilcih (Parkin, 2011a). Pri slednjih je možnost za razvoj raka sečnega mehurja trikrat večja kot pri nekadilcih (Parkin, 2011a). Raka sečnega mehurja lahko povzročijo tudi nekatere industrijske kemikalije (Parkin, 2011b).

Pri večini rakavih obolenj pride do spremembe ene same celice v epiteliju, v primeru raka sečnega mehurja torej v uroteliju (Nowell, 2002). Zaradi genskih mutacij, ki vodijo v aktivacijo onkogenov in utišanje tumor supresorskih genov, se normalne epiteljske celice spremenijo v rakave celice (Vogelstein in Kinzler, 2004). V večstopenjskem procesu rakave celice razvijejo primarni tumor (Vogelstein in Kinzler, 2004).

Ob prvi diagnozi ima med 70 in 80 % bolnikov mišično neinvazivnega raka sečnega mehurja ter med 20 in 30 % bolnikov mišično invazivnega raka sečnega mehurja (Sylvester in sod., 2006). Čeprav oba izvirata iz urotelija sečnega mehurja, imata različne klinične lastnosti (Sylvester in sod., 2006). Pri bolnikih z mišično neinvazivnim rakom sečnega mehurja je verjetnost preživetja visoka, pri 30 do 50 % bolnikov pride do ponovitve bolezni, pri 10 do 20 % bolnikov pa napreduje v mišično invazivnega raka sečnega mehurja (Sylvester in sod., 2006). Čeprav je mišično invazivni rak redkejši, je ta odgovoren za večino smrti v povezavi z rakom sečnega mehurja (Sylvester in sod., 2006). Kar 50 % bolnikov z mišično invazivnim rakom sečnega mehurja ima ob prvi diagnozi že razvite metastaze (Yun in Kim, 2013, cit. po Messing, 2007). Povprečna predvidena življenjska doba bolnikov z že razvitimi metastazami, ki so bili sistemsko zdravljeni, je 14 mesecev (Siegel in sod., 2013). Povprečna predvidena življenjska doba tistih, ki niso bili zdravljeni, pa 8 mesecev (Siegel in sod., 2013). Zaradi tega rak sečnega mehurja predstavlja osmi najpogostejši razlog smrti v povezavi z rakavimi obolenji (Siegel in sod., 2013).

### **2.2.1 Epitelijsko-mezenhimski prehod (EMT)**

Epitelijsko-mezenhimski prehod (EMT) je večstopenjski proces, pri katerem epiteljske celice izgubijo lastnosti epiteljskih celic in pridobijo lastnosti mezenhimskih celic, kot sta giblivosť in invazivnosť (Kalluri in Weinberg, 2009). Raziskave kažejo, da je EMT povezan

z invazijo rakavih celic in metastazami pri različnih rakavih obolenjih, vključno z rakom sečnega mehurja (Yun in Kim, 2013).

Najpomembnejšo vlogo pri vzpostavljanju medceličnih povezav v epitelijskem tkivu imajo kadherini, to je družina proteinov adherentnih stikov (Yun in Kim, 2013). E-kadherin ima pomembno vlogo pri interakciji celic v epitelijskem tkivu, saj omogoča povezovanje sosednjih epitelijskih celic, ohranja apikalno-bazalno polarnost celic in fenotip epitelijskih celic (Rangel in sod., 2012). E-kadherin je torej pomemben zaviralec tumorja, saj preprečuje invazivnost rakavih celic (Jeanes in sod., 2008; Stemmler, 2008). Med EMT pride do spremembe v izražanju kadherinov. Normalno izražanje E-kadherina zamenja neobičajno izražanje P- ali N-kadherina, s tem se sproži proces invazije in tvorba metastaz (De Wever in sod., 2008; Yilmaz in Christofori, 2009). Menjava kadherinov je pomemben proces, ki se zgodi v pozni molekularni patogenezi raka sečnega mehurja, vendar njegova natančna časovna opredelitev in narava dogodkov še ni znana (Yun in Kim, 2013).

### 2.3 KOMUNIKACIJA MED CELICAMI

Za razvoj večceličnih organizmov je pomembna komunikacija med celicami, saj omogoča pravilno delovanje in aktivnost posameznih celic (Gerdes in sod., 2013). Koordinacija in komunikacija celic je tako ključnega pomena pri razvoju tkiv in ohranjanju homeostaze (Kimura in sod., 2013).

Eden izmed načinov komunikacije je izločanje molekul, ki preko receptorjev sprožijo odziv v tarčni celici (Gerdes in sod., 2013). Celice izločajo signalne molekule, kot so citokini, rastni faktorji in hormoni, ki jih nato sprejmejo receptorji tako oddaljenih kot sosednjih tarčnih celic (Kimura in sod., 2013).

Drugi način komunikacije je preko presledkovnih stikov med skupaj stikajočimi se celicami (Gerdes in sod., 2013). Presledkovni stiki tvorijo kanale, ki jih sestavljajo koneksini, in skozi katere lahko direktno, iz ene celice v drugo, prehajajo ioni in majhne, vodotopne molekule (Alberts in sod., 2014: 700). Presledkovni stiki omogočajo tudi električno sklapljanje celic (Alberts in sod., 2014: 700).

Eden izmed nedavno odkritih načinov komunikacij je preko majhnih veziklov, eksosomov, ki jih celice izločajo in ti nato prehajajo v sosednje tarčne celice (Fevrier in Raposo, 2004).

Eden izmed načinov komunikacije celic, ki je natančneje predstavljen v tej nalogi, so membranske nanocevke (angl. *tunneling nanotubes*, TnT). TnT povezujejo celice na daljših in krajših razdaljah ter omogočajo prenos različnih celičnih komponent (Rustom in sod., 2004).

#### 2.4 MEMBRANSKE NANOCEVKE (TnT)

Skozi leta so raziskovalci različno poimenovali TnT, npr. celični mostovi (angl. *cellular bridges*), znotrajcelični membranski mostovi (angl. *intercellular membrane bridges*), epiteljski mostovi (angl. *epithelial bridges*), cevasti mostovi (angl. *tubular bridges*), membranske nanocevke (angl. *membrane nanotubes*) (Sarafraz-Yazdi, 2014). Vsem naštetim poimenovanjem je skupno to, da imajo lastnosti tunelskih nanocevk, torej so daljši citoplazemski izrastki, ki jih sestavlja F-aktin in se v razmerah *in vitro* ne dotikajo gojilne podlage (Rustom in sod., 2004; Sarafraz-Yazdi, 2014). Njihov premer običajno znaša od 50 do 200 nm, dolžina pa od 10  $\mu$ m do nekaj dolžin celice (Rustom in sod., 2004; Sowinski in sod., 2011).

TnT so prvič opisali leta 2004 kot primer novega celičnega stika med celicami feokromocitoma (PC12) podgane (Rustom in sod., 2004). Od tedaj so TnT odkrili že v mnogih celičnih tipih (Preglednica 1). Med drugim so jih odkrili kot stike med naravnimi celicami ubijalkami (NK) in z virusom Epstein-Barr spremenjenimi limfociti B (Onfelt in sod., 2004), v kulturi gojenih celic raka prostate DU154 (Vidulescu in sod., 2004), monocitih THP-1 (Watkins in Salter, 2005), endotelijskih predniških celicah, miocitih srca podgane (Koyanagi in sod., 2005), makrofagih ljudi in glodavcev (Onfelt in Davis, 2004; Onfelt in sod., 2006), astrocitih (Gimsa in sod., 2007) in drugih.

Preglednica 1: Primeri TnT pri različnih tipih celic in njihove lastnosti (Sisakhtnezhad in Khosravi, 2015: 3). Ni določeno (ND).

Celični tip	Dolžina TnT ( $\mu\text{m}$ )	Citoskelet	Tovor	Vir
Celice feokromocitoma (PC12)	6	F-aktin, miozin Va	Organeli, membranske komponente, z endosomi in lizosomi povezani organeli	Rustom in sod. (2004); Bukoreshtliev in sod. (2009)
Benigne urotelijske celice (RT4)	ND	F-aktin, citokeratin 7	ND	Kabaso in sod. (2011); Veranic in sod. (2008)
Rakave urotelijske celice (T24)	ND	F-aktin, citokeratin 7, mikrotubuli	ND	Kabaso in sod. (2011); Veranic in sod. (2008)
Celice jurkat in primarni limfociti T	~22	F-aktin	HIV protein Gag, mitohondriji, membranske komponente, signali celične smrti, virus	Arkwright in sod. (2010); Sowinski in sod. (2008)
Normalne celice ledvic (NRK)	<70	F-aktin, miozin Va	Z endosomi povezani organeli, depolarizacijski signali	Rustom in sod. (2004); Wang in sod. (2010)
Mioblasti srca (H9c2)	<100	F-aktin	Mitohondrij, kvantne pike	He in sod. (2010)
Kokultura z virusom Epstein-Barr spremenjenih limfocitov B in naravnih celic ubijalk	ND	ND	GPI-GFP	Onfelt in sod. (2004)
Makrofagi	ND	F-aktin	Ca <sup>2+</sup>	Hase in sod. (2009)
Kokultura primarnih živčnih celic in astrocitov	~7,1	F-aktin, mikrotubuli	Depolarizacijski signali	Wang in sod. (2012)
Naravne celice ubijalke	21,4-100 $\mu\text{m}$	F-aktin, mikrotubuli	Membranske komponente, signali celične smrti	Chauveau in sod. (2010)
Bakterije	ND	ND	Proteini, genetski material	Dubey in Ben-Yehuda (2011)

### 2.4.1 Lastnosti TnT

Proteinski označevalci specifični za TnT še niso poznani. Glavni kriterij za določanje TnT zato ostajajo njihove morfološke lastnosti (Austefjord in sod., 2014). TnT so občutljive na mehanski stres, kemijsko fiksacijo, daljše obsevanje s svetlobo (Gurke in sod., 2008a) in temperaturo (Kabaso in sod., 2011). Kabaso in sod. (2011) so dokazali, da se z zmanjšanjem temperature gojilnega medija zmanjša število TnT v celični kulturi malignih urotelijskih celic T24. Raziskovanje TnT je oteženo ravno zaradi njihove krhkosti. Poleg tega je TnT skoraj nemogoče ločiti od celic, zaradi česar je njihova biokemijska struktura še vedno slabo raziskana.

TnT omogočajo prenos organelov (Rustom in sod., 2004), membranskih in citoplazemskih molekul (Gurke in sod., 2008b; Watkins in Salter, 2005). Poleg tega pa omogočajo razširjanje patogenov, kot so bakterije (Onfelt in sod., 2006), virusi (Eugenin in sod., 2009; Sherer in sod., 2007; Sowinski in sod., 2008) in prioni (Gousset in sod., 2009). To kaže ne le na fiziološko vlogo TnT v večceličnih organizmih, temveč tudi na vlogo pri širjenju bolezni (Hurtig in sod., 2010).

Raziskave so v zadnjih letih pokazale visoko stopnjo heterogenosti TnT v morfologiji in strukturi, tudi znotraj iste celične linije (Onfelt in sod., 2006). Veranic in sod. (2008) so TnT benignih urotelijskih celic RT4 in malignih urotelijskih celic T24 razdelili v dve skupini. TnT tipa I so krajše, bolj dinamične in vsebujejo aktinske filamente (Veranic in sod., 2008). TnT tipa II so daljše, bolj stabilne in vsebujejo intermediarnefilamente (Veranic in sod., 2008).

TnT, ki so jih našli *in vivo* v tkivih, se v marsičem razlikujejo od TnT *in vitro*. TnT *in vivo* pogosto niso ravne, najverjetneje zaradi kompleksnega mikrookolja (Sowinski in sod., 2008). Ovire, kot so druge celice, in gost zunajcelični matriks, preprečujejo TnT, da bi se celice povezale na najkrajši razdalji (Sowinski in sod., 2008). Raziskave limfocitov T znotraj umetnega 3D matriksa so razkrile vijugaste TnT z dolgo življenjsko dobo, kar se ujema z raziskavami *in vivo* (Sowinski in sod., 2008). Ko med celicami ni ovir, se tudi *in vivo* pojavijo ravne TnT (Sowinski in sod., 2008). Takšen primer so TnT podobne strukture med



celicami na vrhu nevrlnih gub, ki nastaneta med zapiranjem nevrlnne cevi (Pyrgaki in sod., 2010). Zunajcelični matriks TnT najverjetneje omogoča strukturno stabilnost in zaščito pred zunanji silami (Austefjord in sod., 2014).

#### 2.4.1.1 Dolžina TnT

Dolžine TnT so si med različnimi celičnimi linijami zelo različne. TnT limfocitov T so povprečno dolge 22  $\mu\text{m}$  (Sowinski in sod., 2008), TnT celic feokromocitoma pa 6  $\mu\text{m}$ , (Rustom in sod., 2004). TnT limfocitov T so torej precej daljše od TnT celic feokromocitoma. Z migracijo celic, ki sta povezani s TnT, se spreminja razdalja med njima, s tem pa se spreminja tudi dolžina TnT, ki ju povezuje (Austefjord in sod., 2014). Dolžina TnT je torej dinamično regulirana (Austefjord in sod., 2014). Nekatere celice kažejo negativno korelacijo med življenjsko dobo TnT in hitrostjo celičnih migracij (Sowinski in sod., 2008). Ko se celici preveč oddaljita, se TnT med njima pretrga (Austefjord in sod., 2014).

#### 2.4.1.2 Premer TnT

Raziskave s presevnim elektronskim mikroskopom so pokazale, da imajo TnT celic feokromocitoma premer med 50 in 200 nm (Rustom in sod., 2004), TnT limfocitov T pa med 180 in 380 nm (Sowinski in sod., 2008). S konfokalnim mikroskopom so odkrili, da je premer TnT človeških makrofagov lahko tudi večji od 700 nm (Onfelt in sod., 2006). Vzrok temu bi lahko bila vključitev dodatnih citoskeletnih komponent v TnT, npr. mikrotubulov (Onfelt in sod., 2006; Sowinski in sod., 2008).

#### 2.4.1.3 Struktura koncev TnT

Ultrastruktura koncev TnT še ni povsem raziskana. Znano je, da se lahko tvori odprt ali zaprt konec TnT (Davis in Sowinski, 2008). To je odvisno od tega, ali se konec TnT zlije z membrano tarčne celice ali ne (Davis in Sowinski, 2008). Pri odprtem koncu TnT se tvori začasna pora, skozi katero lahko v tarčno celico prehaja celični tovor ali večji organeli, kot so mitohondriji in vezikli (Davis in Sowinski, 2008). V primeru zaprtega konca TnT lahko membranski tovor prehaja v tarčno celico z endocitozo (Davis in Sowinski, 2008).

TnT, ki nastanejo z oddaljevanjem prej stikajočih se celic v kulturi normalnih celic ledvic podgane (angl. *normal rat kidney*, NRK), nimajo odprtega konca, ampak imajo zaprt konec (Wang in sod., 2010). Te TnT na koncu vsebujejo protein koneksin 43 (Cx43), značilen za presledkovne stike (Wang in sod., 2010). Za TnT, ki imajo na koncu presledkovni stik, je značilen prenos električnega signala (Wang in sod., 2010). TnT, ki pri celicah feokromocitoma nastanejo z izražanjem filopodijev, ne vsebujejo proteina Cx43, imajo odprt konec in ne omogočajo prenosa električnega signala (Sherer, 2013).

Raziskave torej kažejo, da so TnT heterogene tudi v strukturi stikov med koncem TnT in celico (Hurtig in sod., 2010). Eden izmed izzivov bi bil odkriti, pod katerimi okoliščinami in s kakšnim mehanizmom pride do zlitja membran, ki vodi v TnT z odprtim koncem (Hurtig in sod., 2010).

## **2.4.2 Zgradba TnT**

### **2.4.2.1 Citoskeletni elementi v TnT**

TnT sestavljajo citoskeletni elementi (Rustom in sod., 2004). Aktinski filamentni so prisotni v večini TnT, po celotni dolžini TnT in so pomembni tudi pri samem nastanku TnT (Rustom in sod., 2004). Ko so celice inkubirali z zdravili, ki depolimerizirajo F-aktin (npr. citohalazin B), se TnT niso tvorile (Bukoreshtliev in sod., 2009). Raziskave so pokazale, da se preko TnT transportirajo različne celične komponente, s hitrostjo značilno za miozinske motorne proteine, ki so vezani na F-aktin. (Gurke in sod., 2008b).

Čeprav prisotnost aktinskih filamentov v TnT velja za eno glavnih značilnosti TnT (Rustom in sod., 2004), raziskave kažejo, da jih nekatere TnT ne vsebujejo. Mikrotubule so našli v TnT imunskih celic (Onfelt in sod., 2006), v TnT med primarnimi živčnimi celicami in astrociti (Wang in sod., 2012), v TnT celic HUVEC med angiogenezo (Mineo in sod., 2012), v TnT urotelijskih celic (Veranic in sod., 2008) in v TnT celic raka prostate (Vidulescu in sod., 2004). Debelejše TnT pri makrofagih vsebujejo aktinske filamente in mikrotubule (Onfelt in sod., 2006). Mikrotubuli najverjetneje, tako kot aktinski filamentni, omogočajo transport po TnT, s to razliko da po mikrotubulih poteka transport s pomočjo kinezinskih in dineinskih motornih proteinov (Onfelt in sod., 2006). Poleg tega povečajo togost TnT in s

tem podaljšajo njeno življenjsko dobo (Gittes in sod., 1993). TnT med nediferenciranimi živčnimi celicami hipokampusa in astrociti, ki niso vsebovale F-aktina, so bile daljše od TnT, ki so vsebovale F-aktin (Wang in sod., 2012). Pri makrofagih je večina debelejših TnT (premer  $> 0,7 \mu\text{m}$ ) vsebovala mikrotubule (Onfelt in sod., 2006). Premer in dolžina TnT sta torej zelo verjetno povezana s citoskeletno zradbo TnT (Zhang in Zhang, 2013).

TnT celic RT4 in T24 vsebujejo tudi citokeratin 7 to je intermediarni filament, značilen za daljše in stabilnejše TnT (Veranic in sod., 2008).

#### 2.4.2.2 Proteini v TnT

Pri nastanku in vezavi TnT na tarčno celico imajo pomembno vlogo transmembranski in stični proteini, kot sta N-kadherin pri rakavih celicah in miozin X. (Gousset in sod., 2013; Lokar in sod., 2010). Membranski proteini imajo pomembno vlogo tudi pri upravljanju funkcije TnT. Presledkovni stiki v predelu, kjer se TnT stika s celico, omogočajo prenos depolarizacijskih signalov (Wang in sod., 2010). Akumulacija proteina A (MICA), ki je soroden proteinu glavnega histokompatibilnega kompleksa razreda HLA I, na koncu TnT, lahko sproži imunski odziv tarčne celice (Chauveau in sod., 2010). Prenos endogenega liganda Fas po TnT lahko pri limfocitih T sproži apoptozo (Arkwright in sod., 2010).

Lokar in sod. (2012) so odkrili, da membrane TnT vsebujejo membranske domene bogate s holesterolom in sfingomielinom. Z odstranitvijo holesterola iz rakavih urotelijskih celic se je število TnT zmanjšalo (Lokar in sod., 2012).

### 2.4.3 Strukture podobne TnT pri živalskih celicah

Nekateri celični izrastki imajo podobne lastnosti kot TnT, zato jim pravimo strukture podobne TnT. Tak primer so citoneme, trakasti izrastki, nanopodiji in epitelijski mostovi.

Citoneme so dolgi in tanki celični izrastki, ki vsebujejo F-aktin. Najdemo jih pri določenih celicah v ličinki vinske mušice (*Drosophila*) (Hsiung in sod., 2005). Citoneme se proti tarčni celici stegujejo na podlagi kemotaksije (Ramirez-Weber in Kornberg, 1999). Omogočajo privzem in transport zunajceličnih signalnih molekul proti celici (Hsiung in sod., 2005).

Citoneme imajo zato med razvojem zarodka pomembno vlogo pri komunikaciji na dolge razdalje (Gurke in sod., 2008a). Ni še znano, ali se citoneme povezujejo z drugimi celicami ali služijo le za sprejemanje signalov iz okolice (Austefjord in sod., 2014).

Trakasti izrastki (angl. *streamers*) so ravno tako TnT podobne strukture, ki so jih odkrili v kulturah limfocitov B in vsebujejo F-aktin. Tvorijo se v dveh minutah po izpostavitvi celic protitelesom. Trakasti izrastki običajno ne povezujejo celic. (Beum in sod., 2008; Beum in sod., 2011).

Nanopodiji nastanejo pri endotelijskih celicah. Ker ne vsebujejo F-aktina in ne povezujejo celic, ne moremo zagotovo trditi, da sodelujejo pri celični komunikaciji (Zukauskas in sod., 2011).

Epitelijski mostovi so cevasti mostovi, ki so jih našli le v primarnih kulturah človeških bronhialnih epitelijskih celic in v človeških epitelijskih celicah karcinoma pljučnega mešička (A549) (Zani in sod., 2010). Po epitelijskih mostovih tipa I se najverjetneje prenašajo celične komponente (Zani in sod., 2010). V primerjavi s TnT so epitelijski mostovi debelejši, njihov premer znaša od 1 do 20  $\mu\text{m}$ , v dolžino pa lahko merijo od 25  $\mu\text{m}$  do več kot 1 mm (Zani in sod., 2010). Zanimivo je, da se tako kot TnT tudi epitelijski mostovi ne dotikajo podlage, lahko vsebujejo aktinske filamente in mikrotubule, vendar pa so strukturno stabilni dalj časa (Zani in sod., 2010).

Zelo možno je, da se TnT lahko razvijejo iz katerih od zgoraj naštetih struktur (Austefjord in sod., 2014) ali da so zgoraj omenjene strukture le različna morfološka poimenovanja TnT. To bodo potrdile ali ovrgle nadaljne raziskave.

#### **2.4.4 Strukture podobne TnT pri različnih organizmih**

TnT in strukture podobne TnT niso značilne le za celice sesalcev. Cevaste strukture, obdane z membrano, se pojavljajo tudi pri bakterijah, pri rastlinah v obliki plazmodezem in pri glivah v obliki septalnih por (Bloemendal in Kuck, 2013; Dubey in Ben-Yehuda, 2011; Lee, 2014). Obstoj struktur podobnih TnT v različnih filogenetskih kraljestvih kaže na to, da je

direktna komunikacija preko membranskih tunelov razširjen in osnoven način celične komunikacije (Lee, 2014).

#### 2.4.4.1 Rastline

Plazmodezme so celični kanali, ki rastlinam omogočajo, da delujejo kot večcelični organizmi (Lee, 2014). Plazmodezme tvorijo z membrano obdane kanale med sosednjimi celicami, s tem omogočajo membransko in citoplazemsko neprekinjenost med njimi oz. skozi celotno rastlino. Primitivne oblike plazmodezme večceličnih alg imajo le citoplazemske odprtine v celičnih stenah, medtem ko imajo višje rastline v plazmodezmi cev endoplazemskega retikuluma, t. i. dezmotubul (Robards in Lucas, 1990).

Skozi plazmodezmo prehajajo majhne molekule, kot so ioni, hormoni in hranila. Plazmodezma v višjih rastlinah se lahko skrči in razširi, kar omogoča nadzorovan prenos makromolekul, kot so transkripcijski dejavniki in molekule RNA (Lee in Cui, 2009; Lucas in Lee, 2004). Podobno kot pri TnT celic sesalcev, tudi pri rastlinah virusi izkoriščajo plazmodezme za razširitev iz ene celice v drugo (Hofmann in sod., 2007; Schoelz in sod., 2011).

#### 2.4.4.2 Glive

Pri enostavnih septalnih porah so septe plošče, ki kot del celične stene ločujejo sosednji celici in vsebujejo osrednjo poro, s premerom od 50 do 500 nm (Bloemendal in Kuck, 2013, cit. po Gull, 1978). Septalno poro lahko prehajajo organeli, kot so mitohondriji, vakuole in jedro (Bloemendal in Kuck, 2013, cit. po Gull, 1978).

V celicah gliv so razvojni procesi direktno povezani s strukturnimi spremembami septalnih por. Med razvojem postane struktura sept kompleksnejša, kar kaže na to, da je selektivni transport pomemben pri diferenciaciji celic (Beckett, 1981; Gull, 1976).

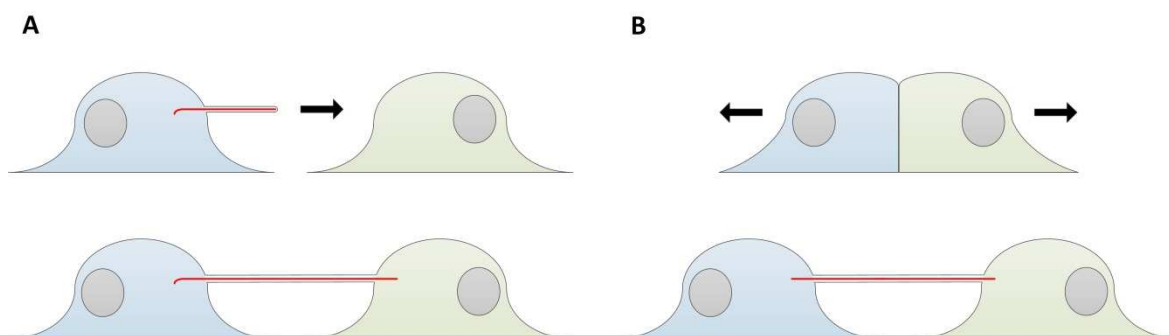
#### 2.4.4.3 Bakterije

Dubey in Ben-Yehuda (2011) sta odkrila, da se med bakterijami tvorijo različno dolge TnT, ki služijo izmenjavi celičnih molekul. Poleg tega se preko TnT lahko prenese dedna in

nededna odpornost na antibiotike in nekonjugacijski plazmidi (Dubey in Ben-Yehuda, 2011). Debelejše TnT povezujejo bolj oddaljene bakterije, tanjše pa bližnje bakterije (Dubey in Ben-Yehuda, 2011). TnT lahko nastanejo tako med bakterijami iste vrste, kot tudi med evolucijsko oddaljenimi vrstami (Dubey in Ben-Yehuda, 2011). TnT najverjetneje predstavljajo večji del bakterijske komunikacije v naravi, ki omogoča izmenjavo celičnih molekul znotraj ene vrste ali med različnimi vrstami bakterij (Dubey in Ben-Yehuda, 2011).

#### 2.4.5 Nastanek TnT

Glede na raznolikost TnT, je logično sklepati, da le-te nastanejo na različne načine. (Austefjord in sod., 2014). Ugotovili so, da TnT nastanejo na dva različna načina (Slika 2). Pri prvem načinu nastajajo TnT z rastjo filopodiju podobnega izrastka proti tarčni celici, pri drugem načinu pa z oddaljevanjem tesno stikajočih se celic (Davis in Sowinski, 2008). Način nastanka se razlikuje med celičnimi tipi. Celice feokromocitoma in živčne celice tvorijo TnT na prvi način (Rustom in sod., 2004; Wang in sod., 2012). Pri večini do sedaj raziskanih celičnih tipov nastanejo TnT na drugi način, tak primer so normalne celice ledvic podgane, celice nevralnega grebena in limfociti T (Sowinski in sod., 2008; Wang in sod., 2010).



Slika 2: Dva načina nastanka TnT. TnT nastanejo z rastjo izrastka podobnega filopodiju proti tarčni celici (A). TnT nastanejo z oddaljevanjem tesno stikajočih celic (B). Rdeča črta: F-aktin; puščice: smer rasti izrastka podobnega filopodiju (A) in smer gibanja celic (B) (Gerdes in sod., 2007: 2197).

Ne glede na način nastanka so za nastanek in stabilizacijo TnT pomembni stični proteini (Kimura in sod., 2012). V TnT rakavih urotelijskih celic T24 se akumulirajo proteini adherentnih stikov, kot sta N-kadherin in  $\beta$ -katenin (Lokar in sod., 2010). Ko TnT torej dosežejo tarčno celico, njihovo pritrditev stabilizirajo adherentni stiki (Lokar in sod., 2010; Veranic in sod., 2008).

Zelo verjetno je, da imajo aktinski filamenti pomembno vlogo pri nastanku TnT in lahko regulirajo nastajanje TnT s spreminjanjem citoskeleta (Zhang in Zhang, 2013). Polimerizacija aktinskih filamentov najverjetneje vodi rast filopodiju podobnega izrastka (Gerdes in sod., 2007). Aktinski filament pa so najverjetneje pomembni tudi pri stabilizaciji TnT, ki nastanejo z oddaljevanjem celic (Gerdes in sod., 2007).

Protein M-Sec sproži nastanek membranskih izrastkov, filopodijev, ki se stegujejo iz plazmaleme (Hase in sod., 2009). Nekateri izmed teh izrastkov se pritrdijo na tarčno celico in tvorijo strukture podobne TnT (Hase in sod., 2009). Za nastanek TnT morata obe celici, ki ju TnT povezuje, stabilno izražati protein M-Sec (Hase in sod., 2009). V nasprotnem primeru namesto TnT nastanejo filopodijski mostovi (Hase in sod., 2009). Podrobnejše raziskave so pokazale, da je nastanek TnT iz filopodijev posredovan preko eksocitotne poti s sodelovanjem proteina Ral (Hase in sod., 2009). Protein M-Sec najverjetneje z usklajevanjem s proteinom RalA (monomerni G-protein) in proteini, udeleženi pri eksocitozi, sproži nastanek in podaljševanje TnT, in sicer tako, da vpliva na polimerizacijo aktinskih filamentov in na potovanje membranskih veziklov v območja nastajanja celičnih izrastkov (Hase in sod., 2009). Potrebno je poudariti, da protein M-Sec sproži nastanek le tistih TnT, ki vsebujejo aktinske filamente, ne pa mikrotubulov (Kimura in sod., 2012). Na nastanek TnT, ki vsebujejo mikrotubule, torej vpliva do sedaj še neznan dejavnik (Kimura in sod., 2012).

Interakcija liganda Fas in receptorja sproži programirano celično smrt preko aktivacije prokaspaz 8 in 10. To je pomembno pri regulaciji imunskega sistema in napredovanju raka (Kimura in sod., 2013). V limfocitih T stimulacija s Fas ligandom sproži nastanek TnT in pospešuje širjenje signalov celične smrti med povezanimi celicami (Arkwright in sod., 2010; Luchetti in sod., 2012). Signaliziranje z ligandom Fas sproži nastanek TnT in programirano celično smrt, vendar preko različnih mehanizmov (Arkwright in sod., 2010).

#### 2.4.5.1 Nastanek TnT pod vplivom stresnih dejavnikov

Nastanek TnT pospešujejo pogoji, ki nastanejo pri vnetju (Kimura in sod., 2013). Eden izmed povzročiteljev vnetja pri sesalcih je lipopolisaharid (LPS), endotoksin po gramu

negativnih bakterij (Kimura in sod., 2013). Če je roženica miši poškodovana in izpostavljena lipopolisaharidu, se število TnT med celicami poveča (Chinnery in sod., 2008).

Oksidativen stres sproži nastanek TnT pri astrocitih in živčnih celicah hipokampusa (Zhu in sod., 2005). Oksidativni stres, ki ga sproži  $H_2O_2$ , spremeni fluidnost membrane, povzroči reorganizacijo citoskeleta in poveča nastajanje TnT preko aktivacije poti p38 MAPK (Zhu in sod., 2005).

Odkrili so tudi, da v kokulturi dveh celičnih populacij, TnT vedno tvorijo celice, ki so pod stresom, proti celicam, ki niso pod stresom (Wang in sod., 2011). Wang in sod. (2011) zato predlagajo, da TnT predstavljajo mehanizem, s katerim se celice odzovejo na škodljive signale in s katerim lahko prenašajo celične komponente ali energijo v obliki mitohondrijev celicam, ki so pod stresom.

#### 2.4.5.2 Membranska dinamika vpliva na nastanek TnT

Med nastajanjem TnT mora plazmalema prestatati bistvene prilagoditvene spremembe (Hurtig in sod., 2010). Plazmalema je tekoči lipidni dvosloj, ki se na mehanske sile odziva elastično (Hurtig in sod., 2010). Mehanske sile se nato razporedijo po celotni površini plazmaleme (Hurtig in sod., 2010). Celice blažijo spremembe v membranski napetosti tako, da ohranjajo zaloge plazmaleme z nagubanostjo plazmaleme ali z dodajanjem lipidov iz znotrajceličnih zalog (Raucher in Sheetz, 1999). Zaloga presežka plazmaleme omogoča nastanek in podaljševanje TnT (Hurtig in sod., 2010).

### 2.4.6 Funkcija TnT

#### 2.4.6.1 Transdukcija signalov

Električno sklapljanje preko TnT omogoča prenos depolarizacije iz ene celice na drugo. Depolarizacijski val potuje preko presledkovnih stikov, ki se nahajajo na koncu TnT, in sproži privzem kalcija v celice (Wang in sod., 2010; Wang in Gerdes, 2012). Receptorji inozitol trifosfat ( $InsP_3$ ), ki so vezani na endoplazemski retikulum znotraj TnT, sodelujejo pri sprostitvi kalcija iz endoplazemskega retikuluma v citoplazmo. Receptor  $InsP_3$  s tem aktivno razširja znotrajcelične signale kalcija vzdolž TnT (Smith in sod., 2011). Kalcij pa



lahko tudi sam prehaja vzdolž TnT (Slika 3) in s tem viša raven kalcija v tarčni celici (Watkins in Salter, 2005; Wittig in sod., 2012). Ti signali nato v tarčnih celicah povzročijo morfološke spremembe, npr. podaljševanje lamelopodijev (Watkins in Salter, 2005). V vseh naštetih primerih morajo TnT zadostiti določenim strukturnim zahtevam. Sestava TnT torej določa možnosti in omejitve njihove funkcije (Austefjord in sod., 2014).

TnT omogočajo potovanje depolarizacijskega vala vsaj 70  $\mu\text{m}$  daleč (Wang in sod., 2010). Depolarizacijski val se lahko prenaša v obe smeri, njegova moč pa je odvisna od dolžine in števila TnT povezav (Wang in sod., 2010).

