

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Tanja VIŠNJAR

**FIZIOLOŠKE IN STRUKTURNE SPREMEMBE V UROTELIJSKIH  
CELICAH *IN VITRO* MED DIFERENCIACIJO**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**PHYSIOLOGICAL AND STRUCTURAL MODIFICATIONS OF  
UROTHELIAL CELLS *IN VITRO* DURING DIFFERENTIATION**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključno delo Univerzitetnega dela študija biologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Inštitutu za biologijo celice Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, kjer je potekalo gojenje tkivnih kultur, imunofluorescentno označevanje proteinov s protitelesi in vse mikroskopske metode ter meritve.

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

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

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

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.

Datum zagovora: 28.08.2009

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tanja Višnjar

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	612 : 616.62 – 001 (043.2) = 163.6
KD	urotelij/sekundarna celična kultura/transepitelijska upornost/diferenciacija/Golgijev aparat
AV	VIŠNJAR, Tanja
SA	ERDANI KREFT, Mateja (mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2009
IN	FIZIOLOŠKE IN STRUKTURNE SPREMEMBE V UROTELIJSKIH CELICAH <i>IN VITRO</i> MED DIFERENCIACIJO
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIV, 94 str., 7 pregl., 16 sl., 9 pril., 99 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Za normalno delovanje sečnega mehurja so pomembne dokončno diferencirane urotelijske celice, ki zagotavljajo krvno-urinsko pregrado ter preprečujejo prehod patogenom in nekontrolirano prehajanje vode, ionov in strupenih, potencialno rakotvornih metabolitov iz urina v vezivno tkivo in krvožilje. Med diferenciacijo urotelijskih celic prihaja do fizioloških in strukturnih sprememb, ki smo jih raziskovali na prašičjih urotelijskih celicah <i>in vitro</i> . V visoko diferenciranih površinskih celicah dvo- do troskladnega urotelija smo dokazali prisotnost diferenciacijskih označevalcev uroplakinov v apikalni plazmalemii, kompleksnega GA, CK 20 in CK 7 v apikalni citoplazmi, aktina ob lateralni plazmalemii ter E-kadherina in okcludina v apikalni lateralni plazmalemii. Ugotovili smo, da je razporejanje in organizacija Gollgijevega aparata (GA) ter $\alpha$ -tubulina odvisno od stopnje diferenciacije. Med diferenciacijo prehaja GA od osnovne preko prehodne do kompleksne oblike, izražanje $\alpha$ -tubulina pa se zmanjšuje. Z merjenjem transepitelijske upornosti (TER) smo dokazali tudi funkcionalnost tesnih stikov in ugotovili, da v hranilni medij dodana $\text{Ca}^{2+}$ ter serum (FBS) vplivata na diferenciacijo in proliferacijo urotelijskih celic. V hranilni medij dodani $\text{Ca}^{2+}$ pospešuje diferenciacijo, serum pa proliferacijo. Najbolj stabilno in visoko TER so dosegle urotelijske celice, ki so rasle v mediju UroM (+ $\text{Ca}^{2+}$ -S).

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC 612 : 616.62 – 001 (043.2) = 163.6
- CX urothelium/secondary cell culture/transepithelium resistance/differentiation/Golgi apparatus
- AU VIŠNJAR, Tanja
- AA ERDANI KREFT, Mateja (mentor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2009
- TI PHYSIOLOGICAL AND STRUCTURAL MODIFICATIONS OF UROTHELIAL CELLS *IN VITRO* DURING DIFFERENTIATION
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO XIV, 94 p., 7 tab., 16 fig., 9 ann., 99 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Terminally differentiated urothelial cells are necessary for the normal functioning of the urinary bladder as they ensure blood-urine barrier, prevent transport of pathogens and unregulated movement of water, ions, solutes and potential carcinogenic metabolites across the urothelium to the underlying connective tissue and blood system. During the differentiation of urothelial cells, physiological and structural modifications occur; these were examined in porcine urothelial cells *in vitro*. In highly differentiated superficial urothelial cells, the presence of differentiation-related markers uroplakins in the apical plasma membrane, complex GA, CK 20 and CK 7 in apical cytoplasm, actin along lateral plasma membrane, E-cadherin and occludin at the apical lateral plasma membrane was proved. Changes of GA and  $\alpha$ -tubulin depend on the degree of urothelial cell differentiation. During differentiation, GA progresses from basic over transitional to complex form, the expression of  $\alpha$ -tubulin decreases. Measurements of transepithelial resistance (TER) prove functionality of tight junctions.  $\text{Ca}^{2+}$  and bovine serum added in the culture media influence the differentiation and proliferation of the urothelial cells. Extra  $\text{Ca}^{2+}$  encourages cell differentiation, while extra serum induces cell proliferation. High and the most stable TER was confirmed in the urothelial cells growing with UroM (+ $\text{Ca}^{2+}$ -S).

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	X
KAZALO PREGLEDNIC.....	XI
KAZALO SHEM.....	XI
KAZALO GRAFOV .....	XII
KAZALO PRILOG .....	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	XIII
1 UVOD .....	1
1.1 Cilji raziskovanja.....	2
1.2 Delovne hipoteze.....	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 SEČNI MEHUR SESALCEV .....	3
2.2 SPLOŠNE LASTNOSTI UROTELIJA SESALCEV <i>IN VIVO</i> .....	3
2.2.1 Vloga urotelija.....	3
2.2.2 Zgradba urotelija .....	3
2.3 DIFERENCIACIJA UROTELIJA.....	5
2.3.1 Odebeljena apikalna plazmalema.....	5
2.3.2 Golgijev aparat .....	8

2.3.3 Citoskelet.....	10
2.3.3.1 Aktinski filamenti .....	10
2.3.3.2 Mikrotubuli.....	11
2.3.3.3 Intermediarni filamenti .....	13
2.3.4 Medcelične povezave .....	14
2.3.4.1 Tesni stiki .....	14
2.3.4.2 Adherentni stiki .....	15
2.3.4.3 Dezmosomi.....	16
2.4 TRANSEPITELIJSKA UPORNOST .....	17
2.4.1 Transepitelijska upornost urotelijskih celic <i>in vivo</i> .....	17
2.4.2 Transepitelijska upornost urotelijskih celic <i>in vitro</i> .....	18
2.4.3 Transepitelijska upornost celic MDCK in T24 .....	19
2.5 KULTURE UROTELIJSKIH CELIC .....	20
2.5.1 Primarna kultura urotelijskih celic .....	21
2.5.2 Sekundarna kultura urotelijskih celic.....	22
2.5.3 Trajna celična linija urotelijskih celic .....	23
2.6 HRANILNI MEDIJI .....	23
3 MATERIAL IN METODE DELO.....	25
3.1 POSKUSNI ŽIVALSKI MATERIAL.....	25
3.2 ODMRZOVANJE IN NASAJANJE CELIC .....	25
3.3 SEKUNDARNE UROTELIJSKE CELIČNE KULTURE.....	26
3.4 CELIČNI LINIJI CELIC MDCK IN T24.....	28
3.5 HRANILNI MEDIJI .....	28

3.6 TIPI POSKUSOV .....	31
3.7 IMUNOFLUORESCENTNO OZNAČEVANJE PROTEINOV V SEKUNDARNI KULTURI PRAŠIČJIH UROTELIJSKIH CELIC .....	31
3.7.1 Označevanje kromatina s fluorescentnim barvilom DAPI.....	34
3.7.2 Dvojna imunofluorescenca Golgijevega aparata (GA) in uroplakinov.....	34
3.7.3 Dvojna imunofluorescenca $\alpha$ -tubulina in uroplakinov.....	35
3.7.4 Dvojna imunofluorescenca aktina in GA.....	36
3.7.5 Dvojna imunofluorescenca GA in proteina tesnih stikov – okludina .....	36
3.7.6 Imunofluorescenca proteina adherentnih stikov E-kadherina.....	37
3.7.7 Dvojna imunofluorescenca proteinov intermediarnih filamentov – citokeratinov 20 in 7 ter uroplakinov .....	37
3.7.8 Imunofluorescenca vimentina .....	38
3.7.9 Imunofluorescenca dezmina.....	39
3.7.10 Negativna kontrola.....	39
3.8 SHEMA POTEKA POSKUSOV .....	40
3.9 ANALIZA FLUORESCENTNIH SLIK PRAŠIČJIH UROTELIJSKIH CELIC .....	41
3.9.1 Ugotavljanje števila jeder ob prisotnosti in odsotnosti seruma v mediju.....	41
3.9.2 Ugotavljanje prisotnosti uroplakinov na površini površinskih urotelijskih celic.....	41
3.9.3 Ugotavljanje oblike GA v površinskih urotelijskih celicah z različno izraženimi uroplakini v apikalni plazmalemi .....	42
3.9.4 Merjenje fluorescence $\alpha$ -tubulina v površinskih urotelijskih celicah z različno izraženimi uroplakini v apikalni plazmalemi .....	42
3.10 MERJENJE TRANSEPITELIJSKE UPORNOSTI (TER) .....	43
3.10.1 Merjenje transepiteljske upornosti (TER) pri sekundarni kulturi prašičjih urotelijskih celic .....	44

3.10.2 Merjenje transepitelijske upornosti (TER) celic MDCK in celic T24 .....	44
4 REZULTATI.....	46
4.1 CELIČNE KULTURE .....	46
4.1.1 Sekundarna kultura prašičjih urotelijskih celic .....	46
4.1.2 Trajni celični liniji celic MDCK in T24.....	49
4.2 IMUNOFLUORESCENTNO OZNAČEVANJE .....	50
4.2.1 Fluorescenca kromatina.....	50
4.2.2 Imunofluorescenca uroplakinov .....	51
4.2.3 Imunofluorescenca GA in uroplakinov .....	54
4.2.4 Imunofluorescenca $\alpha$ -tubulina in uroplakinov .....	56
4.2.5 Imunofluorescenca aktina in GA.....	58
4.2.6 Imunofluorescenca proteina adherentnih stikov E-kadherina .....	60
4.2.7 Imunofluorescenca GA in proteina tesnih stikov – okludina.....	62
4.2.8 Imunofluorescenca proteinov intermediarnih filamentov – citokeratinov 7 in 20 ter uroplakinov.....	63
4.2.9 Imunofluorescenca vimentina in dezmina.....	65
4.3 TRANSEPITELIJSKA UPORNOST (TER).....	66
4.3.1. TER prašičjih urotelijskih celic.....	66
4.3.2 Transepitelijska upornost celic MDCK.....	70
4.3.3 Transepitelijska upornost celic T24 .....	71
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	72
5.1 RAZPRAVA .....	72
5.1.1 V hranilni medij dodani serum povečuje proliferacijo urotelijskih celic, $Ca^{2+}$ pa diferenciacijo .....	73



5.1.2	Površinske urotelijske celice v kulturi dosežejo visoko stopnjo diferenciacije .....	74
5.1.3	Uroplakini so prisotni v apikalni plazmalemi visoko diferenciranih urotelijskih celic <i>in vitro</i> .....	74
5.1.4	Preoblikovanje in prerazporejanje GA med diferenciacijo urotelijskih celic <i>in vitro</i> .....	75
5.1.5	Prerazporejanje $\alpha$ -tubulina med diferenciacijo urotelijskih celic.....	77
5.1.6	Reorganizacija GA sovpada s prerazporejanjem $\alpha$ -tubulina.....	77
5.1.7	Prerazporejanje in organizacija citokeratinov med diferenciacijo urotelijskih celic	78
5.1.8	Prerazporejanje aktina med diferenciacijo urotelijskih celic .....	79
5.1.9	Med površinskimi urotelijskimi celicami <i>in vitro</i> so razviti adherentni stiki .....	80
5.1.10	Med površinskimi urotelijskimi celicami <i>in vitro</i> so razviti funkcionalni tesni stiki, ki določajo visoko TER.....	80
5.1.11	Krvno-urinska pregrada je med rakastimi urotelijskimi celicami porušena .....	83
5.2	SKLEPI.....	84
6	POVZETEK .....	86
7	LITERATURA.....	88

## KAZALO SLIK

Slika 1: Sekundarna kultura prašičjih urotelijskih celic 2. dan po nasaditvi.....	46
Slika 2: Tri mesece stare kulture prašičjih urotelijskih celic (VII. pasaža) .....	47
Slika 3: Dva meseca stari celični kulturi celic MDCK in T24 pod invertnim mikroskopom ...	49
Slika 4: Fluorescentno označena jedra v celični kulturi v UroM (+Ca <sup>2+</sup> -S) .....	50
Slika 5: Imunofluorescenca uroplakinov sekundarne kulture prašičjih urotelijskih celic VII. pasaže.....	51
Slika 6: Imunofluorescenca uroplakinov v kulturi prašičjih urotelijskih celic IX. pasaže.....	52
Slika 7: Imunofluorescenca GA, uroplakinov in jeder celic v prašičjih urotelijskih celicah VII. pasaže.....	54
Slika 8: Kultura površinskih prašičjih urotelijskih celic IX. pasaže z imunofluorescentno označenimi uroplakini, $\alpha$ -tubulinom in jedri celic. ....	56
Slika 9: Primerjava razporeditve aktina in GA v apikalnem in bazalnem delu površinskih urotelijskih celic IX. pasaže.....	59
Slika 10: Imunofluorescenca proteina adherentnih stikov E-kadherina v prašičjih urotelijskih celicah IX. pasaže. ....	61
Slika 11: Imunofluorescenca proteina tesnih stikov okcludina ter GA v kulturi prašičjih urotelijskih celic IX. pasaže.....	62
Slika 12: Supramolekularna organizacija CK 20 in uroplakinov v površinskih urotelijskih celicah.....	63
Slika 13: Supramolekularna organizacija CK 20 v sekundarni kulturi prašičjih urotelijskih celic.....	64
Slika 14: Supramolekularna organizacija CK 7 v sekundarni kulturi prašičjih urotelijskih celic.....	64
Slika 15: Imunofluorescenca CK 7 in CK 20 v različnih medijih.....	65
Slika 16: Kultura prašičjih urotelijskih celic IX. pasaže ob doseženi transepitelijski upornosti 3000, 6000 in 9000 $\Omega\text{cm}^2$ .....	69

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava hranilnega medija za prašičje urotelijske celice UroM (-Ca <sup>2+</sup> +S) .....	288
Preglednica 2: Sestava hranilnega medija za prašičje urotelijske celice UroM (+Ca <sup>2+</sup> +S).....	29
Preglednica 3: Sestava hranilnega medija za prašičje urotelijske celice UroM (+Ca <sup>2+</sup> -S) .....	29
Preglednica 4: Sestava hranilnega medija za celice MDCK .....	30
Preglednica 5: Sestava hranilnega medija za celice T24.....	30
Preglednica 6: Prikaz poskusov na prašičjih urotelijskih celicah MDCK in T24 .....	31
Preglednica 7: Uporabljena primarna in sekundarna protitelesa za imunofluorescentno dokazovanje proteinov.....	33

## KAZALO SHEM

Shema 1: Zgradba urotelija.....	4
Shema 2: Uroplakinske podenote v urotelijskem plaku .....	6
Shema 3: Zgradba Golgijevega aparata.....	8
Shema 4: Citoskeletni elementi .....	10
Shema 5: Shematični prikaz medceličnih povezav v epiteljskih celicah.....	14
Shema 6: Stekleničke za gojenje celičnih kultur različnih površin. ....	25
Shema 7: Porozne membrane v plastični petrijevki in večprekatno stekelce.....	27
Shema 8: Merjenje TER na poroznih membranah s STX2 elektrodami in epiteljskim voltmetrom (EVOM & EVOMX) .....	44

## KAZALO GRAFOV

Graf 1: Število celičnih jeder prešteti na vidnem polju pri kulturi prašičjih urotelijskih celic s hranilnim medijem UroM (+Ca <sup>2+</sup> -S) in UroM (-Ca <sup>2+</sup> +S) .....	48
Graf 2: Povprečna površina prašičjih urotelijskih celic IX. pasaže z uroplakini v apikalni plazmalemi.....	53
Graf 3: Odvisnost med znotrajcelično lokalizacijo uroplakinov in obliko GA.....	55
Graf 4: Razmerje intenzitete fluorescence med uroplakini in $\alpha$ -tubulinom pri površinskih urotelijskih celicah.....	58
Graf 5: Primerjava transepitelijske upornosti med prašičjimi urotelijskimi celicami IX. pasaže, ki so rastle v različnih hranilnih medijih .....	68
Graf 6: Transepitelijske upornost celic MDCK in SE.....	70
Graf 7: Transepitelijska upornost celic T24 ter SE .....	71

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Površina vidnega polja z uroplakini na površini dežnikastih celic v različnih hranilnih medijih	
Priloga B: Odvisnost med znotrajcelično lokalizacijo uroplakinov in obliko GA v sekundarni urotelijski kulturi	
Priloga C: Meritve transepitelijske upornosti (TER) sekundarne urotelijske celične kulture med gojenjem v UroM (+Ca <sup>2+</sup> +S)	
Priloga D: Meritve transepitelijske upornosti (TER) sekundarne urotelijske celične kulture med gojenjem v UroM (-Ca <sup>2+</sup> +S)	
Priloga E: Meritve transepitelijske upornosti (TER) sekundarne urotelijske celične kulture med gojenjem v UroM (+Ca <sup>2+</sup> -S)	
Priloga F: Meritve transepitelijske upornosti (TER) trajne celične linije ledvičnih celic (MDCK)	
Priloga G: Meritve transepitelijske upornosti (TER) trajne celične kulture rakastih urotelijskih celic T24	

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2r	premer
a.e.	arbitratna enota intenzitete fluorescence
A-DMEM	kemijsko definiran hranilni medij ( <i>Advance – Dulbecco's modification of Eagle's medium</i> )
AUM	asimetrično odebeljena plazmalema ( <i>Asymmetric Unit Membrane</i> )
CK	citokeratini
DAPI	fluorescentno barvilo, ki obarva kromatin (4,6-diamine-2-phenylindole dihydrochloride)
ER	endoplazemski retikulum
FBS	goveji fetalni serum ( <i>Fetal Bovin Serum</i> ; pri oznaki hranilnega medija smo ga označili s črko S)
FV	fuziformni vezikli
GA	Golgijev aparat
IF	intermediarni filamenti
KC	Klinični center Ljubljana
KSFM	kemijsko definiran keratinocitni hranilni medij brez seruma ( <i>Keratinocyte Serum-Free Medium</i> )
mM	milimolarno
MCDB 153	kemijsko definiran medij
MDCK	trajna celična linija ledvičnih celic ( <i>Madin-Darby Canine Kidney</i> )
MTOC	mikrotubulski organizacijski center ( <i>MicroTubule-Organizing Center</i> )
N	velikost vzorca
PBS	fosfatni pufer ( <i>phosphate buffered saline</i> )

P <sub>U</sub>	prašičje urotelijske celice
SD	standardna deviacija ali standardni odklon
SE	standardna napaka ocene aritmetične sredine
T24	trajna celična linija rakastih urotelijskih celic
TER	transepitelijska upornost ( <i>TransEpithelium Resistance</i> )
UP	uroplakini (Ia, Ib, II, III): proteini asimetrično odebeljene membrane
ZO-1	znatrajcelični pritrjevalni protein tesnega stika

## 1 UVOD

Epitelij oz. urotelij sečnega mehurja sesalcev je iz treh celičnih skladov. Sestavljajo ga nediferencirane bazalne celice, delno diferencirane vmesne celice in visoko diferencirane površinske ali dežnikaste celice (Hicks, 1975). Za označevalce visoko diferenciranih površinskih urotelijskih celic veljajo fuziformni vezikli v apikalni citoplazmi, odebeljena apikalna plazmalema, kompleksni GA (Hudoklin in sod., 2009), prisotnost CK 20 in CK 7 (Romih in sod., 2002, 2005; Riedel in sod., 2005; Erman in sod., 2006), povezovanje celic s tesnimi in adherentnimi stiki ter dezmosomi (Hicks, 1975). Tudi primarne in sekundarne kulture prašičjih urotelijskih celic *in vitro* lahko dosežejo določeno stopnjo diferenciacije, ki pa ni dokončna (Ludwikowski in sod., 1999; Turner in sod., 2008). Kljub mnogim raziskavam urotelija tako *in vivo* kot *in vitro* pa ostaja v procesu diferenciacije urotelija še mnogo neznanega. Z opazovanjem fizioloških in strukturnih sprememb urotelijskih celic *in vitro* med diferenciacijo smo ob uporabi različnih hranilnih medijev želeli prispevati k boljšemu razumevanju procesa diferenciacije urotelijskih celic.

Za raziskave diferenciacije urotelijskih celic smo uporabili kulture normalnih urotelijskih celic iz treh ključnih razlogov. Celice v kulturi rastejo v kontroliranih razmerah, ki jih lahko tudi nadzorovano spreminjamo. Urotelijske celice *in vitro* so lažje dostopne za raziskovanje z različnimi analitičnimi biokemijskimi, fiziološkimi in mikroskopskimi metodami kot urotelijske celice *in vivo*. Časovno spremljanje in analiza celične diferenciacije je lažja v kulturi kot *in vivo*.

V dosedanjih raziskavah ni podatkov o razporejanju Golgijevega aparata (GA) in mikrotubulov med diferenciacijo urotelijskih celic, zato smo v različno diferenciranih urotelijskih celicah *in vitro* opazovali obliko in organizacijo GA ter mikrotubulov. Z ugotavljanjem prisotnosti diferenciacijskih označevalcev smo želeli ugotoviti stopnjo diferenciacije urotelijske kulture.

Rast in diferenciacijo celic določajo in usmerjajo mnogi dejavniki, katerih učinke je zelo težko proučevati v pogojih *in vivo*. Precej lažje je proučevati učinke posameznih komponent hranilnega medija v pogojih *in vitro*, kjer so življenjske razmere natančno določene. Z gojenjem prašičjih urotelijskih celic v treh različnih medijih smo želeli vplivati na stopnjo diferenciacije celic ter ugotoviti vpliv v hranilni medij dodanega seruma (FBS) in  $Ca^{2+}$  na fiziološke in strukturne spremembe celic.

Diferenciran urotelij deluje kot učinkovita krvno-urinska pregrada. Pri zagotavljanju krvno-urinske pregrade so ključne visoko diferencirane površinske urotelijske celice, ki mejijo na lumen sečnega mehurja. Kar 70–90 % njihove apikalne plazmaleme gradijo integralni transmembranski glikoproteini – uroplakini, ki skupaj z dobro razvitimi tesnimi stiki

vzdržujejo krvno-urinsko pregrado. Z dolgotrajnim merjenjem transepitelijske upornosti (TER) smo želeli ugotoviti funkcionalnost tesnih stikov pri kulturi prašičjih celic ter spreminjanje le-te med gojenjem v različnih hranilnih medijih.

### 1.1 Cilji raziskovanja

- i) Ugotoviti vpliv seruma (FBS) in  $\text{Ca}^{2+}$  na stopnjo diferenciacije sekundarne kulture normalnih prašičjih urotelijskih celic (VII. in IX. pasaže). Stopnjo diferenciacije ovrednotiti z imunooznačevanjem uroplakinov, proteinov medceličnih stikov in proteinov citoskeleta.
- ii) Ugotoviti organizacijo in znotrajcelično razporeditev Golgijevega aparata (GA) v različno diferenciranih urotelijskih celicah.
- iii) Ugotoviti izražanje  $\alpha$ -tubulina v različno diferenciranih urotelijskih celicah in ugotoviti razmerje med količino uroplakinov v apikalni plazmalemii ter mikrotubulov v citoplazmi.
- iv) Določiti z merjenjem TER funkcionalnost tesnih stikov med urotelijskimi celicami ter primerjati izmerjeno TER normalnih urotelijskih celic s TER trajne celične linije normalnih ledvičnih epitelijskih celic (MDCK) in trajne celične linije rakastih urotelijskih celic (T24).

### 1.2 Delovne hipoteze

- i) Višjo stopnjo diferenciacije bodo dosegle prašičje urotelijske celice v hranilnem mediju z dodanim  $\text{Ca}^{2+}$ , v hranilni medij dodani serum pa bo povečal število delitev celic.
- ii) Organizacija in razporeditev Golgijevega aparata je odvisna od stopnje diferenciranosti urotelijskih celic.
- iii) Zmanjšano izražanje  $\alpha$ -tubulina sovпада z diferenciacijo urotelijskih celic in povzroči razdelitev GA v več podenot in nastanek kompleksnega GA.
- iv) TER je odvisna od stopnje diferenciranosti urotelijskih celic.
- v) TER normalnih prašičjih urotelijskih celic (IX. pasaže) je višja od transepitelijske upornosti normalnih ledvičnih epitelijskih celic (MDCK) in rakastih urotelijskih celic (T24).



## **2 PREGLED OBJAV**

### **2.1 SEČNI MEHUR SESALCEV**

Ena od prilagoditev sesalcev na kopenski način življenja je tudi sečni mehur, ki omogoča učinkovito odstranjevanje odpadnih produktov metabolizma in varčevanje z vodo (Hicks, 1975).

Sečni mehur je votel organ, ki ga gradijo serozna, mišična in mukozna plast. Serozno plast sestavlja predvsem vezivno tkivo, obdano s tankim slojem mezotelijskih celic. Mišična plast je zgrajena iz treh plasti gladkih mišic (notranje in zunanje vzdolžne plasti ter krožne srednje plasti). Mukozno plast gradita lamina proprija in epitelij, ki leži na bazalni lamini. Ta epitelij imenujemo tudi urotelij in ima značaj prehodnega epitelija (Hicks, 1975).

### **2.2 SPLOŠNE LASTNOSTI UROTELIJA SESALCEV *IN VIVO***

#### **2.2.1 Vloga urotelija**

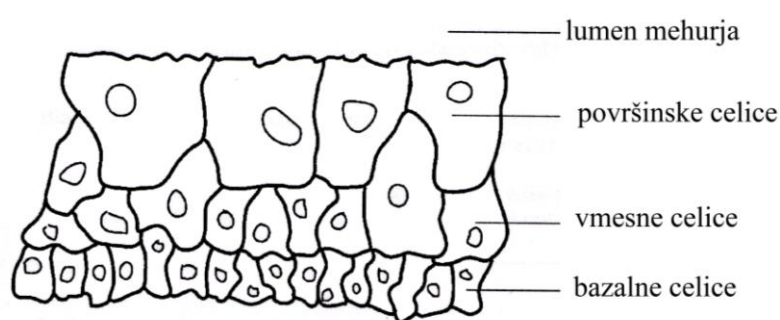
Urotelij omogoča uspešno prilagoditev sesalcev na kopenski način življenja. Urotelij sestavlja notranji del votlega mehurja, sečevodov, ledvičnih čašic in zgornjega območja sečnice in je v neposrednem stiku z urinom. Glavna vloga urotelija sesalcev je zagotavljanje krvno-urinske pregrade (Hicks, 1975), delno pa lahko vpliva tudi na sestavo urina (Deng in sod., 2001).

#### **2.2.2 Zgradba urotelija**

Urotelij doseže visoko stopnjo diferenciacije že ob koncu embrionalnega in v začetku postnatalnega razvoja (Ayres in sod., 1985; Hicks, 1975). Pri odraslih sesalcih urotelij gradijo trije celični skladi: bazalni, vmesni in površinski (Hicks, 1975; Romih in sod., 2005). Na bazi urotelija so nediferencirane, majhne celice kubične oblike ( $2r = 5\text{--}10\ \mu\text{m}$ ), ki se s hemidezmosomi pritrjujejo na bazalno lamino. Te celice imajo nespecifično znotrajcelično strukturo, vsebujejo proste ribosome, nekaj mitohondrijev in slabo razvit endoplazemski retikulum (ER). Golgijev aparat je sestavljen iz skladovnic kratkih cistern, ki se nahajajo tesno ob jedru (Hudoklin in sod., 2009). Nad njimi so vmesne celice, ki so večje ( $2r = 20\ \mu\text{m}$ ) in bolj diferencirane kot bazalne celice. S sosednjimi celicami so povezane z dezmosomi. Te celice

imajo značilnosti tako bazalnih kot površinskih celic, saj vsebujejo proste ribosome, mitohondrije, prehodni GA (Hudoklin in sod., 2009), precej nerazvit ER, mnogo citoplazemskih veziklov in avtofagne vakuole. Zato pravimo, da so te celice delno diferencirane (Hicks, 1965; Koss, 1969; Firth in Hicks, 1973). Tretji sklad urotelija gradijo velike ( $2r = 50\text{--}120\ \mu\text{m}$ ), ploščate, visoko diferencirane površinske celice, ki prekrivajo več spodaj ležečih vmesnih celic (Hicks, 1975; Kreft in sod., 2002). Svetlinska površina celic je pet- ali šestkotna. Celice se povezujejo z dezmosomi in adherentnimi stiki, na meji med apikalno in lateralno plazmalemo pa so povezane z dobro razvitimi tesnimi stiki (Koss, 1969; Hicks, 1975; Candia in sod., 1997). Mnoge celice so večjedrne (Firth in Hicks, 1972; Hicks, 1975; Kreft in sod., 2002; Southgate, 2002). Površinske celice vsebujejo veliko mitohondrijev, kompleksni GA (Hudoklin in sod., 2009), dobro razvit ER ter veliko fuziformnih veziklov (FV) in odebeljeno apikalno plazmalemo. Prisotnost FV in odebeljena apikalna plazmalema sta pokazatelja dokončne diferenciacije dežnikastih celic (Hicks, 1975).

V uroteliju se delijo bazalne celice, le izjemoma (ob poškodbah) pa se lahko delijo tudi vmesne celice (Baskin in sod., 1997). Erman in sod. (2001) so ugotovili, da se nedokončno diferencirane površinske celice v uroteliju mišjih mladičev vse do 14. dne po skotitvi lahko delijo, dokončno diferencirane površinske urotelijske celice pa sposobnost delitve izgubijo (Hicks, 1965). Na površini urotelija lahko celice preživijo več kot 200 dni, za prehod od bazalnega do površinskega sklada pa potrebujejo več kot 11 tednov (Hicks, 1975).



Shema 1: Zgradba urotelija (prirejeno po Lewisu, 2000: 868)

## 2.3 DIFERENCIACIJA UROTELIJA

Vsa epiteljska tkiva so si podobna v glavnih strukturnih lastnostih, med seboj pa se v veliki meri razlikujejo po poteku diferenciacije, ki mnogokrat vodi v funkcionalno specializacijo določenega epitelija (Wanjg in sod., 1996).

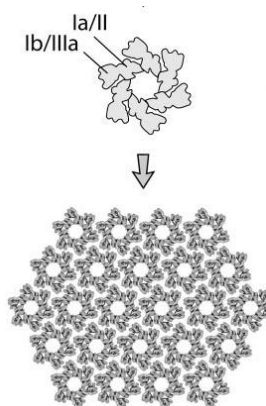
Proliferaciji in migraciji urotelijskih celic sledi proces diferenciacije. Med diferenciacijo nezrele celice pridobijo morfološke in funkcionalne lastnosti zrelih celic. V urotelijskih celicah se med procesom diferenciacije izražajo specifični geni in proteini, ki so značilni za urotelij. Med proteini so najbolj raziskani citoskeletni proteini in uroplakini (Wu in sod., 1990; Romih in sod., 2005).

### 2.3.1 Odebeljena apikalna plazmalema

Apikalna plazmalema površinskih urotelijskih celic je sestavljena iz odebeljenih in neodebeljenih področij. Odebeljeni predeli so iz uroplakinskih plakov, katerih premer je približno 0,5  $\mu\text{m}$ , debelina pa 12 nm (Hicks, 1965; Koss, 1969; Staehelin in sod., 1972; Kachar in sod., 1999). Med odebeljenimi področji plazmaleme so neodebeljena področja debeline 8 nm. Odebeljena področja obsegajo 70–90 % celotne lumenske površine, lumenski sloj plazmaleme je skoraj še enkrat debelejši kot citoplazemski sloj (Hicks, 1975).

Vsak urotelijski plak je zgrajen iz približno 1000 uroplakinskih podenot (Min in sod., 2003), ki so heksagonalno urejene v polkristalne strukture (Walz in sod., 1995). Uroplakinske podenote sestavljajo štirje integralni membranski proteini, uroplakini: UPIa (27 kDa), UPIb (28 kDa), UPII (15 kDa) in UPIIIa (47 kDa). Ti uroplakini se povezujejo v dva tipa uroplakinskih dimerov: UPIa/UPII in UPIb/UPIIIa. Uroplakini imajo večjo zunajcelično kot znotrajcelično domeno, zato takšne odebeljene predele apikalne plazmaleme imenujemo uroplakinski plaki, v angleški literaturi pa tudi asimetrično odebeljene membrane (AUM) (Wu in sod., 1990; Lin in sod., 1994; Yu in sod., 1994). Min in sodelavci (2003) so naredili 3D-rekonstrukcijo uroplakinskih heksagonalnih podenot. Ugotovili so, da vsako uroplakinsko podenoto (premera 16 nm) sestavlja zunanji obroč iz šestih uroplakinskih dimerov (UPIb in

UPIIIa) in notranji obroč iz šestih uroplakinskih dimerov (UPIa in UPII) (Min in sod., 2003). Ko so s pomočjo genskega inženiringa zavrli izražanje uroplakinskih genov, se uroplakinske podenote s premerom 16 nm niso tvorile in apikalna plazmalema je postala bolj prepustna za vodo in sečnino, medtem ko se transepitelijska upornost ni spremenila (Kong in sod., 2004). Iz te raziskave sklepamo, da uroplakini vplivajo predvsem na permeabilnost membrane, ne pa tudi na tesne stike.



Schema 2: Uroplakinske podenote v urotelijskem plaku (prirejeno po Huju in sod., 2005: 3948)

Sinteza odebeljene apikalne plazmaleme se prične v ER in konča v GA. Urotelijski plak se oblikuje s postopnim koncentriranjem uroplakinskih podenot v post-Golgijevih predelih, ki obsegajo uroplakinske transportne vezikle, diskoidalne in fuziformne vezikle (FV). Iz trans-Golgijevega mrežja izhajajo vezikli s 16-nanometrskimi uroplakinskimi podenotami, ki se najprej združujejo in oblikujejo manjše diskoidalne vezikle. Uroplakinske podenote se koncentrirajo v urotelijski plak v diskoidalnih veziklih. Ko se urotelijski plak dokončno oblikuje, se vezikel splošči in nastane zrel FV. Fuziformni vezikli so zgrajeni iz dveh urotelijskih plakov, ki sta med seboj povezana z neodebeljeno membrano. Ob polnjenju sečnega mehurja z urinom se FV z neodebeljeno membrano vgradijo v neodebeljene predele apikalne plazmaleme (Lewis in Moura, 1982; Minsky in Chlapowski, 1978; Truschel in sod., 2002). Po mnenju Hudoklina (2009) FV v apikalni citoplazmi površinskih urotelijskih celic oblikujejo skladovalnice, ki so zaloga apikalne plazmaleme in so verjetno ključne za hitri transport urotelijskih plakov na apikalno plazmalemo površinskih urotelijskih celic.

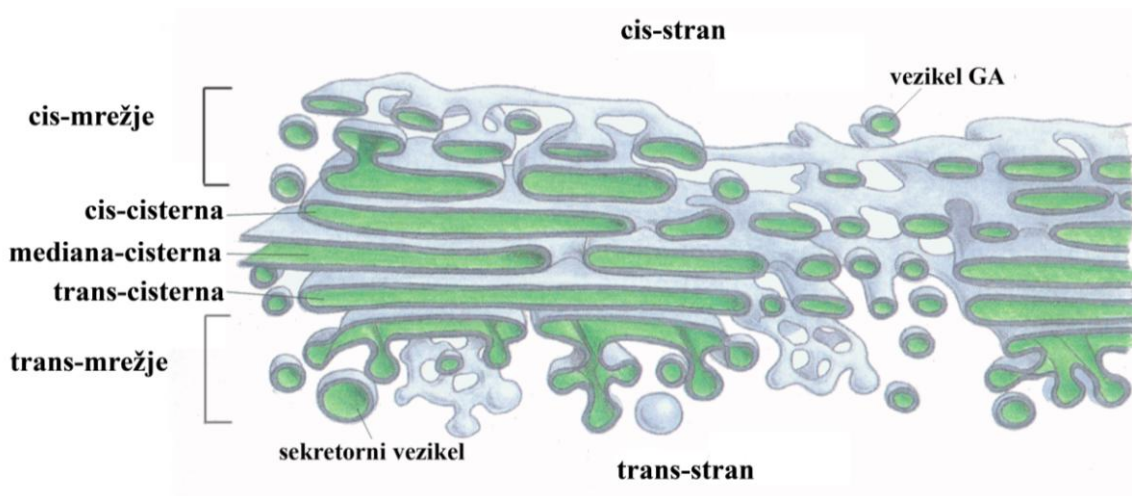
Urotelijski plaki, ki gradijo odebeljene predele apikalne plazmaleme, delujejo kot prepustna pregrada, stabilizirajo apikalno površino mehurja in predstavljajo molekularni mehanizem, ki omogoča spreminjanje površine plazmaleme (Hicks, 1965; Walz in sod., 1995). Neodebeljeni medplakni predeli apikalne plazmaleme pa delujejo kot pregibne točke in omogočajo, da se plazmalema med krčenjem mehurja zgiba.

