

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Maja ČETOJEVIČ

**TRANSPORT MEMBRANSKIH PROTEINOV
UROPLAKINOV V RAKAVIH IN NORMALNIH
UROTELIJSKIH CELICAH**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Maja ČETOJEVIČ

**TRANSPORT MEMBRANSKIH PROTEINOV UROPLAKINOV V
RAKAVIH IN NORMALNIH UROTELIJSKIH CELICAH**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**TRANSPORT OF UROPLAKINS IN
CANCER 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 6. 2. 2013 odobrila naslov magistrskega dela ter za mentorico imenovala prof. dr. Matejo Erdani Kreft in za recenzeta prof. dr. Roka Kostanjška.

Komisija za oceno in zagovor

Predsednica: doc. dr. Nada ŽNIDARŠIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Rok KOSTANJŠEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Mateja ERDANI KREFT
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice

Datum zagovora:

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.

Maja Četojevič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
- DK UDK 61:547.96(043.2)=163.6
- KD uroplakini/transport proteinov/urotelijske celice/celice T24
- AV ČETOJEVIČ, Maja, dipl. biol. (UNI)
- SA ERDANI KREFT, Mateja (mentorica)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij Strukturne in funkcionalne biologije
- LI 2015
- IN TRANSPORT MEMBRANSKIH PROTEINOV UROPLAKINOV V RAKAVIH IN NORMALNIH UROTELJISKIH CELICAH
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
- OP X, 65 str., 6 pregl., 16 sl., 9 pril., 81 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Namen našega dela je bil transficirati celice T24, ki izvirajo iz visoko malignega prehodnoceličnega karcinoma urotelija, s konstruktoma DNA za uroplakina UPIb in UPIIIa. Želeli smo ugotoviti, ali je transport UPIb in UPIIIa v rakavih urotelijskih celicah T24 enak kot v normalnih prašičjih urotelijskih celicah NPU. Poleg tega nas je zanimalo tudi, če kratkotrajno izražanje UP v celicah T24 zmanjša njihovo rakavo transformacijo (glede na morfologijo celice in izražanje E-kadherina). Z vnosom genov za UPIb-EGFP in UPIIIa-EGFP ali kombinacije obeh v celice T24 smo pokazali, da uroplakina posamič ne dosežeta plazmaleme, njun heterodimer (UPIb/UIIIa-EGFP) pa smo dokazali tudi v plazmalemi celic T24. Med transportom UP v apikalno plazmalemo celic NPU prehaja GA iz osnovne oblike (cisterne kondenzirane ob jedru) v fragmentirano (večje število manjših cistern, razporejenih po celotni citoplazmi celice) in te spremembe smo želeli dokazati tudi v celicah T24. Ugotovili smo, da so imele celice T24, ki so izražale heterodimer v plazmalemi, večinoma GA v osnovni obliki. Poleg tega smo v celicah T24, ki so izražale heterodimer v plazmalemi, dokazali tudi fragmentirani GA, le njegova površina je bila bistveno manjša kot v transficiranih celicah NPU. Morfoloških sprememb in sprememb v plazmalemi ali adherentnih stikih v celicah T24 nismo opazili, kljub izražanju UP. Predpostavljamo, da je izražanje UP v našem primeru časovno prekratko. Vzpostavitev celične linije T24, trajno transficirane z UP, bi pripomogla k razumevanju sprememb v transportu UP ter omogočila raziskave vpliva izražanja UP na morebitno mezenhimsko-epitelijsko transformacijo rakavih celic T24.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Du2
- DC UDC 61:547.96(043.2)=163.6
- CX uroplakins/protein transport/urothelial cells/T24 cells
- AU ČETOJEVIČ, Maja, dipl. biol. (UNI)
- AA ERDANI KREFT, Mateja (mentor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study Programme in Structural and Functional Biology
- PY 2015
- TI TRANSPORT OF UROPLAKINS IN CANCER AND NORMAL UROTHELIAL CELLS
- DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
- NO X, 65 p., 6 tab., 16 fig., 9 ann., 81 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The aim of our study was to transfect human high-grade urothelial cancer cells (T24) with DNA constructs for uroplakin (UP) proteins UPIb and UPIIIa. We wanted to learn if uroplakin transport is the same in cancer T24 cells and normal porcine urothelial cells (NPU), and if short-term UP expression in T24 cells alters their neoplastic transformation (depending on cell morphology and E-cadherin expression). We transfected T24 cells with DNA constructs of uroplakin genes UPIb-EGFP and UPIIIa-EGFP, and showed that none of the proteins reached plasma membrane separately. If transfected together, however, the dimerized protein UPIb/UIIIa-EGFP reached the plasma membrane. Although the fragmentation of GA coincides with uroplakin delivery to the plasma membrane of NPU cells, only a few UPIb/UIIIa-EGFP expressing T24 cells had a fragmented GA, and its area was smaller than in transfected NPU cells. A majority of T24 cells expressing UPIb/UIIIa-EGFP had a ribbon-like GA. Furthermore, when compared with untransfected T24 cells, we did not detect any morphological changes or changes in E-cadherin expression in transfected T24 cells expressing UPs. We hypothesize that, in our case, the period of UP expression was too short. We believe the establishment of a T24 cell line, permanently transfected with UPs, would greatly contribute to the understanding of changes in UP transport and benefit the research of UP expression impact on potential mesenchime-epithelial transformation in T24 cells.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1. UVOD	1
1.1. CILJI NALOGE	2
1.2. DELOVNE HIPOTEZE	2
2. PREGLED OBJAV	3
2.1. UROTELIJ SESALCEV	3
2.1.1. Zgradba urotelija	3
2.1.2. Diferenciacija urotelija	4
2.2. UROPLAKINI	5
2.2.1. Lastnosti uroplakinov	5
2.2.2. Sinteza in transport uroplakinov	5
2.3. GOLGIJEV APARAT	7
2.4. MEDCELIČNI STIKI	9
2.4.1. Tesni stiki	9
2.4.2. Adherentni stiki	10
2.4.3. Spremembe medceličnih stikov	11
2.5. RAK SEČNEGA MEHURJA IN SPREMEMBE UROTELIJA MED KARCINOGENEZO	12
2.6. CELIČNE KULTURE UROTELIJSKIH CELIC	14
2.6.1. Primarna kultura urotelijskih celic	14
2.6.2. Sekundarna kultura urotelijskih celic	15
2.6.3. Trajna kultura rakavih urotelijskih celic T24	15
3. MATERIAL IN METODE DE LA	16
3.1. CELICE IN VITRO IN HRANILNI MEDIJI	16
3.1.1. Celice	16
3.1.2. Hranilni medij za prašičje urotelijske celice	16

3.1.3. Hranilni medij za celice T24	18
3.2. IMUNOFLUORESCENČNO OZNAČEVANJE	19
3.3. PRENOS PROTEINOV NA MEMBRANO (PRENOS WESTERN) IN IMUNOOZNAČEVANJE	20
3.3.1. Priprava celičnih lizatov za prenos proteinov in imunooznačevanje	20
3.3.2. Merjenje koncentracije proteinov	20
3.3.3. Elektroforeza	21
3.3.4. Prenos western	21
3.3.5. Imunooznačevanje uroplakinov Ia, Ib, II in IIIa ter E-kadherina in N-kadherina	22
3.4. TRANSFEKCIJA CELIC	24
3.5. ANALIZA USPEŠNOSTI TRANSFEKCIJE	25
3.6. ANALIZA LOKACIJE UP V TRANSFICIRANIH CELICAH	25
3.7. ANALIZA OBLIKE GA V TRANSFICIRANIH CELICAH	27
3.8. ANALIZA VELIKOSTI CELIC NPU IN T24	28
4. REZULTATI	29
4.1. IMUNOFLUORESCENCA UPIb IN UPIIIa, GIANTINA, E-KADHERINA IN N-KADHERINA V CELICAH NPU IN T24	29
4.2. CELICE T24 AVTOFLUORESCIRAJO	32
4.3. ANALIZA PROTEINOV UPIa, UPIb, UPII, UPIIIa, E-KADHERINA IN N-KADHERINA (PRENOS WESTERN)	33
4.4. TRANSFEKCIJA CELIC	34
4.4.1. Učinkovitost različnih transfekcijskih reagentov	34
4.4.2. Transportna pot uroplakinov v celicah NPU in T24	36
4.4.3. Izražanje uroplakinov v celicah NPU je povezano s fragmentacijo GA	39
4.4.4. Izražanje UP je povezano s spremembo oblike GA v rakavih urotelijskih celicah T24	42
4.4.5. Transfekcija celic T24 z UP ne vpliva na morfologijo celic T24	47
4.4.6. Z uroplakini transficirane celice T24 bistveno ne spremenijo izražanja E- in N-kadherina	48
5. RAZPRAVA	49

5.1.	TRANSPORTNA POT UROPLAKINOV V CELICAH T24 JE PODOBNA TRANSPORTNI POTI UROPLAKINOV V CELICAH NPU	49
5.2.	IZRAŽANJE UP V CELICAH T24 VPLIVA NA OBLIKO GA, VENDAR NE POVZROČI FRAGMENTACIJE, KI BI BILA PRIMERLJIVA S CELICAMI NPU	50
5.3.	CELICE T24 PO TRANSFEKCIJI NE IZRAŽAJO E-KADHERINA IN OHRANIJO NESPREMENJENO MORFOLOGIJO	51
5.4.	ODSOTNOST IZRAŽANJA UROPLAKINOV IN E-KADHERINA V CELICAH T24 JE MORDA POSLEDICA SPREMENB V IZRAŽANJU DEJAVNIKOV TWIST IN FOXA1	53
5.5.	AVTOFLUORESCENCA CELIC T24	55
6.	SKLEPI	56
7.	POVZETEK	57
8.	VIRI	59

KAZALO SLIK

Sl. 1:	Golgijev aparat v različno diferenciranih celicah <i>in vitro</i> .	8
Sl. 2:	Štetje transficiranih celic in ugotavljanje lokacije UP s programom ImageJ.	26
Sl. 3:	Analiza oblike GA v transficiranih celicah T24 s programom ImageJ (1.47v, »Treshold colour«).	28
Sl. 4:	Imunooznačevanje UPIb, UPIIIa, giantina, N-kadherina in E-kadherina v celicah NPU.	30
Sl. 5:	Imunooznačevanje UPIb, UPIIIa, giantina, E- in N-kadherina v celicah T24.	31
Sl. 6:	Autofluorescenca celic T24 .	32
Sl. 7:	Analiza uroplakinov in proteinov adherentnih celičnih stikov s prenosom western v celicah T24.	33
Sl. 8:	Uspešnost transfekcije celic T24 in celic NPU s transfekcijskima reagentoma NanoJuice® in Lipofectamine® 3000.	35
Sl. 9:	Lokacija UP v transficiranih celicah NPU in T24.	36
Sl. 10:	Lokacija UP v transficiranih celicah NPU in T24 pri transfekciji s transfekcijskim reagentom a) NanoJuice® in b) Lipofectamine® 3000.	38
Sl. 11:	Transportna pot UPIb/UPIIIa-EGFP v celicah NPU.	39
Sl. 12:	Velikost in oblika GA v celicah NPU.	41
Sl. 13:	Transportna pot UP in oblika GA v transficiranih celicah T24.	43
Sl. 14:	Velikost in oblika GA v celicah T24.	45
Sl. 15:	Celici T24, ki izražata heterodimer UPIb/UPIIIa-EGFP v plazmalemi.	47
Sl. 16:	Imunooznačevanje E- in N-kadherina v celicah T24, transficiranih z UPIb/UPIIIa-EGFP.	48

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Sestava hranilnega medija UroM (-Ca ²⁺ +S _{FBS})	17
Pregl. 2: Sestava hranilnega medija UroM (+Ca ²⁺ -SFBS)	17
Pregl. 3: Sestava hranilnega medija za celice T24	18
Pregl. 4: Primarna protitelesa, ki smo jih uporabili za imunofluorescenčno dokazovanje proteinov.	19
Pregl. 5: Sestava gelov za elektroforezo.	21
Pregl. 6: Primarna protitelesa, ki smo jih uporabili za imunooznačevanje po prenosu western.	22

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A-DMEM	kemijsko definiran hranilni medij (<i>angl. Advance – Dulbecco's modification of Eagle's medium</i>)
CK	citokeratin
DAPI	fluorescenčno barvilo (<i>angl. 4,6-diamine-2-phenylindole dihydrochloride</i>)
DFV	diskoidni fuziformni vezikli
EGFP	ojačan zeleni fluorescirajoči protein (<i>angl. Enhanced Green Fluorescent Protein</i>)
EMT	epitelijsko-mezenhimski prehod (<i>angl.: epithelial-mesenchymal transition</i>)
ER	endoplazemski retikulum
F12	kemijsko definirana hranilna mešanica
FBS	goveji fetalni serum (<i>angl. Fetal Bovine Serum</i>)
FRAP	tehnika obnove fluorescence po bledenju (<i>angl.: fluorescence recovery after photobleaching</i>)
FRIL	tehnika lomljenja membrane z zmrzovanjem in imunooznačevanjem (<i>angl.: freeze-fracture replica immunolabelling</i>)
GA	Golgijev aparat
iFV	nezreli fuziformni vezikel (<i>angl. immature fusiform vesicle</i>)
LF	Lipofectamine® 3000
MDCB 153	kemijsko definiran hranilni medij
mFV	zreli fuziformni vezikel (<i>angl. mature fusiform vesicle</i>)
N	velikost vzorca
NJ	Nanojuice®
NPU	normalne prašičje urotelijske celice
PBS	fosfatni pufer (<i>angl. Phosphate Buffered Saline</i>)
UP	uroplakini
UPTV	UP-pozitivni transportni vezikli
T24	celična linija vzpostavljena iz visoko malignega prehodnoceličnega karcinoma urotelija

1. UVOD

V Sloveniji je v obdobju med letoma 2006 in 2010 za rakom zbolelo 12 166 ljudi, od tega je bilo primerov raka sečnega mehurja 275 (Zadnik in Primic Žakelj, 2014). Vedno več raziskav se zato usmerja v hitro in učinkovito odkrivanje predrakavih sprememb in v odkrivanje čim bolj učinkovitih metod zdravljenja.

Namen našega dela je bil transficirati celice T24, ki izvirajo iz visoko malignega prehodnoceličnega karcinoma urotelija, s konstruktoma DNA za proteina UPIb in UPIIIa. Celice T24 smo izbrali zato, ker ne izražajo uroplakinov (UP). Varga in sod. (2004) in Cowled in sod. (2005) navajajo, da so DNA-odseki z zapisom za UP pri teh celicah hipermetilirani in se zato ne prepisujejo. Celice T24 so torej ustrezen sistem, v katerem lahko opazujemo posledice izražanja UP. V normalnih urotelijskih celicah (NPU) sta UPIb in UPIIIa endogeno izražena in tvorita urotelijske plake v apikalni plazmalemi skupaj z drugimi UP (Višnjar in Kreft, 2013). Uroplakin Ib lahko endoplazemski retikulum (ER) zapusti samostojno, UPIIIa pa se mora za izstop iz ER povezati z UPIb v heterodimer.

V magistrski nalogi smo želeli ugotoviti, ali je transportna pot UPIb in UPIIIa v rakavih urotelijskih celicah T24 enaka kot v celicah NPU. Z vnosom genov za UPIb-EGFP in UPIIIa-EGFP ali kombinacije obeh v celice T24 smo proučili, ali transficirane celice T24 lahko izrazijo UP heterodimer v plazmalemi in kaj se zgodi, če se izrazi samo en od obeh UP. Poleg tega nas je zanimalo tudi, če kratkotrajno izražanje UP v celicah T24 zmanjša njihovo rakavo transformacijo (glede na morfologijo celice in izražanje E-kadherina).

1.1. CILJI NALOGE

Cilj naloge je bil vnos konstruktov DNA z zapisom za fuzijska uroplakina UPIb-GFP in UPIIIa-GFP v rakave urotelijske celice, ki endogeno ne izražajo uroplakinov, in ugotoviti:

- 1) ali se znotrajcelični transport membranskih proteinov uroplakinov v rakavih urotelijskih celicah razlikuje od tistega v normalnih urotelijskih celicah;
- 2) ali izražanje uroplakinov v rakavih celicah lahko zavre rakavo transformacijo celic.

1.2. DELOVNE HIPOTEZE

H1: Transportna pot uroplakinov (UPIb, UPIIIa) v rakavih urotelijskih celicah je enaka kot v normalnih urotelijskih celicah.

H2: Izražanje uroplakinov se v rakavih urotelijskih celicah odraža v spremembah morfologije plazmaleme in oblikovanju adherentnih medceličnih stikov.

2. PREGLED OBJAV

2.1. UROTELIJ SESALCEV

Urotelij je epiteljsko tkivo, ki pokriva dele urinarnega trakta od ledvične kotanje, sečevodov in sečnega mehurja do proksimalne sečnice ter žleznih vodov prostate (Khandelwal in sod., 2009). V primerjavi z epitelijem kože ali prebavnega trakta, ki se redno in hitro obnavlja (2-30 dni), je pri uroteliju ta proces veliko počasnejši (tudi do 6 mesecev) (Hicks 1965, 1975; Wu in sod., 2009; Khandelwal in sod., 2009). Urotelij zagotavlja pregrado, ki preprečuje izmenjavo snovi med urinom in krvjo, in v predelu mehurja omogoča zadrževanje urina (Hicks, 1965; Khandelwal in sod., 2009; Kreft in sod., 2010a)

2.1.1. Zgradba urotelija

Urotelij sestavljajo trije skladi celic: bazalni, vmesni in površinski sklad (Hicks, 1975).

Bazalni sklad gradijo nediferencirane, enojedrne celice, kubične oblike, premera okoli 10 μm (Jost in sod., 1989). Na bazalno lamino se pritrdijo s hemidezmosomi (Hicks, 1975; Khandelwal in sod., 2009).

Vmesni sklad gradi ena do štiri plasti vmesnih celic, ki so med seboj povezane z dezmosomi. Velikost celic je 10-15 μm (Jost in sod., 1989). Celice v tem skladu so deloma diferencirane in že lahko izražajo specifične membranske proteine uroplakine (Wu in sod., 2009; Hudoklin in sod., 2009). Imajo tudi prisotne diskoidne vezikle, ki so predstopnja fuziformnih veziklov površinskih celic (Hudoklin in sod., 2011).

Površinski sklad urotelija gradijo eno-ali večjedrne, diferencirane in močno polarizirane celice, ki so med seboj povezane s tesnimi stiki. Oblika celic je v veliki meri odvisna od količine urina v mehurju. Njihov premer je med 25 in 250 μm (Jost in sod., 1989). Površinske diferencirane urotelijske celice imajo značilno oblikovano apikalno plazmalemo, ki jo gradijo urotelijski plaki (debeline 12 nm), med njimi pa so območja neodebeljene membrane (debeline 7 nm) (Hicks, 1975; Khandelwal in sod., 2009). Tik pod plazmalemo so fuziformni vezikli, ki omogočajo transport urotelijskih plakov do apikalne plazmaleme (Hudoklin in sod., 2011).

Celične delitve potekajo le v bazalnem skladu urotelija (Khandelwal in sod., 2009). Vmesne celice se lahko izjemoma delijo ob poškodbah (Kreft in sod., 2005a) in v primeru rakavega obolenja (Van Batavia in sod., 2014), medtem ko se diferencirane površinske celice tudi v tem primeru ne delijo (Kreft in sod., 2005a).

2.1.2. Diferenciacija urotelija

Kreft in sod. (2005a) ter Hudoklin in sod. (2009) so pokazali, da se izražanje uroplakinov močno spreminja med diferenciacijo površinskih urotelijskih celic po regeneraciji. Pod skladom površinskih celic ležijo manj diferencirane vmesne celice, ki so ob poškodbi urotelija izpostavljene lumnu sečnega mehurja. Sproži se regeneracija, ki zajema postopno povečano izražanje uroplakinov, citokeratina 20 (CK 20) ter postopno zorenje in povečanje Golgijevega aparata. Vse to pa vpliva na sestavljanje uroplakinov v urotelijske plake. Ob začetku regeneracije imajo celice na površini slabo izražene uroplakine, apikalna površina celic pa je oblikovana v mikrovile. Z napredovanjem regeneracije opazimo nadaljnje spremembe apikalne plazmaleme nove površinske celice. Te spremembe zajemajo (1) prehodno stanje, ko uroplakini v apikalni plazmalemi vplivajo na oblikovanje vrvičastih grebenov in (2) stanje končne diferenciacije, ko so uroplakini organizirani v urotelijske plake in so prisotni mikrogrebeni, značilni za apikalno površino diferencirane površinske urotelijske celice.

2.2. UROPLAKINI

2.2.1. Lastnosti uroplakinov

Uroplakini (UP) so transmembranski proteini, značilni predvsem za površinske celice urotelija. Poznamo štiri glavne: UPIa, UPIb, UPII in UPIIIa (Wu in sod., 1994). Pred kratkim pa so opisali še tri nove uroplakine, in sicer: UPIIb, UPIIIc in UPIIIId (Desalle in sod., 2014). Uroplakina Ia in Ib imata po štiri transmembranske domene in sodita v družino tetraspaninov, medtem ko imajo UPII, UPIIIa ter ostali le po eno transmembransko domeno. Uroplakini se po dva in dva združujejo v heterodimere (UPIa/UPII in UPIb/UPIIIa) in skupaj tvorijo uroplakinske partikle (Deng in sod., 2002; Wu in sod., 2009; Lee, 2011). Ti so heksagonalne oblike, z zunanjim in notranjim obročem uroplakinskih heterodimerov (Waltz in sod., 1995; Wu in sod., 2009). Več uroplakinskih partiklov se povezuje v urotelijski plak (Stevens in Warren, 1978; Kachar in sod., 1999; Kreft in Robenek, 2012).

Medtem ko so UPIa, II in IIIa izraženi le v urotelijskih celicah, lahko UPIb najdemo tudi v drugih tkivih (npr. v pljučnem tkivu in roženici) (Hu in sod., 2000; Kong in sod., 2004; Hu in sod., 2005).

2.2.2. Sinteza in transport uroplakinov

Sinteza UP se prične v endoplazemskem retikulumu (ER), kjer se že povezujejo v heterodimere. Študije, ki so jih opravili Hu in sod. (2000), Deng in sod. (2002), Kong in sod. (2004) ter Hu in sod. (2005) kažejo, da se morajo UP po sintezi v ER pravilno povezati v dimere, saj je drugače njihova nadaljnja pot onemogočena. Izbitje gena za UPII v mišjih urotelijskih celicah povzroči zastajanje UPIa v ER (Kong in sod., 2004), izbitje gena za UPIIIa pa vodi v nastanek majhnih in spremenjenih urotelijskih plakov (Hu in sod., 2000), kar očitno nakazuje na nujnost dimerizacije UP pred izstopom iz ER. Tu je izjema UPIb, ki lahko samostojno prehaja iz ER (Hu in sod., 2000; Tu in sod., 2002).