Raziskave na živčnih celicah in astrocitih *in vitro* kažejo, da imajo TnT pomembno vlogo pri električnem signaliziranju med razvojnimi procesi (Gerdes in sod., 2013). Wang in sod. (2012) so dokazali, da se v omejenem obdobju razvoja živčnih celic po TnT širi depolarizacijski val in kalcijevi ioni iz astrocitov v živčne celice. V tem primeru imajo TnT pomembno vlogo pri razvoju možganov (Wang in sod., 2012).

TnT med limfociti T ne morejo prenašati kalcijevega toka (Sowinski in sod., 2008). To ponovno kaže na raznolikost v funkciji TnT pri različnih celičnih tipih (Davis in Sowinski, 2008).

#### 2.4.6.2 Prenos celičnih komponent

Na celicah feokromocitoma so dokazali, da se po TnT prenašajo različne celične komponente. Med njimi so citoplazemske molekule, kot je EGFP-aktin (Veranic in sod., 2008), organeli, vezikli endocitotskega izvora (Slika 3) (Rustom in sod., 2004).

Prenos endocitotskih veziklov po TnT v celicah feokromocitoma in naravnih celicah ubijalkah poteka le v eni smeri s hitrostjo transporta, ki je odvisen od miozina (Gurke in sod., 2008b; Rustom in sod., 2004). Z zmanjšanjem ATP v celicah se zmanjša tudi znotrajcelični prenos endocitotskih veziklov (Gurke in sod., 2008b). Vse to kaže, da endocitotski vezikli prehajajo po TnT s pomočjo aktinsko-miozinskega transporta (Gerdes in sod., 2013). V nasprotju s TnT celic feokromocitoma in naravnih celic ubijalk po TnT, ki povezujejo

makrofage, vezikli potujejo v obe smeri, kar bi lahko pomenilo, da prenos veziklov pri različnih celicah kontrolirajo različni mehanizmi (Onfelt in sod., 2006).

Glede na to da TnT sodelujejo pri celični komunikaciji, lahko sklepamo, da se po TnT med zdravimi celicami in celicami v apoptozi prenašajo tudi regulatorji apoptoze, ki lahko spremenijo usodo tarčne celice (Wang in Gerdes, 2015). Wang in Gerdes (2015) sta odkrila, da so se celice feokromocitoma, ki so bile izpostavljene stresu, izognile apoptozi, ko sta jih gojila skupaj z zdravimi celicami feokromocitoma. Celice, ki so bile izpostavljene stresu, so tvorile nov tip TnT, z drugačno citoskeletno sestavo, kot jih imajo TnT zdravih celic (Wang in Gerdes, 2015). Wang in Gerdes (2015) predvidevata, da prenos zdravih mitohondrijev preko TnT vpliva na okrevanje celic feokromocitoma v zgodnji fazi apoptoze.

#### 2.4.6.3 Prenos molekul plazmaleme

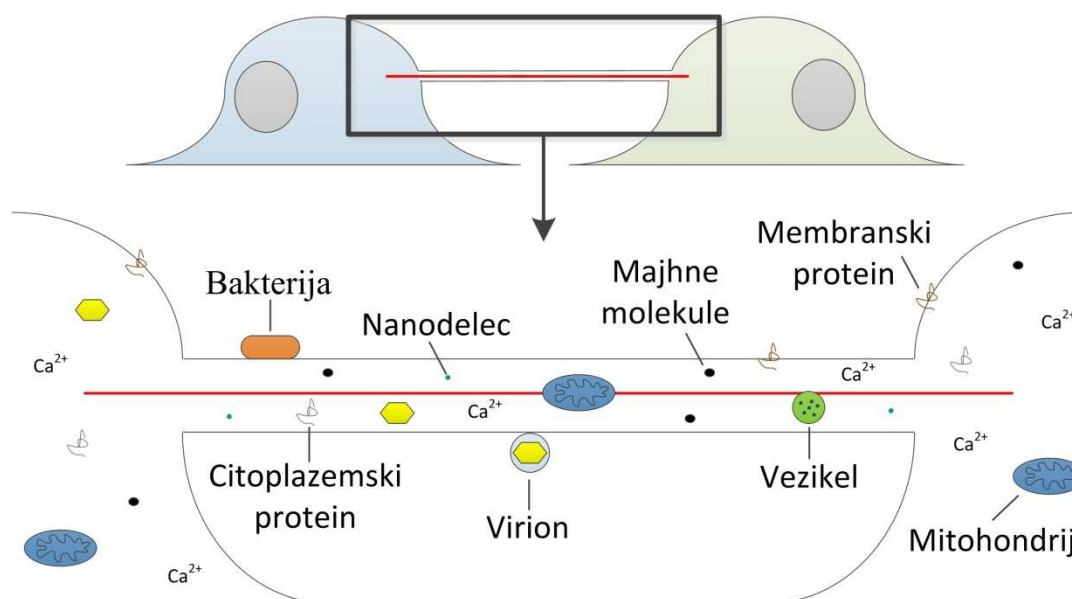
Raziskave na celicah feokromocitoma so pokazale, da se po TnT prenašajo tudi molekule plazmaleme, kot so lipidi in na lipide zasidrani proteini (Slika 3) (Rustom in sod., 2004). Potovanje molekul plazmaleme po površini TnT iz ene celice v drugo je skladno z neprekinjenostjo membrane med povezanimi celicami (Gerdes in sod., 2007).

#### 2.4.6.4 Prenos nanodelcev

Preko TnT se prenašajo tudi trdni lipidni nanodelci (Kristl in sod., 2013) in kvantne pike (Slika 3) (He in sod., 2010). Nadaljnje raziskave na tem področju bi pripomogle k boljšemu razumevanju in razvoju dostavljanja zdravil na tarčna mesta s pomočjo nanodelcev (Kristl in sod., 2013).

#### 2.4.6.5 Prenos molekul imunskega sistema

Pri celicah imunskega sistema so dokazali, da se po TnT prenašajo molekule glavnega histokompatibilnega kompleksa razreda HLA I (Onfelt in sod., 2004). To kaže na pomembno vlogo TnT pri hitrejši in boljši predstavitvi antigenov (Groothuis in sod., 2005; Williams in sod., 2007).



Slika 3: Shematski prikaz prenosa tovora med celicama preko TnT z odprtim koncem. Rdeča črta: citoskelet (Gerdes in sod., 2007: 2197; Sisakhtnezhad in Khosravi, 2015: 5).

## 2.4.7 Transportni mehanizmi po TnT

### 2.4.7.1 Aktivni prenos

Za prenos tovora po TnT so potrebni ATP in motorni proteini (Domhan in sod., 2011; Kuznetsov, 2011; Onfelt in sod., 2006). Ni še povsem raziskano kako organeli uspešno preidejo dve skupaj stikajoči se membrani. Predlagani so trije mehanizmi. Prvi je, da tovor čaka na začasno odprtje, ki nastane z zlitjem membran. Drugi je, da na koncu TnT nastanejo vezikli, v katerih tovor prehaja v tarčno celico. Tretji mehanizem je, da se del TnT pogrezne in endocitira v tarčno celico, s tem pa se endocitira tudi tovor (Wang in Gerdes, 2012).

### 2.4.7.2 Tvorba gondol

Več raziskovalcev je opazilo vezilke, izbokline ali gondole, ki so potovali vzdolž TnT (Onfelt in sod., 2004; Rustom in sod., 2004; Veranic in sod., 2008; Vidulescu in sod., 2004). Gondole najverjetneje nastanejo zaradi tovora, ki je prevelik, da bi se prilegal v cev TnT (Igljic in sod., 2003). Druga možnost je, da gondole nastanejo zaradi nenadne napetosti, ki jo lahko povzročita oddaljujoči se celici (Veranic in sod., 2008).

#### 2.4.8 Prenašanje in razširjanje patogenov po TnT

Transport po TnT torej predstavlja pomembno vlogo pri vzdrževanju homeostaze v tkivih. Slaba stran tega načina komunikacije med celicami je, da omogoča prenos in razširitev škodljivega tovora, kot so prioni, virusi in bakterije (Slika 3). Znotrajcelični patogeni pogosto izkoriščajo obstoječe celične stike ali pa sprožijo nastanek posebnih struktur, ki omogočajo razširitev na sosednje celice (Sherer, 2013). Dokazali so že, da retrovirusi, kot je človeški virus imunske pomanjkljivosti tipa 1 (HIV-1), povzročijo nastanek TnT podobnih filopodijjskih mostičkov, imenovanih virusne citoneme, med okuženimi in neokuženimi fibroblasti. S tem je omogočen od aktina odvisen prenos virusov po zunanji stani plazmaleme (Sherer in sod., 2007). Z virusom HIV-1 okuženi limfociti T se povezujejo s TnT, ki niso virusne citoneme, in jih HIV-1 lahko izkorišča za razširitev (Sowinski in sod., 2008). Virus HIV-1 se tako po TnT razširi iz okuženih v neokužene limfocite T (Sowinski in sod., 2008). TnT so torej dostopne virusom in omogočajo prenos iz ene celice na drugo (Hurtig in sod., 2010). Zelo verjetno lahko virusi nadzorujejo nastajanje TnT med okužbo (Hurtig in sod., 2010). Vendar pa podrobnosti teh procesov še niso znane (Hurtig in sod., 2010).

Bakterija *Mycobacterium bovis* se lahko veže in potuje vzdolž TnT, ki povezujejo človeške makrofage (Sherer in sod., 2007). Bakterije potujejo vzdolž TnT po zunanji strani do telesa celice, kjer lahko v celico vstopijo s fagocitozo (Onfelt in sod., 2006). Še vedno pa ni znano, ali je potovanje bakterij vzdolž TnT odvisno od specifičnih receptorjev, ki bi posredovali vezavo bakterije na celico in zasidranje na F-aktin znotraj TnT (Hurtig in sod., 2010).

Dolgo ni bilo znano, kako prioni pridejo v centralni živčni sistem in se po njem razširijo (Hurtig in sod., 2010). Dokazali so, da prioni lahko potujejo po TnT med živčnimi celicami ali med živčnimi celicami, povezanimi z dendritičnimi celicami (Gousset in sod., 2009). Preko TnT bi lahko bila možna pot do razširitve prionov iz obroboja v živčni sistem (Hurtig in sod., 2010).

## 2.4.9 TnT v normalnih (zdravih) tkivih

Odkrivanje TnT v tkivih je pomembno za razumevanje njihove fiziološke funkcije (Austefjord in sod., 2014). Pregled raziskav je prikazan v

Preglednica 2. V zarodkih rib cebric so v TnT med oddaljenimi celicami epiblasta opazili prenos membranskih proteinov (Caneparo in sod., 2011). V piščančjih zarodkih so med celicami nevrálnega grebena po tankih citoplazemskih mostovih opazili aktiven citoplazemski prenos (McKinney in sod., 2011). Vloga depolarizacijskega toka po TnT v tkivih bi lahko bila v sinhronizaciji in koordinaciji migratorne aktivnosti celic med embriogenezo znotraj rastočega tkiva (Gerdes in sod., 2013). Večino TnT *in vivo* so do sedaj odkrili v zarodkih, iz česar lahko sklepamo na pomembno vlogo TnT med razvojem večceličnih organizmov (Gerdes in sod., 2013).

Preglednica 2: Primeri struktur podobnih TnT, ki so jih odkrili *in vivo* (Gerdes in sod., 2013: 385).

Vrsta živali	Lokacija TnT	Dolžina TnT ( $\mu\text{m}$ )	Vir
Odrasla miš	Imunske celice v roženici	>300	Chinnery in sod. (2008)
Zarodek miši	Ektodermalne celice, ki niso živčne celice, v srednjih možganih	>50	Pyrgaki in sod. (2010)
Zarodek piščanca	Celice nevrálnega grebena	<100	Teddy in Kulesa (2004)
Zarodek cebrice	Celice epiblasta v blastuli	~215	Caneparo in sod. (2011)
Zarodek morskega ježka	Med celicami mezenhima in ektoderma	>80	Miller in sod. (1995)

## 2.4.10 TnT v tumorskih tkivih

Celična komunikacija med rakavimi celicami je kritičnega pomena pri širjenju, koordinaciji in invaziji tumorja (Lou in sod., 2012a). Rakave celice komunicirajo s pomočjo difuzije kemijskih signalov med celicami, ki spodbudijo rast sosednjih celic in invazijo tumorja (Lou in sod., 2012a). Raziskovali so tudi druge možne poti komunikacije rakavih celic, vendar pa so točnejši mehanizmi komunikacije oddaljenih rakavih celic še negotovi (Lou in sod., 2012a).

Lou in sod. (2012a) so dokazali, da se TnT tvorijo med malignimi rakavimi celicami mezotelioma in pljučnega raka, ne tvorijo pa se med malignimi in normalnimi celicami. Pri dokazovanju prisotnosti so uporabili tako celice pridobljene iz tumorja bolnikov kot tudi iz dobro vzpostavljenih celičnih linij. Med malignimi celicami mezotelioma se po TnT prenašajo različne celične komponente kot so proteini, golgijski vezikli in mitohondriji (Lou in sod., 2012a). Prvič so tudi dokazali, da se TnT tvorijo v tumorjih, izoliranih iz bolnikov (Lou in sod., 2012a).

Vloga TnT pri vzpostavitvi direktnih citoplazemskih povezav med rakavimi celicami in/ali normalnimi celicami ostaja slabo raziskana. Raziskovalci domnevajo, da TnT med rakavimi celicami in celicami matriksa, ki obkroža tumor, pripomorejo k razvoju in napredovanju tumorja ter k pripravi na invazijo tumorja in nastanka metastaz (Lou in sod., 2012b). Thayanithy in sod. (2014) so dokazali, da mikroRNA potujejo preko TnT med rakavimi celicami jajčnika in med celicami kostnega raka. S tem TnT predstavljajo možno tarčo za razvoj zdravila, ki bi prekinil medcelični prenos mikroRNA in drugih stimulacij rasti in širitve tumorja (Thayanithy in sod., 2014).

Pri bakterijah se lahko odpornost na antibiotike širi s komunikacijo preko TnT (Dubey in Ben-Yehuda, 2011). Možno je, da se pri rakavih celicah na podoben način širi odpornost na kemoterapijo (Lou in sod., 2012b). Pasquier in sod. (2013) so dokazali, da se mitohondriji iz endotelijskih celic prenašajo po TnT v rakave celice. Posledično so rakave celice s prenesenimi mitohondriji razvile večjo odpornost na kemoterapijo (Pasquier in sod., 2013). S ciljanjem na take TnT bi lahko ugotovili, ali je možno preprečiti odpornost rakavih celic na kemoterapijo (Lou in sod., 2012b).

TnT torej odpirajo novo področje v biologiji raka. Odpirajo se nove možnosti za zdravila, ki bi izhajala iz poznavanja komunikacije med rakavimi celicami, normalnimi celicami, navzkrižne komunikacije med normalnimi in rakavimi celicami ter interakcije znotraj tumorskega mikrookolja (Lou in sod., 2012b).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 GOJENJE CELIC

##### 3.1.1 Gojenje monokultur

Gojili smo monokulture normalnih prašičjih urotelijskih celic (NPU, pasaže od 5 do 13), ki so bile predhodno vzpostavljene po postopku opisanem v (Kreft in sod., 2010; Visnjar in Kreft, 2013) in celic trajne celične linije T24, ki izvirajo iz visoko malignega karcinoma humanega urotelija (ATTC® HTB-4™).

##### 3.1.1.1 Presajanje in štetje celic

Celice smo presadili iz že obstoječih celičnih monokultur, ko so dosegle 90 % konfluentnost, kar pomeni, da so preraščale 90 % podlage. Celični monokulturi smo dodali določeno količino proteolitičnega encima TripleSelect (TS, Gibco), ki cepi medcelične stike in stike celic s podlago. Celice so se po 5-30 minutah odlepili od podlage. Celice smo sprali, jih prenesli v centrifugirko (TPP, Švica) in jih nato centrifugirali 5 min z 200 g in pri 23 °C (Eppendorf). Odstranili smo supernatant ter celice redčili z določeno količino hranilnega medija. Celice smo šteli s hemocitometrom. V epici (Brand) smo 50 µl celične suspenzije dodali 10 µl tripanskega modrila (Invitrogen), ki mrtve celice obarva modro. Celično suspenzijo smo nato nanесли na dve komori na hemocitometru in v 8 kvadrantih prešteli žive in mrtve celice. Število živih celic smo izračunali po enačbi (1).

$$N = DF \times V \times \frac{n}{K} \quad \dots (1)$$

N = število živih celic v celični suspenziji

n = število vseh živih celic v preštetih kvadrantih hemocitometra

K = število preštetih kvadrantov hemocitometra

DF = dilucijski faktor, ki ima vrednost  $1,2 \times 10^4$  c/ml (celic/ml)

V = volumen redčenja v ml

### 3.1.1.2 Nasaditev celic

Celice smo gojili v plastičnih petrijevkah (TPP) s površino  $9,4 \text{ cm}^2$ . Oba tipa celic smo nasadili s štirimi nasaditvenimi gostotami, in sicer  $5 \times 10^3 \text{ c/cm}^2$  (celic/cm<sup>2</sup>),  $5 \times 10^4 \text{ c/cm}^2$ ,  $1 \times 10^5 \text{ c/cm}^2$  in  $2 \times 10^5 \text{ c/cm}^2$ . Na osnovi dobljenega števila živih celic smo izračunali, koliko celične suspenzije moramo dati na petrijevko, da bodo celice nasajene z eno od štirih nasaditvenih gostot.

### 3.1.1.3 Gojenje celic

Hranilna medija, ki smo ju uporabljali za gojenje celic, sta opisana v poglavju 3.1.3 Hranilni medij (Preglednici 2 in 3). Nasajene celice smo shranjevali v CO<sub>2</sub> inkubatorju pri 37 °C, v 5 % atmosferi CO<sub>2</sub> in 100 % vlažnosti (CO<sub>2</sub> inkubator Heraeus, Thermo Scientific). Za nadaljnje poskuse smo celice od nasaditve gojili en in dva dni.

### 3.1.1.4 Mikroskopiranje monokultur

Monokulture celic NPU in T24 smo prvi in drugi dan po nasaditvi opazovali z invertnim svetlobnim mikroskopom (Leica DM IL, Leica microsystems). Pri najmanjši lastni povečavi mikroskopa (40×) smo poslikali še naključna vidna polja posamezne petrijevke. Pri različnih povečavah mikroskopa smo poslikali vse TnT, ki smo jih našli na posamezni petrijevki.

## 3.1.2 Gojenje kokultur

### 3.1.2.1 Presajanje in štetje celic

Postopek presajanja in štetja celic na petrijevko s površino  $9,4 \text{ cm}^2$  je potekal tako kot pri monokulturah (glej poglavje 3.1.1.1 Presajanje in štetje celic). Pred nasaditvijo smo celice NPU označili z zelenim fluorescenčnim barvilom DiO, celice T24 pa z rdečim fluorescenčnim barvilom DiI. Postopek je opisan v Poglavju 3.2 Barvanje kokultur z DiI in DiO.

### 3.1.2.2 Nasaditev celic

Vzpostavili smo 4 kokulture celic NPU in celic T24, z različnimi kombinacijami nasaditvenih gostot, kar prikazuje Preglednica 3.



Preglednica 3: Štiri kokulture NPU celic in celic T24, z različnimi kombinacijami nasaditvenih gostot.

Oznaka kokulture	Nasaditvena gostota celic NPU (c/cm <sup>2</sup> )	Nasaditvena gostota celic T24 (c/cm <sup>2</sup> )
1	5×10 <sup>3</sup>	5×10 <sup>3</sup>
2	5×10 <sup>4</sup>	5×10 <sup>3</sup>
3	2×10 <sup>5</sup>	5×10 <sup>3</sup>
4	5×10 <sup>3</sup>	2×10 <sup>5</sup>

### 3.1.2.3 Gojenje celic

Za gojenje kokultur smo uporabljali hranilni medij za celice NPU (glej poglavje 3.1.3.2 Hranilni medij za celice NPU, Preglednica 5). Kokulture celic smo tako kot monokulture shranjevali v CO<sub>2</sub>-inkubatorju pri 37 °C, v 5 % atmosferi CO<sub>2</sub> in 100 % vlažnosti. Kokulture celic smo gojili en ali dva dni po nasaditvi.

## 3.1.3 Hranilni medij

### 3.1.3.1 Hranilni medij za celice T24

Za gojenje celic T24 smo uporabljali hranilni medij, katerega glavni sestavini sta A-DMEM in F12 (oba predstavljata 50 % končne koncentracije v hranilnem mediju), z dodatkom FBS in antibiotikov (Preglednica 4).

Preglednica 4: Sestavine hranilnega medija za gojenje celic T24.

Sestavine medija	Proizvajalec, kat. št., količina in/ali koncentracija	Končne koncentracije v mediju	Količina za 100 ml medija
A-DMEM	Advanced DMEM, Gibco, 12491-015	50 %	50 ml
F12 (HAM)	Nut Mix Hem, Gibco, 21765-029	50 %	50 ml
FBS	Gibco, 10108-165	5 %	5 ml
Glutamax	Gibco, 35050-038, 100 ml, 200 mM	4 mM	2 ml
PenStrep	Gibco, 15140-122, 100 ml	100 µg/ml streptomycin, 100 U/ml penicilin	1 ml

### 3.1.3.2 Hranilni medij za celice NPU

Za gojenje celic NPU smo uporabljali hranilni medij brez kalcija, katerega glavni sestavini sta MCDB 153 in A-DMEM (oba predstavljata 50 % končne koncentracije v hranilnem mediju), z dodatkom adenina, inzulina, hidrokortizona, fosfoetanolamina, glutamaksa, antibiotikov in FBS (Preglednica 5).

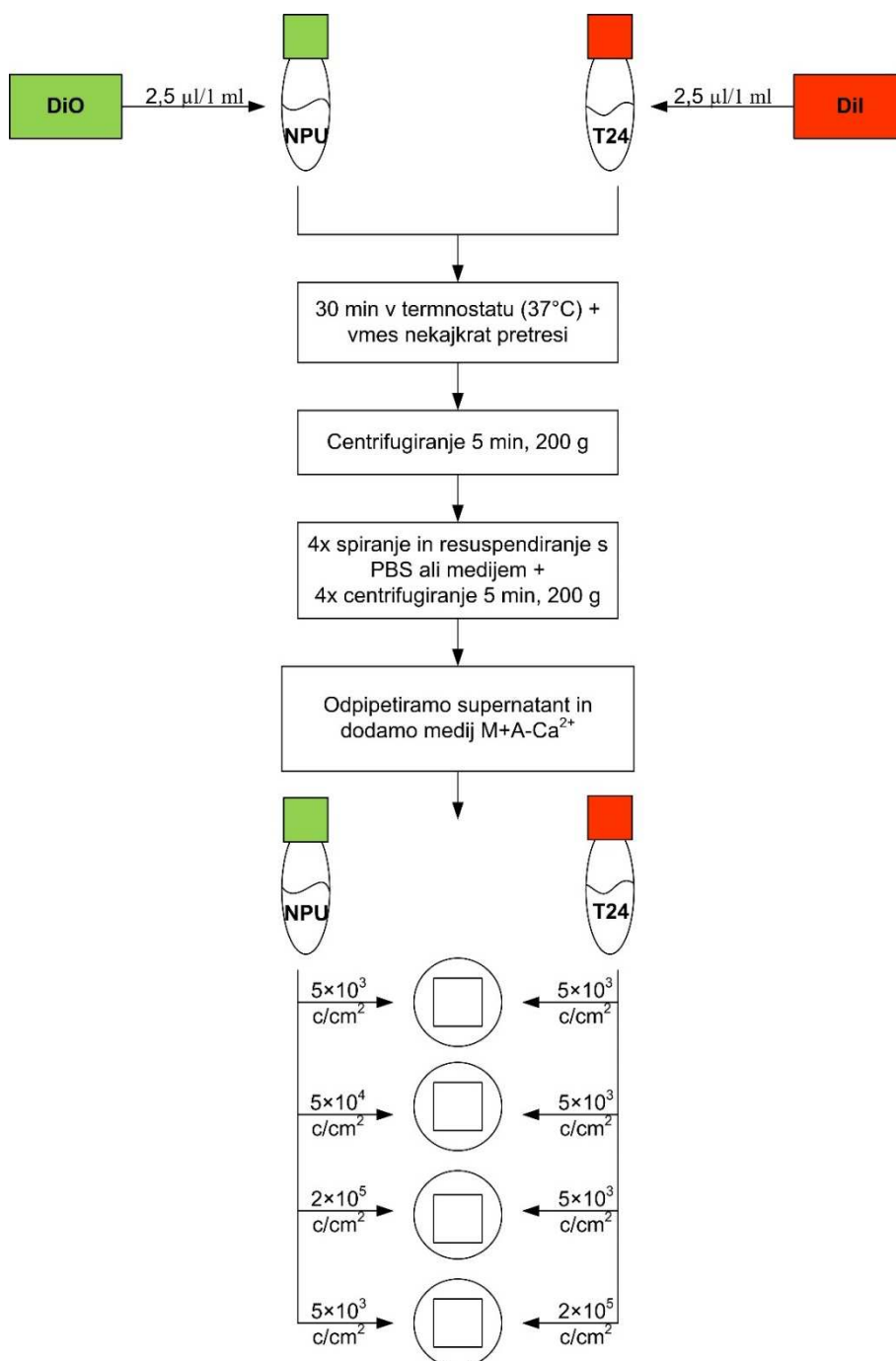
Preglednica 5: Sestavine hranilnega medija za gojenje celic NPU.

Sestavine medija	Proizvajalec, kat. št., količina in/ali koncentracija	Končne koncentracije v mediju	Količina za 100 ml medija
MCDB 153	Sigma, M 7403	50 %	50 ml
A-DMEM	Gibco, 12491-015	50 %	50 ml
Adenin	Sigma, A 2786, 5 g	15 µg/ml	60 µl
Inzulin	Sigma, I 1882, 1 mg	5 µg/ml	50 µl
Hidrokortizon	Sigma, H 0888, 1 g	0,5 µg/ml	100 µl
Fosfoetanolamin	Sigma, P 0503, 1 g	0,1 mM	140 µl
Glutamax	Gibco, 35050-038, 100 ml, 200 mM	4 mM	1 ml
PenStrep	Gibco, 15140-122, 100 ml	100 µg/ml streptomycin, 100 U/ml penicilin	1 ml
FBS	Gibco, 10108-165	2,5 %	2,5 ml

## 3.2 BARVANJE KOKULTUR Z DiI IN DiO

Celice T24 smo barvali z rdečim fluorescenčnim barvilom DiI (Invitrogen Molecular probes), celice NPU pa z zelenim fluorescenčnim barvilom DiO (Invitrogen Molecular probes). Postopek barvanja kokultur je predstavljen na Slika 4. Ko smo izračunali, koliko posamezne celične suspenzije potrebujemo za nasaditev, smo celicam NPU in celicam T24 ločeno dodali 2,5 µl barvila DiI oz. DiO na 1 ml celične suspenzije. Nato smo celice pustili 30 min pri 37 °C. Sledilo je centrifugiranje z 200 g, 5 min. Nato smo celice štirikrat spirali z medijem ali PBS in vsakič vmes centrifugirali z 200 g, 5 min. Po zadnjem centrifugiranju

smo odpipetirali supernatant in celicam v peletu dodali medij za celice NPU (Preglednica 5). Določeno količino celične suspenzije s celicami T24 in celicami NPU smo glede na želeno nasaditveno gostoto združili v petrijevkah s kvadratnim krovnim stekelcem (Brand).



Slika 4: Barvanje kokultur celic T24 in NPU z zelenim fluorescenčnim barvilom DiO in rdečim fluorescenčnim barvilom DiI. Štirje krogi s kvadratom v sredini (na sliki spodaj) predstavljajo štiri petrijevke s krovnim stekelcem, na katerega smo nasadili kokulture celic T24 in celic NPU z različnimi kombinacijami nasaditvenih gostot.

Kokulture celic NPU in T24 smo prvi in drugi dan po nasaditvi fiksirali. Celice v petrijevkah smo dvakrat sprali s PBS in jim dodali fiksativ, 4 % paraformaldehid (PA) v PBS. Celice s fiksativom smo 15 min pustili v hladilniku (4 °C). Nato smo trikrat po 5 min spirali s PBS-jem. Krovna stekelca z obarvanimi celicami smo nato iz petrijevk prenesli na objektna stekla (Paul Marienfeld), na katera smo pred tem kanili kapljico Vectashield z DAPI (Vector Laboratories), ki upočasni bledenje fluorescence, DAPI pa se veže v DNA in jedra obarva modro.

Preparate s celičnimi kokulturami smo poslikali s fluorescenčnim mikroskopom AxioImager Z1, ki je z nastavkom ApoTome omogočal optično rezanje preparatov in 3D rekonstrukcijo optičnih rezin v programu AxioVision.

### 3.3 (IMUNO)OZNAČEVANJE MONOKULTUR IN KOKULTUR RAKAVIH IN NORMALNIH UROTELIJSKIH CELIC

Celice T24 in celice NPU smo gojili na krovnih stekelcih (Brand) v petrijevkah s površino 9,4 cm<sup>2</sup>. Celice T24 smo nasadili z nasaditveno gostoto 5×10<sup>4</sup> c/cm<sup>2</sup>, celice NPU pa z nasaditveno gostoto 1×10<sup>5</sup> c/cm<sup>2</sup>. Celice smo fiksirali in (imuno)označili dva dni po nasaditvi. Pri vsakem poskusu (imuno)označevanja smo naredili tudi negativno kontrolo, pri kateri celic nismo označili s primarnimi protitelesi, ampak le s sekundarnimi protitelesi.

S fluorescenčnimi barvili (imuno)označene celice smo pregledali in poslikali s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa AxioImager Z1 z dodatkom Apotom (Zeiss), ki omogoča optično rezanje in 3D rekonstrukcijo vzorca.

#### 3.3.1 Dvojno označevanje F-aktina in CK7

V celicah T24 in celicah NPU smo označili F-aktin in imunooznačili citokeratin 7 (CK7). F-aktin je po označitvi svetil z zeleno fluorescenco, CK7 pa z rdečo fluorescenco. Označevanje je potekalo po naslednjem protokolu:

1. Celice smo fiksirali s 100 % etanolom (ohlajen na -20 °C; Carlo Erba Reagents), 20 min pri sobni temperaturi.
2. Spirali smo v PBS trikrat po 5 min.

3. Celice smo inkubirali v 2 % BSA v PBS, 30 min pri 37 °C. BSA prepreči nespecifično vezavo primarnih protiteles.
4. Okrogla krovna stekelca s celicami smo prenesli na suho podlago, nanje smo dali 50 µl mešanice primarnih protiteles in inkubirali 1 h pri 37 °C. Spodaj navedena primarna protitelesa smo redčili v 1 % BSA v PBS:
  - Primarna mišja protitelesa proti CK7 (Dako), razredčitev 1:20.
5. Spirali smo v PBS petkrat po 5 min in dvakrat po 10 min.
6. Okrogla krovna stekelca s celicami smo prenesli na suho podlago, nanje smo dali 50 µl mešanice sekundarnih protiteles in inkubirali 1 h pri 37 °C. Spodaj navedena sekundarna protitelesa smo redčili v 1 % BSA v PBS:
  - Sekundarna kozja protitelesa proti mišjim protitelesom (Alexa 555, Invitrogen Molecular Probes Eugene), razredčitev 1:500.
7. Spirali smo v PBS petkrat po 5 min in dvakrat po 10 min.
8. Za označitev F-aktina smo dodali faloidin FITC (Sigma) z razredčitvijo 1:5 v PBS. Inkubirali smo 30 min pri sobni temperaturi.
9. Spirali smo v PBS petkrat po 5 min.
10. Okrogla krovna stekelca s celicami smo prenesli na objektna stekla, na katera smo pred tem kanili kapljico Vectashield z DAPI.

### 3.3.2 Dvojno označevanje F-aktina in $\alpha$ -tubulina

V celicah T24 in celicah NPU smo označili F-aktin in imunooznačili  $\alpha$ -tubulin. F-aktin je po označitvi svetil z zeleno fluorescenco,  $\alpha$ -tubulin pa z rdečo fluorescenco. Označevanje je potekalo po naslednjem protokolu:

1. Celice smo fiksirali v 4 % raztopini PA v PBS, 15 min pri 4 °C.
2. Spirali smo v PBS petkrat po 5 min.
3. Celice smo inkubirali v blokirnem pufri (0,5 % BSA, 0,1 % saponin, 0,1 % želatina, 50 mM NH<sub>4</sub>Cl, 0,02 % NaN<sub>3</sub>), 1 h pri 37 °C.
4. Okrogla krovna stekelca s celicami smo prenesli na suho podlago, nanje smo dali 50 µl mešanice primarnih protiteles in inkubirali 1 h pri 37 °C. Spodaj navedena primarna protitelesa smo redčili v 1 % BSA v PBS:
  - Primarna kunčja protitelesa proti  $\alpha$ -tubulinu (Abcam), razredčitev 1:20.

5. Spirali smo v PBS petkrat po 5 min in dvakrat po 10 min.
6. Okrogla krovna stekelca s celicami smo prenesli na suho podlago, nanje smo dali 50  $\mu$ l mešanice sekundarnih protiteles in inkubirali 1 h pri 37 °C. Spodaj navedena sekundarna protitelesa smo redčili v 1 % BSA v PBS:
  - Sekundarna kozja protitelesa proti kunčjim protitelesom (Alexa 555, Invitrogen Molecular Probes Eugene), razredčitev 1:500.
7. Spirali smo v PBS petkrat po 5 min in dvakrat po 10 min.
8. Za označitev F-aktina smo dodali faloidin FITC z razredčitvijo 1:5 v PBS. Inkubirali smo 30 min pri sobni temperaturi.
9. Spirali smo v PBS petkrat po 5 min.
10. Okrogla krovna stekelca s celicami smo prenesli na objektna stekla, na katera smo pred tem kanili kapljico Vectashield z DAPI.

