

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Larisa TRATNJEK

**ODVISNOST ENDOCITOTSKE AKTIVNOSTI UROTELIJSKIH
CELIC OD NJIHOVE DIFERENCIACIJSKE STOPNJE IN
MIKROTUBULOV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ENDOCYTOTIC ACTIVITY IN UROTHELIAL CELLS:
DEPENDANCE ON DIFFERENTIATION STAGE AND
MICROTUBULES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključno delo Univerzitetnega študija biologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Inštitutu za biologijo celice Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Matejo Erdani Kreft z Inštituta za biologijo celice.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Jasna ŠTRUS
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Boris BULOG
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Datum zagovora: 29.9.2009

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Larisa Tratnjek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	612.014 : 612.62 (043.2) = 163.6
KG	sečni mehur/urotelij/uoplakini/mikrotubuli/diferenciacija/endocitoza
AV	TRATNJEK, Larisa
SA	ERDANI KREFT, MATEJA (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2009
IN	ODVISNOST ENDOCITOTSKE AKTIVNOSTI UROTELIJSKIH CELIC OD NJIHOVE DIFERENCIACIJSKE STOPNJE IN MIKROTUBULOV
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIII, 77 str., 4 pregl., 27 sl., 6 pril., 65 vir.
IJ	sl
JI	sl/en

AI Med diferenciacijo urotelijskih celic sečnega mehurja se sestava apikalne plazmaleme izrazito spremeni. V diplomski nalogi smo ugotavljali odvisnost endocitotske aktivnosti urotelijskih celic od diferenciacijske stopnje. Preučevali smo urotelijske celice z različnim izražanjem uoplakinov in ugotovili, da je endocitotska aktivnost celic z več uoplakini nižja od celic z manj uoplakini. Urotelijske celice smo gojili v treh različnih hranilnih medijih in ugotovili, da imajo celice gojene v hranilnem mediju UroM (+Ca²⁺-S) najnižjo endocitozo. Primerjava endocitotske aktivnosti med urotelijskimi celicami in celicami MDCK je pokazala, da je ta v urotelijskih celicah 3 do 14 krat manjša kot v celicah MDCK. Med diferenciacijo urotelijskih celic pride tudi do preurejanja citoskeletnih elementov. S preslikavo po Westernu smo ugotovili manj α -tubulina v tistih urotelijskih celicah, ki so bile bolj diferencirane. Endocitotsko aktivnost urotelijskih celic v povezavi s prisotnostjo mikrotubulov, smo ugotavljali z nokodazolom, ki prepreči polimerizacijo mikrotubulov. Ugotovili smo, da depolimerizacija mikrotubulov v urotelijskih celicah in celicah MDCK onemogoči transcitozo WGA-FITC ter tako zmanjša prepustnost teh celic za WGA-FITC. Z raziskavo smo dokazali, da fiziološka razgradnja mikrotubulov v diferenciranih celicah in prisotnost uoplakinov v apikalni plazmalemi zmanjšajo endocitotsko aktivnost urotelijskih celic.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 612.014 : 612.62 (043.2) = 163.6
CX bladder/urothelium/uoplakins/microtubules/differentiation/endocytosis
AU TRATNJEK, Larisa
AA ERDANI KREFT, MATEJA (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology
PY 2009
TI ENDOCYTOTIC ACTIVITY IN UROTHELIAL CELLS: THE DEPENDANCE
ON THEIR DIFFERENTIATION STAGE AND MICROTUBULES
DT Graduation thesis (University studies)
NO XIII,77 p., 4 tab., 27 fig., 6 ann., 65 ref.
LA sl
AL sl/en

AB The composition of the apical plasma membrane is dramatically modified during differentiation of bladder urothelial cells. The purpose of our work was to determine the dependence of endocytotic activity on the differentiation stage of urothelial cells. We examined urothelial cells with different levels of uroplakin expression. Urothelial cells with more uroplakins showed lower endocytotic activity than cells with less uroplakins. Urothelial cells were cultivated in three different UroM mediums. Cells grown in UroM (+Ca²⁺-S) showed the lowest endocytotic activity. Comparison of urothelial and MDCK cells shows that urothelial cells are 3-14 times less endocytotically active than MDCK cells. During differentiation of the urothelial cells a specific rearrangement of cytoskeleton also occurs. Western blot showed that differentiated cells have less α -tubulin than partially differentiated cells. To elucidate the dependance of endocytotic activity on microtubules, we treated cells with nocodazole, a microtubule disrupting agent. Microtubule depolymerization blocks the transcytosis of WGA-FITC and establishes lower WGA-FITC permeability of urothelial cells. Our study proves that physiologic microtubule depolymerization and uroplakin presence in apical plasma membrane in differentiated urothelial cells both affect the endocytosis down-regulation.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK.....	IX
KAZALO PREGLEDNIC.....	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
KAZALO PRILOG	XIII
1. UVOD.....	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA.....	1
1.2 CILJI DIPLOMSKEGA DELA.....	1
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 SEČNI MEHUR SESALCEV <i>IN VIVO</i>	3
2.1.1 Zgradba urotelija in diferenciacija urotelijskih celic.....	3
2.1.2 Prepustnost urotelija.....	6
2.2 CITOSKELET.....	6
2.2.1 Mikrotubuli.....	7
2.2.2 Aktinski filamenti	8
2.3 ENDOCITOZA	8
2.3.1 Endocitoza v epitelijskih celicah.....	9
2.3.1.1. Endocitoza v površinskih urotelijskih celicah	9
2.3.1.2. Endocitoza v celicah MDCK.....	10
2.3.2 Vpliv agensov, ki depolimerizirajo mikrotubule na endocitotsko aktivnost epitelijskih celic.....	11
2.3.3 Vpliv aktinskih filamentov na endocitotsko aktivnost epitelijskih celic	13
2.4 MEDCELIČNI STIKI.....	13
2.5 UROTELIJ <i>IN VITRO</i>	14
2.5.1 Celične kulture.....	14
2.5.2 Primarne in sekundarne celične kulture	15
2.5.3 Trajne celične linije	16
2.5.4 Hranilni medij.....	16
3 MATERIALI IN METODE.....	18
3.1 PRAŠIČJE UROTELIJSKE CELICE.....	18

3.1.1	Primarne kulture prašičjih urotelijskih celic	18
3.1.2	Nasaditev celic.....	18
3.1.3	Hranilni medij.....	18
3.1.4	Sekundarne kulture prašičjih urotelijskih celic	20
3.1.5	Določanje viabilnosti, presajanje celic.....	20
3.1.6	Sajenje celic na porozne membrane, prekatna stekelca	21
3.2	TRAJNA CELIČNA LINIJA MDCK.....	22
3.3	TRETIRANJE CELIC Z NOKODAZOLOM	23
3.3.1	Določanje ustrezne koncentracije in časa inkubacije z nokodazolom	23
3.4	IMUNOFLUORESCENCA – α-TUBULINA.....	24
3.4.1	Označevanje kromatina s fluorescentnim barvilom DAPI	24
3.5	UGOTAVLJANJE ENDOCITOTSKE AKTIVNOSTI	25
3.5.1	Določanje ustreznega časa inkubacije z WGA-FITC	25
3.5.2	Ugotavljanje endocitotske aktivnosti netretiranih in z nokodazolom tretiranih urotelijskih celic.....	25
3.5.2.1.	Prašičje urotelijske celice.....	25
3.5.2.2	Trajna celična linija MDCK.....	27
3.5.3	Kvantitativna analiza endocitotske aktivnosti.....	28
3.5.3.1.	Prašičje urotelijske celice.....	28
3.5.3.2.	Trajna celična linija MDCK.....	28
3.6	MERJENJE PREPUSTNOSTI S FLUORIMETROM.....	29
3.7	IMUNOFLUORESCENČNO OZNAČEVANJE UROPLAKINOV PO INKUBACIJI CELIC Z WGA-FITC	29
3.7.1	Kvantitativna analiza endocitotske aktivnosti urotelijskih celic glede na diferenciacijsko stopnjo.....	30
3.8	PRESLIKAVA PO WESTERNU ZA MIKROTUBULE	30
3.9	IMUNOFLUORESCENCA - AKTINA.....	31
3.9.1	Kvantitativna analiza prisotnosti aktina v apikalni citoplazmi celic	32
3.10	IMUNOFLUORESCENČNO OZNAČEVANJE PROTEINOV MEDCELIČNIH STIKOV	32
3.10.1	Imunofluorescenca– okludina in klavdina-8	33
3.10.2	Imunofluorescenca– γ-katena.....	33
3.10.3	Imunofluorescenca– dezmozoplakina	33
3.11	SHEMATSKI PRIKAZ VSEH POSKUSOV	35
4	REZULTATI.....	36
4.1	TRETIRANJE PRAŠIČJIH UROTELIJSKIH CELIC Z NOKODAZOLOM	36
4.1.1	Nokodazol preprečuje polimerizacijo mikrotubulov	36

4.1.2	Nokodazol ne poškoduje medceličnih stikov	36
4.2	INKUBACIJA CELIC Z WGA-FITC	39
4.2.1	Čas inkubacije vpliva na prehajanje WGA-FITC v urotelijske celice.....	39
4.2.2	WGA-FITC ne poškoduje tesnih stikov	39
4.3	ENDOCITOTSKA AKTIVNOST UROTELIJSKIH CELIC GLEDE NA NJIHOVO DIFERENCIACIJSKO STOPNJO	44
4.3.1	Endocitotska aktivnost prašičjih urotelijskih celic po 2 urni inkubaciji z WGA-FITC	44
4.3.2	Endocitotska aktivnost prašičjih urotelijskih celic po 24 urah inkubacije z WGA-FITC.....	45
4.4	ODVISNOST ENDOCITOTSKA AKTIVNOSTI UROTELIJSKIH CELIC IN CELIC MDCK OD ELEMENTOV CITOSKELETA	49
4.4.1	Depolimerizacija mikrotubulov vpliva na razporeditev veziklov z WGA-FITC v urotelijskih celicah in celicah MDCK.....	49
	4.4.1.1 Število in razporeditev veziklov z WGA-FITC po 2 urni inkubaciji	49
	4.4.1.2 Število in razporeditev veziklov z WGA-FITC po 24 urni inkubaciji	51
4.4.2	Primerjava endocitotske aktivnosti urotelijskih celic in celic MDCK po 2 urni ali 24 urni inkubaciji z WGA-FITC ter tretiranju z nokodazolom	54
	4.4.2.1 Prašičje urotelijske celice, gojene v UroM (+Ca ²⁺ +S), UroM (+Ca ²⁺ -S) ali UroM (- Ca ²⁺ +S)	54
	4.4.2.2 Trajna celična linija MDCK.....	55
4.4.3	Za prašičje urotelijske celice je značilna nižja endocitotska aktivnost kot za celice MDCK.	56
4.5	PRESLIKAVA PO WESTERNU ZA PROTEIN MIKROTUBULOV – α-TUBULIN	57
4.5.1	Količina α-tubulina je odvisna od koncentracije kalcija in prisotnosti seruma v mediju.....	57
4.5	IMUNOFLUORESCENCA– AKTINA.....	58
4.5.1	Nokodazol in serum vplivata na količino aktina v apikalni citoplazmi.....	58
4.6	ANALIZA PREPUSTNOSTI UROTELIJSKIH CELIC	61
4.6.1	Prepustnost prašičjih urotelijskih celic za WGA-FITC, gojenih v hranilnem mediju s serumom, se zmanjša, če celice tretiramo z nokodazolom	61
	4.6.1.1 Prepustnost prašičjih urotelijskih celic po 2 urah inkubacije z WGA-FITC	61
	4.6.1.2 Prepustnost prašičjih urotelijskih celic po 24 urah inkubacije z WGA-FITC	62
	4.6.1.3 Prepustnost prašičjih urotelijskih celic je obratno sorazmerna s transepitelijsko upornostjo	63
4.6.2	Prepustnost celic MDCK za WGA-FITC se po kratkotrajnem tretiranju z nokodazolom zmanjša, po dolgotrajnem tretiranju z nokodazolom pa poveča	64
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	66
5.1	RAZPRAVA	66
5.1.1	Dinamika endocitotske aktivnosti urotelijskih celic je odvisna od njihove diferenciacijske stopnje	67

5.1.2	Količina α -tubulina v urotelijskih celicah je odvisna od koncentracije kalcija ter prisotnosti seruma v hranilnem mediju	68
5.1.3	Endocitotska aktivnost urotelijskih celic je odvisna od prisotnosti seruma v mediju ter koncentracije kalcija	69
5.1.4	Odvisnost endocitotske aktivnosti urotelijskih celic od mikrotubul	69
5.1.5	Tretiranje urotelijskih celic z nokodazolom, gojenih v mediju, ki vsebuje serum povzroči preurejanje aktinskih filamentov	70
5.1.6	Prepustnost urotelijskih celic po tretiranju z nokodazolom se zmanjša v hranilnem mediju s serumom	71
5.1.7.	Prepustnost urotelijskih celic je obratno sorazmerna s TER	73
5.2	SKLEPI	75
6.	POVZETEK	76
7.	VIRI	78

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz skrčenega urotelija.....	4
Slika 2: Zgradba mikrotubulov.....	7
Slika 3: Shema endocitotskega transporta v epitelijski celici.....	12
Slika 4: Različne podlage za nasajanje celic.....	22
Slika 5: Shema poskusa za ugotavljanje endocitotske aktivnosti in prepustnosti prašičjih urotelijskih celic...	26
Slika 6: Shema poskusa za ugotavljanje endocitotske aktivnosti in prepustnosti celic MDCK.....	27
Slika 7: Imunofluorescenca α -tubulina po tretiranju z različnimi koncentracijami nokodazola.....	37
Slika 8: Imunofluorescenca α -tubulina po tretiranju z nokodazolom koncentracije 66 μ M.....	38
Slika 9: Vezava WGA-FITC na apikalno plazmalemo površinskih urotelijskih celic.....	40
Slika 10: Imunofluorescenca okludina.....	41
Slika 11: Imunofluorescenca klavdina-8.....	42
Slika 12: Imunofluorescenca γ -katenina in dezmozoplakina.....	43
Slika 13: Analiza intenzitete fluorescence WGA-FITC in uroplakinov v površinskih urotelijskih celicah. ...	45
Slika 14: Analiza intenzitete fluorescence WGA-FITC in uroplakinov v površinskih urotelijskih celicah. ...	47
Slika 15: Imunofluorescenca uroplakinov in fluorescence WGA-FITC.....	48
Slika 16: Primerjava endocitotske aktivnosti med prašičjimi urotelijskimi celicami v in celicami MDCK po 2h inkubacije z WGA-FITC.....	51
Slika 17: Primerjava endocitotske aktivnosti med prašičjimi urotelijskimi celicami in celicami MDCK po 24 h inkubacije z WGA-FITC.....	53
Slika 18: Primerjava endocitotske aktivnosti urotelijskih celic gojenih v UroM po 2h inkubacije z WGA-FITC.....	54
Slika 19: Primerjava endocitotske aktivnosti prašičjih urotelijskih celic in celic MDCK.....	56
Slika 20: Preslikava po Westernu za α -tubulin.....	57

Slika 21: Analiza intenzitete prog α -tubulina v prašičjih urotelijskih celicah.	58
Slika 22: Analiza intenzitete fluorescence aktina v urotelijskih celicah	60
Slika 23: Imunofluorescenca aktina urotelijskih celic	60
Slika 24: Prepustnost urotelijskih celic po 2 urni inkubaciji z WGA-FITC	62
Slika 25: Prepustnost urotelijskih celic po 24 urni inkubaciji z WGA-FITC.	63
Slika 26: Primerjava prepustnosti in TER prašičjih urotelijskih celic.....	64
Slika 27: Prepustnost celic MDCK po 30 minutni, 2 urni ter 24 urni inkubaciji z WGA-FITC.....	65

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava hranilnega medija UroM (-Ca ²⁺ +S).....	19
Preglednica 2: Sestava hranilnega medija UroM (+Ca ²⁺ -S)	19
Preglednica 3: Sestava hranilnega medija UroM (+Ca ²⁺ +S).....	20
Preglednica 4: Sestava hranilnega medija za trajno celično linijo MDCK.....	23

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A-DMEM	Advanced - Dulbecco's modification of Eagle's medium, kemijsko definiran hranilni medij
AUM	asimetrično odebeljena membrana
BSA	goveji serumski albumin
DAPI	4,6-diamin-2-fenilindol dihidroklorid
DMEM	Dulbecco's modification of Eagle's medium, kemijsko definiran hranilni medij
EGF	epidermalni rastni faktor
FITC	fluorescin izotiocianat, zeleno fluorescenčno barvilo
FBS	fetalni goveji serum
FITC	fluorescin izotiocianat (zeleno fluorescentno barvilo)
HRP	hrenova peroksidaza
KSFM	Keratinocyte Serum-Free Medium ali medij za rast kožnih epitelijskih celic; kemijsko definiran hranilni medij
MCDB153	kemijsko definiran hranilni medij
MDCK	Madin-Darby canine kidney; trajna celična linija ledvičnih epitelnih celic
PBS	fosfatni pufer
PA	paraformaldehid
TER	transepitelijska upornost
UPEC	uropatogena <i>Echerichia coli</i>
UroM	mešanica kemijsko definiranih medijev MCDB153 in A-DMEM v razmerju 1:1, z različnimi dodatki (trije različni hranilni mediji) v katerem smo gojili urotelijske celice
UroM (+Ca ²⁺ +S)	mešanica kemijsko definiranih medijev MCDB153 in A-DMEM v razmerju 1:1, z dodanim serumom ter kalcijevim kloridom
UroM (+Ca ²⁺ -S)	mešanica kemijsko definiranih medijev MCDB153 in A-DMEM v razmerju 1:1, z dodanim kalcijevim kloridom in brez seruma
UroM (-Ca ²⁺ +S)	mešanica kemijsko definiranih medijev MCDB153 in A-DMEM v razmerju 1:1, z dodanim serumom in brez dodanega kalcijevega klorida
WGA-FITC	lektin, izoliran iz pšenice, ki se veže na sialično kislino in N-acetilglukozaminske sladkorne ostanke na plazmalemi in je konjugiran s FITC

KAZALO PRILOG

A. ŠTEVILO ENDOCITOTSKIH VEZIKLOV UROTELIJSKIH CELIC, GLEDE NA TRETIRANJE Z NOKODAZOLOM

B. ŠTEVILO ENDOCITOTSKIH VEZIKLOV CELIČNE LINIJE MDCK, GLEDE NA TRETIRANJE Z NOKODAZOLOM

C. PREPUSTNOST UROTELIJSKIH CELIC ZA WGA-FITC

D. MAKSIMALNA INTENZITETA FLUORESCENCE AKTINA UROTELIJSKIH CELIC GLEDE NA TRETIRANJE Z NOKODAZOLOM

E: PREPUSTNOST CELIC MDCK ZA WGA-FITC

F: ANALIZA INTENZITETE FLUORESCENCE UROPLAKINOV IN WGA-FITC

1. UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Sestava apikalne plazmaleme se med diferenciacijo urotelijskih celic močno spremeni, saj membrano debeline 7 nm v 70-90% zamenja z uroplakini bogata membrana, debeline 12 nm. Hkrati z diferenciacijo se spremeni tudi dinamika apikalne endocitoze v površinskih urotelijskih celicah. Izmenjava med toksičnim urinom in citoplazmo mora biti v površinskih urotelijskih celicah minimalna, saj presežna apikalna endocitoza lahko vodi v prehajanje urina v celice. Mehanizmi, ki urotelijskim celicam zagotavljajo nizko endocitotsko aktivnost, še niso poznani, predvideva pa se, da imajo pri tem poleg diferenciacijske stopnje celic pomembno vlogo tudi mikrotubuli.

Namen diplomske naloge je bil preučiti odvisnost endocitotske aktivnosti prašičjih urotelijskih celic od njihove diferenciacijske stopnje in mikrotubulov.

1.2 CILJI DIPLOMSKEGA DELA

1. Ugotoviti stopnjo diferenciranosti prašičjih urotelijskih celic *in vitro* z imnooznačevanjem uroplakinov.
2. Določiti količino α -tubulina v različno diferenciranih celicah s preslikavo po Westernu.
3. Preučiti odvisnost endocitotske aktivnosti urotelijskih celic od njihove diferenciacijske stopnje.
4. Preučiti odvisnost endocitotske aktivnosti urotelijskih celic od mikrotubulov, z uporabo nokodazola, ki preprečuje polimerizacijo mikrotubulov.
5. Preučiti količino aktina v apikalni citoplazmi urotelijskih celic, po tretiranju celic z nokodazolom.
6. Ovrednotiti stopnjo endocitotske aktivnosti urotelijskih celic s pomočjo endocitotskega označevalca in računalniškega programa »Count 3D«.
7. Preučiti prepustnost urotelijskih celic v odvisnosti od tretiranja celic z nokodazolom ter primerjati prepustnost s transepitelijsko upornostjo (TER) celic.

8. Preučiti prisotnost medceličnih stikov v urotelijskih celicah potem, ko smo celice tretirali z nokodazolom ali inkubirali z WGA-FITC

Delovna hipoteza: Prisotnost uroplakinov v apikalni plazmalemi urotelijskih celic ter zmanjšano izražanje α -tubulina v diferenciranih urotelijskih celicah vpliva na zmanjšanje endocitotske aktivnosti.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SEČNI MEHUR SESALCEV *IN VIVO*

Primarna funkcija sesalčjega sečnega mehurja je shranjevanje urin, ki ga ledvice neprenehoma proizvajajo, dokler ga voljno ne izločimo (Hicks, 1975). Sečni mehur je organ v obliki votle krogle, katere stena je sestavljena iz serozne, mišične in mukozne plasti. Serozna plast (*tunica adventitia*) obdaja sečni mehur z zunanje strani in je sestavljena iz bogato prekrvavljene vezivnega tkiva ter spleta živcev (Geneser, 1986). Mišična plast (*tunica muscularis*) je sestavljena iz treh skladov gladkih mišic; notranjega in zunanjega sklada vzdolžno potekajoče gladke mišičnine ter vmesnega sklada iz krožno potekajoče gladke mišičnine. Mukozna plast (*tunica mucosa*) je ločena od mišične s tanko lamino proprijo, ki skupaj z bazalno lamino in epitelijem - urotelijem tvori mukozno plast (Hicks, 1975).

2.1.1 Zgradba urotelija in diferenciacija urotelijskih celic

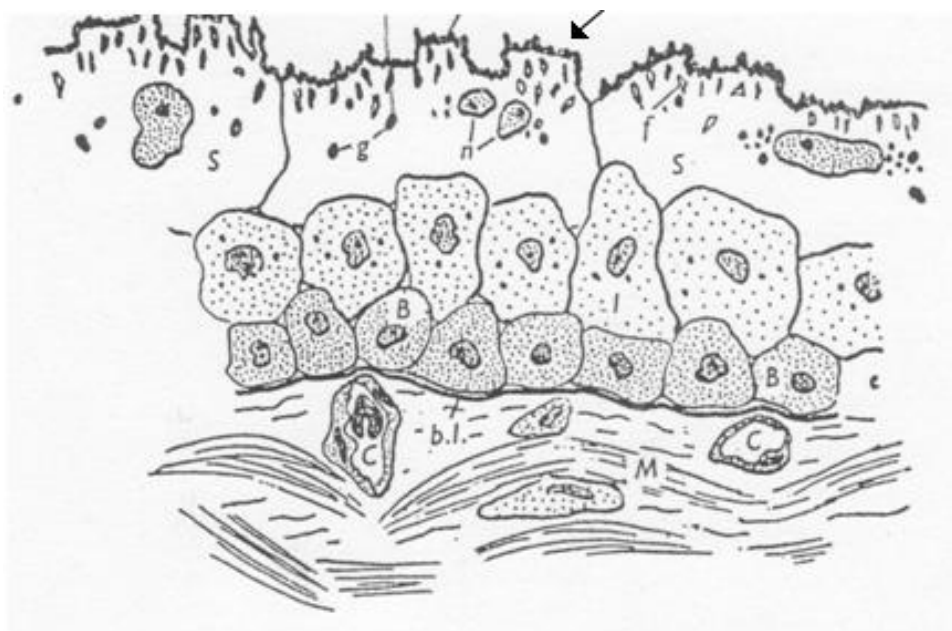
Zaradi histološke zgradbe, ki je vmes med večskladnim ploščatim in večvrstnim visokoprizmatskim epitelijem, se urotelij uvršča med prehodne epitelije (Petzoldt, 1994). Funkcija sečnega mehurja v veliki meri temelji na zgradbi urotelija (Hicks, 1975). Urotelij sestavljajo trije celični skladi, vsak sklad pa gradijo morfološko in diferenciacijsko različne celice. Na bazi so majhne nediferencirane celice, v vmesnem skladu so vmesne celice, ki so delno diferencirane in v površinskem skladu so visoko diferencirane površinske urotelijske celice.

Bazalne urotelijske celice ležijo na bazalni lamini, na katero se pritrdijo s poldezmosomi. Bazalne celice so kuboidne oblike, velikosti 5 – 10 µm, pogosto se mitotsko delijo in so večinoma diploidne. Citoplazma vsebuje mnogo ribosomov, mitohondrijev in malo zrnatega endoplazemskega retikuluma (Hicks, 1965; Hicks, 1975).

Vmesne urotelijske celice tvorijo eno ali več plasti med bazalnimi in površinskimi celicami. Vsebujejo več lizosomov in imajo manj bazično citoplazmo v primerjavi z

bazalnimi celicami. Citoplazma vsebuje mitohondrije, ribosome (ki so značilni za bazalni sklad celic) in izrazit Golgijev aparat, pa tudi fuziformne vezikle (značilnost površinskega sklada celic). Vmesne celice so s sosednjimi celicami povezane z dezmosomi, merijo 20 μm ter so tetraploidne, kar prav tako kaže na njihovo prehodnost med bazalnimi in površinskimi urotelijskimi celicami (Hicks, 1975).

Površinske urotelijske celice so velike, ploščate celice, katerih citoplazma vsebuje številne lizosome ter številne fuziformne vezikle. Celice so med seboj povezane z dezmosomi, adherentnimi stiki in, na meji med apikalno ter lateralno plazmalemo, z dobro razvitimi tesnimi stiki. Površinske celice so tako velike, da se raztezajo čez več spodaj ležečih celic vmesnega sklada, zato jih imenujejo tudi dežnikaste celice. Glede na stopnjo raztegnjenosti mehurja so velike od 50-120 μm in so večinoma poliploidne, kar nakazuje možnost zlivanja vmesnih celic in/ali delitev jeder (Hicks, 1966; Hicks, 1975; Lewis, 2000).



Slika 1: Shematski prikaz skrčenega urotelija. Urotelij je sestavljen iz treh skladov celic: bazalnih (B), vmesnih (I) in površinskih celic (S) ter leži na bazalni lamini (b.l.), ki ločuje urotelij od spodaj ležečih krvnih kapilar (C) in mišičnine (M), (f) fuziformni vezikli, (n) jedra, (puščica) odebjeljena apikalna plazmalema (Hicks, 1975).

Za površinske urotelijske celice je značilna specifična apikalna plazmalema, ki je grajena iz urotelijskih plakov, ki pokrivajo okrog 70-90% lumenske površine sečnega mehurja (Porter in sod., 1967). Zunanji sloj apikalne plazmaleme je v predelih plakov dvakrat debelejši kot notranji sloj, saj imajo uroplakini večjo zunajcelično kot znotrajcelično domeno (Yu in sod., 1994, Wu in sod., 1994). Specializirano apikalno plazmalemo površinskih urotelijskih celic v predelih urotelijskih plakov imenujejo tudi asimetrično odebeljena apikalna plazmalema (AUM; angl.: *asymmetric unit membrane*) (Hicks, 1965, Koss 1969, Hicks). Plaki so poligonalnih oblik (premera 0,2-0,5 μm , debeline 12 nm), sestavljeni iz uroplakinskih podenot premera 16 nm. Posamezno uroplakinsko podenoto tvori skupina štirih transmembranskih proteinov, imenovanih uroplakini: UPIa, UPIb, UPII in UPIIIa. Ti štirje proteini so organizirani v dva heterodimera: UPIa/UPII in UPIb/UPIIIa. Uroplakinske podenote so sestavljene iz centralnega dela (šestih večjih uroplakinov; UPII ali UPIIIa) in perifernega dela (na centralni del vezan zunanji krog šestih uroplakinov, vendar manjših; UPIa ali UPIb).

Sinteza uroplakinov poteka v endoplazemskem retikulumu in se končuje v Golgijevem aparatu, od koder se uroplakini v fuziformnih veziklih transportirajo k apikalni celični površini (Hicks, 1975). Fuziformni vezikli so sploščeni in jih omejuje membrana, ki ima podobno strukturo kot apikalna plazmalema površinskih urotelijskih celic (Koss, 1969). Sinteza uroplakinov se prične v vmesnih celicah in se še močno poveča v površinskih urotelijskih celicah, zato lahko izražanje uroplakinov služi kot biokemični pokazatelj diferenciranosti celic (Wu in sod., 1990).

V literaturi je dokončna diferenciacija površinskih urotelijskih celic opredeljena s prisotnostjo citokeratinov (CK), ki tvorijo mrežo v subapikalni citoplazmi (Veranič in Jezernik, 2002), z aktinskimi filamentami, lokaliziranimi v bazolateralnem delu celic (Romih in sod., 1999), z uroplakini, ki so organizirani v urotelijske plake (Romih in sod., 2002), nizko prepustnostjo in visoko TER (Southgate, 1994, Turner in sod., 2008) ter zmanjšano apikalno endocitozo (Kreft in sod., 2009a).

2.1.2 Prepustnost urotelija

Izmenjava snovi med krvjo in urinom mora biti minimalna, zato urotelij tvori tesno pregrado in preprečuje neregulirano prehajanje vode, ionov ter toksičnih metabolitov.

Prepustnost apikalne plazmaleme za vodo, sečnino, amoniak in proteine je med najnižjimi poznanimi za biološke membrane (Negrete in sod., 1996). Skupaj s tesnimi stiki apikalna plazmalema površinskih urotelijskih celic tvori prepustnostno bariero (Lewis in sod., 1995, Zeidel, 1997). Pokazatelj nizke prepustnosti urotelija je tudi visoka transepitelijska upornost (TER). Vrednosti TER so v uroteliju $20000 \Omega \text{ cm}^2$ in več (Lewis in sod., 1995, Lewis, 2000).

Znano je, da tesni stiki v uroteliju onemogočajo paracelični transport (Lewis in sod., 2000) in tako prispevajo k visoki TER in prepustnostni barieri. Hu in sod. (2002) so pokazali, da odsotnost transmembranskega integralnega proteina uroplakina IIIa pri »knockout« miših kljub funkcionalnim tesnim stikom povzroči povečanje prepustnosti. Prav tako dodajanje nistatina v apikalno raztopino razrezanih epitelijskih mehurja poveča prepustnost, skupaj z zmanjšanjem TER, kar dokazuje, da apikalna plazmalema površinskih urotelijskih celic prispeva k prepustnostni barieri (Negrete in sod., 1996).

2.2 CITOSKELET

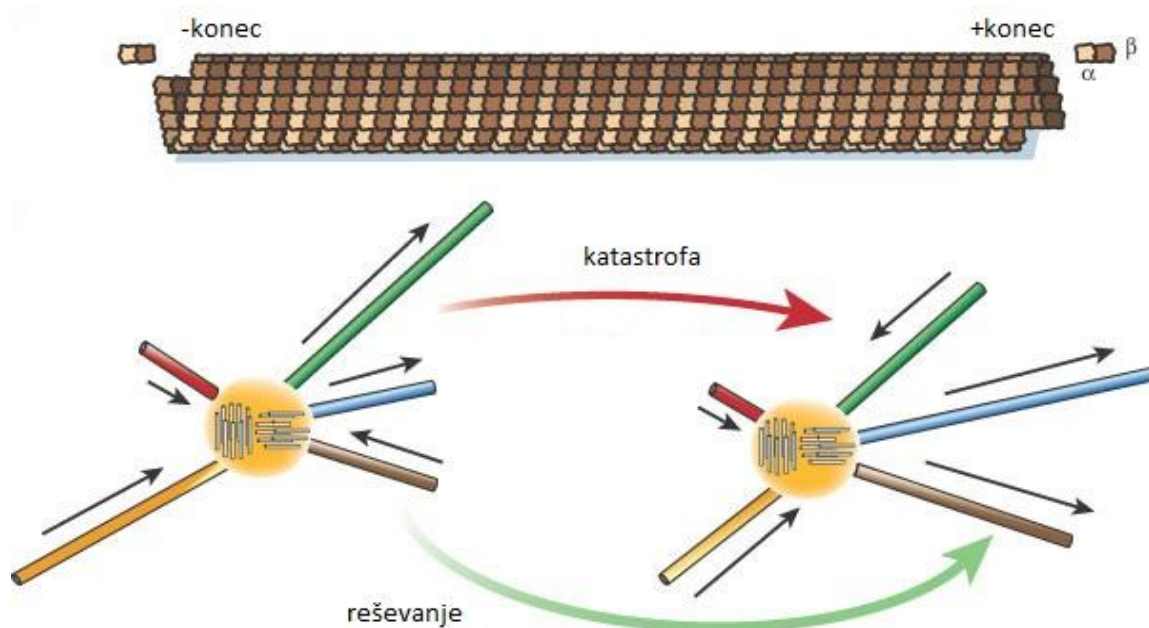
Citoskelet je zelo dinamičen sistem, ki se reorganizira med spreminjanjem celične oblike, celično delitvijo ter odzivanjem na spremembe okolja. Citoskelet bi lahko poimenovali tudi »citomuskulatura«, ker je neposredno odgovoren za gibanja, kot je npr. plazenje celic po substratu, za mišično kontrakcijo, prav tako pa omogoča znotrajcelična gibanja, kot je transport organelov in ločevanje kromosomov med mitozo (Alberts in sod, 2006).