Znanstveniki so različne faze diferenciacije urotelija opazovali tudi med regeneracijo poškodovanega urotelija. Med diferenciacijo se pojavljajo mikrovili in grebeni na apikalni plazmalemi površinskih urotelijskih celic (Fukushima in sod., 1981; Romih in sod., 2001). V slabo diferenciranih površinskih celicah je apikalna plazmalema oblikovana v mikrovile, ki se v procesu diferenciacije združujejo v t.i. nesklenjene grebene (srednje diferencirane površinske urotelijske celice). Ti postopoma prehajajo v sklenjene grebene (dobro diferencirane urotelijske celice). V dokončno diferenciranih površinskih celicah je apikalna plazmalema oblikovana v školjkaste mikrogrebene (Romih in sod., 1998, 2005; Kreft in sod., 2005).

Sinteza ali izražanje uroplakinov še ne pomeni visoke oziroma dokončne diferenciacije urotelijskih celic. Rezultati raziskav (Truschel in sod., 1999; Kreft in sod., 2002, 2005; Romih in sod., 2002, 2005) kažejo, da se uroplakini izražajo že pri slabo diferenciranih površinskih celicah, pa tudi pri posameznih vmesnih celicah. Izražanje uroplakinov tako lahko služi kot biokemični pokazatelj diferenciranosti celic. Romih in sod. (2002) poudarjajo, da je izbira primerne metode ključna za pravilno ocenitev stopnje diferenciacije urotelija. Vsekakor pa je odebeljena apikalna plazmalema najprepoznavnejši morfološki znak, ki ločuje normalni urotelij od spremenjenega urotelija in tudi drugih epitelijev pri sesalcih.

### 2.3.2 Golgijev aparat

Golgijev aparat (GA) je eden izmed prvih opisanih organelov v celici. Leta 1898 ga je prvi opisal Camillo Golgi, za kar je leta 1906 prejel Nobelovo nagrado (Farquhar in Palade, 1998). Glavna naloga GA je glikolizacija proteinov in lipidov ter sortiranje in usmerjanje vezikularnega transporta v celici (Alberts in sod., 2008). Igra torej glavno vlogo pri endocitotskih in mnogih eksocitotskih poteh. GA sestavljajo cisterne in veziko-tubularno mrežje, ki se iz cis- proti trans-strani GA razporeja v naslednjem vrstnem redu: cis-mrežje, cis-cisterne, mediane-cisterne, trans-cisterne ter trans-mrežje. V smeri od cis- proti trans-delu GA poteka tudi transport tovora skozi GA, ki pa še danes ni popolnoma znan (Alberts in sod., 2008).



Shema 3: Zgradba Golgijevega aparata (shema prirejena po Albertsu in sod., 2008: 732)

Razporeditev GA je odvisna od mikrotubulov, ki se pritrjujejo na cis-mrežje, cis-, mediane- in trans-cisterne ter trans-mrežje GA. Najpogosteje se GA nahaja v bližini centrosoma in jedra celice. Če celicam dodamo nokodazol, ki prepreči polimerizacijo mikrotubulov, se GA razprši po citoplazmi (Alberts in sod., 2008).

Funkcijo in lego GA je v vseh treh plasteh epitelija podganjega mehurja opazoval tudi Koss (1969). Ugotovil je, da se v bazalnih celicah GA nahaja lateralno ob jedru, v vmesnih celicah na lumenski strani nad jedrom celice, v celicah na površini pa se nahaja v bazalnem delu

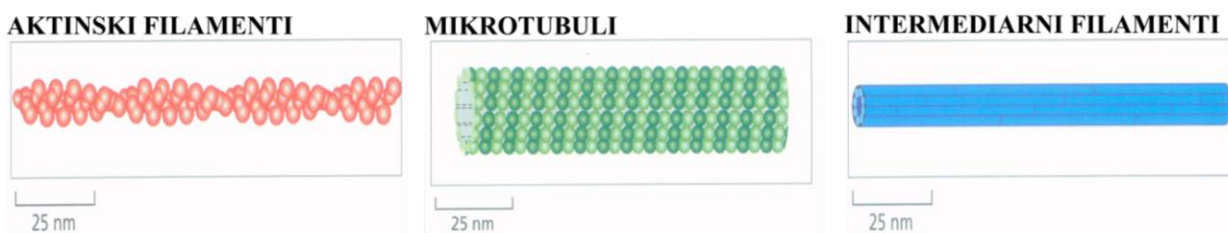
celice, stran od lumna mehurja. Pred kratkim narejena raziskava Hudoklina in sod. (2009) na mišjem uroteliju je prav tako temeljila na opazovanju razporejanja in organizacije GA, saj naj bi ta igral ključno vlogo pri nastajanju odebeljene apikalne plazmaleme. Ugotovili so, da je v bazalnih celicah GA zgrajen iz skladovnic kratkih cistern, razporejenih bazo-lateralno ob celičnem jedru. Takšen GA so poimenovali osnovni GA. V vmesnih celicah je GA zgrajen iz nekaj kratkih in daljših cistern, ki so razporejene bazo-lateralno ob jedru, zato so ga poimenovali prehodni GA. V popolnoma diferenciranih površinskih celicah pa je GA zgrajen iz več skladovnic dolgih cistern, ki so razporejene po celotni subintermediarni citoplazmi. V tem primeru govorimo o kompleksnem GA. Ob tretiranju celic s ciklofosfamidom so imele vse površinske celice preprosto obliko GA. Prav tako so bile brez uroplakinov, FV in odebeljene apikalne plazmaleme, apikalna plazmalema je bila oblikovana v mikrovile. V pozni fazi regeneracije, ko so celice pridobile vse zgoraj omenjene diferenciacijske označevalce, se je znova pojavil kompleksni GA. Ta raziskava kaže, da je organizacija in razporeditev GA v urotelijskih celicah odvisna od stopnje diferenciacije urotelijskih celic.

Prav tako so znane spremembe v organiziranosti GA med embrionalnim razvojem. V 15. dnevu embrionalnega razvoja se GA nahaja v bazolateralnem delu površinskih urotelijskih celic in je slabo razvit. Število cistern GA se najbolj poveča v 17. dnevu embrionalnega razvoja, kar sovpada s povečano sintezo glikozaminoglikanov. S spremembo GA je torej povezana intenzivnost procesov diferenciacije, kot sta prestrukturiranje apikalne plazmaleme in sinteza površinskih glikozaminoglikanov (Pšeničnik in Jezernik, 2000).

GA je torej visoko dinamičen celični organel z nenehno membransko reorganizacijo, tudi zaradi transporta, ki poteka od ER preko GA do plazmaleme. Kljub nenehni reorganizaciji membran GA pa po nedavnih raziskavah Derganca in sodelavcev (2006) število cistern znotraj ene skladovnice GA ostaja stabilno. Kateri dejavniki določajo število cistern v GA in kateri vplivajo na reorganizacijo GA med diferenciacijo celic, pa je še vedno neznan. V literaturi tudi ni podatkov o organizaciji in razporejanju GA med diferenciacijo urotelijskih celic *in vitro*.

### 2.3.3 Citoskelet

Oblika in premikanje celic ter znotrajcelični transport so odvisni od citoskeleta. Citoskelet sestavljajo trije tipi citoskeletnih elementov, ki imajo različne funkcije. Aktinski filamenti in z njimi povezani proteini (miozin, tropomiozin,  $\alpha$ -aktinin, vinkulin, MAP-2 in drugi) sestavljajo kontraktilni sistem, ki je odgovoren za gibanje celic in organelov, citokinezo in spreminjanje celične oblike. Mikrotubuli stabilizirajo celično obliko in omogočajo delitev jeder ter gibanje organelov, intermediarni filamenti pa zagotavljajo mehansko stabilnost celic (Alberts in sod., 2008).



Shema 4: Citoskeletni elementi (shema prirejena po Albertsu, 2008: 975)

Končna faza diferenciacije urotelija vključuje specifično znotrajcelično porazdelitev in organizacijo aktinskih in intermediarnih filamentov (Romih in sod., 1999, 2002).

#### 2.3.3.1 Aktinski filamenti

Aktinski filamenti so dinamične polarne strukture, katerih premer je od 5 nm do 9 nm. Filamente gradita dve prepletajoči se verigi aktinskih monomerov, ki se dodajajo ali odstranjujejo na obeh filamentnih koncih glede na potrebe celice. Konec, kjer sta oba procesa hitrejša, se imenuje pozitivni konec (ang. *plus end*), nasprotni del aktinskega filamenta pa imenujemo negativni konec (ang. *minus end*). Aktinski filamenti se razprostirajo po celotni celici, vendar so večinoma najbolj skoncentrirani tik pod plazmalemo. Sodelujejo pri kontrakciji mišičnih celic, ameboidnem gibanju, citokenezi, vzdrževanju oblike celic ter znotrajceličnem transportu (Alberts in sod., 2008).



Aktinski filamenti so prisotni tudi v urotelijskih celicah.  $\beta$ -aktin je prisoten tako v diferenciranih kot nediferenciranih urotelijskih celicah. Raziskave na mišjih mehurjih so pokazale spreminjanje razporeditve aktinskih filamentov med diferenciacijo površinskih urotelijskih celic. Ugotovili so, da se z oblikovanjem odebeljene apikalne plazmaleme aktinski filament v subapikalnem delu celice razgradijo, v bazolateralnem delu celice pa ostanejo prisotni. Torej lahko kot diferenciacijski označevalec uporabimo tudi razporeditev aktinskih filamentov (Romih in sod., 2002; Kreft in sod., 2005). Podobne rezultate so z imunofluorescenco dobili Truschel in sodelavci (1999), le da so poleg površinskih opazovali tudi bazalne celice. V celicah je bil aktin slabo izražen ob apikalnih robovih in dobro izražen aktin v bazalnem delu celic. Razporejanje aktinskih filamentov v primarni kulturi urotelijskih celic so raziskovali Kreftova in sodelavci (2005) in na urotelijskih kulturah *in vitro* potrdili prerazporejanje aktinskih filamentov med diferenciacijo urotelijskih celic. V bazalnih in vmesnih urotelijskih celicah je bil aktin razporejen na apikalni in bazolateralni plazmalemi, v površinskih urotelijskih celicah pa so opazili sklenjene linije aktina na lateralni plazmalemi, kar je sicer značilno za normalne urotelijske celice *in vivo*. Kako se aktin razporeja v sekundarni kulturi prašičjih urotelijskih celic, ni znano.

#### 2.3.3.2 Mikrotubuli

Mikrotubuli so dinamične strukture, ki poleg aktinskih in intermediarnih filamentov gradijo citoskelet evkariontskih celic. Zanje je značilno, da usmerjajo znotrajcelični transport in določajo položaj znotrajceličnih membranskih organelov. Mikrotubuli tvorijo tudi delitveno vreteno, ki zagotavlja enakomerno porazdelitev celične dednine ob celični delitvi, in so sestavni del bičkov in migetalk. Delujejo kot vodila, ob katerih motorni proteini pomikajo snovi in organele v celici. Ob tem se porablja energija, ki nastane ob hidrolizi ATP. Glavna motorna proteina sta:

- dinein, ki se premika proti negativnemu (-) koncu (ang. *minus end*) mikrotubulov, in
- kinezin, ki se premika proti pozitivnemu (+) koncu (ang. *plus end*) mikrotubulov.

Mikrotubuli so zgrajeni iz  $\alpha$ - in  $\beta$ -tubulinskih monomerov, ki se povezujejo z nekovalentnimi vezmi v  $\alpha/\beta$ -heterodimer. Heterodimeri se nadalje povezujejo v protofilamente. Steno mikrotubulov tvori trinajst linearnih protofilamentov, ki se v vzporednih vrstah povezujejo v valju podobno strukturo. V protofilementih si  $\alpha$ - in  $\beta$ -tubulinski monomeri izmenično sledijo, zato so mikrotubuli polarizirani. Konec mikrotubula, ki je zaključen s podenotami  $\alpha$ , je negativni konec, tisti, ki je zaključen z podenotami  $\beta$ , pa pozitivni konec. V celici stabilni negativni konci mikrotubulov izhajajo iz mikrotubulskega organizacijskega centra (MTOC), dinamični pozitivni konci pa so usmerjeni proti periferiji celice. Takšna razporeditev mikrotubulov omogoča normalno delovanje celice ter razvrščanje celičnih organelov na ustrezna mesta. Premer mikrotubulov je 25 nm in so bolj nepremični ter neupogibljivi kot aktinski filament (Alberts in sod., 2008). Mikrotubuli se podaljšujejo (in krajšajo) z dodajanjem (in odvzemanjem) tubulinskih dimerov na koncih tubula. Pozitivni konec lahko hitro izmenjuje faze rasti in skrajševanja, kar imenujemo dinamično ravnotežje (Alberts in sod., 2008).

Mikrotubuli sodelujejo pri organizaciji GA in njegovi znotrajcelični lokalizaciji. Motnja pri mikrotubulih ali blokiranje funkcije motoričnega proteina dineina, ki sodeluje pri transportu veziklov in razporejanju ter organizaciji GA, povzroči dramatično prerazporeditev GA. Ta se iz osnovne oblike v bližini centrosoma spremeni v razpršeno obliko po celični citoplazmi (Yang in Storrie, 1997; Caviston in Holzbaur, 2006; Alberts in sod., 2008).

Kljub pomembnosti mikrotubulov v celicah je zelo malo podatkov o njihovem razporejanju in organizaciji med diferenciacijo celic. Spremembe v razporeditvi mikrotubulov so odkrili med diferenciacijo kožnih celic (keratinocitov). V bazalnih nediferenciranih keratinocitih so mikrotubuli tvorili mrežo po celotni citoplazmi, med diferenciacijo pa so se pomaknili proti celičnim stikom (Lechler in Fuchs, 2007). V literaturi nismo našli podatkov o prerazporejanju mikrotubulov med diferenciacijo urotelijskih celic *in vitro*.

### 2.3.3.3 Intermediarni filamenti

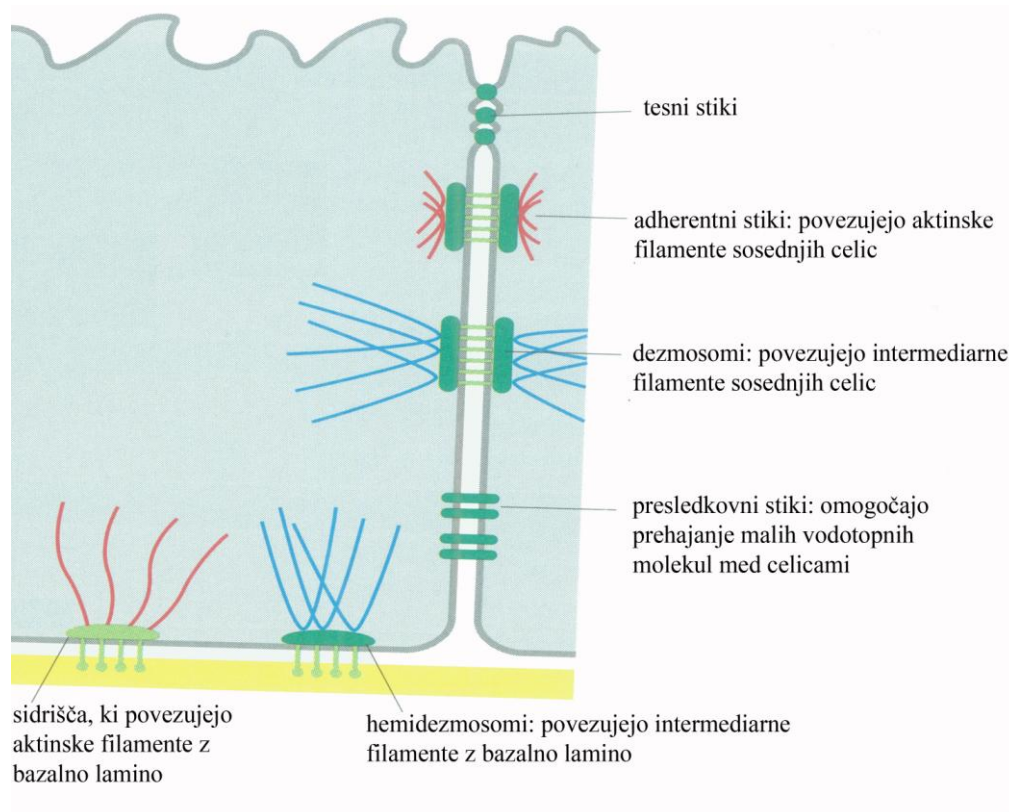
V večini živalskih celic se dobro razvito mrežje intermediarnih filamentov prepleta po vsej citoplazmi ter obdaja jedro celic. Intermediarni filamenti (debeline med 8 nm in 12 nm) se povezujejo tudi z drugimi elementi citoskeleta in se pritrjujejo na plazmalemo ter jedrno ovojnico. Vzdržujejo trdnost in obliko celic, so opora celicam ter sodelujejo pri notranji organizaciji celic. Poznamo več skupin intermediarnih filamentov: citokeratinske filamente, vimentin in vimentinu podobne filamente, dezminske filamente, gliafilamente ter nevrofilamente. Za epitelije so značilni citokeratinski filamenti, ki jih je v človeških epitelijskih celicah več kot 20 vrst (Alberts in sod., 2008).

Normalne urotelijske celice izražajo značilen vzorec citokeratinov glede na njihovo lego v večskladnem uroteliju in stopnjo diferenciacije (Moll in sod., 1988; Schaafsma in sod., 1989; Southgate in sod., 1999). V bazalnih celicah se izražajo citokeratini CK 7, CK 13, CK 19, CK 5 in CK 17. Slednja sta prisotna le v bazalnih celicah, CK 13 pa v bazalnih in vmesnih celicah. CK 7, CK 8, CK 18 in CK 19 najdemo v vseh celičnih skladih, pri čemer sta CK 8 in CK 18 močnejše izražena v površinskem celičnem skladu (Tseng in sod., 1982; Scriven in sod., 1997; Southgate in sod., 2002). CK 20 je prisoten v površinskih urotelijskih celicah in je označevalec visoke stopnje diferenciacije (Schaafsma in sod., 1989; Moll in sod., 1990; Guelstein in sod., 1993; Harnden in sod., 1995; Romih in sod., 1998; Romih in sod., 2005).

Tako kot prisotnost uroplakinov še ne pomeni visoke stopnje diferenciranosti urotelijskih celic, tudi prisotnost posameznih vrst citokeratinov med diferenciacijo urotelijskih celic ni nujno dokaz za visoko diferenciranost. Zelo pomembna je tudi supramolekularna organizacija citokeratinov (Kreft in sod., 2002). Med opazovanjem diferenciacije površinskih urotelijskih celic so Veranič in sod. (2004) odkrili, da se CK 7 in uroplakini nahajajo v subapikalni citoplazmi površinskih celic vse od začetnih stopenj diferenciacije. V zgodnjih fazah diferenciacije površinskih celic je CK 7 filamentozno organiziran. Med nadaljevanjem diferenciacije se CK 7 reorganizira v neprekinjeno mrežo, uroplakini pa v urotelijske plake. V zadnji fazi diferenciacije se izrazi CK 20, ki se nato vključi v že obstoječo citokeratinsko subapikalno mrežo.

### 2.3.4 Medcelične povezave

Medcelične povezave omogočajo strukturno integriteto urotelija (adherentni stiki, dezmosomi, hemidezmosomi), regulirajo medcelično prepustnost (presledkovni stiki, tesni stiki) in zagotavljajo polariziranost celic ter plazmaleme. So torej osnova za vzpostavitev in ohranjanje krvno-urinske pregrade urotelija (Hicks, 1975).



Shema 5: Shematični prikaz medceličnih povezav v epiteljskih celicah (Prirejeno po Albertsu in sod., 2008: 1134)

#### 2.3.4.1 Tesni stiki

Tesni stiki (*zonula occludens*) so glavna fizična pregrada, ki vpliva na paracelično prepustnost (Anderson, 2001). Z elektronskim mikroskopom so videti kot zlitje zunanega sloja plazmaleme sosednjih celic, ki zatesni prostor med celicami (Alberts in sod., 2008). Tesni stiki so v

epitelijih ploskovno nameščeni. Na kompleksnost organizacije tesnih stikov v veliki meri vpliva mikrookolje. Zgrajeni so iz štirih ali več anastomozirajočih vrvic. Te tvorijo zaključeno, krožno mrežo na apikalnem koncu celice, ki se prek zunajceličnih domen proteinov tesno povezuje s podobno mrežo v sosednji celici. Za integriteto tesnih stikov je nujno potreben kalcij (Alberts in sod., 2008), saj vpliva na povezovanje ZO-1 in aktina (Ye in sod., 1999) ter regulira proteinski kompleks (Rich1-Amot), ki vzdržuje funkcionalnost tesnih stikov (Wells in sod., 2006). Odkrili so tudi, da povečana znotrajcelična koncentracija  $Ca^{2+}$  poveča izražanje klavdina 4 (Mima in sod., 2005).

V uroteliju tesni stiki pomembno prispevajo h krvno-urinski pregradi. Tesni stiki so tudi meja med apikalno in bazolateralno plazmalemo, kar ustvarja in vzdržuje polarnost površinskih urotelijskih celic (Rodriguez-Boulan in Nelson, 1989).

Pomemben transmembranski protein tesnih stikov je okludin, z molekularno maso 65 kDa, ima štiri transmembranske regije in na zunajcelični strani tvori dve zanki. Ti zanki po vsej verjetnosti sodelujeta pri medcelični povezavi in omogočata nastanek polprepustne pregrade. Amino-konec okludina se v celici povezuje s proteinoma ZO-1 in ZO-2. Za ZO-1 obstajajo domneve, da bi lahko imel vlogo pri usmerjanju okludina na stična mesta. (Mitic in Anderson, 1998). Tesne stike so v apiko-lateralni plazmalemi dokazali tudi v uroteliju *in vivo* (Claude in Goodenough, 1973; Hicks, 1975; Acharya in sod., 2004) ter *in vitro* (Southgate in sod., 1994; Truschel in sod., 1999; Kreft in sod., 2006).

#### 2.3.4.2 Adherentni stiki

V adherentnih stikih (*zonulae adherens*) se posredno povezujejo citoskeletni aktinski filamenti sosednjih celic. Pri povezavi sodeluje več skupin molekul, med katerimi je najpomembnejša in najbolj raziskana celična adhezivna molekula E-kadherin, ki se v prisotnosti  $Ca^{2+}$  poveže na zunajceličnem amino-koncu z molekulo E-kadherina sosednje celice. E-kadherin je transmembranski protein, ki se na citosolni strani povezuje z  $\beta$ -kateninom ali s plakoglobinom ( $\gamma$ -katenin) (Lewis in sod., 1997).  $\beta$ -katenin ali plakoglobin se vežeta na kadherin na enem in

na  $\alpha$ -katenin na drugem mestu.  $\alpha$ -katenin se pritrjuje na aktinske filamente citoskeleta, pri tem pa sodelujeta tudi vinkulin in  $\alpha$ -aktinin (Aberle in sod., 1996; Pasdar in sod., 1995).

Katenini igrajo osrednjo vlogo pri regulaciji delovanja kadherinov in pri povezovanju le-teh s citoskeletom. Nastajanje kadherinskih in kateninskih kompleksov je zelo dinamičen proces. E-kadherin sodeluje tudi pri nastajanju dezmosomov. Lewis in sod. (1997) so pokazali, da šele vezava E-kadherina s plakoglobinom, ki je edini do sedaj znani protein, prisoten tako v adherentnih stikih kot v dezmosomih, omogoča združevanje dezmosomskih podenot v funkcionalne dezmosome (Lewis in sod., 1997). E-kadherini so pomembni tudi za vzdrževanje apiko-bazolateralne polarnosti celic in posredno z mehansko povezavo dveh sosednjih celic vplivajo na nastanek funkcionalnih tesnih stikov, ki preprečujejo difuzijo membranskih proteinov med apikalno in bazolateralno plazmalemo (Eaton in Simons, 1995).

Prisotnost E-kadherina so dokazali v lateralni plazmalemi tudi pri humanih (Southgate in sod., 1994) in mišjih (Kreft in sod., 2006) urotelijskih celicah *in vitro*. Njegovo izražanje se je povečalo ob dodatku  $\text{Ca}^{2+}$  v hranilni medij, kar potrjuje pomembno vlogo  $\text{Ca}^{2+}$  pri ustvarjanju adherentnih stikov.

#### 2.3.4.3 Dezmosomi

Dezmosomi (*maculae adhaerens*) so močne, točkovne medcelične povezave, značilne za tkiva, ki so izpostavljena mehanskim silam. Preko njih se povezujejo intermediarni filamenti sosednjih celic. Osrednji povezovalni molekuli v dezmosomih sta dezmostein in dezmostolin. Sodita v družino kadherinov, odvisnih od  $\text{Ca}^{2+}$ , vendar sta za razliko od ostalih kadherinov med seboj povezana heterofilno (Allen in sod., 1996, Chitaev in Troyanovsky, 1997). Ti molekuli se pritrjujeta na znotrajcelične pritrjevalne proteine ali citoplazemski plak tik ob plazmalemi, ki ga sestavljajo eden ali več kadherin-vezavnih proteinov in dezmostoplakinov (Gallicano in sod., 1998). Na te povezovalne proteine citoplazemskega plaka se pritrjujejo tudi citokeratini.

Dezmoplakin je edini protein, ki ga najdemo na citoplazemski strani v vseh dezmosomih in je podoben plakoglobinu. Nima transmembranske regije, temveč se z amino-koncem povezuje z drugimi komponentami dezmosomov, prosta regija na drugem koncu pa se pritruje na intermediarne filamente. V celicah ima dezmoplakin različne vloge: sodeluje pri povezovanju dezmosomov in citoskeleta, potreben je pri sestavljanju in/ali stabilizaciji dezmosomov, v zgodnji embriogenezi pa sodeluje pri povezovanju celic (Gallicano in sod., 1998).

## 2.4 TRANSEPITELIJSKA UPORNOST

### 2.4.1 Transepitelijska upornost urotelijskih celic *in vivo*

Primarna funkcija urotelija je zagotavljanje krvno-urinske pregrade. Učinkovito pregrado med krvjo in urinom zagotavljajo tesni stiki ter specializirana apikalna plazmalema (lipidna in proteinska sestava) površinskih urotelijskih celic (Hicks, 1975). Še vedno pa ostaja vprašanje, ali tudi glikozaminski del površinskih urotelijskih celic pripomore h krvno-urinski barieri ali pa imajo glavno vlogo tesni stiki in specializirana apikalna površina (Lewis, 2000).

Skozi urotelij se snovi v glavnem prenašajo z aktivnim transportom. Zelo zanesljiva metoda za ugotavljanje prepustnosti epitelija je merjenje transepitelijske upornosti (TER). TER je obratnosorazmerna s prepustnostjo epitelija za ione. Vrednosti transepitelijske upornosti urotelija daleč presegajo vrednosti vseh ostalih vrst epiteljskih tkiv (Lewis, 2000). Do sedaj so izmerili transepitelijsko upornost urotelija *in vivo* od 10 000  $\Omega\text{cm}^2$  do 75 000  $\Omega\text{cm}^2$  (Lewis in Diamond, 1976, 1979; Lewis, 2000).

Da bi ugotovili vlogo uroplakinov pri zagotavljanju transepitelijske upornosti, so Hu in sodelavci (2002) v raziskavi merili TER in permeabilnost (plinov, vode, malih neelektrolitov) sečnega mehurja pri normalnih ter mutiranih miših brez UPIIIa. Izkazalo se je, da se TER statistično ni razlikovala. Pri normalnih miših je bila TER  $2024 \pm 122 \Omega\text{cm}^2$ , pri mutiranih pa  $2322 \pm 114 \Omega\text{cm}^2$ . Razlika med mišimi se je pokazala pri permeabilnosti za vodo, saj je bila pri normalnih miših  $0,91 \pm 0,06 \text{ cm/s}$ , pri miših brez UPIII pa kar  $1,83 \pm 0,14 \text{ cm/s}$ . Uroplakini torej bolj kot na TER vplivajo na permeabilnost urotelija.

Ob poškodbah površinskih celic mehurja pride do porušanja krvno-urinske pregrade in uhajanja urina v spodnje plasti mehurja, kar povzroči nastanek cistitisa (vnetja sečnega mehurja). Da bi ugotovili, kako hitro pride do obnove urotelija, so Lavelle in sod. (2002) opazovali podganje mehurje pred in po vbrizganju protamin sulfata, ki poškoduje urotelij. Pred poškodbo urotelija je bila TER približno  $2000 \Omega\text{cm}^2$ . Eno uro po vbrizganju protamin sulfata so zaznali močan padec v TER ( $< 500 \Omega\text{cm}^2$ ) in povečano permeabilnost za vodo in urin zaradi poškodbe površinskih celic. Dvainsedemdeset ur po poškodbi se je funkcija urotelija obnovila, saj so se spodaj ležeče vmesne celice pričele diferencirati. Povečala se je sinteza uroplakinov in nastali so tesni stiki. Peti dan po poškodbi urotelija je bila površinska plast popolnoma obnovljena. Upornost je dosegla vrednost  $1500 \Omega\text{cm}^2$ , vendar so celice ostale manjše od normalnih dežnikastih celic do desetega dne, ko je TER celo preseгла začetno upornost.

#### **2.4.2 Transepitelijska upornost urotelijskih celic *in vitro***

Na urotelijskih celicah *in vitro* je bila TER izmerjena le nekajkrat. Na trajni celični liniji humanih urotelijskih celic so bile vrednosti TER od 500 do  $1000 \Omega\text{cm}^2$  (Perrone in sod., 1996), Truschel in sod. (1999) pa so na zajčji primarni urotelijski kulturi izmerili transepitelijsko upornost tudi nad  $8000 \Omega\text{cm}^2$ . Ugotovili so, da celice, ki rastejo v keratinocitnem hranilnem mediju z nizko koncentracijo  $\text{Ca}^{2+}$  ( $< 0.1 \text{ mM}$ ), ne dosežejo visoke TER (Cilento in sod., 1994). Zato so mediju dodali  $1 \text{ mM CaCl}_2$ , ki je povzročil do petkratno povečanje TER. Med poskusom so ugotovili, da je zelo pomembno, kdaj v gojitvenem času celicam dodamo  $\text{Ca}^{2+}$ . Če ga dodamo prehitro (preden TER doseže  $200 \Omega\text{cm}^2$ ) ali prepozno (po šestem dnevu), celični kulturi onemogočimo doseganje visokih upornosti. Pri opazovanju kultur z ali brez dodanega  $\text{Ca}^{2+}$  v hranilnem mediju s svetlobnim mikroskopom do desetega dne gojenja niso opazili morfoloških razlik. Po približno desetih do dvanajstih dneh po nasaditvi so nekateri citokeratini v celicah, ki so rasle v hranilnem mediju z ali brez  $\text{Ca}^{2+}$ , izginili. Po dvanajstih dneh so celice začele prehajati v fazo staranja in TER se je hitro zmanjšala.



Pozitivni učinek v hranilni medij dodanega  $\text{Ca}^{2+}$  in seruma (FBS) na TER so dokazali tudi Cross in sod. (2005), ki so na primarni kulturi humanega urotelija izmerili TER nad  $3000 \Omega\text{cm}^2$ . Normalne humane urotelijske celice s kondicioniranim keratinocitnim hranilnim medijem brez seruma (KSFMc) ali  $\text{Ca}^{2+}$  so imele zelo nizko TER ( $18,5 \pm 2,4 \Omega\text{cm}^2$ ). Ko so jih prestavili v KSFMc z  $2 \text{ mM } \text{Ca}^{2+}$ , je TER poskočila na  $49,4 \pm 8,9 \Omega\text{cm}^2$ , če pa so bile celice v mediju KSFMc s serumom (FBS) ali s serumom in  $\text{Ca}^{2+}$ , je njihova TER dosegla  $2509 \pm 172,2 \Omega\text{cm}^2$  oz.  $3023 \pm 564,4 \Omega\text{cm}^2$ .

Transepitelijska upornost je bila izmerjena tudi pri primarni kulturi prašičjih urotelijskih celic, ki so jih gojili v hranilnih medijih s serumom in brez seruma oz.  $\text{Ca}^{2+}$ . Urotelijske celice, ki so jih gojili v hranilnem mediju brez seruma in z malo  $\text{Ca}^{2+}$  ( $0,09 \text{ mmol/l}$ ), so tvorile enoskladni urotelij. Celice, ki so rasle v mediju s  $5 \%$  seruma ter  $\text{Ca}^{2+}$  ( $1,5 \text{ mmol/l}$ ,  $2 \text{ mmol/l}$ ,  $2,5 \text{ mmol/l}$ ), pa so tvorile več skladov: bazalni, vmesni in površinski celični sklad. Površinske celice so bile pozitivne za UPIIIa, CK20 in ZO-1. Celice v različnih hranilnih medijih so se razlikovale v stopnji diferenciacije, prav tako pa so se uroteliji v različnih hranilnih medijih razlikovali v transepitelijski upornosti. Izmerjena TER pri celicah s serumom ( $6720 \pm 1312 \Omega\text{cm}^2$ ) je bila statistično različna od TER, izmerjeni pri celicah, ki so rasle brez seruma ( $102 \pm 34 \Omega\text{cm}^2$ ) (Turner s sod., 2008).

Hranilni medij je torej zelo pomemben dejavnik pri celičnih kulturah, saj vpliva tako na zgradbo kot funkcionalnost celic. Z uporabo različnih hranilnih medijev so raziskovalci ugotovili, da dodatek seruma v hranilni medij omogoča doseganje višjih TER, dodatek  $\text{Ca}^{2+}$  pa omogoča nastanek večskladnega urotelija z visoko diferenciranimi celicami. V literaturi ni podatkov o vplivu v hranilni medij dodanih  $\text{Ca}^{2+}$  in seruma na TER skozi daljši gojitveni čas.

#### **2.4.3 Transepitelijska upornost celic MDCK in T24**

Trajne celične linije MDCK se uporabljajo kot osnovni model za raziskovanje ledvičnih epitelijskih celic, saj ob konfluentnosti tvorijo polariziran epitelij, prav tako pa so na njih že merili TER. Celice MDCK, ki so jih gojili na poroznih membranah, so tvorile tesne stike (Furuse in sod., 1998) in adherentne stike (Cilento in sod., 1994). Pri merjenju TER so bile

vrednosti meritev od  $300 \Omega\text{cm}^2$  do  $4000 \Omega\text{cm}^2$ . Takšen razpon so pripisali genetski heterogenosti celic MDCK. Da bi ugotovili spreminjanje upornosti glede na pasažo, so TER merili pri nizkih in visokih pasažah. TER se je z višanjem števila pasaže višala pri dveh od šestih celičnih linij in manjšala v eni celični liniji. Razlike v izmerjenih upornostih pripisujejo predvsem razlikam v uporabljenih celičnih populacijah, številu pasaž in preteklem času od zadnje pasaže (Arthur, 2002).

Iz do sedaj opravljenih raziskav sklepamo, da imajo celice MDCK različne TER, vzrok za to pa so genetske razlike. Vsekakor do sedaj še niso izmerili višje TER, kot jo ima urotelij sečnega mehurja sesalcev.

Celice T24 so rakaste celice človeškega sečnega mehurja. V celični kulturi tvorijo monosloj z zelo šibkimi medceličnimi povezavami (Mialhe in sod., 2000), kar poveča permeabilnost celic (Hainau, 1979). Podatkov o TER celic T24 v literaturi ni.

## 2.5 KULTURE UROTELIJSKIH CELIC

Celične kulture so populacije celic, ki živijo in se razmnožujejo *in vitro* (izven mnogoceličnega organizma). Za normalno nadaljnje življenje celic izven organizma moramo zagotoviti čim bolj podobne razmere, kot so jih imele celice v telesu. Zagotoviti moramo primeren hranilni medij s hranilnimi snovmi, ki jih urotelijske celice potrebujejo. V hranilnem mediju so zelo pomembne pravilne koncentracije aminokislin, glukoze, vitaminov, soli in rastnih dejavnikov. Celice, ki živijo izven telesa, nimajo zaščite pred patogenimi organizmi, zato delamo v sterilnih razmerah in hranilnim medijem dodajamo antibiotike ter fungicide. Za preprečitev okužbe delamo v sterilnem okolju (laminarij) in v ustrezni atmosferi (s 5 %  $\text{CO}_2$ ). Hranilni medij mora imeti poleg pravilne sestave tudi primerno temperaturo (prašičje urotelijske celice potrebujejo  $37^\circ\text{C}$ ) ter pH (7,4).