### 3.3.3 Dvojno imunooznačevanje $\alpha$ -tubulina in CK7

V celicah T24 in celicah NPU smo dvojno imunooznačili  $\alpha$ -tubulin in CK7.  $\alpha$ -tubulin je po imunooznačitvi svetil z zeleno fluorescenco, CK7 pa z rdečo fluorescenco. Imunooznačevanje je potekalo po naslednjem protokolu:

1. Celice smo fiksirali s 100 % metanolom, 5 min pri sobni temperaturi
2. Spirali smo v PBS trikrat po 5 min.
3. Celice smo inkubirali v raztopini 1 % BSA/10 % kozji serum (Dako)/0,3 M glicin (Sigma-Aldrich) v 0,1 % PBS-Tween (Sigma Ultra), 1 h pri 37 °C.
4. Okrogla krovna stekelca s celicami smo prenesli na suho podlago, nanje smo dali 50  $\mu$ l mešanice primarnih protiteles in inkubirali 1 h pri 37 °C. Spodaj navedena primarna protitelesa smo redčili v 1 % BSA v PBS:
  - Primarna kunčja protitelesa proti  $\alpha$ -tubulinu (Abcam), razredčitev 1:20,
  - Primarna mišja protitelesa proti CK7 (Dako), razredčitev 1:20.
5. Spirali smo v PBS petkrat po 5 min in dvakrat po 10 min.
6. Okrogla krovna stekelca s celicami smo prenesli na suho podlago, nanje smo dali 50  $\mu$ l mešanice sekundarnih protiteles in inkubirali 1 h pri 37 °C. Spodaj navedena sekundarna protitelesa smo redčili v 1 % BSA v PBS:

- Sekundarna kozja protitelesa proti kunčjim protitelesom (Alexa 488, Invitrogen Molecular Probes Eugene), razredčitev 1:500,
  - Sekundarna kozja protitelesa proti mišjim protitelesom (Alexa 555, Invitrogen Molecular Probes Eugene), razredčitev 1:500.
7. Spirali smo v PBS petkrat po 5 min in dvakrat po 10 min.
  8. Okrogla krovna stekelca s celicami smo prenesli na objektna stekla, na katera smo pred tem kanili kapljico Vectashield z DAPI.

### 3.3.4 Dvojno imunooznačevanje N-kadherina in E-kadherina

Celice T24 in NPU smo nasadili v kokulturi in jih dva dni po nasaditvi imunooznačili. Celice T24 smo nasadili z nasaditveno gostoto  $5 \times 10^3$  c/cm<sup>2</sup>, celice NPU z nasaditveno gostoto  $2 \times 10^5$  c/cm<sup>2</sup>. V kokulturi smo dvojno imunooznačili N-kadherin in E-kadherin. E-kadherin je po imunooznačitvi svetil z zeleno fluorescenco, N-kadherin pa z rdečo fluorescenco. V primeru imunooznačevanja monokultur z N-kadherinom ali E-kadherinom smo uporabili enak protokol, kot pri dvojnem imunooznačevanju, le da smo tudi N-kadherin označili z zeleno fluorescenco. Imunooznačevanje je potekalo po naslednjem protokolu:

1. Celice smo fiksirali v 4 % raztopini PA v PBS, 15 min pri 4 °C.
2. Spirali smo v PBS petkrat po 5 min.
3. Celice smo inkubirali v blokirnem in permeabilizacijskem puftru (0,5 % BSA, 0,1 % saponin, 0,1 % želatina, 50 mM NH<sub>4</sub>Cl, 0,02 % NaN<sub>3</sub>), 30 min pri 37 °C.
4. Krovna stekelca s celicami smo prenesli na suho podlago, nanje smo dali mešanico primarnih protiteles in inkubirali 1 h pri 37 °C. Spodaj navedena primarna protitelesa smo redčili v 1 % BSA v PBS:
  - Primarna kunčja protitelesa proti N-kadherinu (Abcam), razredčitev 1:100,
  - Primarna mišja protitelesa proti E-kadherinu (BD, Transduction Lab.), razredčitev 1:20.
5. Spirali smo v PBS petkrat po 5 min in dvakrat po 10 min.
6. Krovna stekelca s celicami smo prenesli na suho podlago, nanje smo dali mešanico sekundarnih protiteles in inkubirali 2 h pri sobni temperaturi. Spodaj navedena sekundarna protitelesa smo redčili v 1 % BSA v PBS:

- Sekundarna kozja protitelesa proti kunčjim protitelesom (Alexa 555, Invitrogen Molecular Probes Eugene), razredčitev 1:400,
  - Sekundarna kozja protitelesa proti mišjim protitelesom (Alexa 488, Invitrogen Molecular Probes Eugene), razredčitev 1:400.
7. Spirali smo v PBS petkrat po 5 min, dvakrat po 10 min.
  8. Krovna stekelca s celicami smo prenesli na objektna stekla, na katera smo pred tem kanili kapljico Vectashield z DAPI.

### 3.3.5 Trojno označevanje F-aktina, $\alpha$ -tubulina in CK7

Celice T24 smo nasadili z nasaditveno gostoto  $5 \times 10^3$  c/cm<sup>2</sup>, celice NPU pa z nasaditveno gostoto  $1 \times 10^5$  c/cm<sup>2</sup>. Celice smo dva dni po nasaditvi (imuno)označili. F-aktin je po označitvi svetil modro,  $\alpha$ -tubulin po imunooznačitvi zeleno in CK7 po imunooznačitvi rdeče. Označevanje je potekalo po naslednjem protokolu:

1. Celice smo enkrat sprali v PBS.
2. Celice smo fiksirali in sočasno naredili ekstrakcijo v 3,7 % formalinu v pufri PEM/TX, 5 min pri sobni temperaturi.
3. Spirali smo v PBS trikrat po 5 min
4. Celice smo dodatno fiksirali v 4 % raztopini formalina, segreti na 37 °C, 5 min pri sobni temperaturi.
5. Spirali smo v PBS petkrat v 20 min.
6. Naredili smo blokado v raztopini 1 % BSA/10 % kozjem serumu v PBS, 30 min pri sobni temperaturi.
7. Krovna stekelca s celicami smo prenesli na suho podlago, nanje smo dali mešanico primarnih protiteles in inkubirali 1 h pri 37 °C. Spodaj navedena primarna protitelesa smo redčili v 1 % BSA v PBS:
  - Primarna kunčja protitelesa proti  $\alpha$ -tubulinu (Abcam), razredčitev 1:20,
  - Primarna mišja protitelesa proti CK7 (Dako), razredčitev 1:40.
8. Spirali smo v PBS petkrat v 20 min in 10 min.
9. Krovna stekelca s celicami smo prenesli na suho podlago, nanje smo dali mešanico sekundarnih protiteles in inkubirali 1 h pri 37 °C. Spodaj navedena sekundarna protitelesa smo redčili v 1 % BSA v PBS:



- Sekundarna kozja protitelesa proti kunčjim protitelesom (Alexa 488, Invitrogen Molecular Probes Eugene), razredčitev 1:500,
  - Sekundarna kozja protitelesa proti mišjim protitelesom (Alexa 555, Invitrogen Molecular Probes Eugene), razredčitev 1:500.
10. Spirali smo v PBS petkrat v 20 min in 10 min.
  11. Celice smo dodatno fiksirali v 4 % raztopini formalina, segretega na 37 °C, 15 min pri sobni temperaturi.
  12. Spirali smo v PBS petkrat v 20 min.
  13. Za označitev F-aktina smo dodali Faloidin-350 nm (Alexa Fluor, Invitrogen) z razredčitvijo 1:5 v PBS. Inkubirali smo 1 h pri sobni temperaturi.
  14. Spirali smo v PBS petkrat v 20 min in 10 min.
  15. Krovna stekelca s celicami smo prenesli na objektna stekla, na katera smo pred tem kanili kapljico Vectashield z DAPI.

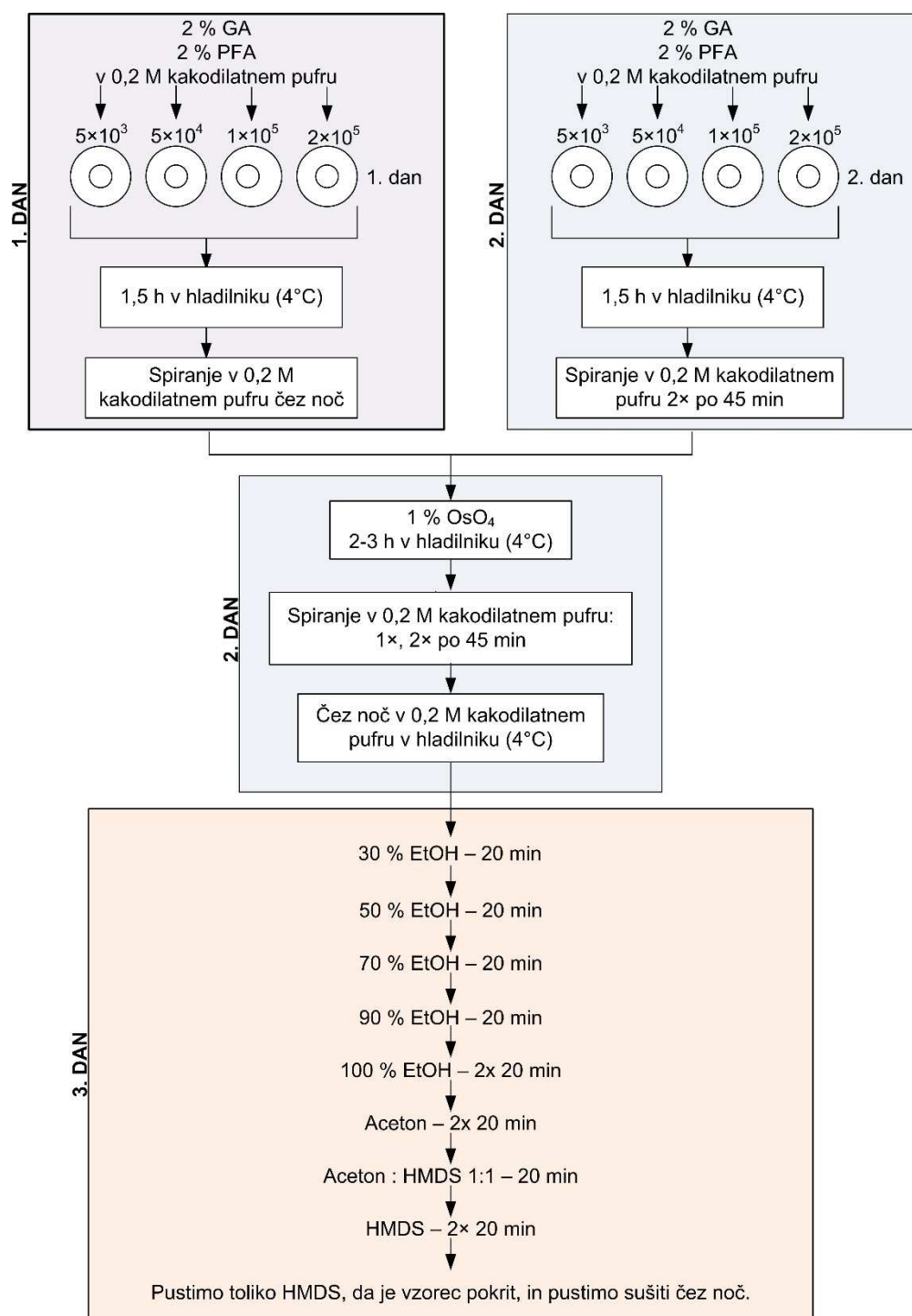
#### 3.4 PRIPRAVA VZORCEV ZA VRSTIČNO ELEKTRONSKO MIKROSKOPIJO

Celice T24 in celice NPU smo nasadili na petrijevke s površino 9,4 cm<sup>2</sup>, in sicer s štirimi nasaditvenimi gostotami, ki smo jih uporabili že pri gojenju monokultur (glej poglavje 3.1.1.2 Nasaditev celic). V vsako petrijevko smo dali okroglo krovno stekelce (Brand), na katerem so rasle celice. Vzorce celic za vrstično elektronsko mikroskopijo smo pripravili prvi in drugi dan po nasaditvi po naslednjem protokolu (Slika 5):

1. Stekelca s celicami, ki smo jih gojili en dan, smo prelili z 2 % GA (glutaraldehyd) in 2 % PA (paraformaldehid v destilirani vodi) v 0,2 M kakodilatnem pufru in inkubirali 1,5 h pri 4 °C.
2. Spirali smo v 0,2 M kakodilatnem pufru čez noč v hladilniku.
3. Naslednji dan smo na celicah, ki smo jih gojili dva dni, ponovili zgoraj opisan postopek, le da smo celice v 0,2 M kakodilatnem pufru spirali dvakrat po 45 min. Naprej smo postopek izvajali na celicah prvega in drugega dne hkrati.
4. Stekelca s celicami smo prelili z 1 % OsO<sub>4</sub> (Serva Electrophosis) in pustili 2 do 3 h pri 4 °C, v temi (osmiranje celic).
5. Spirali smo v 0,2 M kakodilatnem pufru, najprej enkrat po 45 min, potem pa dvakrat po 45 min.

6. Celice smo čez noč pustili v 0,2 M kakodilatnem pufru pri 4 °C.
7. Dodajali smo naraščajoče koncentracije alkoholov (Carlo Erba Reagents):
  - 30 % EtOH za 20 min,
  - 50 % EtOH za 20 min,
  - 70 % EtOH za 20 min,
  - 90 % EtOH za 20 min,
  - 100 % EtOH dvakrat za 20 min.
8. Celice smo inkubirali v acetonu (Carlo Erba Reagents), dvakrat po 20 min. Če stekelca prej še niso bila v steklenih petrijevkah, smo jih prestavili pred tem korakom.
9. Celice smo prelili z raztopino aceton : HMDS v razmerju 1:1 in pustili 20 min.
10. Celice smo inkubirali v HMDS dvakrat po 20 min. Na koncu smo ga pustili toliko, da je bil vzorec prekrit. Vzorec smo pustili v digestoriju čez noč, da se je posušil.

Tako pripravljene vzorce celic smo opazovali z vrstičnim elektronskim mikroskopom (Jeol, JSM-840A).



Slika 5: Postopek priprave vzorcev za vrstično elektronsko mikroskopijo. V petrijevke z okroglimi stekelci smo prelili 2 % GA (glutaraldehyd) in 2 % PA (paraformaldehyd) v 0,2 M kakodilatnem pufru. Ker smo imeli petrijevke s celicami prvega in drugega dne, se prvi del postopka pri ena in dva dni starih celicah nekoliko razlikuje. S tem smo omogočili, da smo drugi in tretji dan postopka opravili na vseh vzorcih hkrati. Tretji dan je sledila dehidracija vzorcev z alkoholi, acetonom in HMDS.

### 3.5 MIKROSKOPIRANJE ŽIVIH CELIC

Celice T24 smo nasadili z nasaditveno gostoto  $5 \times 10^4$  c/cm<sup>2</sup> na petrijevke s površino 9,4 cm<sup>2</sup>, celice NPU pa z nasaditveno gostoto  $1 \times 10^5$  c/cm<sup>2</sup>. Celice smo dva dni po nasaditvi opazovali z mikroskopom AxioImager Z1 (Zeiss). Pred snemanjem smo v petrijevko s celicami dali 1740 µl hranilnega medija, ki je ustrezal tipu celic (glej poglavje 3.1.3 Hranilni medij) in 20 mM Hepesa. S potopnim objektivom (63 × povečava, fazni-kontrast) in s pomočjo programa AxioVision smo v 3D posneli območja v celični monokulturi, kjer so se tvorile TnT. Celice smo slikali v pet sekundnih intervalih.

### 3.6 ŠTETJE CELIC V PETRIJEVKAH

Za določevanje števila živih celic v posamezni petrijevki smo uporabili postopek štetja celic, ki je opisan v poglavju 3.1.1.1 Presajanje in štetje celic. Prešteli smo celice v štirih petrijevkah, v vsaki so bile celice nasajene z eno od štirih nasaditvenih gostot, ki smo jih uporabili v monokulturah (glej poglavje 3.1.1.2 Nasaditev celic). Tako celice NPU kot celice T24 smo šteli prvi in drugi dan po nasaditvi.

### 3.7 ANALIZA SLIK IN STATISTIČNA ANALIZA

#### 3.7.1 Indeks celične oblike

Obliko celic smo ugotavljali s pomočjo indeksa celične oblike (ICO), ki smo ga izračunali po spodnji enačbi (2) (Pelipenko in sod., 2014). Za izračun smo iz slik, narejenih z invertnim mikroskopom (Leica), s programom ImageJ izmerili perimeter celice (najdaljši premer celice) in površino celice. Celice, katerih ICO je bližje vrednosti 1, so bolj kroglaste oblike, celice z ICO bližje 0 pa so bolj podolgovate oblike (Pelipenko in sod., 2014).

$$ICO = 4\pi \frac{\text{površina}}{\text{perimeter}^2} \quad \dots (2)$$

#### 3.7.2 TnT v monokulturi in kokulturi rakavih in normalnih urotelijskih celic

TnT, ki smo jih v monokulturah celic T24 in NPU na posameznih petrijevkah našli z invertnim mikroskopom (Leica), smo prešteli in jim s programom ImageJ izmerili dolžino.

V kokulturah celic T24 in NPU smo prešteli TnT, ki smo jih našli s fluorescenčnim mikroskopom AxioImager Z1 (Zeiss). Celice T24 so bile obarvane z rdečim fluorescenčnim barvilom DiI, celice NPU pa z zelenim fluorescenčnim barvilom DiO. Ločeno smo šteli TnT, ki so jih celice T24 tvorile na celice NPU in obratno.

### **3.7.3 Konfluentnost celic v petrijevki**

Za izračun odstotka preraščenosti petrijevke s celicami (konfluentnost celičnih monokultur) smo z invertnim mikroskopom (Leica) pri 40× lastni povečavi mikroskopa poslikali naključna vidna polja posamezne petrijevke. S programom ImageJ smo nato izmerili površino celic v petrijevki in izračunali konfluentnost celičnih monokultur.

### **3.7.4 Statistična analiza podatkov**

Rezultate smo statistično obdelali v programu Excel. Homogenost varianc smo preverili z Levenovim testom. Če so bile variance homogene, smo za testiranje statistično značilnih razlik uporabili Anovo in Tukey-Kramerjev test. Če variance niso bile homogene, smo za testiranje statistično značilnih razlik uporabili Welchov test in Games-Howellov test. Statistično značilna razlika je bila pri  $p < 0,05$ .

## 4 REZULTATI

### 4.1 LASTNOSTI TnT V MONOKULTURI RAKAVIH ALI NORMALNIH UROTELIJSKIH CELIC

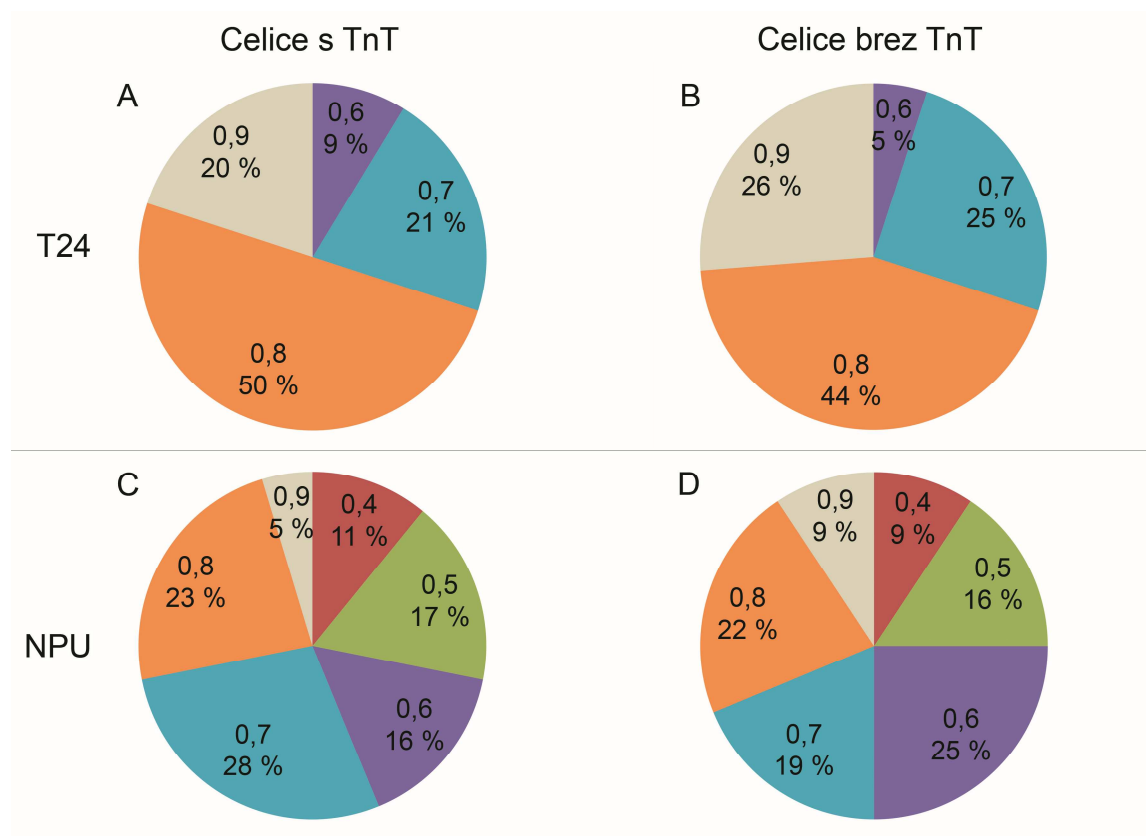
Monokulture celic T24 in celic NPU smo nasadili s štirimi različnimi nasaditvenimi gostotami ( $5 \times 10^3$  c/cm<sup>2</sup>,  $5 \times 10^4$  c/cm<sup>2</sup>,  $1 \times 10^5$  c/cm<sup>2</sup> in  $2 \times 10^5$  c/cm<sup>2</sup>) in jih gojili en ali dva dni v petrijevkah s površino 9,4 cm<sup>2</sup> en ali dva dni. Nato smo z invertnim mikroskopom (Leica) pregledali celotno površino petrijevke s celicami in področja, kjer smo našli TnT, tudi slikali. TnT smo prešteli in jim izmerili dolžino in premer. Celicam smo izmerili površino in perimeter, da bi proučili, ali tvorba TnT vpliva na obliko celic.

#### 4.1.1 Vpliv TnT na obliko rakavih urotelijskih celic in normalnih urotelijskih celic

Z računanjem indeksa celične oblike (ICO) posameznih celic smo želeli ugotoviti, ali TnT vplivajo na obliko celic. Celice z ICO bližje vrednosti 0 (manjši od 0,6) so bile podolgovate oblike, medtem ko so bile celice, ki so imele ICO bližje 1 (večji ali enak 0,6), kroglaste oblike (Pelipenko in sod., 2014). ICO smo izračunali celicam, ki so imele eno ali več TnT. Za primerjavo smo ICO izračunali še celicam, ki niso tvorile oz. niso bile povezane s TnT. Podrobnejše meritve so prikazane v Prilogi A.

Kot prikazuje Slika 6A, so celice T24, ki imajo eno ali več TnT, večinoma kroglaste oblike, saj je imelo 50 % izmerjenih celic ICO 0,8 in 20 % celic ICO 0,9. Poleg tega ni bilo celic, katerih ICO bi bil manjši od 0,6.

Celice NPU, ki so imele eno ali več TnT, so bile različnih oblik (Slika 6C). Večina celic je bila kroglaste oblike, saj je imelo več kot 50 % izmerjenih celic ICO večji od 0,5. Za razliko od celic T24 smo pri celicah NPU opazili tudi celice podolgovate oblike z ICO manjšim od 0,6. ICO 0,5 je imelo 17 % celic NPU, ICO 0,4 pa 11 % celic NPU. Poleg tega je imelo le 5 % celic NPU ICO 0,9.



Slika 6: Indeks celične oblike (ICO). (A) ICO pri celicah T24, ki so imele eno ali več TnT. (B) ICO pri celicah T24, ki niso imele TnT. (C) ICO pri celicah NPU, ki so imele eno ali več TnT. (D) ICO pri celicah NPU, ki niso imele TnT. Celice z ICO bližje 0 (manjši od 0,6), so bile podolgovate oblike, med tem ko so bile celice, ki so imele ICO bližje 1 (večji ali enak 0,6), kroglaste oblike. Tako pri celicah T24 kot pri celicah NPU ni bilo razlik v obliki celic s TnT in celic brez TnT. Celice T24 so bile kroglaste oblike, celice NPU pa so bile kroglaste in podolgovate oblike.

Da bi ugotovili, ali TnT vplivajo na osnovno obliko celice, smo ICO izračunali še celicam, ki niso imele TnT. Na Slika 6B in 6D je razvidno, da se oblika naključno izbranih celic brez TnT ni bistveno razlikovala od celic s TnT. Vse izmerjene celice T24 so imele kljub odsotnosti TnT ICO večji od 0,5. Pri celicah NPU smo sicer opazili nekoliko večji odstotek celic z ICO nad 0,5 (75 %), vendar je imela četrtnina celic NPU ICO 0,4 in 0,5, torej podolgovato obliko. ICO se torej ohranja ne glede na to, ali celice tvorijo TnT ali ne.

#### 4.1.2 Število TnT v monokulturi rakavih urotelijskih celic in normalnih urotelijskih celic

Celice smo v petrijevkah gojili s štirimi nasaditvenimi gostotami. Prvi in drugi dan po nasaditvi smo pri posameznih gostotah nasaditve prešteli TnT. Upoštevali smo, da TnT ne

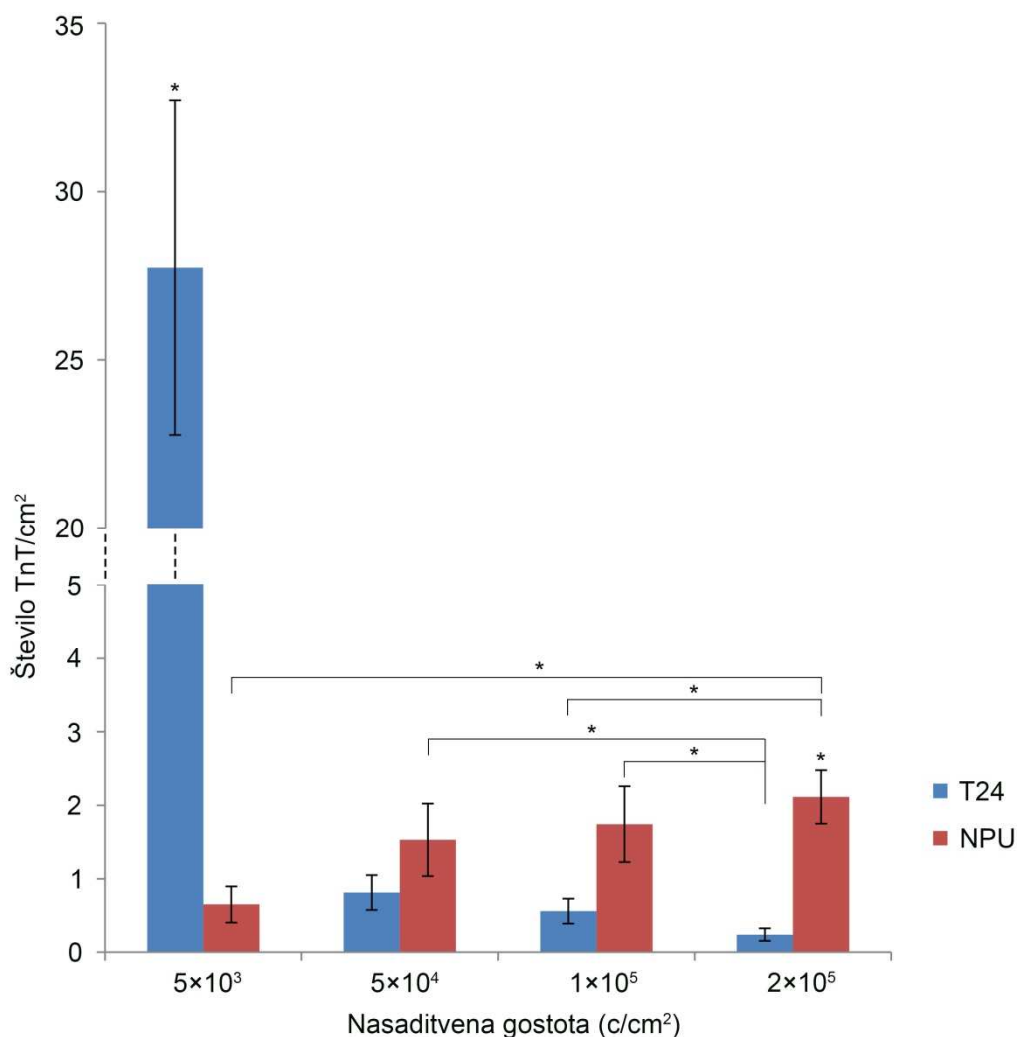
smejo biti krajše od 10  $\mu\text{m}$ . Ker v številu TnT med prvim in drugim dnevom gojenja, tako pri celicah T24 kot pri celicah NPU, ni bilo statistično značilnih razlik, smo meritve združili. Rezultati združenih meritev so prikazani na Slika 7. Podrobnejše meritve združenega prvega in drugega dne so prikazane v Prilogi C. Podrobnejše meritve, ločene na meritve prvega in drugega dne, so prikazane v Prilogi B, točki a. Rezultati ločeni na meritve prvega in drugega dne so prikazani v Prilogi B, točki b.

Statistično značilno največ TnT so tvorile celice T24 pri nasaditveni gostoti  $5 \times 10^3 \text{ c/cm}^2$ , povprečno 28 TnT/cm<sup>2</sup>. Pri ostalih nasaditvenih gostotah je bilo TnT manj, povprečno manj kot 1 TnT/cm<sup>2</sup>. Najmanj TnT so tvorile celice T24 pri nasaditveni gostoti  $2 \times 10^5 \text{ c/cm}^2$ , povprečno 0,2 TnT/cm<sup>2</sup>. V številu TnT, ki so jih tvorile celice T24, med nasaditvenimi gostotami  $5 \times 10^4 \text{ c/cm}^2$ ,  $1 \times 10^5 \text{ c/cm}^2$  in  $2 \times 10^5 \text{ c/cm}^2$  ni bilo statistično značilnih razlik, opazili smo le trend manjšanja števila TnT z večanjem nasaditvene gostote .

Celice NPU so pri nasaditveni gostoti  $2 \times 10^5 \text{ c/cm}^2$  tvorile statistično značilno več TnT kot pri nasaditveni gostoti  $5 \times 10^3 \text{ c/cm}^2$ . Celice NPU so pri nasaditveni gostoti  $5 \times 10^3 \text{ c/cm}^2$  tvorile povprečno 0,6 TnT/cm<sup>2</sup>, pri nasaditveni gostoti  $2 \times 10^5 \text{ c/cm}^2$  pa povprečno 2,1 TnT/cm<sup>2</sup>. Med ostalimi nasaditvenimi gostotami ni bilo statistično značilnih razlik, opazili smo le trend večanja števila TnT z večanjem nasaditvene gostote. Vendar pa to ne pomeni, da bi se, če bi uporabljali še večje nasaditvene gostote, trend večanja števila TnT nadaljeval. Možno je, da bi se s še večjimi nasaditvenimi gostotami število TnT zmanjšalo.

Celice T24 so pri nasaditveni gostoti  $5 \times 10^3 \text{ c/cm}^2$  tvorile statistično značilno več TnT kot celice NPU pri vseh štirih nasaditvenih gostotah. Celice T24 so pri nasaditveni gostoti  $2 \times 10^5 \text{ c/cm}^2$  tvorile statistično značilno manj TnT kot celice NPU pri nasaditveni gostoti  $5 \times 10^4 \text{ c/cm}^2$ ,  $1 \times 10^5 \text{ c/cm}^2$  in  $2 \times 10^5 \text{ c/cm}^2$ . Celice NPU so pri nasaditveni gostoti  $2 \times 10^5 \text{ c/cm}^2$  tvorile statistično značilno več TnT kot celice T24 pri nasaditveni gostoti  $1 \times 10^5 \text{ c/cm}^2$ .





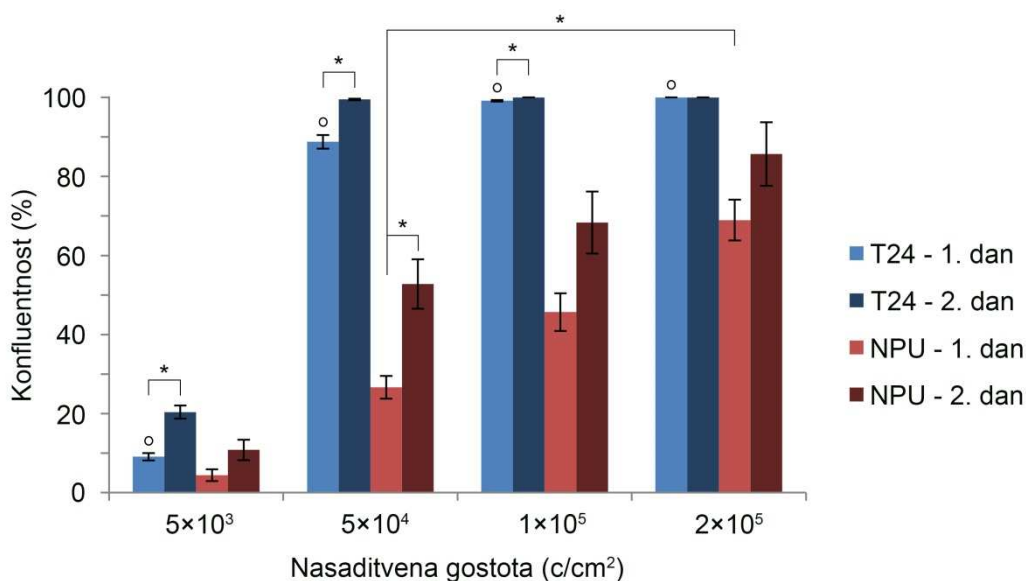
Slika 7: Število TnT/cm<sup>2</sup> v monokulturi celic T24 in celic NPU z združenimi podatki prvega in drugega dne gojenja. Največ TnT je bilo med celicami T24 pri nasaitveni gostoti 5×10<sup>3</sup> c/cm<sup>2</sup>, ko so se celice združevale v manjše otočke. Pri ostalih nasaitvenih gostotah, ko so celice T24 preraščale večji del ali celotno gojilno površino, je bilo manj TnT. Pri celicah NPU je bilo pri nasaitveni gostoti 2×10<sup>5</sup> c/cm<sup>2</sup>, ko so celice rasle v večjih otočkih, statistično značilno več TnT kot pri nasaitveni gostoti 5×10<sup>3</sup> c/cm<sup>2</sup>, ko so celice rasle posamezno ali v manjših otočkih. \* p < 0,05.

