

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Polona GLAŽAR

**MOTORNI PROTEINI V TUNELSKIH
MEMBRANSKIH NANOCEVKAH IN NJIHOVA
VLOGA PRI KOMUNIKACIJI IN RAZŠIRJANJU
BAKTERIJ**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Polona GLAŽAR

**MOTORNI PROTEINI V TUNELSKIH MEMBRANSKIH
NANOCEVKAH IN NJIHOVA VLOGA PRI KOMUNIKACIJI IN
RAZŠIRJANJU BAKTERIJ**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**DETECTION OF MOTOR PROTEINS IN TUNNELING NANOTUBES
AND THEIR ROLE IN BACTERIAL COMMUNICATION AND
DISSEMINATION**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2017

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za biologijo celice Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala izr. prof. dr. Matejo Erdani Kreft, za somentorico doc. dr. Dašo Zupančič in za recenzentko prof. dr. Kristino Sepčič.

Mentorica: izr. prof. dr. Mateja Erdani Kreft

Somentorica: doc. dr. Daša Zupančič

Recenzentka: prof. dr. Kristina Sepčič

Komisija za oceno dela in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Tjaša DANEVČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

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

Članica: doc. dr. Daša ZUPANČIČ
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice

Članica: prof. dr. Kristina SEPČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Polona Glažar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 576.5(043)=163.6
KG	celična biologija/medcelična komunikacija/urotelijske celice/bakterije/tunelske membranske nanocevke /motorni proteini/rak
AV	GLAŽAR, Polona, dipl. mikrobiol. (UN)
SA	ERDANI KREFT, Mateja (mentorica)/ZUPANČIČ, Daša (somentorica)/SEPČIČ, Kristina (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI	2017
IN	MOTORNI PROTEINI V TUNELSKIH MEMBRANSKIH NANOCEVKAH IN NJIHOVA VLOGA PRI KOMUNIKACIJI IN RAZŠIRJANJU BAKTERIJ
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP	XIV, 86 str., 8 pregl., 21 sl., 16 pril., 114 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AJ	Tunelske membranske nanocevke (TnT, angl. Tunneling nanotubes) omogočajo medcelično komunikacijo med evkariontskimi celicami in tudi med bakterijami. TnT so cevasti izrastki, ki povezujejo celice in omogočajo izmenjavo organelov, veziklov in citoplazemskih molekul. V nalogi smo raziskali prisotnost in lokacijo motornih proteinov kinezina 5B, dineina in miozina Va v TnT normalnih urotelijskih celic (NPU) in rakavih urotelijskih celic (T24). Nastanek in morfolologijo TnT smo spremljali s korelativno faznokontrastno-fluorescenčno mikroskopijo. Z metodo prenosa western smo preverjali prisotnost motornih proteinov v celicah NPU in T24, z metodo imunooznačevanja pa njihovo lokacijo v TnT. Dokazali smo, da so izbrani motorni proteini prisotni v TnT celic NPU in T24 in da njihova prisotnost sovпада s prisotnostjo pripadajočih citoskeletnih elementov. Pokazali smo, da se TnT celic NPU in T24 razlikujejo v vsebnosti motornih proteinov in smeri aktivnega transporta, ter da lahko znotraj iste TnT sočasno obstaja več mehanizmov aktivnega transporta. Celice NPU in T24 smo gojili tudi v kokulturi in dokazali, da so motorni proteini prisotni tudi v TnT med normalnimi in rakavimi celicami. Pregled literature je pokazal, da bakterijske TnT nastajajo med bakterijami iste ali različnih vrst in da imajo ključno vlogo pri nastanku in vzdrževanju večceličnih bakterijskih združb in biofilmov. Mehanizmi transporta po bakterijskih TnT so še slabo raziskani. Z magistrsko nalogo smo prispevali nova spoznanja o mehanizmih medcelične komunikacije s TnT, ki bodo, skupaj z nadaljnimi raziskavami, pripomogla k razvoju novih načinov zdravljenja rakavih in infekcijskih obolenj.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 576.5(043)=163.6
CX cell biology/ intercellular communication/urothelial cells/bacteria/tunneling membrane nanotubes /motor proteins/cancer
AU GLAŽAR, Polona
AA ERDANI KREFT, Mateja (supervisor)/ZUPANČIČ, Daša (co-advisor)/SEPČIČ, Kristina (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2017
TI DETECTION OF MOTOR PROTEINS IN TUNNELING NANOTUBES AND THEIR ROLE IN BACTERIAL COMMUNICATION AND DISSEMINATION
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO XIV, 86 p., 8 tab., 21 fig., 16 ann., 114 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Tunneling membrane nanotubes (Tunneling nanotubes,TnTs) are one of the mechanisms of intercellular communication between eukariotic cells and between bacteria. TnTs are tubular protrusions that connect cells and facilitate active transport of organelles, vesicles and cytoplasmic molecules between cells. In this thesis we studied the presence and location of three selected motor proteins: kinesin 5B, dynein and myosin Va in TnTs of normal urothelial cells (NPU) and cancer urothelial cells (T24). We used a method of correlative phase-contrast and fluorescent microscopy to study the development and morphology of TnTs. We used western blot to show that NPU and T24 cells contain different motor proteins, and determined their location in TnT with immunofluorescence. We proved that TnTs contain different motor proteins and that their presence correlates with the presence of appropriate cytoskeletal elements. We found out that TnTs of NPU and T24 cells differ in the content of motor proteins and direction of active transport. We also showed that different mechanisms of active transport can coexist inside one TnT. We cultured normal urothelial cells and cancer urothelial cells in coculture and proved that there are motor proteins present also in TnT between normal and cancer urothelial cells. The examination of the literature on bacterial TnTs showed that TnTs connect bacteria of the same and different species and that TnTs are crucial in development and maintainance of multicellular bacterial communities and biofilms. Mechanisms of transport in bacterial TnTs are still unknown. This master thesis provides new insights into the mechanisms of intercellular communication with TnTs that will in the future, together with further research, importantly contribute to the development of new approaches for treating cancerous and infectious diseases.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
1 UVOD	1
1.1 CILJI IN HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MEDCELIČNA KOMUNIKACIJA	3
2.1.1 Medcelična komunikacija pri evkariontskih celicah	3
2.1.2 Medcelična komunikacija pri bakterijah.....	4
2.2 TUNELSKÉ MEMBRANSKE NANOCEVKE	6
2.2.1 Lastnosti TnT	6
2.2.1.1 Premer in dolžina TnT.....	6
2.2.1.2 Morfologija koncev TnT	7
2.2.1.3 Stabilnost TnT	8
2.2.2 Nastanek TnT	8
2.2.3 Zgradba TnT	9
2.2.3.1 Mikrotubuli.....	10
2.2.3.2 Aktinski filamenti.....	11
2.2.3.3 Intermediarni filamenti.....	11
2.2.3.4 Citoskeletni elementi bakterij.....	12
2.2.4 Funkcije TnT	13
2.2.4.1 Transport celičnih komponent.....	13
2.2.4.2 Prenos signalov	14
2.2.4.3 Prenos molekul imunskega sistema.....	14
2.2.4.4 Prenos patogenov	14
2.2.5 Mehanizmi transporta v TnT	15
2.2.6 TnT normalnih celic.....	16
2.2.7 TnT rakavih celic	17
2.2.8 TnT kokultur	18