Dandanes je sistem primarnih in sekundarnih celičnih kultur osnoven in nepogrešljiv pripomoček pri raziskavah urotelija, katerih skupni cilj je razumevanje genetske in epigenetske kontrole razmnoževanja in diferenciacije urotelijskih celic. Prav tako uporaba

celičnih kultur bistveno zmanjšuje število žrtvovanih poskusnih živali in zmanjša uporabo reagentov (Southgate in sod., 1994). Dodatni prednosti prašičjih urotelijskih celičnih kultur sta tudi preprosto gojenje in podobnost s humanimi urotelijskimi celicami (Ludwikowski in sod., 1999). Poleg tega z uporabo prašičjih mehurjev, ki so namenjeni prehrambeni industriji, preprečujemo nepotrebno ubijanje živali (Guhe in Föllmann). Do sedaj so poleg prašičjih (Guhe in Föllmann, 1994; Ludwikowski in sod., 1999) in humanih (Kirk in sod., 1985; Cilento in sod., 1994; Southgate in sod., 1994; Reznikoff in sod., 2005) vzpostavili tudi podganje (Chlapowski in sod., 1989; Zhang in sod., 2001), mišje (Sterle in sod., 1997; Kreft in sod., 2005) in zajčje (Truschel in sod., 1999) urotelijske celične kulture.

Celične kulture delimo na primarne, sekundarne in trajne celične linije, glede na ohranjanje prvotnih lastnosti, izvor ter možno število delitev.

### **2.5.1 Primarna kultura urotelijskih celic**

Primarne celične kulture dobimo s pravilnim odvzemom zelenega tkiva, uporabo primernih disociacijskih tehnik ter z ustreznimi pogoji gojenja. Primarne kulture urotelijskih celic lahko pridobimo iz urotelijskih prirastkov tkivnih kultur sečnega mehurja ali pa neposredno iz urotelija *in vivo*. Primarne celične kulture so navadno heterogene (iz več tipov celic) z ohranjenimi prvotnimi lastnostmi (Kreft in sod., 2005).

Danes se primarne celične kulture uporabljajo v raziskavah, kjer je pomembno, da celice obdržijo prvotne lastnosti. Tudi urotelijske celice, ki jih je mogoče zanesljivo in hitro gojiti v primarni kulturi, ohranijo vse bistvene lastnosti normalnega urotelija. Primarna kultura prašičjih urotelijskih celic je po funkciji in morfologiji zelo podobna uroteliju *in vivo*. Celice se organizirajo v večskladni epitelij z visoko diferenciranimi celicami na površini. Prašičje in človeške urotelijske celice se lahko kultivirajo dlje časa brez pojava staranja. Ugotovili so tudi, da je kultura prašičjih urotelijskih celic primerljiva s človeškimi, saj imata ta tipa celic podobne morfološke in funkcionalne značilnosti (Hutton in sod., 1993; Guhe in Föllmann, 1994; Ludwikowski in sod., 1999; Turner in sod., 2008).

Razporeditev citokeratinov, ki je značilna za urotelijske celice *in vivo*, je značilna tudi za celice v pogojih *in vitro*, vendar je bilo za človeške celice ugotovljeno, da se CK20, pokazatelj terminalne diferenciacije, ne izraža (Southgate in sod., 1994; Cross, 2005). Njegova prisotnost je bila pokazana le pri mišjih urotelijskih celicah (Kreft, 1999; Kreft in sod., 2002).

Tako kot *in vivo* tudi v kulturah celice vzpostavijo medsebojne povezave. Southgate in sod. (1994) so ugotovili, da se protein adherentnih stikov E-kadherin izraža v kulturi človeškega urotelija v vseh celičnih plasteh, vendar šibkeje kot *in vivo*. Kreft in sodelavci (2002, 2006) so v kulturi dokazali izražanje proteinov tesnih stikov ZO-1 in okcludina ter dezmosomskega proteina dezmozoplakina. Prisotnost tesnih stikov in dezmosomov v celičnih kulturah so Sterle in sod. (1997) pokazali tudi na elektronskomikroskopskem nivoju. Z merjenjem TER so ugotavljali tudi funkcionalnost medceličnih stikov v primarnih celičnih kulturah (Cross in sod., 2005; Turner in sod., 2008). Izmerili so vrednosti nad  $500 \Omega\text{cm}^2$ , kar epitelij uvršča v skupino neprepustnih epitelijev (Fromter in Diamond, 1972).

### **2.5.2 Sekundarna kultura urotelijskih celic**

Sekundarno kulturo dobimo ob prvi uspešni presaditvi primarne kulture. Običajno je populacija celic v sekundarnih kulturah homogena. V prvih pasažah celice ohranjajo tkivno-specifične lastnosti, v višjih pasažah pa jih spreminjajo ali izgubljajo (Southgate in sod. 1994; Guhe in Föllmann, 1994). Z dolgotrajnim gojenjem in višanjem pasaž se celični cikl daljša. Pri prašičjih urotelijskih celicah so ugotovili, da se organizirajo v triskladni epitelij (Zhang in sod., 2001). Po devetih tednih gojenja oz. po V. do VI. pasaži gojenja so na triskladnem epiteliju opazili znake staranja. Celice so se povečale in postale večjedrne (Guhe in Wöllmann, 1994). Ludwikowski in sod. (1999), ki so celične kulture gojili 180 dni do X. pasaže, pa so dobili obratne rezultate. V celičnih kulturah niso opazili znakov dediferenciacije, njihov genotip je bil stabilen, brez kromosomskih napak. V večskladni kulturi so dokazali prisotnost CK 7, CK 8, CK 17, CK 18 ter E-kadherina, razporejenih kot v uroteliju *in vivo*. CK 20 in uroplakinov niso opazili. Med opazovanjem celičnih delitev pri različnih pasažah so ugotovili, da se število celičnih delitev z višanjem pasaž zmanjšuje. Kljub vsemu menijo, da lahko prašičje urotelijske celice gojimo dolgo časa brez znakov staranja.

### 2.5.3 Trajna celična linija urotelijskih celic

Trajne celične linije je razmeroma enostavno gojiti, saj je njihova rast manj odvisna od seruma ali rastnih dejavnikov. Za trajne celične linije je značilna visoka proliferacijska aktivnost. Njihove primarne lastnosti so slabo ohranjene ali povsem izgubljene, zaradi izgube medceličnih povezav pa se lahko te celice razvijejo v tumorske celice (Southgate in sod. 1999). V naši raziskavi smo uporabili dve trajni celični liniji: normalno trajno celično linijo ledvičnih epiteljskih celic (MDCK) in rakasto trajno celično linijo urotelijskih celic (T24).

### 2.6 HRANILNI MEDIJI

Za gojenje celic *in vitro* je zelo pomemben ustrezen hranilni medij. Kemijsko definiran medij je namreč ključen pri razumevanju neposrednega vpliva seruma,  $\text{Ca}^{2+}$  in hormonov na proliferacijo in diferenciacijo celic. V literaturi je kar nekaj poročil o uporabljenih medijih za gojenje urotelijskih celic in o vplivih sestavin na proliferacijo in diferenciacijo celic. Največkrat se omenjajo keratinocitni medij (KSFM) z različnimi dodatki, kot so rastni dejavniki, serum ali  $\text{Ca}^{2+}$  (Cilento in sod., 1994; Truschel in sod., 1998; Ludwikowski in sod., 1999; Southgate in sod., 2002, Cross in sod., 2005; Mudge in sod., 2005; Turner in sod., 2008), kemijsko definiran medij z enakim deležem MCDB153 in DMEM, za katerega je dokazano, da v njem urotelijske celice dosegajo visoko stopnjo diferenciacije (Sterle in sod. 1997; Kreft in sod., 2002; Hudoklin, 2004), in hranilni medij Ham F12 (Chlapowski 1989; Guhe in Föllmann, 1994; Reznikoff in sod., 2005).

V hranilni medij dodani serum omogoča hitrejšo rast urotelijskih celic *in vitro*, saj vsebuje številne nedefinirane snovi, kot so rastni dejavniki in hormoni. Ugotovili so, da urotelijske celice, ki rastejo v mediju brez seruma, potrebujejo za polovico več časa, da prekrijejo enako površino, kot celice, gojene v mediju s serumom. Kljub vsemu celice na koncu ne glede na prisotnost oz. odsotnost seruma dosežejo enako gostoto (Surya in sod., 1990). Dubeau in Jones (1987) opisujeta dobro lastnost hranilnega medija brez seruma, da onemogoča rast drugim celicam. Tako zagotovimo rast samo urotelijskih celicam.

Pomemben del hranilnega medija je tudi kalcij. Pinton in sod. (1998) so ugotovili, da inkubacija celic v mediju s  $\text{Ca}^{2+}$  pri 37 °C velikokrat povzroči spremembe v strukturi GA, saj pride do fragmentacije cistern GA. Ob ponovitvi postopka pri 4 °C je GA ostal nespremenjen. Tudi Southgate in sod. (1994) so ugotavljali vpliv  $\text{Ca}^{2+}$  na urotelijske celice. Ugotovili so, da celice, ki rastejo v mediju z nizko koncentracijo  $\text{Ca}^{2+}$  (0,09 mM), na kolagenskih membranah tvorijo monosloje. Ko pa so medij brez  $\text{Ca}^{2+}$  zamenjali s  $\text{Ca}^{2+}$ , so celice pričele tvoriti tri- do štiri-skladni epitelij. Ugotovili so tudi, da povečevanje zunajceličnega  $\text{Ca}^{2+}$  od 0,09 mM do 4 mM upočasni proliferacijo celic, izzove nastajanje celičnih skladov in povzroči spremembe v celičnem fenotipu, kot sta nastanek dezmosomov ter povečano izražanje E-kadherina in integrinskih adherentnih molekul. Poleg tega se je vidnost mej med celicami zmanjšala, povečalo pa se je število citoplazemskih granul. Nasprotno pa pred kratkim narejene raziskave, v katerih so primerjali stopnje morfološke diferenciacije primarnih celičnih kultur *in vitro* z različnimi hranilnimi mediji, niso pokazale razlik v izražanju diferenciacijskih označevalcev (Turner in sod., 2008).

### 3 MATERIAL IN METODE DELA

#### 3.1 POSKUSNI ŽIVALSKI MATERIAL

Dovoljenje za uporabo živalskih stranskih proizvodov kategorije 3 (prašičjih sečnih mehurjev) je izdalo Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Veterinarska uprava RS (dovoljenje št. 34453-6/2008).

#### 3.2 ODMRZOVANJE IN NASAJANJE CELIC

Za eksperimentalno delo smo odmrznili prašičje urotelijske celice, celice MDCK in celice T24, ki so bile predhodno globoko zamrznjene v tekočem dušiku. Epruvete za zamrzovanje (*Crio-vial*; TPP) s celicami smo vzeli iz tekočega dušika in jih eno minuto odtaljevali v vodi pri  $37^{\circ}\text{C}$ . Za ločitev celic od supernatanta smo uporabili centrifugo (5 min, 200 g,  $23^{\circ}\text{C}$ , Ependorf). Supernatant smo odlili, na dnu zbrane celice pa smo resuspendirali v hranilnem mediju. Nato smo v epici zmešali 50  $\mu\text{l}$  celične suspenzije ter 10  $\mu\text{l}$  tripanskega modrila, ki mrtve celice obarva modro. Vsebino epice smo prenesli na hemocitometer ter pod invertnim mikroskopom (*Leica DM IL*) prešteli mrtve in žive neobarvane celice. Iz ugotovljenega razmerja med živimi in mrtvimi celicami smo izračunali viabilnost ter število celic. Celice smo nato nasadili v gojitvene stekleničke (*Tissue Culture Flasks*; TPP), z različnimi pritrjevalnimi površinami (12,5 cm<sup>2</sup>, 25 cm<sup>2</sup> in 75 cm<sup>2</sup>), z gostoto 10<sup>5</sup> celic/cm<sup>2</sup>. Vsak dan smo zamenjali hranilni medij. Rast in diferenciacijo smo spremljali z invertnim mikroskopom (*Leica DM IL*). Na začetku smo spremljali predvsem pritrjevanje celic na podlago ter obliko celic, pozneje pa tudi število celičnih skladov v kulturi.



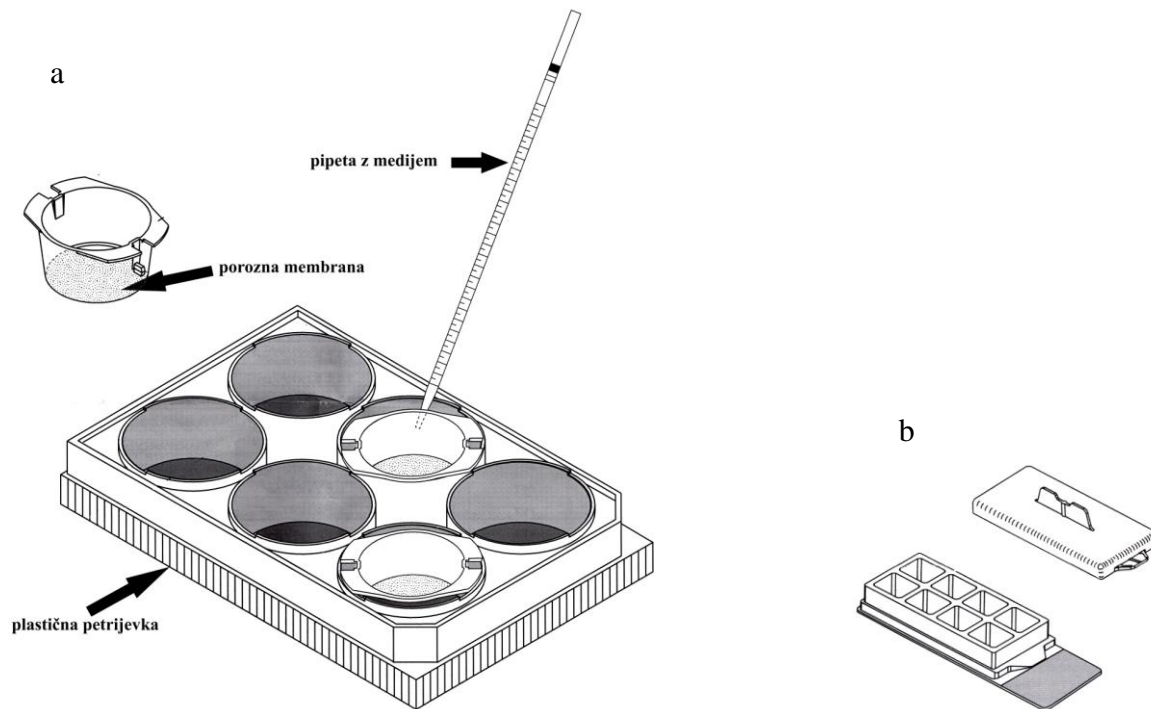
Schema 6: Stekleničke za gojenje celičnih kultur različnih površin

### 3.3 SEKUNDARNE UROTELIJSKE CELIČNE KULTURE

Odmrznjene primarne prašičje urotelijske celice smo nasadili kot I. pasažo sekundarne celične kulture. Presajanje v višje pasaže smo izvedli vedno, ko so celice dosegle najmanj 80% preraščenost dna gojitvene stekleničke, in sicer po spodaj opisanem postopku presajanja.

Postopek presajanja: iz gojitvene posodice smo odstranili hranilni medij in dodali sintetični proteolitični encim *TripleSelect* (Gibco). Sledila je inkubacija pri 37 °C, v atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub> in pri 100% relativni zračni vlažnosti, da so se celice zaokrožile in odlepile od podlage. Nato smo dodali hranilni medij UroM (-Ca<sup>2+</sup>+S), ki je preprečil delovanje encima. Sledilo je 5-minutno centrifugiranje (23 °C, 200 g, Ependorf). Supernatant smo odlili in celicam dodali od 1 do 3 ml hranilnega medija (odvisno od števila celic). Od tako pripravljene celične suspenzije smo vzeli 50 µl in jih zmešali z 10 µl tripanskega modrila, ki mrtve celice obarva modro. Čez čas obarva tudi žive celice, zato je treba celice prešteti v predpisanem času. S pomočjo hemocitometra smo prešteli mrtve in žive celice ter določili njihovo viabilnost in število. Celice smo nato nasadili v nove gojitvene stekleničke (*Tissue Culture Flasks*, TPP) različnih velikosti (gojitvena površina stekleničk: 12,5 cm<sup>2</sup>, 25 cm<sup>2</sup> in 75 cm<sup>2</sup>), na porozne membrane različnih površin, 0,9 cm<sup>2</sup> ali 4,2 cm<sup>2</sup>, z velikostjo por 0,4 µm (*Falcon Cell Culture Insert*, *Becton Dickinson*) in 8-prekatna stekelca (*Falcon CultureSlide*, *Becton Dickinson*), z gostoto 10<sup>5</sup> celic/cm<sup>2</sup>. Membrane smo dali v plastične petrijevke primerne velikosti (*Falcon Tissue Culture Plate*, *Becton Dickinson*), kamor je bil predhodno dodan hranilni medij UroM (-Ca<sup>2+</sup>+S), segret na 37 °C. Medij smo dali tudi na membrane s celicami, tako da so bile celice popolnoma obdane z njim. Menjavanje hranilnega medija je potekalo vsak dan. Celične kulture so uspevale v CO<sub>2</sub>-inkubatorju (*Heracell*, *Heraceus*) pri 37 °C, v 5% CO<sub>2</sub>-atmosferi in pri 100% relativni zračni vlažnosti.





Shema 7 a-b: Porozne membrane v plastični petrijevki in večprekatno stekelce **a)** Porozne membrane s površino 4,2 cm<sup>2</sup> in plastična petrijevka **b)** 8-prekatno stekelce

Ob konfluentnosti smo začeli celice tretirati z mediji, kot prikazuje Preglednica 6. Poleg tega smo celicam, ki so rasle na poroznih membranah s površino 0,9 cm<sup>2</sup>, vsak dan merili transepitelijsko upornost (TER). Celice na poroznih membranah s površino 4,2 cm<sup>2</sup> in večprekatih stekelih smo imunofluorescentno analizirali po 14 dneh tretiranja z različnimi hranilnimi mediji.

S prostim očesom vidne spremembe pri sekundarni kulturi prašičjih urotelijskih celicah smo posneli z digitalnim fotoaparatom *Konica Minolta Dynax 5D*, z makroobjektivom z goriščno razdaljo 50 mm.

### 3.4 CELIČNI LINIJI CELIC MDCK IN T24

Ob konfluentnosti celic MDCK in T24 smo opravili presajanje na enak način, kot je opisano zgoraj za prašičje urotelijske celice, razlika je samo v vrsti uporabljenega medija, katerega sestava je prikazana v preglednicah 4 in 5. Nasadili smo jih na porozne membrane s površino  $0,9 \text{ cm}^2$  in gostoto  $10^5$  celic/ $\text{cm}^2$ . Ko so celice dosegle konfluentno stanje, smo pričeli z vsakodnevnimi meritvami transepiteljske upornosti (TER), ki smo jo izvajali približno dva meseca.

### 3.5 HRANILNI MEDIJI

V skladu s tipom poskusa (Preglednica 6) ter vrsto celic smo uporabili pet hranilnih medijev. Vsem kulturam smo menjali hranilni medij vsak dan, razen ob koncih tedna. Osnova medijev sta bila medij MCDB153 (*Sigma, Taufkirchen, Nemčija*) in medij A-DMEM (*Advanced-Dulbecco's modification of Eagle's medium (Gibco, Life Technologies, Dunaj, Avstrija)*). Natančnejša sestava uporabljenih hranilnih medijev je prikazana v preglednicah 1, 2, 3, 4 ter 5. Hranilni mediji, prikazani v 1., 2. in 3. preglednici, so bili uporabljeni za urotelijske celice. Hranilni medij urotelijskih celic smo označili s kratico UroM. Prisotnost (+) oz. odsotnost (-)  $\text{Ca}^{2+}$  ali seruma (S) smo zapisali v oklepaju za kratico hranilnega medija. Preglednica 4 prikazuje sestavo medija za celice MDCK, preglednica 5 pa za celice T24.

Preglednica 1: Sestava hranilnega medija za prašičje urotelijske celice UroM (- $\text{Ca}^{2+}$ +S)

Sestavine medija	Proizvajalec	Končne koncentracije v mediju
MDCB 153	Sigma	50 %
A-DMEM	Gibco	50 %
Adenin	Sigma	15 $\mu\text{g/ml}$
Inzulin	Sigma	5 $\mu\text{g/ml}$
Hidrokortizon	Sigma	0,5 $\mu\text{g/ml}$
Fosfoetanolamin	Sigma	0,1 mM
Glutamax	Gibco	4 mM
Streptomycin	KC	100 $\mu\text{g/ml}$

Sestavine medija	Proizvajalec	Končne koncentracije v mediju
Penicilin	KC	100 µg/ml
FBS	Gibco	2,5 %

Preglednica 2: Sestava hranilnega medija za prašičje urotelijske celice UroM (+Ca<sup>2+</sup>+S)

Sestavine medija	Proizvajalec	Končne koncentracije v mediju
MDCB 153	Sigma	50 %
A-DMEM	Gibco	50 %
Adenin	Sigma	15 µg/ml
Inzulin	Sigma	5 µg/ml
Hidrokortizon	Sigma	0,5 µg/ml
Fosfoetanolamin	Sigma	0,1 mM
Glutamax	Gibco	4 mM
Streptomycin	KC	100 µg/ml
Penicilin	KC	100 µg/ml
FBS	Gibco	2,5 %
CaCl <sub>2</sub>	KC	2,5 mM

Preglednica 3: Sestava hranilnega medija za prašičje urotelijske celice UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S)

Sestavine medija	Proizvajalec	Končne koncentracije v mediju
MDCB 153	Sigma	50 %
A-DMEM	Gibco	50 %
Adenin	Sigma	15 µg/ml
Inzulin	Sigma	5 µg/ml
Hidrokortizon	Sigma	0,5 µg/ml
Fosfoetanolamin	Sigma	0,1 mM
Glutamax	Gibco	4 mM

<b>Sestavine medija</b>	<b>Proizvajalec</b>	<b>Končne koncentracije v mediju</b>
Streptomycin	KC	100 µg/ml
Penicilin	KC	100 µg/ml
CaCl <sub>2</sub>	KC	2,5 mM

Preglednica 4: Sestava hranilnega medija za celice MDCK

<b>Sestavine medija</b>	<b>Proizvajalec</b>	<b>Končne koncentracije v mediju</b>
A-MEM	Gibco	100 %
Glutamax	Gibco	4 mM
Streptomycin	KC	100 µg/ml
Penicilin	KC	100 µg/ml
FBS	Gibco	2,5 %

Preglednica 5: Sestava hranilnega medija za celice T24

<b>Sestavine medija</b>	<b>Proizvajalec</b>	<b>Končne koncentracije v mediju</b>
A-DMEM	Gibco	50 %
F12 (HAM)	Sigma	50 %
ITS	Gibco	5 µg/ml
Streptomycin	KC	100 µg/ml
Penicilin	KC	100 µg/ml
FBS	Gibco	2,5 %

### 3.6 TIPI POSKUSOV

Prašičjim urotelijskim celicam smo do konfluentnosti dodajali hranilni medij UroM (-Ca<sup>2+</sup>+S) (Preglednica 1). Nato smo pričeli dodajati različne medije, kot je prikazano v Preglednici 6. Celicam MDCK in T24 smo ves čas dodajali hranilni medij celic MDCK (Preglednica 4) ter hranilni medij celic T24 (Preglednica 5).

Izvedeni so bili naslednji poskusi:

Preglednica 6: Prikaz poskusov na normalnih prašičjih urotelijskih celicah MDCK in T24

Številka poskusa	Vrsta celic	Hranilni medij		Vrsta poskusa
		Pred konfluentnostjo	Po konfluentnosti	
I	Prašičje urotelijske	UroM (-Ca <sup>2+</sup> +S) (Preglednica 1)	UroM (-Ca <sup>2+</sup> +S) (Preglednica 1)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• meritev TER</li> <li>• imunofluorescenca</li> </ul>
II	Prašičje urotelijske	UroM (-Ca <sup>2+</sup> +S) (Preglednica 1)	UroM (+Ca <sup>2+</sup> +S) (Preglednica 1)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• meritev TER</li> <li>• imunofluorescenca</li> </ul>
III	Prašičje urotelijske	UroM (-Ca <sup>2+</sup> +S) (Preglednica 1)	UroM (+Ca <sup>2+</sup> -S) (Preglednica 2)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• meritev TER</li> <li>• imunofluorescenca</li> </ul>
IV	MDCK	Hranilni medij za celice MDCK (Preglednica 4)	Hranilni medij za celice MDCK (Preglednica 4)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• meritev TER</li> </ul>
V	T24	Hranilni medij za celice T24 (Preglednica 5)	Hranilni medij za celice T24 (Preglednica 5)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• meritev TER</li> </ul>

### 3.7 IMUNOFLUORESCENTNO OZNAČEVANJE PROTEINOV V SEKUNDARNI KULTURI PRAŠIČJIH UROTELIJSKIH CELIC

Za imunofluorescentno označevanje proteinov smo urotelijske celice nasadili na porozne membrane s površino 4,2 cm<sup>2</sup> in na večprekatna stekelca. Gojili smo jih po istem postopku kot za merjenje TER in pri tem uporabili hranilne medije, ki jih prikazuje Preglednica 6. Po treh tednih gojenja celic smo izvedli postopek imunofluorescence. Razlika med izvedbo imunofluorescence na poroznih membranah ter večpreklatnih stekelcih je v tem, da porozne membrane s celičnimi kulturami po blokadi izrežemo iz plastičnih nosilcev ter jih s skalpelom narežemo na več delov. Nato nadaljujemo delo s koščki razrezanih membran. Pri večpreklatnih

stekelcih pa se celotni postopek opravi v prekatih in se šele preden dodamo *Vectashield* s fluorescentnim barvilom DAPI, odstranimo prekatne stene. Celotno delo je po uporabi sekundarnih protiteles potekalo v temi. Vse pripravljene preparate smo pregledali ter slikali s klasičnim fluorescenčnim mikroskopom *Eclipse TE300* (Nikon) in fluorescenčnim mikroskopom *Axiomager.Z1* z dodatkom *ApoTome* (Zeiss). Klasični fluorescenčni mikroskop omogoča zajemanje posnetkov v eni goriščni ravnini. Fluorescenčni mikroskop z dodatkom *ApoTome* lahko posname več optičnih rezin, katerih goriščne ravnine so 240 nm narazen. Optične rezine lahko nato sestavimo v 3D-model ali naredimo prečni prerez za jasnejšo in lažje predstavljivo informacijo.

Določene slike in 3D-modele (glej 3.8) smo podrobneje analizirali. Podatke smo zbrali v preglednicah, izračunali povprečno vrednost, standardno deviacijo (SD), standardno napako (SE) ter jih prikazali z grafi. S Studentovim t-testom smo preverili, ali so razlike med prašičjimi urotelijskimi celicami, ki so bile različno tretirane, statistično značilne pri tveganju  $p < 0,05$ . Vsak 3D-model je imel os x velikosti 142  $\mu\text{m}$ , os y velikosti 142  $\mu\text{m}$  in os z, katere velikost je bila odvisna od števila optičnih rezin.

Preglednica 7: Uporabljena primarna in sekundarna protitelesa za imunofluorescentno dokazovanje proteinov

<b>protein</b>	<b>primarno protitelo; razredčitev</b>	<b>sekundarno protitelo; razredčitev</b>
uroplakini (močna reakcija proti UPIIIa, srednja reakcija proti UPIa/Ib in šibka reakcija proti UPII)	poliklonska zajčja protitelesa proti uroplakinom (darilo prof. dr. T.-T. Sun); 1:1000	kozja, narejena proti zajčjim antigenom, konjugirana z AlexaFlour (488nm) (Molecular Probes); 1:200
GM130 (cis GA)	zajčje poliklonalno protitelo proti GM130 (darilo dr. M.A. De Matteis); 1:250	kozja, narejena proti zajčjim antigenom, konjugirana z AlexaFlour (555 nm) (Molecular Probes); 1:200
giantin (ogrodni protein GA)	mišje monoklonalno protitelo proti giantinu (darilo dr. H. P. Hauri); 1:1000	kozja, narejena proti mišjim antigenom, konjugirana z AlexaFlour (555 nm) (Molecular Probes); 1:200
$\alpha$ - tubulin	mišje monoklonalno protitelo proti $\alpha$ -tubulinu (Sigma, Taufkirchen, Germany); 1:500	kozja, narejena proti mišjim antigenom, konjugirana z AlexaFlour (555 nm) (Molecular Probes); 1:200
CK 7	mišje monoklonalno protitelo proti citokeratinu 7 (Dako, Glostrup, Denmark); 1:20	kozja, narejena proti mišjim antigenom, konjugirana z AlexaFlour (555 nm) (Molecular Probes); 1:200
CK 20	mišje monoklonalno protitelo proti citokeratinu 20 (Dako, Glostrup, Denmark); 1:20	kozja, narejena proti mišjim antigenom, konjugirana z AlexaFlour (555 nm) (Molecular Probes); 1:200
okludin	zajčje poliklonalno protitelo proti okludinu (Zymed, San Francisco, CA); 1:20	kozja, narejena proti zajčjim antigenom, konjugirana z AlexaFlour (488 nm) (Molecular Probes); 1:200
E-kadherin (adherentni stiki)	mišje monoklonalno protitelo proti E-kadherinu (BD Transduction Laboratories)	kozja, narejena proti mišjim antigenom, konjugirana z AlexaFlour (488 nm) (Molecular Probes); 1:200

<b>protein</b>	<b>primarno protitelo; razredčitev</b>	<b>sekundarno protitelo; razredčitev</b>
vimentin (fibroblasti)	zajčje poliklonalno protitelo proti vimentinu (Sigma, Taufkirchen, Germany); 1:20	kozja, narejena proti zajčjim antigenom, konjugirana z AlexaFlour (555 nm) (Molecular Probes); 1:200
dezmin (mišične celice)	zajčje poliklonalno protitelo proti dezminu (Dako, Glostrup, Denmark); 1:40	kozja, narejena proti zajčjim antigenom, konjugirana z AlexaFlour (555 nm) (Molecular Probes); 1:200

### 3.7.1 Označevanje kromatina s fluorescentnim barvilom DAPI

Fluorescentno barvilo DAPI (4,6- diamidine-2-phenylindole dihydrochloride) se veže specifično na kromatin. Z njim smo ugotavljali lokacijo jeder v celicah. Barvilo je vključeno v medij proti bledenju (*Vectashield* z barvilom DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, CA, ZDA). Vsem poroznim membranam ter večpreklatnim stekelcem s kulturami, ki smo jih pripravljali za različne imunofluorescenčne analize, smo tik pred pokrivanjem s krovnimi stekelci dodali *Vectashield* s fluorescentnim barvilom DAPI.

### 3.7.2 Dvojna imunofluorescenca Golgijevega aparata (GA) in uroplakinov

Celične kulture na poroznih membranah ter večpreklatnih stekelcih smo fiksirali v 4% paraformaldehidu (PA), segretem na 37 °C, 12 minut pri sobni temperaturi. Sledilo je spiranje s PBS (4-krat v 15 minutah). Nato smo celične kulture blokirali 30 minut pri sobni temperaturi z blokirnim pufrom (0,1 % gelatina, 0,1 % saponina, 0,5 % BSA, 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in 0,02 % NaN<sub>3</sub>), segretim na 37 °C. Blokirni pufer smo odstranili ter za 60 minut pri sobni temperaturi dodali **a**) primarna mišja monoklonska protitelesa proti giantinu, razredčena 1:1000 z 1% BSA v PBS, ali **b**) primarna zajčja poliklonalna protitelesa proti GM130 (cis GA), razredčena 1:250 z 1 % BSA v PBS. Sledilo je 30-minutno spiranje s PBS ter 90-minutna inkubacija v temi, pri sobni temperaturi, s sekundarnimi kozjimi protitelesi, narejenimi proti **a**) mišjim antigenom



oz. **b)** zajčjim antigenom, konjugiranim z AF (555 nm), razredčenimi 1:200 z 1% BSA v PBS. Inkubaciji je sledilo 30-minutno spiranje s PBS ter ponovna 5-minutna fiksacija v 4% PA pri sobni temperaturi. Nato smo celice 15 minut spirali s PBS ter 45 minut inkubirali na sobni temperaturi v blokirnem pufri, segretim na 37 °C. Sledila je inkubacija čez noč, v hladilniku, s primarnimi zajčjimi poliklonskimi protitelesi proti uroplakinom, razredčenimi 1:1000 z 1% BSA v PBS. Naslednji dan smo 30 minut spirali s PBS ter celice 90 minut inkubirali s sekundarnimi kozjimi protitelesi, narejenimi proti zajčjim antigenom, konjugiranimi z AF (488 nm) in razredčenimi 1:200 z 1% BSA v PBS. Sledilo je 30-minutno spiranje s PBS in pokrivanje s krovnimi stekelci. Tik pred pokritjem smo dodali še *Vectashield* z barvilom DAPI.

### **3.7.3 Dvojna imunofluorescenca $\alpha$ -tubulina in uroplakinov**

Celične kulture na poroznih membranah ter večpreklatnih stekelcih smo fiksirali v 4% paraformaldehidu, segretim na 37 °C, 12 minut pri sobni temperaturi. Sledilo je spiranje s PBS (4-krat v 15 minutah). Nato smo celične kulture 30 minut pri sobni temperaturi blokirali z blokirnim pufrom, segretim na 37 °C. Blokirni pufer smo odstranili ter za 60 minut pri sobni temperaturi dodali primarna mišja monoklonska protitelesa proti  $\alpha$ - tubulinu, razredčena 1:500 z 1% BSA v PBS. Sledilo je 30-minutno spiranje s PBS ter 90-minutna inkubacija pri sobni temperaturi s sekundarnimi kozjimi protitelesi, narejenimi proti mišjim antigenom, konjugiranimi z AF (555 nm) in razredčenimi 1:200 z 1% BSA v PBS. Inkubaciji je sledilo 30-minutno spiranje s PBS ter ponovna 5-minutna fiksacija v 4% PA pri sobni temperaturi. Nato smo celice spirali 15 minut s PBS ter 45 minut inkubirali pri sobni temperaturi v blokirnem pufri, segretim na 37 °C. Sledila je inkubacija čez noč v hladilniku, s primarnimi zajčjimi poliklonskimi protitelesi proti uroplakinom, razredčenimi 1:1000 z 1% BSA v PBS. Naslednji dan smo 30 minut spirali s PBS ter celice 90 minut inkubirali s sekundarnimi kozjimi protitelesi, narejenimi proti zajčjim antigenom, konjugiranimi z AF (488 nm) in razredčenimi 1:200 z 1% BSA v PBS. Sledilo je 30-minutno spiranje s PBS in pokrivanje s krovnimi stekelci. Tik pred pokritjem smo dodali še *Vectashield* z barvilom DAPI.

### **3.7.4 Dvojna imunofluorescenca aktina in GA**

Celične kulture na poroznih membranah ter večpreklatnih stekelcih smo fiksirali v 4% paraformaldehidu (PA), segretem na 37 °C, 30 minut pri sobni temperaturi. Sledilo je spiranje s PBS (6-krat v 30 minutah). Nato smo celice inkubirali 180 minut pri sobni temperaturi z faloidinom (aktin obarva rdeče; Sigma), razredčenim 1:5 v PBS. Od tu naprej je postopek potekal v temi. Sledila je 5-minutna fiksacija v 4% PA pri sobni temperaturi. Nato smo celice spirali 15 minut s PBS ter 45 minut inkubirali na sobni temperaturi v blokirnem pufri, segretim na 37 °C. Sledila je inkubacija čez noč v hladilniku, s primarnimi mišjimi monoklonskimi protitelesi proti GM130, razredčenimi 1:1000 z 1% BSA v PBS. Naslednji dan smo 30 minut spirali s PBS ter celice 90 minut inkubirali s sekundarnimi kozjimi protitelesi, narejenimi proti mišjim antigenom, konjugiranimi z AF (555 nm) in razredčenimi 1:200 z 1% BSA v PBS. Sledilo je 30-minutno spiranje s PBS in pokrivanje s krovnimi stekelci. Tik pred pokritjem smo dodali še Vectashield z barvilom DAPI.

### **3.7.5 Dvojna imunofluorescenca GA in proteina tesnih stikov – okludina**

Celične kulture na poroznih membranah ter večpreklatnih stekelcih smo fiksirali v 100% etanolu, ohlajenem na -30 °C, 25 minut pri sobni temperaturi. Sledilo je spiranje s PBS (4-krat v 15 minutah). Nato smo celične kulture blokirali v 1% BSA v PBS 45 minut pri sobni temperaturi. 1% BSA v PBS smo odstranili ter za 90 minut pri sobni temperaturi dodali primarna mišja monoklonska protitelesa proti giantinu, razredčena 1:1000 z 1% BSA v PBS. Sledilo je 30-minutno spiranje s PBS ter 110-minutna inkubacija pri sobni temperaturi s sekundarnimi kozjimi protitelesi proti mišjim antigenom, konjugiranimi z AF (555 nm), razredčenimi 1:200 z 1% BSA v PBS. Inkubaciji je sledilo 30-minutno spiranje s PBS ter ponovna 10-minutna fiksacija v 100% etanolu, ohlajenem na -30 °C, pri sobni temperaturi. Nato smo celice spirali 15 minut s PBS ter 45 minut inkubirali na sobni temperaturi v 1% BSA v PBS. Sledila je inkubacija čez noč v hladilniku s primarnimi zajčjimi poliklonskimi protitelesi proti okludinu, razredčenimi 1:20 z 1% BSA v PBS. Naslednji dan smo 30 minut

spirali s PBS ter celice 110 minut inkubirali s sekundarnimi kozjimi protitelesi, narejenimi proti zajčjim antigenom, konjugiranimi z AF (488 nm) in razredčenimi 1:200 z 1% BSA v PBS. Sledilo je 30-minutno spiranje s PBS in pokrivanje s krovnimi stekelci. Tik pred pokritjem smo dodali še *Vectashield* z barvilom DAPI.