#### 4.1.2.1 Vpliv rasti rakavih urotelijskih celic in normalnih urotelijskih celic na število TnT

Za lažjo interpretacijo razlik med posameznimi nasaitvenimi gostotami v monokulturah celic T24 in celic NPU smo prvi in drugi dan gojenja pri vseh nasaitvenih gostotah izračunali odstotek preraščenosti površine gojilne podlage s celicami (konfluentnost). Želeli smo proučiti vpliv rasti celic na število TnT. Podrobnejše meritve so prikazane v Prilogi D.

V monokulturi celic T24 je konfluentnost, z večanjem nasaditvene gostote naraščala (Slika 8). Prvi dan gojenja je bila konfluentnost pri nasaditveni gostoti  $5 \times 10^3$  c/cm<sup>2</sup> povprečno 9 %, pri  $5 \times 10^4$  c/cm<sup>2</sup> povprečno 89 %, pri  $1 \times 10^5$  c/cm<sup>2</sup> povprečno 99 % in pri  $2 \times 10^5$  c/cm<sup>2</sup> povprečno 100 %. Med naštetimi konfluentnostmi je bila statistično značilna razlika. Drugi dan gojenja je bila konfluentnost pri nasaditveni gostoti  $5 \times 10^3$  c/cm<sup>2</sup> povprečno 20 %. Ta konfluentnost je bila statistično značilno manjša od konfluentnosti ostalih treh nasaditvenih gostot, ki so znašale povprečno 100 %. Celice T24 so pri nasaditveni gostoti  $5 \times 10^3$  c/cm<sup>2</sup> rastle posamezno ali pa so se že združevale v manjše otočke (Slika 9A in 9B), medtem ko so pri ostalih nasaditvenih gostotah celice skoraj ali že povsem preraščale gojilno površino (Slika 9C, 9D, 9E, 9F, 9G in 9H).

V monokulturah celice T24 je bila konfluentnost prvi dan gojenja pri posameznih nasaditvenih gostotah statistično značilno manjša od konfluentnosti drugega dne gojenja. Izjema so bile celice T24 pri nasaditveni gostoti  $2 \times 10^5$  c/cm<sup>2</sup>, saj so celice že prvi dan preraščale celotno gojilno površino. Monokulture celic T24 so torej rastle zelo hitro.



Slika 8: Graf konfluentnosti (odstotka preraščenostigojilne površine s celicami). Konfluentnost je z večanjem nasaditvene gostote naraščala. V monokulturi celic T24 je bila konfluentnost posameznih nasaditvenih gostot drugega dne gojenja statistično značilno večja od konfluentnosti prvega dne gojenja, razen pri nasaditveni gostoti  $2 \times 10^5$  c/cm<sup>2</sup>. V monokulturi celic NPU je bila konfluentnost drugega dne gojenja statistično značilno večja od prvega dne gojenja le pri nasaditveni gostoti  $5 \times 10^4$  c/cm<sup>2</sup>. Celice T24 so že pri nasaditveni gostoti  $5 \times 10^4$  c/cm<sup>2</sup> preraščale skoraj celotno gojilno površino, celice NPU pa pri nobeni nasaditveni gostoti niso preraščale celotne gojilne površine. \*p < 0,05. °Med vsemi kombinacijami nasaditvenih gostot je statistično značilna razlika, p < 0,05.

V monokulturi celic T24 je bilo največ TnT (povprečno 28 TnT/cm<sup>2</sup>) med celicami, ki so se združevale v manjših otočkih (Slika 9A in 9B), konfluentnost celic je v tem primeru znašala med 10 in 20 %. Celice T24 so tvorile manj TnT (povprečno manj kot 1 TnT/cm<sup>2</sup>), ko so rastle tesno skupaj in so preraščale že večji del gojilne površine, konfluentnost je v tem primeru znašala več kot 80 %.

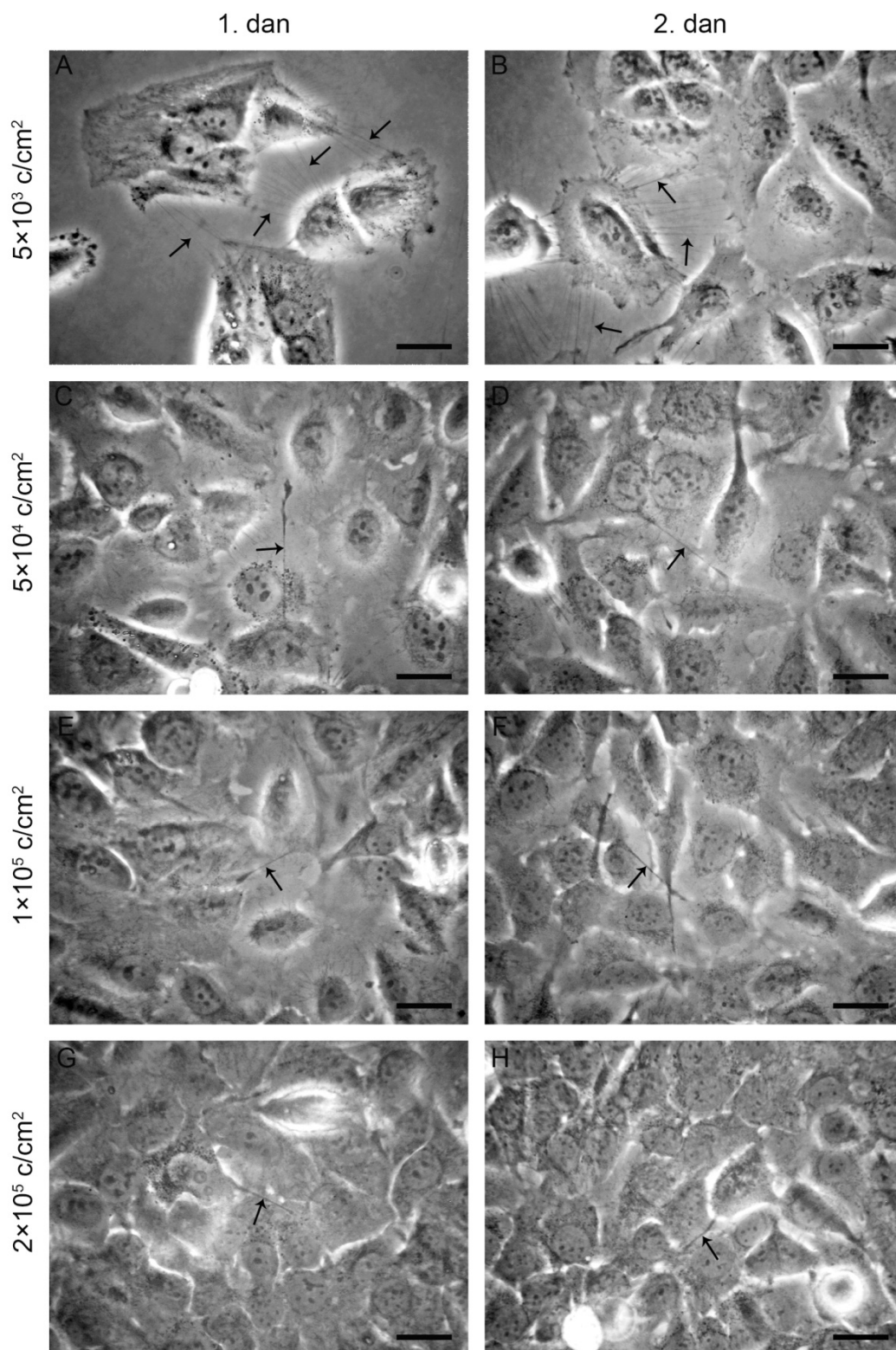
V monokulturi celic NPU je konfluentnost, tako kot v monokulturi celic T24, z večanjem nasaditvene gostote naraščala (Slika 8). Prvi dan gojenja je bila konfluentnost celic NPU pri nasaditveni gostoti  $5 \times 10^3$  c/cm<sup>2</sup> povprečno 4,4 %, pri  $5 \times 10^4$  c/cm<sup>2</sup> povprečno 27 %, pri  $1 \times 10^5$  c/cm<sup>2</sup> povprečno 46 % in pri  $2 \times 10^5$  c/cm<sup>2</sup> povprečno 69 %. Konfluentnost celic NPU je bila prvi dan gojenja pri nasaditveni gostoti  $5 \times 10^3$  c/cm<sup>2</sup> statistično značilno manjša od konfluentnosti ostalih nasaditvenih gostot prvega dne gojenja. Konfluentnost celic NPU je bila prvi dan gojenja pri nasaditveni gostoti  $5 \times 10^4$  c/cm<sup>2</sup> statistično značilno manjša od konfluentnosti prvega dne gojenja pri nasaditveni gostoti  $2 \times 10^5$  c/cm<sup>2</sup>. Drugi dan gojenja je bila konfluentnost celic NPU pri nasaditveni gostoti  $5 \times 10^3$  c/cm<sup>2</sup> povprečno 11 %, pri  $5 \times 10^4$  c/cm<sup>2</sup> povprečno 53 %, pri  $1 \times 10^5$  c/cm<sup>2</sup> povprečno 68 % in pri  $2 \times 10^5$  c/cm<sup>2</sup> povprečno 86 %. Konfluentnost celic NPU je bila drugi dan gojenja pri nasaditveni gostoti  $5 \times 10^3$  c/cm<sup>2</sup> statistično značilno manjša od ostalih nasaditvenih gostot drugega dne gojenja. Celice NPU so pri nasaditveni gostoti  $5 \times 10^3$  c/cm<sup>2</sup> rastle posamezno ali v manjših otočkih (Slika 10A in 10B), medtem ko so pri ostalih nasaditvenih gostotah rastle v večjih otočkih (Slika 10C, 10D, 10E, 10F, 10G in 10H).

V monokulturi celic NPU je bila konfluentnost prvi dan gojenja pri nasaditveni gostoti  $5 \times 10^4$  c/cm<sup>2</sup> statistično značilno manjša od konfluentnosti drugega dne gojenja. Pri ostalih nasaditvenih gostotah ni bilo statistično značilnih razlik v konfluentnosti med prvim in drugim dnem gojenja. Monokulture celic NPU so torej rastle počasneje kot monokulture celic T24.

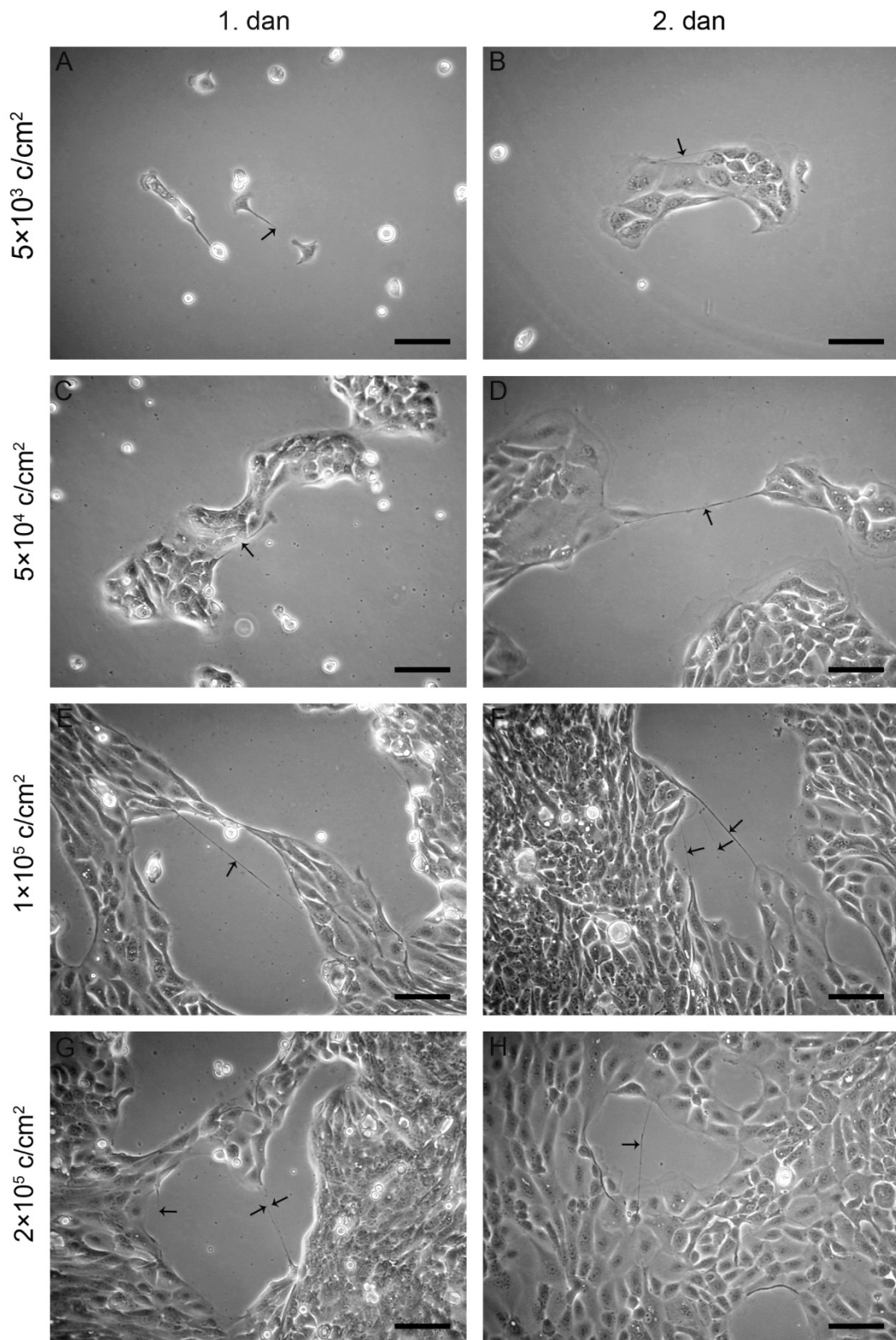
Celice NPU so tvorile statistično značilno več TnT med celicami, ki so se združevale v večjih otočkih (povprečno število TnT 2,1 TnT/cm<sup>2</sup>, Slika 10G in 10H), konfluentnost je v tem primeru znašala med 68 in 86 %, kot med celicami, ki so rastle posamezno ali v manjših otočkih (povprečno število TnT 0,7 TnT/cm<sup>2</sup>, Slika 10A in 10B), konfluentnost je v tem

primeru znašala med 4 in 11 %. Celice T24 so tvorile največ TnT med celicami, ki so se združevale v manjših otočkih. Celice T24 so se povezovale v manjše otočke pri manjši konfluentnosti, ki je znašala med 10 in 20 %. Celice NPU so tvorile največ TnT med celicami, ki so se združevale v večje otočke. Celice NPU so se povezovale v večje otočke pri večji konfluentnosti, ki je znašala nad 27 %.

Monokulture celic T24 so rastle zelo hitro. Pri nasaditveni gostoti  $5 \times 10^3$  c/cm<sup>2</sup> so namreč še rastle posamezno ali v manjših otočkih, pri večjih nasaditvenih gostotah pa so že skoraj ali povsem preraščale gojilno površino. Največ TnT so celice T24 tvorile pri nasaditveni gostoti  $5 \times 10^3$  c/cm<sup>2</sup>. Monokulture celic NPU so rastle počasneje kot monokulture celic T24. Pri nasaditveni gostoti  $5 \times 10^3$  c/cm<sup>2</sup> so rastle posamezno ali v manjših otočkih, pri večjih nasaditvenih gostotah pa so se združevale v večje otočke, nikoli pa niso preraščale celotne gojilne površine. Celice NPU so pri nasaditveni gostoti  $2 \times 10^5$  c/cm<sup>2</sup> tvorile statistično značilno več TnT kot pri nasaditveni gostoti  $5 \times 10^3$  c/cm<sup>2</sup>.



Slika 9: TnT med rakavimi urotelijskimi celicami T24 pri različnih nasaditvenih gostotah, prvi in drugi dan gojenja. (A in B) Največ TnT je bilo med celicami, ki so se združevale v manjših otočkih, ko monokultura še ni bila konfluentna. Posamezne TnT so označene s črno puščico. Posneto z invertnim mikroskopom. Merila: 25  $\mu$ m.

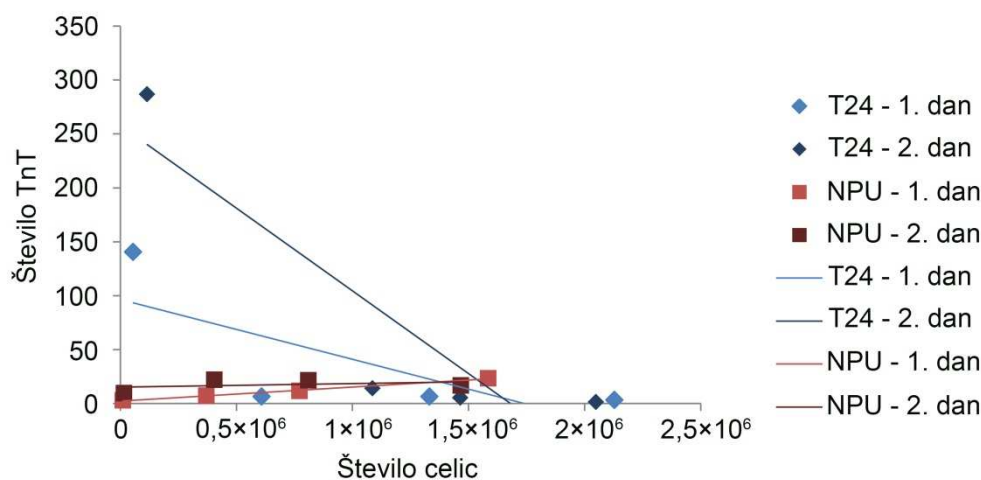


Slika 10: TnT med normalnimi urotelijskimi celicami NPU pri različnih gostotah nasaditve, prvi in drugi dan gojenja. Največ TnT je bilo med celicami, ki so se združevale v večje otočke, ko je bila konfluentnost monokulture več kot 27 %. Posamezne TnT so označene s črno puščico. Posneto z invertnim mikroskopom. Merila: 100  $\mu$ m.

#### 4.1.2.2 Vpliv števila rakavih urotelijskih celic in normalnih urotelijskih celic na število TnT

Celice smo v vsaki petrijevki pri vseh štirih nasaditvenih gostotah prešteli. S tem smo ugotavljali, ali število celic vpliva na število TnT. Podrobnejše meritve so prikazane v Prilogi E.

Pri celicah T24 je bilo število TnT večje pri manjšem številu celic (Slika 11). Pri večjem številu celic je število TnT upadlo. Tu je potrebno poudariti, da so TnT povezovalne celice, ki so se združevale v manjše otočke, torej ne zelo oddaljene celice. Pri celicah NPU ni bilo tako opaznega vpliva števila celic na število TnT. Vseeno pa je na Sliki 11 razvidno večanje števila TnT z večanjem števila celic NPU.



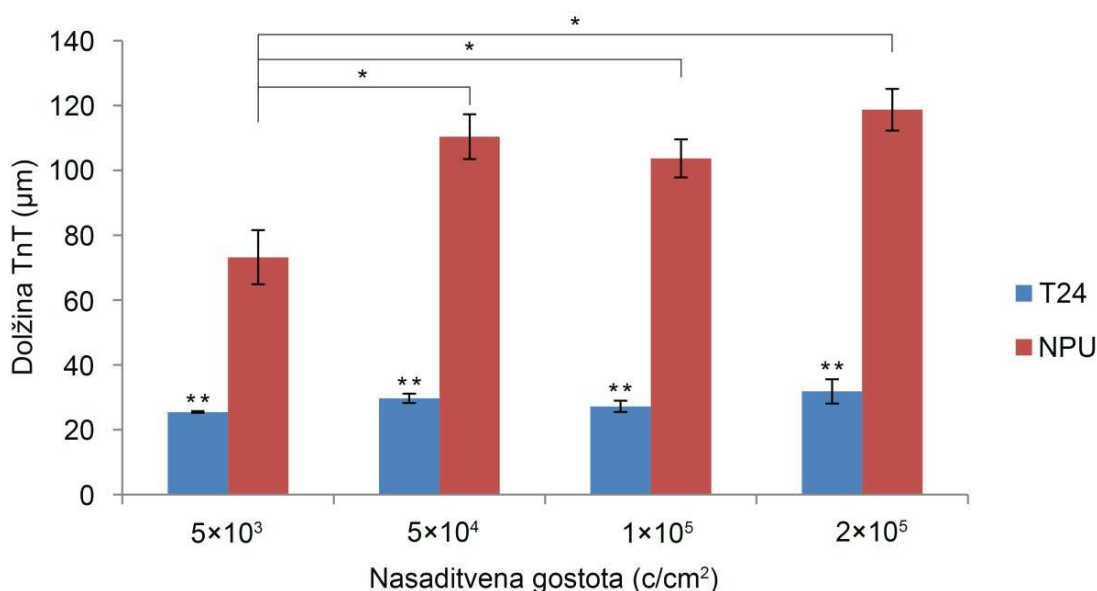
Slika 11: Število TnT med rakavimi urotelijskimi celicami T24 in med normalnimi urotelijskimi celicami NPU glede na število celic. Število TnT med celicami T24 je bilo največje pri manjšem številu celic, z večanjem števila celic T24 se je število TnT zmanjševalo. Tu je potrebno poudariti, da so TnT pri manjšem številu celic povezovalne bližnje celice, ki so se povezovalne v manjše otočke. Število TnT med celicami NPU se je z večanjem števila celic večalo, torej ravno obratno kot pri celicah T24. Celice NPU so se šele pri večjem številu celic združevale v otočke.

#### 4.1.3 Dolžina in premer TnT rakavih urotelijskih celic in normalnih urotelijskih celic

TnT, ki smo jih našli v monokulturah celic posameznih nasaditvenih gostot, smo slikali in jim izmerili dolžino. Ker v dolžini TnT med prvim in drugim dnem po nasaditvi ni bilo statistično značilnih razlik, smo meritve združili. Rezultati ločeni na meritve prvega in

drugega dne po nasaditvi so prikazani v Prilogi F. Združene meritve prvega in drugega dne gojenja so prikazane v Prilogi G. TnT, ki smo jih posneli z vrstičnim elektronskim mikroskopom, smo izmerili premer.

TnT celic T24 so bile povprečno dolge med 25 in 32  $\mu\text{m}$  (Slika 12). Pri nasaditveni gostoti  $5 \times 10^3 \text{ c/cm}^2$  so TnT celic T24 merile povprečno 25  $\mu\text{m}$ , pri  $5 \times 10^4 \text{ c/cm}^2$  povprečno 30  $\mu\text{m}$ , pri  $1 \times 10^5 \text{ c/cm}^2$  povprečno 27  $\mu\text{m}$  in pri  $2 \times 10^5 \text{ c/cm}^2$  povprečno 32  $\mu\text{m}$ . Med dolžinami TnT celic T24 ni bilo statistično značilnih razlik.

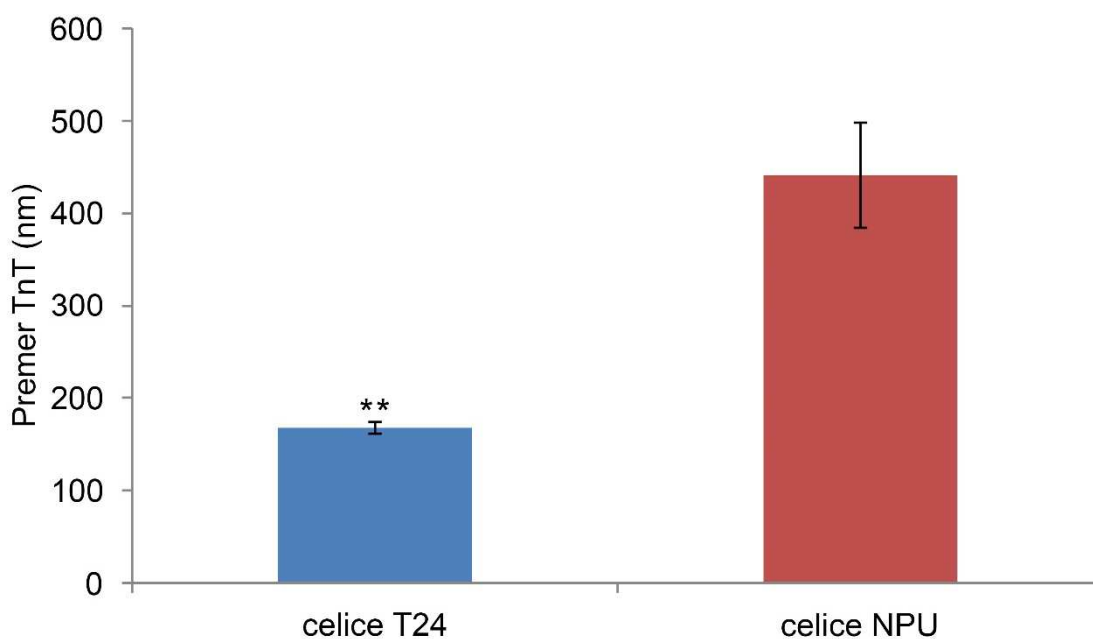


Slika 12: Graf povprečnih dolžin ( $\mu\text{m}$ ) TnT med rakavimi urotelijskimi celicami T24 in med normalnimi urotelijskimi celicami NPU. TnT med celicami T24 so bile statistično značilno krajše od TnT med celicami NPU. \*\* $p < 0,001$ . \* $p < 0,05$ .

TnT celic NPU so bile povprečno dolge med 73 in 119  $\mu\text{m}$ . Pri nasaditveni gostoti  $5 \times 10^3 \text{ c/cm}^2$  so TnT celic NPU merile povprečno 73  $\mu\text{m}$ , pri  $5 \times 10^4 \text{ c/cm}^2$  povprečno 110  $\mu\text{m}$ , pri  $1 \times 10^5 \text{ c/cm}^2$  povprečno 104  $\mu\text{m}$  in pri  $2 \times 10^5 \text{ c/cm}^2$  povprečno 119  $\mu\text{m}$ . TnT celic NPU pri nasaditveni gostoti  $5 \times 10^3 \text{ c/cm}^2$  so bile statistično značilno krajše od TnT celic NPU pri ostalih treh nasaditvenih gostotah. Vzrok temu je bil najverjetneje to, da so bile pri nasaditveni gostoti  $5 \times 10^3 \text{ c/cm}^2$  TnT med celicami znotraj otočka, pri večjih nasaditvenih gostotah pa so nastajale tudi med otočki, kar je razvidno iz Slike 10.

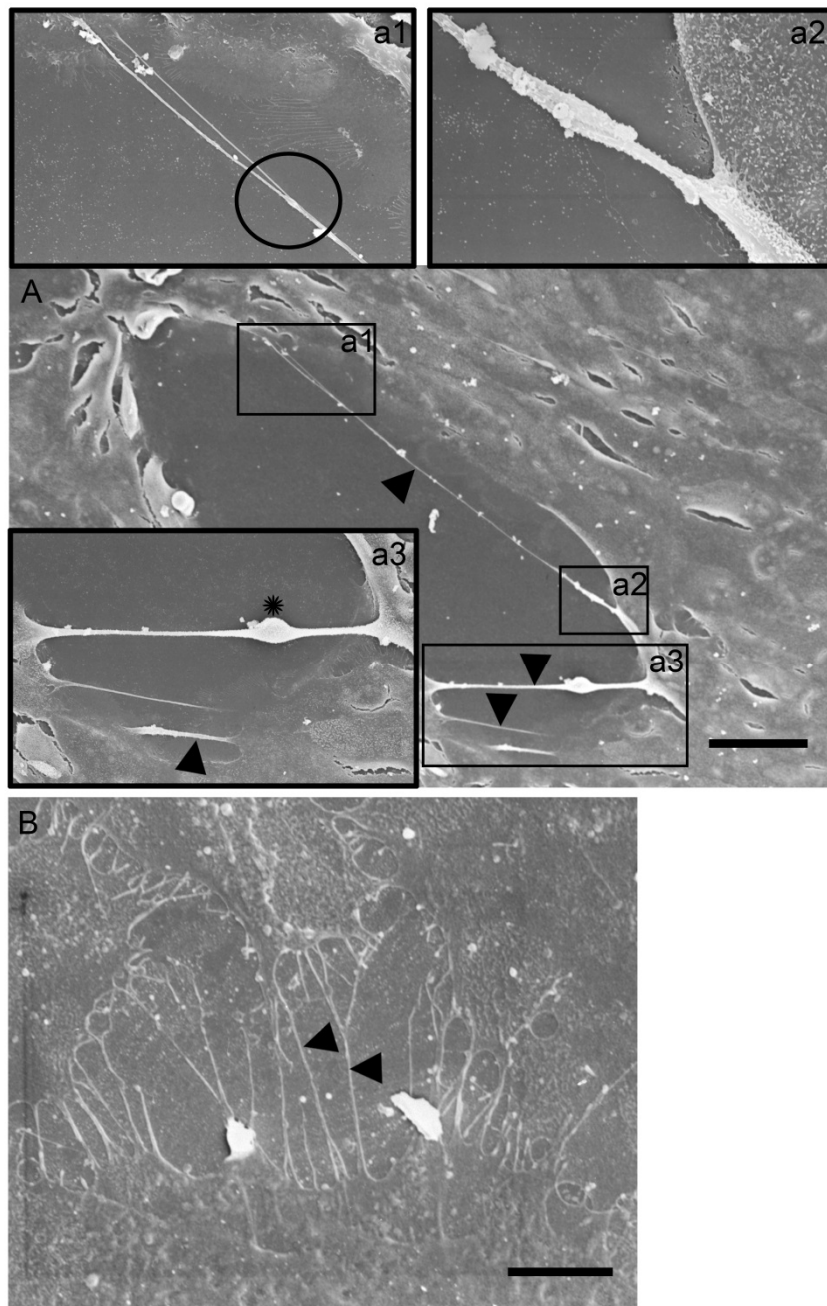


TnT celic T24 so bile statistično značilno tanjše od TnT celic NPU (Slika 13). Premer TnT med celicami T24 je znašal povprečno 167 nm, premer TnT med celicami NPU pa povprečno 441 nm.



Slika 13: Graf povprečnega premera TnT med rakavimi urotelijskimi celicami T24 in TnT med normalnimi urotelijskimi celicami NPU. TnT med celicami T24 so bile statistično značilno tanjše od TnT med celicami NPU. \*\* $p < 0,001$ .

TnT celic T24 so bile statistično značilno krajše in tanjše od TnT celic NPU. Razlike v dolžini in premeru TnT celic T24 in celic NPU so razvidne tudi na Sliki 14, kjer so prikazane TnT celic T24 in celic NPU, ki smo jih posneli z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Celice NPU so povezovalle dolge TnT, v katerih so bile prisotne zadebelitve oz. gondole, ponekod pa so se TnT na koncu razcepile v več TnT (Slika 14A). Celice T24 so povezovalle kratke TnT, ki so bile med blizu ležečimi celicami prisotne v večjem številu (Slika 14B).



Slika 14: TnT, posnete z vrstičnim elektronskim mikroskopom. (A) TnT normalnih urotelijskih celic NPU s povečanimi izseki slike (a1, a2, a3) in (B) TnT rakavih urotelijskih celic T24. Glave puščic označujejo posamezne TnT, \*označuje zadebelitev TnT oz. gondolo, s krogom je označen odsek TnT, kjer se TnT razcepi na dva dela. Merili: (A) 50  $\mu\text{m}$ , (B) 5  $\mu\text{m}$ .

## 4.2 LASTNOSTI TnT V KOKULTURI RAKAVIH IN NORMALNIH UROTELIJSKIH CELIC

Celice T24 in celice NPU smo gojili skupaj v kokulturah. Kokulture smo označili s številkami od 1 do 4 (Preglednica 6). Celice T24 smo v kokulturah 1, 2 in 3 nasadili z nasaditveno gostoto  $5 \times 10^3$  c/cm<sup>2</sup>, pri kateri so v monokulturi tvorile največ TnT. Celice T24 smo v kokulturi 4 nasadili z nasaditveno gostoto  $2 \times 10^5$  c/cm<sup>2</sup>, pri kateri je bila monokultura konfluentna. Celice NPU smo v kokulturi 1 in 4 nasadili z nasaditveno gostoto  $5 \times 10^3$  c/cm<sup>2</sup>, pri kateri so v monokulturi tvorile malo TnT. Celice NPU smo v kokulturi 2 nasadili z nasaditveno gostoto  $5 \times 10^4$  c/cm<sup>2</sup> in v kokulturi 3 z nasaditveno gostoto  $2 \times 10^5$  c/cm<sup>2</sup>, pri kateri so celice NPU v monokulturi tvorile statistično značilno več TnT kot pri nasaditveni gostoti  $5 \times 10^3$  c/cm<sup>2</sup>. Različne nasaditvene gostote smo izbrali z namenom da bi ugotovili, ali pri različnih kombinacijah nasaditvenih gostot obstajajo razlike v številu TnT. Še pred nasaditvijo na skupno gojišče smo celice T24 obarvali z rdečim fluorescenčnim barvilom DiI, celice NPU pa z zelenim fluorescenčnim barvilom DiO. Tako označene celice v kokulturah so prikazane na Sliki 16.