Citoskelet sestavljajo trije tipi citoskeletnih elementov: mikrotubuli, aktinski filamenti (mikrofilamenti) in intermediarni filamenti, iz česar tudi izhaja raznolika aktivnost, ki jo ima citoskelet.

2.2.1 Mikrotubuli

Mikrotubuli so pomembni pri lokalizaciji organelov kot tudi pri prenosu tovora med organeli ter organeli in plazmalemo celice. Gibanja vzdolž mikrotubulov so hitra ($\sim 1\mu\text{m/s}$) in lahko potekajo na dolge razdalje. Kinezini in dineini, motorni proteini, so potrebni za vsa gibanja, ki jih omogočajo mikrotubuli (Vale 1987, Woehlke 2000).

Mikrotubule gradita globularna proteina α - in β -tubulin (slika 2). Heterodimeri α - in β -tubulina se povezujejo v protofilamente, po 13 protofilamentov pa sestavlja cilindrično strukturo, ki jo imenujemo mikrotubul. Podenote heterodimerov vseh protofilamentov imajo enako orientacijo, zato so mikrotubuli tudi polarizirani. Na minus koncu je izpostavljen α -tubulin, na plus koncu mikrotubula pa β -tubulin.



Slika 2: Zgradba mikrotubulov. Mikrotubuli so sestavljeni iz heterodimerov α - in β -tubulina. Na minus koncu je izpostavljen α -tubulin, na plus koncu pa β -tubulin. Katastrofa pomeni krajšanje mikrotubulov, med reševanjem pa mikrotubuli rastejo (Howard in Hyman, 2003).

Za mikrotubule je značilna dinamična nestabilnost, kar pomeni, da se menjujejo daljša obdobja počasne rasti in kratka obdobja hitrega krajšanja, tako da se heterodimeri α - in β -tubulina dodajajo oziroma odstranjujejo, kar omogoča preurejanje mikrotubulov znotraj celice (Alberts, 2008).

Mikrotubuli sodelujejo v procesu endocitoze (več v 2.4.1.1), kar prikazuje tudi slika 3.

2.2.2 Aktinski filament

Aktinski filament so krajši od mikrotubulov in gibanja vzdolž aktina so počasnejša ($\sim 0,1 \mu\text{m/s}$). Ta gibanja omogočajo motorni proteini miozini (Mermall in sod., 1998). Aktinske podenote so globularne, večinoma v obliki monomerov. Podenote tvorijo aktinske filamente, ki so tako kot mikrotubuli polarizirani. Dva filamenta se ovijata okrog drug drugega in tvorita vijaknico. Aktinski filament so bolj fleksibilni kot mikrotubuli. Pomembni so za številne strukture v celici (mikrovili, tesni in adherentni stiki, stresna vlakna), sodelujejo pa tudi v procesu endocitoze (Alberts, 2008) (slika 3).

2.3 ENDOCITOZA

Majhne molekule, kot so aminokisline, sladkorji in ioni lahko prehajajo v celice skozi membranske proteinske črpalke ali kanalov. Večje makromolekule pa pridejo v celico z invaginacijo plazmaleme in nastankom endocitotskega vezikla v procesu endocitoze. Endocitoza obsega več različnih mehanizmov, ki jih uvrščamo v dve kategoriji: fagocitozo (privzem večjih partiklov) in pinocitozo (privzem tekočine in v njej raztopljenih snovi).

Fagocitoza je omejena na specializirane sesalčje celice, kot so makrofagi in monociti, ki odstranjujejo patogene ali odpadne snovi, kot so ostanki celic (Aderem in Underhill, 1999). Gre za močno reguliran proces, ki vključuje specifične celične receptorje in signalne kaskade, ki potekajo preko družine GTPaz Rho (Hall in Nobes, 2000).

Pinocitoza poteka v vseh sesalčjih celicah. Ločimo štiri osnovne mehanizme pinocitoze: makropinocitozo, klatrinsko endocitozo, kaveolarno endocitozo ter klatrinsko in

kaveolarno neodvisno endocitozo. Ti mehanizmi so zelo različni, močno regulirani in omogočajo kontrolo kompleksnih fizioloških procesov, kot so celična homeostaza, hormonska signalizacija, predstavljanje antigenov ipd. Pinocitozo lahko merimo z uporabo označevalskih molekul v mediju. Stopnja sprejemanja tekočinskih označevalcev je neposredno odvisna od njihove koncentracije v mediju. Učinkovitost endocitoze se poveča, ko pride do nespecifične vezave snovi, raztopljenih v tekočini, na plazmalemo (adsorptivna endocitoza), privzem pa je najučinkovitejši, ko pride do vezave na receptorje (receptorska endocitoza) (Conner in Schmid, 2003).

2.3.1 Endocitoza v epitelijjskih celicah

Primarna funkcija epitelijjskih celic je regulacija izmenjave makromolekul med zunanjim okoljem in spodaj ležečim tkivom. Selektivna izmenjava je mogoča zaradi neprepustnosti tega sloja celic tako za manjše kot večje makromolekule (Mostov, 1992). Epitelijjske celice imajo apikalne in bazolateralne domene plazmaleme ločene s tesnimi stiki (Simons in Wandiger-Ness, 1990). Vsaka domena ima različno proteinsko in lipidno sestavo, ki se vzdržuje kljub velikemu transportu od ene površine k drugi (Apodaca, 1994).

V polariziranih celicah igra pomembno vlogo transcitoza, ker omogoča izmenjavo makromolekul iz obeh celičnih površin (Apodaca in sod., 1991, Mostov in sod., 1992). Transcitoza ima centralno vlogo pri osnovanju celične polarnosti (Zurzolo in sod., 1992).

2.3.1.1. Endocitoza v površinskih urotelijskih celicah

V površinskih urotelijskih celicah mora biti izmenjava med toksičnim urinom in citoplazmo minimalna, saj povečana endocitotska aktivnost apikalne plazmaleme lahko vodi v sprejemanje urina.

Manjša endocitotska aktivnost visoko diferenciranih površinskih urotelijskih celic je lahko posledica sestavljanja uroplakinov v urotelijske plake, kajti obstaja mnenje, da so ti preveliki ali pretogi in tako ovirajo apikalno endocitozo (Kreft in sod., 2008). Druga možnost je preurejanje citoskeleta v apikalni citoplazmi; znano je, da v visoko

diferenciranih površinskih urotelijskih celicah v subapikalni citoplazmi aktinski filamenti niso prisotni (Romih in sod, 1999; Acharya in sod, 2004; Kreft in sod., 2005b). Mikrotubuli in aktinski filamenti so namreč potrebni za učinkovito endocitozo v polariziranih epiteljskih celicah (Apodaca, 2001, Apodaca 2004), zato lahko njihova odsotnost prispeva k zmanjšani endocitozi v visoko diferenciranih površinskih urotelijskih celicah.

Čeprav je fagocitoza omejena na specializirane sesalčje celice, se uropatogena *Echerichia coli* (UPEC) verjetno fagocitira v površinskih urotelijskih celicah tako, da se veže na uroplakin Ia in se kljub rigidnosti urotelijskih plakov fagocitira (Wang in sod., 2008). Natančen mehanizem vstopa UPEC v urotelijske celice še ni poznan.

V urotelijskih celicah so doslej opisali le dva tipa endocitoze (pinocitoze): tekočinsko endocitozo ter membransko vezano endocitozo. Obe sta v visoko diferenciranih površinskih urotelijskih celicah močno zmanjšani (Kreft in sod., 2009a). Doslej v literaturi ni podatkov o makropinocitozi, klatrinski, kaveolarni endocitozi ter klatrinsko in kaveolarno neodvisni endocitozi apikalne plazmaleme urotelijskih celic.

2.3.1.2. Endocitoza v celicah MDCK

Celice MDCK so polarizirane ledvične epiteljske celice (Madin-Darby canine kidney), v katerih se vsako uro endocitira površina plazmaleme, ki je ekvivalentna 40% celične površine (Von Bonsdorff in sod., 1990). Material, ki se endocitira s tekočinsko endocitozo, potuje preko apikalnih ali bazalnih zgodnjih endosomov, naprej do poznih endosomov, lizosomov. Vsebina veziklov, ki prehaja v celice iz apikalne plazmaleme se ne izmenjuje z vsebino veziklov, ki prehajajo v celice iz bazalne plazmaleme (Bomsel in sod., 1989; Parton in sod., 1989).

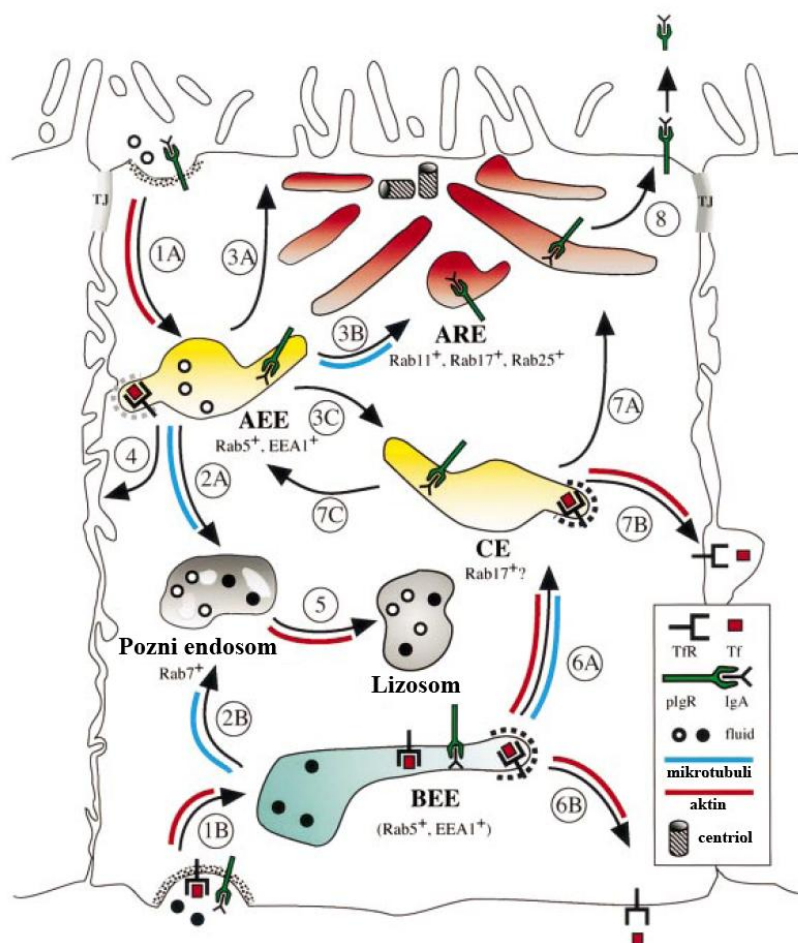
Polimerni imunoglobulinski receptor (PIgR) in njegov ligand IgA se s transcitozo v veziklih prenašata od bazalne plazmaleme v bližino apikalne plazmaleme, kjer se vezikli zbirajo. Če tretiramo celice MDCK z nokodazolom, ta povzroči, da se IgA endocitira iz

bazalne plazmaleme, vendar ne pride do transcitoze do apikalne površine, kar pomeni, da so za to ključni mikrotubuli (Hunziker in sod., 1990).

Primerjava endocitotske aktivnosti celic MDCK in mišjih urotelijskih celic je pokazala, da je ta 5-15 krat višja pri celicah MDCK (Kreft in sod., 2009a).

2.3.2 Vpliv agensov, ki depolimerizirajo mikrotubule na endocitotsko aktivnost epitelijskih celic

Če mikrotubule tretiramo z depolimerizacijskimi agensi (npr. nokodazolom) v ledvičnih celicah hrčka, je blokiran transport od zgodnjih endosomov do poznih endosomov (Gruenberg in sod., 1989). V celicah MDCK je blokiran transport tovora med poznimi endosomi in apikalnimi zgodnjimi endosomi ter bazalnimi zgodnjimi endosomi (Bomsel in sod., 1990). Transport transferina in njegovega receptorja med bazalnimi zgodnjimi endosomi in skupnimi reciklirajočimi endosomi je oslavljen (Apodaca in sod., 2001). Znano je, da so mikrotubuli prav tako pomembni za transport med apikalnimi zgodnjimi endosomi in apikalnimi reciklirajočimi endosomi (Leung in sod., 2000), za transcitozo iz bazolateralne do apikalne plazmaleme (Leung in sod., 2000; Breitfeld in sod., 1990; Hunziker in sod., 1990), ter transcitozo virusa HIV iz apikalne do bazolateralne plazmaleme (Breitfeld in sod., 1990). Prav tako depolimerizacija mikrotubulov prepreči transcitozo receptorja Fc (receptorja za imunoglobulin IgG) (McCarthy in sod., 2000). V posameznih primerih pa depolimerizacija mikrotubulov ne vpliva na transcitozo iz apikalne do bazolateralne plazmaleme (npr. na transcitozo protiteles IgG) (Hunziker in sod., 1990, Ellinger in sod., 2001). Slika 3 shematsko prikazuje endocitotski transport epitelijskih celic ter vlogo mikrotubulov v endocitotskem transportu.



Slika 3: Shema endocitotskega transporta v epitelijski celici. Pomen mikrotubulov in aktinskih filamentov v endocitotskem transportu. Privzeta tekočina in plazmalema potujeta do apikalnih zgodnjih endosomov (AEE; korak 1A) ali bazolateralnih zgodnjih endosomov (BEE, korak 1B), kar zahteva prisotnost aktinskih filamentov v celici. Apikalno sprejeta tekočina se lahko reciklira (korak 3B), transcitira (korak 4) ali pa prenese do poznih endosomov (korak 2A) in končno do lizosomov (korak 5). Transport do poznih endosomov je odvisen od mikrotubulov, transport do lizosomov pa od aktinskih filamentov. Bazolateralna tekočina se primarno transportira do poznih endosomov (korak 2B) in lizosomov (korak 5). Apikalno reciklirajoči proteini se transportirajo od AEE do apikalno reciklirajočih endosomov (ARE, korak 3B) ali skupnih reciklirajočih endosomov (CE, korak 3C), preden se sprostijo iz apikalnega pola celice (korak 8). Transport med AEE in ARE zahteva mikrotubule, medtem ko potrebe po citoskeletnih elementih med ARE in CE še niso poznane. Bazolateralni reciklirajoči proteini (receptorsko vezan transferin Tf), kot proteini, ki se transcitirajo od bazolateralne do apikalne plazmaleme (pIgR-IgA), vstopajo v BEE. Od tu se lahko reciklirajo (korak 6B) ali pa se transportirajo do CE (korak 6A). Pri slednjem koraku so potrebni tako mikrotubuli kot aktinski filament. Od tu se lahko transportirajo do AEE (korak 7C) in se reciklirajo (korak 4) ali pa potujejo od CE do ARE (korak 7A) in se končno sprostijo na apikalnem polu celice (korak 8). Koraka 6B in 7B sta verjetno odvisna od aktinskih filamentov (Apodaca, 2001).

2.3.3 Vpliv aktinskih filamentov na endocitotsko aktivnost epitelijskih celic

Apikalna endocitoza je odvisna od aktinskih filamentov. Tretiranje s citohalazini, ki depolimerizirajo aktinske filamente, prekine apikalno endocitozo v celicah MDCK, medtem ko na bazolateralno endocitozo tretiranje ne vpliva (Gottlieb in sod., 1993). Tretiranje s citohalazini prav tako prekine apikalno endocitozo hrenove peroksidaze (HRP) (Blok in sod., 1983), apikalno endocitozo albumina v ledvičnih celicah opusuma (Gekle in sod., 1997) ter apikalno endocitozo vodnih kanalov v epitelijskih celicah mehurja krastače (Dibas in sod., 1999).

Tudi vpliv na bazolateralno endocitozo ni izključen, saj stabilizacija aktinskih filamentov z jasplakinolidom povzroči selektivno povečanje bazolateralne endocitoze tekočinskega označevalca dekstrana in HRP v celični liniji MDCK, na apikalno endocitozo pa nima vpliva (Shurety in sod., 1998). Slika 3 shematsko prikazuje endocitotski transport epitelijskih celic ter vlogo aktinskih filamentov v endocitotskem transportu.

Študija Romiha in sod. (1999) je pokazala, da se z diferenciacijo urotelijskih celic spreminja razporeditev aktinskih filamentov v površinskih urotelijskih celicah. Ugotovili so, da oblikovanje specializirane apikalne plazmaleme sovпада z razgraditvijo aktinskih filamentov v subapikalnem delu celice, medtem ko v bazolateralnem delu celice ostajajo aktinski filament prisotni. Aktinski filamentni so potrebni za učinkovit endocitotski transport, zato lahko njihova odsotnost prispeva k zmanjšani endocitotski aktivnosti v diferenciranih urotelijskih celicah.

2.4 MEDCELIČNI STIKI

Epitelijske celice so nameščene tesno druga ob drugi in so dodatno združene še s specializiranimi medceličnimi stiki.

Tesni stiki (*zonulae occludens*) igrajo pomembno vlogo pri prepustnostni barieri urotelija (Hicks, 1966, Hicks 1975, Peter 1978). Nahajajo se na apikalni strani vsake površinske urotelijske celice in jo obkrožajo. Sestavlja jih mreža specifičnih citoplazemskih proteinov, citoskeletnih elementov ter transmembranskih proteinov. Pri slednjih so najpomembnejši

okludini in klavdini. Klavdin-8 in okludin se pojavljata v površinskem skladu urotelijskih celic (Kreft in sod., 2006). Funkcionalnost tesnih stikov se vrednoti z višino TER in stopnjo prepustnosti urotelija.

V adherentnih stikih (*zonulae adherens*) se posredno povezujejo aktinski filamenti sosednjih celic. Pri povezavi sodeluje več skupin molekul. E-kadherini (celične adhezivne molekule) sosednjih celic se povezujejo v prisotnosti kalcija. E-kadherin prehaja skozi plazmalemo, na citosolni strani pa se povezuje z β -kateninom ali plakoglobinom (γ -kateninom). Ta dva pa se z vmesnimi proteini pritrjujeta na aktinske filamente (Lewis in sod., 1997).

Dezmosomi (*maculae adherens*) so točkovne medcelične povezave, s katerimi se povezujejo intermediarni filamenti sosednjih celic. Dezmozoplakin je edini protein, ki ga najdemo na citoplazemski strani v vseh dezmosomih in je podoben plakoglobinu. Pritrja se na intermediarne filamente in se povezuje z drugimi komponentami dezmosomov. Dezmozoplakin je ključen za nastanek funkcionalnih dezmosomov (Gallicano in sod., 1998).

2.5 UROTELIJ *IN VITRO*

Čeprav lahko študiramo raznolike značilnosti urotelija *in vivo*, so celične kulture odlični modeli, na katerih lahko študiramo morfološke, fiziološke, imunološke in toksikološke značilnosti ter karcinogenezo izbranega tkiva ali organa (Batista, 2005).

2.5.1 Celične kulture

Celična kultura je populacija celic, ki živi in se razmnožuje *in vitro*. Prednost dela s celičnimi kulturami je zagotavljanje enakih in definiranih eksperimentalnih razmer za vse celice, obenem pa lahko eksperimentalne pogoje tudi spreminjamo.

V literaturi so opisani različni modeli urotelijskih celic *in vitro* (Hutton in sod., 1993; Southgate in sod., 1994; Guhe in sod., 1994; Trushel in sod., 1999; Tash in sod., 2001; Zhang in sod., 2001, Kreft, 2002, Kreft in sod., 2002, Hudoklin, 2004, Kreft in sod.,

2005a). Uspešna urotelijska celična kultura je tista, ki ima razvite tri celične sklade, površinske celice z urotelijskimi plaki, fuziformni vezikli in diferenciacijskimi označevalci, visoko TER, nizko prepustnost za vodo in sečnino ter razvite tesne stike (Lewis, 2000).

Glede na izvor, sposobnost ohranjanja prvotnih lastnosti in število mitotskih delitev, delimo celične kulture na primarne in sekundarne celične kulture ter trajne celične linije.

2.5.2 Primarne in sekundarne celične kulture

Primarne celične kulture dobimo z migracijo celic iz koščka tkiva ali z mehansko oziroma encimsko razgradnjo tkiva (Batista. 2005). Za ločitev urotelijskih celic od spodaj ležečih plasti se uporablja več pristopov (encimska metoda z dispazo, kolagenazo tipa IV, pri manjših mehurjih z EDTA) (Truschel in sod., 1999; Zhang in sod., 2001, Southgate in sod., 1994, Kreft in sod., 2005a).

Sekundarne celične kulture so kulture po prvi uspešni nasaditvi. Celice ohranjajo tkivno specifične lastnosti v prvih presaditvah, v kasnejših pa jih spremenijo oziroma izgubijo, saj selekcioniramo celice, ki se hitro delijo, kar se odraža v postopnem povečevanju homogenosti kulture (Freshney 1994, Batista 2005).

Za nasaditev se najpogosteje uporabljajo plastične podlage, ki so lahko prevlečene z različnimi sestavinami zunajceličnega matriksa, ki pripomorejo k boljšemu pritrjanju celic ob nasaditvi, ter k diferenciaciji in trajnosti kulture (Chlapowski in sod., 1979, Chlapowski 1989). Uporabljajo se kolagenski premazi (kolagen tipa I, kolagen tipa IV), lahko pa tudi fibronektin in laminin (Guhe in sod., 1994, Tash in sod., 2001, Truschel in sod., 1999).

Poleg plastičnih podlag se uporabljajo še sintetične porozne membrane, kjer celice rastejo na porozni membrani, ta pa je delno potopljena v hranilni medij. Apikalna plazmalema meji na zrak, bazalna pa ima vlogo pritrjevanja in sprejemanja hranil skozi pore v porozni membrani (DeBoer in sod., 1994; Sterle in sod., 1997; Truschel in sod., 1999, Tash in sod., 2001, Kreft in sod., 2002).

Tudi na rast in diferenciacijo urotelijskih celic vplivajo podlage. Na neprepustnih podlagah celice niso visoko diferencirane, so pa prisotni proteini tesnih stikov (Chlapowski in Haynes, 1979; Cilento in sod., 1994). Urotelijske celice, nasajene na propustno podlago, pa razvijejo tri- ali večskladno celično kulturo, kjer so mitoze omejene na bazalni sklad celic. Ko postane tako gojena celična kultura konfluentna in se stratifikacija zaključi, ima osnovne značilnosti urotelija *in vivo* (De Boer in sod., 1994).

Nasaditvene gostote za vzpostavljanje primarnih kultur morajo biti višje (5×10^4 do 1×10^5 celic/cm²) od nasaditvenih gostot sekundarnih kultur (nad 1×10^4 celic/cm²) (Kreft in sod., 2005a; Ukmar, 2006).

2.5.3 Trajne celične linije

Trajne celične linije je v *in vitro* pogojih razmeroma lahko gojiti, saj je njihova rast manj odvisna od seruma ali rastnih faktorjev. Običajno imajo visoko proliferativno aktivnost in sposobnost neomejenih delitev.

2.5.4 Hranilni medij

V celični kulturi opravlja hranilni medij naloge, ki jih ima v *in vivo* pogojih zunanje okolje celice. Celice v kulturi potrebujejo osnovno mešanico soli, sladkorjev, aminokislin in vitaminov, poleg tega pa še hormone in rastne faktorje, ki jih v različnih koncentracijah nudi serum (Barnes in Sato, 1980). Če seruma v hranilnem mediju ni, pravimo, da je medij kemijsko definiran. V takšnem hranilnem mediju so koncentracije vseh sestavin natančno določene.

Za gojenje urotelijskih celic so različni raziskovalci uporabljali različne medije. Truschel in sod. (1999) so vzgojili primarno kulturo kunčjih urotelijskih celic, po funkciji in morfologiji zelo podobno uroteliju *in vivo*. Kulture so gojili v kemijsko definiranem hranilnem mediju KSFM (Keratinocyte Serum-Free Medium, medij za rast kožnih epiteljskih celic). Zhang in sod. (2001) so vzgojili primarno kulturo podganjih urotelijskih celic, ki so zelo uspešno rastle v t.i. kondicioniranem mediju, sestavljenem iz medija

KSFM in medija, v katerem je rastla celična linija mišjih fibroblastov 3T3. Southgate in sod. (1994) so gojili humane urotelijske celice v mediju KSFM in ugotovili, da različne koncentracije kalcija in prisotnost retinojske kisline, epidermalnega rastnega faktorja (EGF), toksina kolere (CT) ali ekstrakta telečje hipofize vpliva na pritrjevanje, rast in stratifikacijo urotelijskih celic v kulturi. Kreft in sod., (2005a) so ugotovili, da mišje urotelijske celice dosegajo višjo stopnjo diferenciacije v kemijsko definiranem hranilnem mediju MCDB153:A-DMEM (UroM) kot v mediju KSFM

Spreminjanje pogojev v gojenju urotelijskih celic, kot so prisotnost seruma in različne koncentracije kalcija, vpliva na diferenciacijo urotelijskih celic v kulturi (Turner in sod., 2008).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PRAŠIČJE UROTELIJSKE CELICE

Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Veterinarska uprava RS je izdalo dovoljenje za izvedbo poskusov Medicinski fakulteti, Inštitutu za biologijo celice in sicer dovoljenje uporabe živalskih stranskih proizvodov kategorije 3 (sečnih mehurjev prašičev).

3.1.1 Primarne kulture prašičjih urotelijskih celic

Pri poskusih smo uporabljali urotelijske celice primarne kulture, ki so bile zamrznjene v tekočem dušiku v epruvetah Eppendorf za zamrzovanje (Crio Vial, TPP). Pri odmrznitvi celic je najpomembneje, da jih odmrzujemo v čim krajšem času. Celice smo inkubirali v vodni kopeli (37 °C) eno minuto. Nato smo jih centrifugirali (Eppendorf, 200 g, 5 minut), supernatant odlili, celicam pa dodali hranilni medij UroM (-Ca²⁺+S) (glej 3.1.3).

3.1.2 Nasaditev celic

S pomočjo hemocitometra (glej 3.1.5) smo celice prešteli in jih nasadili na ustrezno velike podlage (12 cm², 25 cm², 75cm²; TPP, Trasadigen) z nasaditveno gostoto 5×10^4 do 1×10^5 celic/cm² ter jim dodali ustrezno količino hranilnega medija UroM (-Ca²⁺+S). Kulture smo gojili v inkubatorju (Heracell, Heraceus) pri stalni temperaturi 37 °C in vlažni atmosferi s 5% CO₂ in jih dnevno pregledovali z invertnim mikroskopom (Leica DM IL).

3.1.3 Hranilni medij

V skladu s tipom poskusa smo uporabljali tri različne hranilne medije. Vsi so mešanica kemijsko definiranih medijev A-DMEM (Advanced Dulbecco's modification of Eagle's medium (Gibco)) ter MCDB 153 (Sigma) v razmerju 1:1. Hranilne medije smo poimenovali UroM. Razlike med uporabljenimi hranilnimi mediji so bile le v dodatku seruma (fetal bovine serum) in koncentraciji kalcija. Medije smo menjavali vsak dan, razen

ob vikendih. Sestave uporabljenih kemijsko definiranih medijev so v preglednicah 1, 2 in 3.

Preglednica 1 : Sestava hranilnega medija UroM (-Ca²⁺+S)

Sestavine	Koncentracije
MCDB 153 (Sigma)	50%
A-DMEM (Gibco)	50%
GlutaMax (Gibco)	4 mM
Adenin (Sigma)	6µg/ml
Inzulin (Sigma)	5 µg/ml
Hidrokortizon (Sigma)	0,5 µg/ml
Fosfoetanolamin (Sigma)	0,1 mM
Streptomycin	100 µg/ml
Penicilin	100 U/ml
Fetalni goveji serum (Gibco)	2,5 %
CaCl ₂	0,7 mM

Preglednica 2: Sestava hranilnega medija UroM (+Ca²⁺-S)

Sestavine medija	Koncentracije
MCDB 153 (Sigma)	50%
A-DMEM (Gibco)	50%
GlutaMax (Gibco)	4 mM
Adenin (Sigma)	6µg/ml
Inzulin (Sigma)	5 µg/ml
Hidrokortizon (Sigma)	0,5 µg/ml
Fosfoetanolamin (Sigma)	0,1 mM
Streptomycin	100 µg/ml
Penicilin	100 U/ml
CaCl ₂ (končna koncentracija kalcija)	2,5 mM

Preglednica 3: Sestava hranilnega medija UroM (+Ca²⁺ +S)

Sestavine	Koncentracije
MCDB 153 (Sigma)	50%
A-DMEM (Gibco)	50%
GlutaMax (Gibco)	4 mM
Adenin (Sigma)	6 µg/ml
Inzulin (Sigma)	5 µg/ml
Hidrokortizon (Sigma)	0,5 µg/ml
Fosfoetanolamin (Sigma)	0,1 mM
Streptomycin	100 µg/ml
Penicilin	100 U/ml
Fetalni goveji serum (Gibco)	2,5 %
CaCl ₂ (končna koncentracija kalcija)	2,5 mM

3.1.4 Sekundarne kulture prašičjih urotelijskih celic

Ko so primarne kulture dosegle 80-100% pokrovnost, smo jih nasadili na nove podlage in tako dobili sekundarne kulture, te pa smo ob enaki pokrovnosti zopet presajali naprej. V sekundarni celični kulturi smo celice gojili do desete (X.) pasaže. Kulture smo označevali z Pu, z zapisano pasažo presajanja (npr. Pu V. pasaže).

3.1.5 Določanje viabilnosti, presajanje celic

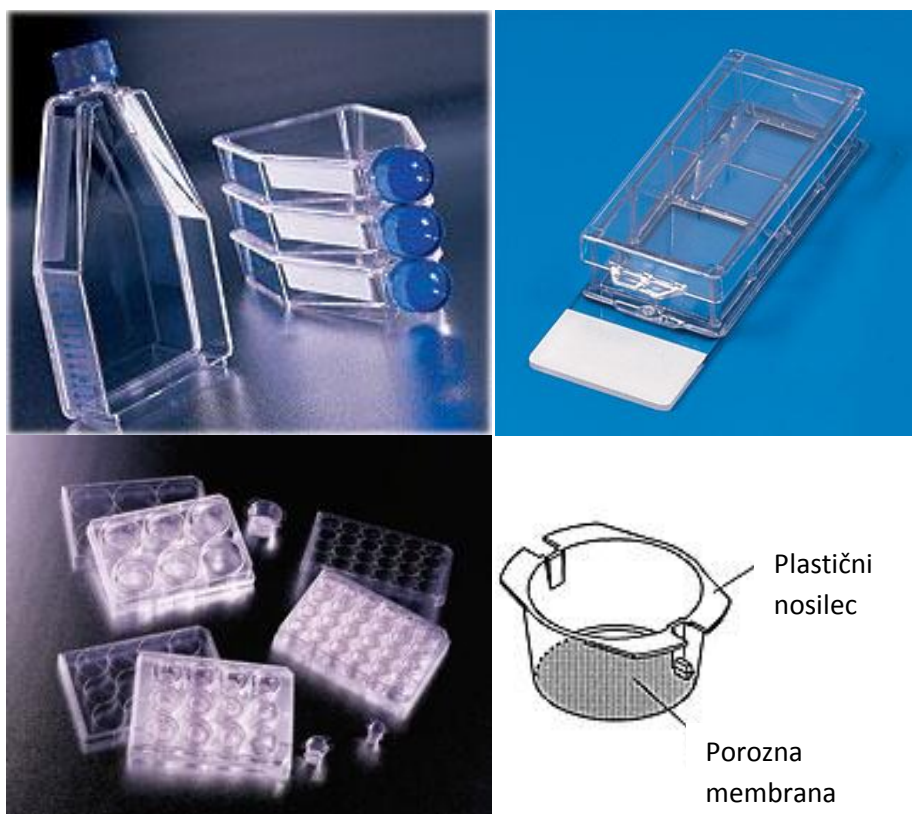
Preden smo celice presajali, smo jih prešteli in določili njihovo viabilnost. To smo delali s pomočjo hemocitometra z metodo, ki je dovolj natančna in učinkovita za rutinsko uporabo. Celicam smo odstranili hranilni medij, dodali ustrezno količino proteolitičnega encima Tripple select (Gibco) in počakali 5-10 minut ali dlje, da so se celice odlepile od podlage in zaokrožile. Po inkubaciji smo zaustavili delovanje encima z dodatkom hranilnega medija. Celice smo sprali s podlage, centrifugirali (5 minut, 200 g, 24 °C), odlili supernatant in dodali ustrezno količino hranilnega medija. Za štetje celic smo uporabili 50 µl celične suspenzije, kateri smo dodali 10 µl tripanskega modrila. To je barvilo, ki obarva celice s poškodovano plazmalemo, saj prehaja skozi njjo, če je le-ta poškodovana. Tako se nam mrtve oziroma poškodovane celice obarvajo modro, žive pa ostanejo svetle in okrogle.