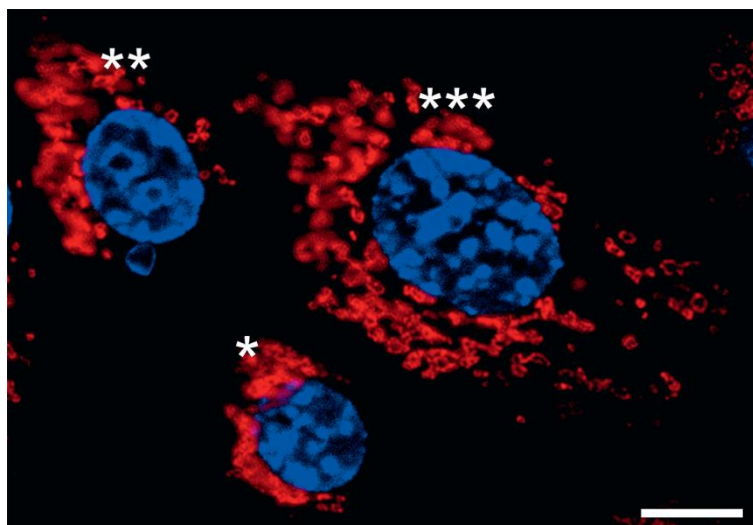
Po izstopu iz ER se transport uroplakinskih dimerov nadaljuje v cisterne Golgijevega aparata (GA), kjer se dalje povezujejo in tvorijo 16 nm uroplakinske partikle. Sledi razporejanje v post-GA predelke, kjer se začnejo povezovati v urotelijske plake (Hu in sod., 2005; Hudoklin in sod., 2011; Hudoklin in sod., 2012). Hudoklin in sod. (2011) so ločili post-GA predelke v tri kategorije. V prvo sodijo UP-pozitivni transportni vezikli (UPTV), ki se nahajajo ob trans-strani GA. Koncentracija uroplakinskih partiklov je tu nizka v primerjavi z zrelim urotelijskim plakom. Druga kategorija zajema nezrele fuziformne vezikle (iFV; *angl.: immature fusiform vesicle*), ki so osrednji post-GA predelki za nastajanje urotelijskih plakov. Nezreli fuziformni vezikli so zelo raznoliki, saj v njih poteka intenzivno razvrščanje in koncentriranje uroplakinskih partiklov, ki prihajajo z UPTV. V tretjo kategorijo spadajo zreli fuziformni vezikli (mFV; *angl.: mature fusiform vesicle*). Ti vezikli so po obliki ožji in daljši od iFV (v dolžino merijo okoli 0,5 μm) in imajo povečano razmerje med površino in volumnom. Sestavljeni so iz dveh urotelijskih plakov, med katerima je območje neodebeljene membrane. Hudoklin in sod. (2012) so ugotovili, da so mFV specifični za površinske urotelijske celice, kjer se v osrednjem delu celice nahajajo v skladih, tik ob apikalni plazmalemi pa posamično. Kreft in Robenek (2012) sta s kombinacijo tehnik lomljenja membrane z zmrzovanjem in imunooznačevanja (*angl.: freeze-fracture replica immunolabelling* ali na kratko FRIL) na modelu *in vitro* pokazala, da se tudi UPTV in iFV (imenovani tudi diskoidni fuziformni vezikli (DFV); *angl.: discoidal fusiform vesicle*) nahajajo v bližini apikalne plazmaleme in predvidevata, da se ti že lahko zlivajo z apikalno plazmalemo.

Proces zlivanja fuziformnih veziklov z apikalno plazmalemo naj bi potekal na območju neodebeljene membrane (Hudoklin in sod., 2012), med drugim s pomočjo proteinov SNARE in Rab, ki so v celicah udeleženi v procesih zlivanja membran in so jih lokalizirali tudi v fuziformnih veziklih (Chen in sod., 2003; Kreft in sod., 2009).

2.3. GOLGIJEV APARAT

Golgijev aparat (GA) je celični organel, ki ga gradi kompleks sploščenih, diskom podobnih membranskih cistern. Te so v bližini ER in jedra, saj sprejemajo lipide in proteine od ER. Ležijo bolj ali manj ena ob drugi in so med seboj povezane s sistemom veziklov in tubulov. Mnenja o tem, kako poteka transport snovi skozi GA, so še vedno deljena. Sprva so menili, da so cisterne prehodne oblike, ki se od *cis*-strani (bližje ER) pa do *trans*-strani počasi premikajo in »zorijo«. Konec 20. stoletja pa je v veljavo prišla hipoteza vezikularnega transporta, ki pravi, da so cisterne bolj ali manj statične in snovi iz ene v drugo prehajajo preko veziklov. Tretja hipoteza pa predvideva potovanje tovora po tubularnih povezavah med cisternami (Karp, 2010; Kreft in Višnjar, 2013). Dandanes raziskave kažejo, da se različni modeli potovanja transporta med seboj ne izključujejo. Kako bo potoval tovor, pa je odvisno od molekule same (Kreft in Višnjar, 2013).

Med diferenciacijo celic in v odvisnosti od fiziološkega stanja celice se lahko oblika GA močno spreminja (Hudoklin in sod., 2009; Kreft in sod., 2010a). Kreft in Višnjar (2013) sta na osnovi morfološke analize ločili osnovno (kondenziran GA, ni posameznih, ločenih skladovnic cistern GA), prehodno in fragmentirano obliko GA (prisotne med seboj ločene posamezne cisterne ali skladovnice cistern). Pri sesalskih celicah se GA poveča, kadar je stopnja transporta preko GA povišana in zmanjša, kadar je tovora iz ER manj (Trucco in sod., 2004). Oblika GA je poleg dotoka novega tovora iz ER odvisna tudi od organizacije mikrotubulov (Kreft in sod., 2010b). Trucco in sod. (2004) so z elektronsko tomografijo pokazali, da je med cisternami GA veliko več povezav med aktivnim transportom tovora iz ER v GA. Iz rezultatov poskusa, ki so ga opravili Kreft in sod. (2010b), pa je razvidno, da imajo celice z več α -tubulina kondenziran, osnovni GA, medtem ko se osnovna oblika GA razbije in fragmentira, ko je koncentracija α -tubulina nižja.



Slika 1: Golgijev aparat v različno diferenciranih celicah *in vitro*. *- osnovna oblika, **-prehodna oblika, ***-fragmentirana oblika. Fluorescenčna mikroskopija. Modra barva: jedra, rdeča barva: Golgijev aparat. Merilce 10 μm . (Povzeto po Kreft in Višnjar, 2013).

Hudoklin in sod. (2009) ter Kreft in sod. (2010a) so dokazali, da imajo bazalne celice v uroteliju drugačno obliko GA kot vmesne ali površinske celice. Oblika GA je prav tako tesno povezana s prisotnostjo in razporeditvijo UP v celici. Medtem ko imajo vmesne celice prehodni GA in UP-pozitivne le DFV, so v površinskih celicah UP v mFV tik pod plazmalemo in v apikalni plazmalemi, GA pa je fragmentirani. Poleg tega so Kreft in sod. (2010b) s tehniko obnove fluorescence po bledenju, t. i. FRAP (*ang.*: *fluorescence recovery after photobleaching*), pokazali, da so skladovnice cistern GA med seboj različno povezane. To so ugotovili tako, da so osvetlili GA v celicah, ki so v GA izražale fluorescenčna proteina GalT-YFP ali GalT-OFP, in izmerili čas, ki je bil potreben za obnovo fluorescence. Ugotovili so, da se fluorescenca najhitreje in v celoti povrne v GA v osnovni (*ang.*: »*ribbon*«) obliki, počasneje in manj v prehodni obliki in najmanj v fragmentirani obliki. Iz tega lahko sklepamo, da so skladovnice cistern v GA v osnovni obliki dovolj blizu, da se lahko fluorescenca popolnoma obnovi. Medtem ko so skladovnice cistern GA v fragmentirani obliki med seboj preveč oddaljene, zato med njimi ne pride do prerazporeditve tovora in se fluorescenca ne obnovi (skladovnice cistern delujejo kot samostojne enote).

2.4. MEDCELIČNI STIKI

Za epitelijske celice je značilno, da se med seboj tesno povezujejo. Tako povezovanje omogoča zaščitno vlogo epitelijske celice, saj preprečuje prehod snovi med celicami po paracelularni poti, obenem pa omogoča selektivno prepustnost. Celice se med seboj povezujejo na več različnih načinov. Tesni stiki (*zonula occludens*) povezujejo celice tesno med seboj na apikalno-lateralnem delu, adherentni stiki (*zonula adherens*) pripenjajo celice eno na drugo na lateralni plazmalemi pod območjem tesnih stikov in presledkovni stiki omogočajo izmenjavo informacij v citoplazmi med sosednjimi celicami (Karp, 2010). V nadaljevanju so podrobneje opisani tesni in adherentni stiki.

2.4.1. Tesni stiki

Tesni stiki se nahajajo apikalno na lateralni plazmalemi celic. Na elektronskih mikrofotografijah so videti kot zlitje membran dveh sosednjih celic (Hicks, 1965; Furuse in sod., 1998). Poskusi s tehniko lomljenja membrane z zmrzovanjem pa so pokazali, da gre za vrvičasto mrežje integralnih proteinov, ki se z zunajcelično domeno povezujejo s podobnim mrežjem v sosednji celici (Furuse in sod., 1998; Morita in sod., 1999).

Prvi odkrit protein tesnih stikov je bil okcludin (Furuse in sod., 1993), ki se s citoplazemsko domeno povezuje z drugimi proteini (ZO-1 in ZO-2) (Mitic in Anderson, 1998). Poleg okcludina pa se v tesnih stikih nahajajo tudi klavdini (Furuse in sod., 1998). Rezultati raziskav kažejo, da so prav klavdini glavni proteini tesnih stikov, saj lahko celice brez okcludina normalno tvorijo tesne stike (Furuse in sod., 1998), medtem ko utišanje klavdinov povzroči nepravilnosti v organizaciji mrežja tesnih stikov in v spremenjenem paracelularnem transportu (Oliveira in Morgado-Díaz, 2007).

V mišjem uroteliju *in vitro* so Kreft in sod (2006) potrdili prisotnost proteinov ZO-1, okcludina ter klavdina-4 in -8. Tesni stiki med urotelijskimi celicami skupaj z urotelijskimi plaki omogočajo krvno-urinsko pregrado (Višnjar in Kreft, 2013).

2.4.2. Adherentni stiki

Celice epitelijev so med seboj povezane tudi z adherentnimi stiki, ki se nahajajo okoli celice, na lateralni plazmalemi pod tesnimi stiki. Ker se pripenjajo na citoskelet (aktinske filamente), omogočajo tudi mehansko stabilizacijo celice. Adherentne stike tvorijo zunajcelični deli kadherinov dveh sosednjih celic in za povezavo je nujen kalcij. Kadherini so velika družina glikoproteinov, ki sodelujejo v medceličnih povezavah. Celice se večinoma med seboj povezujejo z enakim tipom kadherina. Najbolj znani so E-kadherin, N-kadherin in P-kadherin (Karp, 2010).

Med embrionalnim razvojem so kadherini eni najznačilnejših pritrjevalnih proteinov, saj med drugim omogočajo migracijo celic in s tem tvorbo zarodnih plasti, spremembe v pritrjanju celic ter vzpostavitev novih povezav med celicami. Ker se citoplazemska domena kadherina preko kateninov povezuje z aktinskimi filamenti in drugimi citoplazemskimi proteini, so kadherini v adherentnih stikih pomembni tudi za prenos signalov iz okolice celice v citoplazmo (Karp, 2010).

Prisotnost E-kadherina v celici je pomemben signal za diferenciacijo epiteljske celice, saj sproži organizacijo območja lateralne plazmaleme, kjer se oblikujejo tesne in adherentne celične povezave. E-kadherin torej sodeluje tudi pri vzpostavitvi apiko-bazalne polarizacije celice (Rodriguez-Boulán in Nelson, 1989).

Raziskave so pokazale prisotnost E-kadherina na lateralni plazmalemi urotelijskih celic *in vitro* pri človeku (Southgate in sod., 1994), prašiču (Ludwikowski in sod., 1999; Višnjár in sod., 2012) in miši (Kreft in sod., 2006). Analize urotelijskih tumorjev različnih stopenj (Protheroe in sod., 1999; Lascombe in sod., 2006; Bryan in sod., 2008) in celičnih linij (Mialhe in sod., 2000; Lekka in sod., 2011) pa kažejo na spremenjeno izražanje E-kadherina in povišano izražanje N-kadherina. Zato slednjega imenujejo tudi »novi tumorski označevalec« (Lascombe in sod., 2006).

2.4.3. Spremembe medceličnih stikov

Epitelijske celice se med seboj tesno povezujejo in tvorijo epitelij. Pod njim je vezivno tkivo, v katerem so mezenhimske celice, ki pa so med seboj le rahlo povezane ali pa sploh ne. Epitelijske celice v epiteliju od mezenhimskih celic v vezivnem tkivu ločuje bazalna lamina. Prehod celice iz epitelijskega v mezenhimski tip imenujemo epitelijsko-mezenhimski prehod *angl.: epithelial-mesenchymal transition, EMT*) in je nujen med embrionalnim razvojem ter pri celjenju ran. Zajema spremembe v celičnem fenotipu (oblika celice), medceličnih povezavah (kadherini), celični polarnosti (izguba apiko-bazalne polarnosti) in migratornih lastnostih celice. Raziskave se vedno bolj usmerjajo v ugotavljanje pomena EMT pri karcinogenezi (Thiery in sod., 2009; Chen in sod., 2012).

Bryan in Tselepis (2010) ugotavljata, da je pri karcinogenezi urotelija zelo značilno zmanjšanje izražanja E-kadherina v adherentnih stikih. Takrat se poveča izražanje N-kadherina, kar je povezano z večjo invazivnostjo tumorja in je najverjetneje povezano z EMT.

2.5. RAK SEČNEGA MEHURJA IN SPREMEMBE UROTELIJA MED KARCINOGENEZO

Rak sečnega mehurja je v grobem lahko dveh tipov: 1) papilarni (papilom, papilarna neoplazma nizkega malignega potenciala, neinvazivni papilarni karcinom nizke stopnje in neinvazivni papilarni karcinom visoke stopnje) ali 2) nepapilarni (karcinom *in situ*, invazivni v *lamino proprio* in invazivni v *muscularis proprio*) (Ovčak, 2005). Papilarni tip raka sečnega mehurja navadno ni invaziven in ne prodre v steno sečnega mehurja ali metastazira, medtem ko je nepapilarni tip invaziven in lahko povzroči metastaze tudi v druge organe (Eble in sod., 2004). Vzrok za nastanek rakavih sprememb v urotelijskem tkivu so spremembe DNA, ki so lahko posledica eksogenih (tobak, aromatski amini, kronične infekcije) ali endogenih dejavnikov (spremembe v nukleotidnem zaporedju DNA) (Eble in sod., 2004; Mcconkey in sod., 2010). Na molekulski ravni se spremembe kažejo bodisi kot spremembe na katerikoli stopnji procesiranja gena (izražanje, prepisovanje, prevajanje in nadaljnje modifikacije) bodisi kot spremembe v transportu proteina (Huang in sod., 2007).

Uroplakini so glavni pokazatelji diferenciacije urotelijskih celic in zato je moč sklepati, da bo njihovo izražanje močno zmanjšano v primeru dediferenciacije, transformacije ali karcinogeneze urotelijskih celic (Zupančič in sod., 2011a). To drži za nekatere manj diferencirane celične kulture normalnih urotelijskih celic in celične linije humanega karcinoma mehurja (Finch in sod., 1999), vendar pa ne drži za urotelijski karcinom *in vivo* (Koga in sod., 2003; Gaisa in sod., 2011). Ogawa in sod. (1999) so pokazali, da indukcija urotelijskega karcinoma z N-butil-N-(4-hidroksibutil)nitrozaminom (BBN) sicer zmanjša izražanje UP v površinskih urotelijskih celicah, vendar pa ga poveča v nekaterih vmesnih celicah. To nakazuje na oteženo diferenciacijo celic med karcinogenezo. Vendar pa iz teh rezultatov in rezultatov drugih raziskav (Huang in sod., 2007; Matsumoto in sod., 2008; Zupančič in sod., 2011b) ne moremo sklepati na direktno povezavo med znižanjem izražanja UP v apikalni plazmalemi in karcinogenezo.

Zupančič in sod. (2011a) so z indukcijo karcinogeneze podganjega urotelija z BBN *in vivo* ugotovili, da se prisotnost UP zmanjšuje z daljšanjem časa izpostavljenosti

rakotvornemu BBN. Od vseh UP se najbolj zmanjša izražanje UPII, tako v površinskih kot tudi v vmesnih urotelijskih celicah. Z daljšanjem izpostavitve BBN se tudi vse bolj spreminja morfologija apikalne plazmaleme površinskih urotelijskih celic. Mikrogrebeni skoraj povsem izginejo, nadomestijo pa jih vrvičasti grebeni in mikrovili, kar kaže na napake v sestavljanju urotelijskih plakov. Podobno se zgodi tudi pri izbitju gena za UPII (Kong in sod., 2004). UPIa se v tem primeru kopiči v ER, medtem ko lahko UPIb in UPIIIa vseeno potujeta do apikalne plazmaleme, vendar pa ne moreta tvoriti uroplakinskih partiklov in urotelijskih plakov. Površina urotelija je zato brez mikrogrebenov. UPII je edini, ki je sintetiziran v »nezreli« obliki kot pro-UII, in ta prodomena se med zorenjem proteina v cisternah GA odstrani. V primeru, da se to ne zgodi, se par UPIa/UII ne more povezati v heterotetramer s parom UPIb/UIIIa in tvorba uroplakinskih partiklov in urotelijskih plakov je okrnjena (Hu in sod., 2005).

Poleg spremenjenega izražanja UP se pri urotelijski karcinogenezi pojavljajo še druge spremembe: (1) pojav mikrovilov na površini urotelijskih celic, (2) odsotnost urotelijskih plakov, (3) spremenjeno izražanje citokeratina 20 (CK 20) in (4) povečana celična proliferacija (glede na jedrni protein Ki-67) (Zupančič in sod., 2011a). Zupančič in sod. (2011b) so opazovali prvi dve spremembi pri miših, ki so jim 10 tednov intraperitonealno vbrizgavali kemoterapevtik ciklofosfamid (CP), ki povzroča poškodbe urotelija. Ponavljajoči odmerki CP so povzročili predrakave spremembe urotelija, za katere sta bila značilna dva tipa urotelijskih celic, in sicer: 1) slabo diferencirane celice z mikrovili in majhnimi, okroglimi vezikli, kjer ni bilo ne UP ne urotelijskih plakov, ter 2) delno diferencirane celice, v katerih so UP tvorili manjše urotelijske plake, ki so bili prisotni v iFV in v apikalni plazmalemi z gladkimi, vrvičastimi grebeni.

V normalnem uroteliju so UP prisotni in lokalizirani predvsem v urotelijskih plakih v mFV in v plazmalemi, ki je oblikovana v mikrogrebene. Spremenjeno izražanje CK20 in povečano celično proliferacijo so dokazali Zupančič in sod. (2011a). V površinskih urotelijskih celicah se je po tretiranju z BBN zmanjšalo izražanje CK20 in povečalo izražanje proteina Ki-67. Iz tega sklepajo, da BBN povzroči de-diferenciacijo površinskih urotelijskih celic, saj se pojavijo mikrovili na apikalni plazmalemi in se zviša proliferacija celic.

2.6. CELIČNE KULTURE UROTELIJSKIH CELIC

Celična kultura je populacija celic, ki živi in se razmnožuje izven mnogoceličnega organizma oz. *in vitro*. Sistem *in vitro* omogoča natančno regulacijo, spreminjanje in kontroliranje celičnega okolja ter zaradi dostopnosti celic olajša meritve (Truschel in sod., 1999; Karp, 2010). Izven fiziološkega okolja so celice veliko bolj izpostavljene škodljivim dejavnikom, zato jim moramo zagotoviti ustrezne razmere za rast in razmnoževanje. Ustrezna hranila zagotovimo s hranilnim medijem, v katerem celice gojimo. Hranilni medij mora vsebovati ustrezno koncentracijo in raznolikost hranil, hormonov, rastnih dejavnikov in kofaktorjev. Poleg hranil pa moramo zagotoviti tudi zaščito pred mikroorganizmi, saj ti hitro kontaminirajo celično kulturo. Delo s celično kulturo zato poteka v sterilnem okolju, v hranilni medij pa po potrebi dodajamo širokospektralne antibiotike in antimikotike (Truschel, 1999; Karp, 2010). Celične kulture so lahko primarne, sekundarne ali trajne glede na izvor, število celičnih delitev ter ohranjanje lastnosti izvornega tkiva (Karp, 2010).

2.6.1. Primarna kultura urotelijskih celic

Celice, ki v gojišču zrastejo direktno iz koščka ali posameznih celic, izoliranih iz urotelijskega tkiva, predstavljajo primarno celično kulturo urotelijskih celic. V primarni celični kulturi urotelijske celice obdržijo večino lastnosti, ki jih imajo tudi *in vivo* (Kreft in sod., 2002; Southgate in sod., 2002), zato taka kultura predstavlja ustrezen model *in vitro* za raziskave razvoja urotelija in njegove funkcije (Truschel in sod., 1999; Kreft in sod., 2006) ali pa regeneracije po poškodbi (Kreft in sod., 2005a).

Na začetku raziskav so bili raziskovalci mnenja, da urotelijske celice *in vitro* ne dosežejo končne diferenciacije in v apikalni plazmalem površinskih celic ne izpostavljajo urotelijskih plakov (Reznikoff in sod., 1983; Southgate in sod., 2002), vendar pa danes vemo, da temu ni tako. Truschel in sod. (1999) so s prenosom western potrdili tako izražanje UP v celicah primarne urotelijske kulture kot tudi prisotnost urotelijskih plakov. Kreft in Robenek (2012) sta s tehniko FRIL pokazala prisotnost urotelijskih plakov tako v apikalni plazmalem površinskih urotelijskih celic kot tudi v veziklih DFV, ki so udeleženi pri transportu UP in urotelijskih plakov.

2.6.2. Sekundarna kultura urotelijskih celic

Po prvi presaditvi celic primarne kulture vzpostavimo sekundarno kulturo. Celice se tekom pasaž starajo in praviloma izgubljajo lastnosti izvornega tkiva (Southgate in sod., 1994). Za prašičje in humane urotelijske celice so Ludwikowski in sod. (1999) pokazali, da jih lahko gojimo v kulturi tudi do 180 dni (10 pasaž) brez znakov staranja, dediferenciacije ali poliploidnosti. Kasneje so tudi Fossum in sod. (2005) potrdili, da lahko humane urotelijske celice gojimo v kulturi do 14. pasaže, brez večjih sprememb v obliki ali ploidnosti.

Southgate in sod. (1994) v sekundarni kulturi humanih urotelijskih celic niso potrdili uroplakinov in CK20. Kreft in sod. (2005b) prav tako niso ugotovili uroplakinov in CK20 v sekundarni kulturi mišjih urotelijskih celic, medtem ko so okludin in CK7 celice nehale izražati po sedmih pasažah. V sekundarni kulturi prašičjih urotelijskih celic pa so Višnjari in sod. (2012) potrdili uroplakine v apikalni plazmalemi celic, ki so rasle v hranilnem mediju UroM brez seruma.