### **3.7.6 Imunofluorescenca proteina adherentnih stikov E-kadherina**

Celične kulture na poroznih membranah ter večprekatnih stekelcih smo fiksirali v 100% etanolu, ohlajenem na  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 25 minut pri sobni temperaturi. Sledilo je spiranje s PBS (4-krat v 15 minutah). Nato smo celične kulture blokirali v 1% BSA/PBS 45 minut pri sobni temperaturi. 1% BSA/PBS smo odstranili ter za 90 minut pri sobni temperaturi dodali primarna mišja monoklonska protitelesa proti E-kadherinu, razredčena 1:20 z 1% BSA v PBS. Sledilo je 30-minutno spiranje s PBS ter 110-minutna inkubacija pri sobni temperaturi, s sekundarnimi kozjimi protitelesi, narejenimi proti mišjim antigenom, konjugiranimi z AF (555 nm) in razredčenimi 1:200 z 1% BSA v PBS. Inkubaciji je sledilo 30-minutno spiranje s PBS in pokrivanje s krovnimi stekelci. Tik pred pokritjem smo dodali še *Vectashield* z barvilom DAPI.

### **3.7.7 Dvojna imunofluorescenca proteinov intermediarnih filamentov – citokeratinov 20 in 7 ter uroplakinov**

Celične kulture na poroznih membranah ter večprekatnih stekelcih smo fiksirali v 100% etanolu, ohlajenem na  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 25 minut pri sobni temperaturi. Sledilo je spiranje s PBS (4-krat v 15 minutah). Nato smo celične kulture blokirali v 1% BSA/PBS 45 minut pri sobni temperaturi. 1 % BSA/PBS smo odstranili ter za 90 minut pri sobni temperaturi dodali **a)** primarna mišja monoklonska protitelesa proti CK 20, razredčena 1:20 z 1% BSA v PBS, ali **b)** primarna mišja monoklonska protitelesa proti CK 7, razredčena 1:20 z 1% BSA v PBS. Sledilo je 30-minutno spiranje s PBS ter 110-minutna inkubacija pri sobni temperaturi s

sekundarnimi kozjimi protitelesi proti mišjim antigenom, konjugiranimi z AF (555 nm) in razredčenimi 1:200 z 1% BSA v PBS. Inkubaciji je sledilo 30-minutno spiranje s PBS ter ponovna 10-minutna fiksacija v 100% etanolu, ohlajenem na  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 25 minut pri sobni temperaturi. Nato smo celice spirali 15 minut s PBS ter jih 45 minut inkubirali pri sobni temperaturi v 1% BSA v PBS. Sledila je inkubacija čez noč v hladilniku, s primarnimi zajčjimi poliklonskimi protitelesi proti uroplakinom, razredčenimi 1: 1000 z 1% BSA v PBS. Naslednji dan smo 30 minut spirali s PBS ter celice 110 minut inkubirali s sekundarnimi kozjimi protitelesi, narejenimi proti zajčjim antigenom, konjugiranimi z AF (488 nm) in razredčenimi 1:200 z 1% BSA v PBS. Sledilo je 30-minutno spiranje s PBS in pokrivanje s krovnimi stekelci. Tik pred pokritjem smo dodali še *Vectashield* z barvilom DAPI.

### **3.7.8 Imunofluorescenca vimentina**

Celične kulture na poroznih membranah ter večpreklatnih stekelcih smo fiksirali v 4% PA, segretem na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 12 minut pri sobni temperaturi. Sledilo je spiranje s PBS (4-krat v 15 minutah). Nato smo celične kulture blokirali 30 minut pri sobni temperaturi z blokirnim pufrom, segretim na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Blokirni pufer smo odstranili ter za 60 minut pri sobni temperaturi dodali primarna mišja monoklonska protitelesa proti vimentinu, razredčena 1:20 z 1% BSA v PBS. Sledilo je 30-minutno spiranje s PBS ter 90-minutna inkubacija pri sobni temperaturi s sekundarnimi kozjimi protitelesi proti mišjim antigenom, konjugiranimi z AF (555 nm) in razredčenimi 1:200 z 1% BSA v PBS. Inkubaciji je sledilo 30-minutno spiranje s PBS ter pokrivanje s krovnimi stekelci. Tik pred pokritjem smo dodali še *Vectashield* z barvilom DAPI.

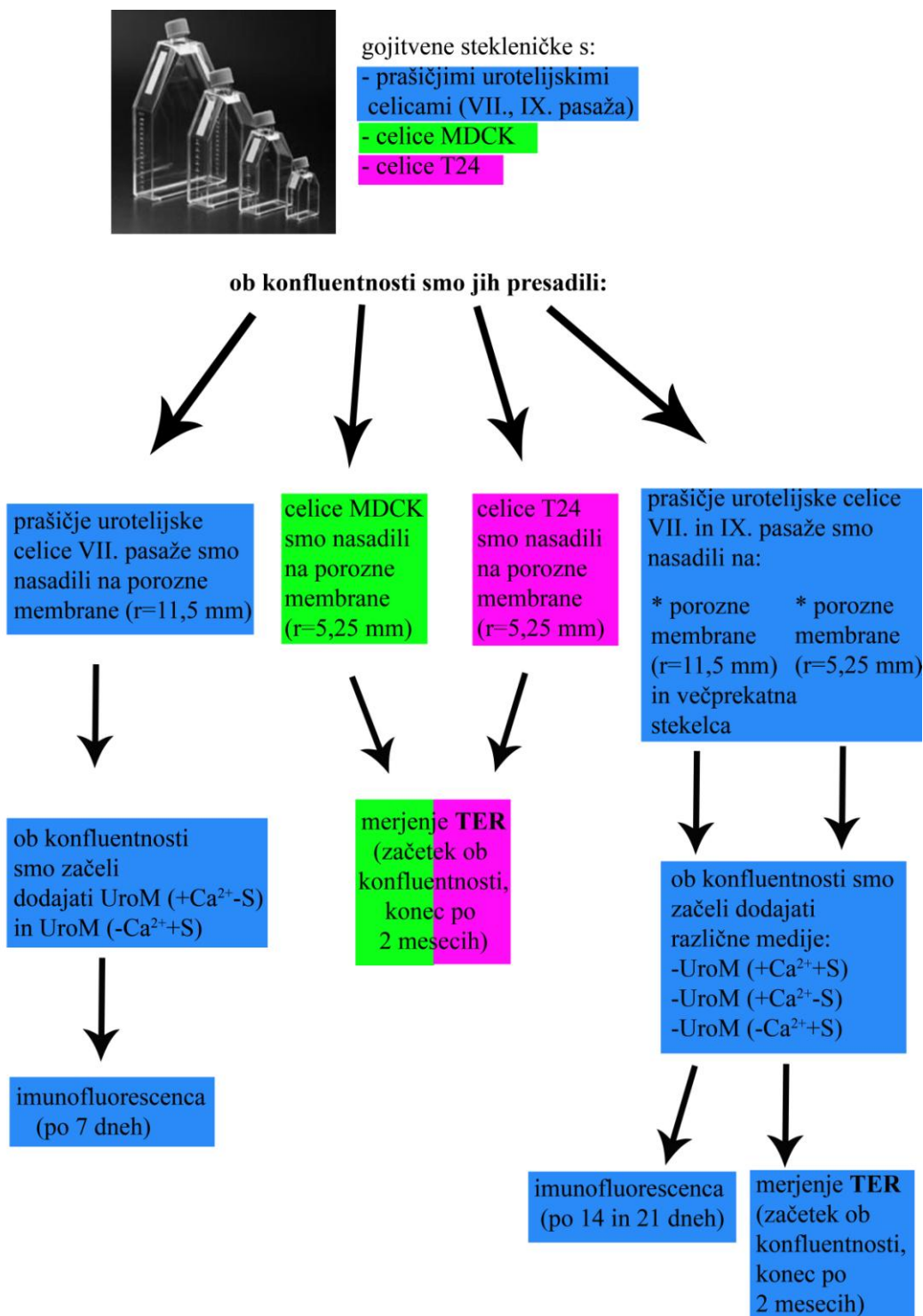
### **3.7.9 Imunofluorescenca dezmina**

Celične kulture na poroznih membranah ter večpreklatnih stekelcih smo pri sobni temperaturi 12 minut fiksirali v 4% paraformaldehidu (PA), segretem na 37 °C. Sledilo je spiranje s PBS (4-krat v 15 minutah). Nato smo celične kulture 30 minut pri sobni temperaturi blokirali z blokirnimi pufrom, segretim na 37 °C. Blokirni pufer smo odstranili ter za 60 minut pri sobni temperaturi dodali primarna mišja monoklonska protitelesa proti dezminu, razredčena 1:40 z 1% BSA v PBS. Sledilo je 30-minutno spiranje s PBS ter 90-minutna inkubacija pri sobni temperaturi, s sekundarnimi kozjimi protitelesi proti mišjim antigenom, konjugiranimi z AF (555 nm), razredčenimi 1:200 z 1% BSA v PBS. Inkubaciji je sledilo 30-minutno spiranje s PBS ter pokrivanje s krovnimi stekelci. Tik pred pokritjem smo dodali še *Vectashield* z barvilom DAPI.

### **3.7.10 Negativna kontrola**

Celične kulture, ki so služile kot negativna kontrola, smo pripravili po istem postopku kot ostale kulture, vendar s to razliko, da smo izpustili inkubacijo v primarnih protitelesih.

### 3.8 SHEMA POTEKA POSKUSOV



### 3.9 ANALIZA FLUORESCENTNIH SLIK PRAŠIČJIH UROTELIJSKIH CELIC

#### 3.9.1 Ugotavljanje števila jeder ob prisotnosti in odsotnosti seruma v mediju

Prašičje urotelijske celice VII. pasaže smo nasadili na porozne membrane površine  $4,2 \text{ cm}^2$  z nasaditveno gostoto  $10^5$  celic/ $\text{cm}^2$ . Gojili smo jih v mediju s serumom (UroM (-Ca<sup>2+</sup>+S)) in brez njega (UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S)), da bi ugotovili, ali serum poveča proliferacijo celic. Kromatin v jedru celic smo fluorescentno označili z DAPI (glej 3.7.1) ter posneli deset naključnih slik s fluorescenčnim mikroskopom (Nikon). V vsakem vidnem polju smo prešteli število jeder, izračunali povprečje, SD ter SE. Razliko med številom jeder v mediju s serumom in brez seruma smo statistično ovrednostili s Studentovim t-testom pri tveganju  $p = 0,05$ .

#### 3.9.2 Ugotavljanje prisotnosti uroplakinov na površini površinskih urotelijskih celic

Uroplakini se vgradijo v apikalno plazmalemo visoko diferenciranih prašičjih urotelijskih celic. Da bi ugotovili, kako različni mediji vplivajo na pojavljanje uroplakinov v apikalni plazmali, smo uroplakine fluorescentno označili, kot je opisano v poglavju 3.7.2. Pripravljene preparate z urotelijskimi celicami, ki so rasle v hranilnih medijih 21 dni, smo slikali s fluorescenčnim mikroskopom *Eclipse TE 300* (Nikon). Pri vsakem mediju smo naredili deset naključnih slik z enakim osvetljevalnim časom (čas osvetlitve = 1 s) ter enako površino ( $74050 \mu\text{m}^2$ ). S pomočjo programa *NIS-elements* (Nikon) smo ugotovili površino apikalne plazmaleme z uroplakini. Podatke smo zbrali v preglednici, izračunali povprečno vrednost, standardno deviacijo (SD), standardno napako (SE) ter jih prikazali na Grafu 2. S Studentovim t-testom smo preverili, ali so razlike med različno tretiranimi prašičjimi urotelijskimi celicami statistično značilne pri tveganju  $p = 0,05$  (Priloga A).

### **3.9.3 Ugotavljanje oblike GA v površinskih urotelijskih celicah z različno izraženimi uroplakini v apikalni plazmalemi**

V prašičjih urotelijskih celicah IX. pasaže, ki so rasle v različnih hranilnih medijih, smo hkrati fluorescentno označili GA ter uroplakine (glej 3.7.2). Zopet smo za vsak hranilni medij fotografirali deset naključnih vidnih polj s fluorescentnim mikroskopom *Axiomager.Z1* z dodatkom *ApoTome*. Opazovali smo obliko GA (osnovno, prehodno ali kompleksno) v celicah z ali brez uroplakinov v apikalni plazmalemi in morebitne razlike med hranilnimi mediji. Podatke smo zbrali v preglednici, izračunali povprečno vrednost, standardno deviacijo (SD), standardno napako (SE) ter jih prikazali z grafom. S Studentovim t-testom smo preverili, ali so razlike med prašičjimi urotelijskimi celicami, ki so bile različno tretirane, statistično značilne pri tveganju  $p = 0,05$ .

### **3.9.4 Merjenje fluorescence $\alpha$ -tubulina v površinskih urotelijskih celicah z različno izraženimi uroplakini v apikalni plazmalemi**

Prašičje urotelijske celice, ki so rasle v različnih hranilnih medijih, smo fluorescentno označili s protitelesi proti  $\alpha$ -tubulinu in proti uroplakinom (glej 3.7.3). S fluorescentnim mikroskopom *Axiomager.Z1* z dodatkom *ApoTome* smo pri vsakem mediju posneli 10 naključnih vidnih polj z enakim osvetljevalnim časom (*exposure time*  $\alpha$ -tubulina = 23 ms, *exposure time* uroplakinov = 82 ms). Slike smo analizirali tako, da smo pri celicah z uroplakini v apikalni plazmalemi izmerili najmočnejšo fluorescenco uroplakinov ter na isti optični ravnini tudi fluorescenco  $\alpha$ -tubulina. Nato smo se premaknili za dve optični rezini (0,480  $\mu\text{m}$ ) pod predhodno merjeno rezino ter postopek ponovili. Izmerili smo še najmočnejšo intenziteto fluorescence  $\alpha$ -tubulina ter v isti optični ravnini tudi intenziteto fluorescence uroplakinov. Intenziteto fluorescence  $\alpha$ -tubulina in uroplakinov smo izmerili tudi dve optični ravnini nad optično ravnino, kjer je bila intenziteta tubulina  $\alpha$  največja. Pri celicah brez uroplakinov v apikalni plazmalemi smo najprej izmerili najmočnejšo fluorescenco  $\alpha$ -tubulina v celici ter v isti optični ravnini še fluorescenco uroplakinov. Nato smo se pomaknili za dve optični rezini nad predhodno merjeno rezino ter še tam izmerili fluorescenco uroplakinov in  $\alpha$ -tubulina. Na istih celicah smo izmerili tudi najmočnejšo intenziteto fluorescence uroplakinov ter intenziteto

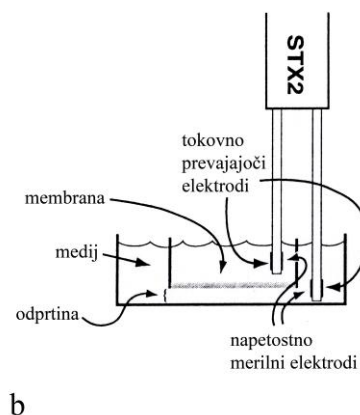


fluorescence  $\alpha$ -tubulina v isti optični ravnini. Meritve smo nato ponovili še dve optični ravnini pod optično ravnino, kjer je bila intenziteta fluorescence uroplakinov največja. Meritve intenzitete fluorescence smo zbrali v preglednici, izračunali povprečno vrednost, standardno deviacijo (SD) in standardno napako (SE) ter jih grafično prikazali. S Studentovim t-testom smo preverili, ali so razlike med prašičjimi urotelijskimi celicami, ki so imele uroplakine v apikalni plazmalemi, in celicami brez uroplakinov v apikalni plazmalemi statistično značilne pri tveganju  $p = 0,05$ .

### 3.10 MERJENJE TRANSEPITELIJSKE UPORNOSTI (TER)

Transepitelijsko upornost smo merili z epitelijskim voltmetrom (EVOM & EVOMX, Sarasota Center Boulevard) in s pripadajočimi elektrodami (STX2, Sarasota). Epitelijski voltmeter z elektrodami je narejen posebej za merjenje toka in upornosti pri epitelijskih kulturah na poroznih membranah površine  $0,9 \text{ cm}^2$ . Pri meritvah je pomembna lega elektrod, ki mora biti pravokotna na porozno membrano. Pri tem se mora daljša elektroda dotikati dna plastične petrijevke, v kateri je porozna membrana, krajša elektroda pa je potopljena v medij tik nad porozno membrano s celično kulturo. Z enako postavitvijo elektrod glede na membrano s celicami izboljšamo natančnost meritev.

Da bi ugotovili transepitelijsko upornost epitelijske kulture na poroznih membranah, smo najprej izmerili upornost praznih membran z različnimi mediji. Iz meritev smo ugotovili, kakšno upornost ima prazna membrana z medijem. Od vsake meritve TER, ki smo jo opravili na kulturah celic, smo odšteli upornost prazne membrane ter tako dobili dejansko upornost celic.



Schema 8 a-b: Merjenje TER na poroznih membranah s STX2 elektrodami in epitelijskim voltmetrom (EVOM & EVOMX) **a)** Voltmeter in STX2 elektroda **b)** Pravilna postavitev elektrod (prirejeno po navodilih proizvajalca EVOM & EVOMX in STX2, Sarasota)

### 3.10.1 Merjenje transepitelijske upornosti (TER) pri sekundarni kulturi prašičjih urotelijskih celic

Ko so celice dosegle konfluentnost, smo začeli meriti transepitelijsko upornost prašičjih urotelijskih celic na poroznih membranah s površino  $0,9 \text{ cm}^2$ . Na vsaki porozni membrani z urotelijskimi celicami smo opravili meritev TER na sedmih različnih mestih, z upoštevanjem napake meritve. Po prvem merjenju smo celicam pričeli dodajati različne medije, kot je prikazano v Preglednici 6. Da bi zmanjšali možnost okužbe, smo menjavo medija vedno opravili po merjenju TER. Meritve smo vsakodnevno opravljali dva meseca.

### 3.10.2 Merjenje transepitelijske upornosti (TER) celic MDCK in celic T24

Transepitelijsko upornost (TER) smo začeli meriti nasajenim celicam na poroznih membranah površine  $0,9 \text{ cm}^2$ , ko so dosegle konfluentno stanje. Postopek meritev TER je bil popolnoma enak kot pri sekundarni kulturi prašičjih urotelijskih celic. Meritve smo opravljali vsak dan ter jih primerjali s transepitelijskimi meritvami pri sekundarnih prašičjih urotelijskih celicah. Pri

MDCK in celicah T24 smo celotni čas poskusa uporabljali hranilna medija, opisana v Preglednici 6. Merjenja TER smo opravljali vsak dan približno dva meseca.

Meritve TER prašičjih urotelijskih celic, MDCK in celic T24 smo zbrali v preglednicah, izračunali povprečno vrednost, standardno deviacijo (SD), standardno napako (SE) ter jih prikazali na grafih. S Studentovim t-testom smo preverili, ali so razlike med prašičjimi urotelijskimi celicami, ki so bile različno tretirane, statistično značilne pri tveganju  $p = 0,05$ .

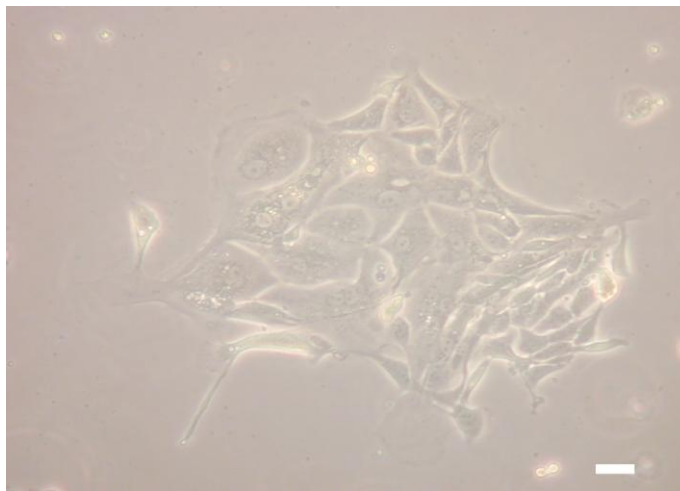
Porozne membrane s celicami smo tudi redno pregledovali z invertnim mikroskopom ter opazovali vidne razlike med celičnimi kulturami z različnimi transepitelijskimi upornostmi.

## 4 REZULTATI

### 4.1 CELIČNE KULTURE

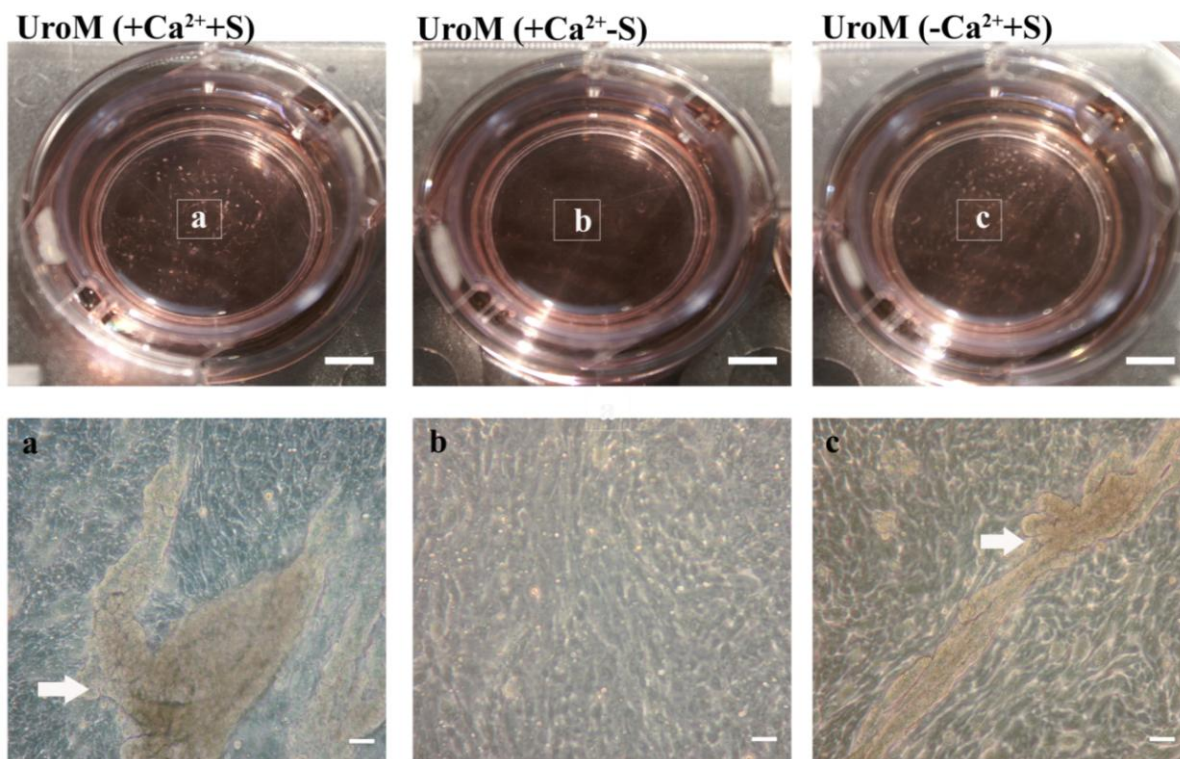
#### 4.1.1 Sekundarna kultura prašičjih urotelijskih celic

Sekundarne kulture prašičjih urotelijskih celic VII. in IX. pasaže z nasaditveno gostoto  $10^5$  celic/cm<sup>2</sup> smo redno opazovali z invertnim svetlobnim mikroskopom. Konfluentno stanje so dosegle približno po sedmih dneh gojenja. Ob konfluentnosti smo pričeli celice tretirati z različnimi hranilnimi mediji, kot je prikazano v Preglednici 6. V nekaj dnevih so se pričele urejati v diferenciran dvo- do troskladni prehodni epitelij z bazalnimi, vmesnimi in dežnikastimi celicami. Prašičje urotelijske celice so torej kmalu po nasaditvi tvorile dvo- do troskladni urotelij, podoben normalnemu uroteliju *in vivo*.



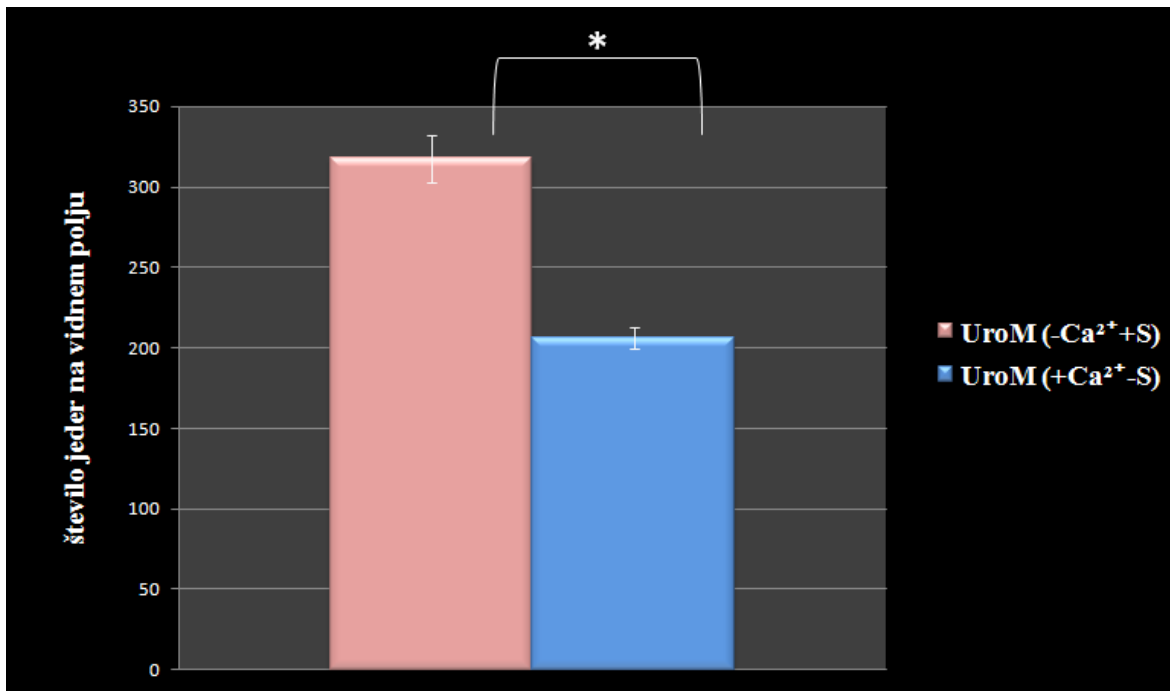
Slika 1: Sekundarna kultura prašičjih urotelijskih celic 2. dan po nasaditvi; invertni mikroskop. Merilce: 10  $\mu$ m.

Po štirih tednih gojenja smo že s prostim očesom opazili razlike med kulturami urotelijskih celic, ki so rasle v različnih hranilnih medijih (Slika 2). Pri kulturah s hranilnima medijema UroM (+Ca<sup>2+</sup>+S) in UroM (-Ca<sup>2+</sup>+S) smo opazili večskladne skupke celic, podobne tistim v hiperplastičnih urotelijih. Pri kulturah s hranilnim medijem UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S) pa skozi celotni čas opazovanja (3 mesece) takšnih hiperplazij nismo opazili.



Slika 2 a-c: Tri mesece stare kulture prašičjih urotelijskih celic (VII. pasaža), slikane z digitalnim fotoaparatom (zgoraj) in z digitalnim fotoaparatom skozi invertni mikroskop (spodaj). S puščicami so označeni hiperplastični predeli. Merilce: zgoraj 0,5 cm, spodaj 50  $\mu\text{m}$ .

Da bi ugotovili, ali serum (FBS) povzroča hitrejšo delitev celic, smo naredili dodaten poskus (3.8.1), kjer smo prašičje urotelijske celice VII. pasaže z gostoto  $10^5$  celic/ $\text{cm}^2$  nasadili na večprekatne petrijevke. Sedem dni smo polovici poroznih membran dodajali medij s serumom UroM (-Ca<sup>2+</sup>+S), drugi polovici pa medij brez seruma UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S). Nato smo obarvali jedra z DAPI (glej 3.6.1) in s fluorescenčnim mikroskopom (Nikon) slikali deset naključnih vidnih polj s celicami, ki so bile v hranilnem mediju s serumom, in deset vidnih polj s celicami brez seruma. Če vsaki celici pripišemo eno jedro, lahko iz števila prešteti jeter ugotovimo število celic. S primerjanjem števila jeder oz. celic smo ugotovili, da serum pospešuje delitve celic, ki jih na površini kulture opazimo kot hiperplazijo.

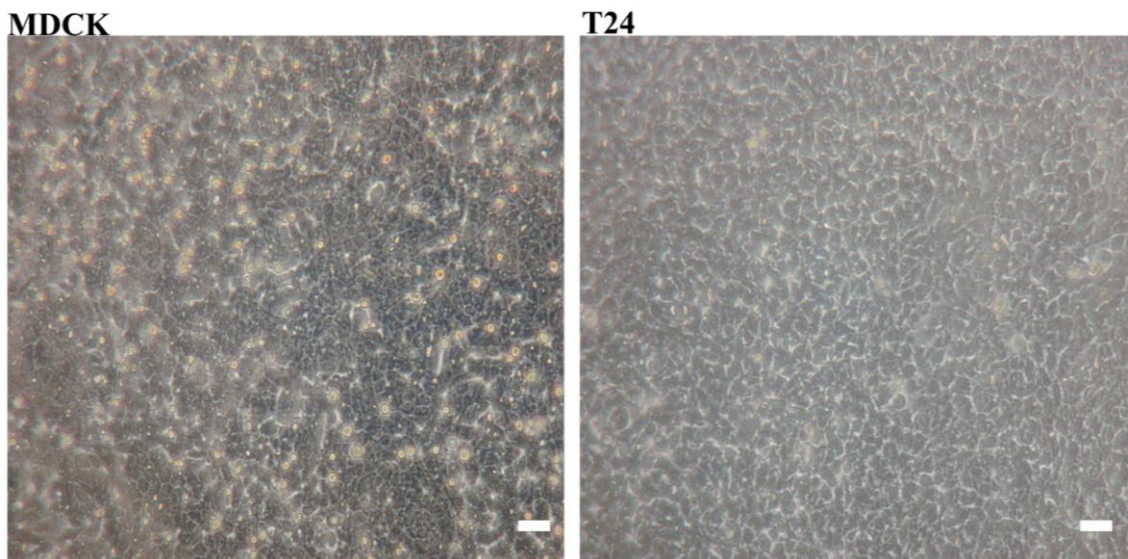


Graf 1: Število celičnih jeder, prešteti v vidnem polju pri kulturi prašičjih urotelijskih celic s hranilnim medijem UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S) in UroM (-Ca<sup>2+</sup>+S) ter SE. Število jeder v vidnem polju pri UroM (-Ca<sup>2+</sup>+S) in UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S) je statistično različno (\* p < 0,001; Studentov t-test).

Z invertnim mikroskopom smo opazili tudi razlike med stiki celičnih membran. Pri urotelijskih celicah, ki so imele hranilni medij s serumom, smo jasno videli stike med celicami, pri celicah brez seruma pa so stiki postali nejasni. Zabrisani stiki med apikalnimi plazmalemami nakazujejo nastanek tesnih stikov med celicami.

#### 4.1.2 Trajni celični liniji celic MDCK in T24

Kulture celic MDCK in T24 so bile nasajene na porozne membrane velikosti  $0,9 \text{ cm}^2$  z nasaditveno gostoto  $10^5$  celic/ $\text{cm}^2$ , saj so bile namenjene merjenju transepitelijske upornosti. Pri teh celicah skozi celotni čas izvajanja poskusa (2 meseca) nismo opazili hiperplazij, stiki med celicami pa so bili jasno vidni.



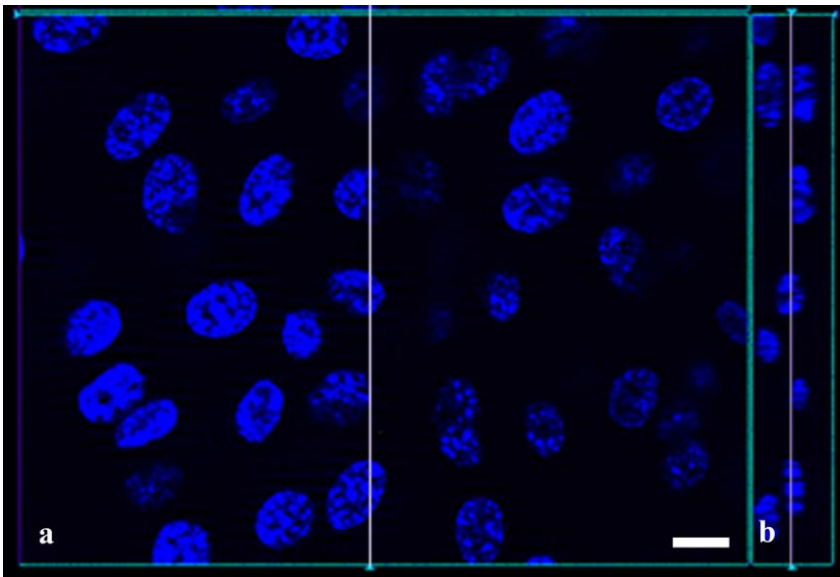
Slika 3: Dva meseca stari celični kulturi celic MDCK in T24 pod invertnim mikroskopom. Merilce:  $50 \mu\text{m}$ .

## 4.2 IMUNOFLUORESCENTNO OZNAČEVANJE

Na tri tedne starih prašičjih urotelijskih celic IX. pasaže, nasajenih na 8-prekatna stekelca in porozne membrane s površino 4,2 cm<sup>2</sup>, smo izvedli imunofluorescentno označevanje uroplakinov, GA,  $\alpha$ -tubulina, aktina, CK7, CK20, E-kadherina in okludina.

### 4.2.1 Fluorescenca kromatina

Fluorescentno označen kromatin nam je pokazal lokacije celičnih jeder v kulturi. S fluorescenčnim mikroskopom *Axiomager.Z1* in *ApoTomom* smo analizirali prečni prerez kulture urotelijskih celic IX. pasaže. Ugotovili smo, da je bila celična kultura v UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S) po dveh tednih gojenja najpogosteje sestavljena iz dveh skladov celic, redkeje pa iz treh skladov celic. V hranilnih medijih UroM (+Ca<sup>2+</sup>+S) in UroM (-Ca<sup>2+</sup>+S) smo opazili hiperplastične predele iz več skladov celic.

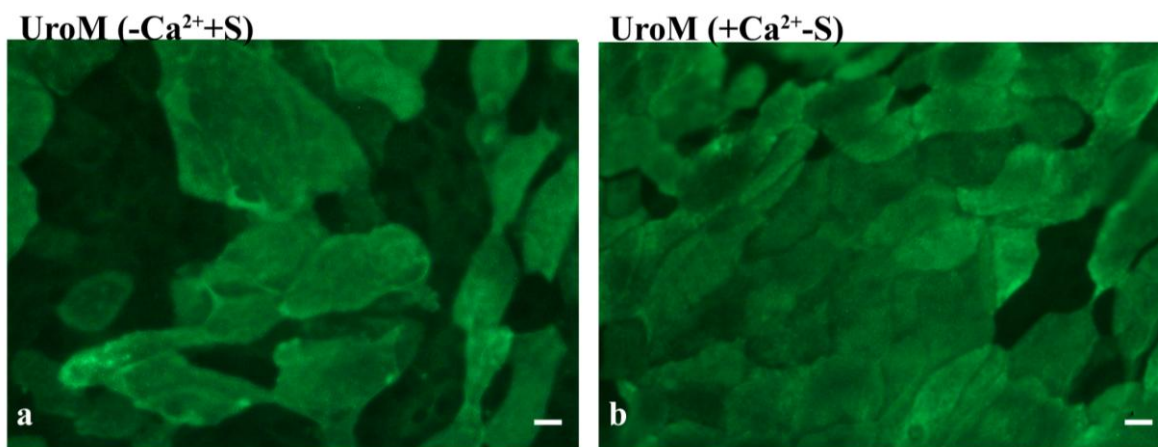


Slika 4 (a-b): Fluorescentno označena jedra v celični kulturi v UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S). **a)** Fluorescentno označena jedra urotelijskih celic (IX. pasaža). Bela črta prikazuje mesto prečnega prereza na Sliki b. **b)** Prečni prerez fluorescentno označenih jeder v kulturi prašičjih urotelijskih celic. Merilce: 10  $\mu$ m.