Celice moramo prešteti takoj po dodatku tripanskega modrila, kajti daljša izpostavljenost tripanskemu modrilu povzroča poškodbe na celicah. Pripravljen vzorec (10 μ l) smo kanili na hemocitometer, ki je narejen tako, da se kapljica celične suspenzije razlije čez dve vgrajeni mrežici. Ti vsebujeta 8 kvadratkov, kjer ima vsak površino 1 mm². Iz povprečnega števila celic na kvadratega (volumen znaša 0,1 mm³) smo izračunali koncentracijo celic, torej število živih celic v mililitru medija ter viabilnost urotelijskih celic, ki je razmerje med živimi in vsemi celicami. Na osnovi štetja smo celice ustrezno redčili in nasadili.

Naslednji dan smo nasajene celične kulture sprali s svežim hranilnim medijem in s tem odstranili iz stekleničke nepritrjene, odmrle celice.

3.1.6 Sajenje celic na porozne membrane, prekatna stekelca

Glede na vrsto poskusa smo celice sekundarnih kultur prašičjih urotelijskih celic (Pu V.-X. pasaže) naprej nasajali na večprekatna stekelca (Falcon CultureSlide, Becton Dickinson) ali na porozne membrane različnih površin: 0,9 cm² ali 4,2 cm² (Falcon Cell Culture Insert, Becton Dickinson). Porozne membrane smo dali v plastične petrijevke primerne velikosti; po 6 membran v 6-prostorsko plastično petrijevko (Falcon Tissue Culture Plate, Becton Dickinson), v katere smo predhodno nalili 2 ml hranilnega medija. Pred nasajevanjem celic smo pustili membrane v plastičnih petrijevkah z medijem nekaj minut v inkubatorju. Te membrane imajo površino 4,2 cm² in velikost por 0,45 μ m. V 12-prostorske plastične petrijevke pa smo po istem postopku dajali membrane s površino 0,9 cm² in velikostjo por 0,45 μ m. V te smo predhodno nalili 1,5 ml hranilnega medija in jih prav tako pustili nekaj časa v inkubatorju skupaj z medijem, da so se hidrirale.



Slika 4: Različne podlage za nasajanje celic; stekleničke, večprekatna stekelca (desno zgoraj) ter porozne membrane v plastičnih petrijevkah (levo spodaj). Shema porozne membrane je desno spodaj.

3.2 TRAJNA CELIČNA LINIJA MDCK

Trajno celično linijo ledvičnih epitelijskih celic MDCK smo glede na vrsto poskusa nasajali na večprekatna stekelca, porozne membrane ter stekleničke različnih velikosti, enako kot prašičje urotelijske celice (glej 3.1.1, 3.1.2). Uporabljali smo hranilni medij iz kemijsko definiranega A-MEM medija (Gibco). Sestava hranilnega medija za celice MDCK je v preglednici 4. Medij smo menjavali vsak dan razen ob vikendih.

Preglednica 4: Sestava hranilnega medija za trajno celično linijo MDCK

Sestavine	Koncentracije
A-MEM (Gibco)	100%
GlutaMax (Gibco)	4 mM
Penicilin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Fetalni goveji serum (Gibco)	2,5%

3.3 TRETIRANJE CELIC Z NOKODAZOLOM

3.3.1 Določanje ustrezne koncentracije in časa inkubacije z nokodazolom

Za ugotavljanje ustrezne koncentracije nokodazola (Sigma), pri kateri preprečimo polimerizacijo vseh mikrotubulov, smo uporabili kulturo celic Pu VI. pasaže, ki so rasle na 4-preklatnih stekelcih. V posamezno kamrico smo dodali po 500 µl 10 µM, 66 µM oziroma 200 µM nokodazola (redčeno v hranilnem mediju UroM (-Ca²⁺ +S)) , v zadnjo pa smo dodali samo hranilni medij UroM (-Ca²⁺ +S) in inkubirali 1 uro (pri koncentraciji 10 µM pa 2 uri).

Ko smo določili ustrezno koncentracijo nokodazola, ki prepreči polimerizacijo mikrotubulov, smo ugotavljali še ustrezen čas inkubacije v nokodazolu. V posamezno kamrico s celicami kulture Pu VI. pasaže, smo dodali 500 µl, 66 µM nokodazola za 1 uro, 3 ure, 6 ur ali 24 ur pri 37 °C.

3.4 IMUNOFLUORESCENCA – α -TUBULINA

Nokodazol preprečuje polimerizacijo mikrotubulov, kar smo ugotavljali z imonooznačevanjem α -tubulina. Celice smo fiksirali s 4% paraformaldehidom (PA) 10 minut, spirali 15 minut s fosfatnim pufrom (PBS; pH 7,4) ter nato inkubirali z blokirnim pufrom (raztopina 0,5 % govejega serumskega albumina (BSA, Sigma); 0,1% saponina; 0,1% želatine, 50mM NH_4Cl ter 0,02 % NaN_3) 30 minut pri sobni temperaturi. Imunofluorescenčno smo označili α -tubulin v celicah, ki so rasle na poroznih membranah ter na večpreklatnih stekelcih. Porozne membrane s celičnimi kulturami smo po blokadi izrezali iz plastičnih nosilcev in protitelesa dodajali v obliki kapljic na porozne membrane, večpreklatnim stekelcem pa smo protitelesa dodajali v kamrice. S primarnimi mišjimi monoklonskimi protitelesi proti α -tubulinu (Sigma), razredčenimi 1:500 z 1% BSA v PBS, smo inkubirali kulture čez noč pri 4 °C. Sledilo je spiranje s PBS 30 minut in nato 90 minutna inkubacija z mišjimi sekundarnimi protitelesi, konjugiranimi z Alexa Fluor[®] 555 (Molecular Probes), razredčenimi 1:200 z 1% BSA v PBS. Preklatnim stekelcem smo odstranili stranske stene, dodali DAPI-Vectashield (glej 3.4.2) ter pokrili s krovnim stekelcem. Porozne membrane s celicami smo prenesli na objektna stekelca, dodali DAPI-Vectashield ter pokrili s krovnimi stekelci.

3.4.1 Označevanje kromatina s fluorescentnim barvilom DAPI

Fluorescentno barvilo DAPI (4,6- diamidine-2-phenylindole dihydrochloride) se specifično veže na kromatin. Z njim lahko ugotavljamo razporeditev jeder in prisotnost mitoz. Barvilo je že komercialno vključeno v medij proti bledenju (Vectashield z barvilom DAPI, Vector Laboratories). Porozne membrane s kulturami, ki smo jih pripravljali za različne imunofluorescenčne analize, smo vklopili v medij s fluorescentnim barvilom DAPI tik pred pokrivanjem s krovnimi stekelci. Če smo za imunofluorescenčne analize uporabljali kulture, ki smo jih gojili na preklatnih stekelcih, smo tem najprej odstranili stranske stene, nato pa podobno kot pri poroznih membranah dodali DAPI in pokrili s krovnimi stekelci.

3.5 UGOTAVLJANJE ENDOCITOTSKE AKTIVNOSTI

Endocitotsko aktivnost urotelijskih celic smo ugotavljali z membransko vezanim endocitotskim označevalcem WGA-FITC (lectin wheat germ aggglutinin), konjugiranim s FITC (fluorescein izotiocianat, zeleno fluorescenčno barvilo) (Sigma). WGA je lektin, izoliran iz pšenice (*Triticum vulgaris*), ki se veže na sialično kislino in N-acetilglukozaminske sladkorne ostanke.

3.5.1 Določanje ustreznega časa inkubacije z WGA-FITC

Pri poskusu smo uporabili kulturo celic Pu VII. pasaže, nasajene na porozne membrane z velikostjo por 0,45 μm ter površino 0,9 cm^2 . Za določanje vezave WGA-FITC na apikalno plazmalemo površinskih urotelijskih celic smo dodali 500 μl hranilnega medija z WGA-FITC (0,02 mg/ml) na apikalno stran urotelijskih kultur, ki so rasle 5 dni na poroznih membranah. Urotelijske kulture smo z WGA-FITC inkubirali različno dolgo (2 uri, 5 ur) in nato določili apikalno endocitozo membransko vezanega endocitotkega označevalca WGA-FITC. Celice smo fiksirali s 4% PA 10 minut pri sobni temperaturi v temi, sprali s PBS (pH 7,2), porozne membrane izrezali iz plastičnih nosilcev, prenesli na objektna stekelca, dodali DAPI-Vectashield ter pokrili s krovnimi stekelci. Kulture smo pregledali s fluorescenčnim mikroskopom (Nikon Eclipse TE 300) in slikali s fluorescenčnim mikroskopom AxioImager.Z1 z dodatkom ApoTome (Zeiss).

3.5.2 Ugotavljanje endocitotske aktivnosti netretiranih in z nokodazolom tretiranih urotelijskih celic

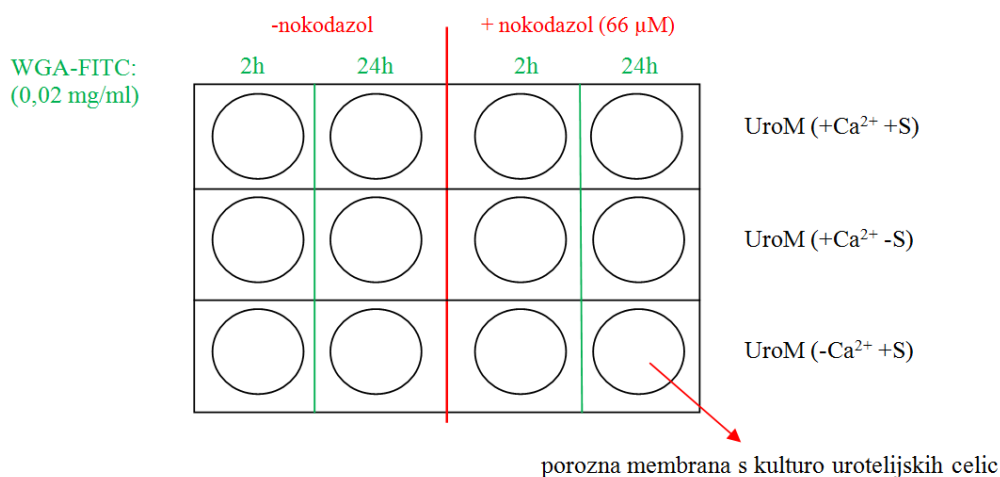
3.5.2.1. Prašičje urotelijske celice

Celične kulture Pu VII-IX. pasaže, nasajene na porozne membrane z velikostjo por 0,45 μm ter površino 0,9 cm^2 , smo gojili v hranilni mediju UroM ($-\text{Ca}^{2+}+\text{S}$), dokler niso dosegle konfluentnega stanja. Nato smo jih dva tedna gojili v različnih medijih (slika 5) in sicer UroM ($+\text{Ca}^{2+}+\text{S}$), UroM ($+\text{Ca}^{2+}-\text{S}$) ali UroM ($-\text{Ca}^{2+}+\text{S}$). Ker v predhodnem poskusu nismo ugotovili razlike glede prehajanja membransko vezanega endocitotkega označevalca

WGA-FITC v celice po 2 ali 5 urah inkubacije, smo uporabili čas inkubacije 2 uri in 24 ur pri enaki koncentraciji WGA-FITC (0,02 mg/ml). Celice smo inkubirali z WGA-FITC in hkrati tretirali z nokodazolom (koncentracije 66 μ M) ali pa smo jih samo inkubirali z WGA-FITC (slika 5). WGA-FITC smo vedno dodajali na apikalno stran kulture na porozni membrani (skupaj z nokodazolom, če smo celice tretirali z nokodazolom), pod porozno membrano pa smo dodali hranilni medij z nokodazolom. Tam kjer celic nismo tretirali z nokodazolom, smo samo zamenjali medij.

Serie urotelijskih kultur, ki smo jim dodali nokodazol, smo pred dodatkom WGA-FITC inkubirali 3 ure z nokodazolom, da smo preprečili polimerizacijo vseh mikrotubulov. Skupen čas inkubacije z nokodazolom je tako znašal 5 ur oziroma 27 ur.

Kulture smo fiksirali s 4% PA pri sobni temperaturi v temi, sprali s PBS (pH 7,2), porozne membrane s kulturami izrezali iz plastičnih nosilcev, jih prenesli na objektna stekelca, dodali DAPI-Vectashield ter pokrili s krovnimi stekelci. Poskus, kot je prikazan na shemi, smo ponovili še dvakrat.



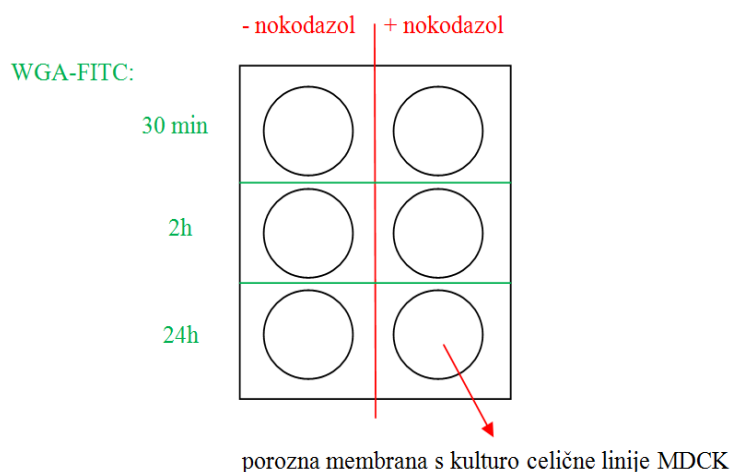
Slika 5: Shema poskusa za ugotavljanje endocitotske aktivnosti in prepustnosti prašičjih urotelijskih celic. Ko so kulture dosegle konfluentno stanje, smo jih gojili v različnih medijih UroM. Celice smo inkubirali z WGA-FITC 2 uri ali 24 ur, z in brez nokodazola.

3.5.2.2 Trajna celična linija MDCK

Endocitotsko aktivnost prašičjih urotelijskih celic smo primerjali z endocitotsko aktivnostjo celic MDCK.

Tudi celicam MDCK, ki so rasle na poroznih membranah površine $0,9\text{ cm}^2$, z velikostjo por $0,45\text{ }\mu\text{m}$ smo določili endocitotsko aktivnost z WGA-FITC. Tako kot pri prašičjih urotelijskih celicah je čas inkubacije z WGA-FITC znašal 2 uri ali 24 ur, poleg tega pa smo celice MDCK inkubirali tudi 30 minut z WGA-FITC. Eno serijo smo tretirali z nokodazolom ($66\text{ }\mu\text{M}$, dodali tri ure pred poskusom), druge pa nismo tretirali. Skupni čas inkubacije z nokodazolom je znašal 3 ure 30 minut, 5 ur ali pa 27 ur (slika 6).

Kulture smo fiksirali s 4% PA pri sobni temperaturi v temi, sprali s PBS (pH 7,2), porozne membrane s kulturami izrezali iz plastičnih nosilcev, prenesli na objektna stekelca, dodali DAPI-Vectashield ter pokrili s krovnimi stekelci. Poskus, kot je prikazan na shemi (slika 6), smo ponovili še dvakrat.



Slika 6: Shema poskusa za ugotavljanje endocitotske aktivnosti in prepustnosti celic MDCK. Celice smo inkubirali z WGA-FITC 30 minut, 2 uri ali 24 ur, z in brez nokodazola.

3.5.3 Kvantitativna analiza endocitotske aktivnosti

3.5.3.1. Prašičje urotelijske celice

Odvisnost endocitoze WGA-FITC od mikrotubulov in vrste hranilnega medija UroM smo ugotavljali z analizo slik, posnetih z AxioImager.Z1 z dodatkom ApoTome (Zeiss). Na vsakem preparatu iz poskusa opisanega v poglavju 3.5.2.1 smo naredili 3 naključne slike (skupno število slik za posamezno serijo je znašalo 9, ker smo vsak poskus naredili trikrat), na katerih smo potem z računalniškim programom »Count 3D« (Celica, Ljubljana) prešteli število endocitotskih veziklov. Pri štetju smo najprej izločili WGA-FITC, ki se je vezal na apikalno plazmalemo (enakomerna fluorescenca), nato pa smo šteli vezikle z WGA-FITC, ki so se nahajali v prvem razredu optičnih rezin (od 1.-10. optične rezine pod apikalno plazmalemo, vezikle z WGA-FITC, ki so se nahajali v drugem razredu optičnih rezin (od 10.-20. optične rezine) ter vezikle, ki so se nahajali v tretjem razredu optičnih rezin (med 20. in 35. optično rezino) pod apikalno plazmalemo (posamezna optična rezina 0,240 μm). Na posamezni sliki smo šteli vezikle na površini 6000 μm^2 .

Razlike v povprečnih vrednostih števila endocitotskih veziklov po posameznih razredih optičnih rezin med kulturami z dodanim nokodazolom in brez njega ter vpliv hranilnih medijev smo ocenili s Studentovim t-testom. V grafih smo za prikaz variabilnosti uporabljali standardne napake (kot tudi v vseh ostalih grafičnih prikazih).

3.5.3.2. Trajna celična linija MDCK

Tudi pri celicah MDCK smo ugotavljali odvisnost endocitotske aktivnosti od mikrotubulov z analizo slik, posnetih z AxioImager.Z1 z dodatkom ApoTome (Zeiss). Na vsakem preparatu iz poskusa opisanega v poglavju 3.5.2.2 smo prav tako naredili 3 naključne slike (skupno število slik za posamezno serijo je znašalo 9), na katerih smo potem z računalniškim programom »Count 3D« šteli število endocitotskih veziklov po postopku, opisanem v poglavju 3.5.3.1.

3.6 MERJENJE PREPUSTNOSTI S FLUORIMETROM

Vsem celičnim kulturam iz poskusa opisanega v poglavju 3.4 smo izmerili še prepustnost s fluorimetrom (PerkinElmerjev fluorescenčni spektrometer LS55), in sicer smo merili delež WGA-FITC, ki je prehajal iz medija na apikalni strani celične kulture v medij pod porozno membrano. Hranilni medij pod porozno membrano, v katerega je prehajal WGA-FITC smo zbrali (700 μ l) izmerili njegovo fluorescenco (vrednosti fluorescence hranilnega medija brez WGA-FITC smo odšteli). Hranilni medij, v katerega je prehajal WGA-FITC, smo nalili v kiveto, postavili v fluorimeter, ga presvetlili s svetlobo valovne dolžine 490 nm ter izmerili svetlobo, ki jo je emitiral vzorec pri valovni dolžini 520 nm. Za umeritveno krivuljo smo uporabili različne redčitve WGA-FITC (redčeno s sterilnim PBS).

Razlike v povprečnih vrednostih prepustnosti med urotelijskimi celičnimi kulturami z dodanim nokodazolom in brez njega ter vpliv hranilnih medijev na prepustnost smo ocenili s Studentovim t-testom.

Kulturam, ki smo jim merili prepustnost, je bila izmerjena tudi TER (Višnjar, 2009). Za prikaz odnosa med TER in prepustnostjo urotelijskih celic smo uporabili podatke samo enega poskusa (skupno smo poskus ponovili trikrat) (slika 16).

3.7 IMUNOFLUORESCENČNO OZNAČEVANJE UROPLAKINOV PO INKUBACIJI CELIC Z WGA-FITC

Pri poskusu smo uporabili celične kulture Pu IX. pasaže, ki so rasle na poroznih membranah površine 4,2 cm², z velikostjo por 0,45 μ m. Celične kulture smo gojili v mediju UroM (-Ca²⁺+S), dokler niso dosegle konfulentnega stanja, nato pa smo jih dva tedna gojili v hranilnem mediju UroM (+Ca²⁺+S). Shema poskusa je bila enaka kot pri poskusu opisanem v 3.5.2.1 (slika 5). Celice smo po inkubaciji z WGA-FITC in nokodazolom fiksirali s 4% PA 10 minut pri sobni temperaturi, spirali s PBS 15 minut ter inkubirali 30 minut v 1% BSA v PBS pri sobni temperaturi. S primarnimi zajčjimi poliklonskimi protitelesi, proti prečiščenim kravjim proteinom odebeljene apikalne plazmaleme urotelijskih celic, razredčenimi 1:1000 (proti AUM), ki močno reagirajo z

uroplakinom UP IIIa, srednje z UP Ia/Ib, in šibko z UP II (podaril prof. dr. Tung-Tien Sun), smo inkubirali celične kulture čez noč pri 4 °C. Sledilo je spiranje s PBS 30 minut in nato 90 minutna inkubacija s kozjimi sekundarnimi protitelesi, konjugiranimi s FITC (Sigma), razredčenimi 1:200 z 1% BSA v PBS, v temi. Po spiranju s PBS smo porozne membrane prenesli na objektna stekelca, dodali DAPI-Vectashield ter pokrili s krovnimi stekelci.

3.7.1 Kvantitativna analiza endocitotske aktivnosti urotelijskih celic glede na diferenciacijsko stopnjo

Odvisnost endocitotske aktivnosti urotelijskih celic od njihove diferenciacijske stopnje smo ugotavljali z analizo slik preparatov iz poskusa opisanega v 3.6, posnetih z AxioImager.Z1 z dodatkom ApoTome (Zeiss). Naredili smo 5 slik na naključnih mestih za vsak preparat, nato pa slike analizirali s programom Axio Vision 4,7. Primerjali smo intenzitete fluorescence rdečega in zelenega kanala slik AxioImager.Z1. Intenziteta fluorescence rdečega kanala predstavlja intenziteto imunofluorescenčne reakcije proti uroplakinom, kjer so bila sekundarna protitelesa konjugirana z Alexa Fluor[®] 555, intenziteta fluorescence zelenega kanala pa fluorescenco endocitotskega označevalca WGA-FITC. Izmerili smo maksimalno intenziteto fluorescence za rdeč in zelen kanal. Razlike v povprečju intenzitete fluorescence WGA-FITC med celicami z močnim izražanjem uroplakinov ali šibkim izražanjem uroplakinov smo ocenili s Studentovim t-testom.

V celicah smo tudi prešteli endocitotske vezikle z računalniškim programom »Count 3D«, po postopku opisanem v poglavju 3.5.3.1, le da so nas tu zanimali vsi endocitotski vezikli v posamezni celici.

3.8 PRESLIKAVA PO WESTERNU ZA MIKROTUBULE

Količino mikrotubulov smo ugotavljali na celičnih kulturah Pu VII. pasaže, ki so rasle na stekleničkah velikosti 75 cm². Polovico celic smo vedno gojili v hranilnem mediju UroM (-Ca²⁺+S), drugo polovico pa le do konfluentnega stanja; naprej smo jih gojili v hranilnem

mediju UroM (+Ca²⁺-S). Skupno smo celice gojili tri tedne. Vzorce smo pripravili tako, da smo celicam dodali proteolitični encim Tripple select, da so se celice odlepili od podlage. Nato smo jih centrifugirali 5 minut, pri 24 °C, 200 g. Supernatant smo odlili in celice sprali z medijem. Celice smo ponovno centrifugirali, popolnoma odstranili medij ter jih zamrznili pri -80 °C.

Celičnim peletom smo dodali pufer za izolacijo mikrotubulov (0,1 M PIPES, 2M glicerol, 5mM MgCl₂, 2mM EGTA, 1% Triton X-100 in mešanico proteaznih inhibitorjev), v razmerju 1:1 in razbili celice s potegi z injekcijami. Nato smo vzorce centrifugirali pri 4 °C, 10 minut, pri 14000 g (Eppendorf). Nastalim vzorcem smo določili koncentracijo proteinov po Bradfordovi metodi. Po dodatku Bradfordovega reagenta smo počakali 5 minut in s spektrofotometrom izmerili absorbance vzorcev pri valovni dolžini 600 nm.

Pred nanosom na gel smo vzorce skupaj z nanašalnim pufrom (125 mM TRIS pH 6,8, 4% SDS, 10% glicerol, 0,006% bromofenol blue, 1,8 β-merkaptotanol) 10 minut vrel v vodni kopeli. Po končani elektroforezi smo proteine prenesli na PVDF membrane (BioRad) in nato membrane čez noč blokirali s 5% mlekom brez maščob v 0,1 % Tween-20 v PBS (pH 7,4). Nato smo membrane inkubirali 2 uri s primarnimi mišjimi monoklonskimi protitelesi proti α-tubulinu v razmerju 1:500 v 0,1 % Tween-20 v PBS pri sobni temperaturi. Sledilo je spiranje v 0,1 % Tween-20 v PBS. Nato smo dodali ustrezna sekundarna protitelesa, konjugirana s peroksidazo (Sigma) za 1 uro pri sobni temperaturi. Proteinske proge (angl. protein bands) smo detektirali s kemiluminiscenco (ECL detekcijski sistem, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.).

3.9 IMUNOFLUORESCENCA - AKTINA

Za poskus smo uporabili kulturo prašičjih urotelijskih celic X. pasaže, nasajeno na porozne membrane s površino 0,9 cm² in velikostjo por 0,45 μm. Do konfluentnosti smo celice gojili v hranilnem mediju UroM (-Ca²⁺+S), nato pa smo jih dva tedna gojili v različnih hranilnih medijih; UroM (+Ca²⁺ +S), UroM (+Ca²⁺-S) ali UroM (-Ca²⁺+S). Polovico celičnih kultur smo tretirali z nokodazolom (66 μM) za 5 ur.

Celice smo fiksirali s 4% PA 10 minut. Po fiksaciji smo kulture spirali v PBS 30 minut, nato pa še 30 minut inkubirali v faloidinu (Phalloidin, Sigma), redčenem 1:5 v temi. Sledilo je spiranje v PBS, prenos membran na krovna stekelca, dodajanje DAPI-Vectashield ter pokritje s krovnimi stekelci.

3.9.1 Kvantitativna analiza prisotnosti aktina v apikalni citoplazmi celic

Kvantitativno analizo prisotnosti aktina smo izvedli z analizo slik preparatov iz poskusa opisanega v poglavju 3.9., posnetih z AxioImager.Z1 z dodatkom ApoTome (Zeiss). Naredili smo 5 naključnih slik (čas osvetljevanja pri zeleni fluorescenci je bil vedno enak in sicer 16 ms) za vsak preparat, nato pa slike analizirali s pomočjo programa Axio Vision 4,7. Zanimal nas je zelen kanal slik AxioImager.Z1, kajti intenziteta fluorescence zelenega kanala predstavlja intenziteto fluorescence faloidina. Na vsaki celici smo izmerili maksimalno fluorescenco zelenega kanala. Razlike med povprečjem intenzitete fluorescence faloidina med celicami z dodanim nokodazolom in brez dodanega nokodazola smo ocenili s Studentovim t-testom.

3.10 IMUNOFLUORESCENČNO OZNAČEVANJE PROTEINOV MEDCELIČNIH STIKOV

Ugotavljali smo vpliv nokodazola na tesne stike, adherentne stike ter dezmosome. Z imunofluorescenčnim označevanjem tesnih stikov smo preverili ali WGA-FITC prehaja v celice le iz apikalne plazmaleme ali tudi lateralne.

Uporabili smo kulture prašičjih urotelijskih celic VII. in IX. pasaže, nasajene na porozne membrane površine $4,2 \mu\text{m}^2$ z velikostjo por $0,45 \mu\text{m}$. Kulture celic smo inkubirali samo z WGA-FITC (2 uri, 24 ur) ali samo z nokodazolom (5 ur, 27 ur) ali pa smo kombinirali inkubacijo z WGA-FITC ter tretiranje z nokodazolom (tretiranje z nokodazolom ($66 \mu\text{M}$) za 3 ure, nato pa skupaj z WGA-FITC inkubacija še 2 uri ali 24 ur - skupni čas inkubacije z nokodazolom je znašal 5 oziroma 27 ur). Za kontrolo so služile kulture, ki jih nismo tretirali z nokodazolom ali inkubirali z WGA-FITC.

3.10.1 Imunofluorescenca– okludina in klavdina-8

V celičnih kulturam iz poskusa opisanega v poglavju 3.10 smo označili proteine tesnih stikov tako, da smo te najprej fiksirali skupaj s porozno membrano v ohlajenem 100% etanolu 25 minut. Po fiksaciji smo kulture spirali 15 minut v PBS. Nespecifično vezavo protiteles smo preprečili z inkubacijo kultur v 1% BSA v PBS 30 minut. S primarnimi zajčjimi poliklonskimi protitelesi proti okludinu (Zymed Laboratories), razredčenimi 1:20 z 1% BSA v PBS oziroma z zajčjimi poliklonskimi protitelesi proti klavdinu-8 (Molecular Probes), razredčenimi 1:400 z 1% BSA v PBS smo inkubirali kulture čez noč pri 4 °C. Sledilo je spiranje s PBS 30 minut, inkubacija s kozjimi sekundarnimi protitelesi, konjugiranimi s Alexa Fluor® 555 (Molecular Probes), razredčenimi 1:200 z 1% BSA v PBS, v temi. Po spiranju s PBS smo membrane prenesli na objektna stekelca, dodali DAPI-Vectashield ter pokrili s krovnimi stekelci.

3.10.2 Imunofluorescenca– γ -katenina

Protein adherentnih stikov – γ -katenin smo imunofluorescenčno označili samo na kulturah, ki smo jim dodali nokodazol za 5 ur in 27 ur ter kontroli.

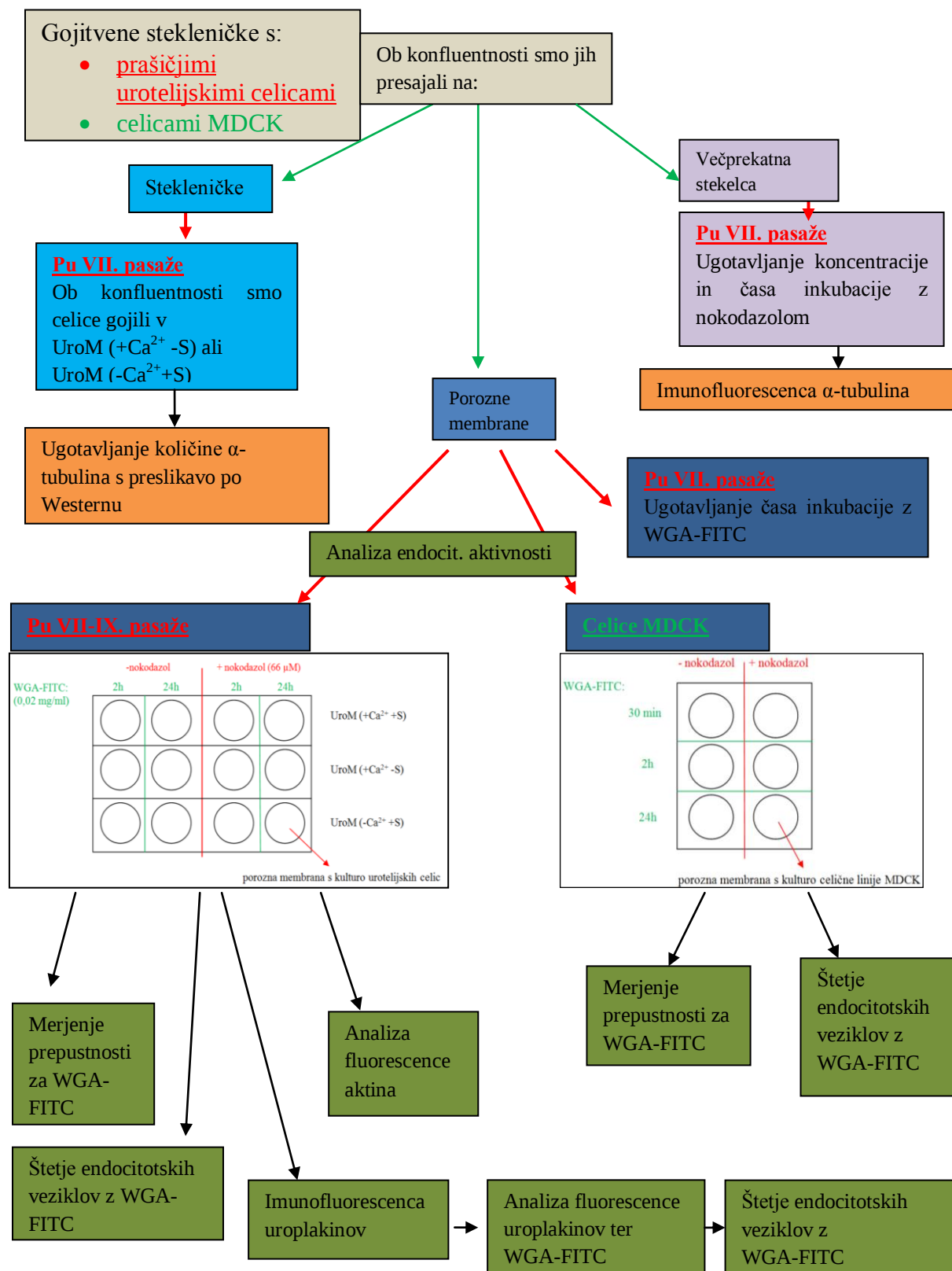
Celične kulture smo fiksirali skupaj z membrano v ohlajenem 100% etanolu 25 minut. Po fiksaciji smo kulture spirali 15 minut v PBS. Nespecifično vezavo protiteles smo preprečili z inkubacijo kultur v 1% BSA v PBS 30 minut. S primarnimi zajčjimi protitelesi proti γ -kateninu (Transduction Laboratories), razredčenimi 1:500 z 1% BSA v PBS, smo inkubirali kulture čez noč pri 4 °C. Sledilo je spiranje s PBS 30 minut in inkubacija s kozjimi sekundarnimi protitelesi, konjugiranimi z Alexa Fluor® 488, razredčenimi 1:200 z 1% BSA v PBS, v temi. Po spiranju s PBS smo membrane prenesli na objektna stekelca, dodali DAPI-Vectashield ter pokrili s krovnimi stekelci.