2.6.3. Trajna kultura rakavih urotelijskih celic T24

Za celice v trajni celični kulturi oz. liniji je značilno, da se lahko neomejeno delijo. Rigby in Franks sta vzpostavila prvo trajno urotelijsko linijo, imenovano RT4, iz papiloma sečnega mehurja v letu 1970 (Rigby in Franks, 1970). Trajne linije urotelijskih celic, ki so pridobljene iz rakavih celic, predstavljajo ustrezno orodje za raziskave sprememb v metabolizmu, odzivu imunskega sistema bolnika in ne nazadnje za nesistemske testiranje delovanja novih zdravil.

V našem primeru smo se odločili za trajno celično linijo rakavih urotelijskih celic T24, ki je bila ustvarjena iz slabše diferenciranega, invazivnega tumorja (Bubeník in sod., 1973) po WHO klasificiranega kot prehodnocelični karcinom (Epstein, 2010). Celice T24 ne izražajo UP (Varga in sod., 2004; Cowled in sod., 2005) in imajo v pleomorfne mikrovile oblikovano plazmalemo (Imani in sod., 2012). Kljub vsemu pa so DeGraff in sod. (2012) s RT-PCR zaznali v celicah T24 prisotnost mRNA za UPIb in UPII. Lascombe in sod. (2006) pa so ugotovili, da celice T24 ne izražajo E-kadherina, ampak N-kadherin, ki je značilen za mezenhimske celice.

3. MATERIAL IN METODE DELA

3.1. CELICE *IN VITRO* IN HRANILNI MEDIJI

3.1.1. Celice

Uporabili smo sekundarno celično kulturo normalnih prašičjih urotelijskih celic (NPU) (pripravljena po postopku opisanem v Kreft in sod., 2010b in Jerman in sod., 2014) in trajno celično linijo rakavih urotelijskih celic T24, izoliranih iz humanega prehodnoceličnega karcinoma (ATTC, LGC Standards, Nemčija). Celice smo gojili v petrijevkah ($2r = 35$ mm) na vgrajenem stekelcu s premerom 10 mm (MatTek Corporation, ZDA) ter na okroglih krovnih stekelcih ($2r = 10$ mm) v 24–prekatnih petrijevkah (Techno Plastic Products, Švica) v CO₂-inkubatorju (37 °C, 5 % CO₂).

3.1.2. Hranilni medij za prašičje urotelijske celice

Normalne prašičje urotelijske celice smo gojili v hranilnem mediju UroM (-Ca²⁺ +S_{FBS}), ki ga sestavljata medij MDCB 153 (Sigma, Nemčija) in medij A-DMEM (Advanced-Dulbecco's modification of Eagle's medium (Gibco, Life Technologies, Avstrija)). Hranilnemu mediju nismo dodajali kalcija (-Ca²⁺), dodali pa smo serum FBS (+S_{FBS}). Podrobna sestava je prikazana v Preglednici 1.

Diferenciacijo celic in organizacijo v več slojev smo spodbudili z zamenjavo medija, in sicer smo odstranili serum in dodali kalcij. Podrobna sestava medija UroM (+Ca²⁺ - S_{FBS}) je prikazana v Preglednici 2.

Preglednica 1. Sestava hranilnega medija UroM (-Ca²⁺ +S_{FBS})

Sestavina medija	Proizvajalec	Končna koncentracija v mediju
MDCB 153	Sigma-Aldrich	50 %
A-DMEM	Gibco	50 %
adenin	Sigma-Aldrich	15 µg/ml
inzulin	Sigma-Aldrich	5 µg/ml
hidrokortizon	Sigma-Aldrich	0,5 µg/ml
fosfoetanolamin	Sigma-Aldrich	0,1 µg/ml
glutamax	Gibco	4 mM
FBS	Gibco	2,5 %
streptomycin	Galenika	100 µg/ml
penicilin	Pliva	100 µg/ml

Preglednica 2. Sestava hranilnega medija UroM (+Ca²⁺ -SFBS)

Sestavina medija	Proizvajalec	Končna koncentracija v mediju
MDCB 153	Sigma-Aldrich	50 %
A-DMEM	Gibco	50 %
adenin	Sigma-Aldrich	15 µg/ml
inzulin	Sigma-Aldrich	5 µg/ml
hidrokortizon	Sigma-Aldrich	0,5 µg/ml
fosfoetanolamin	Sigma-Aldrich	0,1 µg/ml
glutamax	Gibco	4 mM
streptomycin	Galenika	100 µg/ml
penicilin	Pliva	100 µg/ml
CaCl ₂	UKC	2,5 mM

3.1.3. Hranilni medij za celice T24

Celice T24 za svojo rast potrebujejo hranilni medij, ki ga sestavljata medij A-DMEM (Gibco, Life Technologies, Avstrija) in hranilna mešanica F12 (HAM) (Gibco, Life Technologies, Avstrija). Podrobna sestava je prikazana v Preglednici 3.

Preglednica 3. Sestava hranilnega medija za celice T24

Sestavina medija	Proizvajalec	Končna koncentracija v mediju
A-DMEM	Gibco	50 %
F12 (HAM)	Gibco	50 %
FBS	Gibco	5 %
streptomicin	Galenika	100 µg/ml
penicilin	Pliva	100 µg/ml

3.2. IMUNOFLUORESCENČNO OZNAČEVANJE

Celice smo fiksirali pri sobni temperaturi 5 minut v 100 % metanolu, ohlajenem na -20 °C (v primeru imunooznačevanja UP) ali 15 minut v 4 % formaldehidu (za imunooznačevanje drugih celičnih struktur). Nato je sledilo spiranje s PBS (petkrat v 15 minutah) in 30-minutna inkubacija v 1 % BSA v PBS (v primeru imunooznačevanja UP) ali v blokirnem pufru (0,1 % želatina, 0,1 % saponin, 0,5 % BSA, 50 mM NH₄Cl, 0,02 % NaN₃) (za imunooznačevanje drugih celičnih struktur). Blokirni pufer smo nato odstranili in celice čez noč inkubirali pri 4 °C s primarnimi protitelesi (Preglednica 4), ki smo jih redčili v 1 % BSA v PBS. Naslednji dan smo celice najprej spirali s PBS (vsaj šestkrat v 30 minutah). Sledila je 90-minutna inkubacija v temi z ustreznimi sekundarnimi protitelesi konjugiranimi z AF (555 nm ali 488 nm) (Life Technologies, ZDA), pri sobni temperaturi. Nato smo sprali s PBS (vsaj devetkrat v 45 minutah) ter dodali sredstvo VectaShield z barvilom DAPI za barvanje DNA (Vector Laboratories, ZDA). Tako pripravljene preparate smo pregledali ter slikali s klasičnim invertnim fluorescenčnim mikroskopom Eclipse TE300 (Nikon) in fluorescenčnim mikroskopom AxioImager.Z1 z dodatkom ApoTome (Zeiss).

Preglednica 4. Primarna protitelesa, ki smo jih uporabili za imuno fluorescenčno dokazovanje proteinov.

Protitelo	Tip	Gostitelj	Proizvajalec	Kataloška št.	Redčitev
UPIb	poliklonsko	koza	Santa Cruz	15174	1:50
UPIIIa	poliklonsko	zajec	Santa Cruz	33570	1:50
Giantin	monoklonsko	miš	ENZO Life Sciences	ALX804600C	1:1000
E-kadherin	monoklonsko	miš	BD Transduction Laboratories	610182	1:400
N-kadherin	monoklonsko	zajec	Abcam	12221	1:50

3.3. PRENOS PROTEINOV NA MEMBRANO (PRENOS WESTERN) IN IMUNOOZNAČEVANJE

3.3.1. Priprava celičnih lizatov za prenos proteinov in imunooznačevanje

Rakave urotelijske celice T24 smo centrifugirali (5 min, 200 g, 23 °C, Eppendorf) ter odstranili hranilni medij. V vsako centrifugirko s celičnim peletom smo dodali 300 µl lizirne raztopine (2000 µl lizirnega pufru in 20 µl PMSF¹) ter vsebino dobro premešali in nato 10 min inkubirali na ledu z vmesnim mešanjem. Nato smo lizirane celice centrifugirali 10 minut na 4 °C z 11000 g. Supernatant je predstavljal celični lizat, ki smo ga shranili na -80 °C.

Za kontrolo smo uporabili v naprej pripravljene vzorce mišjih urotelijskih celic, ki so bile pridobljene s strganjem celic z lumna sečnega mehurja žrtvovane miši v skladu z etičnimi standardi (Dovoljenje za delo s poskusnimi živalmi 34401-17/2009/6). Postopek priprave celičnega lizata pa je bil enak zgoraj opisanemu.

3.3.2. Merjenje koncentracije proteinov

Koncentracijo proteinov smo merili v lizatih rakavih urotelijskih celic T24 in v lizatih celic mišjega urotelija (kontrola). Uporabili smo komplet reagentov BCA (BCATM Protein Assay Kit, Pierce, ZDA).

Za spektrofotometrično analizo smo najprej pripravili standardno raztopino BSA (v koncentracijah od 25 µg/ml do 2000 µg/ml), ki smo jo potrebovali za umeritveno krivuljo. V 200–mikroliterskih epruvetah Eppendorf smo pripravili 10-krat in 20-krat redčene lizate. Nato smo na mikrotitrsko ploščo v vrste nanašali 190 µl reagenta BCA in 9,5 µl vzorca (10-krat in 20-krat redčen lizat ter standardno raztopino BSA). Inkubirali smo 30 minut na 37 °C nato pa izmerili absorbcijo pri 560 nm. Iz dobljenih rezultatov standardov smo s programom Excel narisali umeritveno krivuljo in izračunali koncentracije naših vzorcev.

¹ Fenil-metil-sulfonil-fluorid je proteazni inhibitor serinskih proteaz, ki se uporablja v pripravi celičnih lizatov.

3.3.3. Elektroforeza

Celične lizate smo za elektroforezo pripravili tako, da smo jim dodali pufer (0,8 M Tris HCl, 7,5 % NaDS, 4 % glicerol, 100 mM DTT (DL-Dithiothreitol, Sigma) in 0,02 % bromofenol modro) v razmerju 4 : 1 ter jih nato kuhali v vodni kopeli 15 minut na 100 °C. Ko so se vzorci ohladili, smo jih lahko zamrznili na -80 °C do nadaljnje analize.

Celične lizate in molekulske standarde (BioRad), za ugotavljanje molekulske mase, smo nanegli na poliakrilamidni gel ustrezne koncentracije (Preglednica 5) in izvedli elektroforezo v Mini-PROTEAN[®] II elektroforetski celici (BioRad). Elektroforeza je potekala eno uro pri napetosti 200 V.

Preglednica 5. Sestava gelov za elektroforezo.

Koncentracija	4 %	15 %
Deionizirana voda	6,1 ml	2,35 ml
0,5 mM TRIS/HCl, pH 6.8	2,5 ml	/
1,5 mM TRIS/HCl, pH 8.8	/	2,5 ml
10 % NaDS	100 µl	100 µl
30 % akrilamid/bis-akrilamid (Sigma)	1,33 ml	5,0 ml
10 % amonijev perisulfat	50 µl	50 µl
TEMED (Sigma)	10 µl	5 µl

3.3.4. Prenos western

Za prenos western smo uporabili aparaturo za elektroforezni prenos (Mini Trans-Blot Electrophoretic transfer cell; BioRad), ki jo sestavljajo banjica, kasetna in pokrov. Poliakrilamidni gel z ločenimi proteini smo namočili v ohlajen pufer za prenašanje (25 mM Tris, 192 nM glicin, 20 % metanol). Z enakim pufrom smo omočili tudi nitrocelulozno membrano (Amersham) in filtrski papir enake velikosti kot gel. V kaseti za elektroforezni prenos smo pripravili sendvič, v katerem so si sledile plasti: filtrski papir, poliakrilamidni gel, nitrocelulozna membrana in ponovno filtrski papir. Pazili smo, da med plastmi ni bilo zračnih mehurčkov. Banjico za elektroforezni prenos smo prav tako napolnili z ohlajenim pufrom za prenašanje in vanj potopili kaseto.

Prenos je potekal eno uro pri napetosti 100 V. Membrano smo uporabili za imunooznačevanje UPIa, UPIb, UPII, UPIIIa ter E- in N-kadherina.

3.3.5. Imunooznačevanje uroplakinov Ia, Ib, II in IIIa ter E-kadherina in N-kadherina

Po končanem prenosu western, smo nitrocelulozno membrano inkubirali v blokirni raztopini (5% mleko v prahu v pufru PBS-T, to je 1% Tween-20 v pufru PBS) čez noč pri temperaturi 4 °C. Nato smo membrano na hitro sprali v pufru PBS-T. Posamezno membrano smo inkubirali s primarnimi protitelesi navedenimi v Preglednici 6.

Preglednica 6. Primarna protitelesa, ki smo jih uporabili za imunooznačevanje po prenosu western.

Protitelo	Tip	Gostitelj	Proizvajalec	Kataloška št.	Redčitev
UPIa	poliklonsko	koza	Santa Cruz	15170	1:200
UPIb	poliklonsko	koza	Santa Cruz	15174	1:200
UPII	poliklonsko	koza	Santa Cruz	15179	1:200
UPIIIa	poliklonsko	zajec	Santa Cruz	33570	1:500
E-kadherin	monoklonsko	miš	BD Transduction Laboratories	610182	1:2000
N-kadherin	monoklonsko	zajec	Abcam	12221	1:100
aktin	poliklonsko	Zajec	Sigma	A-2066	1:1000

Po dvourni inkubaciji pri sobni temperaturi na stresalniku smo membrano spirali 5-krat po 5 minut s pufrom PBS-T. Membrano smo nato 1 uro inkubirali v raztopini ustreznih sekundarnih protiteles, konjugiranih s hrenovo peroksidazo, na stresalniku pri sobni temperaturi. Po končani zadnji inkubaciji smo membrano intenzivno sprali s PBS-T (4-krat v 20 minutah). Sledilo je razvijanje fotografskega filma po metodi izboljšane kemoluminiscence (ECL) po navodilih proizvajalca (Amersham). Stran membrane s proteini smo prelili z reagentom ELC (sestavljeno iz komponent A in B, v razmerju 1 : 1), pustili eno minuto in nato reagent odlili. Nato smo membrano skupaj s filmom vložili v kaseto za izpostavljanje filmov, in sicer za 1, 3 ali 30 minut, odvisno od intenzitete signala, nato pa film razvili.

Za kontrolo nanosa in prenosa proteinov na membrano smo po označevanju proteinov isto membrano uporabili še za imunooznačevanje aktina. Po čiščenju (stripping) membrane z ustreznim pufrom (RestoreTM Western Blot Stripping Buffer, Pierce) smo celoten postopek imunooznačevanja ponovili s primarnimi zajčjimi poliklonskimi protitelesi proti aktinu (Sigma), rečenimi 1:1000 (Preglednica 6) v pufu PBS-T.

3.4. TRANSFEKCIJA CELIC

Tako celice NPU kot tudi celice T24 smo transficirali s transfekcijskim reagentom NanoJuice® (Merck) ali Lipofectamine® 3000 (Invitrogen, Life technologies) po navodilih proizvajalca. Pri transfekciji z reagentom Nanojuice® smo celice T24 fiksirali po 24 urah (± 1 ura) in celice NPU po 18 urah (± 1 ura). Pri transfekciji z reagentom Lipofectamine® smo celice T24 in NPU fiksirali po 20 urah (± 4 ure). Dve transfekcijski sredstvi smo uporabili z namenom, da ugotovimo katero od obeh deluje boljše.

V celice smo vnesli bodisi le konstrukt DNA z zapisom za UPIb z zelenim fluorescenčnim proteinom (UPIb-EGFP (pEGFP-N1-Kanamycin)) bodisi le konstrukt DNA z zapisom za UPIIIa z zelenim fluorescenčnim proteinom (UP3a-EGFP (pEGFP-N1-Kanamycin)) ter kombinacijo obeh. V slednjem primeru je bil UPIb brez EGFP (UPIb pcDNA3-Ampicilin). Priprava konstruktov DNA je opisana v doktorski nalogi Višnjar, 2013.

Kontrolo so predstavljale netransficirane celice T24 in celice NPU, ki smo jih imunooznačili s protitelesom anti-UPIIIa.

3.5. ANALIZA USPEŠNOSTI TRANSFEKCIJE

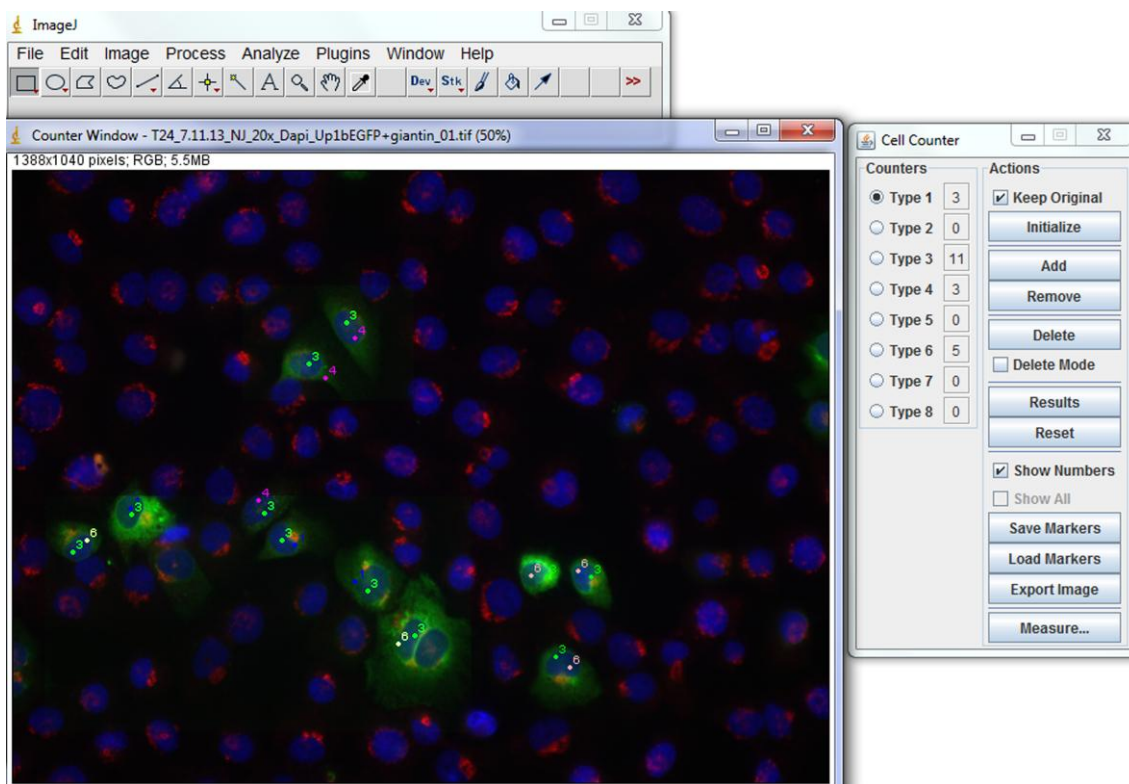
Uspešnost transfekcije smo ugotovili tako, da smo pri posameznem poskusu s programom ImageJ (1.47v, dodatek »Cell Counter«) prešteli transficirane in netransficirane celice na dvanajstih slikah, posnetih z mikroskopom (Slika 2). Za transficirane smo šteli tiste celice, ki so izražale UP bodisi v ER ali v plazmalemi, saj sta bila vzorca zelenega fluorescenčnega signala najbolj razločna. Prisotnost proteina v ER smo zaznali kot mrežast vzorec zelene fluorescence po celotni celici. Ko pa je celica izražala protein v plazmalemi, je bil vzorec zelene fluorescence enakomeren, poleg tega pa na optičnih rezinah nismo opazili zelene fluorescence iz citoplazme.

Podatke smo zbrali v preglednici, izračunali povprečno vrednost, standardni odklon (SD), standardno napako (SE) ter jih prikazali na Sliki 8. Uspešnost transfekcije smo izrazili v odstotkih transficiranih celic glede na vse preštete celice. S Studentovim t-testom smo preverili ali se razlike med transfekcijskima reagentoma Nanojouce® in Lipofectamine® 3000 kažejo v različni uspešnosti transfekcije celic T24 in NPU in ali so te razlike statistično značilne pri tveganju $p = 0,05$ (Priloga A in B).

3.6. ANALIZA LOKACIJE UP V TRANSFICIRANIH CELICAH

Lokacijo UP smo ugotavljali vzporedno s štetjem uspešnosti transfekcije v programu ImageJ (1.47v, dodatek »Cell Counter«).

Podatke smo zbrali v preglednici, izračunali povprečno vrednost, standardni odklon (SD), standardno napako (SE) ter jih prikazali na Sliki 10. Rezultate smo izrazili v odstotkih celic, ki imajo UP v ER ali v plazmalemi glede na vse transficirane celice. S Studentovim t-testom smo preverili ali se razlike med transfekcijskima reagentoma Nanojouce® in Lipofectamine® 3000 kažejo v različni lokalizaciji UP v transficiranih celicah T24 in NPU in ali so te razlike statistično značilne pri tveganju $p = 0,05$ (Priloga C in D).



Slika 2: Štetje transficiranih celic in ugotavljanje lokacije UP s programom ImageJ.

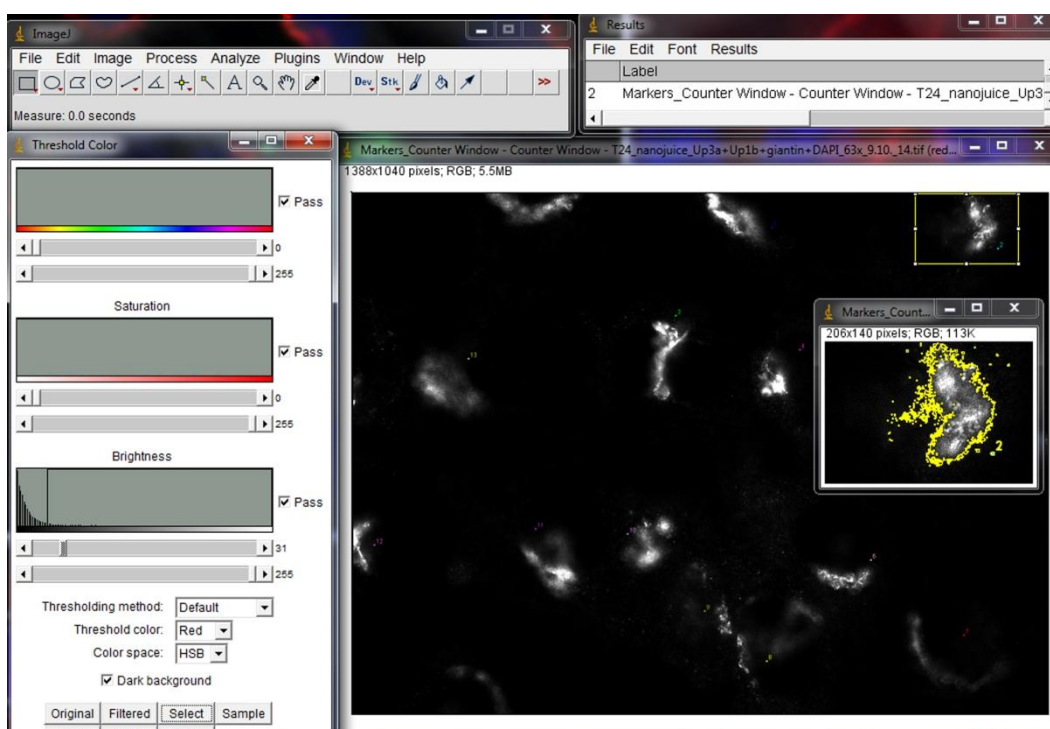
3.7. ANALIZA OBLIKE GA V TRANSFICIRANIH CELICAH

Obliko GA smo analizirali s programom ImageJ (1.47v). Analizirali smo 2D mikroskopske slike brez optičnih rezin, ki smo jih posneli z mikroskopom. Ločili smo barvne kanale zajetih slik. V nadaljevanju smo uporabili le signal rdečega kanala, saj sekundarna protitelesa, s katerimi smo označevali primarna protitelesa vezana na giantin, v GA fluorescirajo rdeče. Z dodatkom za štetje celic »*Cell counter*« smo zaporedno oštevilčili GA in sliko shranili. Nato smo z orodjem za izbor uokvirili želeni GA in ga podvojili, s čimer smo dobili ločeno sliko. Na tej sliki smo nato lahko označili samo izbrani GA z orodjem »*Threshold colour*« in med rezultati dobili površino organela izraženo v piksljih. Dobljene podatke smo s pomočjo merila na originalni sliki pretvorili v μm^2 . Za kontrolo smo uporabili celice NPU imunooznačene proti UPIIIa in giantinu ter netransficirane celice T24 imunooznačene proti giantinu.