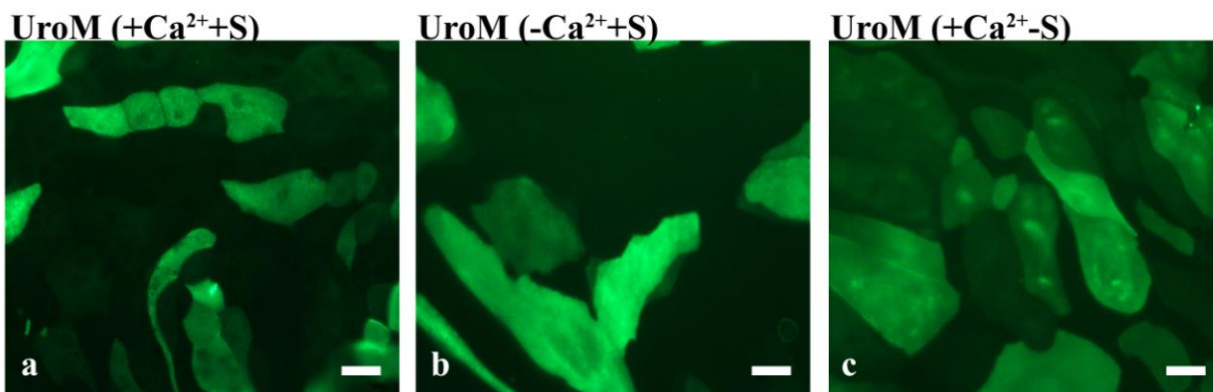


#### 4.2.2 Imunofluorescenca uroplakinov

Protitelesa proti uroplakinom so označila uroplakine v apikalni plazmalemi urotelijskih celic v površinskem skladu. Med celicami, ki so imele uroplakine v apikalni plazmalemi, so bila področja, kjer je bila reakcija proti uroplakinom imunofluorescenčno negativna. V sekundarni kulturi prašičjih urotelijskih celic smo pri VII. pasaži opazili večjo prisotnost uroplakinov v površinskih celicah kot pri IX. pasaži, kjer se je prisotnost uroplakinov vidno zmanjšala.

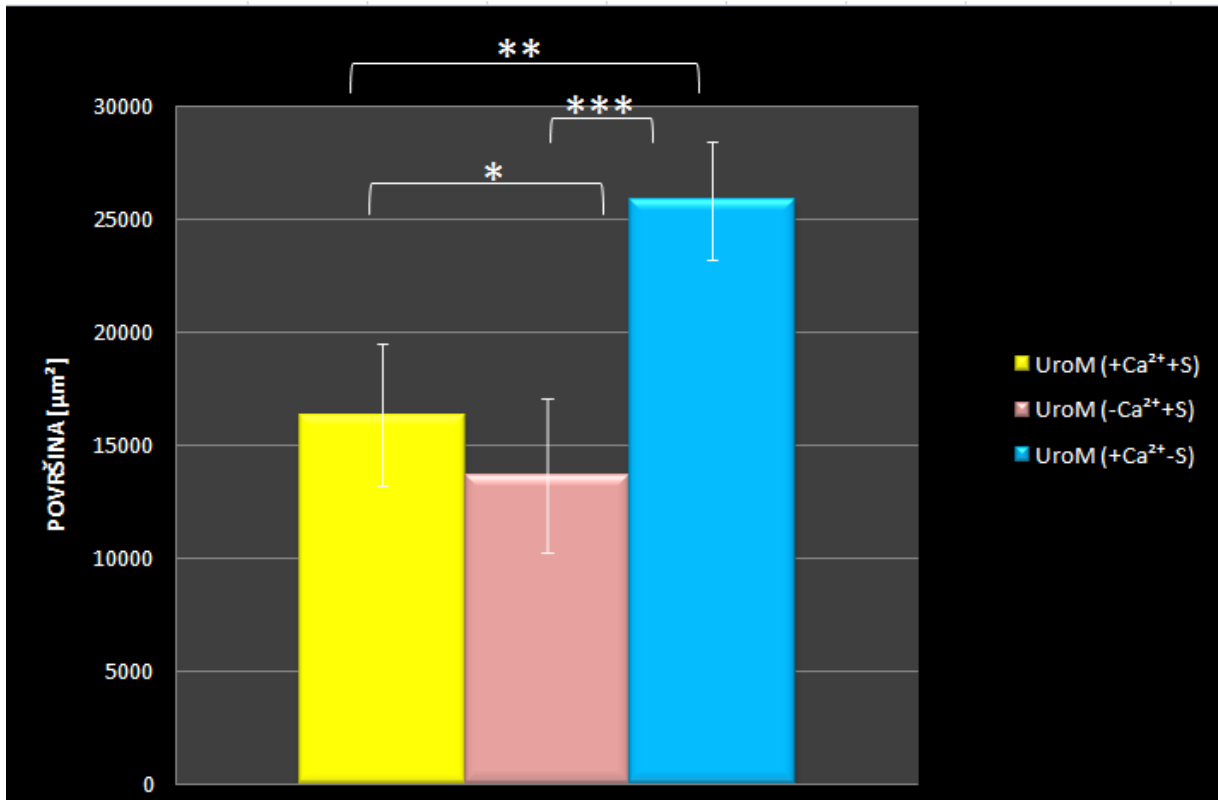


Slika 5 a-b: Imunofluorescenca uroplakinov (zeleno) sekundarne kulture prašičjih urotelijskih celic VII. pasaže. **a)** Vidno polje z uroplakini urotelijskih celic s hranilnim medijem UroM (-Ca<sup>2+</sup>+S). **b)** Vidno polje z uroplakini urotelijskih celic s hranilnim medijem UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S). Površina, pokrita z uroplakini, je pri urotelijskih celicah z UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S) večja kot površina pri celicah z UroM (-Ca<sup>2+</sup>+S). Merilce: 15  $\mu$ m.



Slika 6: Imunofluorescenca uroplakinov (zeleno) v kulturi prašičjih urotelijskih celic IX. pasaže, posneta s fluorescenčnim mikroskopom (Nikon). **a**) Imunofluorescentno označeni uroplakini v celicah z UroM (+Ca<sup>2+</sup>+S). Uroplakini so prisotni le v nekaj posameznih celicah. **b**) Uroplakini v celicah z UroM (-Ca<sup>2+</sup>+S). **c**) Imunofluorescentno označeni uroplakini v celicah z UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S). Površina z uroplakini v apikalni plazmalemi je večja v hranilnem mediju UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S) kot v medijih z UroM (+Ca<sup>2+</sup>+S) in UroM (-Ca<sup>2+</sup>+S). Merilce: 25µm.

Med različnimi hranilnimi mediji smo opazili razlike v velikosti površine, ki je bila imunofluorescentno pozitivna proti uroplakinom. Da bi videno dokazali, smo naključno izbrane slike podrobneje analizirali. Prisotnost uroplakinov v prašičjih urotelijskih celicah IX. pasaže smo izmerili, kot je opisano v 3.8.2. Vsako vidno polje je imelo površino 74050 µm<sup>2</sup>. Največjo izmerjeno povprečno površino (25873,5 ± 2609,7 µm<sup>2</sup>) s prisotnimi uroplakini so imele urotelijske celice, ki so rasle v hranilnem mediju UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S). Izmerjena površina z uroplakini je bila statistično različna od površine, izmerjene pri celicah z ostalima hranilnima medijema pri tveganju p < 0,05 (Studentnov t-test). Celice v UroM (+Ca<sup>2+</sup>+S) in UroM (-Ca<sup>2+</sup>+S) so imele manjšo površino z uroplakini. Med povprečnimi površinami uroplakinov v apikalni plazmalemi, kjer smo uporabili UroM (+Ca<sup>2+</sup>+S) in UroM (-Ca<sup>2+</sup>+S), ni statistično značilne razlike (Studentnov t-test).

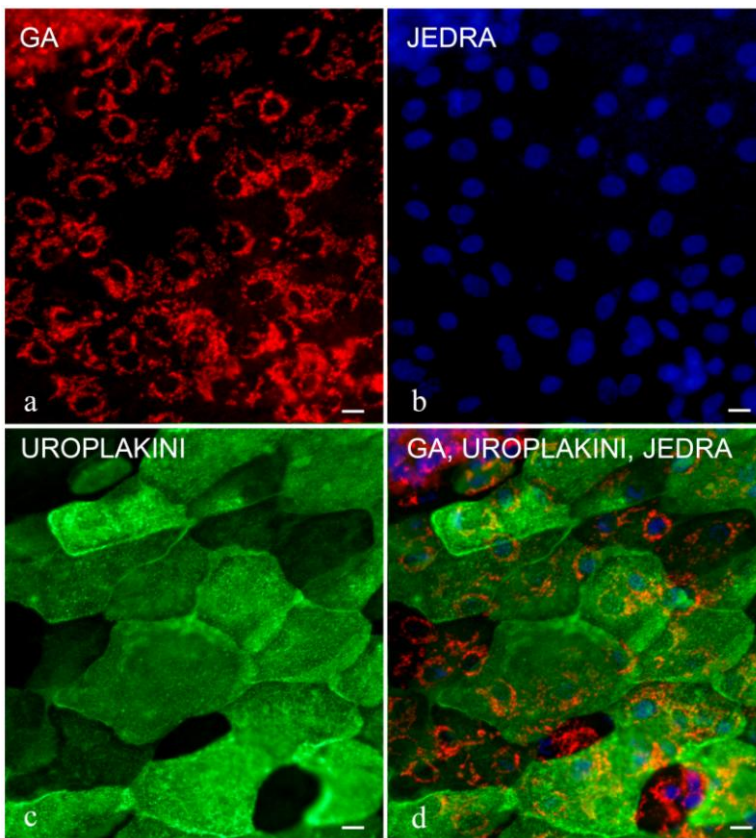


Graf 2: Povprečna površina prašičjih urotelijskih celic IX. pasaže z uroplakini v apikalni plazmalemi. Pri vsakem mediju je prikazana povprečna pokritost 74050 μm<sup>2</sup> velike površine (velikost enega vidnega polja) z uroplakini ter SE. Največjo površino z uroplakini v apikalni plazmalemi so imele celice, ki so bile v UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S). Celice v UroM (+Ca<sup>2+</sup>+S) in UroM (-Ca<sup>2+</sup>+S) so imele manj uroplakinov v apikalni plazmalemi (Studentov t-test) kot tiste v UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S). Med površino uroplakinov v apikalni plazmalemi celic v UroM (-Ca<sup>2+</sup>+S) in UroM (+Ca<sup>2+</sup>+S) ni signifikantne razlike. Pri vseh hranilnih medijih je bila povprečna pokritost vidnega polja manj kot 50 %. Rezultati meritev in opisna statistika so v Prilogi A. N = 30.

Legenda: \* p > 0,05 (ni signifikantne razlike); \*\* p < 0,05; \*\*\* p < 0,005 (Studentov t-test).

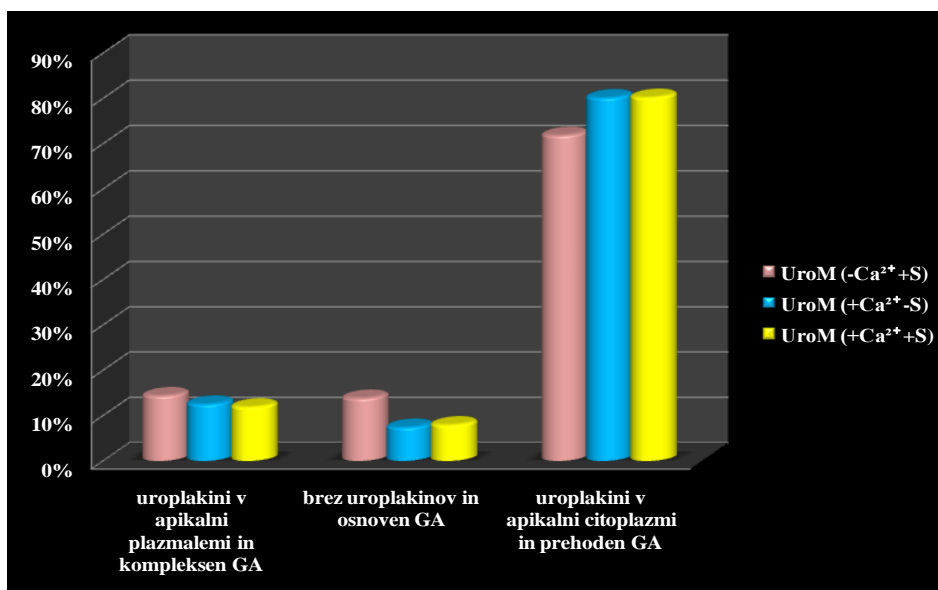
### 4.2.3 Imunofluorescenca GA in uroplakinov

GA je bil jasno viden pri vseh prašičjih urotelijskih celicah, ne glede na vrsto medija, v katerem so celice rastle. V sekundarni kulturi prašičjih urotelijskih celic VII. in IX. pasaže smo opazili vse oblike GA: od osnovnega preko prehodnega do kompleksnega. Osnovni GA je iz malega števila večjih cistern, ki so tesno ob jedru, prehodni GA gradi več cistern, razporejenih v citoplazmi celic, kompleksni GA pa je iz velikega števila majhnih cistern, ki so razporejene v celotni citoplazmi celic. Uroplakini niso bili prisotni v apikalni plazmalemi vseh površinskih celic, opazili pa jih nismo niti v bazalnih niti v vmesnih celicah. Prisotni so bili le v visoko diferenciranih površinskih celicah s kompleksnim GA.



Slika 7 a-d: Imunofluorescenca GA, uroplakinov in jeder celic v kulturah prašičjih urotelijskih celic VII. pasaže; fluorescenčni mikroskop (Nikon). **a)** Imunofluorescentno označen protein GM130 v GA. **b)** Fluorescentno označen kromatin v jedru celic. **c)** Imunofluorescentno označeni uroplakini v visoko diferenciranih površinskih celicah. Prazna območja so uroplakin-negativna. **d)** Združene slike a, b, in c. Merilce: 10µm.

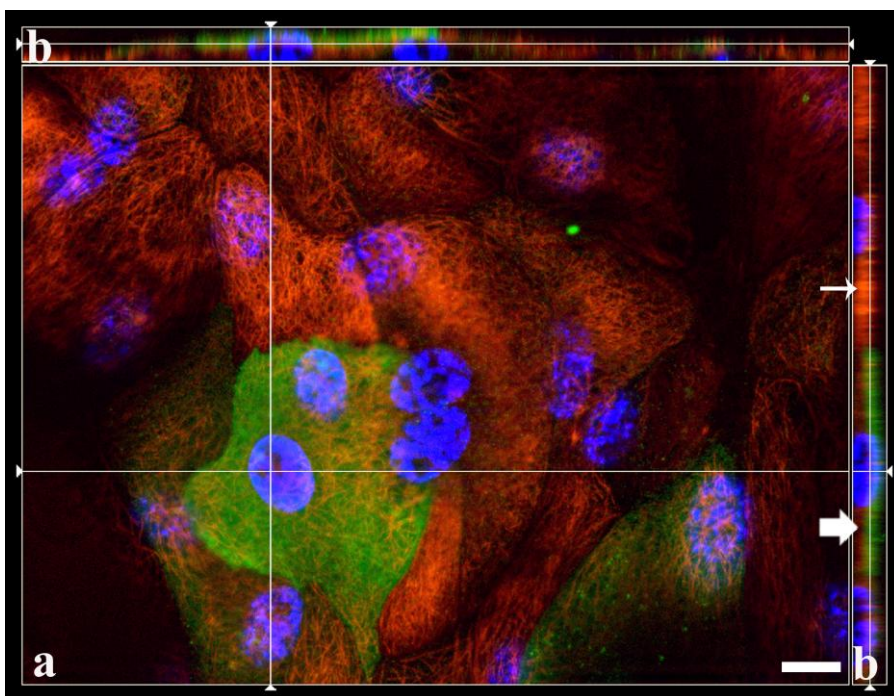
Med opazovanjem oblike in razporeditve GA v površinskih celicah z uroplakini v apikalni plazmalemni smo opazili, da GA zavzame vedno le kompleksno obliko. Da bi ugotovili, ali sta oblika in razporejanje GA enaka pri vseh urotelijskih celicah, smo slike podrobneje analizirali. Iz analize slik (glej 3.8.3) površinskih celic smo ugotovili, da je v celicah z uroplakini v apikalni plazmalemni GA vedno zgrajen kompleksno. V površinskih celicah, kjer uroplakinov v apikalni plazmalemni še ni bilo, je bil GA prehodne oblike, male celice brez uroplakinov pa so imele GA osnovne oblike. Skupaj smo pregledali 559 celic. Primerjali smo tudi obliko GA glede na prisotnost oz. odsotnost uroplakinov v apikalni plazmalemni glede na različne hranilne medije. V vseh hranilnih medijih je bila najpogostejša prehodna oblika GA, kjer so bili uroplakini v apikalni citoplazmi površinskih celic. Celice s prehodnim GA torej v apikalni plazmalemni še niso imele uroplakinov. V vseh hranilnih medijih skupaj je bilo 54 površinskih celic brez uroplakinov in z osnovno obliko GA, kar predstavlja 9,7 % vseh pregledanih celic. Prav tako je imelo samo 12,9 % pregledanih celic uroplakine v apikalni plazmalemni in kompleksni GA, saj je večina celic (77,4 %) imela uroplakine v apikalni citoplazmi in prehodni GA.



Graf 3: Odvisnost med znotrajcelično lokalizacijo uroplakinov in obliko GA. Največ površinskih urotelijskih celic *in vitro* je imelo uroplakine v apikalni citoplazmi in prehodni GA. Najmanj je bilo celic brez uroplakinov in z osnovnim GA. N = 559. Rezultati meritev so v Prilogi B.

#### 4.2.4 Imunofluorescenca $\alpha$ -tubulina in uroplakinov

Z imunofluorescentnim označevanjem smo dokazali prisotnost  $\alpha$ -tubulina v vseh celicah, ne glede na prisotnost uroplakinov v apikalni plazmalemi površinskih celic. Pri opazovanju razporeditve  $\alpha$ -tubulina v celicah z in brez uroplakinov v apikalni plazmalemi smo opazili, da je intenziteta fluorescence  $\alpha$ -tubulina v celicah z uroplakini v apikalni plazmalemi šibkejša kot pri celicah brez uroplakinov v apikalni plazmalemi (Slika 9).



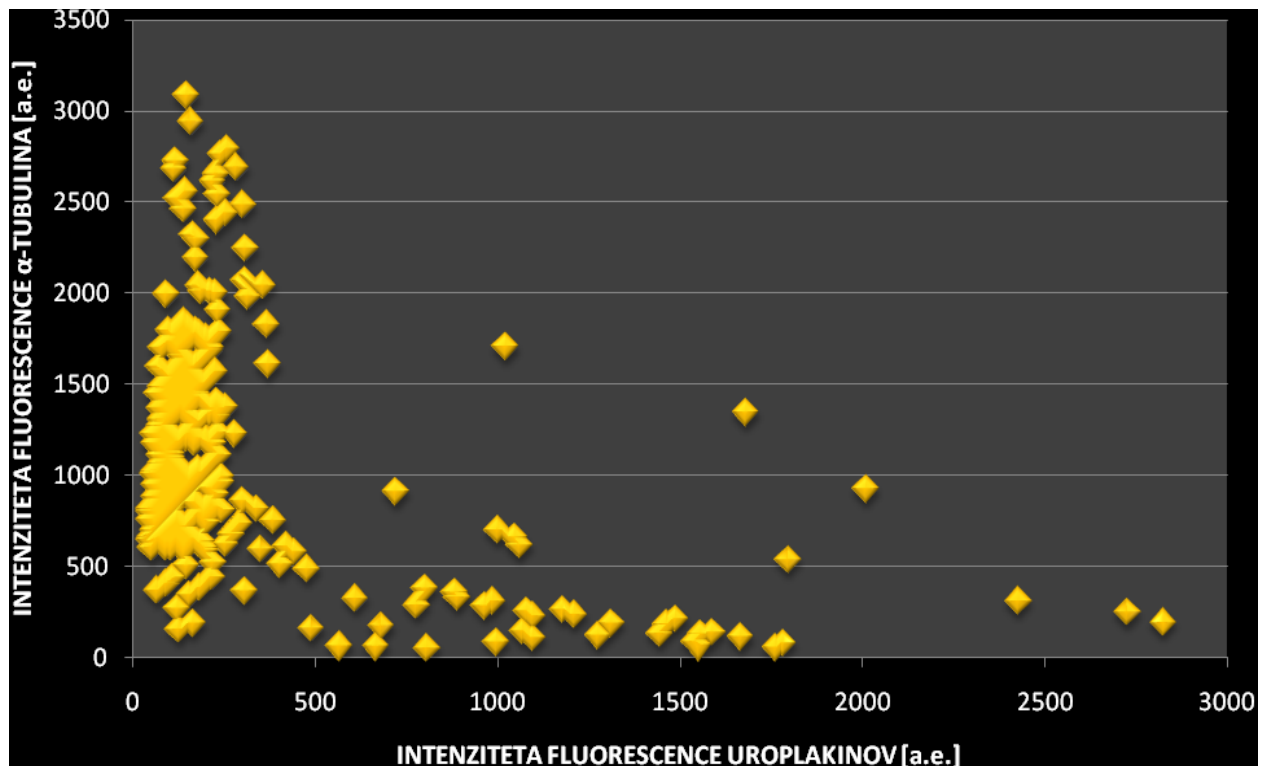
Slika 8 a-b: **a)** Kultura površinskih prašičjih urotelijskih celic IX. pasaže z imunofluorescentno označenimi uroplakini,  $\alpha$ -tubulinom in jedri celic. Beli črti prikazujeta mesti prečnega prereza. **b)** Prečni prerez fluorescentno označenih uroplakinov,  $\alpha$ -tubulina in jeder celic.  $\alpha$ -tubulin ima močnejšo fluorescenco v celicah brez uroplakinov v apikalni plazmalemi. Legenda: debela puščica –  $\alpha$ -tubulin v celici z uroplakini v apikalni plazmalemi; tanka puščica –  $\alpha$ -tubulin v celici brez uroplakinov v apikalni plazmalemi; rdeče –  $\alpha$ -tubulin, zeleno – uroplakini, modro – jedra. Merilce: 10  $\mu$ m.

Z merjenjem intenzitete fluorescence (glej 3.8.4) smo zmanjšano intenziteto fluorescence  $\alpha$ -tubulina pri površinskih urotelijskih celicah z uroplakini v apikalni plazmalemi tudi dokazali. V površinskih urotelijskih celicah z uroplakini v apikalni plazmalemi je bila največja intenziteta fluorescence  $\alpha$ -tubulina ( $413,194786 \pm 117,168124$  a.e.) signifikantno nižja ( $p < 0,001$ ) kot v površinskih urotelijskih celicah brez uroplakinov v apikalni plazmalemi, kjer je bila najmočnejša intenziteta fluorescence  $\alpha$ -tubulina ( $1438,12262 \pm 68,38840358$  a.e.). Meritve in opisna statistika so v Prilogi C.

V optični ravnini v apikalni plazmalemi površinskih urotelijskih celic, kjer so bili prisotni uroplakini v apikalni plazmalemi in kjer je bila intenziteta fluorescence uroplakinov največja ( $1419,55 \pm 156,37$  a.e.), je bila intenziteta fluorescence  $\alpha$ -tubulina zelo nizka ( $254,14 \pm 67,57$  a.e.). Dve optični rezini nižje ( $0,48 \mu\text{m}$ ) se je intenziteta fluorescence  $\alpha$ -tubulina povečala ( $338 \pm 91,82$  a.e.), medtem ko se je intenziteta fluorescence uroplakinov zmanjšala ( $1271,843 \pm 133,06$  a.e.). Meritve in opisna statistika so v Prilogi D.

Pri celicah, ki niso imele vidnih uroplakinov v apikalni plazmalemi, smo najprej izmerili največjo intenziteto fluorescence  $\alpha$ -tubulina. Nato smo na isti osi Z izmerili še intenziteto fluorescence uroplakinov. Meritve smo ponovili tudi dve optični rezini ( $0,48 \mu\text{m}$ ) nad osjo Z. Ugotovili smo, da je na osi Z, kjer je intenziteta  $\alpha$ -tubulina največja ( $1438,12 \pm 68,39$  a.e.), intenziteta fluorescence uroplakinov zelo nizka ( $132,32 \pm 6,44$  a.e.). Dve optični rezini nad osjo Z se intenziteta fluorescence uroplakinov poveča ( $147,16 \pm 8,15$  a.e.), intenziteta fluorescence  $\alpha$ -tubulina pa zmanjša ( $1305,26 \pm 62,09$  a.e.).

Vse meritve intenzitete fluorescence  $\alpha$ -tubulina in uroplakinov smo prikazali na Grafu 4 ter ugotovili obratnosorazmerno odvisnost intenzitete fluorescence  $\alpha$ -tubulina in uroplakinov.

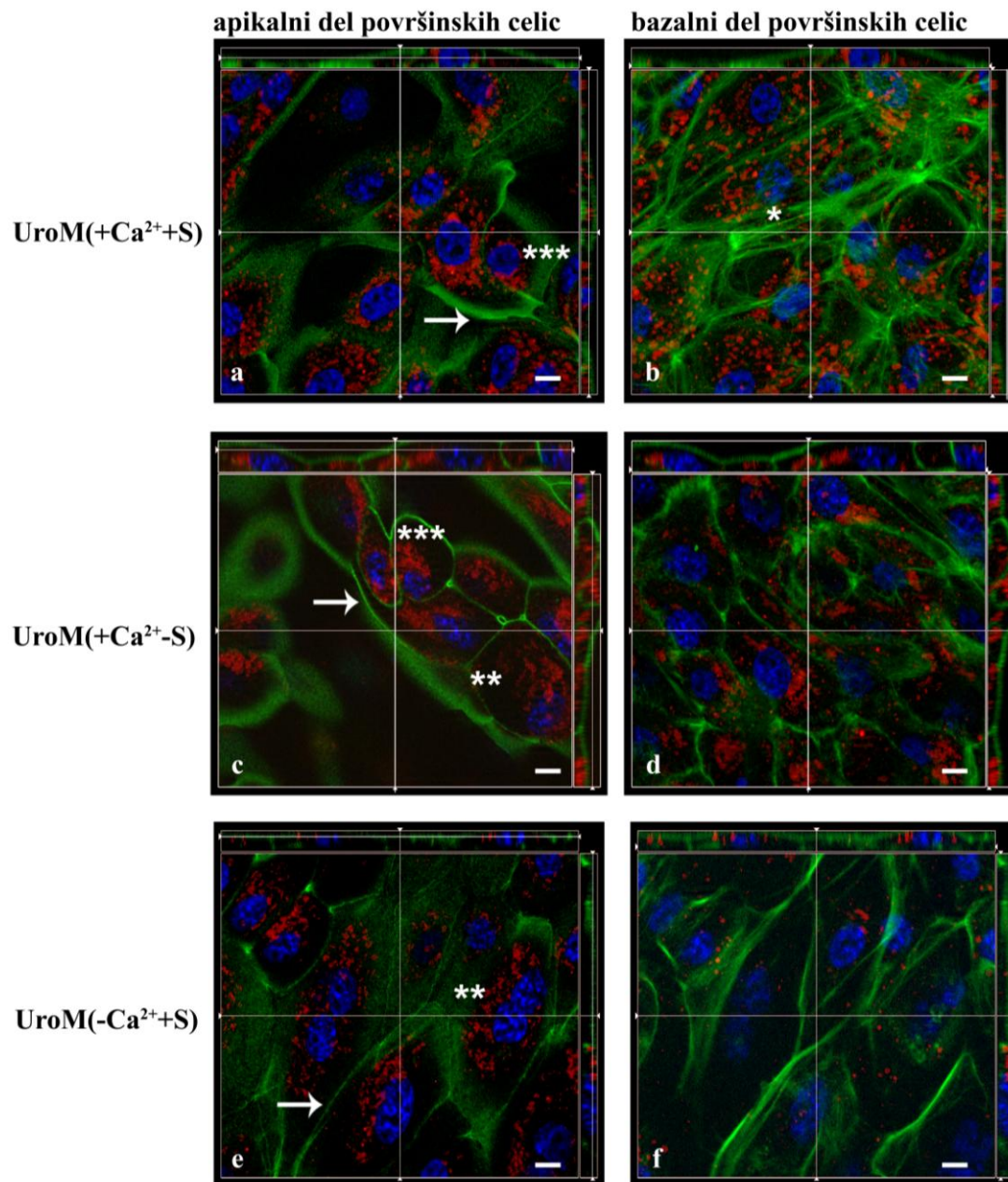


Graf 4: Razmerje intenzitete fluorescence med uroplakini in  $\alpha$ -tubulinom pri površinskih urotelijskih celicah. Intenziteta fluorescence  $\alpha$ -tubulina se s povečevanjem intenzitete fluorescence uroplakinov pri površinskih urotelijskih celicah zmanjšuje, z zmanjševanjem intenzitete fluorescence uroplakinov pa povečuje. Intenziteta fluorescence uroplakinov in intenziteta fluorescence  $\alpha$ -tubulina v površinskih urotelijskih celicah sta torej obratnosorazmerni. N = 338.

#### 4.2.5 Imunofluorescenca aktina in GA

Aktin je bil prisoten v vseh urotelijskih celicah IX. pasaže. Podrobneje smo analizirali prisotnost aktina v površinskih celicah (Slika 10). V apikalnem delu površinskih celic se je aktin nahajal ob lateralni plazmalemi, v bazalnem delu površinskih celic pa so bili prisotni aktinski filament, ki so se v nekaterih celicah razpredali po celotni bazalni citoplazmi, največkrat pa so bili skoncentrirani bolj ob robovih celic. Takšno razporeditev smo opazili pri vseh hranilnih medijih, tako po 14 kot 21 dnevih gojenja.



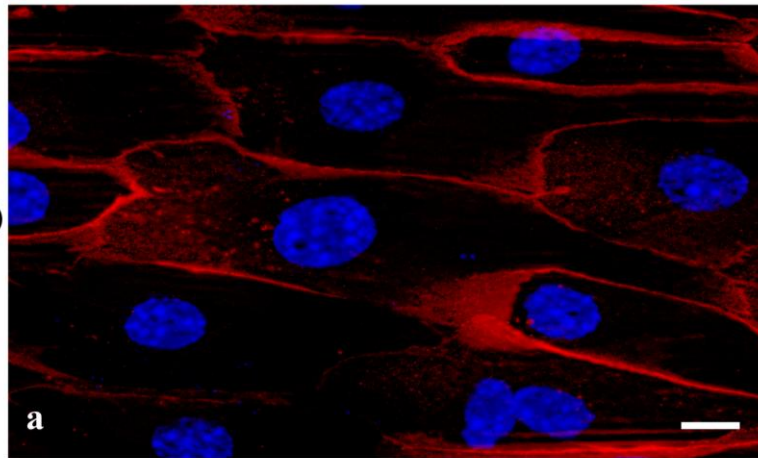


Slika 9 a-f: Primerjava razporeditve aktina in GA v apikalnem in bazalnem delu površinskih urotelijskih celic IX. pasaže po 14 dnevih v različnih hranilnih medijih. **a, c, e)** Aktin se v površinskih urotelijskih celicah v apikalnem delu celic nahaja ob lateralni membrani (puščice). GA je v velikih celicah kompleksno zgrajen (\*\*), v malo manjših celicah je v prehodni obliki (\*\*\*). **b, d, f)** V bazalnem delu celic so vidni aktinski filamenti (\*), ki se ponekod raztezajo po bazalnem delu citoplazme celic. Bele črte prikazujejo mesto prečnega prereza. Legenda: zeleno – aktin; rdeče – GA; modro – jedra. Merilce: 10  $\mu$ m.

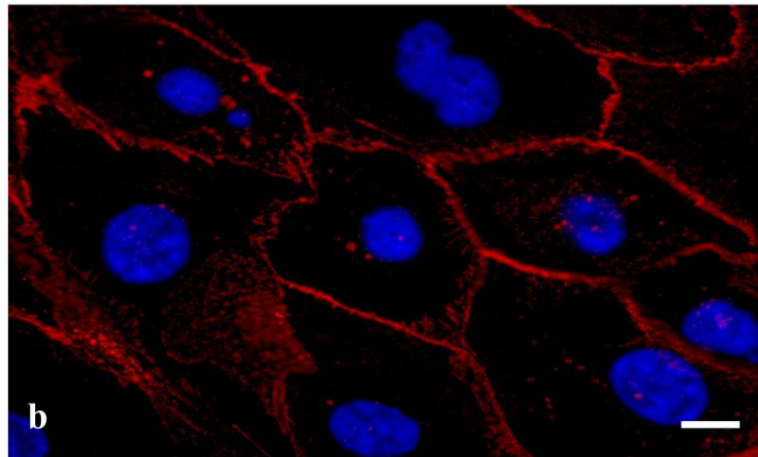
#### **4.2.6 Imunofluorescenca proteina adherentnih stikov E-kadherina**

E-kadherin je bil v vseh površinskih urotelijskih celicah IX. pasaže prisoten v sklenjenih linijah, ki so potekale vzdolž lateralne plazmaleme (Slika 11). Med hranilnimi mediji po 14 in 21 dnevih nismo opazili razlik v prisotnosti E-kadherina.

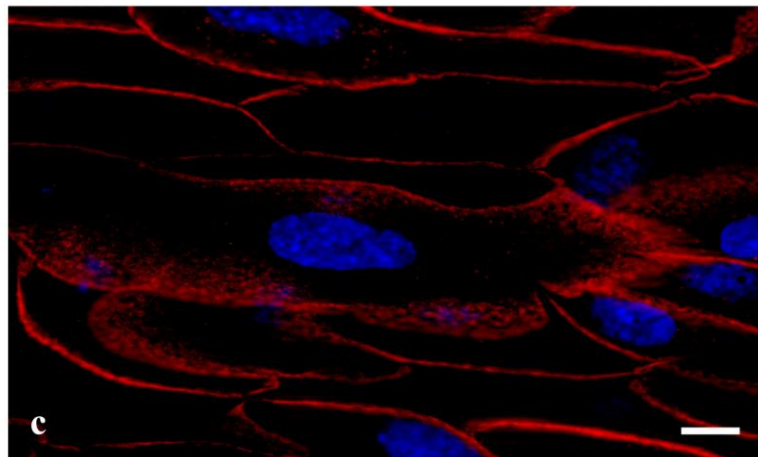
**UroM(+Ca<sup>2+</sup>+S)**



**UroM(-Ca<sup>2+</sup>+S)**



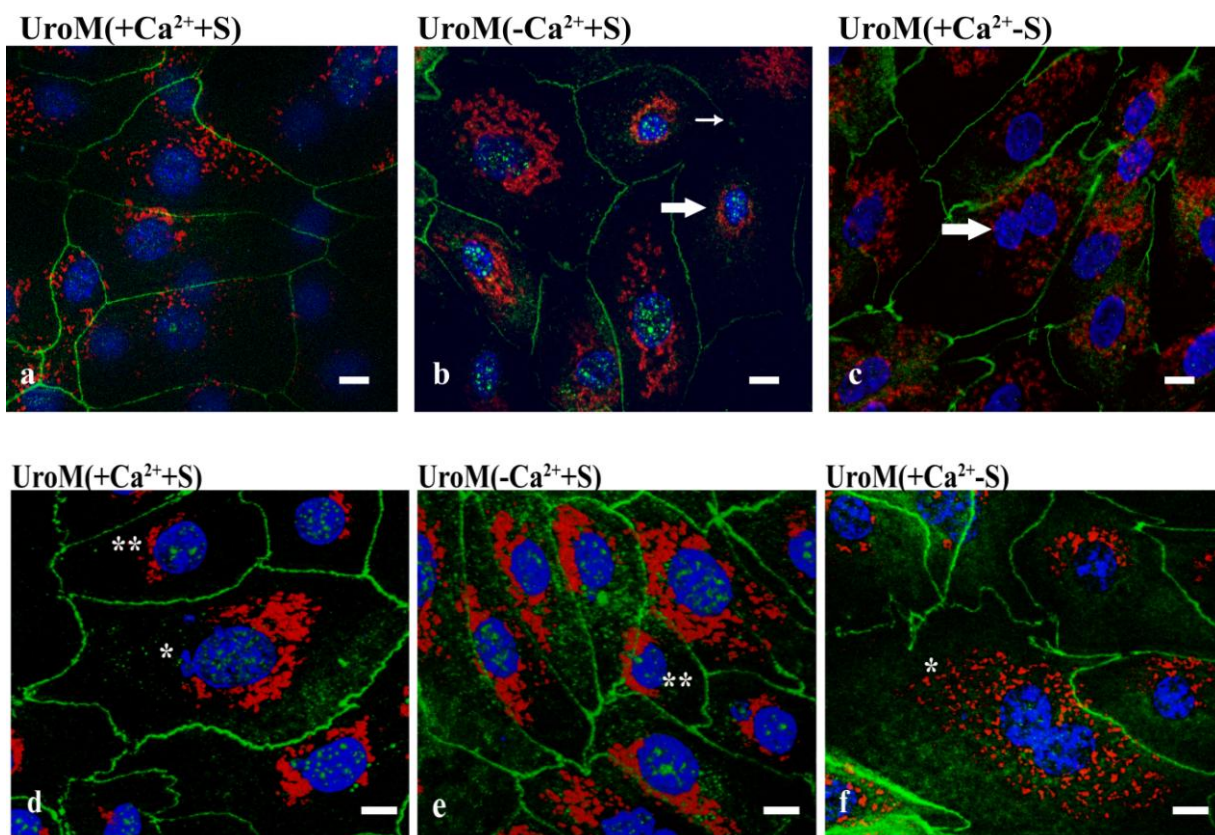
**UroM(+Ca<sup>2+</sup>-S)**



Slika 10 a-c: Imunofluorescenca proteina adherentnih stikov E-kadherina v prašičjih urotelijskih celicah IX. pasaže. Pri vseh celicah se E-kadherin nahaja neprekinjeno ob lateralni plazmalemi. Legenda: rdeče – E-kadherin; modro – jedra. Merilce: 10  $\mu$ m.