3.10.3 Imunofluorescenca– dezmozoplakina

Protein dezmosomov - dezmozoplakin smo imunofluorescenčno označili samo na kulturah, ki smo jim dodali nokodazol za 5 ur in 27 ur ter kontroli.

Urotelijske celice smo skupaj s porozno membrano fiksirali v ohlajenem metanolu 5 minut, nato pa v ohlajenem acetonu 30 sekund. Sledilo je spiranje s PBS 15 minut. Nespecifično vezavo protiteles smo preprečili z inkubacijo kultur v 2% BSA v PBS 30 minut. S primarnimi mišjimi monoklonskimi protitelesi proti dezmozplakinu, (Harlan Sera-Lab), razredčenimi 1:50 z 1% BSA v PBS, smo inkubirali kulture čez noč pri 4 °C. Sledilo je spiranje s PBS 30 minut in inkubacija s kozjimi sekundarnimi protitelesi, konjugiranimi z Alexa Fluor® 555 ali 488 (Molecular Probes), razredčenimi 1:200 z 1% BSA v PBS, v temi. Po spiranju s PBS smo membrane prenesli na objektna stekelca, dodali DAPI-Vectashield ter pokrili s krovnimi stekelci.

3.11 SHEMATSKI PRIKAZ VSEH POSKUSOV



4 REZULTATI

4.1 TRETIRANJE PRAŠIČJIH UROTELIJSKIH CELIC Z NOKODAZOLOM

4.1.1 Nokodazol preprečuje polimerizacijo mikrotubulov

Urotelijske celice smo tretirali z različnimi koncentracijami nokodazola. Polimerizacijo vseh mikrotubulov, smo preprečili že pri 33 μM nokodazola, v vseh nadaljnjih poskusih pa smo uporabljali vmesno koncentracijo med 33- in 200 μM , torej 66 μM . S faznim kontrastom smo ugotovili, da je ostala oblika celic po tretiranju z nokodazolom (pri vseh koncentracijah) nespremenjena (slika 7).

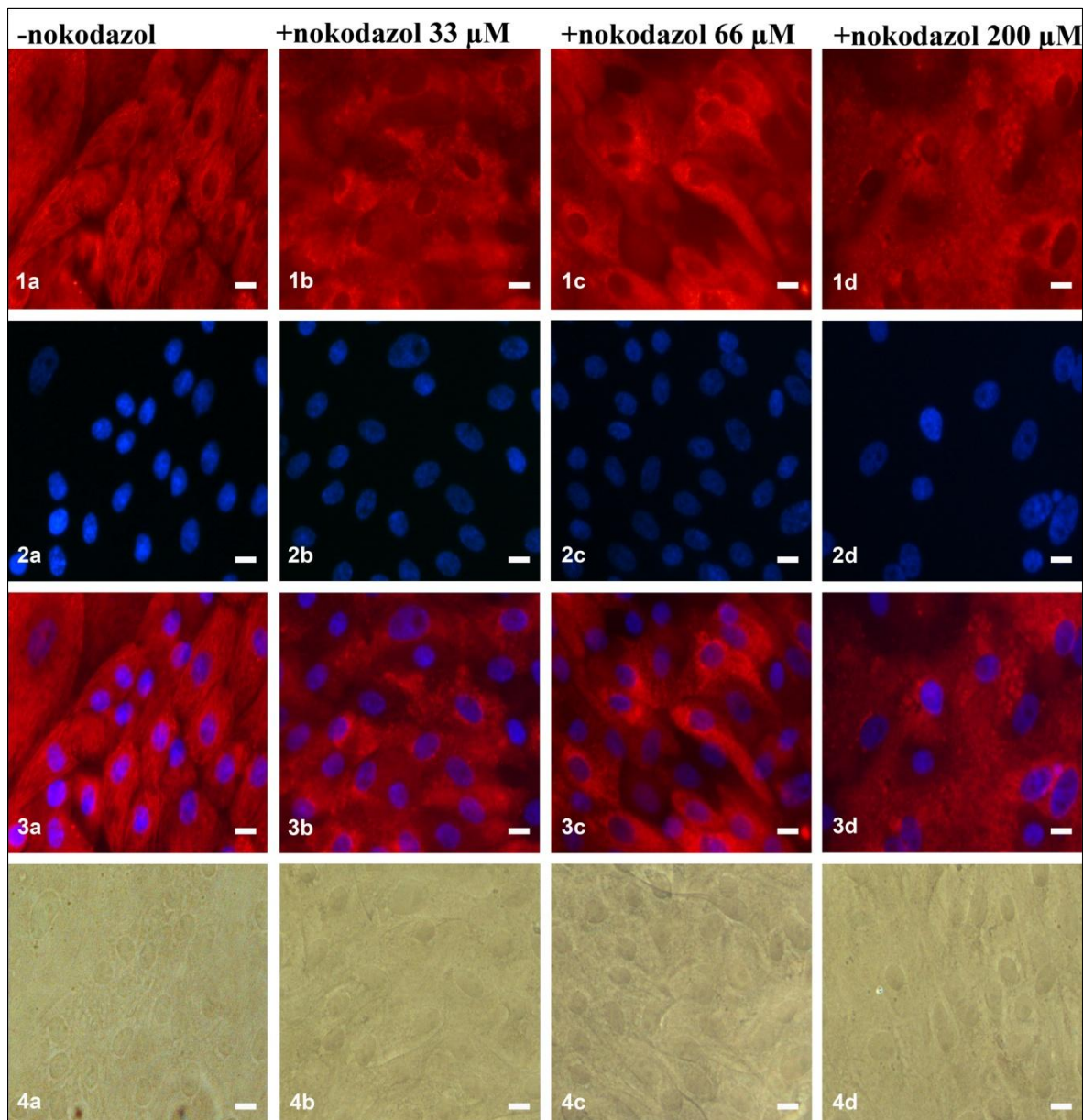
Pri inkubaciji celic z nokodazolom koncentracije 66 μM za eno uro ostanejo prisotni še posamezni mikrotubuli, medtem ko je po 3 urah vsa polimerizacija mikrotubulov v celoti preprečena. Prav tako tretiranje celic 6 ur ali 25 ur z nokodazolom v celoti prepreči polimerizacijo mikrotubulov. V celicah, ki jih nismo tretirali z nokodazolom, so mikrotubuli tvorili mrežast preplet (slika 8).

4.1.2 Nokodazol ne poškoduje medceličnih stikov

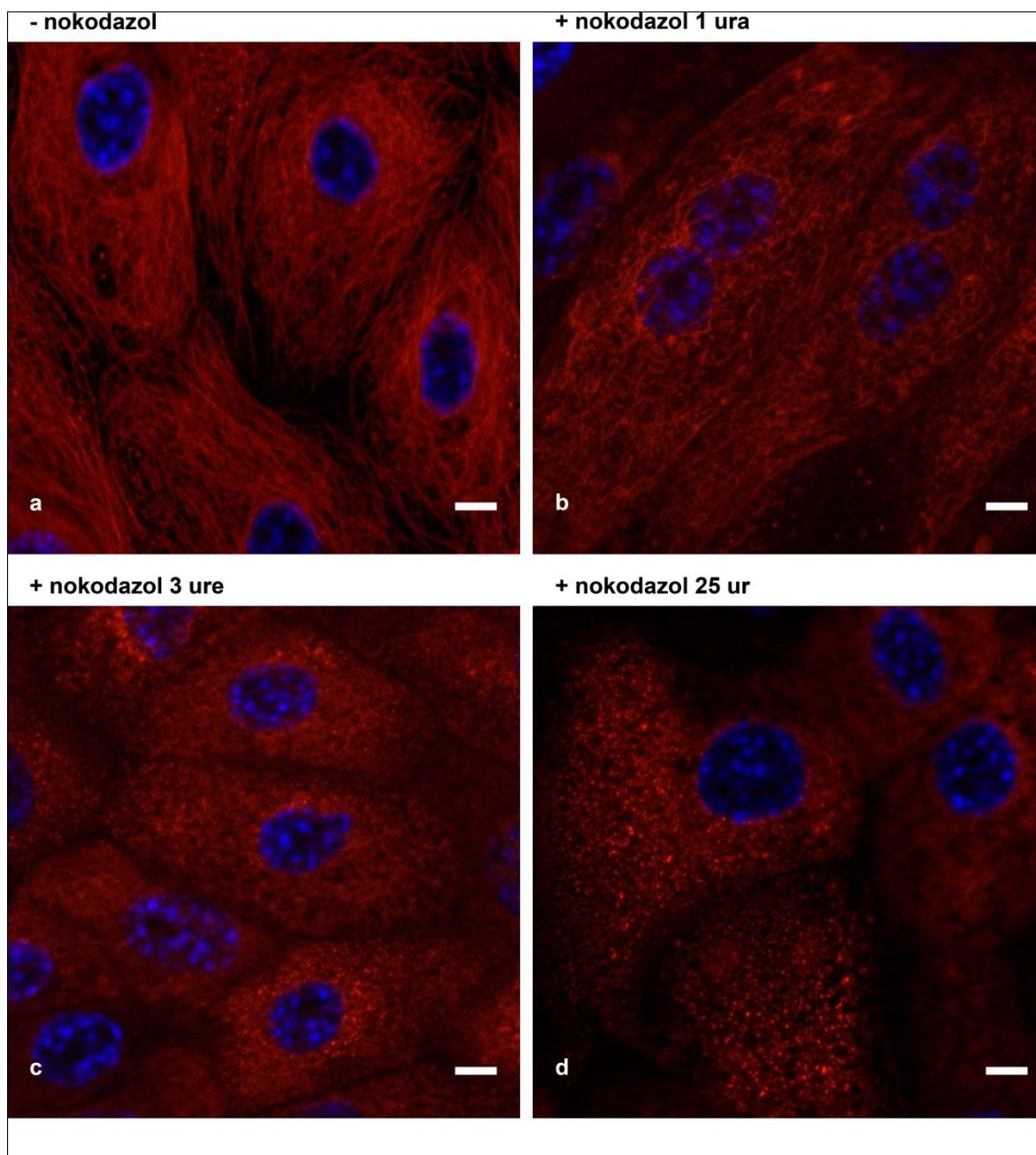
Učinek nokodazola na medcelične stike smo preverili z imunofluorescenco medceličnih stikov. Prašičje urotelijske celice, tretirane z nokodazolom 5 ur ali 27 ur, so imele nepoškodovane medcelične stike. Imunofluorescenčna reakcija je bila pozitivna tako za klavdin-8, okludin (tesni stiki) kot za γ -katenin (adherentni stiki) ter dezmozoplakin (dezmosomi). Nokodazol ni povzročil poškodb na medceličnih stikih, zato smo lahko izločili vpliv nokodazola na prehajanje endocitotskega označevalca WGA-FITC v celice iz apikolateralne in bazolateralne strani.

Klavdin-8 je bil prisoten le v lateralnih plazmalemah celic v površinskem skladu, prav tako okludin. Katenin gama se je pojavljal v obliki sklenjenih linij v lateralni plazmalemah urotelijskih celic v vseh skladih. Ker so dezmosomi točkaste strukture se je dezmozoplakin

pojavljaj v obliki bolj ali manj pikčastih linij v lateralni plazmalemi urotelijskih celic v vseh skladih (slika 10, 11 in 12).



Slika 7: Imunofluorescenca α -tubulina (rdeče) (1) in fluorescenca kromatina (modro, označen z DAPI) (2) urotelijskih celic, ki jih nismo tretirali z nokodazolom (a) ter celic, tretiranih z nokodazolom različnih koncentracij: 33 μ M (b), 66 μ M (c) ter 200 μ M (d). (3) Sestavljene slike imunofluorescence α -tubulina in fluorescence kromatina označenega z DAPI, (4) celice slikane s faznim kontrastom. Merilce: 12 μ m



Slika 8: Imunofluorescenca α -tubulina (rdeče) urotelijskih celic, ki jih nismo tretirali z nokodazolom (a) in tretiranih z nokodazolom koncentracije 66 μ M po 1 uri (b), 3 urah (c) in 25 urah (d). Kromatin je označen z barvilom DAPI (modro). Merilce 5 μ m.

4.2 INKUBACIJA CELIC Z WGA-FITC

4.2.1 Čas inkubacije vpliva na prehajanje WGA-FITC v urotelijske celice

Prašičje urotelijske celice smo inkubirali z WGA-FITC, koncentracije 0,02 mg/ml, 2 uri, 5 ur ter 24 ur.

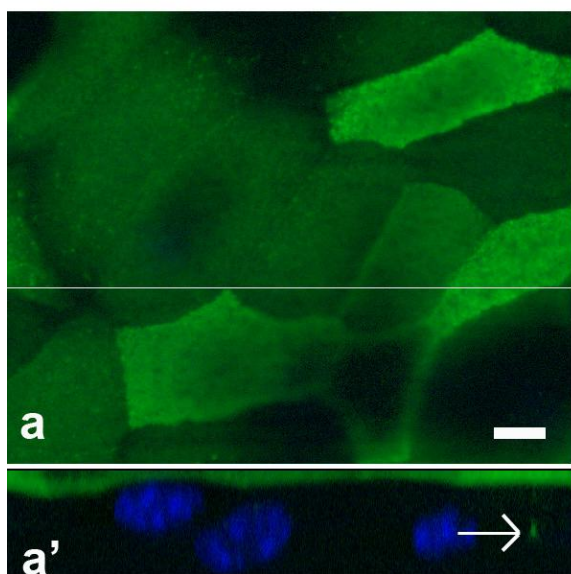
Po 2 in 5 urni inkubaciji z WGA-FITC ta ostane večinoma vezan na plazmalemi urotelijskih celic, pod apikalno plazmalemo pa so posamezni manjši vezikli z WGA-FITC. Po 24 urni inkubaciji je WGA-FITC večinoma pod apikalno plazmalemo urotelijskih celic, poleg majhnih veziklov z WGA-FITC pa smo opazili tudi večje vezikle (slika 9).

Razlik v prehajanju WGA-FITC v vezikle pod apikalno plazmalemo urotelijskih celic po 2 in 5 urni inkubaciji z WGA-FITC ni bilo, zato smo v nadaljnjih poskusih uporabljali čas inkubacije z WGA-FITC 2 uri in 24 ur.

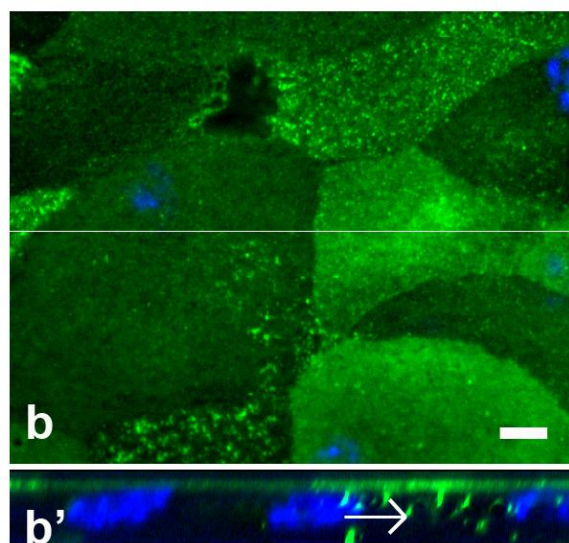
4.2.2 WGA-FITC ne poškoduje tesnih stikov

Preverili smo tudi morebiten vpliv WGA-FITC na tesne stike, da bi ugotovili, če WGA-FITC prehaja v celice poleg iz apikalne tudi iz bazolateralne strani. Tako kot nokodazol tudi WGA-FITC ne poškoduje medceličnih stikov. Imunofluorescenčna reakcija je bila pozitivna tako za okludin (slika 10) kot klavdin-8 (slika 11), če smo celice inkubirali z WGA-FITC 2 uri ali 24 ur in tudi če smo obenem urotelijske celice tretirali z nokodazolom 5 ali 27 ur.

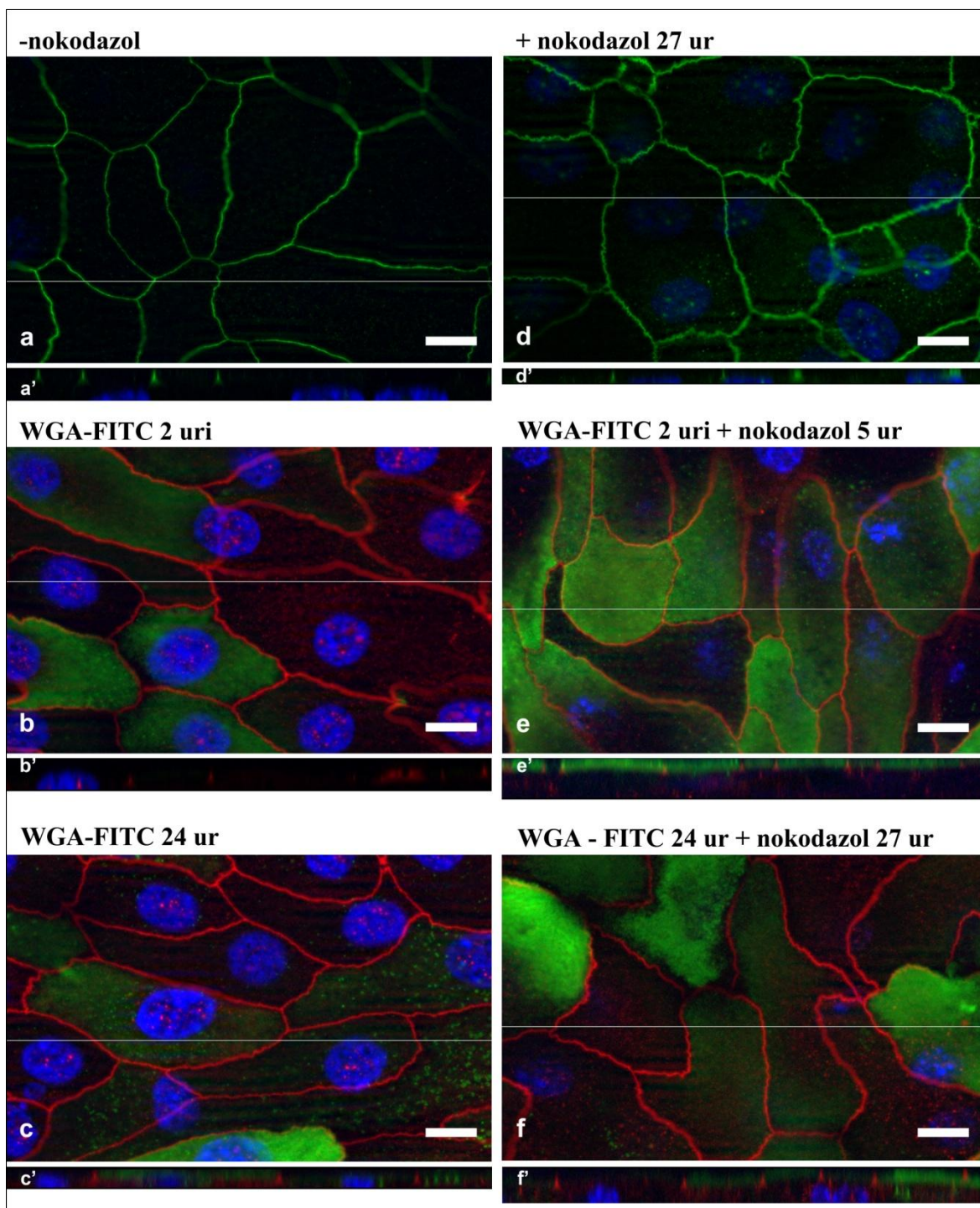
WGA - FITC 2 uri



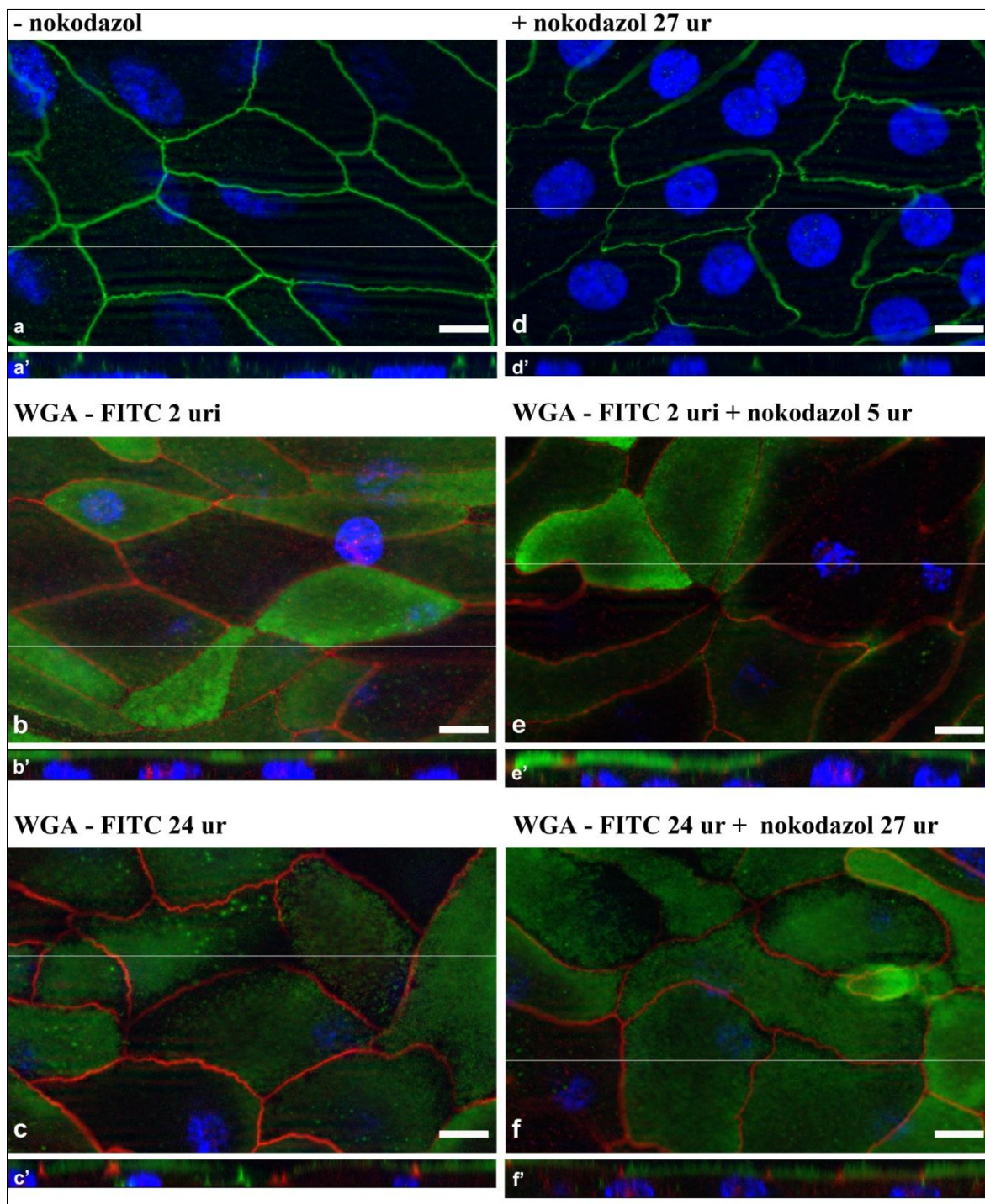
WGA - FITC 24 ur



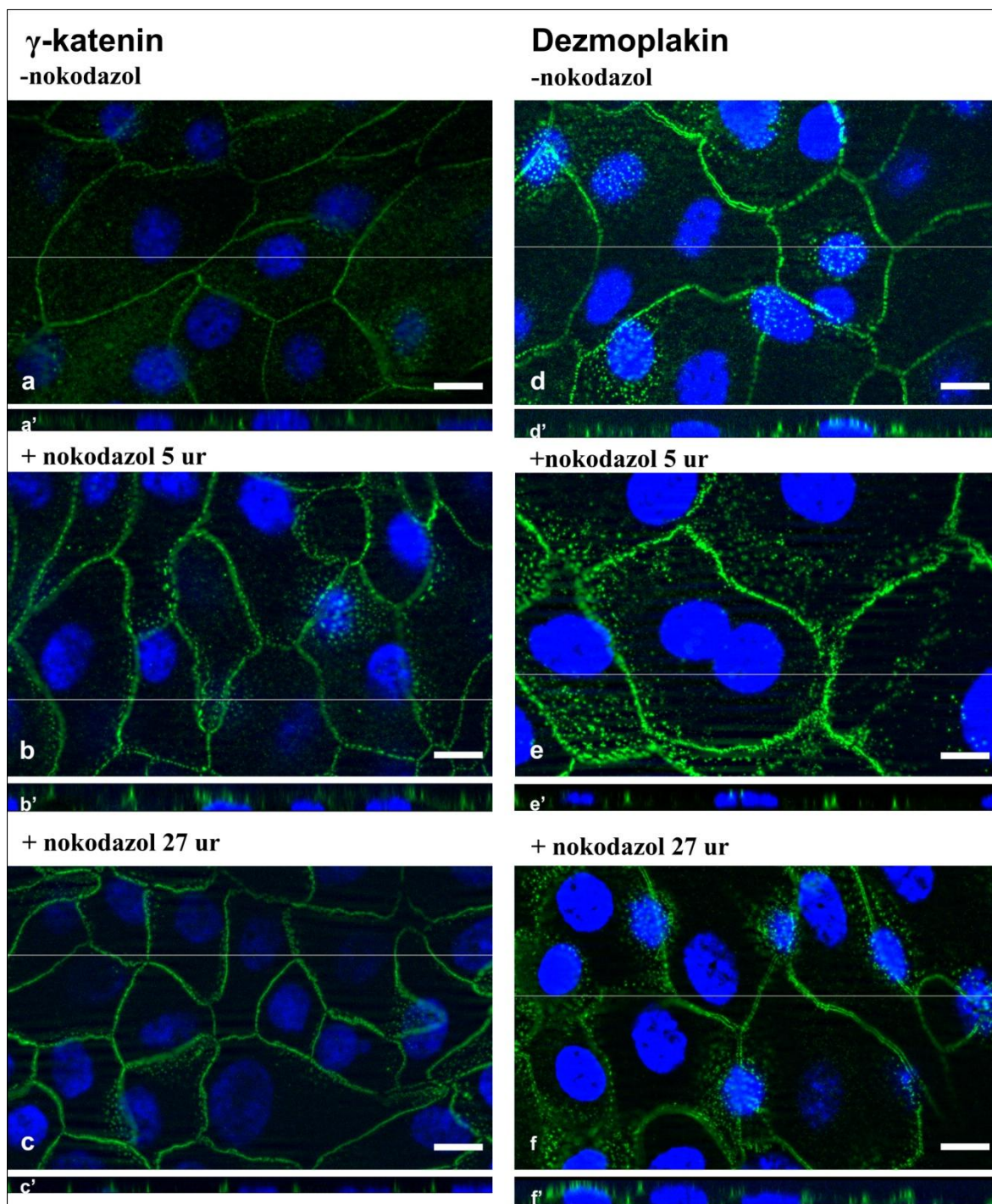
Slika 9: Vezava WGA-FITC na apikalno plazmalemo površinskih urotelijskih celic po inkubaciji z WGA-FITC (0,02 mg/ml) za 2 uri (a) in 24 ur (b). Po 24 urni inkubaciji celic z WGA-FITC je vidnih v celicah več veziklov z WGA-FITC kot po 2 urni inkubaciji WGA-FITC. (puščica) Endocitotski vezikli z WGA-FITC. (a',b') Prečni prerez na področju sive črte. Merilce 5 μ m.



Slika 10: Imunofluorescenca okludina v urotelijskih celicah. Urotelijske celice smo inkubirali z WGA-FITC 2 uri (b) in 24 ur (c) brez tretiranja z nokodazolom ali smo jih tretirali z nokodazolom in inkubirali z WGA-FITC za 2 uri (tretiranje z nokodazolom 5 ur) (e) in 24 ur (tretiranje z nokodazolom 27 ur) (f). (a) Urotelijskih celic nismo tretirali z nokodazolom, niti inkubirali z WGA-FITC. (a',b',c',d',e',f') Prečni prerez v področju sive črte. Merilce 5 μ m.



Slika 11: Imunofluorescenca klavdina-8 v urotelijskih celicah. Urotelijske celice smo inkubirali z WGA-FITC 2 uri (b) in 24 ur (c) brez tretiranja z nokodazolom ali smo jih tretirali z nokodazolom in inkubirali z WGA-FITC za 2 uri (tretiranje z nokodazolom 5 ur) (e) in 24 ur (tretiranje z nokodazolom 27 ur) (f). (a) Urotelijskih celic nismo tretirali z nokodazolom, niti inkubirali z WGA-FITC. (a',b',c',d',e',f') Prečni prerez v področju sive črte. Merilce 5 μm.



Slika 12: Imunofluorescenca γ -katenina (a,b,c) in dezmoplakina (d,e,f) po tretiranju urotelijskih celic z nokodazolom 5 ur (b,d), 27 ur (c,f) ali brez tretiranja z nokodazolom (a,d). (a',b',c',d',e',f') Prečni prerez v področju sive črte. Merilce 5 μ m.

4.3 ENDOCITOTSKA AKTIVNOST UROTELIJSKIH CELIC GLEDE NA NJIHOVO DIFERENCIACIJSKO STOPNJO

Za ugotavljanje odvisnosti endocitoze membransko vezanega označevalca WGA-FITC od diferenciacijske stopnje površinskih urotelijskih celic smo celice po inkubaciji z WGA-FITC še imunofluorescenčno označili z uroplakini. Izmerili smo maksimalno fluorescenco uroplakinov in WGA-FITC ter prešteli število veziklov z WGA-FITC v teh celicah.

Površinske urotelijske celice z veliko uroplakini na apikalni plazmalemi so imele manj vezanega WGA-FITC na apikalni plazmalemi, tako tiste, ki smo jih tretirali z nokodazolom kot tiste, ki niso bile tretirane z nokodazolom.