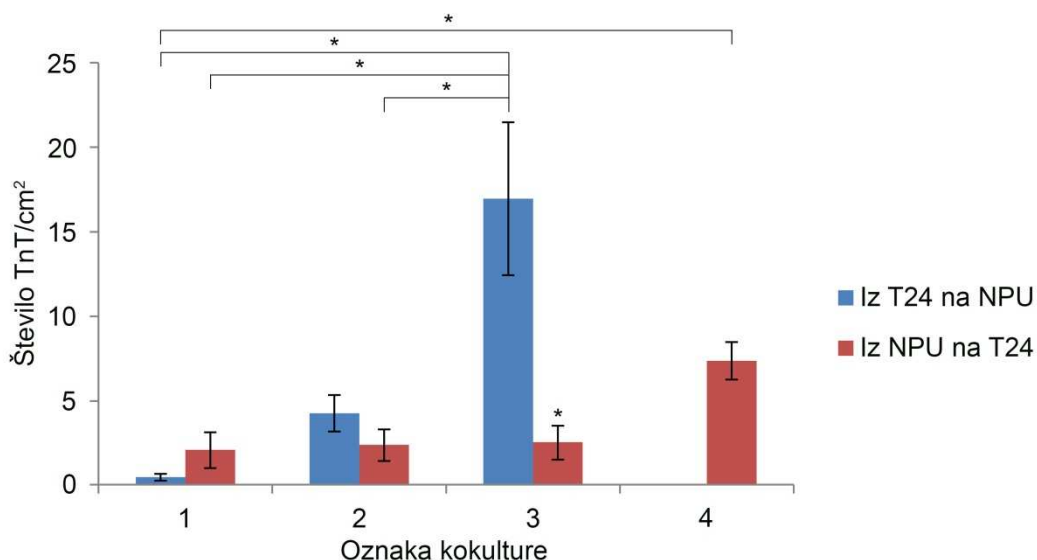
Preglednica 6: Štiri kokulture celic T24 in celic NPU z različnimi kombinacijami nasaditvenih gostot.

Oznaka kokulture	Nasaditvena gostota celic T24 (c/cm <sup>2</sup> )	Nasaditvena gostota celic NPU (c/cm <sup>2</sup> )
1	$5 \times 10^3$	$5 \times 10^3$
2	$5 \times 10^3$	$5 \times 10^4$
3	$5 \times 10^3$	$2 \times 10^5$
4	$2 \times 10^5$	$5 \times 10^3$

### 4.2.1 Nastajanje TnT med rakavimi urotelijskimi celicami in normalnimi urotelijskimi celicami

Celice smo prvi in drugi dan po nasaditvi fiksirali, si jih ogledali pod fluorescenčnim mikroskopom AxioImager Z1 in jih poslikali. Izbrane slike so prikazane na Sliki 16. Če je bila TnT rdeče barve, jo je tvorila celica T24, če je bila zelene barve, jo je tvorila celica NPU. Prešteli smo, koliko TnT je potekalo iz celic T24 na celice NPU in koliko iz celic NPU na celice T24 pri posamezni kokulturi. Ker med prvim in drugim dnem gojenja ni bilo

statistično značilnih razlik, smo meritve združili (Slika 15). Rezultati, ki prikazujejo število TnT iz celic T24 na celice NPU in obratno, ločeni na prvi in drugi dan gojenja, so prikazani v Prilogi H.



Oznaka kokulture	Nasaditvena gostota celic T24 (c/cm²)	Nasaditvena gostota celic NPU (c/cm²)
1	$5 \times 10^3$	$5 \times 10^3$
2	$5 \times 10^3$	$5 \times 10^4$
3	$5 \times 10^3$	$2 \times 10^5$
4	$2 \times 10^5$	$5 \times 10^3$

Slika 15: Število TnT pri posameznih kokulturah, označenih s številkami od 1 do 4. Pomen posameznih oznak kokultur je prikazan v tabeli na sliki spodaj. Število TnT iz celic T24 na celice NPU v kokulturi 3 je bilo statistično značilno večje tudi od števila TnT iz celic NPU na celice T24 v kokulturah 1, 2 in 3. Število TnT iz celic T24 na celice NPU v kokulturi 3 je bilo statistično značilno večje od števila TnT iz celic T24 na celice NPU v kokulturi 1. Število TnT iz celic NPU na celice T24 je bilo v kokulturi 4 statistično značilno večje od števila TnT iz celic T24 na celice NPU v kokulturi 1. \* $p < 0,05$ .

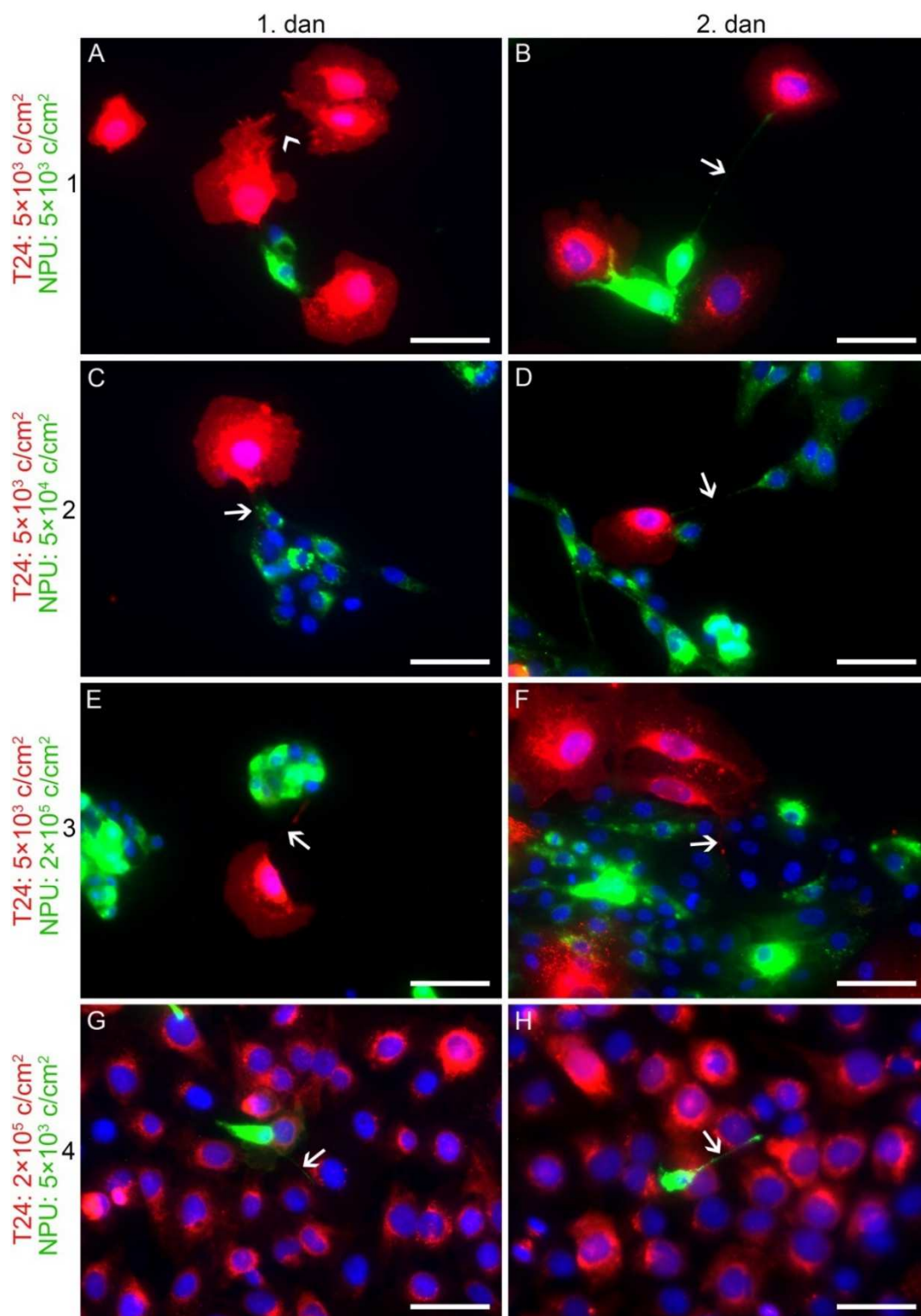
V kokulturi 1 z nasaditveno gostoto celic T24  $5 \times 10^3$  c/cm² in celic NPU  $5 \times 10^3$  c/cm² je bilo tako iz celic T24 na celice NPU kot tudi obratno malo TnT, manj kot 2 TnT/cm². Med številom TnT iz celic T24 na celice NPU in obratno v tem primeru ni bilo statistično značilnih razlik.

V kokulturi 2 z nasaditveno gostoto celic T24  $5 \times 10^3$  c/cm<sup>2</sup> in celic NPU  $5 \times 10^4$  c/cm<sup>2</sup> je bilo tako iz celic T24 na celice NPU kot tudi obratno manj kot 4 TnT/cm<sup>2</sup>. Med številom TnT iz celic T24 na celice NPU in obratno v tem primeru ni bilo statistično značilnih razlik.

V kokulturi 3 z nasaditveno gostoto celic T24  $5 \times 10^3$  c/cm<sup>2</sup> in celic NPU  $2 \times 10^5$  c/cm<sup>2</sup> je bilo statistično značilno več TnT iz celic T24 na celice NPU (povprečno 17 TnT/cm<sup>2</sup>) kot TnT iz celic NPU na celice T24 (povprečno 3 TnT/cm<sup>2</sup>).

V kokulturi 4 z nasaditveno gostoto celic T24  $2 \times 10^5$  c/cm<sup>2</sup> in celic NPU  $5 \times 10^3$  c/cm<sup>2</sup> celice T24 niso tvorile TnT na celice NPU. TnT iz celic NPU na celice T24 je bilo povprečno 7 TnT/cm<sup>2</sup>.

Število TnT iz celic T24 na celice NPU v kokulturi 3 je bilo statistično značilno večje od števila TnT iz celic T24 na celice NPU v kokulturi 1. Število TnT iz celic T24 na celice NPU v kokulturi 3 je bilo statistično značilno večje tudi od števila TnT iz celic NPU na celice T24 v kokulturah 1, 2 in 3. Število TnT iz celic NPU na celice T24 je bilo le v kokulturi 4 statistično značilno večje od števila TnT iz celic T24 na celice NPU v kokulturi 1.



Slika 16: Kokulture rakavih urotelijskih celic T24 in normalnih urotelijskih celic NPU, prvi in drugi dan gojenja. Slike prikazujejo štiri kokulture z različnimi kombinacijami nasaditvenih gostot. Celice T24 so obarvane z rdečim fluorescenčnim barvilom DiI, celice NPU z zelenim fluorescenčnim barvilom DiO. (C, E, F) TnT so se tvorile tako iz celic T24 na celice NPU kot tudi (B, D, G, H) iz celic NPU na celice T24. Bele puščice označujejo posamezne TnT iz celic T24 na celice NPU ter obratno. Glava bele puščice prikazuje TnT med celicama T24 (A). Merila: 40  $\mu$ m.

#### 4.3 CITOSKELETNA ZGRADBA TnT RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC IN NORMALNIH UROTELIJSKIH CELIC

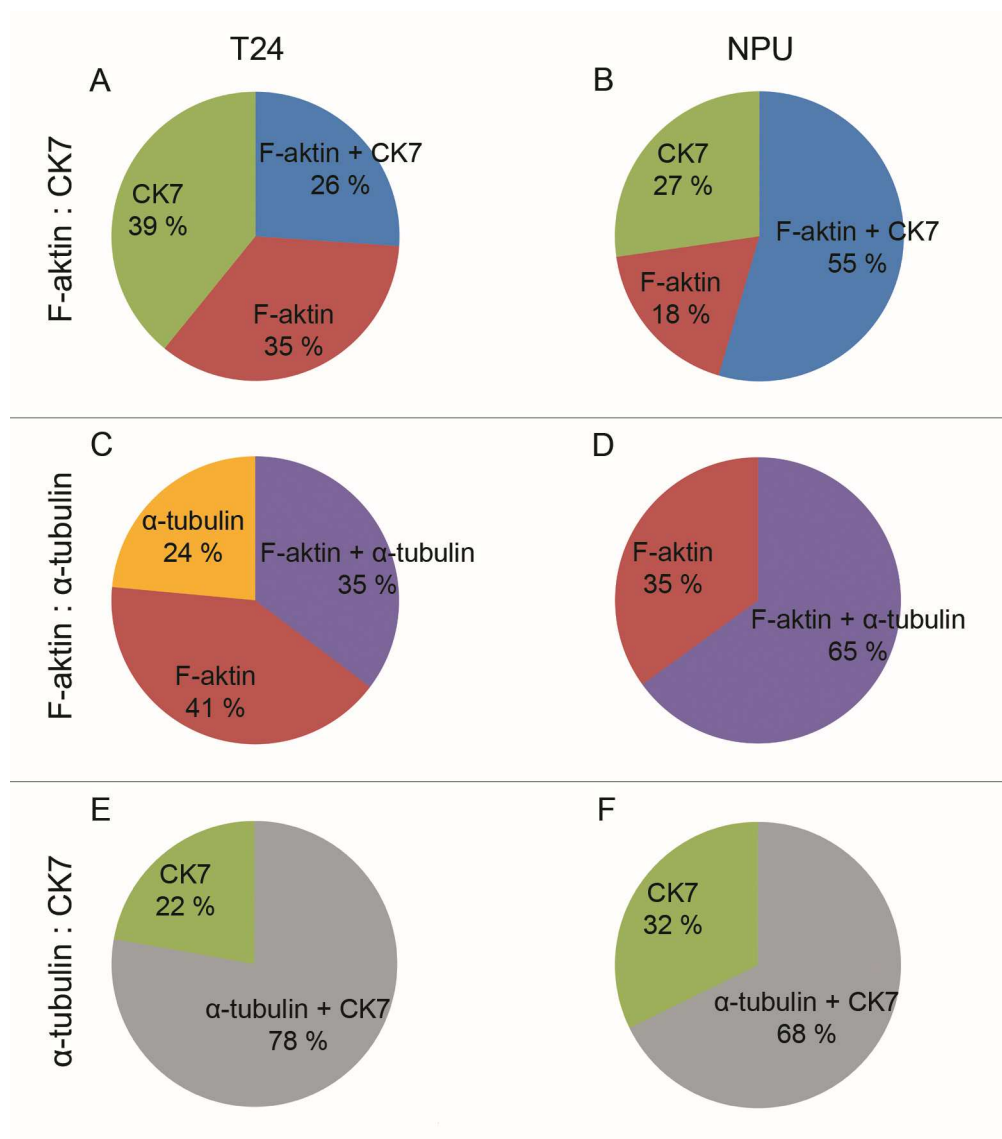
Monokulture celic T24 in celic NPU smo dvojno (imuno)označili. Prisotnost aktinskih filamentov v TnT smo ugotavljali s fluorescenčnim označevanjem F-aktina. Prisotnost intermediarnih filamentov smo ugotavljali s fluorescenčnim označevanjem citokeratina 7 (CK7). Prisotnost mikrotubulov smo ugotavljali s fluorescenčnim označevanjem  $\alpha$ -tubulina. S fluorescenčnim mikroskopom smo opazovali, kateri citoskeletni elementi sestavljajo TnT. Izbor slik dvojnega (imuno)označevanja prikazujeta Slika 18 in Slika 19.

Pri rezultatih dvojnega (imuno)označevanja je potrebno poudariti, da smo v TnT lahko dokazali prisotnost le enega ali obeh označenih citoskeletnih elementov, nismo pa vedeli, ali se je v TnT nahajal tudi tretji citoskeletni element.

##### **4.3.1 Ugotavljanje prisotnosti aktina, intermediarnih filamentov in mikrotubulov v parnih kombinacijah v TnT rakavih urotelijskih celic in normalnih urotelijskih celic**

V monokulturi celic T24 je pri dvojnem označevanju F-aktina in CK7 (Slika 17A) kombinacija F-aktina in CK7 sestavljala 26 % vseh TnT, F-aktin je sestavljal 35 % vseh TnT, CK7 je sestavljal 39 % vseh TnT. V monokulturi celic NPU je pri dvojnem označevanju F-aktina in CK7 (Slika 17B) kombinacija F-aktina in CK7 sestavljala 55 % vseh TnT, F-aktin je sestavljal 18 % vseh TnT, CK7 je sestavljal 27 % vseh TnT. V primerjavi s celicami T24 je pri celicah NPU kombinacija F-aktina in CK7 sestavljala več TnT, F-aktin ali CK7 pa sta sestavljala manj TnT.

V monokulturi celic T24 je pri dvojnem označevanju F-aktina in  $\alpha$ -tubulina (Slika 17C) kombinacija F-aktina in  $\alpha$ -tubulina sestavljala 35 % vseh TnT, F-aktin je sestavljal 41 % vseh TnT,  $\alpha$ -tubulin je sestavljal 24 % vseh TnT. V monokulturi celic NPU je pri dvojnem označevanju F-aktina in  $\alpha$ -tubulina (Slika 17D) kombinacija F-aktina in  $\alpha$ -tubulina sestavljala 65 % vseh TnT, F-aktin je sestavljal 35 % vseh TnT,  $\alpha$ -tubulin ni sestavljal nobene TnT. V primerjavi s celicami T24 je pri celicah NPU kombinacija F-aktina in  $\alpha$ -tubulina sestavljala več TnT, F-aktin ali  $\alpha$ -tubulin pa sta sestavljala manj TnT.



Slika 17: Odstotek posameznih sestavnih delov citoskeletnih elementov, ki so sestavljali TnT fluorescenčno označene z (A in B) dvojnimi (imuno)označevanjem F-aktina in CK7, (C in D) F-aktina in  $\alpha$ -tubulina, (E in F)  $\alpha$ -tubulina in CK7. Levi stolpec prikazuje TnT med celicami T24, desni stolpec pa TnT med celicami NPU. TnT med celicami T24 in med celicami NPU so sestavljali vsi trije citoskeletni elementi. Nekatere TnT so vsebovale kombinacijo obeh označenih citoskeletnih elementov, nekatere TnT pa so vsebovale le enega. Ali so TnT vsebovale še tretji citoskeletni element, z metodo dvojnega (imuno)označevanja ni bilo mogoče določiti. F-aktin predstavlja aktinske filamente, CK7 je predstavnik intermediarnih filamentov,  $\alpha$ -tubulin je sestavni del mikrotubulov. Število vseh TnT: (A) 23, (B) 11, (C) 17, (D) 25, (E) 18, (F) 31.

V monokulturi celic T24 je pri dvojnem imunooznačevanju  $\alpha$ -tubulina in CK7 (Slika 17E) kombinacija  $\alpha$ -tubulina in CK7 sestavljala 78 % vseh TnT, CK7 je sestavljal 22 % vseh TnT,  $\alpha$ -tubulin ni sestavljal nobene TnT. V monokulturi celic NPU je pri dvojnem imunooznačevanju  $\alpha$ -tubulina in CK7 (Slika 17F) kombinacija  $\alpha$ -tubulina in CK7 sestavljala 68 % vseh TnT, CK7 je sestavljal 32 % vseh TnT,  $\alpha$ -tubulin ni sestavljal nobene TnT. Tako



pri celicah T24 kot pri celicah NPU je torej v citoskeletni sestavi prevladovala kombinacija  $\alpha$ -tubulina in CK7.

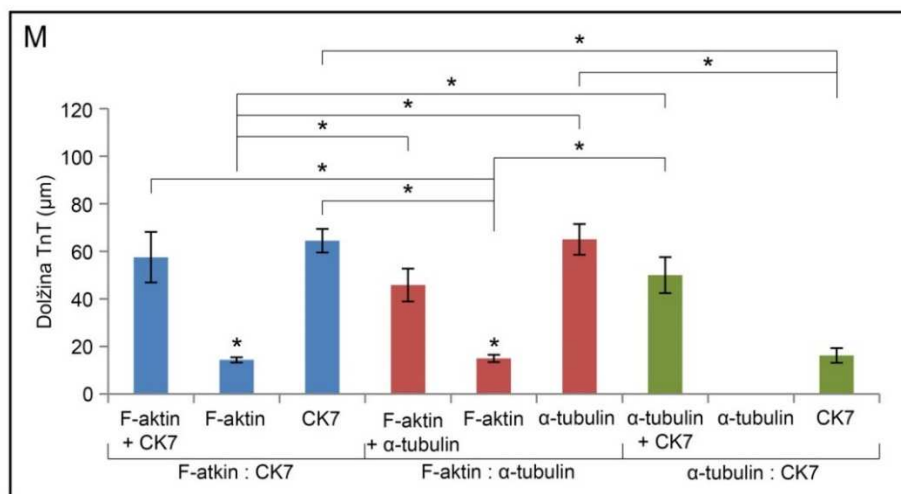
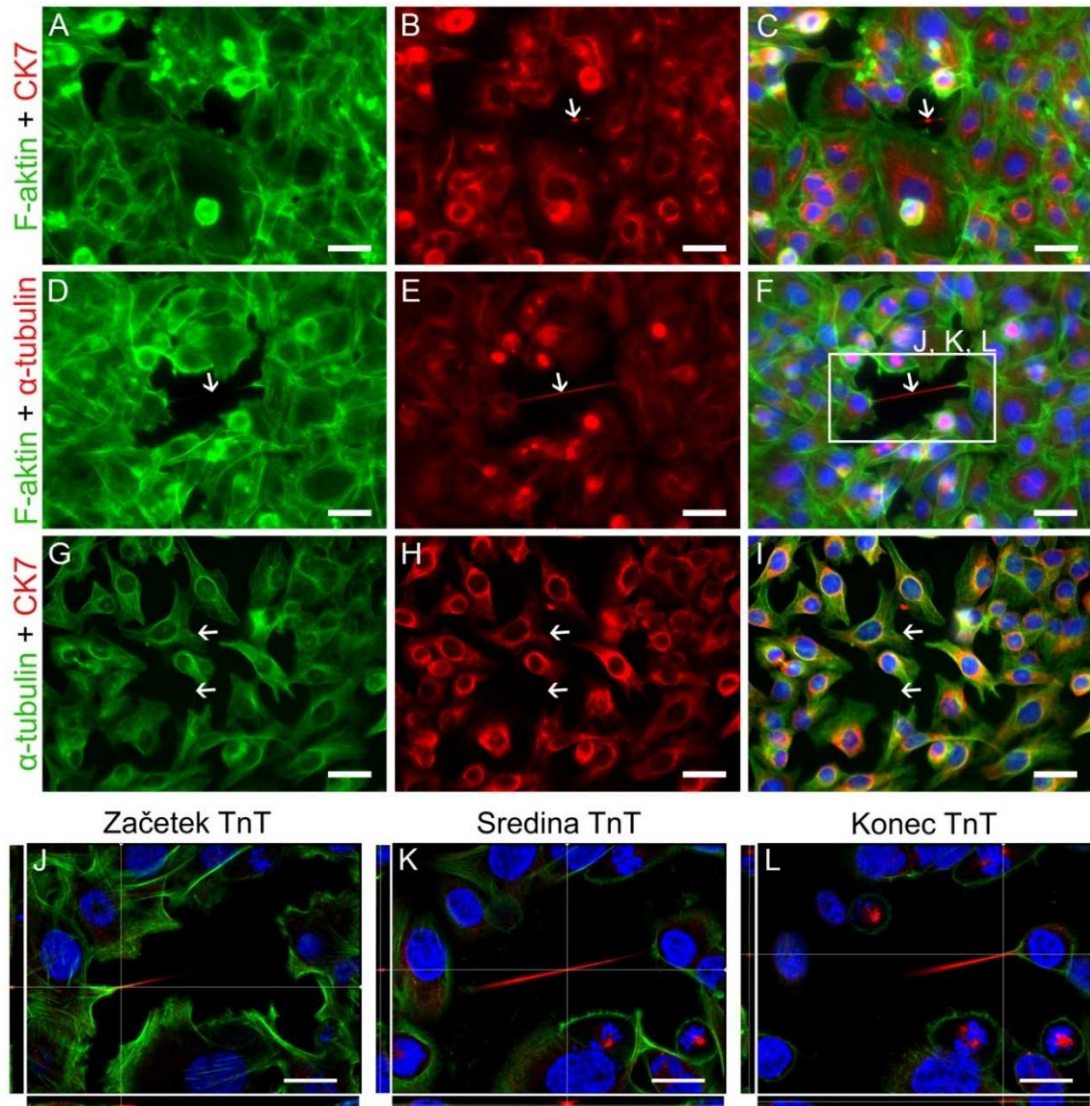
TnT celic T24 in celic NPU so sestavljali aktinski filament, intermediarni filament in mikrotubuli. Z dvojnimi (imuno)označevanjem smo ugotovili, da je razlika v citoskeletni zgradbi med posameznimi TnT v tem, da nekatere TnT vsebujejo kombinacijo dveh prej omenjenih citoskeletnih elementov, nekatere TnT pa vsebujejo le enega. Ali TnT vsebujejo vse tri citoskeletne elemente z metodo dvojnega imunooznačevanja ni bilo mogoče določiti, zato smo celice tudi trojno fluorescenčno označili (glej poglavje 4.3.2 Trojno označevanje F-aktina,  $\alpha$ -tubulina in CK7).

#### 4.3.1.1 Vpliv citoskeletnih elementov na dolžino TnT

Dolžine TnT smo merili v monokulturah celic T24 in celic NPU, ki smo jih dvojno (imuno)označili, zato je potrebno poudariti, da rezultati dokazujejo prisotnost enega ali dveh citoskeletnih elementov v TnT, ne vemo pa ali je bil v TnT prisoten tudi tretji citoskeletni element. Meritve so prikazane v Prilogi I.

V celicah T24 je F-aktin sestavljal krajše TnT, povprečne dolžine 15  $\mu$ m (Slika 18M). Tako F-aktin, ki je bil označen v kombinaciji s CK7, kot tudi F-aktin, ki je bil označen v kombinaciji z  $\alpha$ -tubulinom, sta sestavljala statistično značilno krajše TnT od tistih TnT, ki jih je sestavljala kombinacija F-aktina in CK7, kombinacija F-aktina in  $\alpha$ -tubulina ter kombinacija  $\alpha$ -tubulina in CK7. F-aktin je v celicah T24 sestavljal statistično značilno krajše TnT tudi od tistih TnT, ki jih je sestavljal  $\alpha$ -tubulin ali CK7. Izjema je bila povprečna dolžina TnT, ki jih je sestavljal CK7, imunooznačen v kombinaciji z  $\alpha$ -tubulinom, saj ni bila statistično značilno različna od povprečne dolžine TnT, ki jih je sestavljal F-aktin.

V celicah T24 je  $\alpha$ -tubulin tako v kombinaciji z F-aktinom ali v kombinaciji s CK7 kot tudi sam sestavljal daljše TnT, povprečne dolžine 60  $\mu$ m. Pri dvojnem imunooznačevanju  $\alpha$ -tubulina in CK7 v celicah T24 ni bilo TnT z  $\alpha$ -tubulinom, ampak le TnT s kombinacijo  $\alpha$ -tubulina in CK7.



Slika 18: Dvojno (imuno)označevanje rakavih urotelijskih celic T24 s kombinacijami (A, B, C) F-aktina in CK7, (D, E, F) F-aktina in  $\alpha$ -tubulina ter (G, H, I)  $\alpha$ -tubulina in CK7. Nasaditvena gostota celic T24 je bila  $5 \times 10^4$

c/cm<sup>2</sup>. TnT so vsebovale vse tri citoskeletne elemente v različnih parnih kombinacijah. (J) Začetek TnT, (K) sredina TnT in (L) konec TnT pri prerezu TnT iz slike F, ki prikazuje, da se TnT ne dotika podlage. (M) Zastopanost dvojno (imuno)označenih citoskeletnih elementov v odvisnosti od dolžine TnT v monokulturi celic T24. F-aktin je sestavljal krajše TnT,  $\alpha$ -tubulin pa sam ali v kombinaciji z F-aktinom ali CK7 daljše TnT. CK7 je sestavljal krajše in daljše TnT. F-aktin predstavlja aktinske filamente, CK7 je predstavnik intermediarnih filamentov,  $\alpha$ -tubulin je sestavni del mikrotubulov. \* $p < 0,05$ . Bele puščice označujejo posamezne TnT, v katerih je bil fluorescenčno označen eden ali dva citoskeletna elementa. Merila: (A do I) 40  $\mu\text{m}$ , (J, K in L) 20  $\mu\text{m}$ .

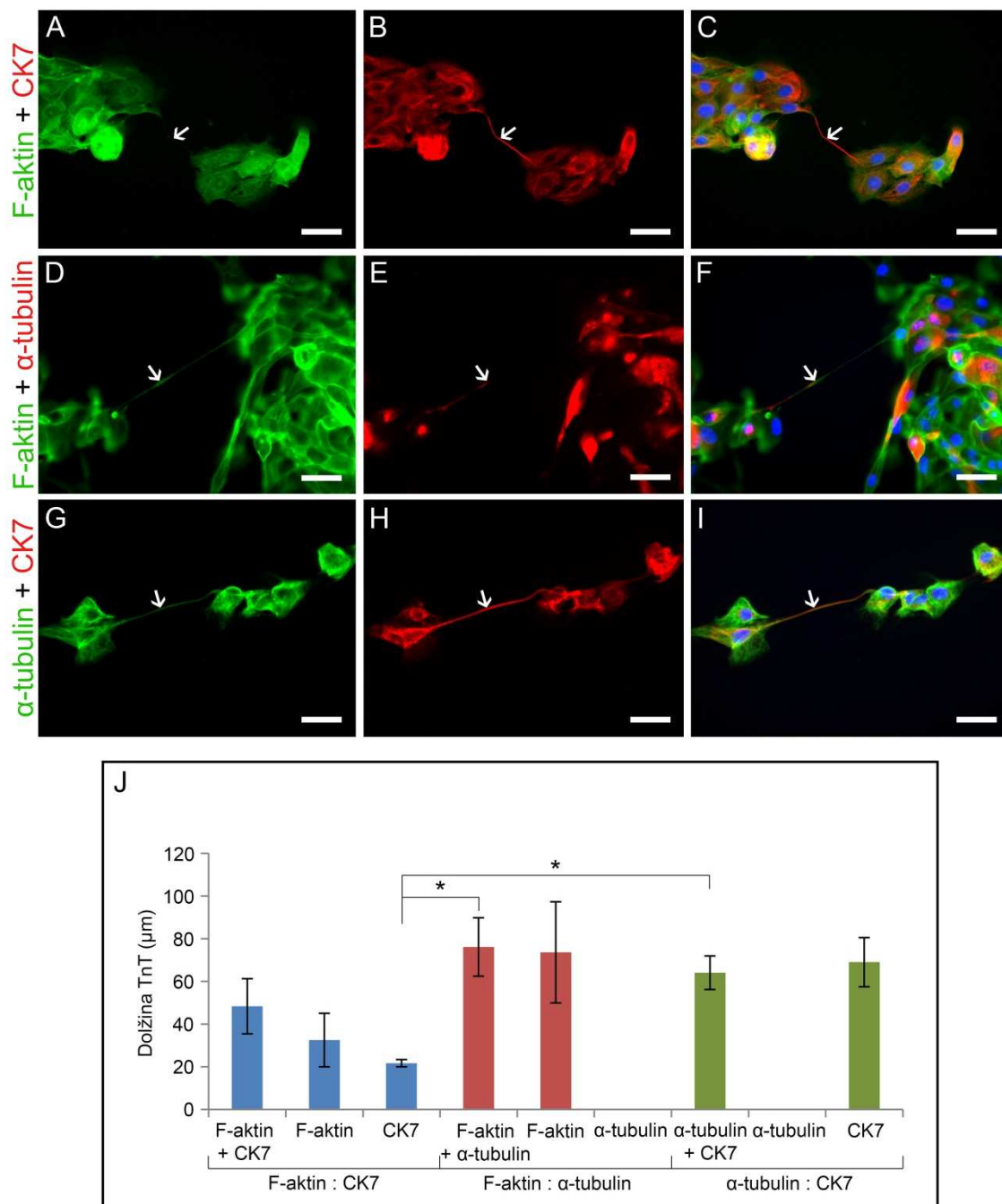
V celicah T24 je CK7 sestavljal tako krajše TnT, povprečne dolžine 16  $\mu\text{m}$ , kot tudi daljše TnT, povprečne dolžine 64  $\mu\text{m}$ . Med omenjenima povprečnima dolžinama je bila statistično značilna razlika. V celicah T24 je CK7, ki je bil imunooznačen v kombinaciji z  $\alpha$ -tubulinom, sestavljal statistično značilno krajše TnT od tistih, ki jih je sestavljal  $\alpha$ -tubulin, označen v kombinaciji s F-aktinom. CK7 je v kombinaciji s F-aktinom ali v kombinaciji z  $\alpha$ -tubulinom sestavljal daljše TnT, povprečne dolžine 50  $\mu\text{m}$ .

V celicah NPU je CK7, podobno kot pri celicah T24, sestavljal krajše TnT, povprečne dolžine 22  $\mu\text{m}$ , kot tudi daljše TnT, povprečne dolžine 69  $\mu\text{m}$  (Slika 19J). Med omenjenima povprečnima dolžinama je bila statistično značilna razlika.

V celicah NPU je kombinacija F-aktina in  $\alpha$ -tubulina sestavljala statistično značilno daljše TnT od tistih, ki jih je sestavljal CK7 označen v kombinaciji s F-aktinom.

V celicah NPU je kombinacija F-aktina in  $\alpha$ -tubulina ter kombinacija  $\alpha$ -tubulina in CK7 sestavljala statistično značilno daljše TnT od TnT med celicami T24, ki sta jih sestavljala F-aktin ali CK7, CK7 je bil v tem primeru imunooznačen v kombinaciji z  $\alpha$ -tubulinom.

V celicah NPU je CK7, ki je bil imunooznačen v kombinaciji z  $\alpha$ -tubulinom, sestavljal statistično značilno daljše TnT od TnT med celicami T24, ki jih je sestavljal F-aktin. V celicah NPU je CK7, ki je bil označen v kombinaciji s F-aktinom, sestavljal statistično značilno krajše TnT od TnT med celicami T24, ki jih je sestavljal CK7, ki je bil označen v kombinaciji s F-aktinom, ali  $\alpha$ -tubulin, ki je bil označen v kombinaciji s F-aktinom.