#### 4.2.7 Imunofluorescenca GA in proteina tesnih stikov – okludina

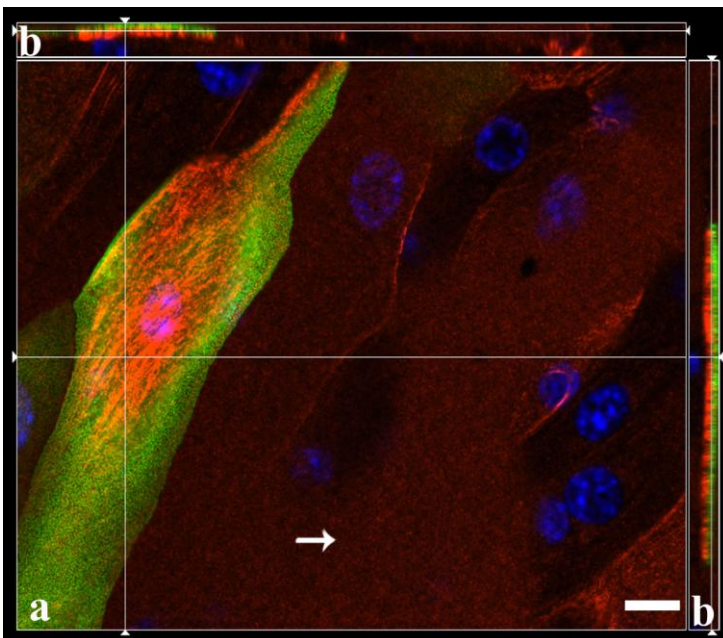
Okludin je bil viden v lateralni plazmalemi površinskih celic, kjer so tesni stiki. Pojavljal se je v sklenjeni liniji pri vseh površinskih urotelijskih celicah IX. pasaže, ki so bile razmeroma velike in ki so imele kompleksni GA. Mnoge so bile tudi večjedrne. V manjših celicah, kjer okludin ni bil v sklenjeni liniji, se je pojavljal osnovni ali prehodni GA. Pri vseh hranilnih medijih smo opazili različne velikosti površinskih celic. Razlik med tistimi celicami, ki so bile gojene 14 dni, in tistimi, ki so bile gojene 21 dni, nismo opazili.



Slika 11 a-f: Imunofluorescenca proteina tesnih stikov okludina ter GA v kulturi prašičjih urotelijskih celic IX. pasaže. **a-c)** Slikano s fluorescenčnim mikroskopom. **d-f)** 3D-model, narejen s pomočjo dodatka *ApoTome*. Površinske urotelijske celice so bile različnih velikosti. Večje celice so imele kompleksen GA ter sklenjeno linijo okludina, manjše celice pa prehodno ali osnovno obliko GA ter ponekod nesklenjeno linijo okludina. Legenda: velika puščica pri mediju UroM (-Ca<sup>2+</sup>+S) – osnovna oblika GA; mala puščica – prekinjena linija okludina; puščica pri mediju UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S) – dvojedrna celica s kompleksnim GA.; \* – velika celica s kompleksnim GA; \*\* – mala celica z osnovnim GA; zeleno – okludin; rdeče – GA; modro – jedra. Merilce: 10 μm.

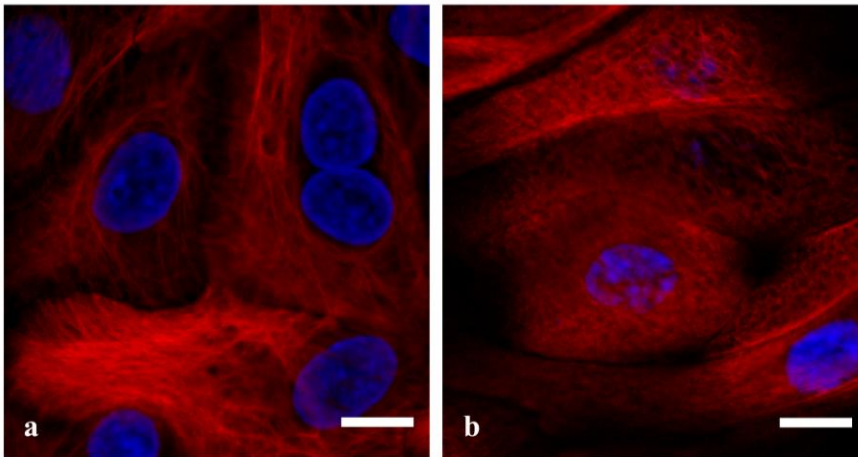
#### 4.2.8 Imunofluorescenca proteinov intermediarnih filamentov – citokeratinov 7 in 20 ter uroplakinov

S pomočjo imunofluorescence smo dokazali prisotnost citokeratina 7 v vseh površinskih prašičjih urotelijskih celicah, medtem ko so bile nekatere površinske celice negativne za citokeratin 20 (Slika 15). Največ celic s CK 20 je bilo pri mediju UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S), sledil je medij UroM (+Ca<sup>2+</sup>+S). Najmanj celic s CK 20 v apikalnem delu celice je bilo pri mediju UroM (-Ca<sup>2+</sup>+S). Razlik med 7- in 14-dnevnim tretiranjem z različnimi hranilnimi mediji nismo opazili. CK 20 je bil v nekaterih celicah prisoten v obliki filamentov in pik, v nekaterih celicah pa v obliki mreže (Slika 14). Citokeratinska mreža se je izoblikovala le v celicah, ki so bile visoko diferencirane. Visoko diferencirane površinske celice so imele v apikalni plazmalemi uroplakine ter tik pod njimi mrežo CK 20. Največ visoko diferenciranih celic smo opazili v UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S). Ne glede na hranilni medij sta bila CK 20 in CK 7 v bolj diferenciranih celicah v obliki mreže, v manj diferenciranih celicah pa v obliki filamentov (Sliki 14 in 15).

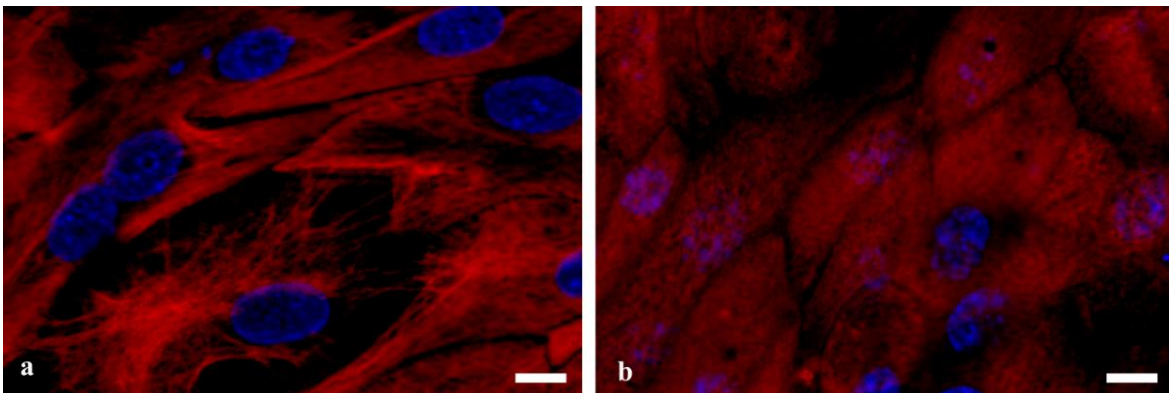


Slika 12 a-b: Supramolekularna organizacija CK 20 in uroplakinov v površinskih urotelijskih celicah. **a)** Imunofluorescenčna reakcija proti CK 20 v obliki pik v manj diferenciranih celicah (puščica) ter v obliki mreže

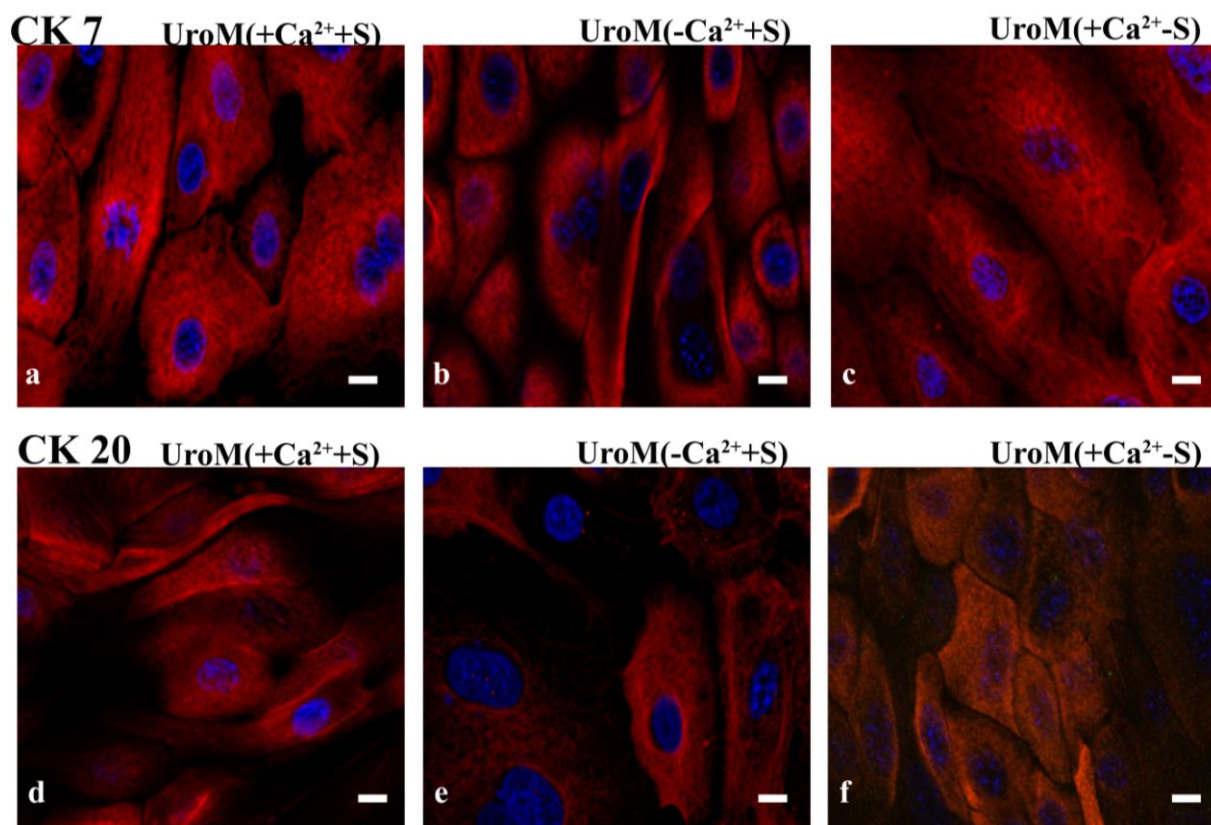
tik pod uroplakini, ki se nahajajo v apikalni plazmalemi velike površinske urotelijske celice. Bele črte prikazujejo mesto prečnega prereza. **b)** Prečni prerez prikazuje mrežo uroplakinov v apikalni plazmalemi visoko diferencirane površinske urotelijske celice ter pas CK 20 tik pod uroplakini. Legenda: rdeče – CK 20; zeleno – uroplakini; mordo – jedro. Merilce: 10  $\mu$ m.



Slika 13 a-b: Supramolekularna organizacija CK 20 v sekundarni kulturi prašičjih urotelijskih celic. **a)** Manj diferencirane celice s CK 20 v obliki filamentov. **b)** Visoko diferencirane celice s CK 20 v obliki citokeratinske mreže. Merilce: 10  $\mu$ m.



Slika 14 a-b: Supramolekularna organizacija CK 7 v sekundarni kulturi prašičjih urotelijskih celic. **a)** Manj diferencirane celice s CK 7 v obliki filamentov v apikalnem delu celice. **b)** Visoko diferencirane celice s CK 7 v obliki citokeratinske mreže. Merilce: 10  $\mu$ m.



Slika 15 a-f: Imunofluorescenca CK 7 in CK 20 v različnih medijih. CK 7 se pojavlja v vseh prašičjih urotelijskih celicah. CK 20 je viden v več oblikah: v filamentih in pikah se pojavlja v malo manj diferenciranih celicah, v visoko diferenciranih celicah pa ga najdemo v obliki citokeratinske mreže. Več celic s CK 20 v obliki mreže najdemo pri celicah, ki so rasle v UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S). Legenda: rdeče – CK 7 ali CK 20; modro – jedro. Merilce: 10  $\mu$ m.

#### 4.2.9 Imunofluorescenca vimentina in dezmina

S protitelesi proti vimentinu in dezminu smo želeli ugotoviti prisotnost fibroblastov in gladkomišičnih celic v sekundarni kulturi prašičjih urotelijskih celic. Rezultati imunofluorescence so bili pri obeh proteinih negativni, kar pomeni, da celična kultura ni vsebovala fibroblastov ali gladkomišičnih celic.

### 4.3 TRANSEPITELIJSKA UPORNOST (TER)

TER smo merili v celičnih kulturah na poroznih membranah velikosti  $0,9 \text{ cm}^2$ . Prva meritvev je bila opravljena, ko so celice dosegle konfluentno stanje. Merjenje je potekalo dva meseca vsak dan v sekundarni kulturi prašičjih urotelijskih celic MDCK in T24. Izmerjena TER ni dejanska upornost epitela, ki ga tvorijo celice v kulturi, saj upornost povzročata tudi membrana in medij. Zato smo pri vsaki meritvi odšteli upornost prazne membrane z medijem. Ugotovili smo, da je upornost praznih membran z različnimi mediji  $150 \pm 0,01 \text{ } \Omega\text{cm}^2$ .

#### 4.3.1. TER prašičjih urotelijskih celic

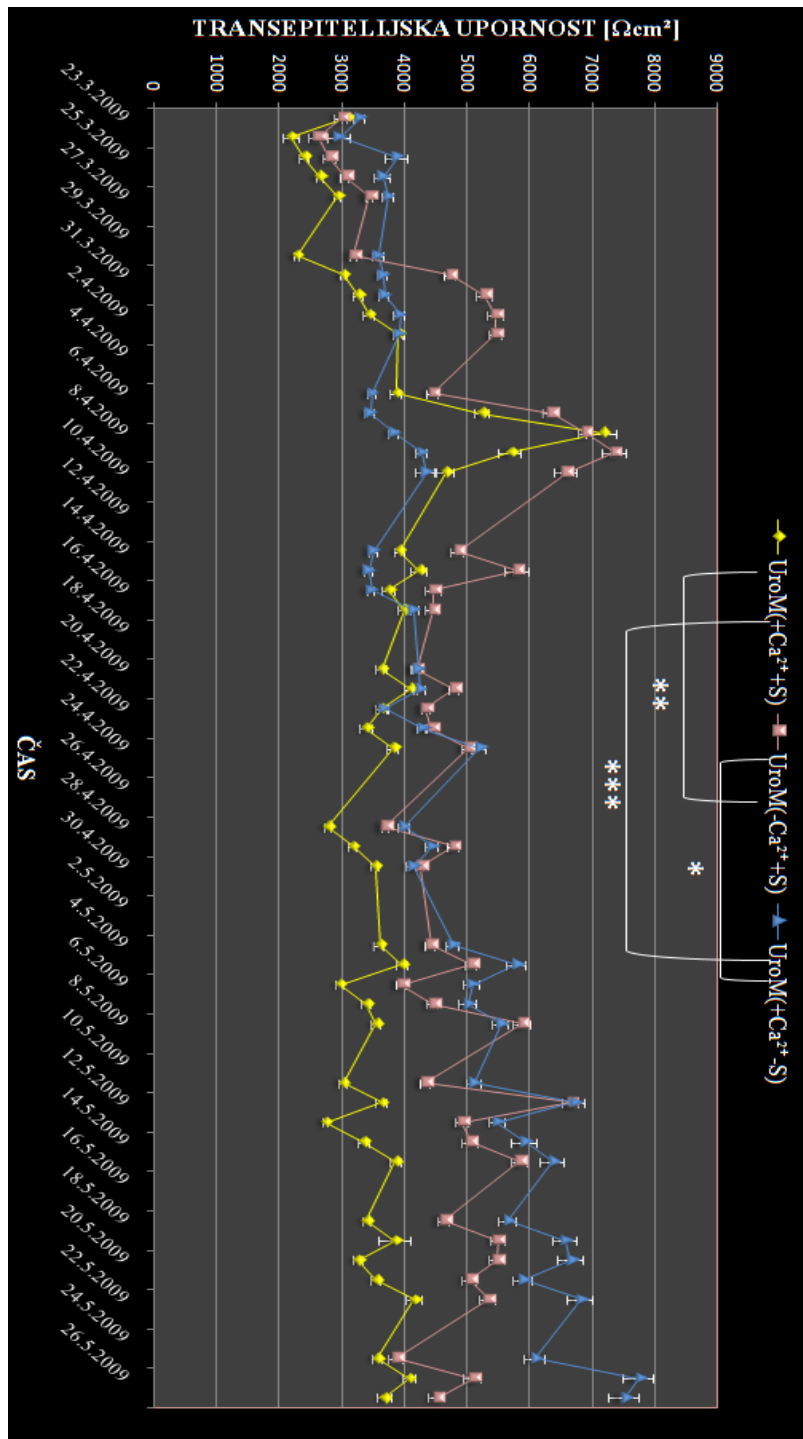
Prve meritve TER so bile izvedene ob doseženi konfluentnosti celic (23. 3. 2009). Izmerjena transepitelijska upornost je bila v povprečju okoli  $3000 \text{ } \Omega\text{cm}^2$  pri vseh urotelijskih celicah. Po prvih meritvah (23. 3. 2009) smo celice gojili v različnih hranilnih medijih ter z vsakodnevnimi meritvami opazovali spremembe transepitelijske upornosti. Kmalu po začetku merjenja TER je pričela upornost pri UroM ( $-\text{Ca}^{2+}+\text{S}$ ) in UroM ( $+\text{Ca}^{2+}+\text{S}$ ) rasti ter pri posameznih urotelijskih celicah dosegla vrednosti nad  $10000 \text{ } \Omega\text{cm}^2$ .

Pri vseh hranilnih medijih so vrednosti TER med meritvami nihale. Nihanja so bila najmanjša pri UroM ( $+\text{Ca}^{2+}-\text{S}$ ), kjer smo opazili tudi naraščanje TER. Največja nihanja so bila pri hranilnem mediju UroM ( $-\text{Ca}^{2+}+\text{S}$ ), kjer smo izmerili upornosti tudi nad  $12000 \text{ } \Omega\text{cm}^2$  in pod  $3000 \text{ } \Omega\text{cm}^2$ . Tako visoke upornosti so dosegle celice pri vseh hranilnih medijih, vendar so bile te dosežene vrednosti pri UroM ( $-\text{Ca}^{2+}+\text{S}$ ) in UroM ( $+\text{Ca}^{2+}+\text{S}$ ) kratkotrajne in le na celicah posameznih membran. Pri UroM ( $+\text{Ca}^{2+}-\text{S}$ ) smo opazili, da urotelijske celice dosežejo visoke vrednosti transepitelijske upornosti šele po daljšem času tretiranja s tem hranilnim medijem. Prav tako so vrednosti TER tako visoko ostale dlje časa.

Po začetnem porastu TER pri UroM ( $+\text{Ca}^{2+}+\text{S}$ ) so sledila manjša nihanja upornosti, ki med celotnim meritvenim časom ni presegla  $4500 \text{ } \Omega\text{cm}^2$ . Ob koncu meritev so imele te celice le malo višjo TER kot ob začetku meritev.

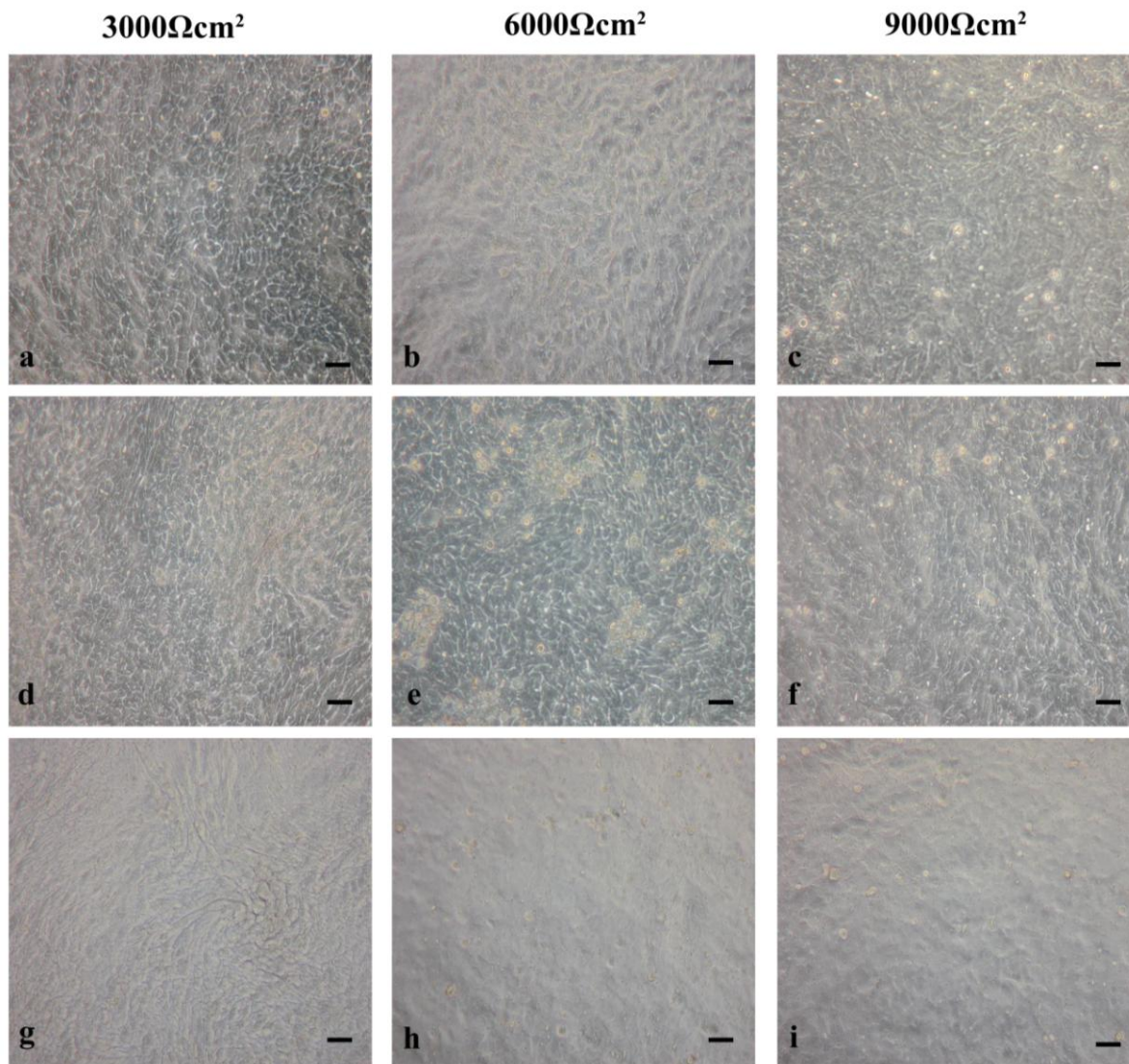


Kulturo urotelijskih celic smo ob določenih vrednostih TER (3000, 6000 in 9000  $\Omega\text{cm}^2$ ) tudi fotografirali (Slika 16). Opazili smo, da se morfologija urotelijskih celic ob določeni TER pri UroM (+Ca<sup>2+</sup>+S) in UroM (-Ca<sup>2+</sup>+S) zelo malo spremeni. Razlike smo opazili le med celičnimi stiki, ki so z višanjem TER postajali slabše vidni. Največjo spremembo smo opazili pri uporabi UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S), kjer so stiki med celicami postali skoraj nevidni.



Graf 5: Primerjava transepiteljske upornosti med prašičjimi urotelijskimi celicami IX. pasaže, ki so rasle v različnih hranilnih medijih. Ob konfluentnosti urotelijskih celic smo opravili prvo merjenje TER. Po prvem merjenju smo začeli dodajati različne hranilne medije ter nadaljevali z vsakodnevnimi merjenjem TER.

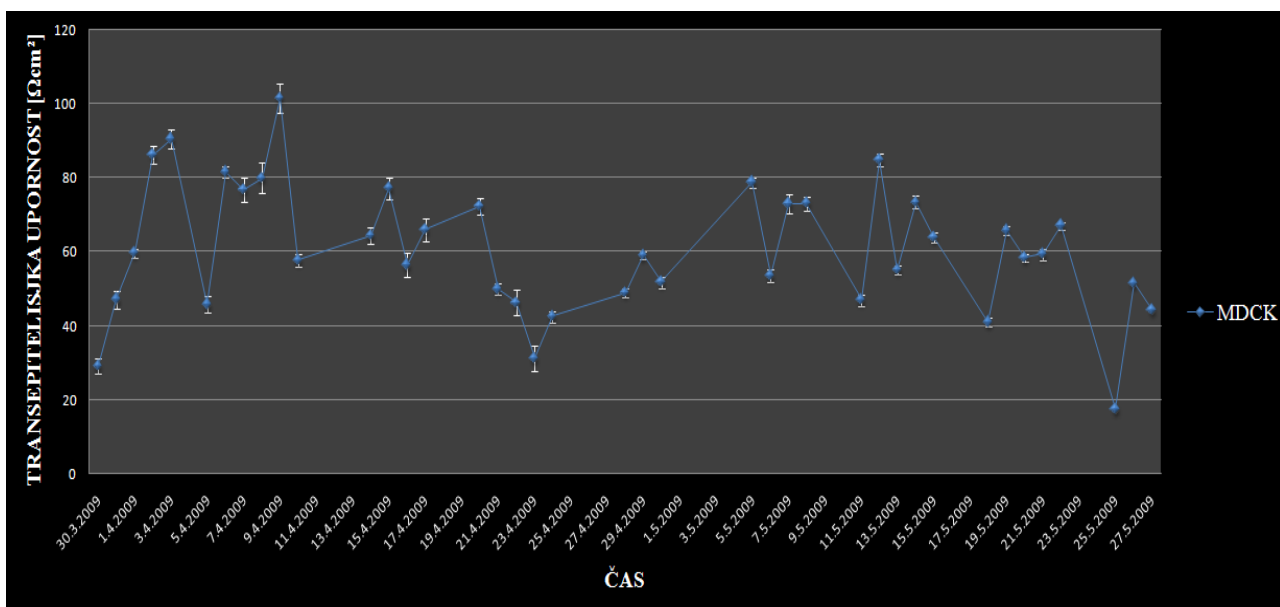
V doseženih vrednostih transepiteljske upornosti ob uporabi različnih hranilnih medijev je med UroM (+Ca<sup>2+</sup>+S) in UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S) ter UroM (+Ca<sup>2+</sup>+S) in UroM (-Ca<sup>2+</sup>+S) značilna statistična razlika (\*\*\*)  $p > 0,05$  (ni signifikantne razlike), \*\*  $p < 0,001$ ; \*  $p < 0,001$ ). N = 60. Rezultati meritev in opisna statistika so v prilogah E, F, G.



Slika 16 a-i: Kultura prašičjih urotelijskih celic IX. pasaže ob doseženi transepiteljski upornosti 3000, 6000 in 9000  $\Omega\text{cm}^2$ . **a-c)** Kultura prašičjih urotelijskih celic v UroM (+Ca<sup>2+</sup>+S). Celični stiki so jasno vidni pri vseh vrednostih TER. **d-f)** Sekundarna kultura prašičjih urotelijskih celic z UroM (-Ca<sup>2+</sup>+S) ob transepiteljski upornosti 3000, 6000 in 9000  $\Omega\text{cm}^2$ . Celični stiki so prav tako jasno vidni pri vseh vrednostih TER. **g-i)** Sekundarna kultura prašičjih urotelijskih celic z UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S) ob transepiteljski upornosti 3000, 6000 in 9000  $\Omega\text{cm}^2$ . Celični stiki so pri TER nad 3000  $\Omega\text{cm}^2$  težje opazni. Merilce: 50  $\mu\text{m}$ .

### 4.3.2 Transepitelijska upornost celic MDCK

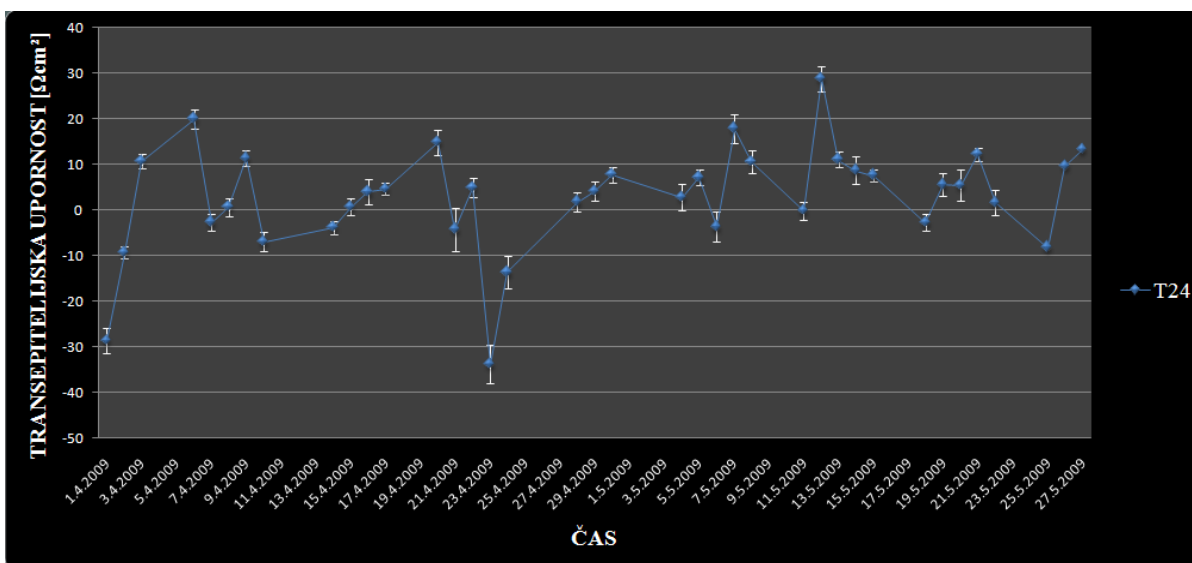
Celice MDCK niso dosegle visokih vrednosti transepitelijske upornosti. Ob konfluentnosti smo naredili prve meritve, katerih rezultati niso presegli  $30 \Omega\text{cm}^2$ . Sledila je hitra rast transepitelijske upornosti, ki pa je ves čas gojenja nihala. Najvišja dosežena upornost je bila  $101,5 \pm 37,7 \Omega\text{cm}^2$ . Končna vrednost TER je bila le malo višja kot začetna.



Graf 6: Transepitelijska upornost celic MDCK in SE. Celice MDCK so dosegale zelo nizko TER. Najvišja TER je bila dosežena v prvih štirinajstih dneh gojenja. N = 12. Rezultati meritev in opisna statistika so v Prilogi H.

### 4.3.3 Transepitelijska upornost celic T24

Trajna celična linija rakastih urotelijskih celic T24 je imela ves meritveni čas zelo nizko TER. Ob odštevanju upornosti membrane z medijem ( $150 \pm 0,01 \Omega\text{cm}^2$ ) smo mnogokrat dobili negativne rezultate. Celice T24 so dosegle najvišjo TER  $28,86 \pm 10,24 \Omega\text{cm}^2$ . Končna upornost je bila  $13,36 \pm 14 \Omega\text{cm}^2$ .



Graf 7: Transepitelijska upornost celic T24 ter SE. TER celic T24 je skozi ves meritveni čas dosegala zelo nizke vrednosti ter nekoliko nihala, nikoli pa ni preseгла  $40 \Omega\text{cm}^2$ .  $N = 12$ . Rezultati meritev in opisna statistika so v Prilogi I.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Namen našega dela je bil vzgojiti normalne urotelijske celice, ki se bodo v kulturi razvile v diferenciran urotelij s funkcionalno krvno–urinsko pregrado, in raziskati fiziološke in strukturne spremembe v urotelijskih celicah med diferenciacijo. Osredotočili smo se predvsem na površinske urotelijske celice, ki dosežejo najvišjo stopnjo diferenciacije. Zanimalo nas je tudi, kako na rast in diferenciacijo urotelijskih celic vplivata v hranilni medij dodana serum (FCS) in  $\text{Ca}^{2+}$ . Podrobneje smo raziskali prisotnost uroplakinov v apikalni plazmalem različno diferenciranih urotelijskih celicah ter ugotavljali prerazporejanje citoskeletnih elementov ( $\alpha$ -tubulina, aktina, CK 7 in CK 20) in preoblikovanje GA med diferenciacijo urotelijskih celic. Ugotovljali smo prisotnost medceličnih povezav (tesnih in adherentnih stikov) med površinskimi urotelijskimi celicami. Funkcionalnost tesnih stikov smo preverjali z merjenjem transepitelijske upornosti, ki smo jo primerjali s TER celic MDCK in T24.

Kulture prašičjih urotelijskih celic mnogokrat vsebujejo fibroblaste ali gladkomišične celice, ker jih pri izolaciji iz mehurja ne moremo popolnoma odstraniti. Zato smo v naši sekundarni kulturi urotelijskih celic ugotavljali prisotnost fibroblastov in gladkomišičnih celic. Z imunofluorescenčnim označevanjem smo dokazovali vimentin, ki bi razkril prisotnost fibroblastov, in dezmin, ki je prisoten v mišičnih celicah. Ugotovili smo, da celice niso vsebovale vimentina in dezmina, na osnovi česar sklepamo, da so bile kulture čiste populacije urotelijskih celic.

Imunofluorescentno označene proteine smo opazovali s fluorescenčnim mikroskopom. Pri raziskavah smo uporabili klasični fluorescenčni mikroskop (Nikon) ter fluorescenčni mikroskop *Axiomager.Z1* z dodatkom *ApoTome*. Ugotovili smo, da je fluorescenčni mikroskop *Axiomager.Z1* z dodatkom *ApoTome* pri študijah imunooznačevanja proteinov v uroteliju primernejši kot klasični fluorescenčni mikroskop, saj z njegovo uporabo dobimo slike z manj svetlobnega šuma, poleg tega pa omogoča tudi izdelavo 3D-modelov, ki dajejo natančnejšo informacijo o razporeditvi proteinov in celičnih organelov. Naši rezultati temeljijo na izdelanih 3D-modelih optičnih rezin. Poleg fluorescenčnih mikroskopov smo pri

opazovanju celic *in vitro* uporabljali tudi invertni mikroskop (*Leica DM IL*), vse s prostim očesom vidne spremembe pa smo slikali z digitalnim fotoaparatom (*Konica Minolta Dynax 5D*).

### **5.1.1 V hranilni medij dodani serum povečuje proliferacijo urotelijskih celic, $\text{Ca}^{2+}$ pa diferenciacijo**

Visok proliferacijski potencial urotelijskih celic se pokaže zlasti med obnovo poškodovanega urotelija, ko se bazalne celice hitro delijo in nadomeščajo med poškodbo izgubljene celice. Tudi *in vitro* humane urotelijske celice obdržijo visok potencial proliferacije (Southgate in sod., 1994, 1999). Kreftova in sod. (2002) so ugotovili, da je proliferacijski potencial urotelijskih celic v primarni celični kulturi eksplantata v prvih dneh po nasaditvi visok, kasneje pa se zmanjša, vendar se njegov diferenciacijski potencial kljub temu ohranja. Vzrok za zmanjšanje proliferacijskega potenciala in večanje diferenciacijskega potenciala je bil tudi dodani  $\text{Ca}^{2+}$  v hranilnem mediju. Tako so v enem tednu iz 2 mm<sup>2</sup> velikega eksplantata vzgojili prirastek velikosti 23 mm<sup>2</sup>, v treh tednih pa prirastek visoko diferenciranih urotelijskih celic, organiziranih v tri- do štiriskladen urotelij velikosti 43 mm<sup>2</sup>.