2.2.9 TnT bakterij	19
2.2.9.1 Zgradba bakterijskih TnT	21
2.3 MOTORNI PROTEINI V TUNELSKIH MEMBRANSKIH NANOCEVKAH.....	22
2.3.1 Kinezin	22
2.3.2 Dinein	23
2.3.3 Miozin.....	24
2.3.4 Motorni proteini pri bakterijah.....	26
3 MATERIAL IN METODE.....	28
3.1 MATERIAL	28
3.2 GOJENJE CELIC.....	31
3.2.1 Presajanje in štetje celic	31
3.2.2 Nasaditev celic	31
3.2.3 Gojenje monokultur celic NPU in T24 ter kokulture celic (NPU+T24).....	32
3.2.4 Mikroskopiranje celic	32
3.2.5 Hranilni medij	33
3.2.5.1 Hranilni medij za celice NPU in kokulture celic (NPU+T24).....	33
3.2.5.2 Hranilni medij za celice T24	33
3.3 PRENOS WESTERN.....	34
3.3.1 Priprava celičnih lizatov	34
3.3.2 Določanje koncentracije proteinov	34
3.3.3 Elektroforeza	35
3.3.4 Prenos proteinov na nitrocelulozno membrano	35
3.3.5 Imunodetekcija motornih proteinov na nitrocelulozni membrani.....	35
3.3.6 Kontrola nanosa in prenosa proteinov na nitrocelulozno membrano	36
3.4 IMUNOOZNAČEVANJE MONOKULTUR CELIC NPU IN T24 TER KOKULTURE CELIC (NPU+T24).....	37
3.4.1 Dvojno imunooznačevanje α -tubulina in kinezina 5B.....	37
3.4.2 Dvojno imunooznačevanje α -tubulina in dineina	38
3.4.3 Dvojno (imuno)označevanje aktinskih filamentov in miozina Va.....	38
3.4.4 Dvojno imunooznačevanje miozina Va in kinezina 5B	39
3.4.5 Dvojno imunooznačevanje miozina Va in dineina.....	40
3.4.6 Negativna kontrola imunooznačevanja rakavih in normalnih urotelijskih celic	40
3.5 ANALIZA SLIK IN STATISTIČNA ANALIZA.....	41