Postavili smo sledeče velikostne razrede, po katerih smo določevali obliko GA:

- osnovna oblika do $44,99 \mu\text{m}^2$,
- prehodna oblika od $45,00 \mu\text{m}^2$ do $149,99 \mu\text{m}^2$,
- fragmentirana oblika nad $150,00 \mu\text{m}^2$.

Podatke smo zbrali v preglednici, izračunali povprečno vrednost, standardni odklon (SD), standardno napako (SE) ter jih prikazali na Sliki 12 in Sliki 14. S Studentovim t-testom smo preverili, ali so razlike v velikosti in obliki GA v netransficiranih in transficiranih celicah NPU in T24 značilne pri tveganju $p = 0,05$ (Priloga E–H).



Slika 3: Analiza oblike GA v transficiranih celicah T24 s programom ImageJ (1.47v, »Treshold colour«).

3.8. ANALIZA VELIKOSTI CELIC NPU IN T24

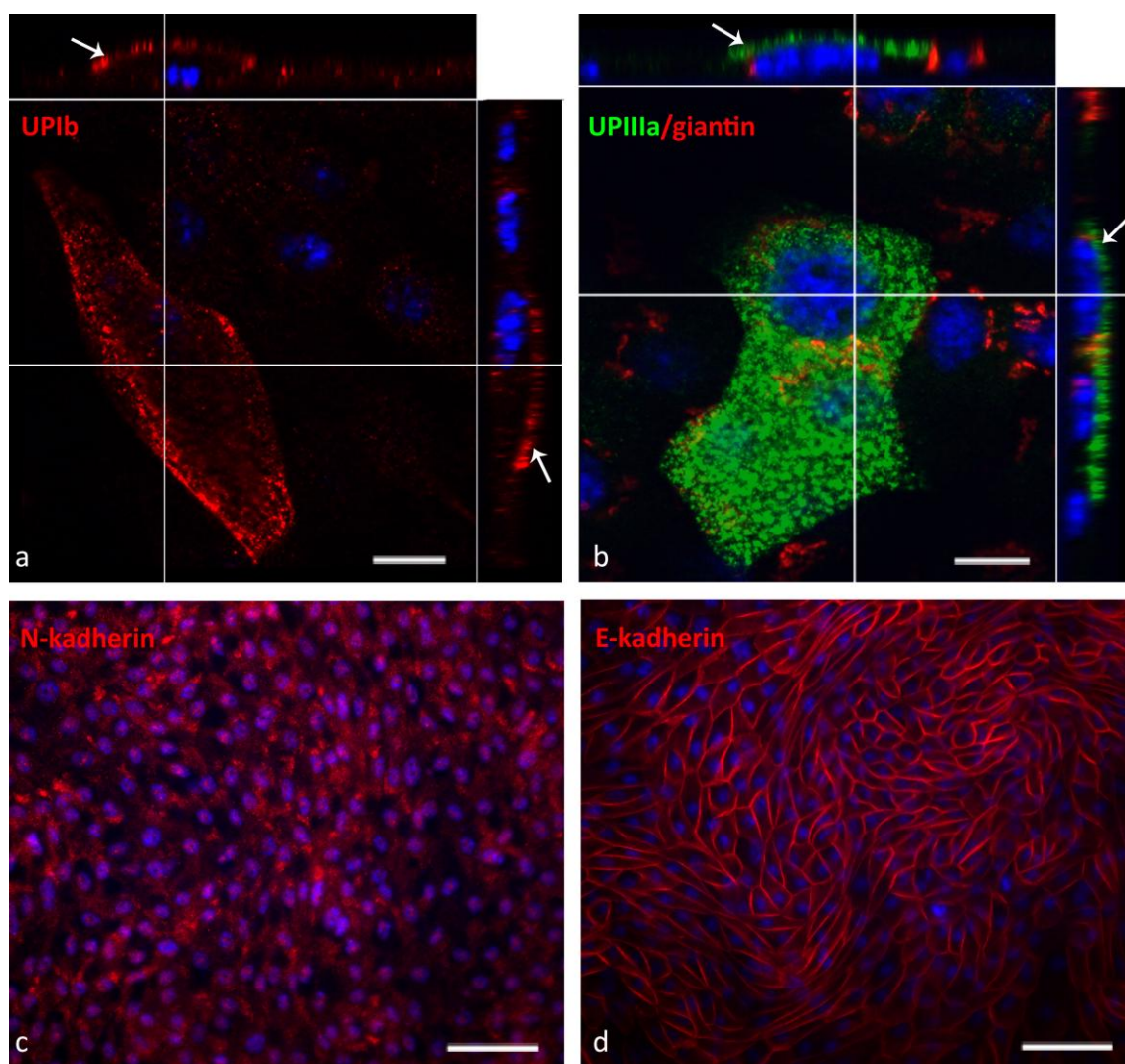
Velikost celic smo analizirali s pomočjo programa ImageJ (1.47v). Analizirali smo slike z optičnimi rezinami, ki smo jih posneli z mikroskopom AxioImager.Z1 (dodatek ApoTome (Zeiss)). Izmerili smo površino 30 celic NPU označenih s protitelesom proti E-kadherinu in 30 celic T24 označenih s protitelesom proti N-kadherinu, na najširšem delu celice. Z dodatkom za štetje celic »Cell counter« smo zaporedno oštevilčili celice in slike shranili. Nato smo z orodjem za prostoročni izbor obrisali zeleno celico in med rezultati dobili površino celice v pikslih. Dobljene podatke smo s pomočjo merila na originalni sliki pretvorili v μm^2 .

Podatke smo zbrali v preglednici, izračunali povprečno vrednost, standardni odklon (SD) in standardno napako (SE). S Studentovim t-testom smo preverili, ali so razlike v velikosti netransficiranih celicami NPU in T24 značilne pri tveganju $p = 0,05$ (Priloga I).

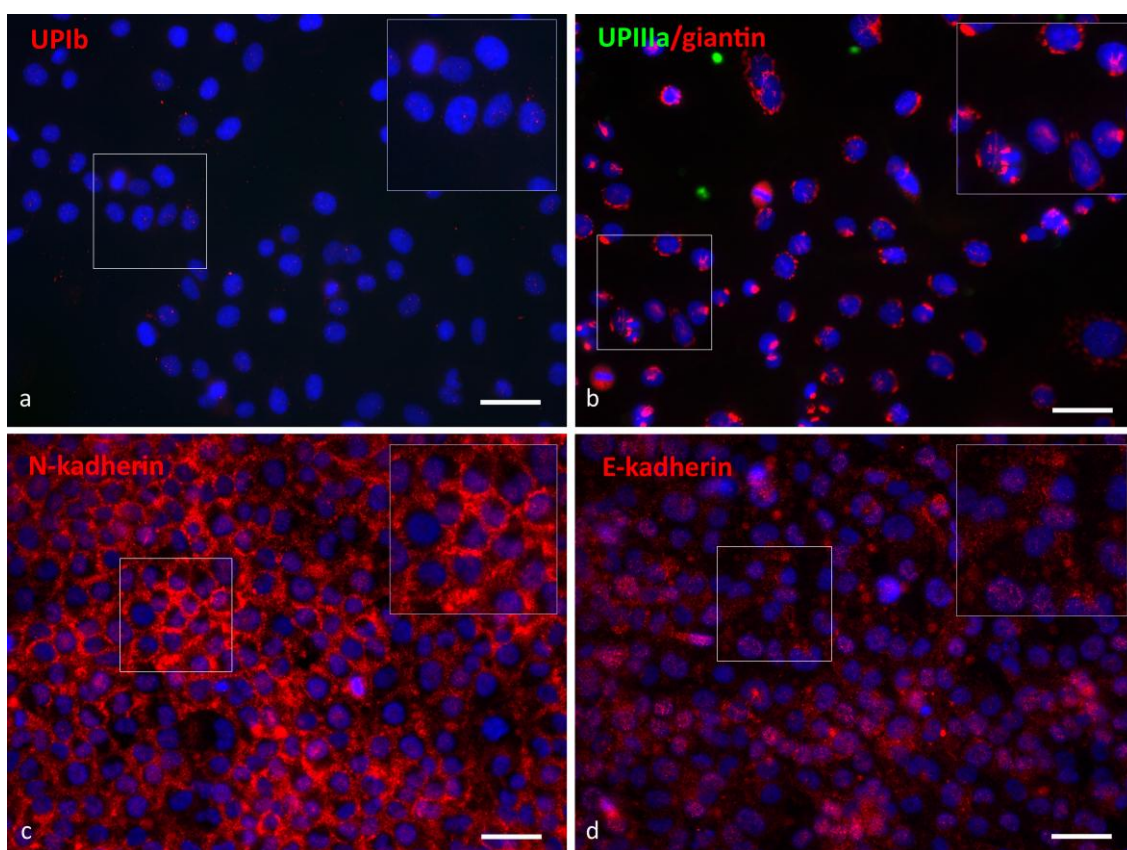
4. REZULTATI

4.1. IMUNOFLUORESCENCA UPIb IN UPIIIa, GIANTINA, E-KADHERINA IN N-KADHERINA V CELICAH NPU IN T24

Z imunooznačevanjem smo preverili prisotnost UPIb, UPIIIa in E-ter N-kadherina v celicah NPU (Slika 4) in v celicah T24 (Slika 5). Diferencirane celice NPU izražajo UPIb in UPIIIa v apikalni plazmalemi (Slika 4a in 4b), medtem ko celice T24 ne izražajo UPIb (Slika 5a) ali UPIIIa (Slika 5b). Celice NPU imajo v adherentnih stikih na lateralni plazmalemi izražen le E-kadherin (Slika 4d), medtem ko N-kadherina na lateralni plazmalemi med celicami ni (Slika 4c). V celicah T24 je izražen N-kadherin (Slika 5c) ne pa E-kadherin (Slika 5d).



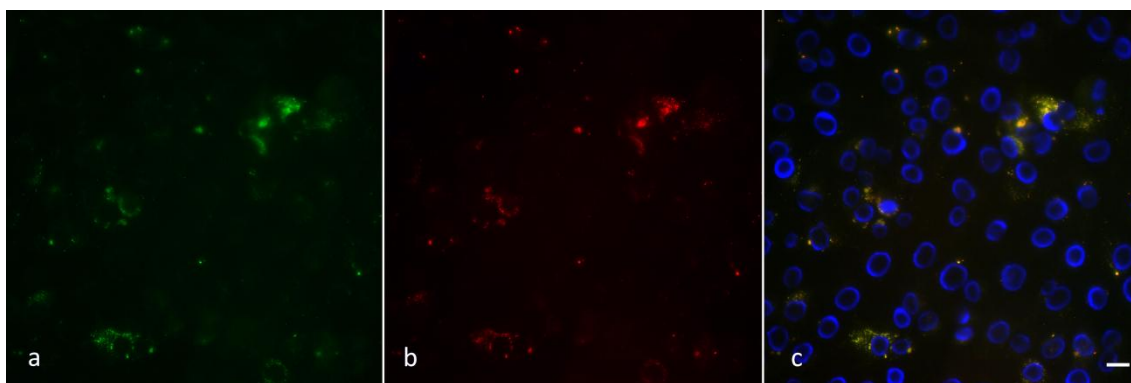
Slika 4: Imunooznačevanje UPIb, UPIIIa, giantina, N-kadherina in E-kadherina v celicah NPU. Celice smo po dosegu konfluentnosti gojili v mediju UroM (+Ca²⁺ -SFBS) še 14 dni, da so se diferencirale. (a, b) Puščice na prečnem prerezu prikazujejo UPIb (a; rdeča) in UPIIIa (b; zelena) v apikalni plazmalemi površinske urotelijske celice. (c) Diferencirane celice NPU ne izražajo N-kadherina (rdeča) na lateralni plazmalemi. (d) Diferencirane celice NPU izražajo E-kadherina (rdeča) na lateralni plazmalemi med diferenciranimi celicami NPU. Modra barva prikazuje jedra celic. Merila: 10 μ m (a, b); 50 μ m (c, d). Območja slik v manjših okvirjih so povečana za 50 % in prikazana v večjih obrobjenih okvirjih.



Slika 5: Imunooznačevanje UPIb, UPIIIa, giantina, E- in N-kadherina v celicah T24. (a) Celice T24 ne izražajo UPIb (rdeča). (b) Celice T24 ne izražajo UPIIIa (zelena). Imunooznačevanje z giantinom (rdeča) je pokazalo, da je GA tesno ob jedru. (c) Celice izražajo N-kadherin (rdeča). (d) Celice T24 ne izražajo E-kadherina (rdeča). Modra barva prikazuje jedra celic. Merila 50 µm. Območja slik v manjših okvirjih so povečana za 50% in prikazana v večjih obrobjenih okvirjih.

4.2. CELICE T24 AVTOFLUORESCIRAJO

Ker smo pri negativni kontroli pri imunooznačevanju pričakovali le modro fluorescenco jeder, poleg te pa smo opazili tudi fluorescenco v zelenem in rdečem delu spektra, smo naredili preparat, pri katerem smo po fiksaciji dodali le sredstvo VectaShield® z barvilom DAPI za barvanje DNA. Ugotovili smo, da celice T24 avtofluorescirajo (Slika 6).

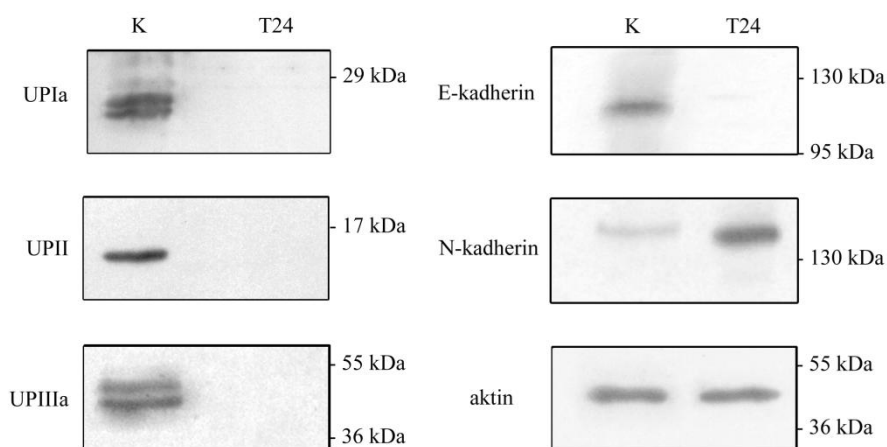


Slika 6: Autofluorescenca celic T24 . Zelen (a) in rdeč (b) kanal sta razkrila neenakomeren signal v bližini jeder nekaterih celic (c; modra). Slika c, na kateri je avtofluorescenca opaziti kot rumeno do oranžno barvo, prikazuje združena kanala slik a in b. Celice nismo transficirali, temveč le fiksirali v 4 % formaldehidu in dodali sredstvo VectaShield® z barvilom DAPI za barvanje DNA (modra). Merilce: 10 μm

4.3. ANALIZA PROTEINOV UPIa, UPIb, UPII, UPIIIa, E-KADHERINA IN N-KADHERINA (PRENOS WESTERN)

Pred izvedbo transfekcije smo želeli preveriti, ali celice T24 izražajo UPIa, UPIb, UPII in UPIIIa ter proteine adherentnih celičnih stikov (E- in N-kadherin), zato smo naredili prenos western. Za kontrolo smo uporabili lizate normalnega mišjega urotelija .

Ugotovili smo, da celice T24 ne izražajo UPIa, UPII ali UPIIIa (Slika 7). Rezultati UPIb so bili tudi pri kontroli negativni, kar pomeni, da so lahko napačni. Endogeno izražanje UPIb v celicah T24 zato ne moremo dokončno ovrednotiti. V nadaljevanju teh rezultatov nismo uporabili. Poleg UP celice T24 ne izražajo E-kadherina, medtem ko je N-kadherin prisoten (Slika 7). Šibka prisotnost N-kadherina v lizatih kontrole je verjetno posledica prisotnosti celic vezivnega tkiva v teh lizatih. Molekulska masa UPIa je 27 kDa, UPII 15 kDa, UPIIIa 47 kDa, E-kadherina 120 kDa, N-kadherina 130 kDa in aktina 43 kDa.



Slika 7: Analiza uroplakinov in proteinov adherentnih celičnih stikov s prenosom western v celicah T24. UPIa, UPII in UPIIIa in izbrana proteina adherentnih celičnih stikov (E- in N-kadherin) smo analizirali v celicah T24. Za kontrolo (K) smo uporabili normalen mišji urotelij (pozitiven N-kadherin je posledica prisotnosti celic vezivnega tkiva v vzorcu). Iz slike je razvidno, da celice T24 ne izražajo UPIa, UPII, UPIIIa ali E-kadherina in imajo močno izražen N-kadherin. Molekulska masa UPIa je 27 kDa, UPII 15 kDa, UPIIIa 47 kDa, E-kadherina 120 kDa, N-kadherina 130 kDa in aktina 43 kDa. Dvojna črta pri kontroli za UPIa in UPIIIa je posledica različne stopnje glikozilacije proteina v celici. Molekulski standardi so navedeni desno.

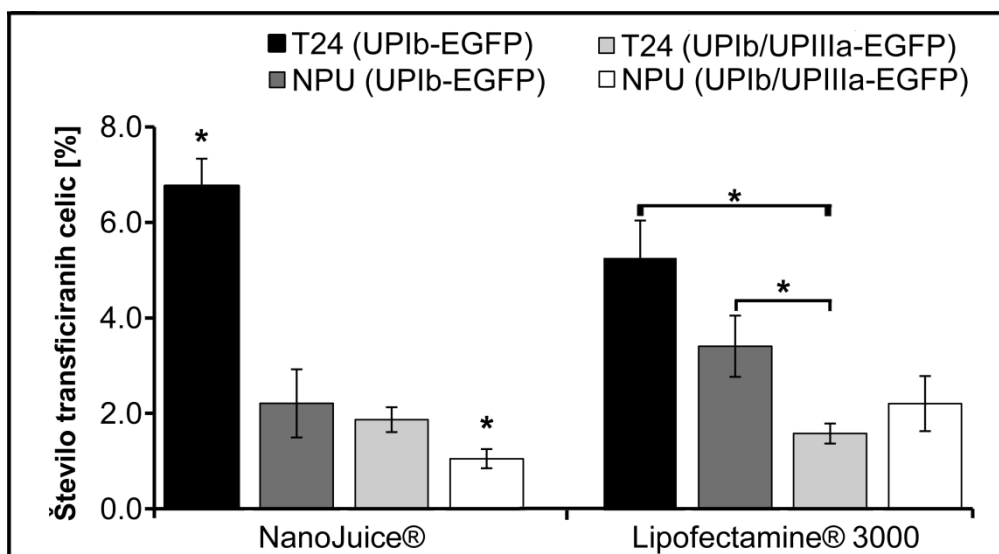
4.4. TRANSFEKCIJA CELIC

4.4.1. Učinkovitost različnih transfekcijskih reagentov

Da bi ugotovili, če je uspešnost transfekcije celic NPU in T24 odvisna od transfekcijskega reagenta, smo primerjali učinkovitost transfekcije z dvema reagentoma: NanoJuice® (NJ) in Lipofectamine® 3000 (LF). Celice NPU ali T24 smo transficirali bodisi le s konstruktom DNA za UPIb-EGFP, bodisi s kombiniranim konstruktom DNA za UPIb/UPIIIa-EGFP. Rezultati niso pokazali statistično značilnih razlik med reagentoma NJ in LF, medtem ko so se pokazale statistično značilne razlike med transfekcijami s posameznimi konstrukti ($p < 0,05$) (Slika 8).

Z reagentom NJ smo najbolj uspešno transficirali celice T24 z DNA za UPIb-EGFP (v nadaljevanju tudi T24 (UPIb-EGFP)) (6 %). Manj uspešni sta bili: transfekcija celic NPU z DNA za UPIb-EGFP (v nadaljevanju tudi NPU (UPIb-EGFP)) (2 %) in transfekcija celic T24 z DNA za UPIb/UPIIIa-EGFP (v nadaljevanju tudi T24 (UPIb/UPIIIa-EGFP)) (2 %). Najmanj uspešna je bila transfekcija celic NPU z DNA za UPIb/UPIIIa-EGFP (v nadaljevanju tudi NPU (UPIb/UPIIIa-EGFP)) (1 %). Primerjava uspešnosti transfekcije celic T24 (UPIb/UPIIIa-EGFP) in celic NPU (UPIb-EGFP) ni pokazala statistično značilnih razlik. Podrobnosti statistične analize so podane v Prilogi A.