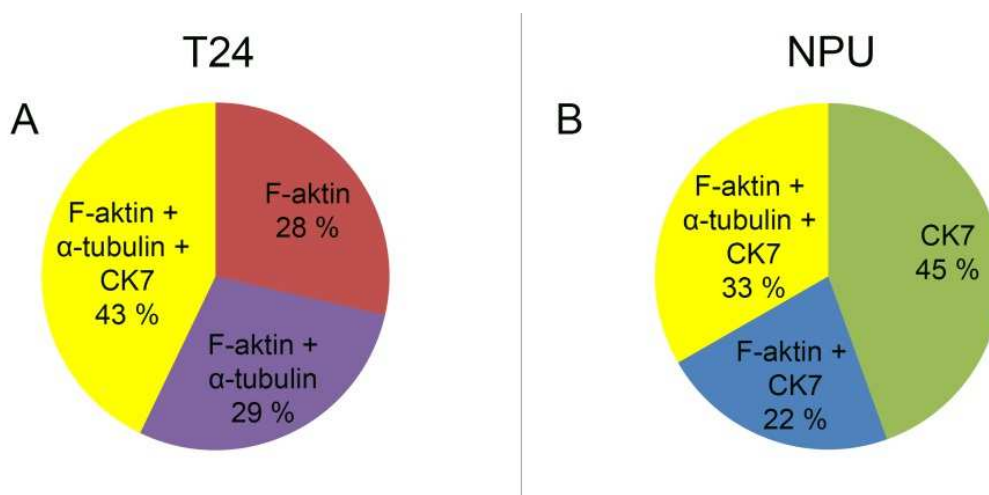


Slika 19: Dvojno (imuno)označvanje normalnih urotelijskih celic NPU s kombinacijami (A, B, C) F-aktina in CK7, (D, E, F) F-aktina in  $\alpha$ -tubulina ter (G, H, I)  $\alpha$ -tubulina in CK7. Nasaditvena gostota celic NPU je bila  $1 \times 10^5$  c/cm<sup>2</sup>. TnT so vsebovale vse tri citoskeletne elemente v različnih parnih kombinacijah. (J) Zastopanost dvojno (imuno)označenih citoskeletnih elementov v odvisnosti od dolžine TnT v monokulturi celic NPU. CK7 je, ko je bil označen v kombinaciji z F-aktinom, sestavljal statistično značilno krajše TnT od TnT, ki so vsebovale kombinacijo F-aktina in  $\alpha$ -tubulina ter kombinacijo  $\alpha$ -tubulina in CK7. F-aktin predstavlja aktinske filamente, CK7 je predstavnik intermediarnih filamentov,  $\alpha$ -tubulin je sestavni del mikrotubulov. \* $p < 0,05$ . Bele puščice označujejo posamezne TnT, v katerih je bil fluorescenčno označen eden ali dva citoskeletna elementa. Merila: 40  $\mu\text{m}$ .

V celicah T24 je F-aktin sestavljal krajše TnT,  $\alpha$ -tubulin pa je sam ali v kombinaciji z F-aktinom ali CK7 sestavljal daljše TnT. V celicah NPU je CK7 sestavljal krajše TnT od tistih, ki jih je sestavljal  $\alpha$ -tubulin v kombinaciji z F-aktinom ali CK7.

#### 4.3.2 Ugotavljanje prisotnosti aktina, intermediarnih filamentov in mikrotubulov v TnT rakavih urotelijskih celic in normalnih urotelijskih celic

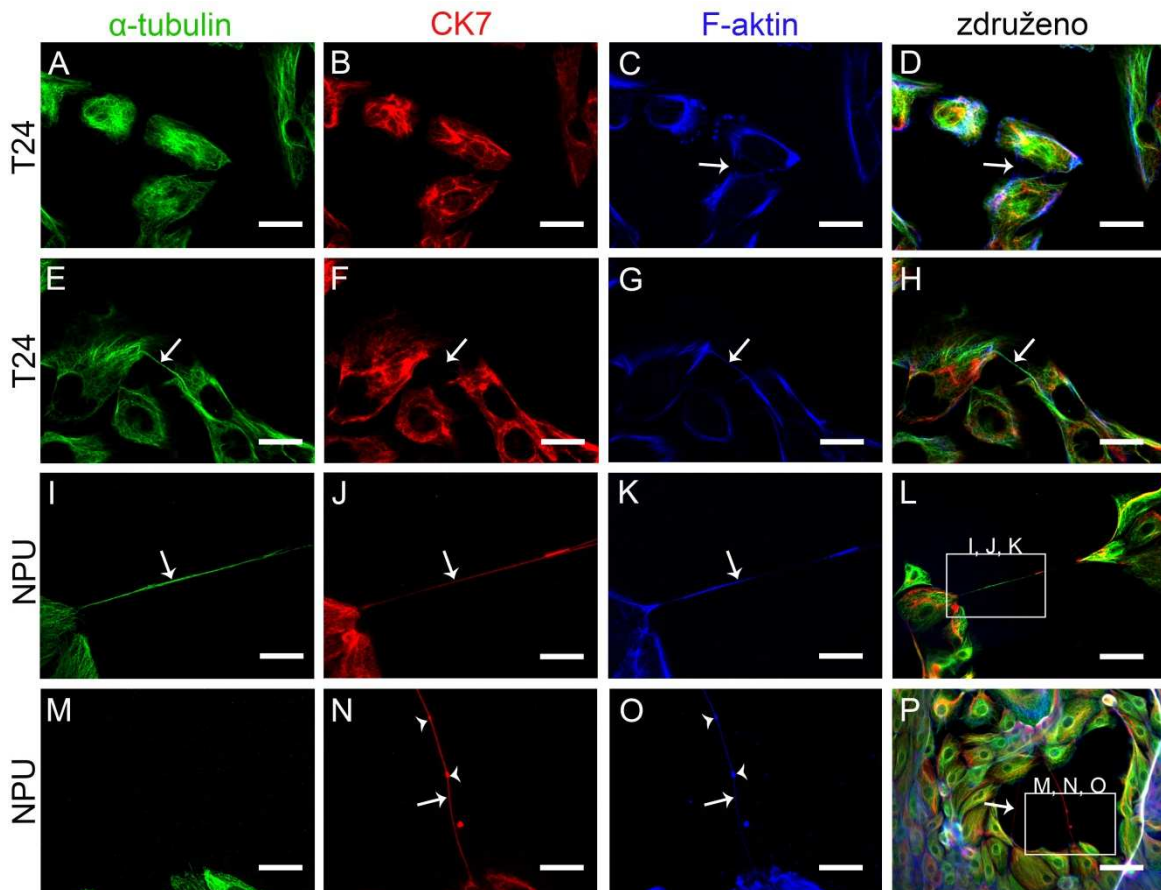
Da bi ugotovili, ali se v TnT celic T24 in celic NPU nahajajo vsi trije citoskeletni elementi hkrati, smo celice trojno fluorescenčno označili. Za ugotavljanje prisotnosti posameznih citoskeletnih elementov smo fluorescenčno označili F-aktin,  $\alpha$ -tubulin in CK7. S fluorescenčnim mikroskopom (Zeiss) smo poslikali TnT pri celicah T24 in TnT pri celicah NPU ter določili, kateri elementi citoskeleta jih sestavljajo (Slika 20). Meritve so prikazane v Prilogi J.



Slika 20: Odstotek posameznih sestavnih delov citoskeletnih elementov, ki so sestavljali TnT pri (A) rakavih urotelijskih celicah T24 in (B) normalnih urotelijskih celicah NPU. Tako v celicah T24 kot v celicah NPU so nekatere TnT sestavljali vsi trije citoskeletni elementi. V celicah T24 je preostale TnT sestavljal F-aktin ali F-aktin v kombinaciji z  $\alpha$ -tubulinom. V celicah NPU je preostale TnT sestavljal CK7 ali CK7 v kombinaciji z F-aktinom. F-aktin predstavlja aktinske filamente, CK7 je predstavnik intermediarnih filamentov,  $\alpha$ -tubulin je sestavni del mikrotubulov. Število vseh TnT: (A) 7, (B) 9.

Tako v celicah T24 kot v celicah NPU so nekatere TnT sestavljali vsi trije citoskeletni elementi (Slika 21). V celicah T24 so večino TnT sestavljali vsi trije citoskeletni elementi (43 %), preostale TnT so sestavljali F-aktin (28 %) ter F-aktin v kombinaciji z  $\alpha$ -tubulinom (29 %). V celicah NPU je večino TnT sestavljal CK7 (45 %), preostale TnT so sestavljali F-

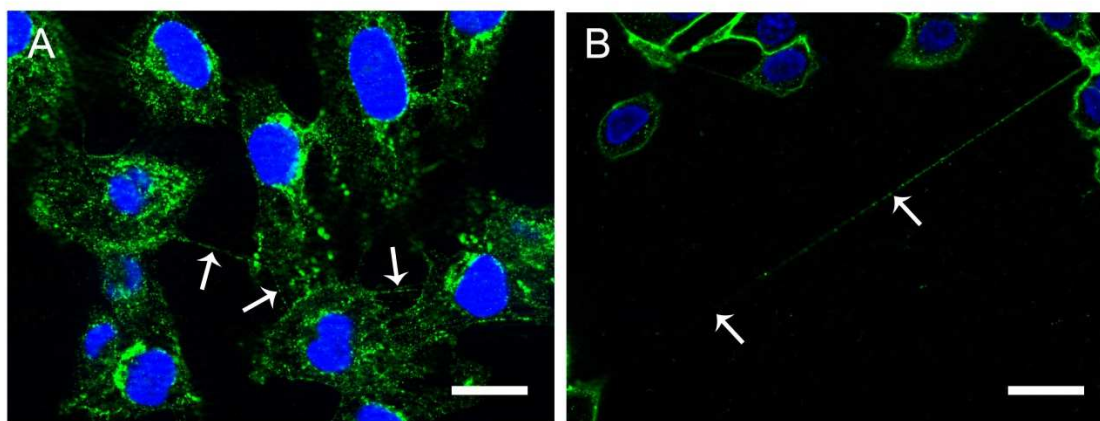
aktin v kombinaciji s CK7 (22 %) ter vsi trije citoskeletni elementi (33 %). V celicah T24, za razliko od celic NPU, ni bilo TnT, ki bi vsebovale le CK7 ali kombinacijo F-aktina in CK7 brez  $\alpha$ -tubulina. Pri celicah NPU, za razliko od celic T24, ni bilo TnT, ki bi vsebovale le F-aktin ali kombinacijo F-aktina in  $\alpha$ -tubulina brez CK7. Samo  $\alpha$ -tubulin ali kombinacija  $\alpha$ -tubulina in CK7 brez F-aktina nista sestavljala nobene TnT.



Slika 21: Trojno označevanje rakavih urotelijskih celic T24 in normalnih urotelijskih celic NPU z  $\alpha$ -tubulinom, CK7 in F-aktinom. (H in L) Tako v celicah T24 kot v celicah NPU so nekatere TnT sestavljali vsi trije citoskeletni elementi. (D) V celicah T24 so nekatere TnT vsebovale le F-aktin. (P) V celicah NPU so nekatere TnT vsebovale kombinacijo F-aktina in CK7. (L in P) S kvadratom so označeni deli TnT, ki so v slikah levo povečani. Z belo puščico so označene TnT, v katerih se je označil vsaj eden izmed treh citoskeletnih elementov. F-aktin predstavlja aktinske filamente, CK7 je predstavnik intermediarnih filamentov,  $\alpha$ -tubulin je sestavni del mikrotubulov. Z glavo bele puščice so označene zadebelitve TnT oz. gondole. Merila: (L in P) 60  $\mu$ m, (preostale slike) 20  $\mu$ m.

#### 4.4 PRISOTNOST STIČNIH PROTEINOV N-KADHERINA IN E-KADHERINA V TnT RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC IN NORMALNIH UROTELIJSKIH CELIC

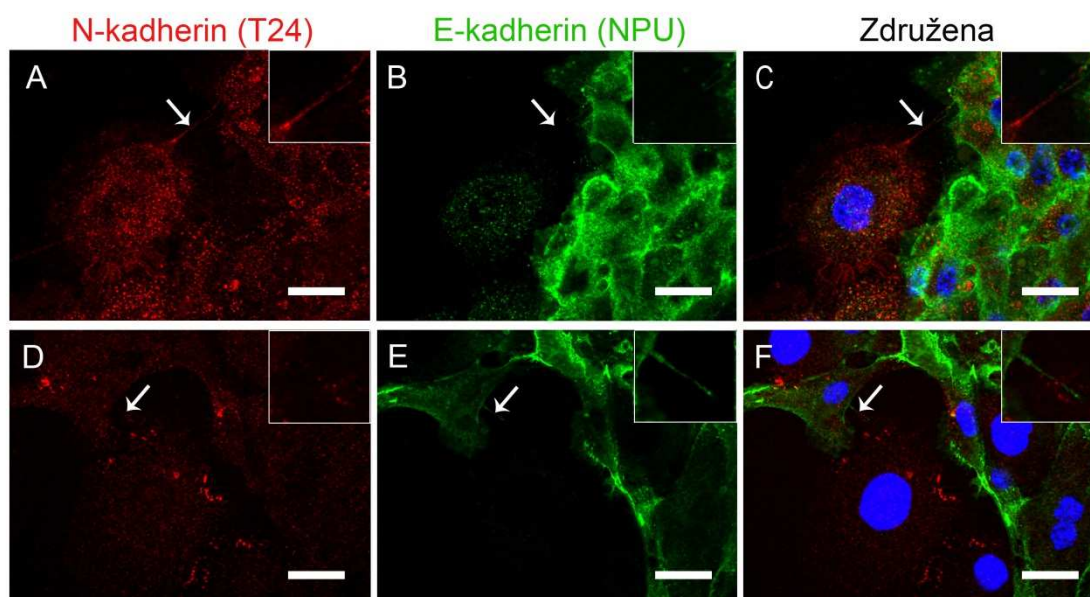
Z imunooznačevanjem N- in E-kadherina smo želeli preveriti, kateri od teh dveh stičnih proteinov je prisoten v področju TnT v rakavih in normalnih urotelijskih celicah. V monokulturi celic T24 smo označili N-kadherin, v monokulturi celic NPU pa E-kadherin. Celice T24 in celice NPU smo nasadili v kokulturi in dvojno imunooznačili N- in E-kadherin. Tako označene celice smo poslikali s fluorescenčnim mikroskopom.



Slika 22: (A) Monokultura rakavih urotelijskih celic T24 imunooznačenih z N-kadherinom in (B) monokultura normalnih urotelijskih celic NPU imunooznačenih z E-kadherinom. (A) Celice T24 izražajo N-kadherin po celotni dolžini TnT. (B) Celice NPU izražajo E-kadherin po celotni dolžini TnT. Bele puščice označujejo posamezne TnT. Merili: 20  $\mu$ m.

TnT med celicami T24 so v monokulturi vsebovale N-kadherin po celotni dolžini TnT (Slika 22A). TnT celic NPU so v monokulturi vsebovale E-kadherin po celotni dolžini TnT (

Slika 22B). V kokulturi rakavih in normalnih urotelijskih celic so celice NPU vsebovale poleg E-kadherina tudi N-kadherin, celice T24 pa poleg N-kadherina ponekod tudi E-kadherin. N-kadherin in E-kadherin sta bila prisotna po celotni dolžini TnT, ki so povezovali celice T24 s celicami NPU, vendar nista bila kolokalizirana (Slika 23). Pri negativni kontroli, kjer ni bilo dodanih protiteles proti E- in N-kadherinu, fluorescence nismo zaznali, sekundarna protitelesa s fluorescenčnim barvilom so se torej vezala le na primarna protitelesa.



Slika 23: Kokulture rakavih urotelijskih celic T24 z nasaditveno gostoto  $5 \times 10^3$  c/cm<sup>2</sup> in normalnih urotelijskih celic NPU z nasaditveno gostoto  $2 \times 10^5$  c/cm<sup>2</sup>, imunooznačenih z N- in E-kadherinom. (A in C) Celice T24 izražajo N-kadherin po celotni dolžini TnT. (E in F) Celice NPU izražajo E-kadherin po celotni dolžini TnT. V belih kvadratih na slikah zgoraj desno so prikazane povečave posameznih TnT. Bele puščice označujejo posamezne TnT v kokulturi. Merlice: 20  $\mu$ m.

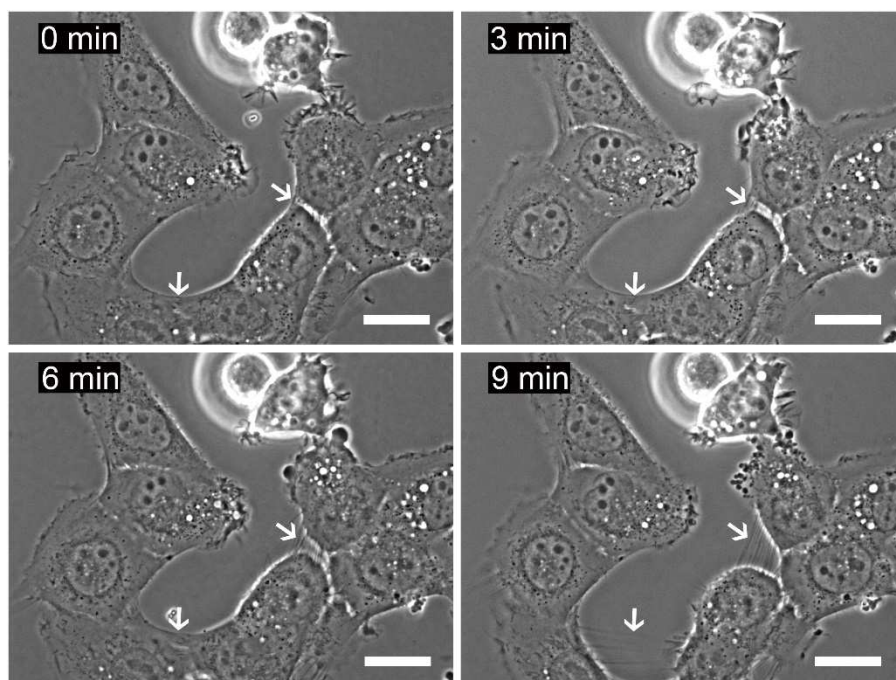
#### 4.5 NASTAJANJE TnT V ŽIVIH RAKAVIH UROTELIJSKIH CELICAH IN NORMALNIH UROTELIJSKIH CELICAH

Pri celicah T24 smo namesto nasaditvene gostote  $5 \times 10^3$  c/cm<sup>3</sup>, kjer je bilo sicer največ TnT, izbrali nasaditveno gostoto  $5 \times 10^4$  c/cm<sup>2</sup>, opazovali pa smo jih en dan po nasaditvi. Pri tej nasaditveni gostoti je bilo en dan po nasaditvi večje število celic kot pri nasaditveni gostoti  $5 \times 10^3$  c/cm<sup>3</sup>, kar je olajšalo snemanje. Pri celicah NPU smo izbrali nasaditveno gostoto in dan, pri kateri je bilo večje število TnT, celice smo torej nasadili z nasaditveno gostoto  $1 \times 10^5$  c/cm<sup>2</sup> in jih opazovali drugi dan po nasaditvi.

##### 4.5.1 Nastanek TnT med celicami T24

Pri celicah T24 smo opazili, da so TnT nastale z oddaljevanjem celic, ki so se pred tem tesno stikale. TnT med celicami T24 so nastale hitro, tudi le v nekaj minutah. To prikazuje Slika 24, kjer so TnT z oddaljevanjem celic nastale v devetih minutah, nekatere pa tudi le v šestih minutah.

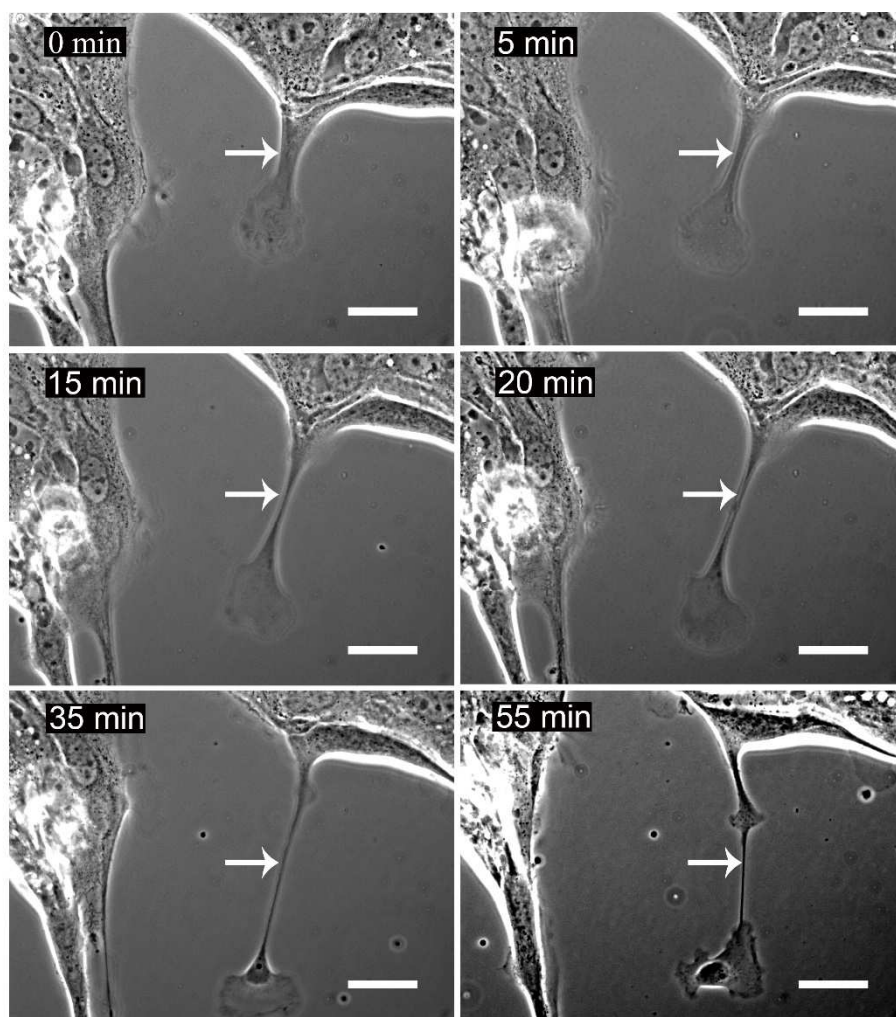




Slika 24: Nastanek TnT z oddaljevanjem rakavih urotelijskih celic T24. Bele puščice označujejo mesto nastanka TnT z oddaljevanjem celic. Merila: 20  $\mu$ m.

#### 4.5.2 Nastanek TnT med celicami NPU

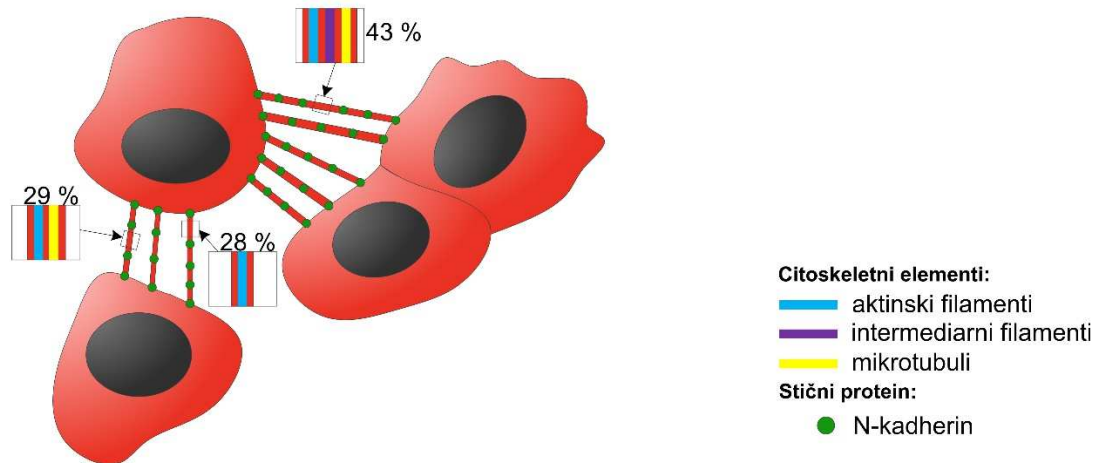
Pri celicah NPU smo opazili, da so TnT nastale z rastjo izrastka podobnega filopodiju. TnT med celicami NPU so nastajale počasneje kot med celicami T24. Primer nastanka TnT med celicami NPU prikazuje Slika 25, kjer je TnT nastala v 35 min. V prikazanem primeru nastanka TnT z rastjo izrastka podobnega filopodiju se je po 35 min snemanja v razširjen konec TnT predvidoma preneslo jedro.



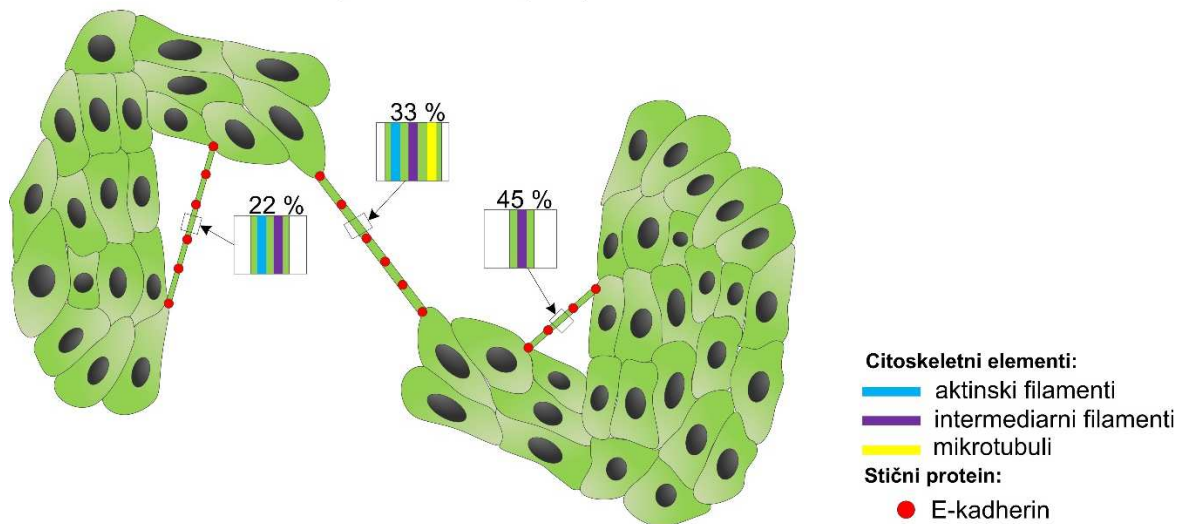
Slika 25: Nastanek TnT normalnih urotelijskih celic NPU z rastjo izrastka podobnega filopodiju. Po 35 min je v odebeljen končni del izrastka prešlo jedro. Bela puščica označuje mesto nastanka TnT z oddaljevanjem celic. Merila: 20 μm.

## 4.6 POVZETEK REZULTATOV

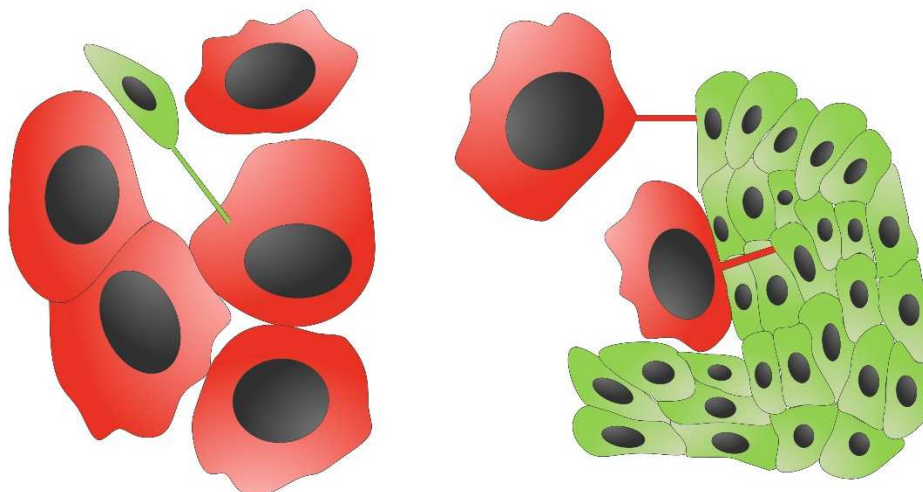
### TnT med rakavimi urotelijskimi celicami (T24)



### TnT med normalnimi urotelijskimi celicami (NPU)



### TnT v kokulturi rakavih urotelijskih celic (T24) in normalnih urotelijskih celic (NPU)



## 5 RAZPRAVA

### 5.1 TnT V MONOKULTURI RAKAVIH ALI NORMALNIH UROTELIJSKIH CELIC

#### 5.1.1 TnT ne vplivajo na obliko celic

Da bi ugotovili, ali TnT vplivajo na obliko celic, smo posameznim celicam izračunali indeks celične oblike (ICO). Ugotovili smo, da se rakave urotelijske celice T24 in normalne urotelijske celice NPU medseboj razlikujejo glede na ICO. Celice T24 so pretežno kroglaste oblike, medtem ko so celice NPU bolj različnih oblik. Ugotovitev bi lahko pripomogla k lažjemu odkrivanju rakavih celic. Zelo pomemben bi bil razvoj računalniškega programa, ki bi glede na obliko celic lahko določil, ali so celice rakave ali normalne.

Tako pri celicah T24 kot pri celicah NPU med celicami, ki so tvorile eno ali več TnT, in celicami brez TnT, ni bilo razlik v ICO. Iz tega lahko sklepamo, da TnT ne spremenijo osnovne oblike celic.

#### 5.1.2 Število TnT je odvisno od števila celic

TnT so se tvorile med rakavimi urotelijskimi celicami T24, kot so to dokazali že Veranic in sod. (2008), dokazali pa smo tudi prisotnost TnT med normalnimi urotelijskimi celicami NPU. Ker je celična komunikacija pomembna pri širjenju in invaziji raka (Lou in sod., 2012a), bi TnT lahko predstavljale novo možnost pri razvoju tarčnih zdravil in dostave zavirajočih bioloških agentov na mesta, ki jih je bilo včasih težko doseči (Lou in sod., 2012b). Pri tem bi morali odkriti specifične označevalce rakavih TnT, da z zdravljenjem ne bi poškodovali TnT normalnih celic (Lou in sod., 2012b).

V monokulturi celic T24 je bilo največ TnT med celicami v manjših otočkih, v katere so se celice združevale pri majhni konfluentnosti monokulture oziroma manjšem številu celic. Ko so celice T24 prerasčale večji del ali celotno gojilno površino, se je število TnT zmanjšalo. Glede na rezultate v številu TnT lahko sklepamo, da je pri celicah T24 komunikacija preko TnT povečana pri majhni konfluentnosti oziroma manjšem številu celic. Nastanek TnT lahko sprožijo stresni dejavniki (Wang in sod., 2011). Wang in sod. (2011) predvidevajo, da TnT omogočajo prenos celičnih komponent in energije v obliki prenosa mitohondrijev iz celic,

ki niso pod stresom, v celice, ki so pod stresom. Razlog za večje število TnT pri manjšemu številu celic T24 bi bil lahko ravno v majhnem številu celic, saj poskušajo v stresnem okolju s povezovanjem z drugimi celicami preživeti in se namnožiti. V monokulturi celic NPU je bilo največ TnT med celicami v večjih otočkih, v katere so se celice združevale pri večji konfluentnosti monokulture oziroma večjem številu celic. Pri celicah NPU je torej komunikacija preko TnT povečana, ko se celice že povezujejo v večje skupke. Celice NPU s komunikacijo preko TnT najverjetneje ohranjajo ali izboljšujejo kakovost in velikost monokulture s prenosom organelov, membranskih komponent, citoplazemskih in membranskih molekul (Gurke in sod., 2008b; Rustom in sod., 2004; Watkins in Salter, 2005). Da celice T24 pri majhni konfluentnosti tvorijo veliko TnT, celice NPU pa ne, bi lahko pripisali agresivnosti rakavih celic, ki kljub majhnemu številu celic aktivno komunicirajo med seboj tudi preko TnT.

Število TnT torej kaže, kdaj celice aktivno komunicirajo in kdaj ne. Celice T24 najbolj komunicirajo, ko jih je manj, celice NPU pa, ko se že združujejo v večje otočke. TnT so torej ključnega pomena pri razvoju in napredovanju raka. Že manjše število celic T24 je dovolj, da se med seboj lahko povežejo s TnT, ki jim omogočajo komunikacijo in s tem tudi večjo možnost za preživetje. V prihodnje bi bilo pomembno raziskati, kateri tovor se prenaša po TnT, ko se te najbolj tvorijo in ali se razlikuje med celicami T24 in NPU. Pomembno bi bilo tudi ugotoviti, ali prekinitev TnT med celicami T24 inhibira rast celic T24. Odkritje bi lahko pripomoglo k razvoju zdravil, ki bi zmanjšala rast tumorskega tkiva.

### **5.1.3 TnT celic T24 so krajše in tanjše od TnT celic NPU**

Dolžina TnT se razlikuje pri različnih tipih celic. Povprečna dolžina TnT limfocitov T tako znaša 22  $\mu\text{m}$  (Sowinski in sod., 2008), medtem ko celic feokromocitoma le 6  $\mu\text{m}$  (Rustom in sod., 2004). TnT med rakavimi urotelijskimi celicami T24 so krajše od TnT med normalnimi urotelijskimi celicami NPU. Predvidevamo, da TnT pri celicah T24 služijo predvsem za komunikacijo med bližnjimi celicami. TnT celic NPU so bolj raznolike v dolžini kot TnT celic T24, vendar večinoma služijo za komunikacijo med bolj oddaljenimi celicami. Tudi premer TnT je različen pri različnih tipih celic. TnT med celicami feokromocitoma so imele premer med 50 in 200 nm (Rustom in sod., 2004), medtem ko so imele nekatere TnT med

celicami makrofagov premer več kot 700 nm (Onfelt in sod., 2006). TnT celic T24 so bile tanjše od TnT celic NPU. Razlog za debelejšje TnT med celicami NPU bi lahko bil v prisotnosti intermediarnih filamentov in mikrotubulov v TnT, kot to navajajo tudi Onfelt in sod. (2006) v primeru TnT med človeškimi makrofagi. Glede na to, da so TnT celic NPU daljše od TnT celic T24 predvidevamo, da TnT celic NPU potrebujejo dodatno strukturno oporo intermediarnih filamentov in mikrotubulov, ki najverjetneje doprinesejo k večjemu premeru TnT. Naši rezultati torej še dodatno potrjujejo ugotovitve, da se TnT med različnimi tipi celic razlikujejo (Onfelt in sod., 2006).