V raziskavi nismo ugotavljali, ali se proliferacijski potencial urotelijskih celic *in vitro* v primerjavi s celicami *in vivo* s časom manjša, ampak nas je zanimalo, kako na delitev celic vpliva v hranilni medij dodani serum ali  $\text{Ca}^{2+}$ . Iz našega poskusa, pri katerem smo uporabili hranilna medija s serumom (UroM (- $\text{Ca}^{2+}$ +S)) in s  $\text{Ca}^{2+}$  (UroM (+ $\text{Ca}^{2+}$ -S)), smo ugotovili, da serum poveča proliferacijo urotelijskih celic, medtem ko jo prisotnost kalcija upočasni. Ti rezultati podpirajo raziskave na humanih in mišjih urotelijskih celicah (Southgate in sod., 1994; Kreft in sod., 2002), kjer so prav tako prišli do zaključka, da zunajcelični  $\text{Ca}^{2+}$  upočasni delitev celic, omogoča nastanek triskladne kulture, medcelični stiki pa postanejo na svetlobno mikroskopskem nivoju nejasni. Te spremembe smo po treh mesecih že s prostim očesom opazili pri urotelijskih celicah, ki so rasle v hranilnih medijih z dodanim  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **5.1.2 Površinske urotelijske celice v kulturi dosežejo visoko stopnjo diferenciacije**

Specializirane površinske urotelijske celice imajo edinstveno morfologijo, antigene in ultrastrukturo, ki so specifični označevalci dokončne diferenciacije urotelijskih celic (Southgate in sod., 2002). Diferenciacija urotelijskih celic pri sesalcih poteka od nediferenciranih bazalnih celic preko vmesnih do visoko diferenciranih površinskih celic (Hicks, 1975). Zmožnost ustvariti celično kulturo normalnih epiteljskih celic iz tkiva omogoča boljše razumevanje celičnih procesov, kot sta proliferacija in diferenciacija celic.

Z imunofluorescenčno analizo kulture urotelijskih celic na nivoju svetlobne mikroskopije smo dokazali prisotnost uroplakinov, intermediarnih filamentov CK 20 in CK 7, aktina, razporejenega apikalno na lateralnih plazmalemah, kompleksnega GA, proteina adherentnih stikov E-kadherina in proteina tesnih stikov okcludina, ki so pomembni označevalci diferenciacije urotelijskih celic. Z merjenjem transepiteljske upornosti smo ugotovili večjo funkcionalnost tesnih stikov pri normalnih urotelijskih celicah kot pri normalnih ledvičnih celicah in rakastih urotelijskih celicah. Na osnovi rezultatov ugotavljamo, da urotelijske celice v sekundarni kulturi višje pasaže dosežejo visoko stopnjo diferenciacije.

### **5.1.3 Uroplakini so prisotni v apikalni plazmalemi visoko diferenciranih urotelijskih celic *in vitro***

V površinskih urotelijskih celicah se uroplakini močno izražajo in so prisotni v urotelijskih plakih, ki jih najdemo v odebeljenih delih apikalne plazmaleme in v fuziformnih veziklih (Romih s sod., 2002). Toda določanje prisotnosti uroplakinov v celici z imunofluorescentno metodo ne pove dosti o njihovi organizaciji v urotelijski plak (Sugasi s sod., 2000). Sama prisotnost uroplakinov v apikalni citoplazmi celic torej še ne pomeni dokončne diferenciacije, za katero so značilni vgrajeni uroplakini v apikalni plazmalemi. V slabo diferenciranih celicah bazalnega sklada se uroplakini ne izražajo in fuziformnih veziklov v citoplazmi ni. Bazalne celice zato ne prispevajo h krvno-urinski pregradi sečnega mehurja, temveč imajo vlogo pri delitvah (Lewis, 2000). O vlogi uroplakinov v apikalni plazmalemi je še mnogo neznanega.



Do sedaj so znanstveniki odkrili, da odsotnost UPIII v apikalni plazmalemi ne vpliva na transepitelijsko upornost (TER), ampak na permeabilnost celic (Hu in sod., 2002).

Glavna značilnost urotelijskih celic je torej oblikovanje specifične apikalne plazmaleme, ki jo sestavljajo v urotelijske plake urejeni transmembranski proteini, uroplakini. V naši kulturi urotelijskih celic IX. pasaže z različnimi hranilnimi mediji je bila imunofluorescentna reakcija proti uroplakinom, ki so jo sprožila protitelesa proti uroplakinom, šibkejša kot v kulturi VII. pasaže. Ne glede na vrsto hranilnega medija je manj kot polovica urotelijskih celic kulture IX. pasaže dosegla visoko stopnjo diferenciacije. Največ visoko diferenciranih celic je bilo pri uporabi UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S). Celice višjih pasaž so se torej sposobne manj diferencirati kot tiste v nižjih pasažah. Izgubljanje osnovnih lastnosti prašičjih urotelijskih celic z višanjem pasaž so opazili tudi Southgateova in sod., (1994). Menimo, da bi bila lahko vzroka nizke diferenciacije kulture urotelijskih celic IX. pasaže dva, in sicer 1.) visoka pasaža in 2.) hranilni medij z vseh strani celic. Zaradi prisotnosti hranilnega medija na dnu petrijevke in na porozni membrani so nutrienti iz medija prihajali tako do bazolateralnega kot apikalnega dela celic. Predvidevamo, da celice izgubijo orientacijo in ne vedo, kaj je spodaj in kaj zgoraj. V nadaljnjih raziskavah bi bilo treba hranilni medij dodati samo pod porozno membrano s celicami in ugotoviti, kakšno diferenciacijo bi dosegle urotelijske celice.

#### **5.1.4 Preoblikovanje in prerazporejanje GA med diferenciacijo urotelijskih celic *in vitro***

V sekundarni kulturi prašičjih urotelijskih celic smo potrdili izražanje dveh značilnih proteinov GA: proteina GM 130, ki se nahaja v cis-GA, in giantina, nameščenega v membranah GA. Hudoklin (2009) je na mišjem uroteliju *in vivo* dokazal, da se razporeditev in organizacija GA spreminja od bazalnih preko vmesnih do dežnikastih celic. V bazalnih urotelijskih celicah je GA razporejen bazolateralno ob jedru, kar je ugotovil že Koss (1969). V bazalnih celicah je GA organiziran kot skladovnica, ki jo sestavljajo kratke cisterne. Način razporeditve in organizacije GA v bazalnih urotelijskih celicah so Hudoklin in sodelavci (2009) označili kot osnovni GA. V vmesnih urotelijskih celicah je GA razporejen

bazolateralno blizu jedra. Število skladovnic v celici se glede na bazalne celice poveča, vsaka skladovnica pa je sestavljena iz več cistern kot pri bazalnih celicah. Način razporeditve in organizacijo GA v vmesnih celicah so označili kot prehodni GA. V dežnikastih celicah je GA razporejen po celotni osrednji citoplazmi, gradi pa ga več skladovnic. Skladovnice so zgrajene iz dolgih, sploščenih cistern, ki jih obdajajo manjši vezikli. Razporeditev in organizacijo GA v dežnikastih celicah so označili kot kompleksni GA (Hudoklin, 2009). Takšno poimenovanje organizacije in razporeditve GA smo uporabili tudi v tem diplomskem delu. Podobno preoblikovanje GA v različno diferenciranih celicah smo opazili tudi v naši raziskavi, kjer smo z dvojno imunofluorescenco v površinskih urotelijskih celicah *in vitro* opazovali prisotnost uroplakinov v apikalni plazmalemi ter razporejanje in organizacijo GA. Ugotovili smo, da v kulturi na površini prevladujejo urotelijske celice z lastnostmi vmesnih celic *in vivo*. Za te urotelijske celice je značilen prehodni GA, brez uroplakinov v apikalni plazmalemi. Visoko diferenciranih celic ter nediferenciranih celic je bilo zelo malo. Visoko diferencirane celice so imele v apikalni plazmalemi prisotne uroplakine ter kompleksno zgrajeni GA. V nižjih plasteh sekundarne kulture smo opazili tudi manjše nediferencirane celice z osnovnim GA. Dobljeni rezultati potrjujejo spremembe v razporeditvi in organizaciji GA tudi med diferenciacijo urotelijskih celic *in vitro*.

GA leži v bližini organizacijskega centra mikrotubulov. Njegova oblika in organizacija sta odvisni od razporeditve mikrotubulov (Alberts in sod., 2008). Iz sprememb v organizaciji in razporeditvi GA smo sklepali, da je prišlo tudi do sprememb v organizaciji in razporeditvi mikrotubulov. Zato smo v nadaljevanju raziskav proučili razporejanje  $\alpha$ -tubulina v različno diferenciranih urotelijskih celicah.

### **5.1.5 Prerazporejanje $\alpha$ -tubulina med diferenciacijo urotelijskih celic**

Imunofluorescentno smo označili  $\alpha$ -tubulin, ki je poleg  $\beta$ -tubulina osnovna gradbena enota mikrotubulov. Tako označene mikrotubule smo podrobneje analizirali. Z merjenjem intenzitete fluorescence smo dokazali zmanjšano intenziteto fluorescence  $\alpha$ -tubulina pri površinskih urotelijskih celicah z uroplakini. Proučevanje razporejanja  $\alpha$ -tubulina z imunofluorescenco potrjuje prisotnost mikrotubulov v vseh sekundarnih urotelijskih kulturah. Podrobneje smo raziskali razporeditev mikrotubulov v površinskih celicah z vidno prisotnimi uroplakini v apikalni plazmalemi. Ugotovili smo, da je imunofluorescenca  $\alpha$ -tubulina v celicah z uroplakini v apikalni plazmalemi signifikantno nižja ( $413,19 \pm 117,17$  a.e.) kot v celicah brez uroplakinov v apikalni plazmalemi ( $1438,12 \pm 68,39$  a.e.). Iz tega sklepamo, da med diferenciacijo urotelijskih celic pride tudi do reorganizacije  $\alpha$ -tubulina. Iz povečevanja intenzitete fluorescence  $\alpha$ -tubulina z odmikanjem od apikalne plazmaleme proti jedru celice sklepamo, da je  $\alpha$ -tubulina nižje v celici več, uroplakinov pa vedno manj. Rezultati se ujemajo tudi z rezultati Western blota (Tratnjek, 2009), ki so pokazali, da je količina proteina  $\alpha$ -tubulina manjša v bolj diferencirani kulturi prašičjih urotelijskih celic kot v manj diferencirani kulturi. Menimo, da je sprememba v količini in razporeditvi  $\alpha$ -tubulina odvisna od stopnje diferenciacije urotelijskih celic.

### **5.1.6 Reorganizacija GA sovpada s prerazporejanjem $\alpha$ -tubulina**

Menimo, da je sprememba v razporeditvi mikrotubulov povezana s spremembo organizacije in znotrajcelične razporeditve GA v urotelijskih celicah, saj se ob razgraditvi mikrotubulov GA razprši po citoplazmi (Alberts, 2008). Ugotovili smo, da se s povečevanjem stopnje diferenciranosti celic izražanje  $\alpha$ -tubulina v urotelijskih celicah zmanjša, hkrati pa prihaja do reorganizacije GA. V malih nediferenciranih urotelijskih celicah je osnovni GA obkrožal celična jedra, izražanje  $\alpha$ -tubulina pa je bilo močno. Z večanjem stopnje diferenciacije urotelijskih celic se je izražanje  $\alpha$ -tubulina zmanjševalo (Graf 4), kompleksnost zgradbe GA

pa povečevala. V visoko diferenciranih urotelijskih celicah je bil kompleksno zgrajeni GA razporejen po celotni citoplazmi, medtem ko je bilo izražanje  $\alpha$ -tubulina najmanjše. Z našo raziskavo smo ugotovili, da reorganizacija GA sovпада s prerazporejanjem  $\alpha$ -tubulina, vendar so za direktno potrditev tega potrebne še nadaljnje raziskave. Kako dejansko poteka reorganizacija mikrotubulov in GA med diferenciacijo urotelijskih celic, ostaja neznan.

### **5.1.7 Prerazporejanje in organizacija citokeratinov med diferenciacijo urotelijskih celic**

Citokeratini se izražajo tako v uroteliju *in vitro* kot v uroteliju *in vivo*. Poznamo več kot 20 različnih citokeratinov. CK 20 se pojavlja le v diferenciranih površinskih urotelijskih celicah (Southgate in sod., 1994; Kreft in sod., 2002; Romih in sod., 2002). S pomočjo fluorescenčnega mikroskopa z dodatkom *ApoTome* smo ugotovili, da se tako CK 7 kot CK 20 nahajata v apikalnem delu različno diferenciranih površinskih urotelijskih celic. CK 7 se pojavlja v vseh celičnih skladih urotelija (Southgate in sod., 1994; Erdani Kreft in sod., 2006; Turner in sod., 2008), kar se je izkazalo tudi pri naši kulturi prašičjih urotelijskih celic. V površinskih urotelijskih celicah smo CK 7 in CK 20 našli v obliki pik, filamentov in mreže. Do pred kratkim je izražanje CK 20 v urotelijskih celicah pomenilo, da je celica visoko diferencirana, Ermanova in sod. (2001) pa so odkrili, da je sama sinteza CK 20 manj primeren označevalec zaključene diferenciacije. Ugotovili so namreč, da se CK 20 lahko izraža v površinskih celicah neodvisno od diferenciacije. Rezultati naše raziskave potrjujejo raziskave Ermanove in sodelavcev, saj so imele površinske urotelijske celice CK 20 izražen, a različno supramolekularno organiziran. Iz teh rezultatov sklepamo, da vse površinske urotelijske celice s prisotnim CK 20 še niso dosegle visoke stopnje diferenciacije, ki jo lahko specifično označuje supramolekularna organizacija CK 20.

Citokeratinske pike in filamenti se pojavljajo v zgodnjih fazah diferenciacije urotelijskih celic, medtem ko se citokeratinska mreža oblikuje v visoko diferenciranih površinskih celicah (Veranič in sod., 2003; Kreft in sod., 2002, 2006). V naši raziskavi smo dokazali vse

supramolekularne oblike pri vseh medijih. Iz teh rezultatov sklepamo, da so naše površinske urotelijske celice dosegle različne diferenciacijske stopnje.

### **5.1.8 Prerazporejanje aktina med diferenciacijo urotelijskih celic**

Raziskave Romiha in sod. (1999) ter Acharya in sod. (2004) so pokazale, da pride med diferenciacijo urotelijskih celic *in vivo* tudi do prerazporeditve aktinskih filamentov. V bazalnih in vmesnih urotelijskih celicah so se aktinski filamentih nahajali po celotni periferiji celic. V apikalni delu končno diferenciranih površinskih urotelijskih celic so se aktinski filamentih nahajali ob lateralni plazmalemi, v bazalnem delu površinskih urotelijskih celic pa so se lahko razporejali po celotni bazalni citoplazmi, največkrat pa so bili skoncentrirani ob robovih urotelijskih celic. Prerazporejanje aktinskih filamentov med diferenciacijo urotelijskih celic so potrdili tudi Kreftova in sod. (2005) na urotelijskih kulturah *in vivo*. V bazalnih in vmesnih urotelijskih celicah je bil aktin razporejen na apikalni in bazolateralni plazmalemi, v površinskih urotelijskih celicah pa so opazili sklenjene linije aktina na lateralni plazmalemi, kar je značilno za normalne urotelijske celice *in vivo*.

Prerazporejanje aktina smo opazili tudi pri sekundarnih urotelijskih kulturah. V površinskih urotelijskih celicah se je aktin nahajal apikalno ob lateralni plazmalemi, v bazalnem delu celice pa je bil skoncentriran ob robovih celic oziroma so se aktinski filamentih razpredali po bazalni citoplazmi. Ti rezultati potrjujejo zgoraj omenjene raziskave, saj smo v površinskih urotelijskih celicah opazili razporejanje aktina, značilno za površinske diferencirane urotelijske celice.

### **5.1.9 Med površinskimi urotelijskimi celicami *in vitro* so razviti adherentni stiki**

Normalni urotelij *in vivo* vsebuje mnogo molekul, ki sodelujejo pri medceličnih povezavah. Med njimi je tudi E-kadherin, ki se nahaja v adherentnih stikih. E-kadherin se enako kot *in vivo* razporeja tudi v urotelijskih celicah *in vitro*. Razliko so opazili samo v imunofluorescenčni reakciji, ki je bila v primarni kulturi z dodanim  $\text{Ca}^{2+}$  močnejša kot v hranilnem mediju brez  $\text{Ca}^{2+}$  (Southgate in sod., 1994, 2002). V naši raziskavi smo E-kadherin imunofluorescenčno označili in ugotovili, da se nahaja v lateralni plazmalemi vseh urotelijskih celic v vseh celičnih skladih. Razporeditev E-kadherina je bila neodvisna od uporabljenega hranilnega medija. Razlike v intenziteti fluorescence nismo opazili, zato menimo, da so vse celice imele enako razvite adherentne stike.

Prisotnost E-kadherina so v eksplantatni kulturi opazili v bazalnih, vmesnih in površinskih urotelijskih celicah (Kreft in sod., 2006). To porazdelitev E-kadherina potrjujejo tudi naši rezultati, saj je bil E-kadherin prisoten v vseh urotelijskih celicah. Iz teh rezultatov sklepamo, da se adherentni stiki pojavljajo v zgodnjih fazah diferenciacije urotelija.

### **5.1.10 Med površinskimi urotelijskimi celicami *in vitro* so razviti funkcionalni tesni stiki, ki določajo visoko TER**

Tesni stiki vzpostavljajo in vzdržujejo krvno-urinsko pregrado v sečnem mehurju ter zagotavljajo polariziranost celic in plazmaleme. Specifičen protein funkcionalnih tesnih stikov je okludin, ki se nahaja v apikalni lateralni plazmalemi (Veranič in Jezernik, 2000). Čas nastanka tesnih stikov med diferenciacijo urotelijskih celic še ni popolnoma znan. Imunofluorescenčno označen okludin v eksplantatu mišjega urotelija dokazuje nastanek tesnih stikov v zgodnjih stopnjah diferenciacije urotelijskih celic (Kreft in sod., 2006).

V kulturi normalnih prašičjih urotelijskih celic je bil imunofluorescenčno označen okludin v apikalnem delu lateralnih plazmalem vseh površinskih celic. V velikih površinskih celicah se je okludin nahajal v sklenjeni liniji, v malih celicah pa smo opazili prekinjene linije pri vseh

hranilnih medijih. Mesto prekinitve sklenjene linije je brez okludina, ki se nahaja v tesnih stikih. Iz tega sklepamo, da niso imele vse površinske celice v sekundarni urotelijski kulturi vzpostavljene sklenjene linije tesnih stikov. Za natančnejšo določitev, ali urotelijske celice v sekundarni kulturi vzpostavijo tesni epitelij (kriteriji Fromterja in Diamonda, 1972), smo proučili transepitelijsko upornost (TER). Fromter in Diamond (1972) sta epitelije glede na transepitelijsko upornost opredelila v dve kategoriji. V prvo kategorijo sodijo netesni epiteliji, ki imajo upornost manjšo od  $500 \Omega\text{cm}^2$ , v drugo kategorijo pa tesni epiteliji z upornostjo nad  $500 \Omega\text{cm}^2$ . Uroteliji *in vivo* dosegajo izjemno visoke TER (do  $75000 \Omega\text{cm}^2$ ) in spadajo med najtesnejše epitelije v telesu.

Dosedanje meritve v celičnih kulturah so prikazale, da tudi urotelijske celice *in vitro* lahko dosežejo visoke TER. Truschel in sod. (1999) so na posameznih celicah v primarni kulturi izmerili tudi do  $20.000 \Omega\text{cm}^2$ . Pri vzpostavljanju celičnih kultur *in vitro* z različnimi hranilnimi mediji so raziskovalci izmerili precej različne TER. Turner in sod. (2008) so merili TER v celičnih kulturah, ki so jim dodajali različne kombinacije hranilnega medija KSFMc, seruma (FCS) in  $\text{Ca}^{2+}$ . Primarna kultura urotelijskih celic, ki je bila v KSFMc mediju brez dodatkov ali z  $2,5 \text{ mmol/l Ca}^{2+}$ , ni dosegla TER nad  $500 \Omega\text{cm}^2$ . Najvišjo TER (nad  $7000 \Omega\text{cm}^2$ ) je dosegla kultura v KSFMc s 5% serumom (FCS). Celična kultura s hranilnim medijem, ki je vseboval tako serum (FCS) kot  $\text{Ca}^{2+}$ , je dosegla vrednosti nad  $2.500 \Omega\text{cm}^2$ , vendar šele po šestih dneh gojenja. Iz njihovih raziskav sklepamo, da hranilni medij s serumom omogoča hitrejše povečanje TER kot medij brez seruma. Cross in sod. (2005) so po sedmih dnevih izmerili najvišjo TER ( $3023,4 \pm 564 \Omega\text{cm}^2$ ) pri celični kulturi KSFMc, ki mu je bil dodan 5% serum (FCS) in  $2 \text{ mM Ca}^{2+}$ . TER malo nad  $2500 \Omega\text{cm}^2$  so izmerili pri celicah s KSFMc, ki so mu dodali 5% serum (FCS). Pri hranilnem mediju brez seruma in brez  $\text{Ca}^{2+}$  ter pri hranilnem mediju brez seruma in s  $\text{Ca}^{2+}$  celice niso dosegle TER nad  $500 \Omega\text{cm}^2$ .

Pri obeh raziskavah je treba upoštevati, kako dolgo so bile celice izpostavljene različnim hranilnim medijem. Ugotovili so, da je pri doseganju visokih vrednosti TER ključen čas dodatka  $\text{Ca}^{2+}$ . Za doseganje najvišjih TER predlagajo dodajanje  $\text{Ca}^{2+}$ , ko kultura že doseže TER nad  $200 \Omega\text{cm}^2$  in ne kasneje od 6. dne gojenja (Truschel in sod., 1998). Kaj se zgodi s

TER pri celični kulturi v daljšem časovnem obdobju, do sedaj ni bilo raziskano. V naši raziskavi smo želeli ugotoviti tudi vpliv dodanega seruma (FCS) in  $\text{Ca}^{2+}$  na TER v daljšem časovnem obdobju.

Ugotovili smo, da lahko kultura prašičjih urotelijskih celic v vseh uporabljenih hranilnih medijih (UroM (+ $\text{Ca}^{2+}$ +S), UroM (- $\text{Ca}^{2+}$ +S), UroM (+ $\text{Ca}^{2+}$ -S)) doseže vrednosti nad 10000  $\Omega\text{cm}^2$ . Velika razlika pa se je pokazala v zmožnosti vzdrževanja visoke TER. Prašičje urotelijske celice z UroM (+ $\text{Ca}^{2+}$ +S) in UroM (- $\text{Ca}^{2+}$ +S) so v nekaj dnevih dosegle transepitelijske vrednosti nad 10.000  $\Omega\text{cm}^2$ . Hitro povečanje upornosti pri kulturah z dodanim serumom (FCS) je v skladu z raziskavami Crossa in sod. (2005) ter Turnerja in sod. (2008), vendar je hitremu vzponu sledil hiter padec upornosti. Predvidevamo, da ima v prvih dneh gojenja največjo vlogo pri ustvarjanju TER hitra mitotska delitev celic, ki jo omogoča serum. Hitro vzpostavitev visoke TER ob pričetku rasti celične kulture lahko primerjamo z urotelijem *in vivo*. Ob poružitvi krvno-urinske pregrade je zelo pomembna ponovna hitra vzpostavitev visoke TER, ki prepečuje prehod patogenom in nekontrolirano prehajanje vode, ionov in stopenih, potencialno rakotvornih metabolitov iz urina v spodaj ležeče vezivno tkivo in krvožilje. Po nekaj dnevih gojenja celic *in vitro* pa visoka upornost pade, verjetno zaradi odmiranja površinskih urotelijskih celic.

TER pri celicah z UroM (+ $\text{Ca}^{2+}$ +S) je bila ob koncu merjenja ( $3690,5 \pm 107,1 \Omega\text{cm}^2$ ) le nekoliko višja kot ob začetku merjenja ( $3102,5 \pm 95,5 \Omega\text{cm}^2$ ). Višjo končno upornost so dosegle celice z UroM (- $\text{Ca}^{2+}$ +S). Iz poskusa, kjer se je pokazalo, da serum (FCS) poveča število mitotskih delitev, ki se po določenem času izražajo kot hiperplazije, sklepamo, da je TER višja zaradi večjega števila celic. Ob poškodbah urotelija *in vivo* je hiperplazija zelo učinkovit mehanizem zagotavljanja krvno-urinske pregrade. Menimo, da hiperplazija pripomore k povečani TER, ki smo jo opazili v prvih 14 dnevih pri uporabi UroM (- $\text{Ca}^{2+}$ +S) in UroM (+ $\text{Ca}^{2+}$ +S). Epidermalni rastni faktor (EGFR) pospešuje proliferacijo celic, ki nadomeščajo poškodovane urotelijske celice. S povečevanjem števil celičnih skladov se poškodba urotelija zmanjšuje, izražanje receptorja epidermalnega rastnega faktorja pa se omeji na bazalne celice (Romih in sod., 2001). Predvidevamo, da je vzrok padca TER po treh tednih



gojenja v dveh hranilnih medijih s serumom zmanjšano izražanje receptorja epidermalnega ravnega faktorja (EGFR), saj se z nastankom večskladnega urotelija izražanje EGFR omeji na bazalne celice.

Najbolj stabilno in počasno rast TER so dosegle celice z UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S). Njihova končna TER je dosegla  $7520,5 \pm 232,6 \Omega\text{cm}^2$ . Iz rezultatov sklepamo, da je za doseganje najvišje in stabilne TER najboljši hranilni medij UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S).

Glede na razdelitev epitelijev med tesne in netesne epitelije (kriteriji Fromterja in Diamonda, 1972), lahko proučevano kulturo prašičjih urotelijskih celic uvrstimo med tesne epitelije, saj je bila upornost nad  $500 \Omega\text{cm}^2$ .

#### **5.1.11 Krvno-urinska pregrada je med rakastimi urotelijskimi celicami porušena**

Glavna funkcija urotelija je zagotavljanje krvno-urinske pregrade sečnega mehurja. Krvne kapilare z izotonično krvno plazmo ležijo pod bazalno lamino le nekaj mikrometrov od hipertoničnega urina v sečnem mehurju. Če bi postal urotelij prepusten, bi prišlo do mešanja urina z vodo, zaradi česar bi organizem izgubil velike količine vode ter utrpel dehidracijo (Hicks, 1975). Ob spremembi urotelijskih celic pride do porušitve krvno-urinske pregrade. Ob takšnih spremembah celic pride do bolezenskega stanja sečnega mehurja, ki je pri ljudeh pogost pojav. Zelo pogosta je sprememba urotelijskih celic v rakaste celice, ob kateri se poruši krvno-urinsko pregrado. V raziskavi smo želeli tudi ugotoviti, kakšno TER imajo rakaste urotelijske celice. TER sekundarne kulture prašičjih urotelijskih celic smo primerjali s TER trajne celične linije ledvičnih celic (MDCK) ter trajne celične linije rakastih urotelijskih celic (T24). Celice MDCK in T24 so imele TER pod  $200 \Omega\text{cm}^2$ , kar je značilno za netesne epitele. Vzrok nizke TER so šibki medcelični stiki, ki so značilni za rakaste urotelijske in ledvične epiteljske celice. Pri trajni celični liniji rakastih urotelijskih celic T24 smo ob odštetju upornosti membrane in medija dobili tudi negativne vrednosti TER. Vzroka za takšne rezultate sta izredno nizka TER rakastih celic in premajhna občutljivost merilne aparature.

Normalna človeška urinarna pot je sterilno okolje, zaščiteno pred patogenimi organizmi zaradi toka sečnine, izločenih antibakterijskih faktorjev ter zaradi delovanja imunskih celic. Kljub vsemu pa je bakterijska okužba urinarnega sistema najpogostejša infekcijska bolezen (Litwin in sod., 2005). Zhang in sod. (2005) so odkrili, da urotelijske celice pacientov s cistitisi izločajo antiproliferacijski faktor, ki poveča permeabilnost urotelija in zmanjša število tesnih stikov (Zhang in sod., 2005). Tradicionalni antibiotiki za zdravljenje infekcij urinarne poti zaradi onemogočene penetracije v urotelijske celice izgubijo učinek. Odkritje, da se lektin WGA (*wheat germ agglutinin*) pripne in nato z endocitozo vstopi v urotelijske celice, pa daje nove potenciale za učinkovito zdravljenje ponavljajočih se infekcij (Kreft in sod., 2009). Kljub vsemu pa bo potrebno še mnogo podobnih raziskav, da bomo popolnoma razumeli delovanje urotelijskih celic ter uspešno zdravili bolezenska stanja urinarne poti.

## 5.2 SKLEPI

1. Med diferenciacijo urotelijskih celic *in vitro* prihaja do fizioloških in strukturnih sprememb.
2. Z višanjem pasaj urotelijske celice izgubljajo primarne lastnosti urotelija *in vivo*.
3. V hranilni medij dodani serum (FCS) pospešuje proliferacijo celic, medtem ko  $\text{Ca}^{2+}$  vodi v diferenciacijo celic.
4. Urotelijske celice, ki rastejo prvih 7 dni v UroM ( $-\text{Ca}^{2+}+\text{S}$ ), naslednjih 14 dni pa v enem izmed uporabljenih medijev (UroM ( $-\text{Ca}^{2+}+\text{S}$ )), UroM ( $+\text{Ca}^{2+}+\text{S}$ ), UroM ( $+\text{Ca}^{2+}-\text{S}$ )), se organizirajo v dvo- do troskladen urotelij, v katerem so površinske celice med seboj povezane s tesnimi stiki (okludin) ter adherentnimi stiki (E-kadherin).
5. V visoko diferenciranih površinskih urotelijskih celicah sekundarne urotelijske kulture so prisotni uroplakini v apikalni plazmalemi, kompleksni GA, intermediarna filameta CK 20 in CK 7 v apikalni citoplazmi celic, aktin, razporejen apikalno ob lateralnih plazmalemah, in okludin (tesni stiki) ter E-kadherin (adherentni stiki) v lateralni

plazmalemi. Toda sama prisotnost označevalcev visoke diferenciacije še ne pomeni nujno dejanske diferenciacije, zato je pomembno preučiti supramolekularno organizacijo in razporeditev označevalcev v celici.

6. Supramolekularna organizacija CK 7 in CK 20 odraža diferenciacijsko stopnjo površinskih urotelijskih celic. V manj diferenciranih celicah sta CK 7 in CK 20 prisotna v obliki pik in filamentov, v bolj diferenciranih celicah pa sta prisotna v obliki mreže.
7. Z diferenciacijo urotelijskih celic se spreminja količina in razporeditev  $\alpha$ -tubulina ter organizacija in zgradba GA. Nediferencirane bazalne celice imajo osnovni GA, vmesne celice imajo prehodni GA, visoko diferencirane celice pa imajo kompleksni GA.  $\alpha$ -tubulin je v visoko diferenciranih celicah šibkeje izražen kot v nediferenciranih celicah. Intenziteta fluorescence  $\alpha$ -tubulina je v visoko diferenciranih celicah z uroplakini v apikalni plazmalemi šibka.
8. Transepitelijska upornost je odvisna od stopnje diferenciranosti urotelijskih celic.
9. Transepitelijska upornost sekundarne kulture prašičjih urotelijskih celic IX. pasaže je višja od TER trajne celične linije ledvičnih celic MDCK in trajne celične linije rakastih urotelijskih celic T24.
10. Hranilni medij UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S) je najučinkovitejši pri zagotavljanju dolgotrajno visoke TER in je zato primeren pri vzpostavljanju urotelijev s funkcionalno krvno-urinsko pregrado. Hranilna medija UroM (+Ca<sup>2+</sup>+S) in UroM (-Ca<sup>2+</sup>+S) zaradi prisotnosti seruma omogočata hitro začetno povečanje TER, vendar ta upornost po nekaj dnevih upade.

## 6 POVZETEK

Visoko diferencirane urotelijske celice, ki mejijo na lumen sečnega mehurja, vzdržujejo krvno-urinsko pregrado. Kljub mnogim raziskavam urotelija tako *in vivo* kot *in vitro* je v procesu diferenciacije urotelija še mnogo neznanega. V našem delu nas je zanimalo, do kakšnih fizioloških in strukturnih sprememb pride v urotelijskih celicah *in vitro* med diferenciacijo. Na stopnjo diferenciacije celic smo vplivali z uporabo treh različnih hranilnih medijev (UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S), UroM (+Ca<sup>2+</sup>+S), UroM (-Ca<sup>2+</sup>+S)). Dosednje študije so namreč pokazale, da sestava hranilnega medija vpliva na proliferacijo in diferenciacijo urotelijskih celic. Vzpostavili smo sekundarni kulturi urotelijskih celic VII. in IX. pasaže, katerima smo ob konfluentnosti celic začeli dodajati različne hranilne medije: UroM (+Ca<sup>2+</sup>+S), UroM (-Ca<sup>2+</sup>+S) in UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S). V vseh treh hranilnih medijih so se celice organizirale v večskladen urotelij. Izkazalo se je, da v hranilni medij dodan serum (FCS) povečuje proliferacijo in zmanjšuje diferenciacijo celic. Nasprotni učinek kot serum je povzročil v hranilni medij dodani Ca<sup>2+</sup>. Po 14 in 21 dnevih smo z imunofluorescenčnim označevanjem uroplakinov, proteinov GA, proteinov medceličnih stikov in proteinov citoskeleta ovrednotili stopnjo diferenciranosti urotelijskih celic VII. in IX. pasaže. Imunofluorescentne označevalce visoke diferenciacije (uroplakine v apikalni plazmalemi, kompleksen GA, CK 20 in CK 7 v apikalni citoplazmi, aktin ob lateralni plazmalemi in E-kadherin ter okcludin v apikalni lateralni plazmalemi) smo dokazali pri vseh hranilnih medijih. Ne glede na hranilni medij je sekundarna kultura urotelijskih celic VII. pasaže dosegla višjo diferenciacijo kot IX. pasaža. V sekundarni kulturi IX. pasaže je manj kot polovica površinskih celic dosegla visoko diferenciacijo. V vseh hranilnih medijih je bilo več kot polovica celic brez uroplakinov v apikalni plazmalemi, brez kompleksnega GA, brez CK 20 in brez sklenjenje linije okcludina, ki gradi tesne stike. Največ visoko diferenciranih površinskih celic je bilo pri uporabi medija UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S). Večina celic je imela lastnosti prehodnih celic, kjer so bili ključni diferenciacijski proteini v fazi nastajanja in razporejanja. V urotelijski celični kulturi smo ugotovili prerazporejanje GA v odvisnosti od prerazporeditve mikrotubulov in v povezavi z diferenciacijo urotelijskih celic potrdili funkcionalnost tesnih stikov. Prav tako smo potrdili vpliv seruma in Ca<sup>2+</sup> na urotelijske celice *in vitro*. Z merjenjem in analizo transepitelijske

upornosti (TER) smo določevali funkcionalnost tesnih stikov. Ugotovili smo, da sekundarna kultura prašičjih urotelijskih celic IX. pasaže spada med tesne epitelije ( $> 500 \Omega\text{cm}^2$ ), medtem ko trajna celična linija ledvičnih celic (MDCK) in trajna celična kultura rakastih urotelijskih celic (T24) sodita med netesne epitelije ( $< 500 \Omega\text{cm}^2$ ). Za doseganje visokih in stabilnih TER sekundarne kulture urotelijskih celic je najprimernejši hranilni medij UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S).