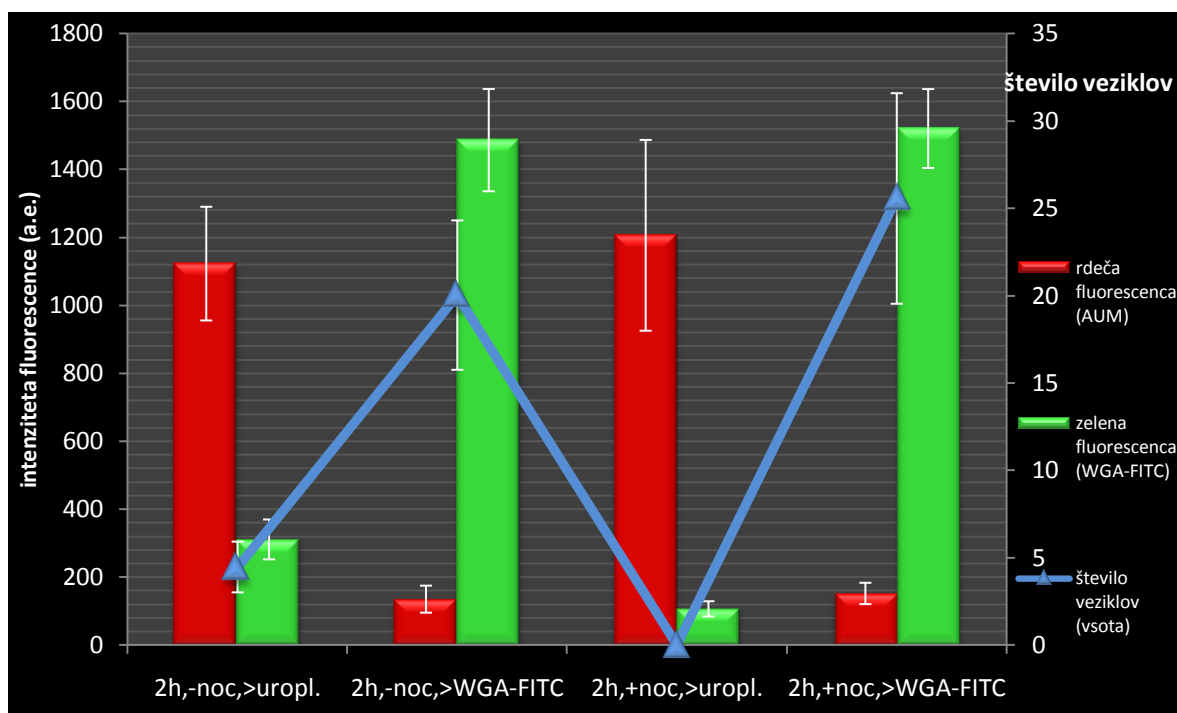
4.3.1 Endocitotska aktivnost prašičjih urotelijskih celic po 2 urni inkubaciji z WGA-FITC

Po 2 urni inkubaciji prašičjih urotelijskih celic z WGA-FITC (slika 13 in 15) ter z ali brez tretiranja z nokodazolom, so imele visoko diferencirane celice z več uroplakini v apikalni plazmalemi (intenziteta fluorescence uroplakinov $1122,5 \pm 167,3$ a.e. v celicah brez nokodazola in $1205 \pm 280,8$ a.e. v celicah z nokodazolom) vezanega manj WGA-FITC (intenziteta fluorescence WGA-FITC $310,7 \pm 58,7$ a.e. v celicah brez nokodazola in $106,1 \pm 22,8$ a.e. v celicah z nokodazolom) kot celice z manj uroplakini. Delno diferencirane urotelijske celice z manj uroplakini (intenziteta fluorescence uroplakinov $134,7 \pm 39,8$ a.e. v celicah brez nokodazola in $151,6 \pm 31,4$ a.e. v celicah z nokodazolom) so imele na apikalni plazmalemi vezanega več WGA-FITC (intenziteta fluorescence WGA-FITC $1486 \pm 150,5$ a.e. v celicah brez nokodazola in $1520,1 \pm 116,1$ a.e. v celicah z nokodazolom). Med visoko diferenciranimi in delno diferenciranimi celicami je bila statistično značilna razlika $P < 0,01$.

Tudi število veziklov z WGA-FITC v površinskih urotelijskih celicah je bilo manjše v visoko diferenciranih celicah z več uroplakini, in sicer je znašalo $4,5 \pm 1,4$ veziklov kadar celice nismo tretirali z nokodazolom ter nič veziklov po tretiranju celic z nokodazolom. Delno diferencirane urotelijske celice z manj uroplakini, ki jih nismo tretirali z nokodazolom so imele v povprečju $20 \pm 4,3$ veziklov, tretirane celice pa $25,5 \pm 6$ veziklov.

Med visoko diferenciranimi in delno diferenciranimi celicami je bila statistično značilna razlika $P < 0,01$.

Rezultati meritev in opisna statistika so v prilogi A.



Slika 13: Analiza intenzitete fluorescenca WGA-FITC in uroplakinov v površinskih urotelijskih celicah z veliko WGA-FITC vezanega na apikalni plazmalemi ali z veliko uroplakini v apikalni plazmalemi. Vsota veziklov predstavlja število veziklov v posamezni celici. Celične kulture so bile inkubirane 2 uri z WGA-FITC, z ali brez nokodazola. Celice z več uroplakini imajo manjše število veziklov z WGA-FITC in manj vezanega WGA-FITC na apikalni plazmalemi, v primerjavi s celicami z manj uroplakini ($P < 0,01$).

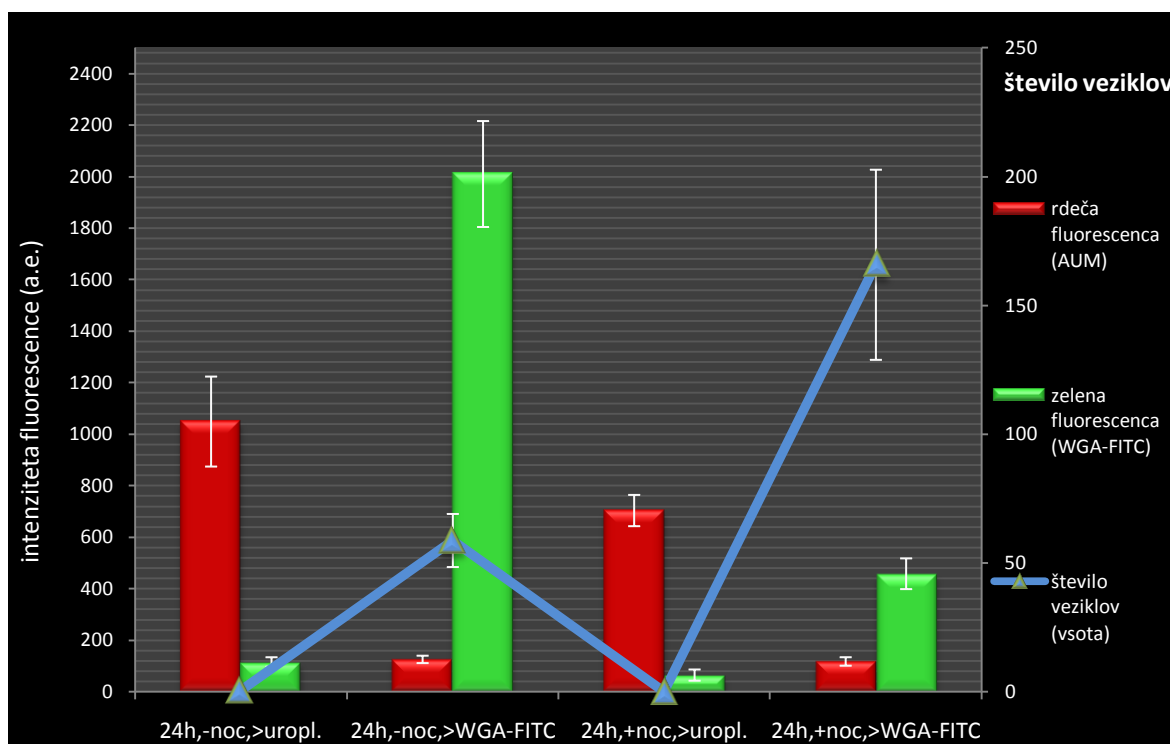
4.3.2 Endocitotska aktivnost prašičjih urotelijskih celic po 24 urah inkubacije z WGA-FITC

Podobno kot po 2 urah inkubacije z WGA-FITC so tudi po 24 urah inkubacije z WGA-FITC (slika 14 in 15) imele visoko diferencirane površinske urotelijske celice z več uroplakini (intenziteta fluorescenca uroplakinov $974,5 \pm 154,3$ a.e. v celicah brez nokodazola in $645,5 \pm 65,61$ a.e. v celicah z nokodazolom) na apikalni plazmalemi

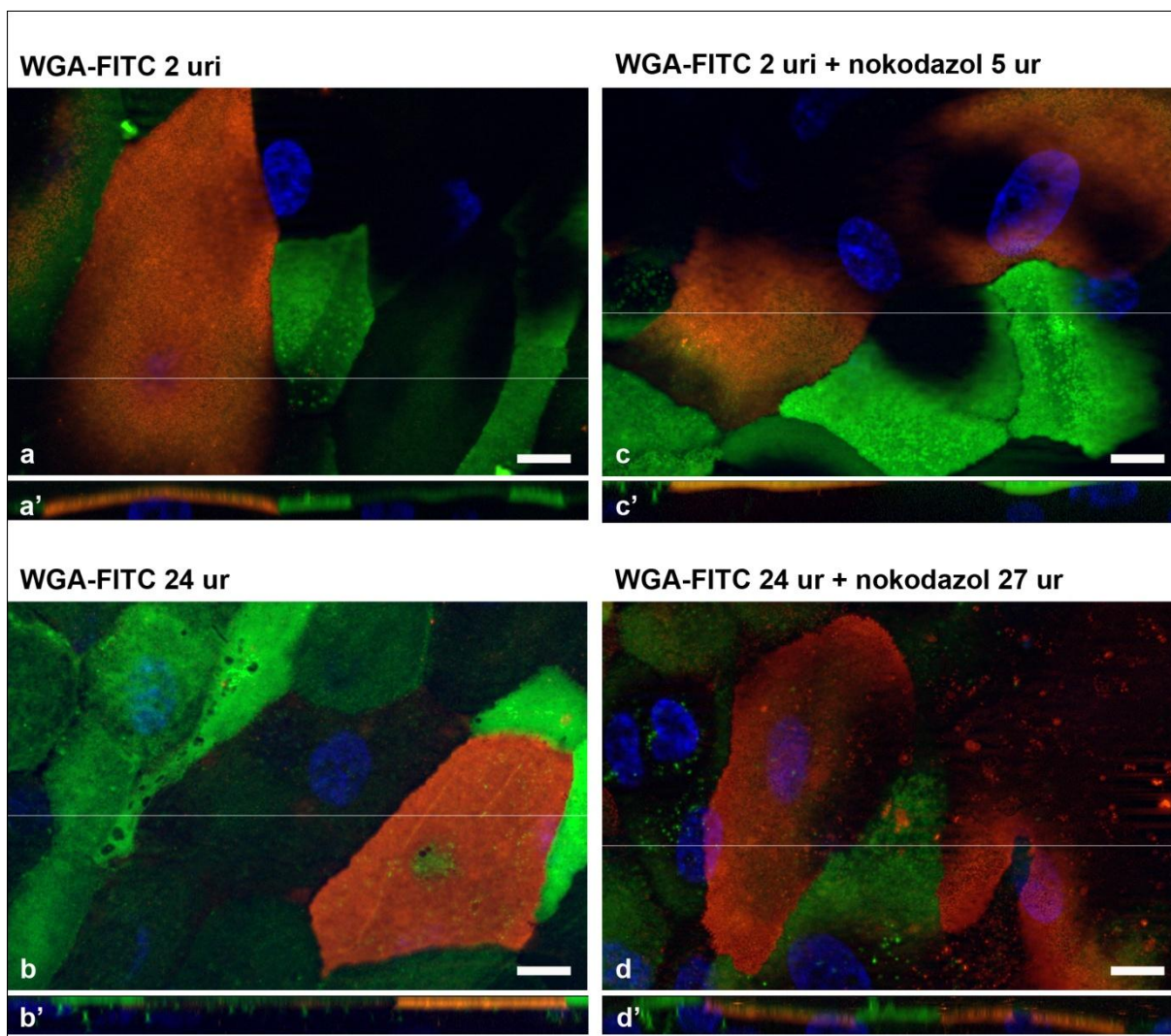
vezanega manj WGA-FITC (intenziteta fluorescence WGA-FITC $117,2 \pm 15,5$ a.e. v celicah brez nokodazola in $98,45 \pm 35,2$ a.e. v celicah z nokodazolom) kot celice z manj uroplakini. Delno diferencirane urotelijske celice z manj uroplakini (intenziteta fluorescence uroplakinov $124,6 \pm 14,3$ a.e. v celicah brez nokodazola in $116,7 \pm 16,4$ a.e. v celicah z nokodazolom) so imele na apikalni plazmalemi vezanega več WGA-FITC (intenziteta fluorescence WGA-FITC $2008,9 \pm 195,7$ a.e. v celicah brez nokodazola in $457,17 \pm 59,7$ a.e. v celicah z nokodazolom). Med visoko diferenciranimi celicami in delno diferenciranimi celicami je bila statistično značilna razlika $P < 0,01$.

Število veziklov z WGA-FITC v površinskih celicah je bilo večje v celicah s šibkim izražanjem uroplakinov, in sicer $58,6 \pm 10,3$ veziklov v povprečju v netretiranih celicah in $165,6 \pm 36,9$ v celicah, tretiranih z nokodazolom. Celice z močnim izražanjem uroplakinov so imele v povprečju $5,4 \pm 3,5$ veziklov, kadar celice nismo tretirali z nokodazolom ter $50 \pm 33,3$ veziklov v tretiranih celicah. Med visoko diferenciranimi celicami in delno diferenciranimi celicami je bila statistično značilna razlika $P < 0,01$.

Rezultati meritev in opisna statistika so v prilogi A.



Slika 14: Analiza intenzitete fluorescence WGA-FITC in uroplakinov v površinskih urotelijskih celicah z veliko WGA-FITC vezanega na apikalni plazmalemi ali z veliko uroplakini v apikalni plazmalemi. Vsota veziklov predstavlja število veziklov v posamezni celici. Celične kulture so bile inkubirane z WGA-FITC 24 ur, z ali brez nokodazola. Celice z več uroplakini imajo manjše število veziklov z WGA-FITC in manj vezanega WGA-FITC na apikalni plazmalemi, v primerjavi s celicami z manj uroplakini ($P < 0,01$)



Slika 15: Imunofluorescenca uroplakinov (rdeče) in fluorescenca WGA-FITC (zeleno) po inkubaciji celic z WGA-FITC 2 uri, brez nokodazola (a) in z nokodazolom (c) ter po inkubaciji z WGA-FITC 24 ur brez nokodazola (b) in z nokodazolom (d). (a',b',c',d'). Število veziklov z WGA-FITC pod apikalno plazmalemo je manjše, kadar so na plazmalemi prisotni uroplakini. Prečni prerez v področju sive črte. Merilce 5 μ m.

4.4 ODVISNOST ENDOCITOTSKE AKTIVNOSTI UROTELIJSKIH CELIC IN CELIC MDCK OD ELEMENTOV CITOSKELETA

4.4.1 Depolimerizacija mikrotubulov vpliva na razporeditev veziklov z WGA-FITC v urotelijskih celicah in celicah MDCK

Urotelijske celice in celice MDCK smo inkubirali v različnih hranilnih medijih z WGA-FITC 2 uri in 24 ur. Polovico celic smo tretirali z nokodazolom, drugo pa ne. S programom »Count 3D« smo šteli vezikle v treh razredih optičnih rezin (od 1.-10., 10.-20. in 20.-35. optične rezine pod apikalno plazmalemo) na površini $6000 \mu\text{m}^2$.

4.4.1.1 Število in razporeditev veziklov z WGA-FITC po 2 urni inkubaciji

Dvourni inkubacija urotelijskih celic in celic MDCK z WGA-FITC je pokazala različno razporeditev veziklov z WGA-FITC glede na tretiranje z nokodazolom. (sliki 16 in 18). Po tretiranju z nokodazolom je bila večina veziklov z WGA-FITC prisotnih v prvem razredu optičnih rezin pod apikalno plazmalemo površinskih urotelijskih celic v vseh hranilnih medijih (slika 16), prav tako v celicah MDCK. V celicah, ki so rastle v UroM (+Ca²⁺+S) je bilo v prvem razredu optičnih rezin v povprečju $839,2 \pm 95,8$ veziklov, kar predstavlja $86,8 \pm 9,9$ % vseh veziklov, v UroM (+Ca²⁺-S) $219,2 \pm 15$ veziklov, kar je $82,5 \pm 5,6$ % vseh veziklov z WGA-FITC ter v UroM (-Ca²⁺+S) $730,7 \pm 25,8$ veziklov, kar je $74,5 \pm 2,6$ % vseh veziklov z WGA-FITC. Podobno so imele celice MDCK visok odstotek vseh veziklov z WGA-FITC v prvem razredu optičnih rezin pod apikalno plazmalemo, in sicer v povprečju $1637,3 \pm 132,3$ kar je $66,3 \pm 4,6$ % vseh veziklov z WGA-FITC. Razlike v številu veziklov z WGA-FITC med prvim razredom optičnih rezin pod apikalno plazmalemo ter ostalima razredoma optičnih rezin so bile statistično značilne $P < 0,01$.

V drugem in tretjem razredu optičnih rezin se je nahajal preostanek veziklov z WGA-FITC. V celicah, ki so rastle v UroM (+Ca²⁺+S) je bilo to v povprečju $114,1 \pm 28,7$ veziklov z WGA-FITC v drugem razredu in $13,3 \pm 4$ v tretjem razredu optičnih rezin; v UroM (+Ca²⁺-S) v povprečju $34 \pm 15,5$ veziklov z WGA-FITC v drugem razredu in $11,6 \pm$

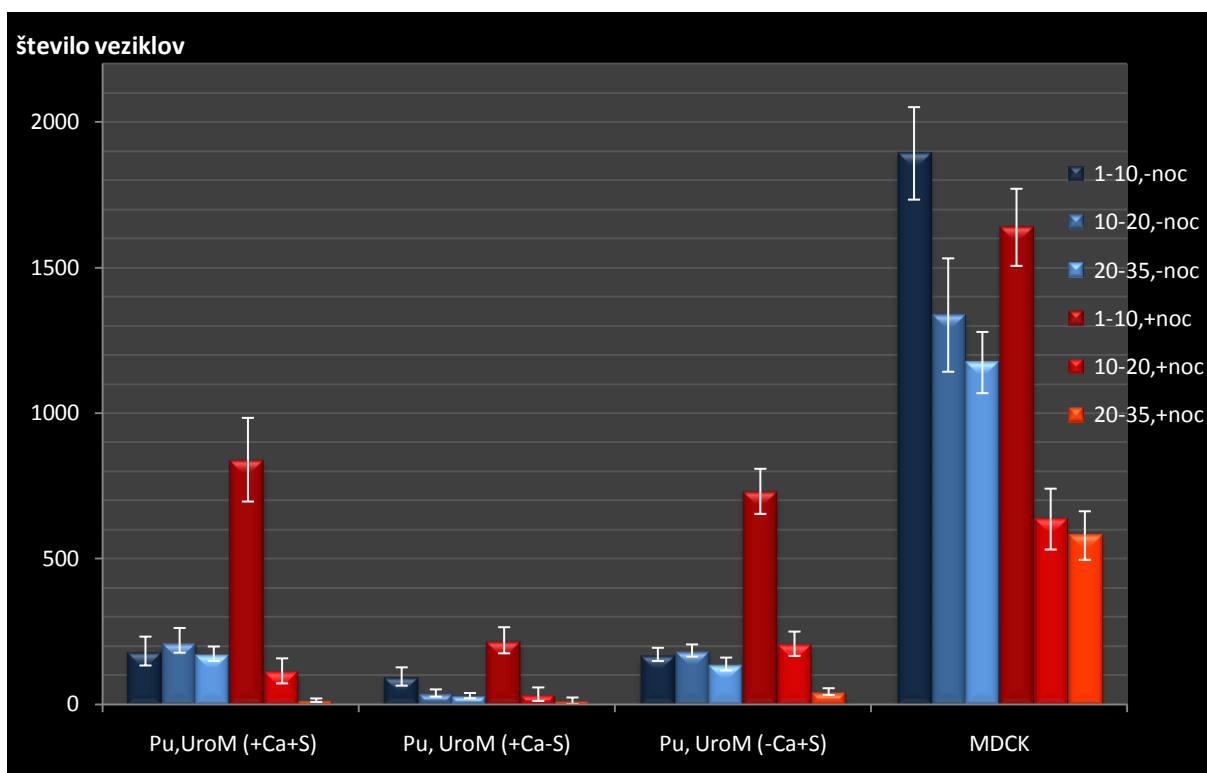
11,2 veziklov v tretjem razredu ter v UroM ($-Ca^{2+}+S$) v povprečju $207,33 \pm 27,8$ veziklov v drugem razredu in $42,9 \pm 11,6$ veziklov v tretjem razredu optičnih rezin. V celicah MDCK je bilo v povprečju $635,3 \pm 132,3$ veziklov z WGA-FITC v drugem razredu in $579 \pm 83,2$ veziklov v tretjem razredu optičnih rezin.

V celicah, ki jih nismo tretirali z nokodazolom, statistično značilnih razlik v številu veziklov z WGA-FITC po posameznih razredih optičnih rezin pod apikalno plazmalemo celic ni bilo. Ti so namreč enakomerneje razporejeni. Celicah, ki so rastle v UroM ($+Ca^{2+}+S$) so imele $182,1 \pm 31,3$ veziklov z WGA-FITC v prvem razredu; $211,8 \pm 22,4$ v drugem ter $173,0 \pm 15,7$ v tretjem razredu optičnih rezin pod apikalno plazmalemo. V celicah v UroM ($+Ca^{2+}-S$) je bilo $94,8 \pm 10,49$ v prvem, $38,0 \pm 8,3$ v drugem ter $29,1 \pm 9,0$ veziklov z WGA-FITC v tretjem razredu optičnih rezin. V celicah v UroM ($-Ca^{2+}+S$) pa $170,6 \pm 7,6$ v prvem, $183,9 \pm 14,0$ v drugem ter $137,7 \pm 22,1$ veziklov z WGA-FITC v tretjem razredu optičnih rezin pod apikalno plazmalemo.

Celice MDCK so se razlikovale od prašičjih urotelijskih celic v tem, da je tudi pri netretiranih celicah bil najvišji odstotek veziklov v prvem razredu optičnih rezin in je bil statistično višji kot pri celicah, tretiranih z nokodazolom. Razlike v številu veziklov med prvim razredom optičnih rezin in ostalima razredoma optičnih rezin pod apikalno plazmalemo so bile statistično značilne $P < 0,05$. V povprečju je bilo v prvem razredu $1891,17 \pm 389,0$ veziklov, kar je $42,9 \pm 3,6$ % vseh veziklov. Naslednja razreda optičnih rezin sta imela manjše število veziklov; v povprečju $1336 \pm 194,7$ in $1172,8 \pm 105,1$ veziklov z WGA-FITC. Med drugim in tretjim razredom optičnih rezin netretiranih celic statistične razlike v številu veziklov ni bilo.

Primerjava števila veziklov med urotelijskimi celicami in celicami MDCK v vseh razredih optičnih rezin, ne glede na tretiranje z nokodazolom, kaže statistično značilno večje število veziklov z WGA-FITC v celicah MDCK (več v 4.4.2).

Rezultati meritev in opisna statistika so v prilogi B in C.



Slika 16: Primerjava endocitotske aktivnosti med prašičjimi urotelijskimi celicami v različnih hranilnih medijih in celicami MDCK po 2 urni inkubacije z WGA-FITC brez nokodazola (modra) ter z WGA-FITC in nokodazolom (rdeče). Intenziteto endocitotske aktivnosti celic smo ovrednotili s številom veziklov z WGA-FITC po posameznih razredih optičnih rezin pod apikalno plazmalemo (razredi od 1.-10., 10.-20. ter 20.-35. optične rezine). Endocitoza membransko vezanega označevalca WGA-FITC je intenzivnejša v celicah MDCK kot v urotelijskih celicah ($P < 0,01$). Število veziklov z WGA-FITC v urotelijskih celicah tretiranih z nokodazolom, je v razredu od 1.-10. optične rezine statistično značilno večje ($P < 0,05$) v primerjavi z ostalimi razredi ter v primerjavi z urotelijskimi celicami (vsi hranilni mediji), ki jih nismo tretirali z nokodazolom. V celicah MDCK je prav tako statistično značilno ($P < 0,05$) večje število veziklov v prvih desetih optičnih rezinah, glede na ostala razreda v celicah tretiranih z nokodazolom. V celicah MDCK tudi ni statistične razlike v številu veziklov v razredu prvih desetih optičnih rezin glede na tretiranje z nokodazolom. Šele v drugem in tretjem razredu optičnih rezin (10.-20. ter 20.-35.) pod apikalno plazmalemo so razlike statistično značilno različne ($P < 0,01$).

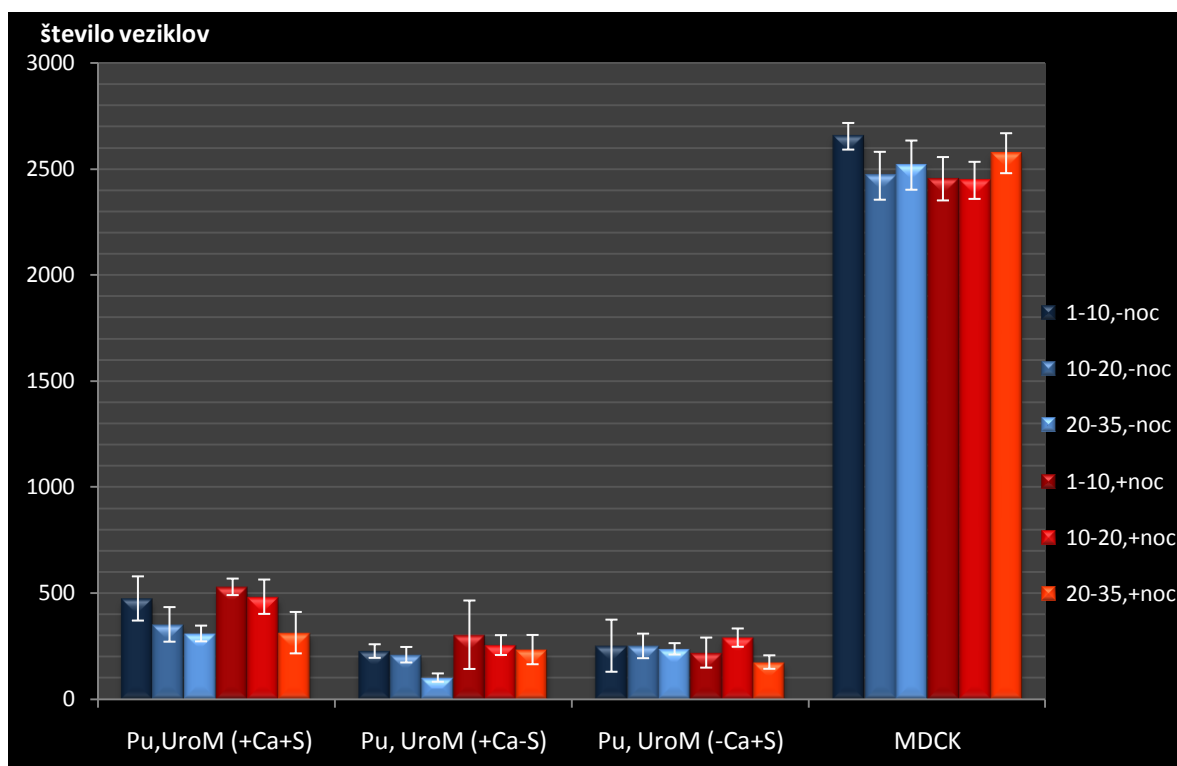
4.4.1.2 Število in razporeditev veziklov z WGA-FITC po 24 urni inkubaciji

Razporeditev veziklov je v urotelijskih celicah in celicah MDCK ne glede na tretiranje z nokodazolom bolj ali manj enakomerna v vseh razredih optičnih rezin pod apikalno

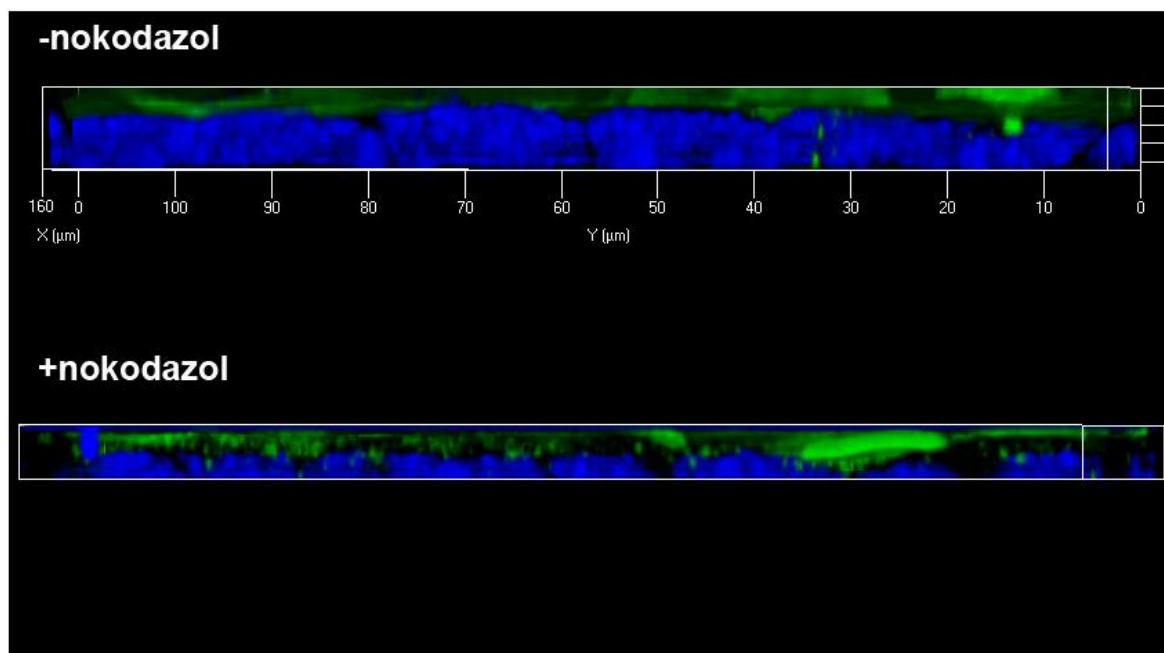
plazmalemo. Statistično značilnih razlik v številu veziklov z WGA-FITC med posameznimi razredi optičnih rezin pod apikalno plazmalemo v prašičjih urotelijskih celicah in celicah MDCK ni. Prav tako ni statistično značilnih razlik v številu veziklov v posameznih razredih optičnih rezin med celicami, tretiranimi z nokodazolom in netretiranimi celicami.

Endocitotska aktivnost celic MDCK v primerjavi z urotelijskimi celicami po 24 urah inkubacije z WGA-FITC je večja tako pri celicah, tretiranih z nokodazolom kot tistih, ki jih z nokodazolom nismo tretirali (več v 4.4.2).

Rezultati meritev in opisna statistika so v prilogi B in C.



Slika 17: Primerjava endocitotske aktivnosti med prašičjimi urotelijskimi celicami v različnih hranilnih medijih in celicami MDCK po 24 urah inkubacije z WGA-FITC brez nokodazola (modro) ter z WGA-FITC in nokodazolom (rdeče). Intenziteto endocitotske aktivnosti celic smo ovrednotili s številom veziklov z WGA-FITC po posameznih razredih optičnih rezin pod apikalno plazmalemo (razredi od 1.-10., 10.-20. ter 20.-35. optične rezine). Endocitoza membransko vezanega označevalca WGA-FITC je intenzivnejša pri celicah MDCK kot v urotelijskih celicah ($P < 0,001$). Statistično značilnih razlik v številu veziklov z WGA-FITC med posameznimi razredi optičnih rezin pod apikalno plazmalemo v prašičjih urotelijskih celicah in celicah MDCK ni. Prav tako ni statistično značilnih razlik v številu veziklov v posameznih razredih optičnih rezin med celicami, tretiranimi z nokodazolom in netretiranimi celicami.



Slika 18: Primerjava endocitotske aktivnosti urotelijskih celic gojenih v UroM ($-Ca^{2+}+S$) po 2 urah inkubacije z WGA-FITC brez nokodazola ter z WGA-FITC in nokodazolom Urotelijske celice, tretirane z nokodazolom, imajo večino veziklov z WGA-FITC (zeleno) v razredu prvih desetih optičnih rezin, torej nad jedri (modro), medtem ko imajo netretirane celice značilno manjše število veziklov z WGA-FITC, ki so enakomerno razporejeni po vseh razredih optičnih rezin pod apikalno plazmalemo.

4.4.2 Primerjava endocitotske aktivnosti urotelijskih celic in celic MDCK po 2 urni ali 24 urni inkubaciji z WGA-FITC ter tretiranju z nokodazolom

4.4.2.1 Prašičje urotelijske celice, gojene v UroM ($+Ca^{2+}+S$), UroM ($+Ca^{2+}-S$) ali UroM ($-Ca^{2+}+S$)

Za urotelijske celice, gojene v UroM ($+Ca^{2+}+S$) in inkubirane z WGA-FITC 2 uri, je značilno večje število veziklov z WGA-FITC v celicah z nokodazolom ($967,1 \pm 169,2$ veziklov) kot v celicah brez nokodazola ($607,0 \pm 62,7$ veziklov). Razlika v številu veziklov med z nokodazolom tretiranimi celicami in netretiranimi celicami je bila statistično značilna $P = 0,05$. Prav tako se poveča število veziklov po tretiranju z nokodazolom v celicah gojenih v UroM ($-Ca^{2+}+S$). V celicah z nokodazolom je bilo $980,9 \pm 107,3$ veziklov, brez nokodazola pa $548,0 \pm 52,037$ veziklov. Razlika v številu veziklov med tretiranimi in netretiranimi celicami je bila statistično značilna $P < 0,01$. Za urotelijske

celice, gojene v UroM (+Ca²⁺-S) in inkubirane z WGA-FITC 2 uri ni statistično značilnih razlik v številu veziklov glede na tretiranje z nokodazolom ($265,7 \pm 58,5$ veziklov v celicah z nokodazolom in $164,9 \pm 37,7$ veziklov v celicah brez nokodazola). Po 24 urah inkubacije z WGA-FITC urotelijskih celic gojenih v vseh treh hranilnih medijih UroM statistično značilne razlike v številu veziklov glede na tretiranje z nokodazolom ni (slika 19).