V magistrski nalogi smo preverjali odvisnost dolžine TnT od citoskeletne zgradbe. V prihodnje bi lahko raziskali, ali imajo različno dolge TnT tudi različno vlogo. Lahko bi namreč sklepali, da je vloga krajših TnT celic T24 drugačna od vloge daljših TnT celic NPU.

#### **5.1.4 V TnT so prisotni aktinski filament, intermediarni filament in mikrotubuli**

Prisotnost aktinskih filamentov v TnT velja za eno glavnih lastnosti TnT (Rustom in sod., 2004), vendar pa raziskave kažejo, da nekatere TnT vsebujejo tudi druge citoskeletne elemente. V raziskavi smo želeli preveriti, ali se v TnT rakavih in normalnih urotelijskih celic nahajajo F-aktin (aktinski filament), CK7 (intermediarni filament) in  $\alpha$ -tubulin (mikrotubuli). Ugotovili smo, da v rakavih in normalnih urotelijskih celicah TnT vsebujejo vse tri citoskeletne elemente, razlika med njimi je le v tem, da nekatere TnT vsebujejo le enega, nekatere dva in druge vse tri citoskeletne elemente hkrati.

Pri dvojnem (imuno)označevanju F-aktina in CK7 je bil pri celicah T24 večji odstotek TnT, ki so vsebovale le F-aktin, kot pri celicah NPU. To lahko povežemo s krajšimi TnT, značilnimi za celice T24. Krajše TnT ne potrebujejo podpore strukturno močnejših citoskeletnih elementov, zato zadošča le F-aktin. V nasprotju od celic T24 so za celice NPU značilne daljše TnT, kar lahko povežemo z manjšim odstotkom TnT, ki so vsebovale le F-aktin in večjim odstotkom TnT, ki so vsebovale kombinacijo F-aktina in CK7. Vloga intermediarnega filameta CK7 bi v tem primeru lahko bila dodatna podpora daljšim in stabilnejšim TnT (Veranic in sod., 2008).

Podobno je bilo pri dvojnem (imuno)označevanju F-aktina in  $\alpha$ -tubulina. Pri celicah T24 je bil večji odstotek TnT, ki so vsebovale samo F-aktin kot pri celicah NPU. Tudi v tem primeru lahko manjši odstotek TnT v celicah NPU, ki so vsebovale samo F-aktin, in večji odstotek F-aktina v kombinaciji z  $\alpha$ -tubulinom pojasnimo z vlogo  $\alpha$ -tubulina kot sestavnega dela mikrotubulov pri opori daljših TnT, značilnih za celice NPU. Podobno so ugotovili Wang in sod. (2012), kjer so bile TnT med nediferenciranimi živčnimi celicami hipokampusu in astrociti, ki niso vsebovale F-aktina daljše od TnT z F-aktinom. Dolžina TnT je torej glede na rezultate v raziskavi in ugotovitve drugih raziskovalcev povezana z zgradbo TnT (Zhang in Zhang, 2013).

Tako pri celicah T24 kot pri celicah NPU je pri dvojnem imunooznačevanju  $\alpha$ -tubulina in CK7 večino TnT gradila kombinacija obeh. Pri obeh tipih celic je kombinacija obeh elementov citoskeleta gradila daljše TnT, kar je bilo pričakovati, saj oba omogočata strukturno stabilnost daljšim TnT. Iz rezultatov lahko tudi sklepamo, da CK7 sam ali v kombinaciji z drugim elementom citoskeleta ne gradi nujno le daljših TnT, ampak lahko tudi krajše.

Da bi ugotovili, ali TnT vsebujejo tudi vse tri citoskeletne elemente, smo razvili postopek trojnega (imuno)označevanja. Dokazali smo, da pri celicah T24 in NPU nekatere TnT sestavljajo vsi trije elementi citoskeleta. Pri celicah T24 je večino TnT sestavljala kombinacija treh elementov citoskeleta, preostale je sestavljala F-aktin ali F-aktin v kombinaciji z  $\alpha$ -tubulinom. To se ujema s tem, da celice T24 tvorijo veliko kratkih TnT, ki jih najverjetneje gradi le F-aktin, tvorijo pa tudi daljše TnT, ki potrebujejo dodatno oporo ostalih elementov citoskeleta. Manjši odstotek F-aktina kot bi ga pričakovali, glede na veliko število krajših TnT, gre pripisati temu, da so TnT zelo občutljive strukture (Gurke in sod., 2008a), zato je možno, da jih je poškodoval postopek fiksacije in označevanja. Manjši odstotek F-aktina je bil morda tudi zato, ker je bilo F-aktin, zaradi nekoliko slabše modre fluorescence, težje opaziti kot pa  $\alpha$ -tubulin z močnejšo zeleno fluorescenco in CK7 z močnejšo rdečo fluorescenco. Pri celicah NPU je večino TnT gradil CK7, kar je skladno s tem kar trdijo Veranic in sod. (2008), da CK7 gradi daljše in stabilnejše TnT. Ravno daljše

TnT pa so značilne za celice NPU. Nekatere TnT celic NPU so gradili tudi vsi trije elementi citoskeleta ali kombinacija F-aktina in CK7.

TnT celic T24 in NPU se razlikujejo v zgradbi citoskeleta. Skupno jim je to, da F-aktin gradi krajše TnT, F-aktin v kombinaciji z drugimi elementi citoskeleta ali kombinaciji intermediarnih elementov in mikrotubulov pa gradi daljše TnT, saj potrebujejo močnejšo strukturno oporo. Zanimivo je, da CK7 sam ali v kombinaciji z drugimi elementi citoskeleta ne gradi nujno le daljših TnT, ampak tudi krajše. Iz rezultatov lahko povzamemo, da je F-aktin glavni strukturni element v TnT celic T24, saj se sam ali v kombinaciji z drugimi elementi citoskeleta nahaja v vseh TnT. Glavni strukturni element TnT celic NPU je CK7, saj se ravno tako sam ali v kombinaciji z drugimi elementi citoskeleta nahaja v vseh TnT. V raziskavi smo kot prvi dokazali, da nekatere TnT gradijo vsi trije elementi citoskeleta hkrati.

### **5.1.5 TnT nastanejo z oddaljevanjem celic in rastjo filopodiju podobnega izrastka**

TnT lahko nastanejo na dva različna načina. Prvi način je rast izrastka podobnega filopodiju proti tarčni celici, drugi način pa je oddaljevanje tesno stikajočih se celic (Davis in Sowinski, 2008). Dokazali smo, da je eden izmed možnih načinov nastanka TnT pri celicah T24 oddaljevanje tesno stikajočih se celic, medtem ko je pri celicah NPU eden izmed možnih načinov nastanka TnT z rastjo izrastka podobnega filopodiju. V primeru nastanka TnT z oddaljevanjem celic T24 je potrebno poudariti, da so nastale TnT najverjetneje posledica stresnih dejavnikov, kot so osvetlevanje in višje temperature med mikroskopiranjem. Omenjeni stresni dejavniki bi lahko vplivali na premikanje celic in posledično tudi na nastanek TnT. Pri celicah T24 so TnT nastale hitro. Celice so se hitro oddaljile druga od druge, TnT so nastale v 9 min od začetka snemanja. Pri celicah NPU so TnT nastajale počasneje. Izrastek je rasel počasi, TnT je nastala v 35 min od začetka snemanja. Pri celicah NPU smo med nastajanjem TnT z rastjo izrastka opazili prehod jedra v razširjen konec TnT. V tem primeru je nastanek TnT predstavljal poseben primer nastanka, saj izrastek ni rasel proti tarčni celici, kot to običajno opisujejo raziskovalci (Davis in Sowinski, 2008; Gerdes in sod., 2007; Rustom in sod., 2004; Veranic in sod., 2008).



Do sedaj so raziskovalci pri večini tipov celic ugotovili, da TnT nastanejo z oddaljevanjem tesno stikajočih se celic. Veranic in sod. (2008) so odkrili, da TnT urotelijskih celic RT4 in T24 nastajajo na oba načina. V naši raziskavi smo pri celicah T24 dokazali nastanek TnT na drugi način, pri celicah NPU pa na prvi način. Glede na predhodne raziskave ni nujno, da je to edini način nastanka TnT pri posameznih celicah, ampak najbolj pogost ter posledično lažje opazen. Možno je tudi, da so TnT nastale z oddaljevanjem celic zaradi stresnih dejavnikov. Celice so bile namreč izpostavljene svetlobnemu in toplotnemu sevanju mikroskopa.

## 5.2 TnT V KOKULTURI RAKAVIH IN NORMALNIH UROTELIJSKIH CELIC

### 5.2.1 TnT se tvorijo med rakavimi in normalnimi urotelijskimi celicami

V zadnjem času je vse večji poudarek na raziskavah komunikacije med rakavimi celicami in normalnimi celicami. TnT, ki povezujejo rakave in normalne celice, najverjetneje pripomorejo k razvoju in napredovanju tumorja ter k nastanku metastaz (Lou in sod., 2012b). Da bi ugotovili, ali se TnT tvorijo iz rakavih urotelijskih celic T24 na normalne urotelijske celice NPU in obratno, smo celice gojili v kokulturi.

TnT so nastale tako iz rakavih urotelijskih celic na normalne urotelijske celice kot tudi obratno. Največ TnT iz rakavih urotelijskih celic na normalne urotelijske celice je bilo, ko je bilo rakavih urotelijskih celic malo, normalne urotelijske celice pa so preraščale zadostno površino, da so se rakave urotelijske celice povezale z njimi. Rakave urotelijske celice so že v monokulturi, ko so bile v majhnem številu, tvorile največ TnT. Thayanithy in sod. (2014) so dokazali, da se preko TnT med rakavimi in normalnimi celicami prenaša genetski material. Možno je, da tudi med rakavimi in normalnimi urotelijskimi celicami pride do prenašanja genetskega materiala ali drugega tovora, ki bi lahko stimuliral rast in širitev raka sečnega mehurja. Poleg tega so Pasquier in sod. (2013) ugotovili, da se mitohondriji iz endotelijskih celic preko TnT prenašajo v rakave celice, posledično pa rakave celice s tem pridobijo večjo odpornost na kemoterapijo. Celice najverjetneje s prenosom mitohondrijev preprečijo apoptozo, ki jo povzročijo kemoterapevtiki s povečanjem prepustnosti membrane mitohondrijev (Pasquier in sod., 2013).

Le v kokulturi z nasaditveno gostoto rakavih urotelijskih celic  $2 \times 10^5$  c/cm<sup>2</sup> in normalnih urotelijskih celic  $5 \times 10^3$  c/cm<sup>2</sup> je bilo število TnT iz normalnih urotelijskih celic na rakave urotelijske celice statistično značilno večje, saj TnT iz rakavih urotelijskih celic na normalne urotelijske celice ni bilo. Celice T24 so v tem primeru povsem preraščale gojilno površino, celic NPU pa je bilo malo in so se nahajale posamezno.

Raziskovanje komunikacije med rakavimi urotelijskimi celicami in normalnimi urotelijskimi celicami omogoča boljše razumevanje biologije raka sečnega mehurja in odpira nove možnosti za razvoj zdravil. S tarčnimi zdravili, ki bi ciljali na TnT, bi lahko prekinili medcelični prenos tovara, ki stimulira rast in širitev raka sečnega mehurja, in morda celo preprečili odpornost rakavih celic na kemoterapijo (Lou in sod., 2012b; Thayanithy in sod., 2014). Zato so nadaljnje raziskave TnT, ki povezujejo rakave celice ali normalne celice in rakave celice z normalnimi celicami, bistvenega pomena. V prihodnje bi bilo smiselno raziskati, ali so med TnT rakavih in normalnih celic strukturne razlike, ki bi pripomogle k razvoju dobrih tarčnih zdravil, ki bi ciljale le na TnT rakavih celic. Pomembno bi bilo tudi raziskati pomen komunikacije med rakavimi in normalnimi celicami in ugotoviti, ali lahko prekinitev te komunikacije upočasni napredovanje tumorja.

### **5.2.2 TnT rakavih urotelijskih celic vsebujejo N-kadherin, TnT normalnih urotelijskih celic vsebujejo E-kadherin**

N- in E-kadherin sta pomembna transmembranska stična proteina, obenem imata pomembno vlogo pri pritrditvi TnT na tarčno celico, saj jo stabilizirata (Lokar in sod., 2010). E-kadherin ohranja povezanost s sosednjimi epitelijskimi celicami in s tem ohranja fenotip epitelijskih celic (Rangel in sod., 2012). Med EMT pride do prenehanja izražanja E-kadherina in začne se izražati N-kadherin, s tem celice dobijo lastnosti mezenhimskih celic, kot sta gibljivost in invazivnost (Kalluri in Weinberg, 2009). N-kadherin je torej značilen za rakave celice. V raziskavi smo ugotovili, da TnT rakavih urotelijskih celic vsebujejo N-kadherin po celotni dolžini TnT. To se ujema z ugotovitvijo Lokar in sod. (2010), da se N-kadherin akumulira v TnT celic T24. Dokazali pa smo tudi, da se vzdolž celotne TnT normalnih urotelijskih celic nahaja E-kadherin. Z imunooznačevanjem N- in E-kadherina v monokulturi smo dokazali,

da pri pritrjanju TnT na celice T24 sodeluje N-kadherin, pri pritrjanju TnT na celice NPU pa E-kadherin.

V kokulturi rakavih in normalnih urotelijskih celic so nastale TnT, ki so povezovala rakave in normalne urotelijske celice in so vsebovale N-kadherin ali E-kadherin. Kolokalizacije N- in E-kadherina v TnT ne moremo potrditi. Celice NPU so v kokulturi celic vsebovale N- in E-kadherin. Vzrok temu ni povsem jasen, morda je bil razlog v nediferenciranosti celic in možnosti, da tudi normalne urotelijske celice sintetizirajo N-kadherin, ko še ne tvorijo epitelija ali konfluentne kulture. V literaturi tega podatka ni. Ne izključujemo tudi možnosti, da je prisotnost N-kadherina v celicah NPU posledica postopka imunooznačevanja in morebitne nespecifičnosti protitelesih.

## 6 SKLEPI

1.) Med rakavimi in normalnimi urotelijskimi celicami so opazne razlike v obliki celic, vendar pa TnT niso spremenile osnovne oblike celic, kar smo dokazali z računanjem indeksa celične oblike.

2.) V monokulturi rakavih urotelijskih celic je število TnT večje, ko je konfluentnost manjša. V monokulturi normalnih urotelijskih celic je število TnT večje, ko je konfluentnost večja.

3.) Rakave urotelijske celice imajo statistično značilno krajše in tanjše TnT kot normalne urotelijske celice.

4.) Uspešno smo razvili postopek razvili postopek trojnega (imuno)označevanja.in ugotovili, da različne kombinacije aktinskih filamentov, intermediarnih filamentov in mikrotubulov gradijo TnT. Nekatere TnT vsebujejo vse tri citoskeletne elemente hkrati.

5.) TnT rakavih urotelijskih celic vsebujejo N-kadherin, TnT normalnih urotelijskih celic vsebujejo E-kadherin. TnT, ki v kokulturi povezujejo rakave urotelijske celice z normalnimi urotelijskimi celicami, vsebujejo N-kadherin ali E-kadherin.

6.) TnT rakavih urotelijskih celic nastajajo z oddaljevanjem tesno stikajočih se celic, TnT normalnih urotelijskih celic pa z rastjo izrastka podobnega filopodiju.

7.) TnT rastejo iz rakavih urotelijskih celic na normalne, ko je rakavih urotelijskih celic malo, normalne urotelijske celice pa se združujejo v večje otočke. TnT rastejo iz normalnih urotelijskih celic na rakave, ko rakave urotelijske celice skoraj ali že povsem preraščajo gojilno površino, normalnih urotelijskih celic pa je malo.

## 7 POVZETEK

Komunikacija celic omogoča pravilno delovanje in aktivnost posameznih celic, to je ključnega pomena pri razvoju tkiv in ohranjanju homeostaze. TnT so cevasti citoplazemski izrastki, ki povezujejo različno oddaljene celice. Po TnT potujejo organeli, membranske komponente, citoplazemske molekule ter patogeni, kot so bakterije, virusi in prioni. TnT imajo poleg pomembne fiziološke vloge v večceličnih organizmih pomembno vlogo tudi pri širjenju bolezni. Kot glavna lastnost TnT je dolgo veljal aktinski filamenet (F-aktin), a se je izkazalo, da TnT gradijo tudi drugi citoskeletni elementi. Raziskave TnT zadnja leta kažejo na visoko stopnjo heterogenosti v morfologiji in strukturi TnT.

V magistrski nalogi smo ugotavljali vpliv TnT na obliko celic. To smo naredili tako, da smo v monokulturi celic T24 ali celic NPU celicam, ki so tvorile TnT, in celicam brez TnT, izmerili parametre, s katerimi smo izračunali ICO. Ugotovili smo, da TnT ne vplivajo na ICO, in da se celice T24 ter celice NPU razlikujejo v obliki.

Raziskali smo tudi morfološke lastnosti TnT. Celice T24 in celice NPU smo gojili s štirimi nasaditvenimi gostotami. Prvi in drugi dan po nasaditvi smo poiskali TnT, jih prešteli in jim izmerili dolžino. TnT, ki smo jih posneli z vrstičnim elektronskim mikroskopom, smo izmerili tudi premer. Monokulturam celic smo določili konfluentnost, ki nam je pomagala pri interpretaciji števila TnT. Ugotovili smo, da je pri celicah T24 število TnT večje med celicami, ki se združujejo v manjše otočke pri manjši konfluentnosti, pri celicah NPU pa je število TnT večje med celicami, ki se združujejo v večje otočke pri večji konfluentnosti. Ugotovili smo, da so TnT celic T24 krajše in tanjše od TnT celic NPU.

Raziskali smo tudi strukturne lastnosti TnT, preverjali smo prisotnost treh citoskeletnih elementov. Celice T24 in celice NPU smo nasadili z določeno nasaditveno gostoto in jih dvojno imunooznačili z vsemi pari kombinacij F-aktina,  $\alpha$ -tubulina in CK7. Celice T24 in celice NPU smo nato tudi trojno fluorescenčno označili, saj smo želeli ugotoviti, ali TnT lahko gradijo vsi trije elementi citoskeleta hkrati. Ugotovili smo, da aktin gradi krajše TnT, aktin v kombinaciji z drugimi elementi citoskeleta ali kombinacija intermediarnih elementov in mikrotubulov pa gradi daljše TnT. Intermediarni filamentni sami ali v kombinaciji z

drugimi citoskeletnimi elementi lahko gradijo krajše ali daljše TnT. Ena izmed glavnih ugotovitev je, da TnT lahko vsebujejo tudi vse tri citoskeletne elemente.

TnT lahko nastanejo na dva načina. Prvi je rast izrastka podobnega filopodiju proti tarčni celici. Drugi način je oddaljevanje tesno stikajočih se celic. Nastanek TnT se razlikuje med različnimi celičnimi tipi. Večina do sedaj raziskanih TnT nastane na drugi način. V magistrski nalogi smo želeli ugotoviti, na kakšen način nastanejo TnT celic T24 in celic NPU. Celice smo nasadili z določeno nasaditveno gostoto in jih dva dni kasneje snemali s svetlobnim mikroskopom. TnT celic T24 so nastajale z oddaljevanjem tesno stikajočih se celic, TnT celic NPU pa z rastjo izrastka podobnega filopodiju.

Na svetu zaradi raka sečnega mehurja letno umre okoli 150.000 ljudi. Pri raku sečnega mehurja pride do genetskih sprememb celic v uroteliju, specializiranem večplastnem epiteliju sečnega mehurja. TnT se tvorijo tako med rakavimi celicami kot tudi med rakavimi celicami in celicami vezivnega tkiva. TnT imajo torej pomembno vlogo pri razvoju in širjenju tumorja, zato predstavljajo potencialno tarčo za razvoj selektivnih zdravil. Preverjali smo prisotnost TnT, ki povezujejo celice T24 s celicami NPU. Celice smo nasadili v kokulturi ter prvi in drugi dan po nasaditvi poiskali morebitne TnT med celicami T24 in celicami NPU. Dokazali smo, da se TnT tvorijo tako iz celic T24 na celice NPU kot tudi obratno. Največ TnT iz celic T24 na celice NPU nastane, ko je celic T24 malo, celice NPU pa se preraščajo večji del gojilne površine.

N- in E-kadherin sta pomembna stična proteina. E-kadherin ohranja fenotip epiteljskih celic, med EMT ga namreč zamenja N-kadherin, ki je značilen za rakave celice. V kokulturi celic T24 in NPU smo preverjali prisotnost N- in E-kadherina. Ugotovili smo, da TnT v kokulturi vsebujejo N- ali E-kadherin, kolokalizacije obeh nismo potrdili.

Z magistrsko nalogo smo dopolnili predhodne raziskave morfoloških in strukturnih lastnosti TnT. Dokazali smo, da se TnT tvorijo med celicami T24 in celicami NPU. Vsekakor bo potrebnih še veliko raziskav, da bomo lahko resnično razumeli strukturo in vlogo TnT. Raziskave na področju TnT med rakavimi celicami ter med rakavimi in normalnimi celicami pa bi lahko omogočile razvoj novih, učinkovitejših zdravil.

## 8 VIRI

- Abraham P., Rabi S., Selvakumar D. 2009. Protective effect of aminoguanidine against oxidative stress and bladder injury in cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rat. *Cell biochemistry and function*, 27, 1: 56-62
- Acharya P., Beckel J., Ruiz W. G., Wang E., Rojas R., Birder L., Apodaca G. 2004. Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium. *American journal of physiology. Renal physiology*, 287, 2: F305-F318
- Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2014. *Essential Cell Biology*. 4<sup>th</sup> ed. New York, Garland Science, Taylor & Francis Group: 864 str.
- Apodaca G. 2004. The uroepithelium: not just a passive barrier. *Traffic*, 5, 3: 117-128
- Arkwright P. D., Luchetti F., Tour J., Roberts C., Ayub R., Morales A. P., Rodriguez J. J., Gilmore A., Canonico B., Papa S., Esposti M. D. 2010. Fas stimulation of T lymphocytes promotes rapid intercellular exchange of death signals via membrane nanotubes. *Cell research*, 20, 1: 72-88
- Austefjord M. W., Gerdes H. H., Wang X. 2014. Tunneling nanotubes: Diversity in morphology and structure. *Communicative and integrative biology*, 7, 1: e27934, doi: 10.4161/cib.27934: 5 str.
- Beckett A. 1981. The ultrastructure of septal pores and associated structures in the ascogenous hyphae and asci of *Sordaria humana*. *Protoplasma*, 107, 1: 127-147
- Beum P. V., Lindorfer M. A., Beurskens F., Stukenberg P. T., Lokhorst H. M., Pawluczkoysz A. W., Parren P. W., van de Winkel J. G., Taylor R. P. 2008. Complement activation on B lymphocytes opsonized with rituximab or ofatumumab produces substantial changes in membrane structure preceding cell lysis. *Journal of immunology*, 181, 1: 822-832
- Beum P. V., Lindorfer M. A., Peek E. M., Stukenberg P. T., de Weers M., Beurskens F. J., Parren P. W., van de Winkel J. G., Taylor R. P. 2011. Penetration of antibody-opsonized cells by the membrane attack complex of complement promotes Ca(2+) influx and induces streamers. *European journal of immunology*, 41, 8: 2436-2446
- Birder L. A. 2011. Urothelial signaling. V: Urinary Tract. Andersson K. E., Michel M. C. (eds.). Heidelberg, Springer: 207-231, doi: 10.1007/978-3-642-16499-6\_10: 577 str.
- Bloemendal S., Kuck U. 2013. Cell-to-cell communication in plants, animals, and fungi: a comparative review. *Naturwissenschaften*, 100, 1: 3-19

- Bukoreshtliev N. V., Wang X., Hodneland E., Gurke S., Barroso J. F., Gerdes H. H. 2009. Selective block of tunneling nanotube (TNT) formation inhibits intercellular organelle transfer between PC12 cells. *FEBS Letters*, 583, 9: 1481-1488
- Caneparo L., Pantazis P., Dempsey W., Fraser S. E. 2011. Intercellular bridges in vertebrate gastrulation. *Public library of science one*, 6, 5: e20230, doi: 10.1371/journal.pone.0020230: 6 str.
- Chauveau A., Aucher A., Eissmann P., Vivier E., Davis D. M. 2010. Membrane nanotubes facilitate long-distance interactions between natural killer cells and target cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 12: 5545-5550
- Chinnery H. R., Pearlman E., McMenamin P. G. 2008. Cutting edge: Membrane nanotubes in vivo: a feature of MHC class II+ cells in the mouse cornea. *Journal of immunology*, 180, 9: 5779-5783
- Davis D. M., Sowinski S. 2008. Membrane nanotubes: dynamic long-distance connections between animal cells. *Nature reviews molecular cell biology*, 9, 6: 431-436
- De Wever O., Pauwels P., De Craene B., Sabbah M., Emami S., Redeuilh G., Gespach C., Bracke M., Berx G. 2008. Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front. *Histochemistry and cell biology*, 130, 3: 481-494
- Domhan S., Ma L., Tai A., Anaya Z., Beheshti A., Zeier M., Hlatky L., Abdollahi A. 2011. Intercellular communication by exchange of cytoplasmic material via tunneling nanotube like structures in primary human renal epithelial cells. *Public library of science one*, 6, 6: e21283, doi: 10.1371/journal.pone.0021283: 8 str.
- Dubey G. P., Ben-Yehuda S. 2011. Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell*, 144, 4: 590-600
- Eugenin E. A., Gaskill P. J., Berman J. W. 2009. Tunneling nanotubes (TNT) are induced by HIV-infection of macrophages: a potential mechanism for intercellular HIV trafficking. *Cellular immunology*, 254, 2: 142-148
- Fevrier B., Raposo G. 2004. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Current opinion in cell biology*, 16, 4: 415-421
- Gerdes H. H., Rustom A., Wang X. 2013. Tunneling nanotubes, an emerging intercellular communication route in development. *Mechanisms of development*, 130, 6-8: 381-387
- Gerdes H. H., Bukoreshtliev N. V., Barroso J. F. 2007. Tunneling nanotubes: a new route for the exchange of components between animal cells. *FEBS Letters*, 581, 11: 2194-2201



- Gimsa U., Iglic A., Fiedler S., Zwanzig M., Kralj-Iglic V., Jonas L., Gimsa J. 2007. Actin is not required for nanotubular protrusions of primary astrocytes grown on metal nano-lawn. *Molecular membrane biology*, 24, 3: 243-255
- Gittes F., Mickey B., Nettleton J., Howard J. 1993. Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *The Journal of cell biology*, 120, 4: 923-934
- Gousset K., Marzo L., Commere P. H., Zurzolo C. 2013. Myo10 is a key regulator of TNT formation in neuronal cells. *Journal of cell science*, 126, 19: 4424-4435
- Gousset K., Schiff E., Langevin C., Marijanovic Z., Caputo A., Browman D. T., Chenouard N., de Chaumont F., Martino A., Enninga J., Olivo-Marin J. C., Mannel D., Zurzolo C. 2009. Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nature cell biology*, 11, 3: 328-336
- Groothuis T. A., Griekspoor A. C., Neijssen J. J., Herberts C. A., Neefjes J. J. 2005. MHC class I alleles and their exploration of the antigen-processing machinery. *Immunological reviews*, 207, 60-76
- Gull K. 1976. Differentiation of septal ultrastructure according to cell type in the basidiomycete, *Agrocybe praecox*. *Journal of ultrastructure research*, 54, 1: 89-94
- Gurke S., Barroso J. F., Gerdes H. H. 2008a. The art of cellular communication: tunneling nanotubes bridge the divide. *Histochemistry and cell biology*, 129, 5: 539-550
- Gurke S., Barroso J. F., Hodneland E., Bukoreshtliev N. V., Schlicker O., Gerdes H. H. 2008b. Tunneling nanotube (TNT)-like structures facilitate a constitutive, actomyosin-dependent exchange of endocytic organelles between normal rat kidney cells. *Experimental cell research*, 314, 20: 3669-3683
- Hase K., Kimura S., Takatsu H., Ohmae M., Kawano S., Kitamura H., Ito M., Watarai H., Hazelett C. C., Yeaman C., Ohno H. 2009. M-Sec promotes membrane nanotube formation by interacting with Ral and the exocyst complex. *Nature cell biology*, 11, 12: 1427-1432
- He K., Luo W., Zhang Y., Liu F., Liu D., Xu L., Qin L., Xiong C., Lu Z., Fang X., Zhang Y. 2010. Intercellular transportation of quantum dots mediated by membrane nanotubes. *American chemical society nano*, 4, 6: 3015-3022
- Hicks R. M. 1975. The mammalian urinary bladder: an accommodating organ. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 50, 2: 215-246
- Hofmann C., Sambade A., Heinlein M. 2007. Plasmodesmata and intercellular transport of viral RNA. *Biochemical Society transactions*, 35, Pt 1: 142-145

- Hossler F. E., Monson F. C. 1995. Microvasculature of the rabbit urinary bladder. *The Anatomical record*, 243, 4: 438-448
- Hsiung F., Ramirez-Weber F. A., Iwaki D. D., Kornberg T. B. 2005. Dependence of *Drosophila* wing imaginal disc cytonemes on Decapentaplegic. *Nature*, 437, 7058: 560-563
- Hurtig J., Chiu D. T., Onfelt B. 2010. Intercellular nanotubes: insights from imaging studies and beyond. *Wiley interdisciplinary reviews: nanomedicine and nanobiotechnology*, 2, 3: 260-276
- Iglic A., Hagerstrand H., Bobrowska-Hagerstrand M., Arrigler V., Kralj-Iglic V. 2003. Possible role of phospholipid nanotubes in direct transport of membrane vesicles. *Elsevier Science B. V.*, 310, 493-497
- Jeanes A., Gottardi C. J., Yap A. S. 2008. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene*, 27, 55: 6920-6929
- Kabaso D., Lokar M., Kralj-Iglic V., Veranic P., Iglic A. 2011. Temperature and cholera toxin B are factors that influence formation of membrane nanotubes in RT4 and T24 urothelial cancer cell lines. *International journal of nanomedicine*, 6: 495-509
- Kalluri R., Weinberg R. A. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The journal of clinical investigation*, 119, 6: 1420-1428
- Khandelwal P., Abraham S. N., Apodaca G. 2009. Cell biology and physiology of the uroepithelium. *American journal of physiology. Renal physiology*, 297, 6: F1477-F1501
- Kimura S., Hase K., Ohno H. 2013. The molecular basis of induction and formation of tunneling nanotubes. *Cell and tissue research*, 352, 1: 67-76
- Kimura S., Hase K., Ohno H. 2012. Tunneling nanotubes: emerging view of their molecular components and formation mechanisms. *Experimental cell research*, 318, 14: 1699-1706
- Koyanagi M., Brandes R. P., Haendeler J., Zeiher A. M., Dimmeler S. 2005. Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes? *Circulation research*, 96, 10: 1039-1041
- Kreft M. E., Robenek H. 2012. Freeze-fracture replica immunolabelling reveals urothelial plaques in cultured urothelial cells. *Public library of science one*, 7, 6: e38509, doi: 10.1371/journal.pone.0038509: 8 str.
- Kreft M. E., Di Giandomenico D., Beznoussenko G. V., Resnik N., Mironov A. A., Jezernik K. 2010. Golgi apparatus fragmentation as a mechanism responsible for uniform delivery of uroplakins to the apical plasma membrane of uroepithelial cells. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 102, 11: 593-607

- Kreft M. E., Sterle M., Veranic P., Jezernik K. 2005. Urothelial injuries and the early wound healing response: tight junctions and urothelial cytodifferentiation. *Histochemistry and cell biology*, 123, 4-5: 529-539
- Kristl J., Plajnssek K. T., Kreft M. E., Jankovic B., Kocbek P. 2013. Intracellular trafficking of solid lipid nanoparticles and their distribution between cells through tunneling nanotubes. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 50, 1: 139-148
- Kuznetsov A. V. 2011. Modeling bidirectional transport of quantum dot nanoparticles in membrane nanotubes. *Mathematical biosciences*, 232, 2: 101-109
- Lee J. Y. 2014. New and old roles of plasmodesmata in immunity and parallels to tunneling nanotubes. *Plant science*, 221-222, 13-20
- Lee J. Y., Cui W. 2009. Non-cell Autonomous RNA Trafficking and Long-Distance Signaling. *Journal of plant biology*, 52, 1: 10-18
- Lewis S. A. 2000. Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. *American journal of physiology. Renal physiology*, 278, 6: F867-F874
- Liang F. X., Riedel I., Deng F. M., Zhou G., Xu C., Wu X. R., Kong X. P., Moll R., Sun T. T. 2001. Organization of uroplakin subunits: transmembrane topology, pair formation and plaque composition. *The Biochemical journal*, 355, Pt 1: 13-18
- Lokar M., Iglic A., Veranic P. 2010. Protruding membrane nanotubes: attachment of tubular protrusions to adjacent cells by several anchoring junctions. *Protoplasma*, 246, 1-4: 81-87
- Lokar M., Kabaso D., Resnik N., Sepcic K., Kralj-Iglic V., Veranic P., Zorec R., Iglic A. 2012. The role of cholesterol-sphingomyelin membrane nanodomains in the stability of intercellular membrane nanotubes. *International journal of nanomedicine*, 7, 1891-1902
- Lou E., Fujisawa S., Morozov A., Barlas A., Romin Y., Dogan Y., Gholami S., Moreira A. L., Manova-Todorova K., Moore M. A. 2012a. Tunneling nanotubes provide a unique conduit for intercellular transfer of cellular contents in human malignant pleural mesothelioma. *Public library of science one*, 7, 3: e33093, doi: 10.1371/journal.pone.0033093: 11 str.
- Lou E., Fujisawa S., Barlas A., Romin Y., Manova-Todorova K., Moore M. A., Subramanian S. 2012b. Tunneling Nanotubes: A new paradigm for studying intercellular communication and therapeutics in cancer. *Communicative and integrative biology*, 5, 4: 399-403
- Lucas W. J., Lee J. Y. 2004. Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. *Nature reviews molecular cell biology*, 5, 9: 712-726