3.5.1 Merjenje dolžine TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic ter TnT kokulture celic (NPU+T24)	41
3.5.2 Določanje prisotnosti motornih in citoskeletnih proteinov v TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic ter v TnT kokulture celic (NPU+T24)	41
3.5.3 Primerjava vsebnosti in kvantifikacija motornih in citoskeletnih proteinov v TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic ter v TnT kokulture celic (NPU+T24)	41
3.5.4 Določanje lokacije motornih proteinov v TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic ter v TnT kokulture celic (NPU+T24)	43
3.5.5 Statistična analiza podatkov.....	43
4 REZULTATI.....	44
4.1 SPREMLJANJE NASTANKA IN MERJENJE DOLŽINE TUNELSKIH MEMBRANSKIH NANOCEVK	44
4.1.1 Spremljanje nastanka in določanje smeri poteka TnT	44
4.1.2 Analiza dolžine TnT v monokulturah normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic in kokulturi celic (NPU+T24).....	46
4.2 PRISOTNOST IN LOKACIJA MOTORNIH PROTEINOV V TUNELSKIH MEMBRANSKIH NANOCEVKAH NORMALNIH (NPU) IN RAKAVIH (T24) UROTELIJSKIH CELIC, TER KOKULTURE CELIC (NPU+T24).....	47
4.2.1 Preverjanje prisotnosti motornih proteinov v monokulturah normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic z metodo prenosa western	47
4.2.1.1 Kontrola specifičnosti protiteles.....	48
4.2.1.2 Primerjava intenzitete proteinskih prog motornih proteinov v celicah NPU in T24	48
4.2.2 Določanje lokacije motornih in citoskeletnih proteinov v TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic z metodo imunooznačevanja	49
4.2.2.1 Lokacija α -tubulina in kinezina 5B znotraj TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic	50
4.2.2.2 Lokacija α -tubulina in dineina znotraj TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic	51
4.2.2.3 Lokacija F-aktina in miozina Va znotraj TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic	52
4.2.2.4 Lokacija kinezina 5B in miozina Va znotraj TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic	53
4.2.2.5 Lokacija dineina in miozina Va znotraj TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic	54
4.2.3 Lokacija motornih in citoskeletnih proteinov v TnT kokulture celic (NPU+T24)	55
4.3 KVANTIFIKACIJA MOTORNIH PROTEINOV V TUNELSKIH MEMBRANSKIH NANOCEVKAH NORMALNIH (NPU) IN RAKAVIH (T24) UROTELIJSKIH CELIC, TER KOKULTURE CELIC (NPU+T24).....	57