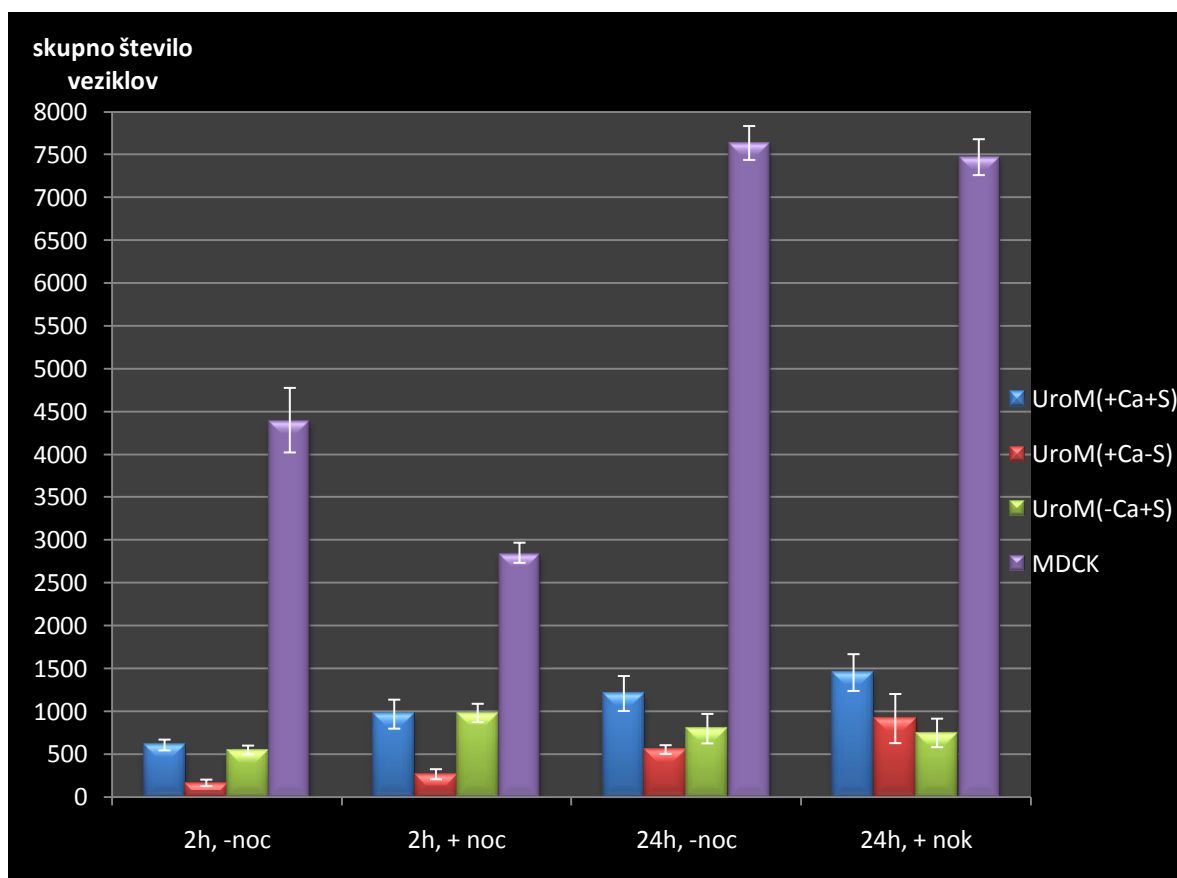
Če primerjamo 2 uri inkubacije z WGA-FITC ter 24 ur je število veziklov v urotelijskih celicah gojenih v UroM (+Ca²⁺+S) večje po 24 urah inkubacije z WGA-FITC le pri celicah brez nokodazola. Razlika v številu veziklov urotelijskih celic gojenih v UroM (+Ca²⁺+S) z ali brez nokodazola je bila statistično značilna $P < 0,01$. V urotelijskih celicah gojenih v UroM (-Ca²⁺+S) med 2 urami inkubacije z WGA-FITC ter 24 urami inkubacije, statistično značilnih razlik v številu veziklov ni. V celicah gojenih v UroM (+Ca²⁺-S) je število veziklov večje po 24 urah inkubacije z WGA-FITC glede na 2 uri inkubacije z WGA-FITC. Razlika v številu veziklov z WGA-FITC po 2 urah inkubacije ali 24 urah inkubacije z WGA-FITC je bila statistično značilna $P < 0,05$ (slika 19).

4.4.2.2 Trajna celična linija MDCK

Število veziklov z WGA-FITC se v celicah MDCK po tretiranju z nokodazolom in inkubaciji z WGA-FITC 2 uri zmanjša in ne naraste kot pri urotelijskih celicah, gojenih v hranilnem mediju z dodanim serumom (UroM (-Ca²⁺+S) in UroM (+Ca²⁺+S)). Celice, ki jih nismo tretirali z nokodazolom so imele $4400,0 \pm 376,9$ veziklov, tretirane celice pa $2851,7 \pm 117,3$ veziklov. Razlika v številu veziklov med celicami tretiranimi z nokodazolom in netretiranimi celicami je bila statistično značilna $P < 0,01$. Po 24 urah inkubacije z WGA-FITC statistično značilnih razlik v številu veziklov glede na tretiranje z nokodazolom ni. V primerjavi z 2 urami inkubacije z WGA-FITC pa je število veziklov večje po 24 urah inkubacije z WGA-FITC. (slika 19).

4.4.3 Za prašičje urotelijske celice je značilna nižja endocitotska aktivnost kot za celice MDCK

Če primerjamo endocitotsko aktivnost prašičjih urotelijskih celic, gojenih v različnih medijih in endocitotsko aktivnost celic MDCK, kažejo urotelijske celice, ki smo jih gojili v UroM (+Ca²⁺-S), najmanjšo endocitotsko aktivnost in to po 2 ali 24 urah inkubacije z WGA-FITC ne glede na nokodazol. Največjo endocitotsko aktivnost so imele celice MDCK, saj je bila ta kar za 3-14 krat večja kot v prašičjih urotelijskih celicah. Razlike v številu veziklov med urotelijskimi celicami in celicami MDCK so bile statistično značilne $P < 0,01$ (slika 19).



Slika 19: Primerjava endocitotske aktivnosti prašičjih urotelijskih celic in celic MDCK. Vsota endocitotskih veziklov z WGA-FITC v prašičjih urotelijskih celicah glede na hranilni medij in v celicah MDCK. Celice smo inkubirali z WGA-FITC 2 uri ali 24 ur, z ali brez nokodazola.

4.5 PRESLIKAVA PO WESTERNU ZA PROTEIN MIKROTUBULOV – α -TUBULIN

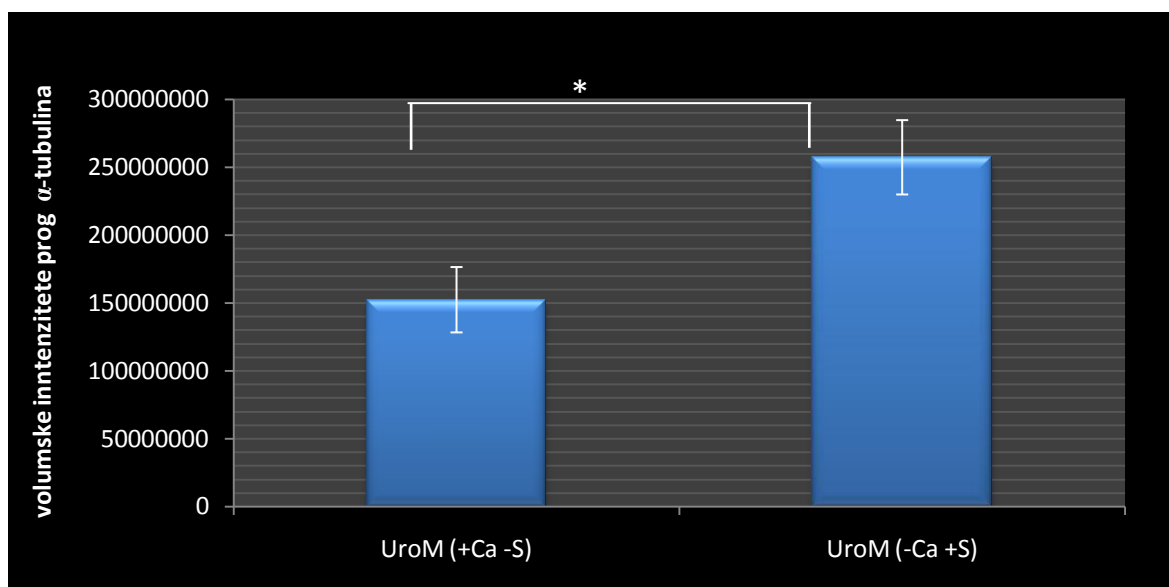
4.5.1 Količina α -tubulina je odvisna od koncentracije kalcija in prisotnosti seruma v mediju

Količino α -tubulina smo ugotavljali v urotelijskih celicah, ki smo jih do konfluentnosti gojili v hranilnem mediju UroM ($-\text{Ca}^{2+}+\text{S}$), nato pa nadaljnja 2 tedna v istem mediju UroM ($-\text{Ca}^{2+}+\text{S}$) ali v mediju UroM ($+\text{Ca}^{2+}-\text{S}$) (slika 20). Hranilni medij UroM ($-\text{Ca}^{2+}+\text{S}$) je vseboval 0,7 mM kalcija, UroM ($+\text{Ca}^{2+}-\text{S}$) pa 2,5 mM kalcija.

Urotelijske celice ves čas gojene v hranilnem mediju z 0,7 mM kalcija, t.j. v UroM ($-\text{Ca}^{2+}+\text{S}$), so imele večjo količino α -tubulina (volumska intenziteta prog je znašala $152.222.681,0 \pm 24.090.849,0$) kot tiste, ki smo jih po konfluentnosti gojili v hranilnem mediju z 2,5 mM kalcija, t.j. v UroM ($+\text{Ca}^{2+}-\text{S}$) (volumska intenziteta prog je znašala $257.170.398,1 \pm 27.393.832,0$) (slika 21). Razlika v količini α -tubulina med celicami gojenimi v UroM ($+\text{Ca}^{2+}-\text{S}$) in UroM ($+\text{Ca}^{2+}-\text{S}$) je bila statistično značilna $P < 0,05$.



Slika 20: Preslikava po Westernu za α -tubulin. Vzorec 1 predstavlja α -tubulin v prašičjih urotelijskih celicah, ki smo jih gojili v hranilnem mediju UroM ($+\text{Ca}^{2+}-\text{S}$), vzorec 2 pa α -tubulin v celicah, ki smo jih gojili v UroM ($-\text{Ca}^{2+}+\text{S}$). Primarna protitelesa so se vezala na 50 kDa velik α -tubulin.



Slika 21: Analiza intenzitete prog α -tubulina v prašičjih urotelijskih celicah. V celicah gojenih v UroM (-Ca²⁺+S) je α -tubulina več kot v celicah gojenih v UroM (+Ca²⁺-S) (*P < 0,05).

4.5 IMUNOFLUORESCENCA– AKTINA

4.5.1 Nokodazol in serum vplivata na količino aktina v apikalni citoplazmi

Količino aktina smo ugotavljali z merjenjem fluorescence v urotelijskih celicah, ki smo jih gojili v različnih medijih z ali brez nokodazola in označili aktin s faloidinom.

Ne glede na tretiranje z nokodazolom je bil aktin v bazalnih urotelijskih celicah prisoten v obliki filamentov. V površinskih urotelijskih celicah se je aktin nahajal pod apikalno plazmalemo ter ob lateralnih plazmalemah v obliki pikic, ne glede na tretiranje z nokodazolom, spremenila pa se je količina aktina.

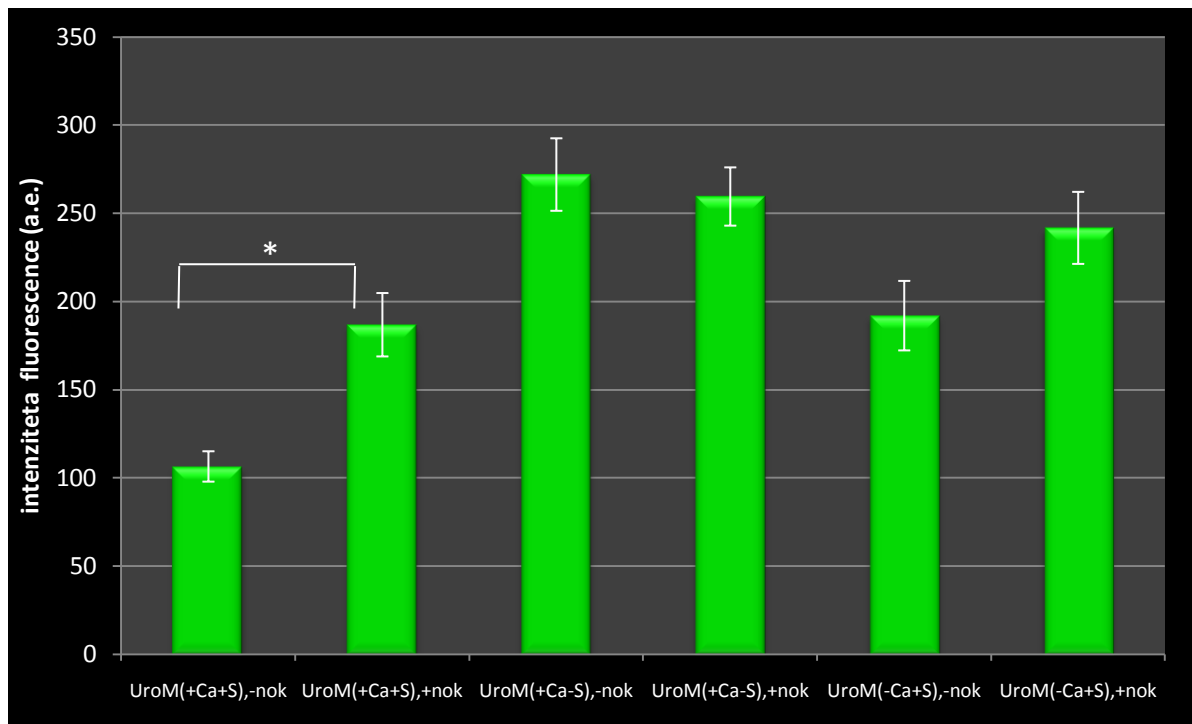
Analiza imunofluorescence aktina je pokazala, da se količina aktina pod apikalno plazmalemo celic po tretiranju z nokodazolom statistično značilno poveča v primerjavi s celicami, ki niso tretirane z nokodazolom. Vendar to velja le za urotelijske celice, gojene v hranilnem mediju, ki vsebuje serum ter dodan kalcij; torej v UroM (+Ca²⁺+S). V celicah gojenih v hranilnem mediju brez seruma, UroM (+Ca²⁺-S) ter UroM (-Ca²⁺+S), statistično

značilnih razlik v intenziteti fluorescence aktina glede na tretiranje z nokodazolom ni bilo (slika 22 in 23).

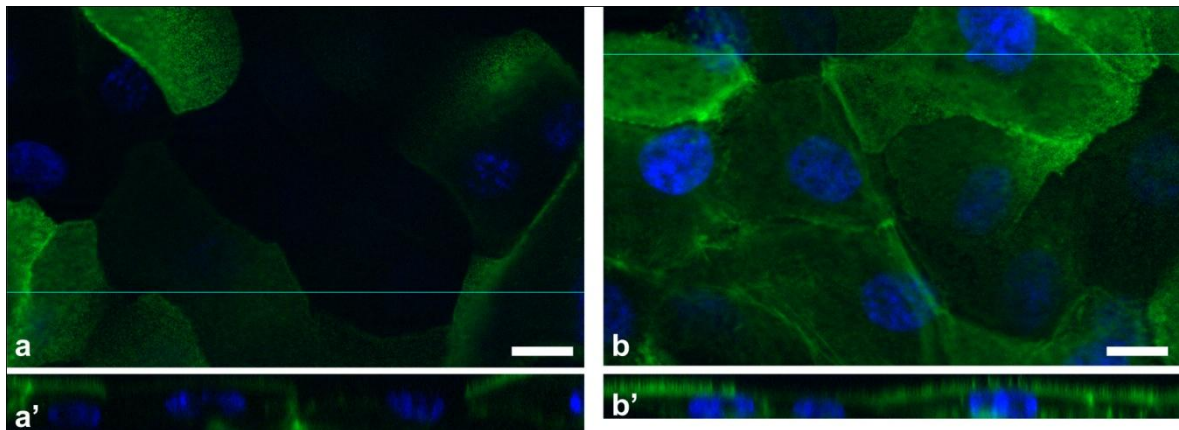
Intenziteta fluorescence aktina je bila v urotelijskih celicah, gojenih v UroM (+Ca²⁺+S) brez nokodazola v povprečju $106,3 \pm 8,6$ a.e., medtem ko je bila v celicah tretiranih z nokodazolom večja, v povprečju: $186,7 \pm 18,0$ a.e. Razlika v intenziteti fluorescence aktina med tretiranimi celicami z nokodazolom in netretiranimi celicami je bila statistično značilna $P < 0,001$. Prav tako je bila intenziteta fluorescence aktina v urotelijskih celicah gojenih v UroM (-Ca²⁺+S) brez nokodazola v povprečju manjša $191,8 \pm 19,7$ a.e., kot v celicah tretiranih z nokodazolom $241,6 \pm 20,4$ a.e. vendar ni bila statistično značilno različna.

V mediju UroM (+Ca²⁺-S) statistično značilnih razlik med celicami, tretiranimi z nokodazolom in netretiranimi celicami, ni bilo. Intenziteta fluorescence aktina je bila v površinskih urotelijskih celicah, netretiranih z nokodazolom, v povprečju $271,8 \pm 20,5$ a.e., v tretiranih pa $259,3 \pm 16,5$ a.e.

Rezultati meritev in opisna statistika so v prilogi D.



Slika 22: Analiza intenzitete fluorescence aktina v urotelijskih celicah, gojenih v različnih hranilnih medijih z in brez nokodazola (* $P < 0,001$).



Slika 23: Imunofluorescenca aktina urotelijskih celic, ki smo jih gojili v hranilnem mediju UroM (+Ca²⁺+S) (a,b). Koncentracija aktina (zeleno) pod apikalno plazmalemo površinskih urotelijskih celic po tretiranju z nokodazolom naraste (b). (a', b') Prečni prerez v področju modre črte. Merilce: 5 μ m.

4.6 ANALIZA PREPUSTNOSTI UROTELIJSKIH CELIC

Urotelijskim kulturam smo izmerili prepustnost za WGA-FITC tako, da smo na apikalno stran dodali WGA-FITC koncentracije 0,02 mg/ml, nato pa izmerili koncentracijo WGA-FITC v mediju pod porozno membrano.

4.6.1 Prepustnost prašičjih urotelijskih celic za WGA-FITC, gojenih v hranilnem mediju s serumom, se zmanjša, če celice tretiramo z nokodazolom

Urotelijske celice, gojene v različnih hranilnih medijih, smo inkubirali z WGA-FITC 2 uri ali 24 ur, z ali brez nokodazola, nato pa jim izmerili prepustnost.

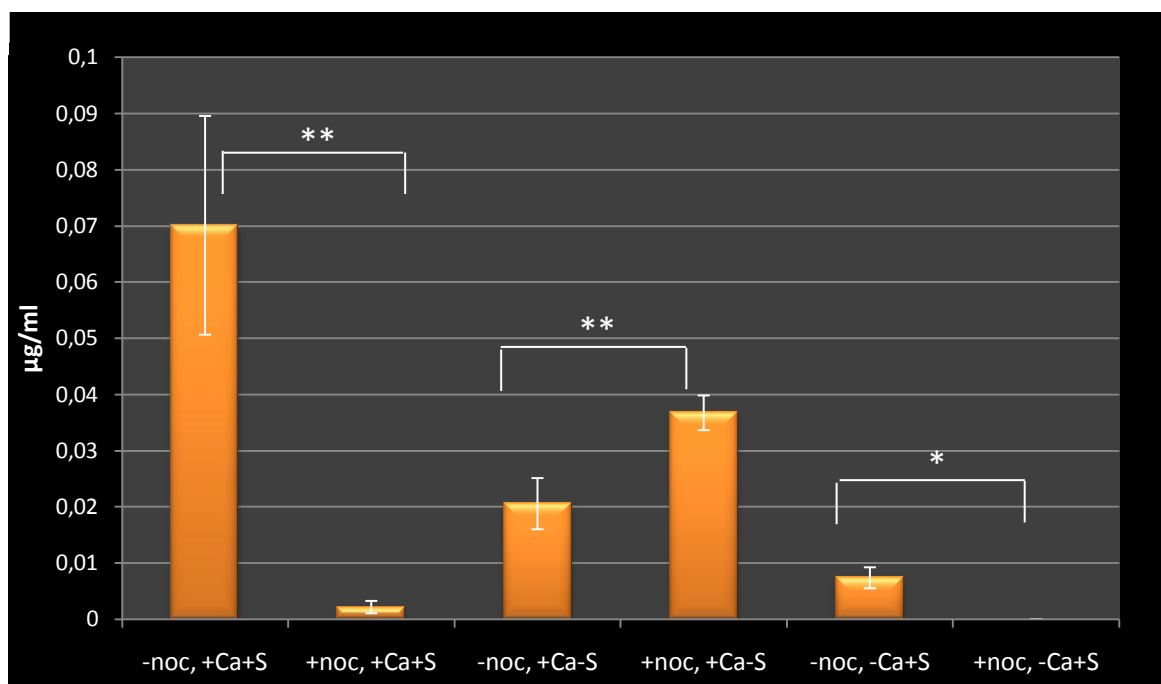
4.6.1.1 Prepustnost prašičjih urotelijskih celic po 2 urah inkubacije z WGA-FITC

Po 2 urni inkubaciji urotelijskih celic z WGA-FITC (slika 24) se je prepustnost zmanjšala v celicah tretiranih z nokodazolom v primerjavi s celicami, ki z nokodazolom niso bile tretirane. Prepustnost se je zmanjšala v urotelijskih celicah, ki smo jih gojili v mediju z dodanim serumom: v UroM (+Ca²⁺+S), kjer se je prepustnost iz $0,070 \pm 0,019$ µg/ml zmanjšala na $0,002 \pm 0,001$ µg/ml ter v UroM (-Ca²⁺+S) iz $0,007 \pm 0,002$ µg/ml na 0 µg/ml. Razlika v prepustnosti med urotelijskimi celicami z nokodazolom in brez nokodazola je bila statistično značilna $P \leq 0,05$.

V urotelijskih celicah, ki smo jih gojili v hranilnem mediju brez seruma (UroM (+Ca²⁺-S)), pa je prepustnost ob dodatku nokodazola narasla. V netretiranih celicah je prepustnost znašala $0,020 \pm 0,004$ µg/ml, v celicah tretiranih z nokodazolom pa $0,037 \pm 0,003$ µg/ml. Razlika v prepustnosti med urotelijskimi celicami z nokodazolom ter brez nokodazola je bila statistično značilna $P = 0,05$.

Izmerjene vrednosti prepustnosti so bile zelo nizke, saj so predstavljale od 0 % do 0,35 % WGA-FITC, ki smo ga dodali na apikalno stran kulture (0,02 mg/ml).

Rezultati meritev in opisna statistika so v prilogi E.



Slika 24: Prepustnost urotelijskih celic v različnih hranilnih medijih po 2 urni inkubaciji z WGA-FITC brez nokodazola ter z WGA-FITC in nokodazolom. Prepustnost je statistično značilno večja v celicah brez nokodazola, ki smo jih gojili v hranilnem mediju UroM (+Ca²⁺+S) ali UroM (-Ca²⁺+S). Obraten pojav je opaziti v celicah, gojenih v hranilnem mediju UroM (+Ca²⁺-S). V teh celicah je bila prepustnost statistično značilno večja v celicah tretiranih z nokodazolom (*P = 0,05; **P < 0,05).

4.6.1.2 Prepustnost prašičjih urotelijskih celic po 24 urah inkubacije z WGA-FITC

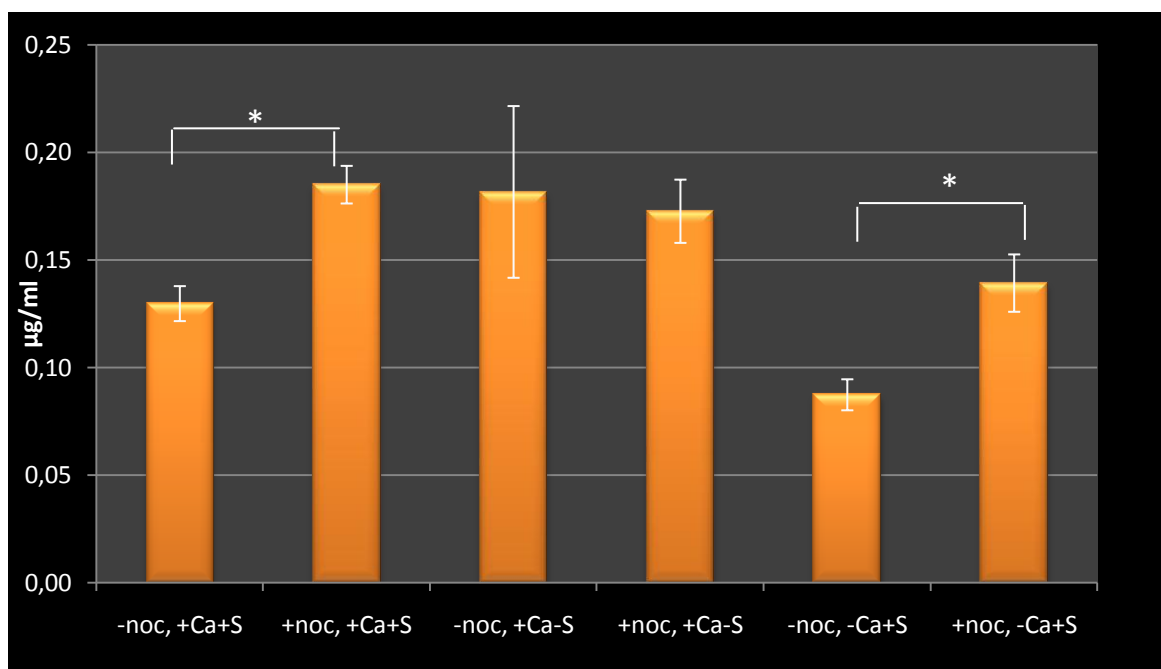
Po 24 urni inkubaciji urotelijskih celic z WGA-FITC (slika 25) in tretiranjem z nokodazolom se je prepustnost povečala glede na netretirane celice (medtem ko se je pri 2 urni inkubaciji z WGA-FITC prepustnost zmanjšala). Prepustnost se je povečala po tretiranju z nokodazolom v urotelijskih celicah, ki smo jih gojili v mediju z dodanim serumom: v UroM (+Ca²⁺+S) se je prepustnost iz $0,130 \pm 0,008$ µg/ml statistično značilno povečala na $0,185 \pm 0,009$ µg/ml ter v UroM (-Ca²⁺+S) iz $0,087 \pm 0,007$ µg/ml na $0,139 \pm 0,013$ µg/ml. Razlika v prepustnosti med urotelijskimi celicami z nokodazolom ter celicami brez nokodazola je bila statistično značilna $P < 0,05$.

V urotelijskih celicah, ki smo jih gojili v hranilnem mediju brez seruma (UroM (+Ca²⁺-S)), statistično značilnih razlik v prepustnosti po tretiranju z nokodazolom ni bilo. V

netretiranih celicah je prepustnost znašala $0,181 \pm 0,040 \mu\text{g/ml}$, v tretiranih celicah pa $0,172 \pm 0,014 \mu\text{g/ml}$.

Izmerjene prepustnosti so bile kljub 24 urni inkubaciji z WGA-FITC še vedno nizke, saj so predstavljale od 0,44 % do 0,92 % WGA-FITC, ki smo ga dodali na apikalno stran kulture ($0,02 \text{ mg/ml}$).

Rezultati meritev in opisna statistika so v prilogi E.

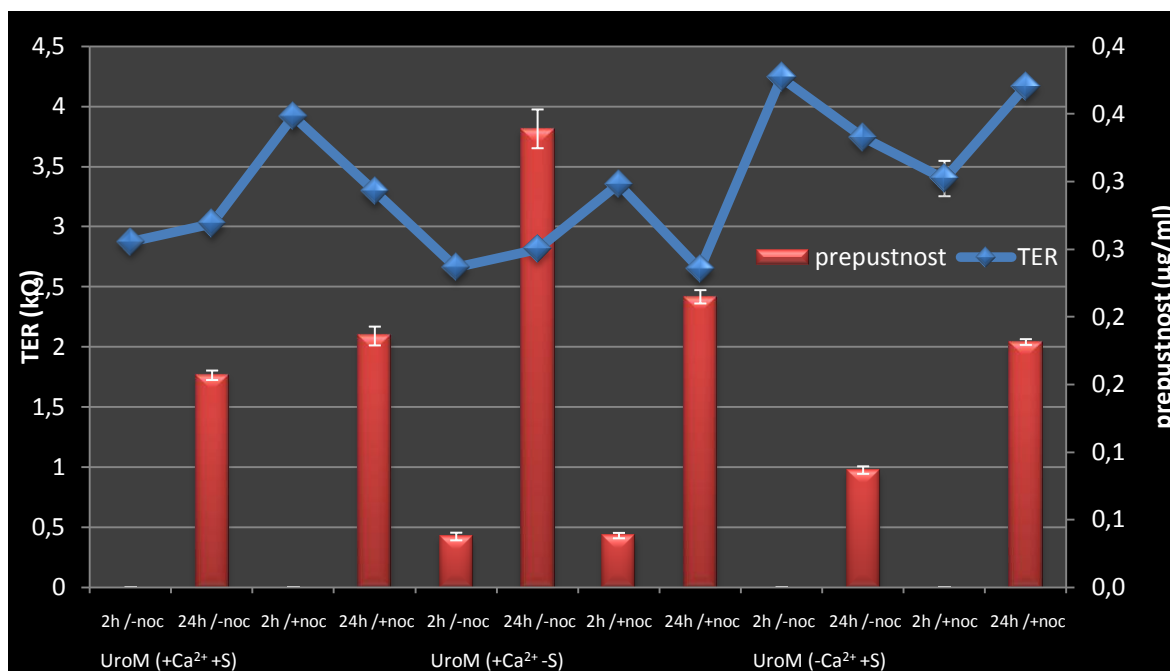


Slika 7: Prepustnost urotelijskih celic v različnih hranilnih medijih po 24 urni inkubaciji z WGA-FITC brez nokodazola ter z WGA-FITC in nokodazolom. Prepustnost je statistično značilno večja v celicah, tretiranih z nokodazolom, ki smo jih gojili v hranilnem mediju UroM ($+Ca^{2+}+S$) ali UroM ($-Ca^{2+}+S$), medtem ko pri hranilnem mediju UroM ($+Ca^{2+}-S$) ni statistično značilnih razlik (* $P < 0,05$).

4.6.1.3 Prepustnost prašičjih urotelijskih celic je obratno sorazmerna s transepitelijsko upornostjo

Primerjava prepustnosti in TER (Višnjar, 2009) v urotelijskih celicah kaže obratno sorazmerni odnos (slika 26). Najnižje vrednosti TER so bile izmerjene v urotelijskih

celičnih kulturah z največjo prepustnostjo in obratno. Vrednosti TER so se gibale med 2500 in 4500 $\Omega \text{ cm}^2$ in niso tako variirale kot prepustnosti urotelijskih celic za WGA-FITC, na katere je vplivalo tretiranje z nokodazolom.



Slika 26: Primerjava prepustnosti in TER prašičjih urotelijskih celic gojenih v različnih medijih UroM. Najvišjim vrednostim TER ustrezajo najnižje vrednosti prepustnosti.