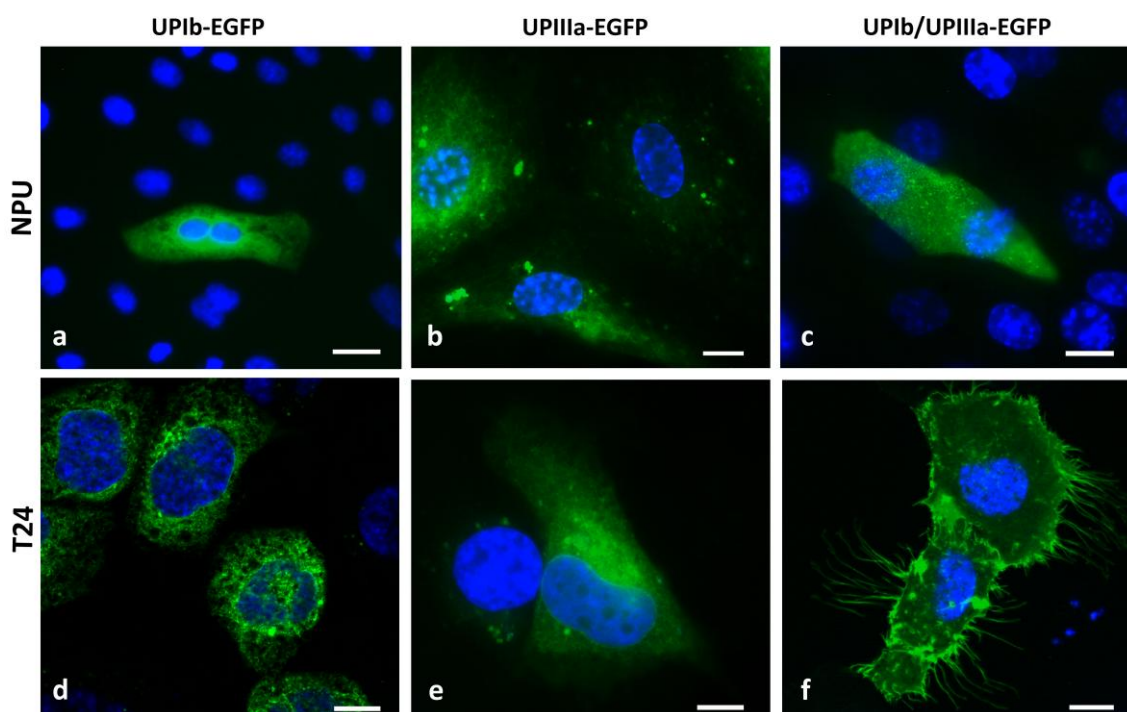
Tudi z reagentom LF je bila najuspešnejša transfekcija celic T24 (UPIb-EGFP) (5 % celic). Transfekcija celic NPU (UPIb-EGFP) je bila 3 % in transfekcija celic T24 (UPIb/UPIIIa-EGFP) ter celic NPU (UPIb/UPIIIa-EGFP) 2 %. Statistična analiza je pokazala statistično značilno več transficiranih celic T24 (UPIb-EGFP) in NPU (UPIb-EGFP) v primerjavi s celicami T24 (UPIb/UPIIIa-EGFP). V nobenem primeru ni bilo statistično značilnih razlik v primerjavi s številom transficiranih celic NPU (UPIb/UPIIIa-EGFP). Podrobnosti statistične analize so podane v Prilogi B.



Slika 8: Uspešnost transfekcije celic T24 in celic NPU s transfekcijskima reagentoma NanoJuice® in Lipofectamine® 3000. Najuspešnejša je bila transfekcija celic T24 z UPIb-EGFP (črna stolpca). Pri transfekciji z NanoJuice® (NJ) je bila statistično značilno učinkovitejša transfekcija celic T24 z UPIb-EGFP v primerjavi s katerokoli od preostalih treh kombinacij. Primerjava števila celic transficiranih s posameznim konstruktom med reagentoma NJ in LF ni pokazala statistično značilnih razlik. * $p < 0,05$

4.4.2. Transportna pot uroplakinov v celicah NPU in T24

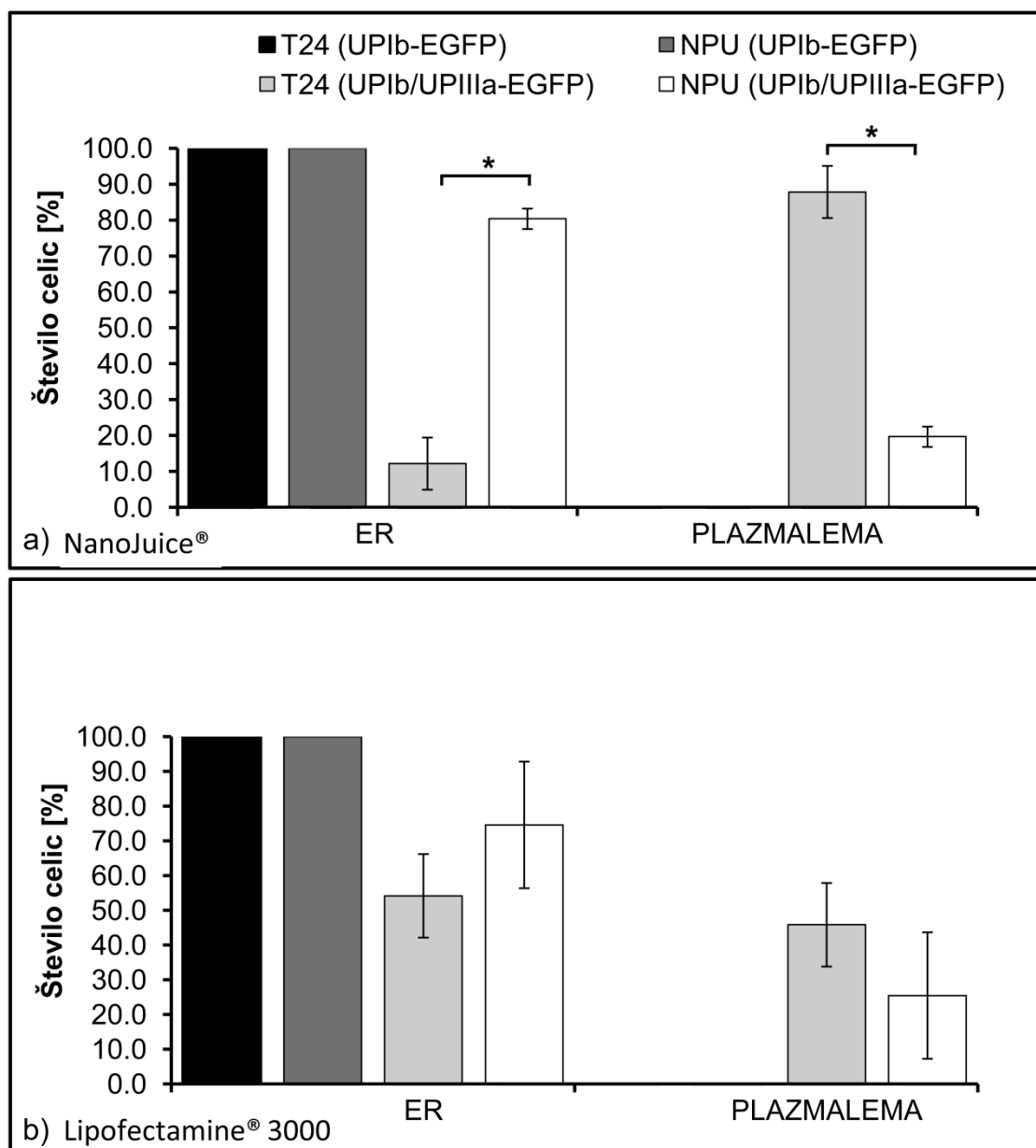
Tako celice NPU kot T24 smo najprej transfcirali le s konstruktom UPIb-EGFP, saj smo želeli potrditi, da UPIb samostojno prehaja iz ER v plazmalemo. Vendar take celice, ki bi imela UPIb-EGFP v plazmalemi, nismo zasledili. Nato smo celice transfcirali še z UPIIIa-EGFP in dokazali, da UPIIIa samostojno ne prehaja v plazmalemo. Šele ko smo celice kotransfcirali s kombinacijo UPIb/UIIIa-EGFP, smo UP dokazali v plazmalemi. V celicah NPU smo opazili UP v plazmalemi 18 ur po transfekciji, v celicah T24 pa že 6 ur po transfekciji (Slika 10c, f).



Slika 9: Lokacija UP v transfciranih celicah NPU in T24. (a, b) Celice NPU izražajo UPIb-EGFP in UPIIIa-EGFP v ER (mrežasto razporejen zeleni signal v celici). (c) Heterodimer UPIb/UIIIa-EGFP celice NPU izražajo v plazmalemi. (d, e) Celice T24 izražajo UPIb-EGFP in UPIIIa-EGFP v ER (mrežasto razporejen zeleni signal v celici). (f) Celici T24 izražata heterodimer UPIb/UIIIa-EGFP v plazmalemi. Modra barva prikazuje jedra celic. Merila: 30 μm (a), 10 μm (b–f).

Pri transfekciji z reagentom NJ (Slika 10a) je imelo 80 % celic NPU (UPIb/UPIIIa-EGFP) UP v ER, 20 % celic pa je imelo UP vidne v plazmalemi (N = 56). Uroplakini so bili v 90 % celic T24 (UPIb/UPIIIa-EGFP) v plazmalemi in v 10 % v ER (N = 138). Če smo celice transficirali z UPIb-EGFP, smo opazili UP le v ER. Statistično značilno več celic T24 (UPIb/UPIIIa-EGFP) je imelo UP v plazmalemi v primerjavi s celicami NPU (UPIb/UPIIIa-EGFP) ($p < 0,05$). Statistično značilno več celic NPU (UPIb/UPIIIa-EGFP) je imelo UP v ER v primerjavi s celicami T24 (UPIb/UPIIIa-EGFP). Podrobnosti statistične analize so podane v Prilogi C.

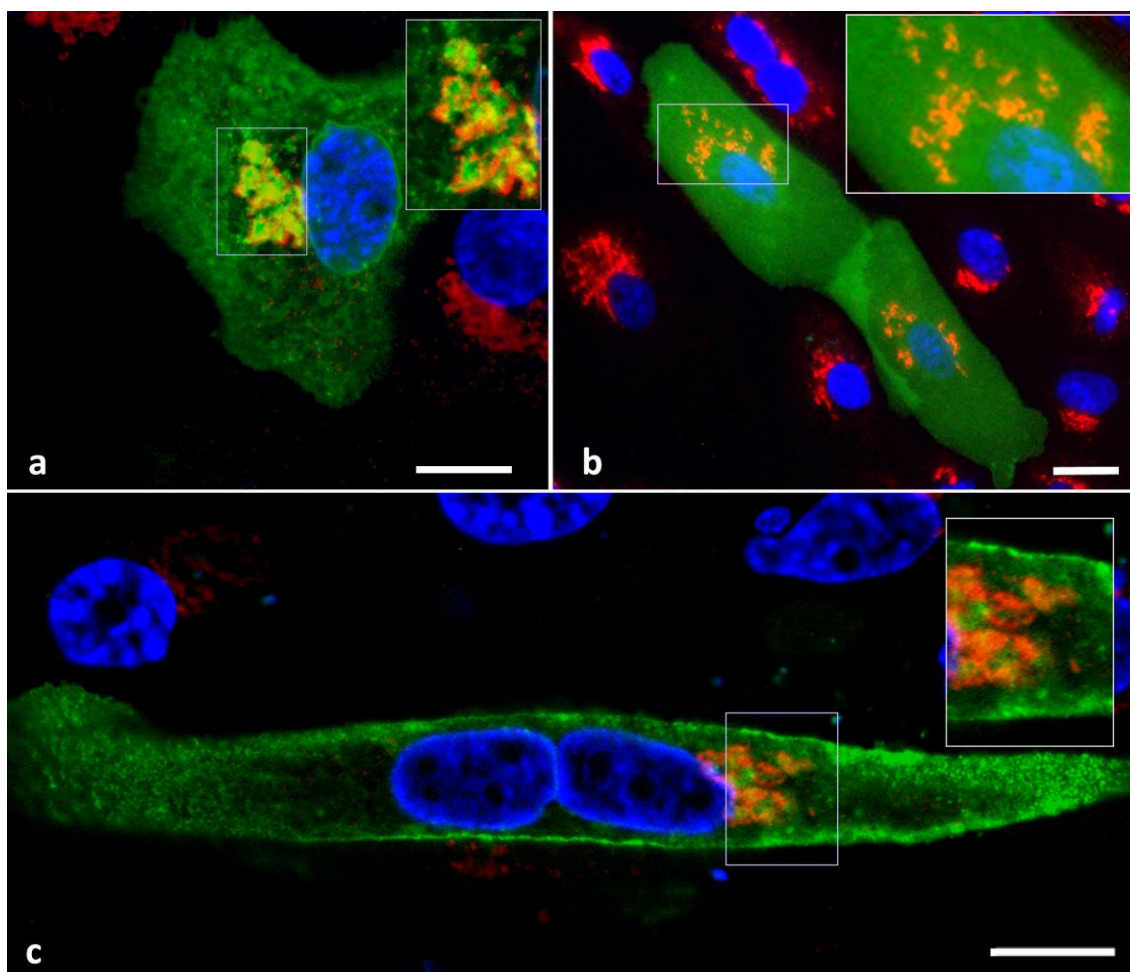
Pri transfekciji z reagentom LF smo našli 59 kotransficiranih celic NPU (UPIb/UPIIIa-EGFP) in opazili UP v ER v 75 % celic in v plazmalemi v 25 % celic. Med 48 pregledanimi kotransficiranimi celicami T24 (UPIb/UPIIIa-EGFP) pa so rezultati pokazali UP v ER v 54 % celic in v plazmalemi v 46 % celic. Med rezultati ni bilo statistično značilne razlike. Podrobnosti statistične analize so podane v Prilogi D.



Slika 10: Lokacija UP v transficiranih celicah NPU in T24 pri transfekciji s transfekcijskim reagentom a) NanoJuice® in b) Lipofectamine® 3000. Če smo celice T24 ali NPU transficirali z UPIb-EGFP smo opazili UP le v ER. (a) Analiza celic transficiranih z reagentom NanoJuice®. Statistično značilno več celic T24 kotransficiranih z UPIb/UPIIIa-EGFP je heterodimer izražalo v plazmalemi v primerjavi s celicami NPU. V celicah NPU je bil heterodimer v ER v več statistično značilnih primerih kot v celicah T24. (b) Analiza celic transficiranih z reagentom Lipofectamine® 3000. Statistična analiza ni pokazala statistično značilnih razlik med številom celic T24 in NPU, ki so izražale UP v ER. Prav tako ni bilo statistično značilnih razlik med številom celic T24 in NPU, ki so izražale UP v plazmalemi. Kljub temu pa lahko tudi na grafu (b) opazimo trend z grafa (a). * $p < 0,05$.

4.4.3. Izražanje uroplakinov v celicah NPU je povezano s fragmentacijo GA

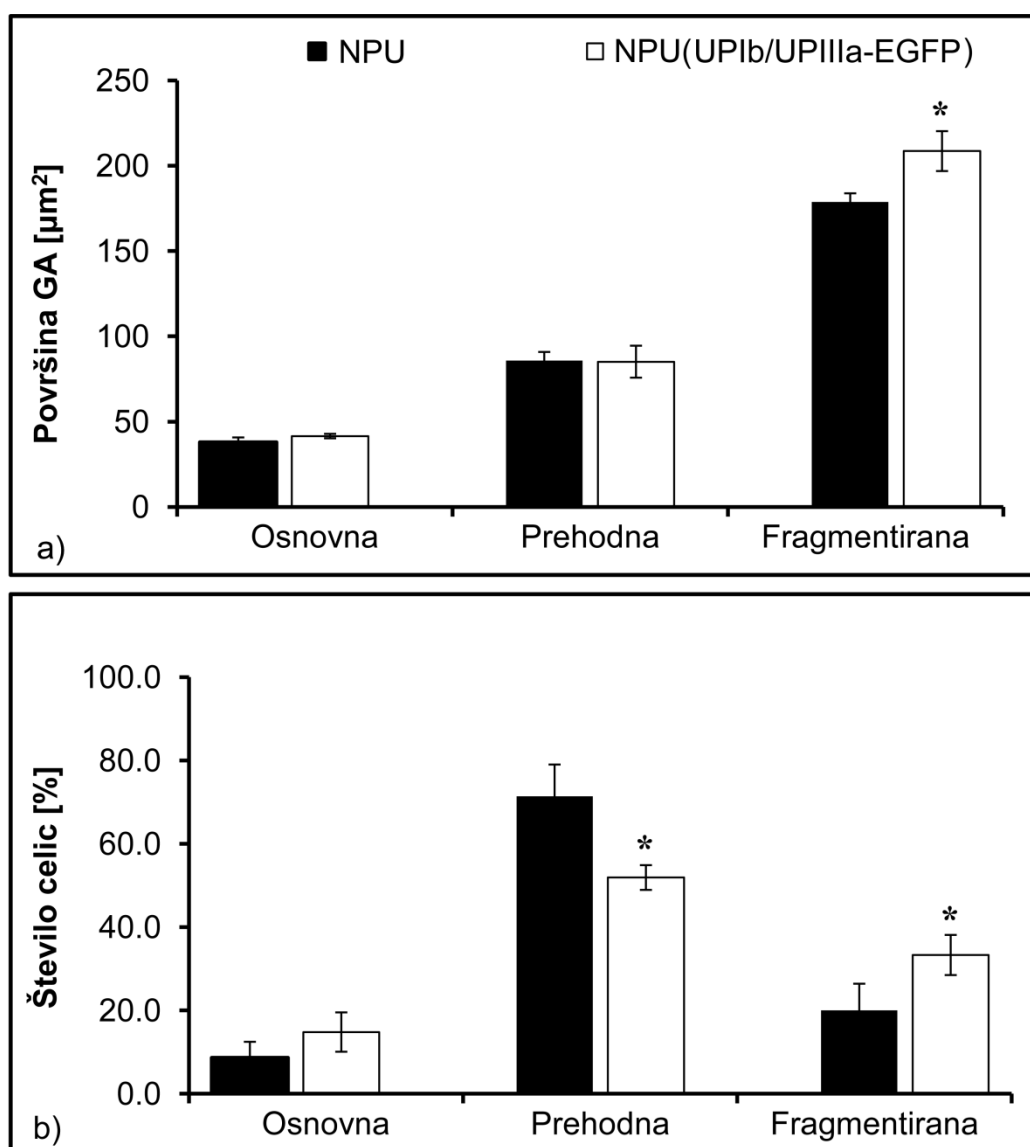
Transficirane celice NPU, ki so izražale UPIb/UPIIIa-EGFP v ER ali GA, so imele GA večinoma blizu jedra in v prehodni obliki (Slika 11a). Nekatere celice NPU, ki so izražale UP v plazmalem, so imele fragmentirani GA (Slika 11b), spet druge pa so izražale UP v plazmalem in so imele GA v prehodni obliki v bližini jedra (Slika 11c).



Slika 11: Transportna pot UPIb/UPIIIa-EGFP v celicah NPU. (a) Uroplakinski heterodimer UPIb/UPIIIa-EGFP (zeleno) je razporejen v ER ter GA. Rumeno do oranžna barva v povečanem okvirju kaže na kolokalizacijo uroplakinov in GA. GA je v prehodni obliki. (b) Uroplakinski heterodimer UPIb/UPIIIa-EGFP (zeleno) v plazmalem, medtem ko mrežastega vzorca, značilnega za ER, ni več opaziti. V GA, ki je v fragmentirani obliki, ni heterodimera (z belo obrobljen in povečan okvir). (c) Celica NPU izraža heterodimer v plazmalem. GA je v prehodni obliki (z belo obrobljen in povečan okvir). Modra barva prikazuje jedra celic. Merila: 10 μm (a, c), 20 μm (b). Območja slik v manjših okvirjih so povečana za 50% (a, c) ter 100% (b) in prikazana v večjih obrobljenih okvirjih.

Povprečna velikost GA v osnovni obliki v celicah NPU, ki smo jih transficirali z UPIb/UPIIIa-EGFP je bila $42 \mu\text{m}^2$. Prehodna oblika GA je merila v povprečju $85 \mu\text{m}^2$ in fragmentirana $206 \mu\text{m}^2$. Povprečna velikost fragmentirane oblike GA je bila v transficiranih celicah NPU statistično značilno večja kot v kontrolnih, netransficiranih celicah, ki smo jih imunooznačili s protitelesom proti UPIIIa (Slika 12a). Podrobnosti statistične analize so podane v Prilogi E.

Celice NPU, ki smo jih transficirali z UPIb/UPIIIa-EGFP so imele GA večinoma v prehodni obliki (52 %). Golgijev aparat v osnovni obliki je imelo 15 % celic in v fragmentirani 33 % celic. Statistično značilno večje število transficiranih celic je imelo GA v fragmentirani obliki v primerjavi s kontrolo (Slika 12b). Podrobnosti statistične analize so podane v Prilogi G.



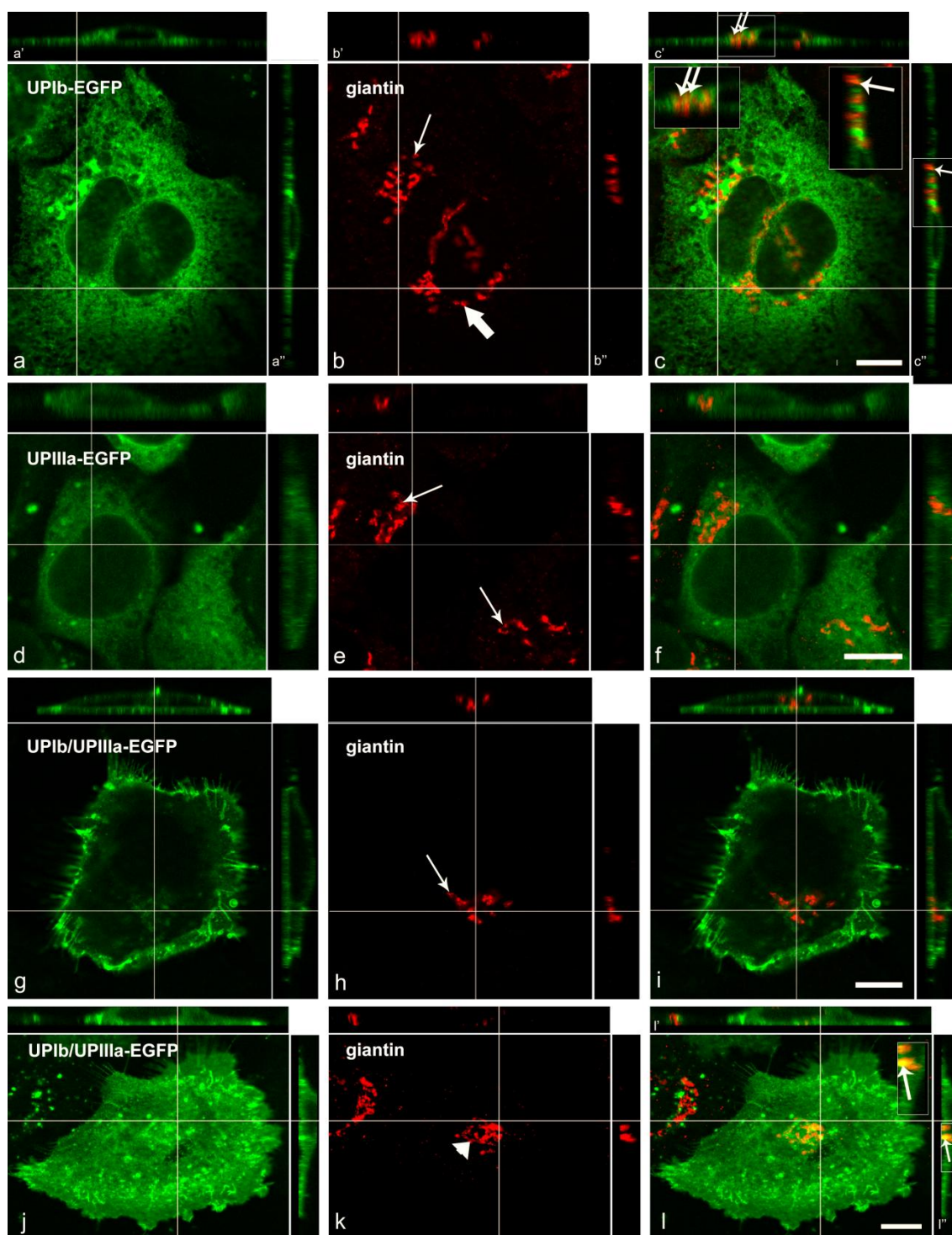
Slika 12: Velikost in oblika GA v celicah NPU. (a) Povprečna površina GA v netransficiranih celicah NPU (imunooznačenih proti UPIIIa) ter celicah NPU (UPIb/UPIIIa-EGFP). Statistično značilno večjo površino fragmentiranega GA so imele transficirane celice NPU. (b) Število transficiranih celic s posamezno obliko GA. Največ netransficiranih in transficiranih celic NPU je imelo GA v prehodni obliki. Vendar je imelo statistično značilno manjše število transficiranih celic GA v prehodni oblik v primerjavi z netransficiranimi celicami NPU. Fragmentirano obliko GA pa je imelo statistično značilno večje število transficiranih celic v primerjavi z netransficiranimi celicami. * $p < 0,05$

4.4.4. Izražanje UP je povezano s spremembo oblike GA v rakavih urotelijskih celicah T24

Izražanje UPIb-EGFP je v celicah T24 sovpadalo s fragmentacijo GA, v plazmalemi pa ga nismo zasledili (Slike 13a–c). UPIb-EGFP smo dokazali v posameznih delih GA (Slika 13c). Celice T24, ki so izražale UPIIIa-EGFP, so imele UPIIIa vedno razporejen v ER (Sliki 13d, f), GA pa je bil večinoma v prehodni obliki (Sliki 13e, f). Celice T24, ki so heterodimer UPIb/UPIIIa-EGFP izražale v plazmalemi, so imele večinoma GA v osnovni obliki (Slike 13j–l) in tudi v prehodni obliki (Slike 13g–i).