4.3.1 Kvantifikacija vsebnosti motornih in citoskeletnih proteinov v TnT monokultur normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic	57
4.3.2 Kvantifikacija vsebnosti motornih in citoskeletnih proteinov v TnT kokulture celic (NPU+T24)	60
4.3.3 Primerjava vsebnosti motornih proteinov v TnT normalnih (NPU) in rakavih urotelijskih celic (T24) ter v TnT kokulture celic (NPU+T24)	62
4.3.4 Razporeditev motornih proteinov in analiza smeri transporta v TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic ter v TnT kokulture celic (NPU+T24).....	64
5 RAZPRAVA	66
5.1 MOTORNI PROTEINI TUNELSKIH MEMBRANSKIH NANOCEVK NORMALNIH UROTELIJSKIH CELIC NPU, RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC T24 IN KOKULTURE CELIC (NPU+T24).....	66
5.1.1 TnT celic NPU, T24 in kokulture celic (NPU+T24) vsebujejo različne motorne proteine, katerih prisotnost sovpada s prisotnostjo pripadajočih citoskeletnih elementov.....	66
5.1.2 Znotraj TnT lahko hkrati deluje več mehanizmov aktivnega transporta, kar omogoča dvosmerni prenos snovi	67
5.1.3 Aktivni transport, ki temelji na kinezinu 5B, je v TnT celic T24 intenzivnejši kot v TnT celic NPU	68
5.1.4 TnT omogočajo aktivni transport snovi med celicami NPU in T24.....	70
5.2 TUNELSKIE MEMBRANSKE NANOCEVKE BAKTERIJ.....	71
5.2.1 TnT imajo ključno vlogo pri vzpostavljanju večceličnih baterijskih združb	71
5.2.2 TnT predstavljajo nov in učinkovit mehanizem transporta molekul med bakterijami	72
5.2.3 TnT bakterij kot mehanizem za prenos patogenov	74
6 SKLEPI	75
7 POVZETEK.....	76
8 VIRI.....	78
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Primeri TnT pri različnih celičnih tipih, sestava njihovega citoskeleta ter prisotnost motornih proteinov in tovora, ki ga prenašajo.....	16
Preglednica 2: Aparature, ki smo jih uporabljali.....	28
Preglednica 3: Uporabljen laboratorijski material in kemikalije.....	28
Preglednica 4: Kulture gojenih celic in njihove nasaditvene gostote.....	32
Preglednica 5: Sestavine hranilnega medija UroM ($-Ca^{2+} + S$) za gojenje monokulture celic NPU in kokulture celic (NPU+T24).....	33
Preglednica 6: Sestavine hranilnega medija A-DMEM za gojenje celic T24.	34
Preglednica 7: Sestava poliakrilamidnih gelov za elektroforezo.....	35
Preglednica 8: Molekulska masa in gostota uporabljenega poliakrilamidnega gela za posamezno protitelo.....	36

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz TnT med donorsko in akceptorsko celico.	7
Slika 2: Shema različnih oblik TnT med bakterijami in shema prenosa tovora med dvema bakterijskima celicama.	20
Slika 3: Shematski prikaz zgradbe motornega proteina kinezina 5B in njegovega gibanja po mikrotubulu v smeri konca plus.	23
Slika 4: Shematski prikaz motornega proteina dineina in njegovega gibanja po mikrotubulu v smeri konca minus.	24
Slika 5: Shematski prikaz zgradbe motornega proteina miozina Va in njegovega premikanja po aktinskem filamentu v smeri konca plus.	26
Slika 6: Prikaz merjenja dolžine TnT. TnT med celicama NPU.	41
Slika 7: Prikaz postopka kvantifikacije vsebnosti motornih proteinov v TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic.	42
Slika 8: Primerjava korelativne faznokontrastne in fluorescenčne mikroskopije TnT normalnih urotelijskih celic (NPU), rakavih urotelijskih celic (T24) in kokulture celic (NPU+T24).	45
Slika 9: Analiza dolžine TnT normalnih urotelijskih celic (NPU), rakavih urotelijskih celic (T24) in kokulture celic (NPU+T24).	47
Slika 10: Prenos western lizatov normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic po 2 in 7 dneh gojenja ter lizatirov celic NPU celic po 3 tednih gojenja.	49
Slika 11: Imunooznačevanje α -tubulina in kinezina 5B v TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic.	50
Slika 12: Imunooznačevanje α -tubulina in dineina v TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic.	51
Slika 13: (Imuno)označevanje F-aktina in miozina Va v TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic.	52
Slika 14: Imunooznačevanje miozina Va in kinezina 5B v TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic.	53
Slika 15: Imunooznačevanje dineina in miozina Va v TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic.	54

Slika 16: (Imuno)označevanje citoskeletnih proteinov α -tubulina in F-aktina, ter motornih proteinov kinezina 5B, dineina in miozina Va v TnT kokulture normalnih in rakavih urotelijskih celic (NPU+T24).	56
Slika 17: Odstotek TnT normalnih (NPU; levo) in rakavih (T24; desno) urotelijskih celic, ki vsebujejo določen motorni ali citoskeletni protein ali ustrezno kombinacijo.	59
Slika 18: Odstotek TnT, ki so v kokulturah (NPU+T24) nastale med celicami NPU in T24, in vsebujejo določen motorni ali citoskeletni protein ali kombinacijo obeh.....	61
Slika 19: Vsebnost motornih proteinov v TnT.....	63
Slika 20: Razporeditev motornih proteinov glede na donorsko in akceptorsko celico v TnT normalnih (NPU) in rakavih urotelijskih celic (T24) ter TnT kokulture celic (NPU+T24).65	