## 7 LITERATURA

- Aberle H., Schwartz H., Kelmer R. 1996. Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *Journal of Cellular Biochemistry*, 61: 514-523
- Acharya, P., Beckel, J., Ruiz, W. G., Wang, E., Rojas, R., Birder, L. and 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
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2008. *Molecular biology of the cell*. 5. izdaja. New York, Garland Science, 908- 1400 str.
- Allen E., Yu Q.-C., Fuchs E. 1996. Mice expressing a mutant desmosomal cadherin exhibit abnormalities in desmosomes, proliferation, and epidermal differentiation. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 133, 6: 1367-1382
- Anderson J.M. 2001. Molecular structure of tight junction and their role in epithelial transport. *News Physiol. Sci.*, 16: 126-130
- Arthur J.M. 2000. The MDCK cell line is made up of populations of cells with diverse resistive and transport properties. *Tissue and Cell*, Vol. 32, 5: 446-450
- Ayres P.H., Shinohara Y., Frith C.H. 1985. Morphological observations on the epithelium of the developing urinary bladder of the mouse and rat. *The Journal of Urology*, 133:506-512
- Baskin L. S., Sutherland R. S., Thomson A. A., Nguyen H. T., Morgan D. M., Hayward S. W., Hom Y. K., DiSandro M., Cunha G. R. 1997. Growth Factors in Bladder Wound Healing. *American Urological Association*, Vol. 157, 6: 2388-2395
- Candia O.A., Mia A., Yorio T. 1997. Evidence of basolateral water permeability regulation in amphibian urinary bladder. *Biology of the Cell*, 89: 331-339
- Caviston, J.P., Holzbaur, E.L. 2006. Microtubule motors at the intersection of trafficking and transport. *Trends Cell Biol.*, 16: 530-537
- Chapowski F. J. 1989. Long term growth and maintenance of stratified rat urothelium in vitro. *Cell. Tissue Kinet.*, 3: 245-257
- Chitaev N.A., Troyanovsky S.M. 1997. Direct  $Ca^{2+}$  - dependent heterophilic interaction between desmosomal cadherins, desmoglein and desmocollin, contributes to cell-cell adhesion. *The Journal of Cell Biology*, 138, 1: 193-201
- Cilento B. G., Freeman M. R., Schneck F. X., Retik A. B., Atala A. 1994. Phenotypic and cytogenetic characterization of human bladder urothelia expanded in vitro. *The Journal of urology*, 152: 665-670
- Claude P., Goodenough D. A. 1973. Fracture faces of zonulae occludentes from »tight« and »leaky« epithelia. *The Journal of Cell Biology*, 58: 390-400

- Cross W. R., Eardley I., Leese H. J., Southgate J. 2005. A biomimetic tissue from cultured normal human urothelial cells: analysis of physiological function. *J Physiol Renal Physiol.* 289: 459-468
- Derganc J., Mironov A.A., Svetina S. 2006. Physical factor that affect the number and size of Golgi cisternae. *Blackwell Munksgaard*, 7:85-96
- Deng F-M., Ding M., Lavker R.M., Sun T-T. 2001. Urothelial function reconsidered: A role in urinary protein secretion. *PNAS*, Vol.98, 1:154-159
- Dubeau L., Jones P. A., 1987. Growth of normal and neoplastic urothelium and response to epidermal growth factor in a defined serum-free medium. *Cancer Res.* 47: 2107-2112
- Eaton S., Simons K. 1995. Apical, basal and lateral cues for epithelial polarization. *Cell*, 82: 5-8.
- Erman A., Jezernik K., Stiblar-Martinčič D., Romih R., Veranič P. 2001. Postnatal restoration of the mouse urinary bladder urothelium. *Histochem Cell Biol*, 115: 309-316
- Farquhar M. G., Palade G. E. 1998. The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends in Cell Biology.* Vol. 8, 1: 2-10
- Firth, J.A. in Hicks, R.M. 1972. Membrane specialization and synchronized cell death in developing rat transitional epithelium. *J. Anat.*, Vol. 113, 1: 95-107
- Firth J. A., Hicks R. M., 1973. Interspecies variation in fine structure and enzyme cytochemistry of mammalian transitional epithelium. *J. Anat.*, 116, 31-43
- Fromter E., Diamond J. 1972. Route of passive ion permeation in epithelia. *Nat New Biol*, 235: 9-13
- Fukushima S., Arai M., Cohen S. M., Jakobs J. B., Friedell G. H. 1981. Scanning electron microscopy of cyclophosphamide- induced hyperplasia of the rat urinary bladder. *Lab. Invest.* 44: 89-96
- Furuse M., Fujita K., Hiiragi T., Fujimoto K., Tsukita S. 1998. Claudin-1 and -2: Novel integral membrane proteins localizing at tight junction with no sequence similarity to occluding. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 141, 7: 1539-1558.
- Gallicano G.I. Kouklis P., Bauer C., Yin M., Vasioukhin V., Degenstein L., Fuchs E. 1998. Desmoplakin is required early in development for assembly of desmosomes and cytoskeletal linkage. *Journal of Cell Biology*, Vol. 143, 7: 2009-20022
- Guhe C., Föllmann W. 1994. Growth and characterization of porcine urinary bladder epithelial cells in vitro. *Renal Physiology*, Vol. 266, 2: 298-308
- Guelstein V. I., Tchippysheva T. A., Ermilova V.D., Troyanovsky S. M. 1993. Immunohistochemical localization of cytokeratin 17 in transitional cell carcinoma of the human urinary tract. *Virchows Arch. B Cell Pathol.*, 64, 1-5
- Hainau B. 1979. Luminal Plasma Membrane Organization in Rat Urinary Bladder Urothelium after Direct Exposure in Vivo to N-Methyl-N-nitrosourea. *Cancer Research*, 39: 3757-3762

- Harnden P., Allam A., Joyce A. D., Patel A., Selby P., Southgate J. 1995. Cytokeratin 20 expression by non-invasive transitional cell carcinomas: potential for distinguishing recurrent from non-recurrent disease. *Histopathology*, 27: 169-174
- Hicks R. M. 1965. The fine structure of the transitional epithelium of rat ureter. *J. Cell Biol.* 26, 25-48
- Hicks, R.M. 1966. The permeability of rat transitional epithelium – keratinization and the barrier to water. *The Journal of Cell Biology*, 28: 21–31
- Hicks. R.M. 1975. The mammalian urinary bladder: an accomodating organ. *Biol. Rev.*, 50: 215–246
- Hu C.-C. A., Liang F.-X., Zhou G., Tu L., Tang C.-h. A., Zhou J., Kreibich G., Sun T.-T. 2005. Assembly of urothelial plaques: tetraspanin function in membrane protein trafficking. *Molecular Biology of the Cell*, 16: 3937-3950
- Hudoklin S., Zupančič D., Romih R., 2009. Maturation of the Golgi apparatus in urothelial cells. *Cell tissue Res*, Vol. 336, 3: 453-463
- Hudoklin S. 2009. Oblikovanje in vezikularni transport asimetrično odebeljene membrane v uroteliju. Doktorska disertacija. Medicinska fakulteta v Ljubljani.
- Hutton K. A. R., Trejdosiewicz L. K., Thomas D. F. M., Southgate J. 1993. Urothelial tissue culture for bladder reconstruction: an experimental study. *The Journal of Urology*, 150: 721-725
- Kachar B., Liang F., Lins U., Ding M., Wu X. R., Stoffer D., Aebi U., Sun T. T., 1999. Three-dimensional analysis of the 16 nm urothelial plaque particle: luminal surface exposure, preferential head-to-head interaction, and hinge formation. *J. Mol. Biol.*, 285: 595-608
- Kikkawa M. 2008. The role of microtubules in processive kinesin movement. *Trends in Cell Biology*, Vol.18, 3: 128-135
- Kirk D., Kagawa s., Narayan K. S., Ohnuki Y., Jones L. W. 1985. Selective growth of normal adult human urothelial cells in serum-free medium. *In vitro cellular & developmental biology – plant*, Vol. 21, 3: 165-171
- Kong X.-T., Deng F.-M., hu P., Liang F.-X., Zhou G., Auerbach A.B., Genieser N., Nelson P.K., Robbins E.S., Shapiro E., Kachar B., Sun T.-T. 2004. Roles of uroplakins in plaque formation, umbrella cell enlargement, and urinary tract diseases. *The Journal of Cell Biology*, Vol.167, 6:1195-1203
- Koss L. R. 1969. The asymmetric unit membrane of the epithelium of the urinary bladder of the rat. An electron microscopy study of a mechanism of epithelial maturation and function. *Lab. Invest.*, 21: 154-168
- Kreft ME. 1999. Vloga laminae propriae pri razvoju in diferenciaciji urotelijskih celic sečnega mehurja miši *in vitro*. Magistrska naloga. Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani
- Kreft ME. 2002. Organizacija in diferenciacija primarne celične kulture eksplantata sečnega mehurja miši. Doktorska disertacija. Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani
- Kreft ME., Romih R., Sterle M. 2002. Antigenic and ultrastructural markers associated with urothelial cytodifferentiation in primary explant outgrowths of mouse bladder. *Cell Biology International*, 26, 1: 63-74



- Kreft ME, Sterle M., Veranič P., Jezernik K. 2005a. Urothelial injuries and the early wound healing response: tight junctions and urothelial cytodifferentiation. *Histochem Cell Biol*, 123: 529-539
- Kreft ME., Hudoklin S., Sterle M., 2005b. Establishment and characterization of primary and subsequent subcultures of normal mouse urothelial cells. *Folia Biologica*, 51: 126-132
- 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. 2009. Apical plasma membrane traffic in superficial cells of bladder urothelium. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1152:18-29
- Lecher T. in Fuchs E. 2007. Desmoplakin: an unexpected regulator of microtubule organization in the epidermis. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 176, 2: 147-154
- Lavelle J., Meyers S., Ruiz W.G., Buffington C.A.T., Zeidel M.L., Apodaca G. 2000. Urothelial pathophysiological changes in feline interstitial cystitis: a human model. *Am. J Physiol Renal Physiol*, 278: 540-553
- Lavelle J., Meyers S., Ramage R., Bastacky S., Doty D., Apodaca G., Zeidel M.L. 2002. Bladder Permeability Barrier: Recovery From Selective Injury of Surface Epithelial Cells. *J Physiol Renal Physiol*, 283: 242-253
- Lewis S.A., Diamond J.M. 1976. Na<sup>+</sup> transport by rabbit urinary bladder, a tight epithelium. *J Memb Biol*, 28: 1-40
- Lewis S. A., de Moura J. L. 1982. Incorporation of cytoplasmic vesicles into apical membrane of mammalian urinary bladder epithelium. *Nature*, 297: 685-688
- Lewis J.E., Wahl III J.K., Jensen P.J., Johnson, K.R., Wheelock M.J. 1997. Cross-talk between adherens junctions and desmosomes depends on plakoglobin. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 136, 4: 919-934
- Lin J. H., Wu X. R., Kreibich G., Sun T.-T. 1994. Precursor sequence, processing and urothelium-specific expression of a major 15-kDa protein subunit of asymmetric unit membrane. *J. Biol. Chem.* 269: 1775-1784
- Litwin M. S., 2005. Urologic diseases in American project. *Urologic diseases in America Project: analytical methods and principal findings. J. Urol.* 173: 933-937
- Ludwikowski B., Zhang Y. Y., Frey P. 1999. The long-term culture of porine urothelial cell and introduction of urothelial stratification. *BJU International*, 84: 507-514
- Mialhe A., Levacher G., Champelovier P., Martel V., Serres M., Knudsen K., Seigneurin D. 2000. Expression of E-, P-, N-cadherins and catenins in human bladder carcinoma cell lines. *The Journal of Urology*, 164: 826-835
- Mima S., Tsutsumi S., Ushijima H., Takeda M., Fukuda I., Yokomizo K., Suzuki K., Sano K., Nakanishi T., Tomisato W., Tsuchiya T., Mizushima T. 2005. Induction of claudin-4 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and its contribution to their chemopreventive effect. *Cancer Res.* 65: 1868–1876, 2005.

- Min G., Zhou G., Sun T.-T., Kong X.-P. 2003. Structural basis of urothelial permeability barrier function as revealed by Cryo-EM studies of the 16 nm uroplakin particle. *Journal of Cell Science*, 116: 4087-4094
- Minsky B. D., Chlapowski F. J., 1978. Morphometric analysis of the translocation of luminal membrane between cytoplasm and cell surface of transitional cell during the expansion-contraction cycles of mammalian urinary bladder. *J. Cell Biol.* 77: 685-697
- Mitic L. L., Anderson J. M. 1998. Molecular architecture of tight junctions. *Annual Reviews in Physiology*, 60: 121-142
- Moll R., Schiller D. L., Franke W. W., 1990. Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns. *J. Cell Biol.* 111,: 567-580
- Morgan G., Pearson J.D., Sepúlveda F.V. 1984. Absence of gap junctional complexes in two established renal epithelial cell lines (LLC-PK<sub>1</sub> and MDCK). *Cell Biology International Reports*, Vol.8, 11: 917-922
- Mudge C. S., Klumpp D. J. 2005. Induction of the urothelial differentiation program in the absence of stromal cues. *The Journal of Urology*. 174: 380-385
- Pasdar M., Li Z., Chlumecky V. 1995. Plakoglobin: kinetics of synthesis, phosphorylation, stability, and interactions with desmoglein and E-cadherin. *Cell Motility and the Journal of Cell Biology*, Vol. 125, 6: 1341-1352
- Pinton P., Pozzan T., Rizzuto R. 1998. The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca<sup>2+</sup> store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 17, 18: 5298-5308
- Pšeničnik M., Jezernik K., 2000. The role of the Golgi apparatus during terminal differentiation of mouse urothelial surface cells. *Eur. J. Histochem.* 44,: 345-351
- Reznikoff C. A., Loretz L. J., Pesciotta D. M., Oberley T. D., Ignjatovic M. M. 2005. Growth kinetics and differentiation *in vitro* of normal human uroepithelial cells on collagen gel substrates in defined medium. *Journal of cellular physiology*. Vol.131, 3: 285-301
- Rodriguez-Boulan E., Nelson W. J. 1989. Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotyp. *Science*. 245: 718-725.
- Romih R., Jezernik K., Masera A. 1998. Uroplakins and cytokeratins in the regenerating rat urothelium after sodium saccharin tretment. *Histochem. Cell biol.*, 109: 263-269
- Romih R., Veranič P., Jezernik K., 1999. Actin filaments during terminal differentiation of urothelial cells in the rat urinary bladder. *Histochemistry and Cell Biology*. Vol.112, 5: 375-380.
- Romih R., Koprivec D., Martincic D. S., Jezernik K. 2001. Restoration of the rat urothelium after cyclophosphamide tretment. *Cell Biol. Int*, 25: 531-537
- Romih R., Veranič P., Jezernik K. 2002. Appraisal of differentiation markers in urothelial cells. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*10, 339-343

- Romih R., Korošec P., de Mello W., Jezernik K. 2005. Differentiation of epithelial cells in the urinary tract. *Cell Tissue Res*, 320: 259- 268
- Southgate J., Hutton K.A.R., Thomas D.F.M., Trejdosiewicz L.K. 1994. Normal human urothelial cells in vitro: proliferation and stratification. *Lab Investigation*, Vol. 71, 4: 583-593
- Southgate J., Masters J. R. W., Trejdosiewicz L. K. 2002. Culture of human urothelium. *Culture of Epithelial Cells*, 2. Izdaja. Wiley-Liss, Inc: 381-399
- Schaafsma H. E., Ramaekers S. C. S., van Muijen G. N. P., Ooms E. C. M., Ruiter D. J. 1989. Distribution of cytokeratin polypeptides in epithelia of the human urinary tract. *Histochemistry*, 91: 151-159
- Surya B., Yu J., Manabe M., Sun T.-T., 1990. Assessing the differentiation state of cultured bovine urothelial cells: elevated synthesis of stratification-related K5 and K6 keratins and persistent expression of uroplakin I. *Journal of cell science*, 97: 419-423
- Staehelin L. A., Chlapowski F. J., Bonneville M. A. 1972. Lumenal plasma membrane of the urinary bladder: 1. Three-dimensional reconstruction from freeze-etch images. *J. Cell Biol.* 53: 73-91
- Sterle, M. 1996. Growth and differentiation of urothelial cells in explant culture. *Pflugers Arch – Eur J Physiol*, 431: 245 - 246
- Sterle M., Ergani Kreft M., Batista U., 1997. The effect of epidermal growth factor and transforming growth factor  $\beta_1$  on proliferation and differentiation of urothelial cells in urinary bladder explant culture. *Biology of the cell* 89: 263-271
- Tratnjek L., 2009. Odvisnost endocitotske aktivnosti urotelijskih celic od njihove diferenciacijske stopnje in mikrotubulov. Diplomsko delo. Biotehniška fakulteta. Univerza v Ljubljani
- Truschel S.T., Ruiz W.G., Shulman T., Pilewski J., Sun T.-T., Zeidel M.L., Apodaca G. 1999. Primary uroepithelial cultures. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 274, 21: 15020-15029
- Truschel S. T., Wang E., Ruiz W. G., Leung S. M., Rojas R., Lavelle J., Zeidel M., Stoffer D., Apodaca G. 2002. Stretch-regulated exocytosis/endocytosis in bladder umbrella cell. *Mol. Biol. Cell* 13: 830-846
- Turner A.M., Subramaniam R., Thomas D.F.M., Southgate J. 2008. Generation of a functional, differentiated porcine urothelial tissue in vitro. *European Association of urology*. Vol. 54, 6: 1423-1432
- Veranič P., Jezernik K. 2003. Trajectory organisation of cytokeratins within the subapical region of umbrella cells. *Cell Motion. Cytoskeleton* 53: 317-325
- Veranič P., Romih R., Jezernik K. 2004. What determines differentiation of urothelial umbrella cells? *Cell Biol.* 83: 27-34
- Zhang Y. Y., Ludwikowski B., Hurst R., Frey R. 2001. Expansion and long-term culture of differentiated normal rat urothelial cells in vitro. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, 37: 419-429

- Zhang C., Wang J. Y., Koch K. R., Keay S. Regulation of tight junction proteins and bladder epithelial paracellular permeability by an antiproliferative factor from patients with interstitial cystitis. *The Journal of Urology*. Vol. 174, 2382-2387
- Walz T., Häner M., Wu X., Henn C., Engel A., Sun T-T., Aebi U. 1995. Towards the Molecular Architecture of the Asymmetric Unit Membrane of the Mammalian Urinary Bladder Epithelium: A Closed "Twisted Ribbon" Structure. *J. Mol. Biol.* 248: 887-900
- Wanjg, J. H., Redmond, H. P., Watson, R. W. G., Duggan, S., McCarthy, J., Barry, M., Bouchier-Hayes, D. 1996. Mechanisms involved in the induction of human endothelial cell necrosis. *Cellular Immunology*, 168: 91-99
- Wells C.D., Fawcett J. P., Traweger A., Yamanaka Y., Goudreault M., Elder K., Kulkarni S., Gish G., Virag C., Lim C., Colwill K., Starostine A., Metalnikov P., Pawson T. 2006. A Rich 1/Amot complex regulates the Cdc42 GTPase and apical-polarity proteins in epithelial cells. *Cell* 125: 535-548
- Wu X. R., 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.* 265: 19170-19179
- Yang W., Storrie B., 1997. Scattered Golgi elements during microtubule disruption are initially enriched in trans-golgi proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 9: 191-207
- Ye J., Tsukamoto T., Sun A., Nigam S. K. 1999. A role of intracellular calcium in tight junction reassembly after ATP depletion-repletion. *Am. J. Physiol.* 277: 524-532
- Yu J., Lin J. H., Wu X. R., 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: 171-18

## ZAHVALA

Zahvaljujem se vsem, ki ste mi omogočili nastanek tega dela, me usmerjali, spodbujali in vodili do znanja. Posebej se zahvaljujem vedno nasmejani mentorici doc. dr. Mateji Erdani Kreft za uvajanje v praktično delo v laboratorijih, usmerjanje in koristne nasvete pri izdelavi diplomske naloge.

Hvala zaposlenim na Inštitutu za biologijo celice:

- prof. dr. Kristijanu Jezerniku,
- prof. dr. Maksimiljanu Sterletu,
- doc. dr. Petru Veraniču,
- doc. dr. Roku Romihu,
- asist. dr. Andreji Erman,
- asist. dr. Samu Hudoklinu,
- asist. Nataši Resnik,
- Sabini Železnik,
- Sanji Čebraja,
- Nadi Pavlica,
- Lindi Štrus in
- Marini Jeriha.

Iskreno se zahvaljujem tudi staršema, bratu, fantu in vsem prijateljem za moralno pomoč, potrpljenje in vzpodbudo v času študija ter med izdelavo diplomske naloge.

## PRILOGA

**Priloga A:** Površina vidnega polja z uroplakini na površini dežnikastih celic v različnih hranilnih medijih. Opisne statistike: aritmetična sredina (M), velikost vzorca (N), standardni odklon (SD) in standardna napaka ocene aritmetične sredine (SE).

HRANILNI MEDIJ	M [ $\mu\text{m}^2$ ]	SD	SE	N
UroM (+Ca <sup>2+</sup> +S)	16341,2	9959,56	3149,49	10
UroM (-Ca <sup>2+</sup> +S)	13679,7	10833,93	3425,99	10
UroM (+Ca <sup>2+</sup> -S)	25873,5	8252,49	2609,67	10

Površina vidnega polja je bila 74050  $\mu\text{m}^2$ .

**Priloga B:** Odvisnost med znotrajcelično lokalizacijo uroplakinov in obliko GA v sekundarni urotelijski kulturi.

medij	UroM (-Ca <sup>2+</sup> +S)	UroM (+Ca <sup>2+</sup> -S)	UroM (+Ca <sup>2+</sup> +S)
pregledano št. celic	181	176	202
uroplakini v apikalni plazmalemi in kompleksni GA	26	22	24
brez uroplakinov in osnovni GA	25	13	16
uroplakini v apikalni citoplazmi in prehodni GA	130	141	162

**Priloga C:** Intenziteta fluorescence  $\alpha$ -tubulina in uroplakinov v površinskih urotelijskih celicah z uroplakini v apikalni plazmalemi. Opisne statistike: aritmetična sredina (M), velikost vzorca (N), standardni odklon (SD) in standardna napaka ocene aritmetične sredine (SE).

	M [a.e.]	SD	SE	N
največja intenziteta fluorescence uroplakinov (os Z1)	1419,55	585,09	156,37	14
intenziteta fluorescence $\alpha$ -tubulina (os Z1)	254,14	252,83	67,57	14
intenziteta fluorescence uroplakinov dve optični rezini pod osjo Z1	1271,84	497,86	133,06	14

	M [a.e.]	SD	SE	N
intenziteta fluorescence $\alpha$ -tubulina dve optični rezini pod osjo Z1	338	343,57	91,82	14
najmočnejša intenziteta fluorescenca $\alpha$ -tubulina (os Z2)	413,19	438,4	117,17	14
intenziteta fluorescence uroplakov (os Z2)	636,44	455,84	121,83	14
intenziteta fluorescence $\alpha$ -tubulina dve optični rezini nad osjo Z2	379,84	417,36	111,54	14
intenziteta fluorescence uroplakinov dve optični rezini nad osjo Z2	1009,97	566,81	151,49	14

**Priloga D:** Intenziteta fluorescence  $\alpha$ -tubulina in uroplakinov v površinskih urotelijskih celicah brez uroplakinov v apikalni plazmalemi. Opisne statistike: aritmetična sredina (M), velikost vzorca (N), standardni odklon (SD) in standardna napaka ocene aritmetične sredine (SE).

	M [a.e.]	SD	SE	N
največja intenziteta fluorescence uroplakinov (os Z1)	163,44	182,35	21,64	69
intenziteta fluorescence $\alpha$ -tubulina (os Z1)	1195,14	522,08	61,96	69
intenziteta fluorescence uroplakinov dve optični rezini pod osjo Z1	154,01	75,78	9	69
intenziteta fluorescence $\alpha$ -tubulina dve optični rezini pod osjo Z1	1335,15	605,23	71,83	69
najmočnejša intenziteta fluorescenca $\alpha$ -tubulina (os Z2)	1438,12	576,25	68,39	69
intenziteta fluorescence uroplakov (os Z2)	132,32	54,23	6,44	69
intenziteta fluorescence $\alpha$ -tubulina dve optični rezini nad osjo Z2	1305,26	523,21	62,09	69
intenziteta fluorescence uroplakinov dve optični rezini nad osjo Z2	147,17	68,71	8,15	69

**Priloga E:** Meritve transepitelijske upornosti (TER) sekundarne urotelijske celične kulture med gojenjem v UroM (+Ca<sup>2+</sup>+S). Opisne statistike: aritmetična sredina (M), velikost vzorca (N), standardni odklon (SD) in standardna napaka ocene aritmetične sredine (SE).

Datum	M [ $\Omega\text{cm}^2$ ]	SD	SE	N
23.3.2009	3102,5	874,82	95,45	84
24.3.2009	2202,57	1477,28	124,85	140
25.3.2009	2409,5	1007,92	85,18	140
26.3.2009	2661,57	698,55	59,04	140
27.3.2009	2941,56	658,33	55,64	140
30.3.2009	2298,5	435,37	36,79	140
31.3.2009	3033	621,76	52,55	140
1.4.2009	3273,28	798,51	67,49	140
2.4.2009	3438	976,14	82,49	140
3.4.2009	3918,78	1059,47	89,54	140
6.4.2009	3874,07	1139,16	96,28	140
7.4.2009	5244,36	1390,77	117,54	140
8.4.2009	7167,21	2831,94	239,34	140
9.4.2009	5698,195	2156,50	186,99	140
10.4.2009	4668,04	1535,17	133,12	140
14.4.2009	3926,11	872,8	75,68	140
15.4.2009	4245,26	1407,37	122,03	140
16.4.2009	3759,63	1094,52	94,91	140
17.4.2009	4009,02	1110,62	96,30	140
20.4.2009	3643,23	1079,01	93,56	140
21.4.2009	4105,20	1161,01	100,67	140
22.4.2009	3646,31	920,75	79,84	140
23.4.2009	3396,767	1113,27	96,53	140
24.4.2009	3828,12	1069,32	92,72	140
28.4.2009	2793,53	584,39	50,67	140
29.4.2009	3183,91	846,56	73,40	140
30.4.2009	3545,71	790,11	68,51	140
4.5.2009	3615,94	882,37	76,51	140
5.5.2009	3970,98	1119,16	97,04	140
6.5.2009	2985,86	728,38	63,16	140
7.5.2009	3409,7	881,89	76,47	140
8.5.2009	3556,16	919,54	79,73	140
11.5.2009	3033,68	657,88	57,04	140
12.5.2009	3641,65	939,22	81,44	140
13.5.2009	2754,81	506,88	43,95	140



Datum	M [ $\Omega\text{cm}^2$ ]	SD	SE	N
14.5.2009	3360,07	936,19	81,18	140
15.5.2009	3869,62	937,04	81,25	140
18.5.2009	3409,02	718,39	62,29	140
19.5.2009	3859,62	3034,96	263,16	140
20.5.2009	3272,48	874,12	75,791	140
21.5.2009	3559,62	889,49	77,13	140
22.5.2009	4164,06	1372,03	118,97	140
25.5.2009	3574,51	914,99	79,34	140
26.5.2009	4080,98	1138,19	98,69	140
27.5.2009	3690,53	1234,96	107,08	140

**Priloga F:** Meritve transepitelijske upornosti (TER) sekundarne urotelijske celične kulture med gojenjem v UroM (-Ca<sup>2+</sup>+S). Opisne statistike: aritmetična sredina (M), velikost vzorca (N), standardni odklon (SD) in standardna napaka ocene aritmetične sredine (SE).

Datum	M [ $\Omega\text{cm}^2$ ]	SD	SE	N
23.3.2009	2997,74	979,96	106,92	84
24.3.2009	2626,93	1793,04	151,54	140
25.3.2009	2811,57	1158,87	97,94	140
26.3.2009	3057,21	715,96	60,51	140
27.3.2009	3454,21	715,96	60,51	140
30.3.2009	3194,64	596,24	50,39	140
31.3.2009	4732,93	1069,61	90,39	140
1.4.2009	5282,14	1480,30	125,11	140
2.4.2009	5458,57	1568,57	132,57	140
3.4.2009	5464,14	1298,51	109,74	140
6.4.2009	4455,86	942,59	79,66	140
7.4.2009	6361,43	1508,45	127,49	140
8.4.2009	6899,57	1418,82	119,91	140
9.4.2009	7364,21	2259,93	195,96	140
10.4.2009	6587,59	1981,00	171,77	140
14.4.2009	4860,60	1175,82	101,96	140
15.4.2009	5806,98	2144,67	185,97	140
16.4.2009	4471,90	1338,04	116,02	140
17.4.2009	4451,58	1099,38	95,33	140
20.4.2009	4194,96	799,17	69,3	140
21.4.2009	4803,16	886,65	76,88	140
22.4.2009	4344,29	735,41	63,77	140

Datum	M [ $\Omega\text{cm}^2$ ]	SD	SE	N
23.4.2009	4436,92	1019,74	88,42	140
24.4.2009	5020,98	1064,11	92,27	140
28.4.2009	3704,89	619,18	53,69	140
29.4.2009	4783,91	1010,2	87,59	140
30.4.2009	4255,64	848,95	73,61	140
4.5.2009	4423,38	784,38	68,01	140
5.5.2009	5082,63	1034,57	89,71	140
6.5.2009	3955,04	895,54	77,65	140
7.5.2009	4463,68	1071,17	92,88	140
8.5.2009	5884,89	1498,56	129,94	140
11.5.2009	4341,80	868,09	75,27	140
12.5.2009	6667,59	1547,85	134,22	140
13.5.2009	4929,02	1225,24	106,24	140
14.5.2009	5059,47	1389,33	120,47	140
15.5.2009	5842,03	1488	129,03	140
18.5.2009	4638,5	996,84	86,44	140
19.5.2009	5493,23	1306,07	113,25	140
20.5.2009	5490,45	1441,84	125,02	140
21.5.2009	5044,59	1313,37	113,88	140
22.5.2009	5340,53	1505,11	130,51	140
25.5.2009	3881,20	1285,77	111,49	140
26.5.2009	5103,16	1654,64	143,47	140
27.5.2009	4529,85	1498,29	129,92	140

**Priloga G:** Meritve transepitelijske upornosti (TER) sekundarne urotelijske celične kulture med gojenjem v UroM (+Ca<sup>2+</sup>-S). Opisne statistike: aritmetična sredina (M), velikost vzorca (N), standardni odklon (SD) in standardna napaka ocene aritmetične sredine (SE).

Datum	M [ $\Omega\text{cm}^2$ ]	SD	SE	N
23.3.2009	3301,90	766,98	83,68	84
24.3.2009	2968,83	2103,60	177,79	140
25.3.2009	3885,07	2038,894	172,32	140
26.3.2009	3652	1439,2	121,63	140
27.3.2009	3746,93	1118,95	94,57	140
30.3.2009	3582,5	1037,10	87,65	140
31.3.2009	3662,79	873,80	73,85	140
1.4.2009	3676,21	951,07	80,38	140
2.4.2009	3928,64	990,03	83,67	140

Datum	M [ $\Omega\text{cm}^2$ ]	SD	SE	N
3.4.2009	3912,29	1007,91	85,18	140
6.4.2009	3489,79	839,14	70,92	140
7.4.2009	3457,14	870,28	73,55	140
8.4.2009	3837,29	950,52	80,33	140
9.4.2009	4277,37	979,08	84,9	140
10.4.2009	4346,62	1651,23	143,18	140
14.4.2009	3510	791,38	68,62	140
15.4.2009	3430,24	714,02	61,91	140
16.4.2009	3477,86	725,42	62,90	140
17.4.2009	4140,90	1083,23	93,93	140
20.4.2009	4214,59	894,61	77,57	140
21.4.2009	4256,09	1009,04	87,49	140
22.4.2009	3673,01	873,41	75,73	140
23.4.2009	4292,86	970,33	84,14	140
24.4.2009	5204,59	1287,93	111,68	140
28.4.2009	3997,89	969,63	84,08	140
29.4.2009	4447,97	1270,86	110,2	140
30.4.2009	4134,36	1031,91	89,48	140
4.5.2009	4775,71	1284,72	111,4	140
5.5.2009	5795,19	1670,30	144,83	140
6.5.2009	5088,27	1399,30	121,33	140
7.5.2009	5023,91	1530,55	132,72	140
8.5.2009	5545,26	1401,19	121,5	140
11.5.2009	5116,92	1373,69	119,11	140
12.5.2009	6711,65	2059,14	178,55	140
13.5.2009	5486,09	1499,92	130,06	140
14.5.2009	5925,79	2244,17	194,59	140
15.5.2009	6368,12	2212,23	191,82	140
18.5.2009	5661,13	1693,93	146,88	140
19.5.2009	6567,23	2207,58	191,42	140
20.5.2009	6658,72	2356,08	204,3	140
21.5.2009	5900,23	1807,87	156,76	140
22.5.2009	6823,23	2304,01	199,78	140
25.5.2009	6086,99	1817,5	157,6	140
26.5.2009	7752,26	2746,19	238,12	140
27.5.2009	7520,45	2682,027	232,56	140

**Priloga H:** Meritve transepitelijske upornosti (TER) trajne celične linije ledvičnih celic (MDCK). Opisne statistike: aritmetična sredina (M), velikost vzorca (N), standardni odklon (SD) in standardna napaka ocene aritmetične sredine (SE).

Datum	M [ $\Omega\text{cm}^2$ ]	SD	SE	N
30.3.2009	29,17	20,15	2,19	84
31.3.2009	47,14	22,40	2,44	84
1.4.2009	59,68	10,97	1,12	84
2.4.2009	86,19	21,22	2,31	84
3.4.2009	90,48	23,99	2,62	84
6.4.2009	81,55	21,37	2,33	84
7.4.2009	76,86	13,66	1,49	84
8.4.2009	79,89	29,69	3,24	84
9.4.2009	101,54	37,72	4,11	84
10.4.2009	57,65	34,79	3,8	84
14.4.2009	64,44	16,66	1,82	84
15.4.2009	77,23	19,69	2,15	84
16.4.2009	56,42	26,2	2,86	84
17.4.2009	65,90	29,89	3,26	84
20.4.2009	72,36	29,52	3,22	84
21.4.2009	49,89	21,16	2,31	84
22.4.2009	46,25	14,76	1,61	84
23.4.2009	31,26	31,04	3,39	84
24.4.2009	42,49	31,78	3,47	84
28.4.2009	48,95	14,04	1,53	84
29.4.2009	59,09	11,98	1,31	84
30.4.2009	51,82	10,69	1,17	84
5.4.2009	45,79	14,08	1,54	84
5.5.2009	78,73	12,91	1,41	84
6.5.2009	53,52	14,83	1,62	84
7.5.2009	72,95	23,2	2,53	84
8.5.2009	73,09	17,21	1,88	84
11.5.2009	46,94	14,99	1,63	84
12.5.2009	84,8	15,92	1,74	84
13.5.2009	55,13	11,26	1,23	84
14.5.2009	73,37	15,61	1,70	84
15.5.2009	63,84	13,09	1,43	84
18.5.2009	40,90	11,25	1,23	84
19.5.2009	65,68	11,4	1,24	84
20.5.2009	58,33	9,8	1,07	84

Datum	M [ $\Omega\text{cm}^2$ ]	SD	SE	N
21.5.2009	59,34	14,08	1,53	84
22.5.2009	67,11	9,51	1,04	84
25.5.2009	17,46	18,68	2,04	84
26.5.2009	51,45	24,13	2,63	84
27.5.2009	44,3	23,07	2,52	84

**Priloga I:** Meritve transepitelijske upornosti (TER) trajne celične kulture rakastih urotelijskih celic (T24). Opisne statistike: aritmetična sredina (M), velikost vzorca (N), standardni odklon (SD) in standardna napaka ocene aritmetične sredine (SE).

Datum	M [ $\Omega\text{cm}^2$ ]	SD	SE	N
1.4.2009	-28,57	10,27	2,75	84
2.4.2009	-9,29	4,75	1,27	84
3.4.2009	10,71	6,16	1,65	84
6.4.2009	20	7,84	2,10	84
7.4.2009	-2,64	7,07	1,89	84
8.4.2009	0,71	7,40	1,98	84
9.4.2009	11,36	6,25	1,67	84
10.4.2009	-6,86	7,95	2,13	84
14.4.2009	-3,78	5,32	1,43	84
15.4.2009	0,71	6,57	1,76	84
16.4.2009	4	10,13	2,71	84
17.4.2009	4,64	4,7	1,26	84
20.4.2009	14,93	10,34	2,77	84
21.4.2009	-4,21	17,94	4,81	84
22.4.2009	4,93	8,25	2,21	84
23.4.2009	-33,79	15,94	4,27	84
24.4.2009	-13,64	12,98	3,48	84
28.4.2009	1,86	7,90	2,12	84
29.4.2009	4,07	8,01	2,15	84
30.4.2009	7,79	6,51	1,74	84
5.4.2009	2,86	10,52	2,82	84
5.5.2009	7,14	6,35	1,70	84
6.5.2009	-3,64	12,17	3,26	84
7.5.2009	17,93	11,80	3,16	84
8.5.2009	10,64	9,63	2,58	84
11.5.2009	-0,14	7,61	2,04	84
12.5.2009	28,86	10,24	2,74	84

Datum	M [ $\Omega\text{cm}^2$ ]	SD	SE	N
13.5.2009	11,07	6,45	1,73	84
14.5.2009	8,71	11,51	3,09	84
15.5.2009	7,64	4,68	1,25	84
18.5.2009	-2,71	6,49	1,74	84
19.5.2009	5,57	9,64	2,58	84
20.5.2009	5,5	12,82	3,43	84
21.5.2009	12,29	5,47	1,46	84
22.5.2009	1,64	10,05	2,69	84
25.5.2009	-8,14	7,03	1,88	84
26.5.2009	9,71	7,09	1,9	84
27.5.2009	13,36	14,23	3,81	84