Fragmentirani GA smo dokazali v celicah, ki so izražale UPIb-EGFP, UPIIIa-EGFP in UPIb/UPIIIa-EGFP. Netransficirane celice T24 in celice T24 (UPIb/UPIIIa-EGFP) so imele več GA v fragmentirani obliki kot celice T24 (UPIb-EGFP) ali celice T24 (UPIIIa-EGFP). Primerjava oblike GA med transficiranimi celicami T24 pa je pokazala le statistično značilno manj fragmentiranega GA v celicah T24 (UPIIIa-EGFP) (Slika 14b).

Ugotovili smo, da se površine GA med transficiranimi in netransficiranimi celicami statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$) (Slika 14a). Površina osnovne oblike GA je bila v celicah T24, ki so izražale UPIb/UPIIIa-EGFP statistično značilno manjša ($29 \mu\text{m}^2$) od površine GA v celicah, ki so izražale UPIb-EGFP ($36 \mu\text{m}^2$). Prehodna oblika GA je bila v celicah, ki so izražale UPIb/UPIIIa-EGFP, prav tako statistično značilno manjša ($65 \mu\text{m}^2$) v primerjavi z netransficiranimi celicami T24 ($78 \mu\text{m}^2$) ali celicami, ki so izražale UPIb-EGFP ($79 \mu\text{m}^2$). Celice, ki so izražale UPIIIa-EGFP ali UPIb/UPIIIa-EGFP, so imele statistično značilno manjši fragmentirani GA ($151 \mu\text{m}^2$ in $155 \mu\text{m}^2$) v primerjavi s netransficiranimi celicami ($210 \mu\text{m}^2$) ali celicami, ki so izražale UPIb-EGFP ($189 \mu\text{m}^2$). Podrobnosti statistične analize so podane v Prilogi F.

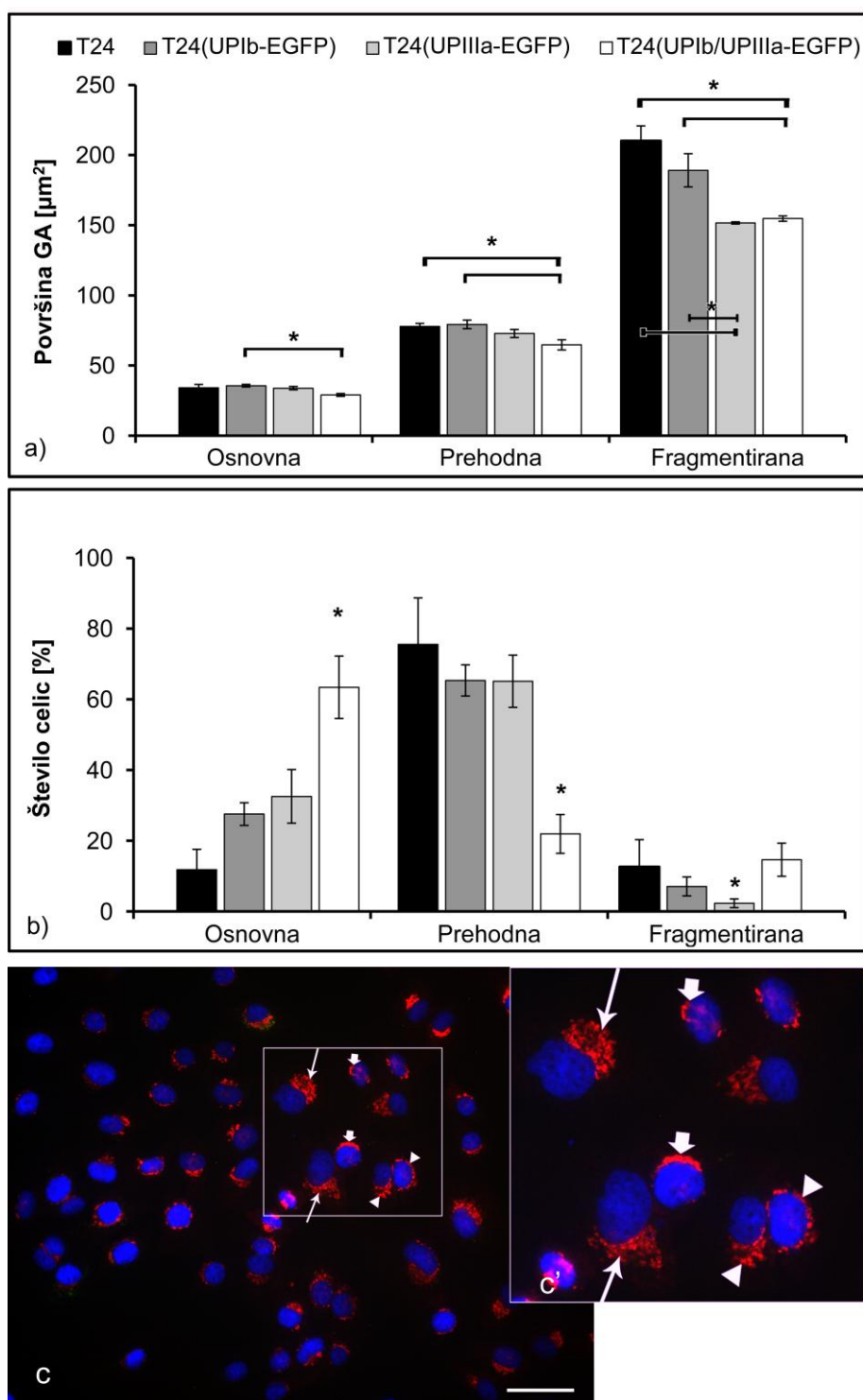


Slika 13: Transportna pot UP in oblika GA v transficiranih celicah T24. Celice T24 smo transficirali z UPIb-EGFP (a–c) ali UPIIIa-EGFP (d–e) ali kotransficirali z UPIb/UPIIIa-EGFP (g–l). Po transfekciji smo celice imunofluorescenčno označili s protitelesi proti giantinu. (a–f) Fluorescenca UPIb-EGFP in UPIIIa-EGFP prihaja iz ER, za kar je značilen mrežast vzorec po celotni celici. (a–c) Celice T24 niso izražale UPIb-EGFP v plazmalemni in so imele GA večinoma v prehodni obliki (b, tanka puščica).

Dokazali pa smo tudi GA v fragmentirani obliki (b, debela puščica). (c) Na optičnih rezinah smo odkrili kolokalizacijo UPIb-EGFP v GA (c' in c'', puščice). (d–f) Celice transficirane z UPIIIa-EGFP so imele GA večinoma v prehodni obliki. (g–i) Celice, ki so izražale UPIb/UIIIa-EGFP v plazmalemi, niso imele fragmentiranega GA. Večina celic je imela GA v osnovni obliki (k, glava puščice), manj pa v prehodni obliki (h, tanka puščica). (j–l) Celica izraža UPIb/UIIIa-EGFP, vendar še ne v celoti v plazmalemi. Na optičnih rezinah smo odkrili kolokalizacijo UPIb/UIIIa-EGFP v GA (l'', puščica). Tanke puščice na slikah b, e in h prikazujejo GA v prehodni obliki. Merila: 10 μ m. Območja slik v manjših okvirjih so povečana za 50% in prikazana v večjih obrobjenih okvirjih.

Osnovni GA smo večinoma našli v kotransficiranih celicah T24 (Slika 14b). Kotransficiranih celic z osnovnim GA je bilo statistično značilno več (63 %) v primerjavi z netransficiranimi celicami (12 %) ali celicami T24, ki so izražale bodisi UPIb-EGFP (26 %) bodisi UPIIIa-EGFP (33 %). Statistična analiza je pokazala statistično značilno več GA v prehodni obliki v netransficiranih celicah (75 %) ter celicah T24 (UPIb-EGFP) (65 %) ali T24 (UPIIIa-EGFP) (65 %) v primerjavi s kotransficiranimi celicami (20 %) (Slika 14b). Fragmentirano obliko GA je imelo največ netransficiranih celic T24 (13 %) in celic T24 (UPIb/UIIIa-EGFP) (15 %), vendar statistična analiza ni pokazala statistično značilne razlike med njimi. Le v primerjavi s celicami T24 (UPIIIa-EGFP) (2 %) je analiza pokazala statistično značilno manj celic s fragmentiranim GA v primerjavi s z netransficiranimi celicami T24 ali celicami, ki so izražale UPIb-EGFP (7 %) oziroma UPIb/UIIIa-EGFP (Slika 14b). Podrobnosti statistične analize so podane v Prilogi H.

Primerjava oblike GA v celicah T24, ki so izražale UPIb-EGFP ali UPIIIa-EGFP, je pokazala, da ima statistično značilno več celic GA v prehodni obliki kot v ostalih dveh oblikah. Celice, ki so izražale UPIb/UIIIa-EGFP, so imele statistično značilno več GA v osnovni obliki kot v prehodni ali fragmentirani. Razen tega analiza ni pokazala statistično značilne razlike med številom prehodnih ali fragmentiranih GA v celicah T24, ki so izražale UPIb/UIIIa-EGFP.

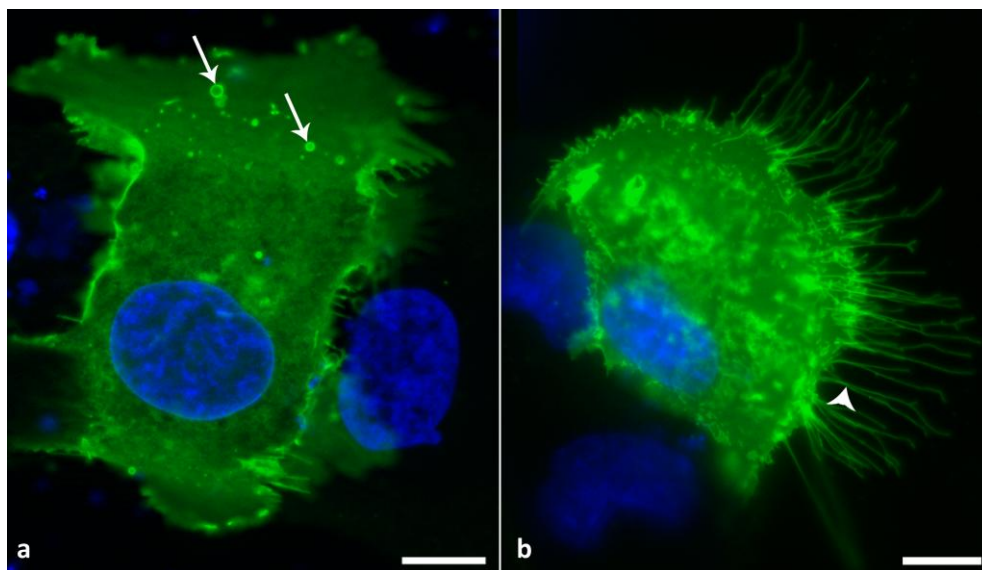


Slika 14: Velikost in oblika GA v celicah T24. (a) Z merjenjem površine GA smo dobili velikostne razrede za določanje oblike GA. Ugotovili smo, da je bila površina osnovnega GA v kotransficiranih celicah manjša od površine osnovnega GA v celicah, ki so izražale UPIb-GFP. Prav tako je bila statistično značilno manjša površina prehodne oblike GA v kotransficiranih celicah v primerjavi z netransficiranimi celicami T24 ali celicami T24 (UPIb-EGFP). Površina fragmentirane oblike GA v

celicah T24 (UPIIIa-EGFP) ali T24(UPIb/UPIIIa-EGFP) je bila statistično značilno manjša od površine fragmentiranega GA v netransficiranih celicah ali celicah T24 (UPIb-EGFP). Statistično značilne razlike med površinami GA v celicah T24 (UPIIIa-EGFP) ali T24 (UPIb/UPIIIa-EGFP) ni bilo. (b) Analiza števila transficiranih celic, ki so imele GA v posamezni obliki je pokazala, da je imelo GA v osnovni obliki največ kotransficiranih celic. Najmanj GA v osnovni obliki pa je bilo v netransficiranih celicah. Statistično značilno najmanj kotransficiranih celic je imelo GA v prehodni obliki. Statistična analiza je pokazala statistično značilno najmanj fragmentiranega GA v celicah T24 (UPIIIa-EGFP). (c) Golgijev aparat v netransficiranih celicah T24. Na sliki (c') so prikazane vse tri oblike GA (rdeče): osnovna (debela puščica), prehodna (glava puščice) in fragmentirana (tanki puščica). Modra barva prikazuje jedra celic. Merilo: 50 μ m. Slika (c') je povečana za 100 %. * $p < 0,05$.

4.4.5. Transfekcija celic T24 z UP ne vpliva na morfologijo celic T24

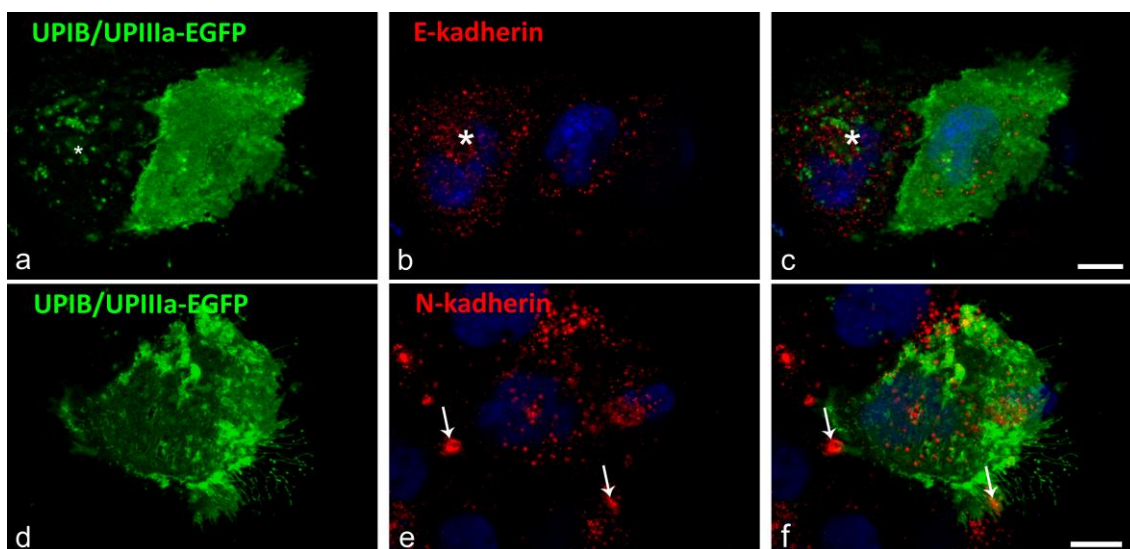
Ker smo želeli ugotoviti, če lahko UP vplivajo na morfologijo celic T24, smo analizirali plazmalemo celic transficiranih z UPIb/UPIIIa-EGFP (Slika 15). Celice T24 so obdržale značilno oblikovano plazmalemo s številnimi nanocevkam-podobnimi izrastki in mikrovezikli.



Slika 15: Celice T24, ki izražata heterodimer UPIb/UPIIIa-EGFP v plazmalemi. (a) Tanki puščici kažeta na dva večja mikrovezikla, ki se odcepljata od plazmaleme celice. (b) UP so prisotni v številnih nanocevkam-podobnih izrastkih v celicah T24 (glava puščice). Modra barva prikazuje jedra celic. Merili: 10 μ m.

4.4.6. Z uroplakini transficirane celice T24 bistveno ne spremenijo izražanja E- in N-kadherina

Z imunooznačevanjem celic T24, transficiranih z UPIb/UPIIIa-EGFP, smo preverili, ali transficirane celice spremenijo izražanje ali lokalizacijo E- in N-kadherina (Slika 16). V plazmalemi transficirane celice T24 smo dokazali le UPIb/UPIIIa-EGFP (Sliki 16a, d). Reakcija imunofluorescence E-kadherina v transficiranih celicah T24 (Slika 16b) je bila podobna tisti v netransficiranih celicah (Slika 5d), kjer smo točkasti signal zaznali neenakomerno razporejen v celicah. Predpostavljamo, da gre za nespecifično vezavo sekundarnega protitelesa, saj so bile negativne vse negativne kontrole. Torej E-kadherina v transficiranih celicah T24 nismo dokazali (Slika 16c). Dokazali pa smo, da N-kadherin po 24 urah v transficiranih celicah ni več izražen kontinuirano v lateralni plazmalemi (Sliki 16e, f) kot na sliki 5, temveč le v posameznih delih plazmaleme.



Slika 16: Imunooznačevanje E- in N-kadherina v celicah T24, transficiranih z UPIb/UPIIIa-EGFP. (a, d) Celica T24 izraža UPIb/UPIIIa-EGFP v plazmalemi. (b) E-kadherin ni izražen, saj glede na podobnost z reakcijo imunofluorescence v netransficiranih celicah T24 in v negativni kontroli predpostavljamo, da gre za nespecifično vezavo. (c) Signala E-kadherina in UPIb/UPIIIa-EGFP se ne prekrivata. (e) N-kadherin v transficirani celici T24 ni izražen na lateralni plazmalemi, ampak le v posameznih delih plazmaleme (puščici). (a-c) * Celica T24, ki ne izraža UPIb/UPIIIa-EGFP v plazmalemi. Modra barva prikazuje jedra celic. Merili: 10 μ m.

5. RAZPRAVA

5.1. TRANSPORTNA POT UROPLAKINOV V CELICAH T24 JE PODOBNA TRANSPORTNI POTI UROPLAKINOV V CELICAH NPU

Z vnosom konstruktov DNA za UPIb-EGFP, UPIIIa-EGFP in kombinacije UPIb/UIIIa-EGFP v celice T24 smo želeli preveriti, ali je transportna pot UP v celicah T24 enaka kot v celicah NPU. Dokazali smo, da heterodimer UPIb/UIIIa-EGFP potuje v plazmalemo celic T24 kot v ledvičnih embrionalnih celicah 293T (Tu in sod., 2002) in celicah NPU (Višnjar, 2013). Skladno z raziskavami (Tu in sod., 2002; Kong in sod., 2004; Hu in sod., 2005) smo potrdili, da UPIIIa-EGFP samostojno ne prehaja iz ER.

Nasprotno velja za UPIb, za katerega je znano, da je edini UP, ki lahko samostojno potuje v plazmalemo (Tu in sod., 2002; Hu in sod., 2005; Višnjar, 2013), vendar smo ga v naši raziskavi dokazali le v GA. Sklepamo, da imajo celice T24 morda mehanizem, ki proteinu UPIb-EGFP preprečuje prehod v plazmalemo, ali pa pride do napak v postranslacijskih modifikacijah proteina in zato samostojno ne prehaja v plazmalemo.

Iz rezultatov kotransfekcije celic T24 lahko sklepamo, da imajo celice T24 enak mehanizem transporta za UP heterodimer UPIb/UIIIa-EGFP kot celice NPU. UPIIIa-EGFP samostojno ne prehaja iz ER kot v celicah NPU, saj imajo endogeno izražen UPIb. Vendar pa transficirane celice T24 genov za UP ne izražajo časovno neomejeno, temveč, glede na naša opazovanja, le približno 7 dni. Predvidevamo, da bi morali za časovno neomejeno izražanje UP v celicah T24 vzpostaviti celično linijo T24 trajno transficirano z UP.

5.2. IZRAŽANJE UP V CELICAH T24 VPLIVA NA OBLIKO GA, VENDAR NE POVZROČI FRAGMENTACIJE, KI BI BILA PRIMERLJIVA S CELICAMI NPU

V celicah T24, ki po kotransfekciji z UPIb/UPIIIa-EGFP izražajo UP v plazmalemi, nismo opazili fragmentacije GA, ki bi bila primerljiva s fragmentacijo GA v celicah NPU, kot jo opisujejo Hudoklin in sod. (2009), Kreft in sod. (2010b) ter Višnjar (2013). V slednjih je fragmentacija GA ob izražaju UP v plazmalemi nampreč zelo očitna. Možnih vzrokov, zakaj v celicah T24 take fragmentacije GA nismo zasledili, je lahko več. (1) Prehod iz GA v plazmalemo se zgodi tako hitro, da ga nismo uspeli ujeti. Posledica tega je, da je GA v času našega opazovanja že povrnjen v prehodno ali osnovno obliko. Osnovna oblika GA je bila tudi najpogostejša v celicah T24, ki so UPIb/UPIIIa-EGFP izražale v plazmalemi. Z uporabo brefeldina A (BFA), ki ustavi transport iz ER v GA (Lippincott-Schwartz in sod., 1989), bi lahko podrobneje proučili spremembe v obliki GA v celicah T24, ki izražajo UP. V našem primeru pa bi s pomočjo BFA in izpostavitvijo celic temperaturi 20 °C poskušali sinhronizirati transport UP iz GA. S temperaturnim blokom in BFA proteine skoncentriramo v trans-strani GA in jim šele s prenosom na 37 °C omogočimo izhod iz trans-strani GA. (2) Prehod uroplakinov v plazmalemo iz ER preko GA poteče brez očitnejše fragmentacije GA. Razlog je morda v manjši velikosti celic T24 v primerjavi s celicami NPU (*podrobnosti v Prilogi I*). (3) Fragmentacija GA je posledica razvojnih oz. regenerativnih procesov normalnih urotelijskih celic (Hudoklin in sod., 2009; Kreft in sod., 2010b; Višnjar in sod., 2012), ki jih v rakavih celicah T24 ni.