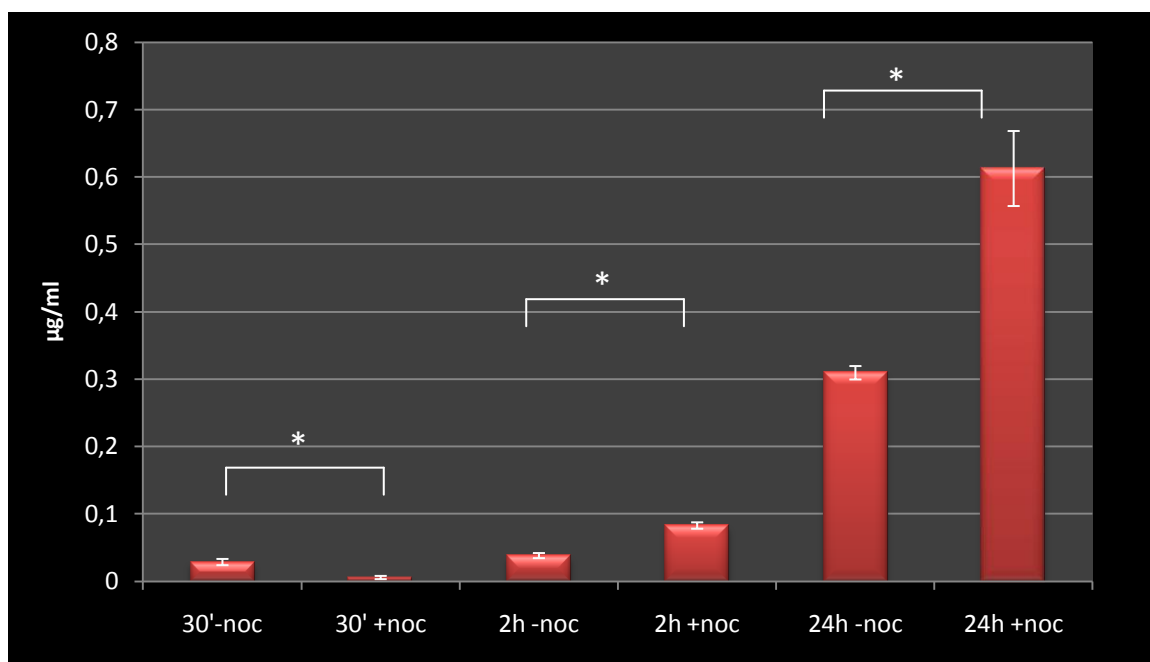
Rezultati meritev in opisna statistika so v prilogi F.

4.6.2 Prepustnost celic MDCK za WGA-FITC se po kratkotrajnem tretiranju z nokodazolom zmanjša, po dolgotrajnem tretiranju z nokodazolom pa poveča

Po 30 minutni inkubaciji celic MDCK z WGA-FITC in tretiranju z nokodazolom se prepustnost za WGA-FITC zmanjša (iz $0,028 \pm 0,005 \mu\text{g/ml}$ na $0,005 \pm 0,002 \mu\text{g/ml}$). Po 2 urni in 24 urni inkubaciji z WGA-FITC pa se prepustnosti povečajo po tretiranju celic z nokodazolom. Po 2 urni inkubaciji se prepustnost poveča iz $0,038 \pm 0,04 \mu\text{g/ml}$ na $0,082 \pm 0,005 \mu\text{g/ml}$, po 24 urni inkubaciji pa iz $0,309 \pm 0,010 \mu\text{g/ml}$ na $0,612 \pm 0,056 \mu\text{g/ml}$ (slika 27). Razlika v prepustnosti med urotelijskimi celicami tretiranimi z nokodazolom in netretiranimi celicami je statistično značilna $P < 0,05$.

Izmerjene vrednosti prepustnosti za WGA-FITC predstavljajo od 0,267 % do 3,062 % WGA-FITC, ki smo ga dodali na apikalno stran kulture (0,02 mg/ml).

Rezultati meritev in opisna statistika so v prilogi G.



Slika 27: Prepustnost celic MDCK po 30 minutni, 2 urni ter 24 urni inkubaciji z WGA-FITC brez nokodazola ter z WGA-FITC in nokodazolom. Prepustnost je statistično značilno manjša v celicah, tretiranih z nokodazolom, ki smo jih inkubirali z WGA-FITC 30 minut, medtem ko je po inkubaciji z WGA-FITC 2 uri ali 24 ur po tretiranju z nokodazolom prepustnost statistično značilno večja (* $P < 0,05$).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Urotelijske celice vzdržujejo tesno pregrado, ki preprečuje prehajanje urina v celice. Ta se razvije med diferenciacijo površinskih urotelijskih celic in predstavlja eno najtesnejših in najmanj prepustnih pregrad v telesu. Med diferenciacijo urotelijskih celic se citoskeletni elementi preurejajo, prav tako pa je znano, da so za učinkovit endocitotski transport nujno potrebni mikrotubuli in aktinski filamenta (Maples in sod. 1997, Romih in sod. 1999, Acharya in sod. 2004). Namen diplomske naloge je bil ugotoviti ali se z diferenciacijo urotelijskih celic spremeni dinamika endocitotske aktivnosti, ki pripomore k vzdrževanju tesne pregrade ter ali mikrotubuli sodelujejo pri regulaciji endocitotske aktivnosti.

Stopnjo diferenciranosti celic smo določali z intenziteto izražanja uroplakinov v površinskih urotelijskih celicah. V celicah smo imunofluorescenčno označili uroplakine in ugotavljali endocitotsko aktivnost v celicah s šibkim izražanjem uroplakinov ter v celicah z močnim izražanjem uroplakinov.

Endocitotsko aktivnost smo analizirali z membransko vezanim označevalcem WGA-FITC, ki smo ga dodajali na apikalno stran kultur. Z imunofluorescenčnim označevanjem proteinov tesnih stikov smo preverili ali WGA-FITC lahko prehaja v celice tudi preko bazolateralne plazmaleme.

Urotelijske celice smo gojili v treh različnih medijih UroM, ki so se razlikovali v koncentraciji kalcija ter prisotnosti seruma. Preučili smo vpliv seruma in kalcija na endocitotsko aktivnost. Ugotavljali smo tudi količino α -tubulina, ki smo jo določili s preslikavo po Westernu.

Odvisnost endocitotske aktivnosti urotelijskih celic od mikrotubulov smo ugotavljali s pomočjo nokodazola, agensa, ki prepreči polimerizacijo mikrotubulov. Ugotavljali smo število veziklov z WGA-FITC v urotelijskih celicah glede na tretiranje z nokodazolom ter

spreminjanje prepustnosti za WGA-FITC. Z imunofluorescenčnim označevanjem proteinov medceličnih stikov smo preučili vpliv nokodazola na prehajanje WGA-FITC v celice.

Poleg mikrotubulov sodelujejo pri endocitozi tudi aktinski filament (Maples in sod., 1997), zato smo ugotavljali koncentracijo aktina v urotelijskih celicah po tretiranju z nokodazolom.

5.1.1 Dinamika endocitotske aktivnosti urotelijskih celic je odvisna od njihove diferenciacijske stopnje

Nižja endocitotska aktivnost diferenciranih površinskih urotelijskih celic, ki imajo apikalno plazmalemo skoraj v celoti prekrito z uroplakini, je verjetno dodatna zaščita pred prehajanjem toksičnih snovi iz urina v celice. Celice z močnim izražanjem uroplakinov vežejo manj WGA-FITC na apikalno plazmalemo, kot površinske urotelijske celice s šibkim izražanjem uroplakinov, do vezave pa pride le na simetričnih regijah apikalne plazmaleme (Kreft in sod., 2009a).

V raziskavi smo primerjali visoko in delno diferencirane urotelijske celice in ugotovili nižjo endocitotsko aktivnost v visoko diferenciranih urotelijskih celicah kot v delno diferenciranih celicah. Število endocitotskih veziklov z WGA-FITC je bilo vedno statistično značilno manjše v površinskih urotelijskih celicah z močnim izražanjem uroplakinov. Tudi Kreft in sod., 2009a so ugotovili, da je membransko vezana apikalna endocitoza v diferenciranih mišjih urotelijskih celicah (z močnim izražanjem uroplakinov) za 86% nižja, kot v delno diferenciranih površinskih urotelijskih celicah. Sklepamo, da nižja endocitotska aktivnost višje diferenciranih celic, glede na delno diferencirane celice prispeva k vzdrževanju prepustnostne pregrade. S slednjim se skladajo tudi rezultati preučevanja endocitotske aktivnosti celic MDCK, ki smo jih primerjali z urotelijskimi celicami.

Tudi v celicah MDCK pride med diferenciacijo do zmanjšanja endocitotske aktivnosti. Foerg in sod., 2007 so ugotovili, da se membransko vezana apikalna endocitoza v

polariziranih celicah MDCK močno zmanjša. Primerjava endocitotske aktivnosti med prašičjimi urotelijskimi celicami in celicami MDCK je pokazala, da je ta precej višja pri celični liniji MDCK in sicer 3 do 14 krat večja, kar so ugotovili tudi Kreft in sod. (2009a) (5-15 krat večja).

Nižja intenziteta endocitotske aktivnosti prašičjih urotelijskih celic v primerjavi s celicami MDCK potrjuje naše sklepe, da spremenjena dinamika endocitotske aktivnosti v urotelijskih celicah sodeluje pri vzdrževanju prepustnostne pregrade.

5.1.2 Količina α -tubulina v urotelijskih celicah je odvisna od koncentracije kalcija ter prisotnosti seruma v hranilnem mediju

Za površinske urotelijske celice je značilno, da se v mediju z dodanim kalcijem ter v odsotnosti seruma (UroM (+Ca²⁺-S)) diferencirajo (Kreft in sod., 2002, Hudoklin, 2004). Za diferencirane celice pa je značilna nižja endocitotska aktivnost (Kreft in sod., 2009a) ter preurejanje citoskeleta. Romih in sod., 1999 so ugotovili, da so aktinski filament v diferenciranih urotelijskih celicah prisotni ob bazolateralni plazmalemi površinskih celic, medtem ko je bila njihova koncentracija pod apikalno plazmalemo zelo nizka. Znano je namreč, da razgradnja aktinskih filamentov vodi v ustavitev apikalne endocitoze v celicah MDCK (Gottlieb in sod., 1993) ter da so za učinkovito endocitozo v polariziranih epitelijskih celicah potrebni tako mikrotubuli kot aktinski filament (Maples in sod., 1997). Ena od možnih hipotez zakaj pride do zmanjšane endocitoze v diferenciranih urotelijskih celicah je, da preurejanje in manjša koncentracija mikrotubulov povzroči zmanjšanje endocitoze. V naši raziskavi smo zato ugotavljali v različno diferenciranih urotelijskih celicah količino α -tubulina s preslikavo po Westernu.

Urotelijske celice, ki smo jih gojili v hranilnem mediju UroM (+Ca²⁺-S) so imele statistično značilno manj α -tubulina, kot tiste, ki smo jih gojili v UroM (-Ca²⁺+S). Iz predhodnih raziskav je znano, da so urotelijske celice v UroM (+Ca²⁺-S) višje diferencirane kot UroM (-Ca²⁺+S), mi pa smo v teh celicah ugotovili manj α -tubulina. Iz rezultatov sklepamo, da je v bolj diferenciranih urotelijskih celicah manj mikrotubulov.

5.1.3 Endocitotska aktivnost urotelijskih celic je odvisna od prisotnosti seruma v mediju ter koncentracije kalcija

Nižja koncentracija α -tubulina v urotelijskih celicah gojenih v UroM (+Ca²⁺-S) se sklada s primerjavo endocitotske aktivnosti med skupinami celic, ki smo jih gojili v različnih hranilnih medijih (UroM (+Ca²⁺+S), UroM (+Ca²⁺-S) ali UroM (-Ca²⁺+S)). Endocitotska aktivnost je bila najnižja pri celicah gojenih v hranilnem mediju UroM (+Ca²⁺-S). Za celice gojene v UroM (+Ca²⁺-S) smo dokazali nižjo količino α -tubulina kot v UroM (-Ca²⁺+S). Sklepamo, da se med diferenciacijo celic zmanjša količina mikrotubulov v površinskih urotelijskih celicah, s čimer se zmanjša endocitotska aktivnost urotelijskih celic.

Hranilni medij UroM (+Ca²⁺-S) je vseboval 2,5 mM kalcija, serum pa ni bil prisoten. S tako sestavo hranilnega medija smo vplivali na višjo diferenciacijo celic. To so dokazali že Southgate in sod. (1994) ter Kreft in sod. (2002) ki so na normalnih človeških ter mišjih urotelijskih celicah ugotovili, da zunajcelični Ca²⁺ upočasni delitev celic, poveča celično gostoto, omogoča nastanek triskladne kulture, medcelični stiki pa se okrepijo. Medij s serumom ter nizko koncentracijo kalcija pa sproži povečano proliferacijo celic.

S spreminjanjem koncentracije kalcija in prisotnostjo/odsotnostjo seruma v mediju smo vplivali na večjo proliferacijo ali večjo diferenciacijo celic. V diferenciranih celicah gojenih v UroM (+Ca²⁺-S) smo ugotovili najnižjo endocitotsko aktivnost, glede na ostale hranilne medije. Torej smo dokazali nizko endocitotsko aktivnost pri diferenciranih celicah, kar smo dokazali tudi s primerjanjem endocitotske aktivnosti v urotelijskih celicah z različnim izražanjem uroplakinov. Višje diferencirane celice, torej z več uroplakini v apikalni plazmalemi so imele manjšo endocitotsko aktivnost, kot delno diferencirane celice z manj uroplakini v apikalni plazmalemi.

5.1.4 Odvisnost endocitotske aktivnosti urotelijskih celic od mikrotubulov

V diferenciranih celicah smo dokazali nižjo količino α -tubulina ter nižjo endocitotsko aktivnost, zato nas je zanimalo ali je endocitotska aktivnost urotelijskih celic odvisna od mikrotubulov.

Mikrotubule smo razgradili z nokodazolom ter inkubirali urotelijske celice z WGA-FITC (2 uri) in ugotovili, da število endocitotskih veziklov po tretiranju z nokodazolom celo naraste. Vendar pa so bili ti skoncentrirani bližje apikalni plazmalemi, večinoma nad jedri. V razredu prvih desetih optičnih rezin pod apikalno plazmalemo se je nahajalo od 74-87 % veziklov, ki so prehajali v urotelijske celice. V celicah MDCK je bila ta vrednost 66 %. Celice, ki jih nismo tretirali z nokodazolom so kazale enakomernjšo razporeditev veziklov z WGA-FITC po optičnih rezinah. Iz dobljenih rezultatov sklepamo, da mikrotubuli niso potrebni za prehod snovi vezanih na apikalno plazmalemo v endosome pod apikalno plazmalemo, so pa nujni za endocitotski transport proti bazalnemu delu celice. Ti rezultati se ujemajo z rezultati drugih raziskav, ki so preučevale vpliv depolimerizacije mikrotubulov na endocitotski transport. Depolimerizacija mikrotubulov vpliva na transport od zgodnjih do poznih endosomov, od zgodnjih do reciklirajočih endosomov ter na transcitozo od apikalne do bazolateralne plazmaleme ter obratno (Gruenberg in sod., 1989; Bomsel in sod., 1990; Apodaca in sod., 2001; Leung in sod., 2000; Breitfeld in sod., 1990; Hunzinger in sod., 1990). Menimo, da smo s preprečitvijo polimerizacije mikrotubulov prekinili transcitotski transport, zato so se vezikli z WGA-FITC kopičili tik pod apikalno plazmalemo.

Specifični vzorec razporejanja veziklov v posameznih razredih optičnih rezin, kjer se večina veziklov nahaja v razredu prvih desetih rezin, se po tretiranju z nokodazolom in 24 urni inkubaciji z WGA-FITC v urotelijskih celic ter celicah MDCK ni pojavil. Razporeditev je bila enakomerna v vseh razredih optičnih rezin pod apikalno plazmalemo. Iz teh rezultatov sklepamo, da 27 urno tretiranje celic z nokodazolom za celice najverjetneje že predstavlja patološko stanje in WGA-FITC prehaja v celice nekontrolirano.

5.1.5 Tretiranje urotelijskih celic z nokodazolom, gojenih v mediju, ki vsebuje serum povzroči preurejanje aktinskih filamentov

Na urotelijskih celicah, ki smo jih tretirali z nokodazolom smo preverili tudi količino aktinskih filamentov s fluorescenčno analizo. Maples in sod. (1997) so ugotovili, da samo razgradnja mikrotubulov ali aktinskih filamentov v celicah MDCK ni popolnoma ustavila

transcitoze (medtem, ko ob sočasni razgradnji obeh sistemov pride do skoraj popolne ustavitve transcitoze) in da sta ta sistema najverjetneje povezana.

Endocitotska aktivnost urotelijskih celic se je po tretiranju z nokodazolom povečala, zato nas je zanimalo, ali na to vplivajo aktinski filament. Za površinske urotelijske celice, ki smo jih tretirali z nokodazolom smo ugotovili, da imajo res več aktinskih filamentov v apikalni plazmalemi v primerjavi s celicami, ki jih nismo tretirali z nokodazolom. Vendar je to veljalo le pri urotelijskih celicah, ki smo jih gojili v hranilnem mediju z dodanim serumom ter kalcijem; torej UroM (+Ca²⁺+S). Tudi v celicah gojenih v UroM (-Ca²⁺+S) količina aktina po tretiranju naraste, vendar ne statistično značilno. Prav tako nismo ugotovili statistično značilnih razlik v koncentraciji aktina med celicami tretiranimi z nokodazolom in netretiranimi urotelijskimi celicami gojenimi v UroM (+Ca²⁺-S).

Posledica razgradnje mikrotubulov je lahko preurejanje citoskeletnih elementov, ki nadomestijo mikrotubule (Maples in sod., 1999). Menimo, da povečana količina aktina po tretiranju celic z nokodazolom nadomesti razgrajene mikrotubule, zato je tudi mogoče, da se število endocitotskih veziklov po tretiranju z nokodazolom poveča. Celice gojene v hranilnih medijih, ki so vsebovali serum so imele statistično značilno večje skupno število endocitotskih veziklov po tretiranju z nokodazolom. Tudi v celicah gojenih v UroM (+Ca²⁺-S) se je število endocitotskih veziklov po tretiranju z nokodazolom povečalo, vendar razlika ni bila statistično značilna. Za te celice smo s preslikavo po Westernu ugotovili, da imajo nižjo količino α -tubulina, zato menimo, da ima depolimerizacija mikrotubulov manjši vpliv na endocitotsko aktivnost. Vendar pa so rezultati spreminjanja koncentracije aktina v površinskih urotelijskih celicah le preliminarne. Za podrobnejše analize so potrebni nadaljnji poskusi.

5.1.6 Prepustnost urotelijskih celic po tretiranju z nokodazolom se zmanjša v hranilnem mediju s serumom

Prepustnost urotelijskih celic je bila zelo nizka. Delež WGA-FITC, ki je prehajal v medij pod porozno membrano je predstavljal od 0 do 0,92 % WGA-FITC, ki smo ga dodali na apikalno stran kulture. S temi rezultati smo dokazali, da tudi prašičje urotelijske celice *in*

vitro tvorijo učinkovito prepustnostno pregrado. Celice MDCK so bolj prepustne za WGA-FITC in sicer je v medij pod porozno membrano prehajalo 0,267 do 3,06% WGA-FITC dodanega na apikalno stran kulture.

Prepustnost urotelijskih celic za WGA-FITC smo merili v urotelijskih kulturah gojenih v različnih hranilnih medijih. Vpliv seruma v hranilnem mediju so Turner in sod. (2008) raziskovali na prašičjih urotelijskih celicah in ugotovili, da ta vpliva na razvoj funkcionalne urotelijske pregrade, torej se kaže v funkciji tesnih stikov. Ob prisotnosti seruma in nizkih koncentracij kalcija je bila prepustnost celic nizka, TER pa visoka. Prepustnost je bila nizka tudi v celicah, ki so jim dodali hranilni medij z dodanim serumom in višjo koncentracijo kalcija, medtem ko je bila prepustnost statistično značilno večja, kadar medij ni vseboval seruma. Tudi Cross in sod. (2005) so na humanih urotelijskih celicah izmerili najnižje prepustnosti za dekstran, kadar je medij vseboval serum (s kalcijem ali brez kalcija); kadar serum v mediju ni bil prisoten so bile prepustnosti statistično značilno večje. Višje prepustnosti urotelijskih celic za WGA-FITC gojenih v UroM ($-Ca^{2+}+S$) je možno razložiti s kratkoročnim vplivom seruma. Serum poveča proliferacijo urotelijskih celic (Southgate 1994, Kreft in sod. 2002) in omogoči nastanek hiperplazije, ki zmanjša prepustnost. Glede na rezultate dolgotrajne študije TER (Višnjar, 2009) predvidevamo, da bi bili rezultati prepustnosti lahko drugačni.

Na preučevanih urotelijskih celicah, ki smo jih gojili v mediju z dodanim serumom (UroM ($-Ca^{2+}+S$) in UroM ($+Ca^{2+}+S$)) in inkubirali z WGA-FITC 2 uri, smo ugotovili, da se po tretiranju celic z nokodazolom prepustnost zmanjša, medtem ko se je celicam gojenim v UroM ($+Ca^{2+}-S$) prepustnost povečala. Po razgradnji mikrotubulov, število veziklov v celicah, ki smo jih gojili v UroM ($+Ca^{2+}+S$) in UroM ($-Ca^{2+}+S$) naraste, večina pa se jih nahaja v razredu prvih desetih optičnih rezin pod apikalno plazmalemo. Večje število endocitotskih veziklov v teh celicah je lahko posledica večje koncentracije aktina. Mikrotubuli preprečujejo prehajanje endocitotskih veziklov proti bazalnemu delu celic, kar se odraža tudi v nižji prepustnosti celic tretiranih z nokodazolom.

Celice gojene v UroM ($+Ca^{2+}-S$), ne kažejo razlik v številu endocitotskih veziklov in količini aktinskih filamentov po tretiranju z nokodazolom. Prepustnost za WGA-FITC pa

po tretiranju z nokodazolom naraste. Odsotnost seruma v hranilnem mediju vpliva na večjo prepustnost urotelijskih celic (Cross in sod. 2005) zato je mogoče, da po tretiranju urotelijskih celic z nokodazolom prepustnost naraste.

Prepustnost celic po 24 urah inkubacije z WGA-FITC se po tretiranju z nokodazolom poveča v celicah gojenih v UroM (+Ca²⁺+S) in UroM (-Ca²⁺+S). Sklepamo, da 27 ur tretiranja z nokodazolom in inkubacija celic z WGA-FITC 24 ur verjetno predstavlja patološko stanje teh celic.

Celice MDCK po tretiranju z nokodazolom prav tako kažejo, da se prepustnost statistično značilno zmanjša, vendar je to veljalo le za celice, ki smo jih inkubirali 30 minut z WGA-FITC. Po inkubaciji z WGA-FITC 2 uri ali 24 ur prepustnost po tretiranju z nokodazolom naraste, kar smo podobno kot za prašičje urotelijske celice po 24 urni inkubaciji z WGA-FITC smatrali za patološko stanje.

5.1.7 Prepustnost urotelijskih celic je obratno sorazmerna s TER

Izmerjene vrednosti prepustnosti urotelijskih celic so bile zelo nizke, kar kaže da je bila pregrada, ki *in vivo* preprečuje prehajanje toksičnih snovi iz urina, tudi pri celicah v kulturi dobro razvita. Nizka prepustnost pomeni tudi dobro razvite tesne stike. Prisotnost tesnih stikov smo preverili z imunofluorescenco proti proteinom medceličnih stikov; imunofluorescenčna reakcija je bila vedno pozitivna.

Izmerjene vrednosti prepustnosti smo primerjali z izmerjenimi TER na istih kulturah in ugotovili, da najvišjim vrednostim TER ustrezajo najnižje vrednosti prepustnosti. Vrednosti TER so se gibale med 2500 in 4500 $\Omega \text{ cm}^2$, značilnost tesnih epitelijskih pa je, da imajo TER >500 $\Omega \text{ cm}^2$ (Fromter in Diamond, 1972). Torej so preučevane kulture urotelijskih celic z nizko prepustnostjo in visoko TER kazale značilnost tesnega epitelijskega.

Urotelija *in vitro* predstavlja dober model za študij celičnih mehanizmov in je pomembno orodje pri izvajanju toksikoloških, fizioloških, imunoloških in farmakoloških študij ter pri študiju karcinogeneze sečnega mehurja. Poleg tega pa je razvoj čim bolj diferenciranih

kultur urotelijskih celic pomemben z vidika uporabe urotelija pri rekonstrukcijah urinarnega sistema.

Razumevanje molekularnih mehanizmov, ki uravnavajo endocitozo je bistveno za učinkovito zdravljenje bakterijskih infekcij. Mnogo patogenov, vključno z *Escherichia coli*, vstopa v celice z endocitozo (Eto in sod., 2006). Plazmalema preprečuje mnogim biofarmacevtskim sredstvom prehajanje do tarčnega mesta, kar zmanjša učinkovitost teh sredstev. Tak je primer infekcije urinarnega trakta, kjer tradicionalno zdravljenje z antibiotiki manj učinkovito zaradi nezadostne penetracije antibiotika v urotelijske celice. Poznavanje endocitotskih mehanizmov nam omogoča pridobiti nova potencialna biofarmacevtska sredstva.

5.2 SKLEPI

1. Urotelijske celice z močnejšim izražanjem uroplakinov imajo nižjo endocitozo membransko vezanega označevalca v primerjavi z urotelijskimi celicami s šibkim izražanjem uroplakinov.
2. Urotelijske celice gojene v hranilnem mediju UroM (+Ca²⁺-S) imajo nižjo endocitotsko aktivnost kot celice gojene v UroM (+Ca²⁺+S) ali UroM (-Ca²⁺+S).
3. Visoko diferencirane urotelijske celice imajo manj α -tubulina kot delno diferencirane celice ter nižjo endocitotsko aktivnost. Nižja endocitotska aktivnost v višje diferenciranih celicah je lahko posledica manjše količine α -tubulina.
4. Endocitotska aktivnost urotelijskih celic je nižja od endocitotske aktivnosti celic MDCK.
5. Depolimerizacija mikrotubulov prepreči transcitozo WGA-FITC od apikalne do bazalne plazmaleme ter tako zmanjša prepustnost urotelijskih celic za WGA-FITC.
6. Sistema mikrotubulov in aktinskih filamentov sta verjetno povezana, saj depolimerizacija mikrotubulov vpliva na intenziteto fluorescence aktina v apikalni citoplazmi.
7. Prepustnost urotelijskih celic za WGA-FITC je nizka, ter obratno sorazmerna s transepitelijsko upornostjo.
8. Prepustnost urotelijskih celic za WGA-FITC je nižja v urotelijskih celicah kot v celicah MDCK.

6. POVZETEK

Endocitotska aktivnost urotelijskih celic mora biti nizka, da toksične snovi iz urina ne prehajajo v celice. Namen diplomske naloge je bil ugotoviti ali je endocitotska aktivnost urotelijskih celic odvisna od njihove diferenciacijske stopnje in prisotnosti mikrotubulov.

Endocitotsko aktivnost smo ugotavljali z membransko vezanim endocitotskim označevalcem WGA-FITC, tako da smo s programom »Count 3D« šteli število veziklov z WGA-FITC. Zanimalo nas je število veziklov v celicah z močnim izražanjem uroplakinov ter v celicah s šibkim izražanjem uroplakinov. Urotelijske celice smo gojili v treh različnih hranilnih medijih UroM in ugotavljali endocitotsko aktivnost. V diferenciranih urotelijskih celicah smo s preslikavo po Westernu ugotavljali količino α -tubulina, ki smo jo primerjali s količino α -tubulina v manj diferenciranih celicah. Zanimala nas je tudi endocitotska aktivnost celic MDCK, ki smo jo primerjali z endocitotsko aktivnostjo urotelijskih celic.

Odvisnost endocitotske aktivnosti urotelijskih celic od mikrotubulov smo ugotavljali s pomočjo nokodazola, agensa, ki prepreči polimerizacijo mikrotubulov. Urotelijske celice smo tretirali z nokodazolom in inkubirali z WGA-FITC. Zanimalo nas je število veziklov z WGA-FITC ter prepustnost urotelijskih celic za WGA-FITC po tretiranju z nokodazolom. Prepustnost urotelijskih celic smo primerjali s transepitelijsko upornostjo (TER). V urotelijskih celicah smo po tretiranju z nokodazolom ugotavljali še fluorescenco aktina, ki smo jo primerjali z netretiranimi celicami. Tudi celice MDCK smo tretirali z nokodazolom. Primerjali smo število veziklov z WGA-FITC med celicami MDCK tretiranimi z nokodazolom ter netretiranimi in prepustnost za WGA-FITC med netretiranimi celicami MDCK in tretiranimi z nokodazolom.

Z raziskavo smo potrdili odvisnost endocitotske aktivnosti urotelijskih celic od njihove diferenciacijske stopnje. Ugotovili smo, da imajo urotelijske celice z več uroplakini manjšo endocitotsko aktivnost kot urotelijske celice z manj uroplakini. Urotelijske celice gojene v hranilnem mediju UroM ($+Ca^{2+}$ -S) imajo najnižjo endocitotsko aktivnost glede na celice gojene v UroM ($+Ca^{2+}$ +S) ali UroM ($-Ca^{2+}$ +S). Za urotelijske celice gojene v UroM ($+Ca^{2+}$ -S) smo ugotovili tudi manj α -tubulina, ki verjetno vpliva na manjšo endocitotsko

aktivnost teh celic. Endocitotska aktivnost urotelijskih celic je bila 3 do 14 krat nižja kot endocitotska aktivnost celic MDCK.

Potrdili smo tudi odvisnost endocitotske aktivnosti urotelijskih celic od mikrotubulov. Depolimerizacija mikrotubulov je ustavila transcitozo WGA-FITC, kar se je odražalo tudi v nižji prepustnosti urotelijskih celic za WGA-FITC. Depolimerizacija mikrotubulov je vplivala tudi na količino aktina v apikalni citoplazmi urotelijskih celic. Verjetno je, da sta sistema mikrotubulov in aktinskih filamentov v urotelijskih celicah povezana.

Prepustnost urotelijskih celic za WGA-FITC je bila nizka in obratno sorazmerna s TER. Primerjava prepustnosti za WGA-FITC med urotelijskimi celicami in celicami MDCK je pokazala, da je prepustnost urotelijskih celic nižja kot v celicah MDCK.

V diplomski nalogi smo potrdili delovno hipotezo, da je endocitotska aktivnost urotelijskih celic odvisna od diferenciacijske stopnje in mikrotubulov.

7.VIRI

Acharya P., Beckel J., Ruiz WG., Wang E., Rojas R., Birder L., Apodaca G. 2004. Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287: 305-318.

Achtstätter T., Moll R., Moore B., Franke WW. 1985. Cytokeratin polypeptide patterns of different epithelia of human male urogenital tract: immunofluorescence and electrophoretic studies. *J Histochem Cytochem* 33: 415-426.

Anderem A.&Underhill DM. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*, 17: 593-623.

Apodaca, G. 2001. Endocytic traffic in polarized epithelial cells: Role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic* 2:149-159.

Apodaca G., Katz LA., Mostov KE. 1994. Receptor-mediated transcytosis of IgA in MDCK cells is via apical recycling endosomes. *J Cell Biol*, 125: 67-86.

Barnes D, Sato G.1980. Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell*, 22: 649-655.

Batista U. 2005. Gojenje sesalskih celic *in vitro* pogojih. Ljubljana, Študentska založba.

Battles, JR., HM. Ferraci, Stieger B., Hubbard AL. 1987. Biogenesis of the rat hepatocyte plasma membrane in vivo: comparison of the pathways taken by apical and basolateral proteins using subcellular fractionation. *J Cell Biol*, 105:1241-1251.

Bomsel, M., Prydz, K., Parton, RG., Gruenberg, J., Simons, K. 1989. Endocytosis in filter grown Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol*, 109, 3243-3258.

Breitfeld PP., McKinnon WC., Mostov KE. 1990. Effect of nocodazole on vesicular traffic to the apical and basolateral surfaces of polarized MDCK cells. *J Cell Biol*, 111: 2365-2373.

Chlapowski FJ., Haynes L. 1979. The growth and differentiation of transitional epithelium in vitro. *J Cell Biol*, 83: 605-14.

Cilento BG., Freeman MR., Schneck FX., Retik AB., Atala A. 1994. Phenotypic and cytogenetic characterization of human bladder urothelia expanded in vitro. *J Urol*, 152: 665-70.

Conner SD & Schmid L. 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422: 37-44.

Cross W.R., Eardley I., Leese H.J., Southgate J. 2005. A biomimetic tissue from cultured normal human urothelial cells: analysis of physiological function. *Am J Physiol Renal Physiol* 289, 459-468.

De Boer WI., Rebel JMJ., Vermey M., Thijssen CDEM., Van der Kwast TH. 1994. Multiparameter analysis of primary epithelial cultures grown on cylopore membranes. *J Histochem Cytochem*, 42: 277-82.

Deborde S., Perret E., Gravotta D., Deora A., Salvarezza S., Schreiner R., Rodriguez-Boulán E. 2008. Clathrin is a key regulator of basolateral polarity. *Nature*, 452: 719-723.

Ellinger I., Rothe A., Grill M., Fuhcs R. 2001. Apical to Basolateral Transcytosis and Apical Recycling of Immunoglobulin G in Trophoblast-Derived BeWo Cells: Effects of Low Temperature, Nocodazole, and Cytochalasin D. *Exp Cell Res*, 269: 322-331.

Eto DS., Sundsbak JL., Mulvey MA. 2006. Actin-gated intracellular growth and resurgence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 4, 704-717.