- Luchetti F., Canonico B., Arcangeletti M., Guescini M., Cesarini E., Stocchi V., Degli Esposti M., Papa S. 2012. Fas signalling promotes intercellular communication in T cells. *Public library of science one*, 7, 4: e35766, doi: 10.1371/journal.pone.0035766: 12. str.
- McKinney M. C., Stark D. A., Teddy J., Kulesa P. M. 2011. Neural crest cell communication involves an exchange of cytoplasmic material through cellular bridges revealed by photoconversion of KikGR. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 240, 6: 1391-1401
- Miller J., Fraser S. E., McClay D. 1995. Dynamics of thin filopodia during sea urchin gastrulation. *Development*, 121, 8: 2501-2511
- Mineo M., Garfield S. H., Taverna S., Flugy A., De Leo G., Alessandro R., Kohn E. C. 2012. Exosomes released by K562 chronic myeloid leukemia cells promote angiogenesis in a Src-dependent fashion. *Angiogenesis*, 15, 1: 33-45
- Nowell P. C. 2002. Tumor progression: a brief historical perspective. *Seminars in cancer biology*, 12, 4: 261-266
- Onfelt B., Davis D. M. 2004. Can membrane nanotubes facilitate communication between immune cells? *Biochemical Society transactions*, 32, Pt 5: 676-678
- Onfelt B., Nedvetzki S., Yanagi K., Davis D. M. 2004. Cutting edge: Membrane nanotubes connect immune cells. *Journal of immunology*, 173, 3: 1511-1513
- Onfelt B., Nedvetzki S., Benninger R. K., Purbhoo M. A., Sowinski S., Hume A. N., Seabra M. C., Neil M. A., French P. M., Davis D. M. 2006. Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. *Journal of immunology*, 177, 12: 8476-8483
- Parkin D. M. 2011a. 2. Tobacco-attributable cancer burden in the UK in 2010. *British journal of cancer*, 105: S6-S13, doi: 10.1038/bjc.2011.475: 8 str.
- Parkin D. M. 2011b. 14. Cancers attributable to occupational exposures in the UK in 2010. *British journal of cancer*, 105: S70-S72, doi: 10.1038/bjc.2011.487: 3 str.
- Parsons C. L., Boychuk D., Jones S., Hurst R., Callahan H. 1990. Bladder surface glycosaminoglycans: an epithelial permeability barrier. *The journal of urology*, 143, 1: 139-142
- Parsons C. L., Greenspan C., Moore S. W., Mulholland S. G. 1977. Role of surface mucin in primary antibacterial defense of bladder. *Urology*, 9, 1: 48-52
- Pasquier J., Guerrouahen B. S., Al Thawadi H., Ghiabi P., Maleki M., Abu-Kaoud N., Jacob A., Mirshahi M., Galas L., Rafii S., Le Foll F., Rafii A. 2013. Preferential transfer of mitochondria from endothelial to cancer cells through tunneling nanotubes modulates

- chemoresistance. *Journal of translational medicine*, 11, 1: 94, doi: 10.1186/1479-5876-11-94: 14 str.
- Pelipenko J., Zupan J., Jankovic B., Kreft M. E., Marc J., Kristl J. 2014. Nanofibrillar scaffold orientation could affect cell growth in wound healing. *Doktorska disertacija*. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 256 str.
- Pyrgaki C., Trainor P., Hadjantonakis A. K., Niswander L. 2010. Dynamic imaging of mammalian neural tube closure. *Developmental biology*, 344, 2: 941-947
- Rak v Sloveniji 2011. 2015. Ljubljana, Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije. [http://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokumenti/RRS/LP\\_2011.pdf](http://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokumenti/RRS/LP_2011.pdf) (3. avg. 2015)
- Ramirez-Weber F. A., Kornberg T. B. 1999. Cytonemes: cellular processes that project to the principal signaling center in *Drosophila* imaginal discs. *Cell*, 97, 5: 599-607
- Rangel M. C., Karasawa H., Castro N. P., Nagaoka T., Salomon D. S., Bianco C. 2012. Role of Cripto-1 during epithelial-to-mesenchymal transition in development and cancer. *The American journal of pathology*, 180, 6: 2188-2200
- Raucher D., Sheetz M. P. 1999. Characteristics of a membrane reservoir buffering membrane tension. *Biophysical journal*, 77, 4: 1992-2002
- Robards A. W., Lucas W. J. 1990. Plasmodesmata. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41: 369-419
- Rustom A., Saffrich R., Markovic I., Walther P., Gerdes H. H. 2004. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science*, 303, 5660: 1007-1010
- Sarafraz-Yazdi E. 2014. Tunneling nanotubes: novel potentials for old players. *Translational research*, 164, 5: 357-358
- Schoelz J. E., Harries P. A., Nelson R. S. 2011. Intracellular transport of plant viruses: finding the door out of the cell. *Molecular plant*, 4, 5: 813-831
- Sherer N. M. 2013. Long-distance relationships: do membrane nanotubes regulate cell-cell communication and disease progression? *Molecular biology of the cell*, 24, 8: 1095-1098
- Sherer N. M., Lehmann M. J., Jimenez-Soto L. F., Horensavitz C., Pypaert M., Mothes W. 2007. Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission. *Nature cell biology*, 9, 3: 310-315
- Siegel R., Naishadham D., Jemal A. 2013. Cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians*, 63, 1: 11-30

- Sisakhtnezhad S., Khosravi L. 2015. Emerging physiological and pathological implications of tunneling nanotubes formation between cells. *European journal of cell biology*, 94, 10: 429-443
- Smith I. F., Shuai J., Parker I. 2011. Active generation and propagation of Ca<sup>2+</sup> signals within tunneling membrane nanotubes. *Biophysical journal*, 100, 8: L37-L39
- Sowinski S., Jolly C., Berninghausen O., Purbhoo M. A., Chauveau A., Kohler K., Oddos S., Eissmann P., Brodsky F. M., Hopkins C., Onfelt B., Sattentau Q., Davis D. M. 2008. Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nature cell biology*, 10, 2: 211-219
- Sowinski S., Alakoskela J. M., Jolly C., Davis D. M. 2011. Optimized methods for imaging membrane nanotubes between T cells and trafficking of HIV-1. *Methods*, 53, 1: 27-33
- Stemmler M. P. 2008. Cadherins in development and cancer. *Molecular bioSystems*, 4, 8: 835-850
- Sylvester R. J., van der Meijden A. P., Oosterlinck W., Witjes J. A., Bouffieux C., Denis L., Newling D. W., Kurth K. 2006. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *European urology*, 49, 3: 466-477
- Teddy J. M., Kulesa P. M. 2004. In vivo evidence for short- and long-range cell communication in cranial neural crest cells. *Development*, 131, 24: 6141-6151
- Thayanithy V., Dickson E. L., Steer C., Subramanian S., Lou E. 2014. Tumor-stromal cross talk: direct cell-to-cell transfer of oncogenic microRNAs via tunneling nanotubes. *Translational research*, 164, 5: 359-365
- Veranic P., Lokar M., Schutz G. J., Weghuber J., Wieser S., Hagerstrand H., Kralj-Iglic V., Iglic A. 2008. Different types of cell-to-cell connections mediated by nanotubular structures. *Biophysical journal*, 95, 9: 4416-4425
- Vidulescu C., Clejan S., O'Connor K C. 2004. Vesicle traffic through intercellular bridges in DU 145 human prostate cancer cells. *Journal of cellular and molecular medicine*, 8, 3: 388-396
- Visnjar T., Kreft M. E. 2013. Air-liquid and liquid-liquid interfaces influence the formation of the urothelial permeability barrier in vitro. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 49, 3: 196-204
- Vogelstein B., Kinzler K. W. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine*, 10, 8: 789-799
- Wang X., Veruki M. L., Bukoreshtliev N. V., Hartveit E., Gerdes H. H. 2010. Animal cells connected by nanotubes can be electrically coupled through interposed gap-junction

- channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 40: 17194-17199
- Wang X., Bukoreshtliev N. V., Gerdes H. H. 2012. Developing neurons form transient nanotubes facilitating electrical coupling and calcium signaling with distant astrocytes. *Public library of science one*, 7, 10: e47429, doi: 10.1371/journal.pone.0047429: 9 str.
- Wang X., Gerdes H. H. 2012. Long-distance electrical coupling via tunneling nanotubes. *Biochimica et biophysica acta*, 1818, 8: 2082-2086
- Wang X., Gerdes H. H. 2015. Transfer of mitochondria via tunneling nanotubes rescues apoptotic PC12 cells. *Cell death and differentiation*, 22, 7: 1181-1191
- Wang Y., Cui J., Sun X., Zhang Y. 2011. Tunneling-nanotube development in astrocytes depends on p53 activation. *Cell death and differentiation*, 18, 4: 732-742
- Watkins S. C., Salter R. D. 2005. Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubules. *Immunity*, 23, 3: 309-318
- Williams G. S., Collinson L. M., Brzostek J., Eissmann P., Almeida C. R., McCann F. E., Burshtyn D., Davis D. M. 2007. Membranous structures transfer cell surface proteins across NK cell immune synapses. *Traffic*, 8, 9: 1190-1204
- Wittig D., Wang X., Walter C., Gerdes H. H., Funk R. H., Roehlecke C. 2012. Multi-level communication of human retinal pigment epithelial cells via tunneling nanotubes. *Public library of science one*, 7, 3: e33195, doi: 10.1371/journal.pone.0033195: 12 str.
- Yilmaz M., Christofori G. 2009. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer metastasis reviews*, 28, 1-2: 15-33
- Yun S. J., Kim W. J. 2013. Role of the epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer: from prognosis to therapeutic target. *Korean journal of urology*, 54, 10: 645-650
- Zani B. G., Indolfi L., Edelman E. R. 2010. Tubular bridges for bronchial epithelial cell migration and communication. *Public library of science one*, 5, 1: e8930, doi: 10.1371/journal.pone.0008930: 12. str.
- Zhang J., Zhang Y. 2013. Membrane nanotubes: novel communication between distant cells. *Science china life sciences*, 56, 11: 994-999
- Zhu D., Tan K. S., Zhang X., Sun A. Y., Sun G. Y., Lee J. C. 2005. Hydrogen peroxide alters membrane and cytoskeleton properties and increases intercellular connections in astrocytes. *Journal of cell science*, 118, Pt 16: 3695-3703
- Zukauskas A., Merley A., Li D., Ang L. H., Sciuto T. E., Salman S., Dvorak A. M., Dvorak H. F., Jaminet S. C. 2011. TM4SF1: a tetraspanin-like protein necessary for nanopodia formation and endothelial cell migration. *Angiogenesis*, 14, 3: 345-354

## PRILOGE

### PRILOGA A

#### Povprečno število celic s posamezno vrednostjo indeksa celične oblike (CSI)

Opisne statistike: N: velikost vzorca.

Celice s TnT					
NPU			T24		
CSI	Povprečno število celic	N	CSI	Povprečno število celic	N
0,1	0,0	0	0,1	0,0	0
0,2	0,0	0	0,2	0,0	0
0,3	0,0	0	0,3	0,0	0
0,4	1,8	7	0,4	0,0	0
0,5	2,8	11	0,5	0,0	0
0,6	2,5	10	0,6	1,4	7
0,7	4,5	18	0,7	3,4	17
0,8	3,8	15	0,8	8,0	40
0,9	0,8	3	0,9	3,2	16
1	0,0	0	1	0,0	0

Celice brez TnT					
NPU			T24		
CSI	Povprečno število celic	N	CSI	Povprečno število celic	N
0,1	0,0	0	0,1	0,0	0
0,2	0,0	0	0,2	0,0	0
0,3	0,0	0	0,3	0,0	0
0,4	1,5	6	0,4	0,0	0
0,5	2,5	10	0,5	0,0	0
0,6	4,0	16	0,6	0,8	4
0,7	3,0	12	0,7	4,0	20
0,8	3,5	14	0,8	7,0	35
0,9	1,5	6	0,9	4,2	21
1	0,0	0	1	0,0	0



## PRILOGA B

### a) Število TnT celic T24 in celic NPU, s štirimi nasaditvenimi gostotami (c/cm<sup>2</sup>), prvi in drugi dan po nasaditvi

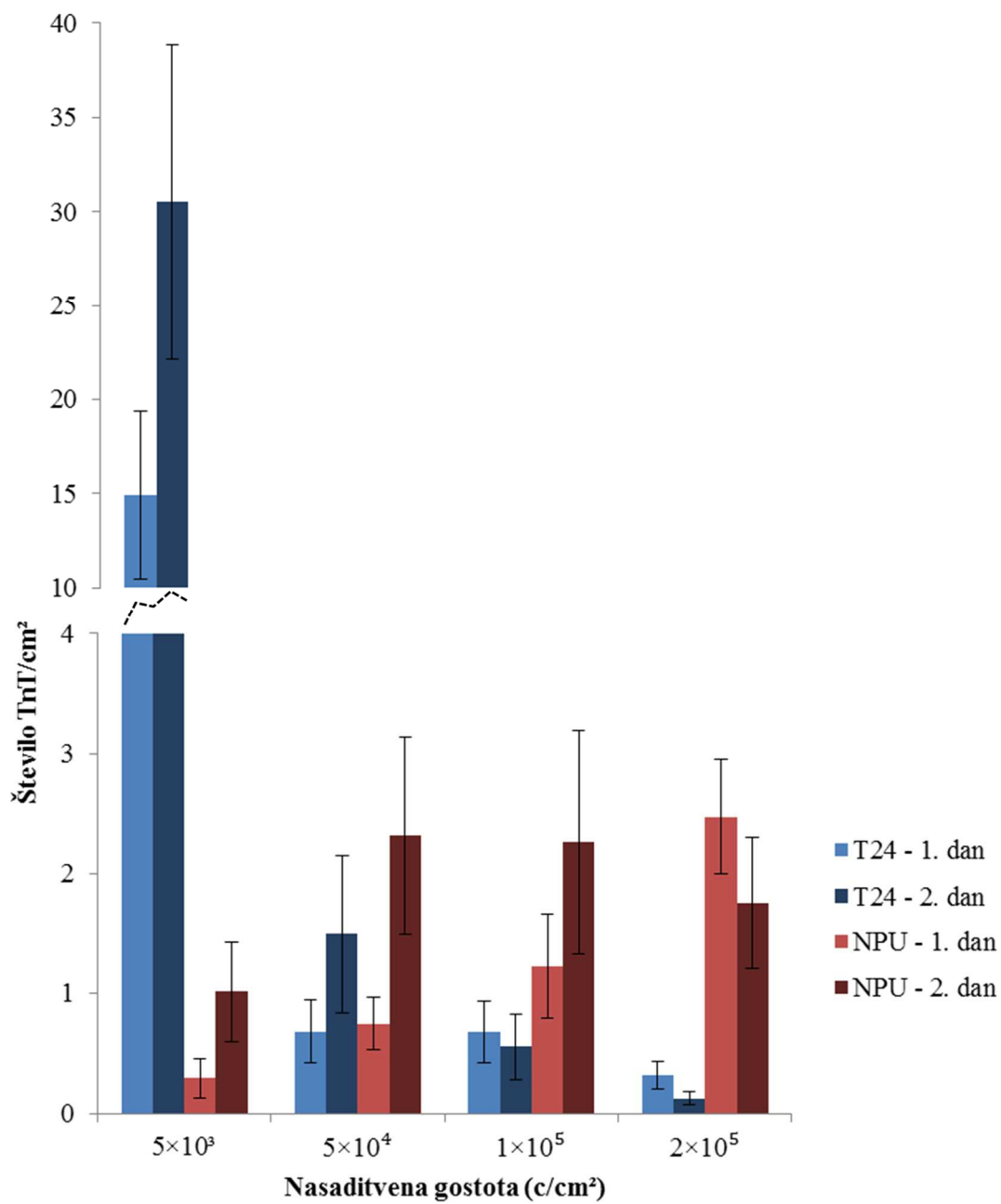
Opisne statistike: M: povprečje, N: velikost vzorca, SD: standardni odklon, SE: standardna napaka.

c/cm <sup>2</sup>	T24							
	1. dan				2. dan			
	5×10 <sup>3</sup>	5×10 <sup>4</sup>	1×10 <sup>5</sup>	2×10 <sup>5</sup>	5×10 <sup>3</sup>	5×10 <sup>4</sup>	1×10 <sup>5</sup>	2×10 <sup>5</sup>
	86	4	6	4	234	5	1	0
	201	5	3	4	506	19	5	0
	171	2	7	6	397	7	4	2
	238	16	15	0	253	3	1	2
M	140,4	6,4	6,4	3	278,6	7,6	3	3,8
N	5	5	5	5	5	5	5	5
SD	93,751	5,505	5,367	2,449	189,953	6,542	1,871	6,340
SE	41,927	2,462	2,400	1,095	84,950	2,926	0,837	2,835
Št. TnT/cm <sup>2</sup>	14,936	0,681	0,681	0,319	29,638	0,809	0,319	0,404
SE/cm <sup>2</sup>	4,460	0,262	0,255	0,117	9,037	0,311	0,089	0,302

c/cm <sup>2</sup>	NPU							
	1. dan				2. dan			
	5×10 <sup>3</sup>	5×10 <sup>4</sup>	1×10 <sup>5</sup>	2×10 <sup>5</sup>	5×10 <sup>3</sup>	5×10 <sup>4</sup>	1×10 <sup>5</sup>	2×10 <sup>5</sup>
	7	6	10	16	14	7	13	12
	3	4	4	15	18	11	8	16
	1	13	23	32	2	29	17	7
	0	5	9	30	4	40	47	31
M	2,75	7	11,5	23,25	9,5	21,75	21,25	16,5
N	4	4	4	4	4	4	4	4
SD	3,096	4,082	8,103	8,995	7,724	15,478	17,557	10,344
SE	1,548	2,041	4,052	4,498	3,862	7,739	8,779	5,172
Št. TnT/cm <sup>2</sup>	0,293	0,745	1,223	2,473	1,011	2,314	2,261	1,755
SE/cm <sup>2</sup>	0,165	0,217	0,431	0,478	0,411	0,823	0,934	0,550

## PRILOGA B

b) Graf povprečnega števila TnT celic T24 in celic NPU, s štirimi nasaditvenimi gostotami ( $c/cm^2$ ), prvi in drugi dan po nasaditvi



## PRILOGA C

### Število TnT celic T24 in celic NPU, s štirimi nasaditvenimi gostotami (c/cm<sup>2</sup>), z združenim prvim in drugim dnevom po nasaditvi

Opisne statistike: M: povprečje, N: velikost vzorca, SD: standardni odklon, SE: standardna napaka

c/cm <sup>2</sup>	T24				NPU			
	5×10 <sup>3</sup>	5×10 <sup>4</sup>	1×10 <sup>5</sup>	2×10 <sup>5</sup>	5×10 <sup>3</sup>	5×10 <sup>4</sup>	1×10 <sup>5</sup>	2×10 <sup>5</sup>
	86	4	6	4	7	6	10	16
	201	5	3	4	3	4	4	15
	171	2	7	6	1	13	23	32
	238	16	15	0	0	5	9	30
	234	5	1	0	14	7	13	12
	506	19	5	0	18	11	8	16
	397	7	4	2	2	29	17	7
	253	3	1	2	4	40	47	31
M	260,75	7,63	5,25	2,25	6,13	14,38	16,38	19,88
N	8	8	8	8	8	8	8	8
SD	132,11	6,32	4,50	2,25	6,53	13,11	13,69	9,67
SE	46,71	2,24	1,59	0,80	2,31	4,64	4,84	3,42
Št. TnT/cm <sup>2</sup>	27,74	0,81	0,56	0,24	0,65	1,53	1,74	2,11
SE/cm <sup>2</sup>	4,97	0,24	0,17	0,08	0,25	0,49	0,51	0,36

## PRILOGA D

### Povprečna konfluentnost (%) celic T24 in NPU, s štirimi nasaditvenimi gostotami ( $c/cm^2$ ), prvi in drugi dan po nasaditvi

Opisne statistike: M (%): povprečje podano v %, N: velikost vzorca, SD: standardni odklon, SE: standardna napaka.

$c/cm^2$	T24							
	1. dan				2. dan			
	$5 \times 10^3$	$5 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$5 \times 10^3$	$5 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$2 \times 10^5$
M (%)	9	89	99	100	20	100	100	100
N	41	41	41	36	41	40	40	34
SD	5,86	11,05	1,37	0,00	10,51	1,19	0,00	0,00
SE	0,92	1,73	0,21	0,00	1,64	0,19	0,00	0,00

$c/cm^2$	NPU							
	1. dan				2. dan			
	$5 \times 10^3$	$5 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$5 \times 10^3$	$5 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$2 \times 10^5$
M (%)	4	27	46	69	11	53	68	86
N	45	54	53	50	54	54	54	52
SD	9,98	21,13	34,87	36,50	18,87	45,91	57,64	58,02
SE	1,49	2,88	4,79	5,16	2,57	6,25	7,84	8,05

## PRILOGA E

### Povprečno število celic T24 in NPU na petrijevki (9,4 cm<sup>2</sup>), s štirimi nasaditvenimi gostotami (c/cm<sup>2</sup>), prvi in drugi dan po nasaditvi

Opisne statistike: M: povprečje, N: velikost vzorca, SD: standardni odklon, SE: standardna napaka.

c/cm <sup>2</sup>	T24							
	1. dan				2. dan			
	5×10 <sup>3</sup>	5×10 <sup>4</sup>	1×10 <sup>5</sup>	2×10 <sup>5</sup>	5×10 <sup>3</sup>	5×10 <sup>4</sup>	1×10 <sup>5</sup>	2×10 <sup>5</sup>
M	56200	609200	1333200	2129967	115775	1086843	1465000	2049750
N	3	3	3	3	3	3	3	3
SD	3058	109997	19312	158690	8637	69237	347930	255976
SE	1765	63507	11150	91620	4986	39974	200877	147788

c/cm <sup>2</sup>	NPU							
	1. dan				2. dan			
	5×10 <sup>3</sup>	5×10 <sup>4</sup>	1×10 <sup>5</sup>	2×10 <sup>5</sup>	5×10 <sup>3</sup>	5×10 <sup>4</sup>	1×10 <sup>5</sup>	2×10 <sup>5</sup>
M	11450	371300	773000	1585400	16150	405600	810600	1468000
N	3	3	3	3	3	3	3	3
SD	2166	230699	351821	773621	7824	65313	84079	183475
SE	1251	133194	203124	446650	4517	37708	48543	105929

## PRILOGA F

### a) Povprečna dolžina ( $\mu\text{m}$ ) TnT celic T24 in NPU, s štirimi nasaditvenimi gostotami ( $\text{c}/\text{cm}^2$ ), prvi in drugi dan po nasaditvi

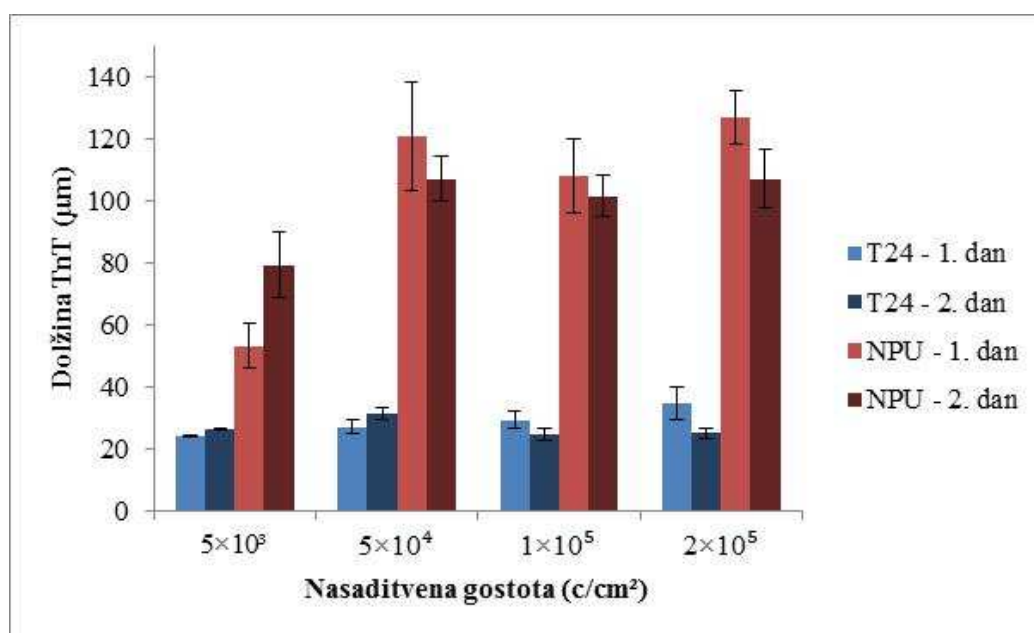
Opisne statistike: M ( $\mu\text{m}$ ): povprečje podano v  $\mu\text{m}$ , N: velikost vzorca, SD: standardni odklon, SE: standardna napaka

$\text{c}/\text{cm}^2$	T24							
	1. dan				2. dan			
	$5 \times 10^3$	$5 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$5 \times 10^3$	$5 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$2 \times 10^5$
M ( $\mu\text{m}$ )	24	27	29	35	26	31	25	25
N	702	37	32	15	1434	70	26	6
SD	10	13	15	20	11	15	11	4
SE	0	2	3	5	0	2	2	2

$\text{c}/\text{cm}^2$	NPU							
	1. dan				2. dan			
	$5 \times 10^3$	$5 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$5 \times 10^3$	$5 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$2 \times 10^5$
M ( $\mu\text{m}$ )	53	121	108	127	79	107	102	107
N	11	28	46	93	37	87	85	66
SD	24	93	80	83	64	67	59	76
SE	7	18	12	9	10	7	6	9

## PRILOGA F

b) Graf povprečnih dolžin ( $\mu\text{m}$ ) TnT celic T24 in celic NPU, s štirimi nasaditvenimi gostotami ( $\text{c}/\text{cm}^2$ ), prvi in drugi dan po nasaditvi



## PRILOGA G

**Povprečna dolžina ( $\mu\text{m}$ ) TnT celic T24 in celic NPU, s štirimi nasaditvenimi gostotami ( $\text{c}/\text{cm}^2$ ), z združenim prvim in drugim dnevom po nasaditvi**

Opisne statistike: M ( $\mu\text{m}$ ): povprečje podano v  $\mu\text{m}$ , N: velikost vzorca, SD: standardni odklon, SE: standardna napaka

$\text{c}/\text{cm}^2$	T24				NPU			
	$5 \times 10^3$	$5 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$5 \times 10^3$	$5 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$2 \times 10^5$
M ( $\mu\text{m}$ )	26	30	27	32	73	110	104	119
N	2136	107	58	21	48	115	131	159
SD	10,92	14,82	13,08	17,10	57,77	73,75	67,23	80,72
SE	0,24	1,43	1,72	3,73	8,34	6,88	5,87	6,40



## PRILOGA H

a) Število TnT iz celic T24 na celice NPU in iz celic NPU na celice T24, v kokulturi, s štirimi kombinacijami nasaditvenih gostot ( $c/cm^2$ ), prvi in drugi dan po nasaditvi

Opisne statistike: M: povprečje, N: velikost vzorca, SD: standardni odklon, SE: standardna napaka.

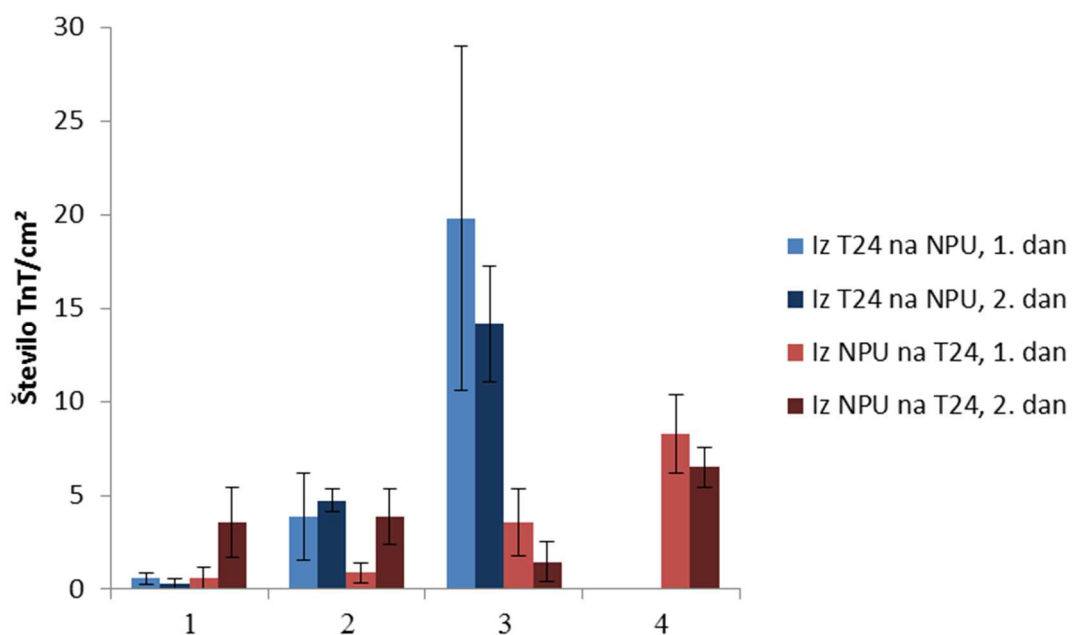
	T24: $5 \times 10^3 c/cm^2$ , NPU: $5 \times 10^3 c/cm^2$				T24: $5 \times 10^3 c/cm^2$ , NPU: $5 \times 10^4 c/cm^2$			
	1. dan		2. dan		1. dan		2. dan	
	Iz T24 na NPU	Iz NPU na T24	Iz T24 na NPU	Iz NPU na T24	Iz T24 na NPU	Iz NPU na T24	Iz T24 na NPU	Iz NPU na T24
	0,88	0	0,88	6,19	7,96	0,88	5,31	5,31
	0,88	1,77	0	4,42	3,54	1,77	3,54	5,31
	0	0	0	0	0	0	5,31	0,88
M	0,59	0,59	0,29	3,54	3,83	0,88	4,72	3,83
N	3	3	3	3	3	3	3	3
SD	0,51	1,02	0,51	3,19	3,99	0,88	1,02	2,55
SE	0,29	0,59	0,29	1,84	2,30	0,51	0,59	1,47
	T24: $5 \times 10^3 c/cm^2$ , NPU: $2 \times 10^5 c/cm^2$				T24: $2 \times 10^5 c/cm^2$ , NPU: $5 \times 10^3 c/cm^2$			
	1. dan		2. dan		1. dan		2. dan	
	Iz T24 na NPU	Iz NPU na T24	Iz T24 na NPU	Iz NPU na T24	Iz T24 na NPU	Iz NPU na T24	Iz T24 na NPU	Iz NPU na T24
	38,05	5,31	17,70	3,54	0	8,85	0	7,96
	12,39	5,31	16,81	0,88	0	11,50	0	7,08
	8,85	0	7,96	0	0	4,42	0	4,42
M	19,76	3,54	14,16	1,47	0	8,26	0	6,49
N	3	3	3	3	3	3	3	3
SD	15,94	3,07	5,38	1,84	0	3,58	0	1,84
SE	9,20	1,77	3,11	1,06	0	2,06	0	1,06

## PRILOGA H

b) Graf povprečnega števila TnT iz celic T24 na celice NPU in iz celic NPU na celice T24, v kokulturi s štirimi kombinacijami nasaditvenih gostot ( $c/cm^2$ ), prvi in drugi dan po nasaditvi

Legenda nasaditvenih gostot ( $c/cm^2$ ):

- 1: T24:  $5 \times 10^3$ , NPU:  $5 \times 10^3$
- 2: T24:  $5 \times 10^3$ , NPU:  $5 \times 10^4$
- 3: T24:  $5 \times 10^3$ , NPU:  $2 \times 10^5$
- 4: T24:  $2 \times 10^5$ , NPU:  $5 \times 10^3$



## PRILOGA I

### Povprečna dolžina ( $\mu\text{m}$ ) TnT celic T24 in celic NPU, glede na citoskeletno sestavo

Celice smo dvojno imunooznačili s pari sestavnih delov citoskeletnih elementov: F-aktin + CK7, F-aktin +  $\alpha$ -tubulin,  $\alpha$ -tubulin + CK7. Opisne statistike: M ( $\mu\text{m}$ ): povprečje, podano v  $\mu\text{m}$ , N: velikost vzorca, SD: standardni odklon, SE: standardna napaka.

	T24								
	F-aktin + CK7	F-aktin	CK7	F-aktin + $\alpha$ -tubulin	F-aktin	$\alpha$ -tubulin	$\alpha$ -tubulin + CK7	$\alpha$ -tubulin	CK7
M ( $\mu\text{m}$ )	57,50	14,38	64,44	45,83	15,00	65,00	50,00	/	16,25
N	6	8	9	6	7	4	14	0	4
SD	26,03	3,20	14,88	16,86	4,08	12,91	28,28	/	6,29
SE	10,63	1,13	4,96	6,88	1,54	6,45	7,56	/	3,15

	NPU								
	F-aktin + CK7	F-aktin	CK7	F-aktin + $\alpha$ -tubulin	F-aktin	$\alpha$ -tubulin	$\alpha$ -tubulin + CK7	$\alpha$ -tubulin	CK7
M ( $\mu\text{m}$ )	48,33	32,50	21,67	76,15	73,57	/	64,05	/	69,00
N	6	2	3	13	7	0	21	0	10
SD	31,57	17,68	2,89	49,42	62,76	/	36,04	/	36,42
SE	12,89	12,50	1,67	13,71	23,72	/	7,87	/	11,52

## PRILOGA J

### Število TnT celic T24 in celic NPU s posameznimi sestavnimi deli citoskeletnih elementov pri trojnem označevanju F-aktina, $\alpha$ -tubulina in CK7

Opisne statistike: N: velikost vzorca.

		T24						
	F-aktin	F-aktin + $\alpha$ -tubulin	F-aktin + CK7	$\alpha$ -tubulin	CK7	$\alpha$ -tubulin + CK7	F-aktin + $\alpha$ -tubulin + CK7	
N	2	2					3	

		NPU						
	F-aktin	F-aktin + $\alpha$ -tubulin	F-aktin + CK7	$\alpha$ -tubulin	CK7	$\alpha$ -tubulin + CK7	F-aktin + $\alpha$ -tubulin + CK7	
N			2		4		3	