Fragmentirana oblika GA, ki smo jo dokazali v transficiranih celicah T24, je bila bistveno manjša kot v transficiranih celicah NPU. Predpostavljamo, da je to posledica velikosti celice, saj so celice NPU statistično značilno večje od celic T24 (Priloga I). Poleg tega bi bil lahko razlog tudi v tem, da imajo celice NPU mehanizme, ki intenzivno usmerjajo transport UP v plazmalemo in posledično fragmentirajo GA (Kreft in sod., 2010b). Potrebne so nadaljnje raziskave GA v celicah T24, ki bodo pripomogle k razumevanju transporta UP v plazmalemo celic T24.

5.3. CELICE T24 PO TRANSFEKCIJI NE IZRAŽAJO E-KADHERINA IN OHRANIJO NESPREMENJENO MORFOLOGIJO

Najprej smo z imunooznačevanjem in prenosom western potrdili, da celice T24 endogeno ne izražajo E-kadherina, izražajo pa N-kadherin. Nato smo želeli z vnosom genov za UP v celice T24 ugotoviti, ali začnejo celice v kratkem času (24 h) po transfekciji z UPIb/UPIIIa-EGFP izražati E-kadherin oziroma ali se jim spremeni morfolologija. Celice T24 so namreč slabo diferencirane (Bubeník in sod., 1973; Mialhe in sod., 2000) in imajo plazmalemo oblikovano v pleomorfne mikrovile (Imani in sod., 2012) in nanocevkke (Lokar in sod., 2012), od plazmaleme pa se pogosto odcepljajo mikrovezikli (Ogorevc in sod., 2013). Zanimalo nas je, ali postanejo rakave celice T24, transficirane z UP, fenotipsko bolj podobne visoko diferenciranim površinskim celicam NPU, ki izražajo E-kadherin in imajo plazmalemo oblikovano v mikrogrebene (Zupančič in sod., 2011b).

Rezultati prenosa western in imunooznačevanja rakavih urotelijskih celic T24 kažejo na močno spremenjene urotelijske celice, ki nimajo epitelijskega fenotipa, saj ne izražajo E-kadherina. Izražanje N-kadherina je značilno za mezenhimski tip celice, kar razloži migratornost in invazivnost celic T24. Ugotovitve so skladne z ugotovitvami Lascombe in sod. (2006) ter Lekka in sod. (2011), ki so s prenosom western prav tako ugotovili, da celice T24 ne izražajo E-kadherina. Lascombe in sod. (2006) so N-kadherin označili celo kot »*novi označevalec za ocenjevanje napredovanja urotelijskih tumorjev*«, vendar pa niso odkrili nobenega tipa tumorja, ki bi povsem izgubil E-kadherin, le izražanje N-kadherina se je močno povečalo. To pripisujejo heterogenosti tumorja oziroma po drugi strani selekciji celic med gojenjem *in vitro*. Ugotavljajo tudi, da je povečano izražanje N-kadherina povezano s povečano invazivnostjo tumorja.

Celice T24 so po 24 urah po transfekciji z UPIb/UPIIIa-EGFP ohranile morfolologijo s pleomorfnimi mikrovili, nanocevkami in mnogimi mikrovezikli, ki so se odcepljali od plazmaleme. Tudi niso izražale E-kadherina, medtem ko so ga celice NPU v tem času že izražale (neobjavljeni rezultati). N-kadherin so celice T24 izražale 24 ur po transfekciji, vendar je bil izražen le v skupkih in le na posameznih delih celic. Alexander in sod. (2006) so dokazali, da je izražanje N-kadherina v celicah PC-3 (rak prostate) najbolj

intenzivno 12 ur po nasaditvi celic. Prav tako smo tekom raziskave ugotovili, da celice T24 izražajo N-kadherin v lateralni plazmalemi takoj naslednji dan po nasaditvi (neobjavljeni rezultati). Iz tega sledi, da bi moral biti N-kadherin po 24 urah izražen v plazmalemi transficirane celice. Naši rezultati so pokazali, da izražanje uroplakinov nima tako hitrega vpliva na morfologijo celic T24 in tudi ne na izražanje E-kadherina. Izražanje N-kadherina je bilo sicer zmanjšano in lokalno omejeno, ampak celotna morfologija celice ni bila spremenjena. Menimo, da je bila sprememba v izražanju N-kadherina premajhna, da bi bistveno vplivala na morfologijo in migratorni potencial celice T24.

Vsekakor so za potrditev vpliva UP na morfologijo celice ter izražanje E- in N-kadherina v celicah T24 potrebne še nadaljnje raziskave. Za raziskovanje vplivov dolgoročnega izražanja uroplakinov na morfologijo celic T24 predlagamo vzpostavitev z UP trajno transficirane celične linije T24.

5.4. ODSOTNOST IZRAŽANJA UROPLAKINOV IN E-KADHERINA V CELICAH T24 JE MORDA POSLEDICA SPREMENB V IZRAŽANJU DEJAVNIKOV TWIST IN FOXA1

Spremembe v izražanju E- in N-kadherina so povezane z normalnim razvojem tkiva, kjer pride do epitelijsko-mezenhimskega prehoda (*angl.: epithelial-mesenchymal transition, EMT*) (Thiery in sod., 2009; Chen in sod., 2012). Nekaj podobnega se dogaja tudi med karcinogenezo, kjer pa so spremembe najverjetneje posledica okvar na ravni transkripcijskih dejavnikov. Na primer, raziskave kažejo, da ima transkripcijski dejavnik TWIST1 pomembno vlogo pri povečanju celične migratornosti (Alexander in sod., 2006; Xue in sod., 2011). V embrionalnem razvoju namreč sodeluje pri razvoju mezoderma tako pri vinski mušici (Thisse in sod., 1987) kot pri miši (O'Rourke in Tam, 2002). Alexander in sod. (2006) so raziskovali izražanje gena za N-kadherin v celični liniji raka prostate PC-3 in ugotovili pozitivno povezavo s transkripcijskim dejavnikom TWIST1. Dokazali so, da TWIST1 uravnava izražanje N-kadherina in posledično tudi migratornost celic. Xue in sod. (2011) so v celicah T24/DN868A z okvarjeno telomerozo odkrili povečano izražanje transkripcijskega dejavnika TWIST, vimetina in N-kadherina, medtem ko je bilo izražanje E-kadherina, citokeratina 18 in citokeratina 19 zmanjšano. Prav tako so Paliwal in sod. (2012) raziskovali vpliv transkripcijskega dejavnika TWIST na izražanje E-kadherina, N-kadherina in citokeratinov v tumorskem tkivu pridobljenim s cistektomijo. Ugotovili so, da je povečano izražanje dejavnika TWIST povzročilo zmanjšanje v izražanju E-kadherina in citokeratinov, vendar povezave z N-kadherinom niso potrdili.

Poleg TWIST1, je pomemben tudi transkripcijski dejavnik FOXA-1, ki v embrionalnem razvoju sodeluje pri diferenciaciji celic (Lupien in sod., 2008). DeGraff in sod. (2012) so vzpostavili celično linijo T24 trajno transficirano s transkripcijskim dejavnikom FOXA1, ki so jo poimenovali T24-FOXA1. S prenosom western so namreč ugotovili, da celice T24 normalno zelo šibko izražajo FOXA1. V celicah T24-FOXA1 so nato dokazali, da povečano izražanje proteina FOXA1 povzroči izražanje E-kadherina Böck in sod. (2014) so ugotovili, da zmanjšano izražanje transkripcijskega dejavnika FOXA1 v celicah normalnega humanega urotelija (NHU) povzroči upad UPIIIa. Predpostavljajo, da je FOXA1 udeležen pri uravnavanju izražanja UP v normalnem

uroteliju. V diferenciranih celicah NPU se uroplakini nahajajo v apikalni plazmalemi, kjer prispevajo k ohranjanju krvno-urinske pregrade. Prav tako celice NPU močno izražajo E-kadherin na lateralni plazmalemi, kar zagotavlja normalno delovanje epitelijskega in ohranja njegovo integriteto (Višnjar in sod., 2012). Ugotovitve DeGraf in sod. (2012) ter Böck in sod. (2014) skupaj kažejo na značilno vlogo transkripcijskega dejavnika FOXA1 pri vzdrževanju epitelijskega oziroma, v našem primeru, urotelijskega tipa celice. FOXA1 je morda v celicah T24 okvarjen in zato slabše izražen. Predpostavljamo, da gre v primeru celic T24 za okvaro v uravnavanju izražanja UP in/ali E-kadherina.

Omenjena transkripcijska dejavnika sta tako lahko ključni tarči za nadaljnje raziskave s celično linijo T24, da bi z njuno manipulacijo bolj natančno ugotovili, kakšen je njun vpliv na izražanje UP in/ali kadherinov in če se da maligni fenotip celic T24 zavreti ali ustaviti.

5.5. AVTOFLUORESCENCA CELIC T24

Pri preverjanju uspešnosti transfekcije in pri imunooznačevanju smo v nekaterih celicah T24 opazili številne vezikle. Sklepali smo, da gre za avtofluorescenco. Potrdili smo jo s fiksacijo netransficiranih celic T24, kjer smo odkrili rumen signal v veziklih v nekaterih celicah. V celicah najdemo molekule, ki fluorescirajo. Med drugimi so to koencimi dihalne verige v mitohondrijih in lipopigmenti (lipofuscin) (Andersson in sod., 1998; Croce in sod., 1999). Avtofluorescenca lipopigmentov je tudi metabolno in starostno pogojena – bolj kot je celica metabolno aktivna oziroma starejša kot je, več bo imela pigmenta (Croce in sod., 1999).

Avtofluorescenca celic pa se lahko uporablja tudi v diagnostične namene, na primer pri odkrivanju rakavih sprememb. Na podlagi razlike v intenziteti avtofluorescence zdravih in rakavih celic odkrivajo rak debelega črevesa (DaCosta in sod., 2005) ter rak dojk (Palmer in sod., 2003).

Prisotnost številnih avtofluorescirajočih veziklov v celicah T24 potrjuje, da so celice metabolno zelo aktivne. To lastnost bi lahko uporabili v raziskavah metabolne aktivnosti celic T24 v namene diagnostike prehodnoceličnega karcinoma. Poleg tega menimo, da bi lahko bila avtofluorescenca celic T24 moteča v nadaljnjih raziskavah, saj ima večina protiteles, ki se uporabljajo za imunooznačevanje, rdeč ali zelen signal. Predlagamo uporabo sredstva, ki utiša fluorescenco lipofuscina, na primer sudan črno (Oliveira in sod., 2010).

6. SKLEPI

- 1) Rakave urotelijske celice T24 ne izražajo E-kadherina in uroplakinov, kar smo potrdili s prenosom western in imunooznačevanjem. Dokazali smo, da celice T24 endogeno ne izražajo UPIa, UPII, UPIIIa ter E-kadherina, izražajo pa N-kadherin. Z imooznačevanjem smo potrdili rezultate prenosa western in dokazali, da celice T24 tudi ne izražajo UPIb.
- 2) Transportna pot uroplakinov v celicah T24 je podobna transportni poti uroplakinov v celicah NPU, kar smo pokazali z vnosom konstruktov DNA za UPIb-EGFP, UPIIIa-EGFP in UPIb/UIIIa-EGFP v celice T24. Dokazali smo, da UPIIIa-EGFP samostojno ne prehaja iz ER. Protein UPIb-EGFP smo dokazali v ER in v GA, ne pa tudi v plazmalemi. Morda imajo celice T24 mehanizem, ki proteinu UPIb-EGFP preprečuje prehod v plazmalemo. Potrdili smo tudi, da heterodimer UPIb/UIIIa-EGFP potuje v plazmalemo celic T24 kot v celicah NPU.
- 3) Transfekcija celic T24 z UPIb/UIIIa-EGFP po vsej verjetnosti povzroči fragmentacijo GA, vendar ta morfološko ni primerljiva s fragmentacijo GA v celicah NPU. V transficiranih celicah T24 je bila namreč površina fragmentiranega GA, bistveno manjša kot v transficiranih celicah NPU.
- 4) Celice T24 po transfekciji ne izražajo E-kadherina in ohranijo nespremenjeno morfologijo. Z vnosom genov za UP v celice T24 smo pokazali, da 24-urno izražanje uroplakinov nima vpliva na morfologijo celic T24 in tudi ne na izražanje E-kadherina. Menimo, da bi bilo za raziskovanje vplivov dolgoročnega izražanja uroplakinov na morfologijo celic T24 potrebno vzpostaviti z UP trajno transficirano celično linijo T24.
- 5) Dokazali smo, da celice T24 avtofluorescirajo kar nakazuje visoko metabolno aktivnosti teh celic. Avtofluorescenco celic T24 bi lahko uporabili v raziskavah metabolne aktivnosti celic v namene diagnostike prehodnoceličnega karcinoma.

7. POVZETEK

Urotelij je epitelijsko tkivo, ki pokriva dele urinarnega trakta od ledvične kotanje, sečevodov, sečnega mehurja do proksimalne sečnice in žlezni vodov prostate. Urotelij zagotavlja pregrado, ki preprečuje izmenjavo snovi med urinom in krvjo, in v predelu mehurja omogoča zadrževanje urina. Vzrok za nastanek rakavih sprememb v urotelijskem tkivu so spremembe v DNA, ki so lahko posledica eksogenih (derivati nikotina, aromatski amini, kronične infekcije) ali endogenih dejavnikov (spremembe v nukleotidnem zaporedju DNA).

Uroplakini so glavni označevalci diferenciranosti urotelijskih celic in zato je moč sklepati, da bo njihovo izražanje spremenjeno v primeru karcinogeneze. Prisotnost E-kadherina v celici je pomemben signal za diferenciacijo epitelijske celice, saj sproži organizacijo območja lateralne plazmaleme, kjer se oblikujejo adherentne in tesne celične povezave. E-kadherin sodeluje tudi pri vzpostavitvi apiko-bazalne polarizacije celice. Analize urotelijskih tumorjev različnih stopenj in celičnih linij kažejo na spremenjeno izražanje E-kadherina in povišano izražanje N-kadherina. Zato slednjega imenujejo tudi »novi tumorski označevalec«. Med diferenciacijo urotelijskih celic in v odvisnosti od fiziološkega stanja celice, se spreminja oblika Golgijevega aparata (GA). V sesalskih celicah se GA poveča, kadar je stopnja transporta preko GA povišana in se zmanjša, kadar je tovora iz ER manj.

Namen našega dela je bil transficirati celice T24, ki izvirajo iz visoko malignega prehodnoceličnega karcinoma urotelija, s konstruktoma DNA za proteina UPIb in UPIIIa. Celično linijo T24 smo izbrali zato, ker endogeno ne izraža UP. Odseki z zapisom za UP naj bi bili v DNA teh celic hipermetilirani in se zato ne prepisujejo. V normalnih urotelijskih celicah (NPU) sta proteina endogeno izražena in tvorita urotelijske plake v apikalni plazmalemi skupaj s še drugimi UP. Uroplakin Ib lahko endoplazemski retikulum (ER) zapusti samostojno, UPIIIa pa se mora za izstop iz ER povezati z UPIb v heterodimer. V naših poskusih nas je zanimalo, ali celice T24 kljub neizražanju UP lahko izrazijo UP heterodimer v plazmalemi in kaj se zgodi, če se izrazi samo en UP iz para. Ker so UP specifični označevalci urotelijskih celic, smo želeli ugotoviti tudi, če izražanje UP v celicah T24 povzroči spremembe v izražanju proteinov adherentnih medceličnih povezav ali spremembe v plazmalemi. Z vnosom genov za

UPIb-EGFP in UPIIIa-EGFP ali kombinacije obeh v celice T24 smo dokazali, da je transportna pot heterodimera UPIb/UIIIa-EGFP v celicah T24 po vsej verjetnosti enaka kot v celicah NPU. Prav tako smo pokazali, da UPIIIa-EGFP samostojno ne pripouje v plazmalemo. Za UPIb-EGFP je znano, da samostojno prehaja iz ER in GA v plazmalemo in zato smo ga pričakovali v plazmalemi celic T24, vendar tega nismo dokazali. Sklepamo, da je v celicah T24 prisoten mehanizem, ki protein zadrži v GA.

Ugotovili smo, da imajo celice transficirane z UPIb/UIIIa-EGFP najbolj fragmentirani GA v primerjavi s celicami T24 (UPIb-EGFP) ali celicami T24 (UPIIIa-EGFP). To je v skladu z ugotovitvami, da je fragmentacija GA ključna za transport UP v apikalno plazmalemo celic NPU. Vendar pa je površina fragmentiranega GA v celicah T24, ki izražajo UPIb/UIIIa-EGFP, bistveno manjša kot v transficiranih celicah NPU. Razlog za to je morda v majhnosti celic T24 v primerjavi s celicami NPU, ki so večje. Poleg tega je prehod iz GA v plazmalemo morda tako hiter, da ga nismo uspeli ujeti v celoti ali pa poteče brez očitnejše fragmentacije GA. Možni vzrok je lahko tudi, da je fragmentacija GA posledica razvojnih oz. regenerativnih procesov normalnih urotelijskih celic, ki jih v celicah T24 ni. Za nadaljnje raziskave predlagamo uporabo brefeldina A, ki ustavi transport iz ER in GA in omogoča ujeti proteine v GA.

Sprememb v plazmalemi ali adherentnih stikih v transficiranih celicah T24 nismo opazili, kljub izražanju UP. Predpostavljamo, da je 24 ur izražanja UP v našem primeru časovno prekratko, da bi povzročilo spremembe v morfologiji celice. Vzpostavitev celične linije T24 trajno transficirane z UP bi pripomogla k razumevanju sprememb v transportni poti UP. Prav tako bi omogočila raziskave vpliva izražanja UP na celice T24. Ker je transport iz GA ključen za izpostavitvev UP v plazmalemo celic NPU, menimo, da so potrebne tudi nadaljnje raziskave GA v celicah T24, ki bodo pripomogle k razumevanju transporta UP v plazmalemo celic T24.

8. VIRI

- Alexander N. R., Tran N. L., Rekapally H., Summers C. E., Glackin C., Heimark R. L. 2006. N-cadherin gene expression in prostate carcinoma is modulated by integrin-dependent nuclear translocation of Twist1. *Cancer Research*, 66, 7: 3365–3369
- Andersson H., Baechi T., Hoechl M., Richter C. 1998. Autofluorescence of living cells. *Journal of Microscopy*, 191, 1: 1–7
- Batavia J. Van, Yamany T., Molotkov A., Dan H., Mansukhani M., Batourina E., Schneider K., Oyon D., Dunlop M., Wu X.-R., Cordon-Cardo C., Mendelsohn C. 2014. Bladder cancers arise from distinct urothelial sub-populations. *Nature Cell Biology*, 16, 10: 982–991
- Böck M., Hinley J., Schmitt C., Wahlicht T., Kramer S., Southgate J. 2014. Identification of ELF3 as an early transcriptional regulator of human urothelium. *Developmental Biology*, 386, 2: 321–330
- Bryan R. T., Atherfold P. A., Yeo Y., Jones L. J., Harrison R. F., Wallace D. M. A., Jankowski J. A. 2008. Cadherin switching dictates the biology of transitional cell carcinoma of the bladder: ex vivo and in vitro studies. *Journal of Pathology*, 215: 184–194
- Bryan R. T., Tselepis C. 2010. Cadherin switching and bladder cancer. *Journal of Urology*, 184, 2: 423–431
- Bubeník J., Baresová, M., Viklický, V., Jakoubková, J., Sainerová, H., Donner, J. 1973. Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen. *International Journal of Cancer*, 11, 3: 765 – 773
- Chen J., Han Q., Pei D. 2012. EMT and MET as paradigms for cell fate switching. *Journal of Molecular Cell Biology*, 4, 2: 66–69
- Chen Y., Guo X., Deng F.-M., Liang F.-X., Sun W., Ren M., Izumi T., Sabatini D. D., Sun T.-T., Kreibich G. 2003. Rab27b is associated with fusiform vesicles and may be involved in targeting uroplakins to urothelial apical membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 24: 14012–14017
- Cowled P., Kanter I., Leonardos L., Jackson P. 2005. Uroplakin Ib Gene Transcription in Urothelial Tumor Cells Is Regulated by CpG Methylation. *Neoplasia*, 7, 12: 1091–1103
- Croce A. C., Spano A., Locatelli D., Barni S., Sciola L., Bottiroli G. 1999. Dependence of fibroblast autofluorescence properties on normal and transformed conditions. Role of the metabolic activity. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 69, 3: 364–374
- DaCosta R. S., Andersson H., Cirocco M., Marcon N. E., Wilson B. C. 2005. Autofluorescence characterisation of isolated whole crypts and primary cultured

human epithelial cells from normal, hyperplastic, and adenomatous colonic mucosa. *Journal of Clinical Pathology*, 58, 7: 766–774

DeGraff D. J., Clark P. E., Cates J. M., Yamashita H., Robinson V. L., Yu X., Smolkin M. E., Chang S. S., Cookson M. S., Herrick M. K., Shariat S. F., Steinberg G. D., Frierson H. F., Wu X. R., Theodorescu D., Matusik R. J. 2012. Loss of the urothelial differentiation marker FOXA1 is associated with high grade, late stage bladder cancer and increased tumor proliferation. *PLOS ONE*, 7, 5: e36669, doi: 10.1371/journal.pone.0036669: 13 str.