Foerg C., Ziegler U., Fernandez-Carneado J., Giralt E., Merkle H.P. 2007. Differentiation Restricted Endocytosis of Cell Penetrating Peptides in MDCK Cells Corresponds with Activities of Rho-GTPases. *Pharm. Res.* 24, 628-642.

Dibas A, Mia A, Yorio T.1999. Microfilament network is needed for the endocytosis of water channels and not for apical membrane insertion upon vasopressin action. *Proc Soc Exp Biol Med*, 223: 203-209.

Gekle M, Mildenerger S, Freudinger R, Schwerdt G, Silberagl S.1997. Albumin endocytosis in OK cells:dependence on actin and microtubules and regulation by protein kinases. *Am J Physiol*, 272: 668-F677.

Geneser F. 1986. Textbook of Histology. 1st ed, 2nd pr., *Philadelphia, Lea&Febiger*: 546-550.

Gottlieb TA., Ivanov IE., Adesnik M., Sabatini DD. 1993. Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells. *J Cell Biol*, 120: 695-710.

Gruenberg J., Griffiths G., Howell K. 1989. Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *J Cell Biol*,108: 1301-1316.

Guhe C. Föllmann W. 1994. Growth and characterization of porcine urinary bladder epithelial cells in vitro. *Am J Phys*, 266: 298-308.

Hall A., Nobes CD. 2002. Rho GTPases: Molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Phil Trans R Soc Land*, 355: 967-970.

Hicks RM. 1965. The fine structure of the transitional epithelium of the rat ureter. *J Cell Biol*, 26: 25-48.

Hicks RM. 1966. The permeability of rat transitional epithelium. *J Cell Biol*, 28: 21-31.

Hicks RM. 1975. The mammalian urinary bladder: an accommodating organ. *Biol Rev*, 50: 215-246.

Howard J., Hyman A.A. 2003. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* 422, 753-758.

Hu P., Deng F-M., Liang F-X., Hu C-M., Auerbach AB., 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. *J Cell Biol*, 151: 961-971.

Hunziker, W., Male, P., Mellman, I. 1990. Differential microtubule requirements for transcytosis in MDCK cells. *J Eur Mol Biol Organ*, 9: 3515-3525.

Hudoklin S. 2004. Analiza različnih dejavnikov za vzpostavitev sekundarne kulture mišjih urotelijskih celic. *Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo*.

Hutton, KAR., Trejdosiwicz LK., Thomas DFM., Southgate J. Urothelial tissue culture for bladder reconstruction: an experimental study. 1993. *J Urol*, 150: 721-725.

Kreft ME., Romih R. in Sterle M. 2002. Antigenic and ultrastructural markers associated with urothelial cytodifferentiation in primary explant outgrowths of mouse bladder. *Int Cell Biol*, 26: 63-74.

Kreft ME. 2002. Organizacija in diferenciacija primarne celične kulture eksplantata sečnega mehurja miši. *Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta*.

Kreft ME., Hudoklin S., Sterle M. 2005a. Establishment and Characterization of Primary and Subsequent Subcultures of Normal Mouse Urothelial Cells. *Folia Biologica*, 51: 126-132.

Kreft ME. Sterle M., Veranič P., Jezernik K. 2005b. Urothelial injuries and the early wound healing response: tight junction and urothelial differentiation. *Histochem Cell Biol*, 125: 475-285.

Kreft ME., Sterle M., Jezernik K. 2006. Distribution of junction- and differentiation-related proteins in urothelial cells at the leading edge of primary explant outgrowths. *Histochem Cell Biol*, 125: 475-485.

Kreft ME., Jezernik K., Kreft M., Romih R. 2009a. Endocytotic activity of bladder superficial urothelial cells is inversely related to their differentiation stage. *Differentiation*, 77: 48-59.

Kreft ME., Jezernik K., Kreft M., Romih R. 2009b. Apical plasma membrane traffic in superficial cells of bladder urothelium. *Ann NY Acad Sci*, 1152: 18-29.

Lewis SA., Berg JR., Kleine TJ. 1995. Modulation of epithelial permeability by extracellular macromolecules. *Physiol Rew* 75: 561-590.

Lewis SA. 2000. Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. *Am J Physiol-Renal Physiol* 278: F867-F874.

Maples, C., Ruiz, W.G. and Apodaca, G. 1997 Both actin and microtubules are required for efficient postendocytic traffic in MDCK cells. *J Biol Chem*, 272:6741-6751.

McCarthy KM., Yoong Y., Simister NE. 2000. Bidirectional transcytosis of IgG by the rat neonatal Fc receptor expressed in a rat kidney cell line: a system to study protein transport across epithelia. *J Cell Sci*, 113: 1277-1285

Mermall V, Post PL, Mooseker MS. 1998. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science*, 279: 527-533.

Mostov K., Apodaca G., Aroeti B., and Okamoto C.. 1992. Plasma membraneprotein sorting in polarized epithelial ceils. *J Cell Biol*, 116:577-583.

Negrete HO., Lavelle JP., Berg J., Lewis SA., Zeidel ML. 1996. Permeability properties of the intact mammalian bladder epithelium. *Am J Physiol*, 271: 886-894.

Parton, RG., Prydz, K., Bomsel, M., Simons, K., Griffiths, G. 1989. Meeting of the apical and basolateral endocytic pathways of the Madin-Darby canine kidney cell in late endosomes. *J Cell Biol*, 109: 3259-3272.

Peter S. 1978. The junctional connections between the cells of the urinary bladder in the rat. *Cell Tissue Res* 187: 439-448.

Petzoldt JL., Leigh IM., Duffy PG., Masters JR. 1994. Culture and characterisation of human urothelium in vivo and in vitro. *Urol Res* 2: 67-74.

Porter K., Kenyon K., Badenhause S. 1967. Specializations of the unit membrane. *Protoplasma*, 63: 262-274.

Romih R., Veranič P., Jezernik K. 1999. Actin filaments during terminal differentiation of urothelial cells in the rat urinary bladder. *Histochem Cell Biol* 112: 375-380.

Shurety W., Stewart NL., Stow JL. 1998. Fluid-phase markers in the basolateral endocytic pathway accumulate in response to the actinassembly-promoting drug jasplakinolide. *Mol Biol Cell* ,9: 957-975.

Simons, K., A. Wandinger-Ness. 1990. Polarized sorting in epithelia. *Cell*, 62:207-210.

Southgate J; Hutton K A; Thomas D F; Trejdosiewicz L K. 1994. Normal human urothelial cells in vitro: proliferation and induction of stratification. *Lab Invest*, 71: 583-593.

Tash JA., David SG., Vaughan D., Herzlinger DA. 2001. Fibroblast growth factor-7 regulates stratification of the bladder urothelium. *J Urol* : 2536-2541. 166.

Truschel ST., Ruiz WG., Shulman T., Pilewski J., Sun T-T., Zeidel ML., Apodaca G. 1999. Primary uroepithelial cultures. A model system to analyze umbrella cell barrier function. *J Biol Chem*, 274: 15020-15029.

Truschel ST., Wang E., Ruiz WG., Leung S-M., Rojas R., Lavelle J., Zeidel M., Stoffer D., Apodaca G. 2002. Stretch-regulated exocytosis/endocytosis in bladder umbrella cells. *Mol Biol Cell*, 13: 830-846.

Turner Alexander M; Subramaniam Ramnath; Thomas David F M; Southgate J. 2008. Generation of a functional, differentiated porcine urothelial tissue in vitro. *Eur Urol*, 54: 1423-32.

Ukmar M. 2006. Vpliv mezenhimskih celic na rast in diferenciacijo urotelijskih celic v kulturi. *Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo*.

Višnjar T. 2009. Fiziološke in strukturne spremembe v urotelijskih celicah in vitro med diferenciacijo. *Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo*.

Von Bonsdorff, C.-H., Fuller SD., Simons K. 1985. Apical and basolateral endocytosis in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells grown on nitrocellulose filters. *J Eur Mol Biol Organ*, 4: 2781-2792.

Wang H., Liang FX., Kong XP. 2008. Characteristics of the Phagocytic Cup Induced by Uropathogenic Escherichia. *J Histochem & Cytochem*, 56: 597-604.

Wu XR., Lin JH., Walz T., Haner M., Yu J., Aebi U., Sun T-T .1994. Mammalian uroplakins: a group of highly conserved urothelial differentiation-related membrane proteins. *J Biol Chem* 269: 13716-13724.

Wu XR., Manabe M., Yu J., Sun T-T. 1990. Large scale purification and immunolocalization of bovine uroplakins I, II, and III: molecular markers of urothelial differentiation. *J Biol Chem*, 65: 19170-19172.

Zurzolo, C., Le Bivic A., Quaroni A., Nitsch L., Rodriguez-Boulan E.. 1992. Modulation of transcytotic and direct targeting pathways in a polarized thyroid cell line. *J Eur Mol Biol Organ* , 11:2337-2344.

Yu J., Lin J.H., Wu XR, Sun T-T. 1994. Uroplakins Ia and Ib, two major differentiation products of bladder epithelium, belong to a family of four transmembrane domain (4TM) proteins. *J Cell Biol* 125, 171-182.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc.dr. Mateji Erdani Kreft za strokovno usmerjanje in pomoč pri nastanku mojega diplomskega dela ter za vso prijaznost izkazano z njene strani.

Hvala vsem zaposlenim na inštitutu za biologijo celice:

Prof. dr. Kristjanu Jezerniku
Prof. dr. Maksimilijanu Sterletu
Doc. dr. Petru Veraniču
Doc. dr. Roku Romihu
Asist. Dr. Andreji Erman
Asist. Dr. Samu Hudoklinu
Asist. Nataši Resnik
Sanji Čebraja
Nadi Pavlica
Sabini Železnik
Lindi Štrus
Marini Jeriha

PRILOGA A

ANALIZA INTENZITETE FLUORESCENCE UROPLAKINOV IN WGA-FITC

Tabela 1: Fluorescenca uroplakinov in WGA-FITC urotelijskih celic po tretiranju z nokodazolom ali brez v celicah z več uroplakini v apikalni plazmalemi ter v celicah z več WGA-FITC na apikalni plazmalemi

	Fluorescenca rdečega kanala	Fluorescenca zelenega kanala	število veziklov
	a.e.	a.e.	
2h,-noc	1085,91	91,49	0
Celice z > uroplak.	2732,8	367,89	0
	839,17	370,36	9
	1385,56	404,68	6
	1138,96	270,6	0
	1380,14	289,45	11
	1320,9	274,82	2
	1599,33	299,2	1
	608,33	139,77	0
	349,6	73,21	0
	562,47	980,68	0
	480,84	167,9	16
	650,9	261,26	8
	1580,28	358,41	5
numerus	14		
povprečje	1122,514	310,6943	4,461538
standardna napaka	167,3375	58,68516	1,45274
Celice z >WGA-FITC	48,89	584,69	0
	47,88	428,7	0
	49,17	507,08	7
	73,43	736,1	0
	61,52	954,11	27
	35,79	193,58	
	59,48	1010,76	8
	59,67	749,3	
	68,05	1286,4	4
	188,07	483,23	9
	73,43	4735,33	55
	262,87	3082,98	71
	66,33	3073,93	127
	75,04	4036,31	42
	52,54	1742,75	7
	65,01	1274,45	57
	59,01	1274,45	8
	41,02	984,02	4
	97,08	1368,86	5
	242,55	1370,48	16
	80,07	1601,21	13
	36,88	1584,57	68
	116,69	375,85	
	133,05	560,72	
	252,34	2039,88	15
	161,55	1106,79	13
	96,43	379,74	2

	109,39	414,19	
	1871,66	111,61	0
	31,19	1367,63	24
	33,96	1799,18	0
	34,7	1139,56	15
	190,74	927,82	2
	82,64	2309,16	8
	136,96	1068,56	36
	210,52	1037,53	7
	58,03	1798,18	85
	68,35	1248,93	18
	94,43	2553,3	9
	14,54	2754,26	0
	80,38	2810,93	14
	254,05	1241,52	0
	70,25	1106,31	21
	119,69	2428,48	8
	51,36	1515,11	8
	83,1	3197,46	8
numerus	74		
povprečje	134,7778	1486	20,02439
standardna napaka	39,76882	150,4998	4,275638
2h+noc	1021,29	88,41	0
Celice z > uroplak.	1693,66	185,09	0
	1997,08	57,89	0
	858,16	123,59	0
	458,85	75,74	0
numerus	5		
povprečje	1205,808	106,144	0
standardna napaka	280,7991	22,47686	0
Celice z >WGA-FITC	144,6	2986,5	8
	130,94	2432,39	69
	83,75	1483,55	45
	91,59	2137,42	0
	75,94	1007,41	0
	140,39	654,13	0
	120,42	2137,48	8
	153,02	2380,49	5
	180,87	2096,96	42
	81,05	501,75	0
	108,07	1314,74	14
	914,25	1898,7	0
	89,22	1271,08	0
	104,6	2017,14	19
	118,42	1858,38	115
	129,62	1612,87	25
	95,35	1450,79	52
	97,33	1371,9	35
	104,76	1473,97	15
	86,45	1236,86	81
	90,06	1046,57	11
	86,09	884,11	7
	106,43	1514,6	59
	100,14	1155,38	5

	364,41	1548,8	75
	210,77	893,34	0
	84,65	676,87	0
numerus	27		
povprečje	151,5996	1520,155	25,55556
standardna napaka	31,37721	116,0987	6,026138
24h -noc	1587,51	102,07	0
Celice z > uroplak	974,92	106,89	0
	511,53	204,77	2
	1189,5	142,67	0
	698,56	82,75	3
	2171,96	76,54	0
	1202,89	62,69	0
	218,82	59,24	0
	837,14	84,95	0
	1087,08	224,07	0
numerus	10		
povprečje	1047,991	114,664	0,5
standardna napaka	174,7108	18,32428	0,341565
Celice z >WGA-FITC	156,82	2611,55	28
	164,36	738,69	19
	176,59	2614,46	29
	231,55	1440,03	10
	173,83	4057,66	41
	177,54	2083,4	68
	236,56	4389,25	63
	152,86	1697,54	34
	52,95	1823,61	270
	279,85	679,29	100
	64,17	3008,94	127
	31,11	1313,69	238
	173,52	3840,27	150
	31,6	792,01	2
	41,72	385,57	35
	147,03	3205,09	0
	216,15	374,12	0
	101	1847,63	0
	108,92	4249,11	75
	60,61	3901,62	127
	57,61	3062,07	50
	89,88	1581,2	41
	86,82	4066,82	73
	60,77	2334,31	58
	187,93	2493,37	41
	130,5	3415,26	124
	52,52	962,71	17
	136,04	1003,02	5
	182,35	361,9	16
	123,85	1809,6	96
	79,79	427,89	28
	444,37	878,82	6
	37,4	1546,88	39
	39,43	1735,58	13
	52,89	651,63	14

	35,79	2193,11	104
	35,52	755,28	28
numerus	37		
povprečje	124,6541	2008,999	58,62162
standardna napaka	14,30648	205,6548	10,30848
24+noc	990,35	210,52	0
Celice z > uroplak.	536,95	37,71	0
	684,15	61,6	0
	611,14	69,95	0
	623,42	42,32	0
	616,59	28,98	0
	602,61	37,54	0
	955,09	21,21	0
numerus	7		
povprečje	702,5375	63,72875	0
standardna napaka	60,70445	21,72367	0
Celice z > WGA-FITC	131,76	393,59	134
	30,67	234,43	191
	42,87	306,45	248
	53,56	400,33	71
	79,04	337,34	9
	67,6	340,38	205
	95,32	376,14	438
	87,76	207,02	17
	66,43	452,74	155
	67,86	284,95	24
	245,69	977,91	0
	235,14	953,37	0
	103,88	236,24	0
	249,65	918,65	0
	143,6	441,1	0
	154,45	592,44	0
	218,27	782,69	0
	84,03	230,63	304
	58,88	220	192
numerus	20		
povprečje	116,6558	457,1789	165,6667
standardna napaka	16,44446	59,66941	36,90248

PRILOGA B

ŠTEVILO ENDOCITOTSKIH VEZIKLOV UROTELIJSKIH CELIC GOJENIH V RAZLIČNIH
HRANILNIH MEDIJIH, GLEDE NA TRETIRANJE Z NOKODAZOLOM

Tabela 2: Število endocitotskih veziklov v celicah, po posameznih razredih optičnih rezin

	Število veziklov po posameznih razredih optičnih rezin pod apikalno plazmalemo					
	- nokodazol			+ nokodazol		
	1-10	10-20	20-35	1-10	10-20	20-35
UroM (+Ca+S)						
	307	30	197	1577	161	49
	467	0	105	1046	424	27
	368	0	77	678	79	16
	10	56	150	580	159	28
	193	15	197	563	25	0
	78	20	97	486	0	0
	48	43	168	415	63	0
	152	104	297	1481	89	0
	8	79	305	727	27	0
	190	54	137			
numerus	10			9		
povprečje	182,1	211,8	173	839,2222	114,1111	13,33333
standardna napaka	31,35197	22,39143	15,69402	95,76732	28,68205	3,982989
24 h WGA-FITC	403	200	247	535	791	676
	453	320	372	495	492	435
	249	421	445	433	454	418
	181	57	190	585	328	51
	791	522	280	438	595	191
	763	586	315	683	229	101
numerus	6			6		
povprečje	473,3333	351	308,1667	528,1667	481,5	312
standardna napaka	85,10952	66,59396	30,31055	38,96016	81,00566	97,66337
UroM (+Ca-S)						
2h WGA-FITC	107	100	56	218	218	100
	49	57	8	468	34	4
	27	25	16	138	8	0
	64	6	12	85	0	0
	26	7	7	410	8	0
	0	12	78	83	22	0
	180	0	0	163	12	0
	99	89	48	210	4	0

	301	46	37	198	0	0
numerus	9			9		
povprečje	94,77778	38	29,11111	219,2222	34	11,55556
standardna napaka	10,49012	8,293981	8,958925	14,96671	15,52537	11,06435
24 h WGA-FITC	349	67	18	85	265	330
	234	262	70	1099	443	521
	134	154	145	152	319	232
	172	185	113	108	197	113
	277	307	137	108	151	112
	186	273	118	261	146	85
numerus	6			6		
povprečje	225,3333	208	100,1667	302,1667	253,5	232,1667
standardna napaka	13,07486	29,91395	19,58812	65,9019	38,17722	69,11219
UroM (-Ca+S)						
2h WGA-FITC	221	203	152	1041	427	77
	120	161	94	989	126	19
	164	162	137	617	375	47
	189	89	77	817	269	0
	169	276	280	730	155	93
	43	149	74	719	144	12
	131	261	199	363	84	70
	222	229	123	873	206	64
	276	125	103	427	80	4
numerus	9			9		
povprečje	170,5556	183,8889	137,6667	730,6667	207,3333	42,88889
standardna napaka	7,565172	13,9494	22,1372	25,79609	27,77333	11,6362
24h WGA-FITC	863	508	215	467	367	272
	111	313	333	388	377	249
	122	120	136	221	406	197
	174	173	249	84	196	124
	105	182	214	91	167	81
	128	201	268	57	219	117
numerus	6			6		
povprečje	250,5	249,5	235,8333	218	288,6667	173,3333
standardna napaka	50,17511	47,23123	26,78733	28,95552	35,26072	31,70349

PRILOGA C

ŠTEVILO ENDOCITOTSKIH VEZIKLOV CELIČNE LINIJE MDCK, GLEDE NA TRETIRANJE Z NOKODAZOLOM

Tabela 3: Število endocitotskih veziklov v celicah, po posameznih razredih optičnih rezin

	Število veziklov po posameznih razredih optičnih rezin pod apikalno plazmalemo					
	- nokodazol			+ nokodazol		
	1-10	10-20	20-35	1-10	10-20	20-35
2h WGA-FITC	1676	1188	1122	1876	522	433
	1701	1034	781	1419	540	583
	2352	2052	1312	1617	844	721
	1680	916	1101			
	2419	1815	1160			
	1519	1011	1561			
numerus	6			3		
povprečje	1891,167	1336	1172,833	1637,333	635,3333	579
standardna napaka	158,8006	194,6981	105,1158	132,3196	104,4657	83,16493
24 WGA-FITC	2724	2610	2010	2608	2323	2774
	2704	2132	2450	2432	2320	2331
	2378	2112	2523	2833	2768	2810
	2834	2523	2554	2471	2352	2278
	2670	2732	2790	2224	2247	2722
	2609	2692	2775	2149	2661	2525
numerus	6			6		
povprečje	2653,167	2466,833	2517	2452,833	2445,167	2573,333
standardna napaka	62,78318	112,9427	116,0507	102,3139	87,43472	94,27992

PRILOGA D

MAKSIMALNA INTENZITETA FLUORESCENCE AKTINA UROTELISJKIH CELIC GLEDE NA TRETIRANJE Z NOKODAZOLOM

Tabela 4: Fluorescenca aktina urotelijskih celic gojenih v hranilnih medijih UroM z dodanim nokodazolom ali brez

UroM (+Ca ²⁺ +S)		UroM (+Ca ²⁺ -S)		UroM (-Ca ²⁺ +S)	
-nokodazol	+nokodazol	-nokodazol	+nokodazol	-nokodazol	+nokodazol
104,72	260,47	543,26	419,23	302,52	503,62
110,05	156,49	342,32	740,72	275,89	514,11
50,98	131,57	278,2	295,34	422,07	131,07
128,18	85,05	468,74	277,52	57,28	314,68
165,93	149,74	342,91	513,91	47,11	461,65
386,75	180,08	353,15	518,24	72,13	241,35
190	98,71	432,33	295,86	245,53	471,08
93,3	210,24	360,31	308,18	248,19	445,89
55,25	76,71	331,68	242,36	69,7	599,2
125,74	151,18	193,74	123,13	72,52	487,91
139,28	201,8	432,26	502,91	168,78	643,93
110,27	150,96	250,09	314,88	72,36	395,27
38,45	116,23	313,58	168,67	279,13	150
39,43	74,17	257,3	261,27	278,08	475,68
214,84	193,75	110,09	155,99	68,22	69,51
210,25	417,23	135,07	171,04	100,6	130,05
39,28	140,55	177,37	170,52	274,73	132,5
56,26	135,67	227,92	130,5	206,94	658,56
171,04	36,92	256,3	238,87	256,16	102,9
246,82	69,85	78,84	459,03	75,72	167,13
105,66	336,1	587	428,81	473,05	768,44
40,31	154,48	123,03	46,43	703,73	150,74
210,05	50,09	244,57	52	715,28	239,92
193,6	51,3	161,57	67,64	132,64	371,76
58,7	41,24	519,01	99,08	85,14	363,03
81,59	37	743,56	95,09	270,93	339,65

131,89	46,42	278,61	348,82	116,09	125,74
170,94	55,07	369,17	424,35	333,71	110,82
140,43	271,67	166,8	237,67	656,95	129,4
232,97	378,99	98,54	376,58	512,25	336,93
70,51	225,06	102,53	351,11	681,3	149,6
48,78	279,79	211,87	347,88	179,27	72,28
243,33	171,85	90,23	464,38	311,45	72,3
81,65	156,1	138,75	278,16	350,73	112,84
41,1	174,31	95,37	249,29	102,12	117,59
49,97	183,1	87,15	191,42	144,97	153,42
152,7	142,02	115,98	281,55	57,95	355,82
58	166,72	203,7	253,94	42,86	747,24
60,5	264,88	88,02	173,27	43,5	435,23
182,54	189,73	493,99	468,32	70,15	497,12
37,56	241,53	314,33	491,53	64,86	145,97
36,81	227,57	302,36	414,22	492,1	43,77
328,1	277,52	402,15	213,85	375,86	62,62
75,04	41,71	575,07	124,38	168,91	124,27
69,35	469,03	418,91	251,23	87,49	59,22
84,96	317,4	232,79	119,58	56,63	167,73
60,92	350,71	266,34	76,35	40,32	47,06
45,47	209,61	164,02	77,35	58,18	406,34
100,04	204,17	208,07	264,63	58,9	138,7
317,08	123,52	246,18	232,51	152,49	282,92
42,61	242,47	209,27	171,98	51,91	63,73
323,41	632,63	159,62	496,4	113,33	64,94
52,87	108,44	229,74	410,51	633,16	304,32
39,08	812,4	142,62	295,46	93,48	258,35
317,31	184,52		385,12	57,74	470,04
37,64	78,44		579,99	50,6	122,97
32,74	243,6		461,65	128,96	283,33
49,68	22,48		257,46	89,13	141,11
86,54	29,33		156,8	86,44	155,21

	69,58	211,49		200,75	111,44	91,02
	124,8	95,89		257,6	168,01	476,87
	36,39	34,97		211,36	59,48	408,83
	177,14			223,1	634,37	172,33
	181,9			189,4	76,74	69,46
	61,11			86,16	62,7	60,2
	73,77			134,77	89,13	171,5
	81,12			89,46	183,11	562,21
	137,32			74,67	59,49	123,25
	47,37			400,26	76,7	131,09
	31,43			163,4	67,61	142,8
	66,95			134,29	140,74	423,73
	44,62			168,01	343,52	181,36
	86,36			185,99	197,72	113,81
	23,43			99,15	125,59	81,75
	26,48			104,69	84,16	88,82
	27,79			512,88	74,19	80,72
	93,65			647,53	108,32	122,53
	222,07			132,71	61,8	59,36
	105,51			194,64	82,76	85,07
	48,66			566,37	110,02	63,45
	71,65			160,48	179,65	75,91
	32,61			108,53		76,75
	97,04			160,09		98,04
	93,47			71,79		
	41,59			179,8		
	50,95			102,62		
	26,11			366,04		
	26,39			46,08		
	84,68			84,05		
numerus	89	62	54	89	81	83
povprečje	106,3055056	186,6568	271,7848	259,3442	191,7959	241,5593
Standardna napaka	8,607037438	17,97283	20,55131	16,51132	19,70276	20,41283

PRILOGA E

PREPUSTNOST UROTELIJSKIH CELIC ZA WGA-FITC

Tabela 3: Prepustnosti za WGA-FITC urotelijskih celic gojenih v hranilnih medijih UroM z dodanim nokodazolom ali brez .

	mg/ml	mg/ml
	-nokodazol	+nokodazol
UroM (+Ca+S)		
2h WGA-FITC	0,00010593	0,00000000
	0,00009391	0,00000129
	0,00009480	0,00000385
	0,00005571	0,00000548
numerus	4	4
povprečje	0,00007007	0,00000213
standardna napaka	0,00001947	0,00000109
24h WGA-FITC	0,00016078	0,00020109
	0,00014960	0,00018784
	0,00015929	0,00019834
	0,00011750	0,00021703
	0,00011035	0,00020563
	0,00011927	0,00017533
	0,00010478	0,00017825
	0,00011529	0,00017293
	0,00000000	0,00012738
numerus	9	9
povprečje	0,00012961	0,00018487
standardna napaka	0,00000813	0,00000874
UroM (+Ca-S)		
2h WGA-FITC	0,00004473	0,00003542
	0,00003056	0,00003680
	0,00004342	0,00004466
	0,00003403	0,00003330
	0,00003403	0,00003997
	0,00000349	0,00004934
	0,00000899	0,00002578
	0,00000139	0,00003640
	0,00001227	0,00005084
	0,00001510	0,00004812
	0,00000618	0,00001886
	0,00001223	0,00002096
numerus	9	9

povprečje	0,00002053	0,00003670
standardna napaka	0,00000455	0,00000309
24h WGA-FITC	0,00034580	0,00022683
	0,00031119	0,00022206
	0,00035936	0,00021087
	0,00010598	0,00021499
	0,00011214	0,00019822
	0,00012434	0,00015252
	0,00010752	0,00016296
	0,00010216	0,00014740
	0,00006504	0,00013722
		0,00016128
		0,00006336
numerus	9	11
povprečje	0,00018150	0,00017252
standardna napaka	0,00003989	0,00001469
UroM (-Ca+S)		
2h WGA-FITC	0,00000806	0
	0,00000383	0
	0,00000861	0
	0,00001123	
	0	
	0,00000302	
	0,00000698	
	0,00001700	
numerus	8	3
povprečje	0,00000734	0
standardna napaka	0,00000187	0
24 h WGA-FITC	0,00008382	0,00018353
	0,00009367	0,00017409
	0,00007853	0,00018115
	0,00009177	0,00018677
	0,00008446	0,00017918
	0,00010788	0,00013858
	0,00010895	0,00015028
	0,00011409	0,00012475
	0,00010503	0,00015748
	0,00005496	0,00014827
	0,00003649	0,00006676
		0,00006395

		0,00005401
numerus	11	13
povprečje	0,00008724	0,00013914
standardna napaka	0,00000720	0,00001333

PRILOGA F

PRIMERJAVA PREPUSTNOSTI IN TRANSEPITELIJSKE UPORNOSTI UROTELIJSKIH CELIC

Tabela: Prepustnost urotelijskih celic za WGA-FITC tretiranih z nokodazolom ali brez

	2h-noc	24,-noc	2h,+noc	24,+noc
	UroM (+Ca+S)			
	0	0,0001608	0	0,0001843
	0	0,0001496	0	0,0001649
	0	0,0001593	0	0,0001803
				0,0002076
				0,0001909
numerus		3	1	5
povprečje	0,000	0,0001566	0	0,0001856
standardna napaka	0,000	0,00000350	0	0,00000696
	UroM (-Ca+S)			
	0,00004473	0,0003458	0,00003542	0,0002268
	0,00003056	0,0003112	0,00003680	0,0002221
	0,00004341	0,0003594	0,00004466	0,0002109
	0,00003402		0,00003330	0,000215
	0,00003402		0,00003997	0,0001982
numerus	5	3	5	5
povprečje	0,00003735	0,0003388	0,00003803	0,0002146
standardna napaka	0,00000282	0,00001434	0,00000198	0,00000494
	UroM (+Ca-S)			
	0	0,00008382	0	0,0001837
	0	0,00009366	0	0,0001743
	0	0,00007852	0	0,0001814
		0,00009176		0,000187
		0,00008445		0,0001794
numerus	3	5	3	5
povprečje	0	0,00008644	0	0,0001811
standardna napaka	0	0,00000278	0	0,00000213

Tabela: Transepitelijska upornost urotelijskih celic (Višnjar, 2009)

	2h-noc (k Ω cm ²)	24,-noc (k Ω cm ²)	2h,+noc (k Ω cm ²)	24,+noc (k Ω cm ²)
	UroM (+Ca+S)			
	2,98	2,82	3,24	3,85
	3	2,85	3,25	3,88
	3,01	2,87	3,3	3,89
	3,03	2,88	3,3	3,93
	3,03	2,87	3,32	3,95
	3,06	2,9	3,32	3,95
	3,06	2,92	3,32	3,97
numerus	7			
povprečje	3,02428571	2,87285714	3,29285714	3,91714286
SE	0,0113089	0,01228904	0,01285714	0,016721
	UroM (-Ca+S)			
	2,79	2,66	2,63	3,35
	2,8	2,66	2,65	3,34
	2,8	2,64	2,66	3,35
	2,81	2,66	2,66	3,35
	2,83	2,66	2,62	3,36
	2,83	2,67	2,66	3,36
	2,82	2,68	2,64	3,36
numerus	7			
povprečje	2,81142857	2,66142857	2,64571429	3,35285714
SE	0,00594762	0,00459221	0,00611678	0,00285714
	UroM (+Ca-S)			
	3,73	4,23	4,17	3,81
	3,73	4,23	4,16	3,81
	3,71	4,23	4,18	3,083
	3,74	4,24	4,16	3,083
	3,75	4,25	4,17	3,089
	3,75	4,23	4,16	3,089
	3,77	4,27	4,17	3,82

numerus	7			
povprečje	3,74	4,24	4,16714286	3,39771429
SE	0,00723747	0,0057735	0,00285714	0,14695184

PRILOGA G

PREPUSTNOST CELIC MDCK ZA WGA-FITC

Tabela 5: prepustnosti celic MDCK za WGA-FITC po tretiranju z nokodazolom ali brez

	30'		2 h		24h	
	- nokodazol	+ nokodazol	-nokodazol	+nokodazol	-nokodazol	+nokodazol
	0,00001621	0,00000793	0,00002952	0,00008237	0,00028360	0,00043881
	0,00002377	0,00001223	0,00004000	0,00007144	0,00031678	0,00042733
	0,00001628	0,00000145	0,00004355	0,00007128	0,00028745	0,00045339
	0,00003724	0,00000625	0,00004844	0,00008312	0,00026821	0,00043695
	0,00004199	0,00000240	0,00002934	0,00009523	0,00031574	0,00077089
	0,00002563	0,00000177	0,00003645	0,00009165	0,00032978	0,00072956
	0,00003692				0,00033190	0,00076931
					0,00034071	0,00074780
						0,00073732
numerus	7	6	6	6	8	9
povprečje	0,00002829	0,00000534	0,00003788	0,00008252	0,00030927	0,00061237
standardna napaka	0,00000462	0,00000241	0,00000379	0,00000472	0,00000996	0,00005567