Deng F.-M., Liang F.-X., Tu L., Resing K. A., Hu P., Supino M., Hu C.-C. A., Zhou G., Ding M., Kreibich G., Sun T.-T. 2002. Uroplakin IIIb, a urothelial differentiation marker, dimerizes with uroplakin Ib as an early step of urothelial plaque assembly. *The Journal of Cell Biology*, 159, 4: 685–694

Desalle R., Chicote J. U., Sun T.-T., Garcia-España A. 2014. Generation of divergent uroplakin tetraspanins and their partners during vertebrate evolution: identification of novel uroplakins. *BMC Evolutionary Biology*, 14, 13, doi: 10.1186/1471-2148-14-13

Epstein J. I. 2010. Diagnosis and classification of flat, papillary, and invasive urothelial carcinoma: the WHO/ISUP consensus. *International Journal of Surgical Pathology*, 18, 3: 106S–111S

Finch J. L., Miller J., Aspinall J. O., Cowled P. A. 1999. Cloning of the human uroplakin 1B cDNA and analysis of its expression in urothelial-tumor cell lines and bladder-carcinoma tissue. *International Journal of Cancer*, 80, 4: 533–538

Fossum M., Lundberg F., Holmberg K., Schoumans J., Kratz G., Nordenskjöld A. 2005. Long-term culture of human urothelial cells--a qualitative analysis. *Cells Tissues Organs*, 181, 1: 11–22

Furuse M., Hirase T., Itoh M., Nagafuchi A., Yonemura S., Tsukita S. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *The Journal of Cell Biology*, 123, 6: 1777–1788

Furuse M., Fujita K., Hiiragi T., Fujimoto K., Tsukita S. 1998. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *The Journal of Cell Biology*, 141, 7: 1539–1550

Gaisa N. T., Braunschweig T., Reimer N., Bornemann J., Eltze E., Siegert S., Toma M., Villa L., Hartmann A., Knuechel R. 2011. Different immunohistochemical and ultrastructural phenotypes of squamous differentiation in bladder cancer. *Virchows Archiv*, 458, 3: 301–312

Hicks R. M. 1965. The Fine Structure of the Transitional Epithelium of Rat Urether. *The Journal of Cell Biology*, 26: 25–48

- Hu C.-C. A., Liang F.-X., Zhou G., Tu L., Tang C.-H. A., Zhou J., Kreibich G., Sun T.-T. 2005. Assembly of urothelial plaques: tetraspanin function in membrane protein trafficking. *Molecular Biology of the Cell*, 16, 9: 3937–3950
- Hu P., Deng F. M., Liang F. X., Hu C. M., Auerbach A., Shapiro E., Wu X. R., Kachar B., Sun T. T. 2000. Ablation of uroplakin III gene results in small urothelial plaques, urothelial leakage, and vesicoureteral reflux. *Urology*, 151, 5: 961–971
- Huang H.-Y., Shariat S. F., Sun T.-T., Al. E. 2007. Persistent Uroplakin Expression in Advanced Urothelial Carcinomas: Implications in Urothelial Tumor Progression and Clinical Outcome. *Human Pathology*, 38, 11: 1703–1713
- Hudoklin S., Zupancic D., Romih R. 2009. Maturation of the Golgi apparatus in urothelial cells. *Cell and Tissue Research*, 336, 3: 453–463
- Hudoklin S., Jezernik K., Neumüller J., Pavelka M., Romih R. 2011. Urothelial plaque formation in post-Golgi compartments. *PLOS ONE*, 6, 8: e23636, doi: 10.1371/journal.pone.0023636: 9 str.
- Hudoklin S., Jezernik K., Neumüller J., Pavelka M., Romih R. 2012. Electron tomography of fusiform vesicles and their organization in urothelial cells. *PLOS ONE*, 7, 3: e32935, DOI: 10.1371/journal.pone.0032935: 8 str.
- Imani R., Kabaso D., Erdani Kreft M., Gongadze E., Penič S., Eleršič K., Kos A., Veranič P., Zorec R., Igljč A. 2012. Morphological alterations of T24 cells on flat and nanotubular TiO₂ surfaces. *Croatian Medical Journal*, 53, 6: 577–585
- Jerman U. D., Kolenc M., Steyer A., Veranič P., Prijatelj M. P., Kreft M. E. 2014. A novel strain of porcine adenovirus detected in urinary bladder urothelial cell culture. *Viruses*, 6, 6: 2505–2518
- Karp G. 2010. *Cell Biology*, 6. izdaja. New York, Wiley, 765 str.
- Khandelwal P., Abraham S. N., Apodaca G. 2009. Cell biology and physiology of the uroepithelium. *American Journal of Physiol - Renal Physiology*, 297: F1477–F1501
- Koga F., Kawakami S., Fujii Y., Saito K., Ohtsuka Y., Iwai A., Ando N., Takizawa T., Kageyama Y., Kazunori K. 2003. Impaired p63 Expression Associates with Poor Prognosis and Uroplakin III Expression in Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder Impaired p63 Expression Associates with Poor Prognosis and Uroplakin III Expression in Invasive Urothelial Carcinoma of the. *Clinical Cancer Research*, 9: 5501–5507
- Kong X.-T., Deng F.-M., Hu P., Liang F.-X., Zhou G., Auerbach A. B., Genieser N., Nelson P. K., Robbins E. S., Shapiro E., Kachar B., Sun T.-T. 2004. Roles of uroplakins in plaque formation, umbrella cell enlargement, and urinary tract diseases. *The Journal of Cell Biology*, 167, 6: 1195–1204

- Kreft M. E., Romih R., Sterle M. 2002. Antigenic and ultrastructural markers associated with urothelial cytodifferentiation in primary explant outgrowths of mouse bladder. *Cell Biology International*, 26, 1: 63–74
- Kreft M. E., Sterle M., Veranic P., Jezernik K. 2005a. Urothelial injuries and the early wound healing response: tight junctions and urothelial cytodifferentiation. *Histochemistry and Cell Biology*, 123, 4-5: 529–539
- Kreft M. E., Hudoklin S., Sterle M. 2005b. Establishment and characterization of primary and subsequent subcultures of normal mouse urothelial cells. *Folia Biologica*, 51, 5: 126–132
- Kreft M. E., Sterle M., Jezernik K. 2006. Distribution of junction- and differentiation-related proteins in urothelial cells at the leading edge of primary explant outgrowths. *Histochemistry and Cell Biology*, 125, 5: 475–485
- Kreft M. E., Jezernik K., Kreft M., Romih R. 2009. Apical plasma membrane traffic in superficial cells of bladder urothelium. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1152: 18–29
- Kreft M. E., Giandomenico D., Beznoussenko G. V., Resnik N., Mironov A., Jezernik K. 2010a. Golgi apparatus fragmentation as a mechanism responsible for uniform delivery of uroplakins to the apical plasma membrane of uroepithelial cells. *Biology of the Cell*, 102, 11: 593–607
- Kreft M. E., Hudoklin S., Jezernik K., Romih R. 2010b. Formation and maintenance of blood-urine barrier in urothelium. *Protoplasma*, 246, 1-4: 3–14
- Kreft M. E., Robenek H. 2012. Freeze-fracture replica immunolabelling reveals urothelial plaques in cultured urothelial cells. *PLOS ONE*, 7, 6: e38509, doi: 10.1371/journal.pone.0038509: 8 str.
- Kreft M. E., Višnjar T. 2013. Golgijev aparat: zgradba, funkcija in bolezni - Golgi Apparatus: Organization, Function and Diseases. *Medicinski razgledi*, 53: 3–15
- Lascombe I., Clairotte A., Fauconnet S., Bernardini S., Wallerand H., Kantelip B., Bittard H. 2006. N-cadherin as a novel prognostic marker of progression in superficial urothelial tumors. *Clinical Cancer Research*, 12, 9: 2780–2787
- Lekka M., Gil D., Dąbroś W., Jaczewska J., Kulik A. J., Lekki J., Stachura Z., Stachura J., Laidler P. 2011. Characterization of N-cadherin unbinding properties in non-malignant (HCV29) and malignant (T24) bladder cells. *Journal of Molecular Recognition*, 24, 5: 833–842
- Lippincott-Schwartz J., Yuan L. C., Bonifacino J. S., Richard D. K. 1989. Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: Evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell*, 56, 5: 801–813

- Lokar M., Kabaso D., Resnik N., Sepčič K., Kralj-Iglič V., Veranič P., Zorec R., Iglič A. 2012. The role of cholesterol-sphingomyelin membrane nanodomains in the stability of intercellular membrane nanotubes. *International Journal of Nanomedicine*, 7: 1891–1902
- Ludwikowski B., Zhang Y. Y., Frey P. 1999. The long-term culture of porcine urothelial cells and induction of urothelial stratification. *BJU International*, 84, 4: 507–514
- Lupien M., Eeckhoutte J., Meyer C. A., Wang Q., Li W., Carroll J. S., Liu X. S., Brown M. 2008. FoxA1 translates epigenetic signatures into enhancer driven lineage-specific transcription. *Cell*, 132, 6: 958–970
- Matsumoto K., Satoh T., Irie A., Ishii J., Kuwao S., Iwamura M., Baba S. 2008. Loss expression of uroplakin III is associated with clinicopathologic features of aggressive bladder cancer. *Urology*, 72, 2: 444–9
- Mcconkey D. J., Lee S., Choi W., Tran M., Majewski T., Siefker-Radtke A., Dinney C., Czerniak B. 2010. Molecular genetics of bladder cancer: Emerging mechanisms of tumor initiation and progression. *Urologic Oncology*, 28, 4: 429–440
- Mialhe A., Levacher G., Champelovier P., Martel V., Serres M., Knudsen K., Seigneurin D. 2000. Expression of E-, P-, n-cadherins and catenins in human bladder carcinoma cell lines. *Journal of Urology*, 164: 826–835
- Mitic L. L., Anderson J. M. 1998. Molecular architecture of tight junctions. *Annual Review of Physiology*, 60: 121–42
- Morita K., Furuse M., Fujimoto K., Tsukita S. 1999. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 511–516
- Ogawa K., John M. St., Oliveira M. L. De, Arnold L., Shirai T., Sun T.-T., Cohen S. M. 1999. Comparison of Uroplakin Expression During Urothelial Carcinogenesis Induced by N-Butyl-N-(4-Hydroxybutyl)Nitrosamine in Rats and Mice. *Toxicologic Pathology*, 27, 6: 645–651
- Ogorevc E., Kralj-Iglic V., Veranic P. 2013. The role of extracellular vesicles in phenotypic cancer transformation. *Radiology and Oncology*, 47, 3: 197–205
- Oliveira S. S., Morgado-Díaz J. A. 2007. Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 1: 17–28
- Oliveira V. C., Saggioro F. P., Carlotti C. G., Covas D. T., Neder L. 2010. Sudan Black B treatment reduces autofluorescence and improves resolution of in situ hybridization specific fluorescent signals of brain sections. *Histology and Histopathology*, 25: 1017–1024

- O'Rourke M. P., Tam P. P. L. 2002. Twist functions in mouse development. *International Journal of Developmental Biology*, 46: 401–413
- Ovčak Z. 2005. Klasifikacija urotelnih tumorjev sečnega mehurja WHO / ISUP. *Zdravstveni Vestnik*, 74: 529–533
- Palmer G., Keely P., Breslin T., Ramanujam N. 2003. Autofluorescence spectroscopy of normal and malignant human breast cell lines. *Photochemistry and Photobiology*, 78, 5: 462–469
- Protheroe A. S., Banks R. E., Mzimba M., Porter W. H., Southgate J., Singh P. N., Bosomworth M., Harnden P., Smith P. H., Whelan P., Selby P. J. 1999. Urinary concentrations of the soluble adhesion molecule E-cadherin and total protein in patients with bladder cancer. *British Journal of Cancer*, 80, 1/2: 273–278
- Reznikoff C. A., Johnson M. D., Norback D. H., Bryan G. T. 1983. Growth and Characterization of Normal Human Urothelium In Vitro. *In Vitro*, 19, 4: 326–343
- Rigby C. C., Franks L. M. 1970. A human tissue culture cell line from a transitional cell tumour of the urinary bladder: growth, chromosome pattern and ultrastructure. *British Journal of Cancer*, 24, 4: 746–754
- Rodriguez-Boulan E., Nelson W. J. 1989. Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science*, 245, 4919: 718–725
- Southgate J., Hutton K. A. R., Thomas D. F. M., Trejdosiewicz L. K. 1994. Normal Human Urothelial Cells In vitro: Proliferation and Induction of Stratification. *Laboratory Investigation*, 71, 4: 583–594
- Southgate J., Masters J. R. W., Trejdosiewicz L. K. 2002. Culture Of Human Urothelium V: Culture of Epithelial Cells. 2. Edition. Freshney I. R., Freshney M. G. (eds.). Wilmington, Wiley-Liss Inc., 381 - 399
- Thiery J. P., Acloque H., Huang R. Y. J., Nieto M. A. 2009. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*, 139, 5: 871–890
- Thisse B., El Messal M., Perrin-Schmitt F. 1987. The twist gene: isolation of a Drosophila zygotic gene necessary for the establishment of dorso-ventral pattern. *Nucleic Acids Research*, 15, 8: 3439–3453
- Trucco A., Polishchuk R. S., Martella O., Pentima A. Di, Fusella A., Giandomenico D. Di, San Pietro E., Beznoussenko G. V, Polishchuk E. V, Baldassarre M., Buccione R., Geerts W. J. C., Koster A. J., Burger K. N. J., Mironov A. a, Luini A. 2004. Secretory traffic triggers the formation of tubular continuities across Golgi sub-compartments. *Nature Cell Biology*, 6, 11: 1071–1081
- Truschel S. T., Ruiz W. G., Shulman T., Pilewski J., Sun T., Zeidel M. L., Apodaca G. 1999. Primary Uroepithelial Cultures. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 21: 15020–15029

- Tu L., Sun T.-T., Kreibich G. 2002. Specific heterodimer formation is a prerequisite for uroplakins to exit from the endoplasmic reticulum. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 12: 4221–4230
- Varga A. E., Leonardos L., Jackson P., Marreiros A., Cowled P. a 2004. Methylation of a CpG island within the uroplakin Ib promoter: a possible mechanism for loss of uroplakin Ib expression in bladder carcinoma. *Neoplasia*, 6, 2: 128–135
- Višnjar T., Kocbek P., Kreft M. E. 2012. Hyperplasia as a mechanism for rapid resealing urothelial injuries and maintaining high transepithelial resistance. *Histochemistry and Cell Biology*, 137, 2: 177–186
- Višnjar T., Kreft M. E. 2013. Air-liquid and liquid-liquid interfaces influence the formation of the urothelial permeability barrier in vitro. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 49, 3: 196–204
- Višnjar T. 2013. Model nastajanja krvno-urinske pregrade. Doktorska Disertacija. Ljubljana, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice: 134
- World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Eble J. N., Epstein J. I., Sesterhenn I. A. (eds.) 2004. Lyon, IARC Press: 89–127
- Wu X. R., Lin J. H., Walz T., Haner M., Yu J., Aebi U., Sun T.-T. 1994. Mammalian Uroplakins. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 18: 13716–13724
- Zadnik V., Primic Žakelj M. SLORA: Slovenija in rak. Epidemiologija in register raka. Onkološki inštitut Ljubljana. www.slora.si (14.1.2015)
- Zupančič D., Ovčak Z., Vidmar G., Romih R. 2011a. Altered expression of UPIa, UPIb, UPII, and UPIIIa during urothelial carcinogenesis induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in rats. *Virchows Archiv*, 458, 5: 603–613
- Zupančič D., Zakrajšek M., Zhou G., Romih R. 2011b. Expression and localization of four uroplakins in urothelial preneoplastic lesions. *Histochemistry and Cell Biology*, 136, 4: 491–500

ZAHVALA

Najlepše bi se rada zahvalila mentorici prof. dr. Mateji Kreft za priložnost, neizmerno potrpežljivost in vse napotke in predloge tekom izdelave magistrske naloge. Kljub izjemno polnemu urniku si vedno našla čas zame in za to sem zelo hvaležna!

Najlepša hvala tudi članoma komisije prof. dr. Roku Kostanjšku za konstruktivno kritiko in nasvete ob recenziji naloge ter predsednici doc. dr. Nadi Žnidaršič za prijaznost.

Posebna zahvala gre asist. dr. Tanji Višnjar, asist. dr. Nataši Resnik in asist. Urški Dragin Jerman, ki so me, vsaka po malo in na svoj način, uvedle v laboratorijsko delo. Hvala za vse razkrite, majhne in večje laboratorijske trike, kavice, kosila, nasvete in neverjetno energijo! Hvala tudi asist. dr. Mateju Skočaju za izolacijo DNA, brez tega sploh ne bi šlo. Super ste!

Hvala tudi ostalim zaposlenim na Inštitutu: prof. dr. Petru Veraniču, izr. prof. dr. Roku Romihu, doc. dr. Andreji Erman, doc. dr. Daši Zupančič, asist. dr. Samu Hudoklinu, Sabini Železnik, Sanji Čebraja, Nadi Pavlica, Lindi Štrus in Marini Jeriha, ki so mi s pozitivno energijo in lepo besedo vedno priskočili na pomoč.

Anja, draga prijateljica, hvala za spontanost in vzpodbudo. Delo v celičnem laboratoriju je bilo s teboj res zabavno! Draga Petra, hvala tudi tebi za podporo in razumevanje!

Nenazadnje, moj dragi Miša, iz srca hvala za potrpežljivost, vse telefonske pogovore in zaupanje! Hvala tudi sestri, babici in staršema, ki še naprej verjamjo vame!

PRILOGE

Priloga A: Uspešnost transfekcije celic s transfekcijskim reagentom NanoJuice®. Legenda: Konstrukt DNA transficiran v celice (DNA); uspešnost transfekcije celic izražena v odstotkih (Uspešnost) glede na število vseh pregledanih celic (N); standardni odklon (SD) in standardna napaka (SE) ocene uspešnosti transfekcije.

Celice	DNA	Uspešnost [%]	SD	SE	N
T24	UPIb-EGFP	6,8	0,8	0,8	1835
	UPIb/UPIIIa-EGFP	2,1	0,6	0,2	6727
NPU	UPIb-EGFP	2,2	2,4	0,7	815
	UPIb/UPIIIa-EGFP	1,1	0,4	0,2	5325

Priloga B: Uspešnost transfekcije celic s transfekcijskim reagentom Lipofectamine® 3000. Legenda: Konstrukt DNA transficiran v celice (DNA); uspešnost transfekcije celic izražena v odstotkih (Uspešnost) glede na število vseh pregledanih celic (N); standardni odklon (SD) in standardna napaka (SE) ocene uspešnosti transfekcije.

Celice	DNA	Uspešnost [%]	SD	SE	N
T24	UPIb-EGFP	5,3	1,1	0,8	951
	UPIb/UPIIIa-EGFP	1,6	0,4	0,2	3041
NPU	UPIb-EGFP	3,4	1,8	0,6	323
	UPIb/UPIIIa-EGFP	2,2	0,8	0,6	2676

Priloga C: Lokacija UP v celicah transficiranih s transfekcijskim reagentom NanoJuice®. Legenda: Konstrukt DNA transficiran v celice (DNA); število transficiranih celic, ki so imele izražene UP v endoplazemskem retikulumu (ER) ali v plazmalemi (PL), izraženo v odstotkih glede na število vseh pregledanih celic (N); standardni odklon (SD) in standardna napaka (SE) ocenjenega števila transficiranih celic.

Celice	DNA	Lokacija	Število celic [%]	SD	SE	N
T24	UPIb-EGFP	ER	100	N/A	N/A	124
		PL	0	N/A	N/A	
	UPIb/UPIIIa-EGFP	ER	10,1	19,7	7,4	138
		PL	89,9	16,7	7,4	
NPU	UPIb-EGFP	ER	100	N/A	N/A	18
		PL	0	N/A	N/A	
	UPIb/UPIIIa-EGFP	ER	80,4	5,7	2,8	56
		PL	19,6	5,7	2,8	

Priloga D: Lokacija UP v celicah transficiranih s transfekcijskim reagentom Lipofectamine® 3000. Legenda: Konstrukt DNA transficiran v celice (DNA); število transficiranih celic, ki so imele izražene UP v endoplazemskem retikulumu (ER) ali v plazmalemi (PL), izraženo v odstotkih glede na število vseh pregledanih celic (N); standardni odklon (SD) in standardna napaka (SE) ocenjenega števila transficiranih celic.

Celice	DNA	Lokacija	Število celic [%]	SD	SE	N
T24	UPIb-EGFP	ER	100	N/A	N/A	50
		PL	0	N/A	N/A	
	UPIb/UPIIIa-EGFP	ER	54,2	24,1	12,0	48
		PL	45,8	24,1	12,0	
NPU	UPIb-EGFP	ER	100	N/A	N/A	11
		PL	0	N/A	N/A	
	UPIb/UPIIIa-EGFP	ER	74,6	25,8	18,2	59
		PL	25,4	25,8	18,2	

Priloga E: Površina Golgijevega aparata (GA) v netransficiranih in transficiranih celicah NPU. Legenda: Konstrukt DNA transficiran v celice (DNA); osnovni GA (O); prehodni GA (P); fragmentirani GA (F); aritmetična sredina (M); število pregledanih transficiranih celic (N); standardni odklon (SD) in standardna napaka (SE) ocene aritmetične sredine.

DNA	Oblika GA	M [μm^2]	SD	SE	N
Netransficirane celice	O	37,9	4,9	2,8	35
	P	85,8	25,3	5,1	
	F	172,2	20,5	7,8	
UPIb/UPIIIa-EGFP	O	41,5	2,7	1,3	31
	P	85,1	35,1	9,4	
	F	202,3	35,1	11,7	

Priloga F: Površina Golgijevega aparata (GA) netransficiranih in transficiranih celicah T24. Legenda: Konstrukt DNA transficiran v celice (DNA); osnovni GA (O); prehodni GA (P); fragmentirani GA (F); aritmetična sredina (M); število pregledanih transficiranih celic (N); standardni odklon (SD) in standardna napaka (SE) ocene aritmetične sredine.

DNA	Oblika GA	M [μm^2]	SD	SE	N
Netransficirane celice	O	34,1	9,9	2,4	133
	P	77,8	22,1	2,2	
	F	210,2	42,2	10,5	
UPIb-EGFP	O	35,6	5,7	0,9	127
	P	79,3	28,1	3,1	
	F	189,1	35,6	11,9	
UPIIIa-EGFP	O	33,9	7,3	1,2	86
	P	72,8	21,4	2,9	
	F	150,8	1,1	0,8	
UPIb/UIIIa-EGFP	O	29,0	9,9	1,8	41
	P	64,7	10,8	3,6	
	F	154,7	5,4	1,9	

Priloga G: Število netransficiranih in transficiranih celic NPU s posamezno obliko GA. Legenda: Konstrukt DNA transficiran v celice (DNA); osnovni GA (O); prehodni GA (P); fragmentirani GA (F); število celic, ki so imele GA v osnovni (O), prehodni (P) ali fragmentirani (F) obliki, izraženo v odstotkih glede na število vseh pregledanih celic (N); standardni odklon (SD) in standardna napaka (SE) ocene aritmetične sredine.

DNA	Oblika GA	Število celic [%]	SD	SE	N
Netransficirane celice	O	8,6	8,7	3,9	35
	P	71,4	17,1	7,6	
	F	20,0	14,3	6,4	
UPIb/UPIIIa-EGFP	O	12,9	9,4	4,7	31
	P	45,2	5,9	2,9	
	F	41,9	9,6	4,8	

Priloga H: Število netransficiranih in transficiranih celic T24 s posamezno obliko GA. Legenda: Konstrukt DNA transficiran v celice (DNA); osnovni GA (O); prehodni GA (P); fragmentirani GA (F); število celic, ki so imele GA v osnovni (O), prehodni (P) ali fragmentirani (F) obliki, izraženo v odstotkih glede na število vseh pregledanih celic (N); standardni odklon (SD) in standardna napaka (SE) ocene aritmetične sredine.

DNA	Oblika GA	Število celic [%]	SD	SE	N
Netransficirane celice	O	11,9	14,0	5,7	133
	P	75,6	32,1	13,1	
	F	12,6	18,9	7,7	
UPIb-EGFP	O	27,6	9,6	3,2	127
	P	65,3	13,2	4,4	
	F	7,1	8,1	2,7	
UPIIIa-EGFP	O	32,6	25,1	7,6	86
	P	65,1	24,5	7,4	
	F	2,3	4,1	1,2	
UPIb/UIIIa-EGFP	O	63,0	18,7	8,3	41
	P	19,6	13,2	5,9	
	F	14,6	11,6	5,2	

Priloga I: Povprečna velikost netransficiranih celic T24, ki so izražale N-kadherin in netransficiranih celic NPU, ki so izražale E-kadherin. Legenda: aritmetična sredina (M); število pregledanih celic (N); standardni odklon (SD) in standardna napaka (SE) ocene aritmetične sredine.

Celice	M [μm^2]	SD	SE	N
T24	538,6	173,3	31,7	30
NPU	936,7	217,5	39,7	30