KAZALO PRILOG

Priloga A: Biološke ponovitve, neodvisni poskusi in tehnične ponovitve.....	1
Priloga B: Sestava pufra RIPA (pH=8) z dodanim PMSF.....	4
Priloga C: Sestava nanašalnega pufra dodanega lizatom celic pred elektroforezo.....	4
Priloga D: Sestava pufra za elektroforezo (Running buffer).....	4
Priloga E: Sestava pufra za prenos proteinov na nitrocelulozno membrano (Transfer buffer).....	5
Priloga F: Sestava pufra PEM/TX (pH=6,8).....	5
Priloga G: Premer celičnega jedra pri celicah NPU in T24.	6
Priloga H: Dolžina TnT pri celicah NPU, T24 in kokulturi celic (NPU+T24).....	7
Priloga I: Število TnT na cm ² v monokulturah celic NPU in T24 ter v kokulturi celic (NPU+T24).....	7
Priloga J: Kvantifikacija motornih in citoskeletnih proteinov v TnT v TnT celic NPU, T24 in v TnT kokulture celic (NPU+T24).....	8
Priloga K: Primerjava vsebnosti motornih proteinov v TnT celic NPU, T24 in v TnT kokulture celic (NPU+T24).....	9
Priloga L: Razporeditev motornih proteinov v TnT celic NPU, T24 in v TnT kokulture celic (NPU+T24).....	10

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A-DMEM	definiran hranilni medij za rakave urotelijske celice T24
ATP	adenozin trifosfat
BCA	komplet reagentov za kolorimetrično detekcijo in kvantifikacijo proteinov (Thermo Scientific; BCA Protein Assay)
BCG	bakterija <i>Mycobacterium bovis</i> Bacillus Calmette-Gueirin
BSA	goveji serumski albumin (angl. Bovine Serum Albumin)
<i>B. subtilis</i>	bakterija <i>Bacillus subtilis</i>
CO ₂	ogljikov dioksid
DAPI	fluorescentno barvilo, ki obarva kromatin (4,6-diamidino-2-fenilindol)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. Deoxyribonucleic acid)
DU 145	celična linija, ki izvira iz karcinoma humane prostate
EBV	Eppstein-Barr virus
<i>E. coli</i>	bakterija <i>Escherichia coli</i>
EGFP	ojačan zeleni fluorescenčni protein (angl. Enhanced Green Fluorescent Protein)
F12	kemijsko definirana hranilna mešanica uporabljena v medijih za gojenje celic
FBS	fetalni goveji serum (angl. Fetal Bovine Serum)
FtsZ	protein, ki je bakterijski homolog tubulina in sodeluje pri delitvi celic
GFP	zeleni fluorescenčni protein (angl. Green Fluorescent Protein)
GTP	gvanozin trifosfat
HIV-1	človeški virus imunske pomanjkljivosti tipa 1
HLA I	človeški levkocitni antigen, ki igra pomembno vlogo v imunskem sistemu
HRP	hrenova peroksidaza (angl. Horseradish peroxidase)
LP9	celična linija, ki izvira iz normalnega humanega mezotelija
MCF7	celična linija, ki izvira iz karcinoma dojke

mikroRNA	kratko, nekodirajoče zaporedje ribonukleinske kisline (angl. Micro-ribonucleic acid)
MreB, MreI	bakterijski proteini, homologi aktina
MSTO211H	celična linija, ki izvira iz karcinoma humanega mezotelija
NK	naravne celice ubijalke (angl. Natural Killer cells)
NPU	normalne prašičje urotelijske celice
NRK	normalne podganje ledvične celice (angl. Normal Rat Kidney cells)
ParM	prokariontski protein, homolog aktina
PBS	fosfatni pufer (angl. Phosphate Buffered Saline)
PC12	celična linija, ki izvira iz podganjega feocitokroma
RT4	trajna celična linija, ki izvira iz benignega karcinoma humanega urotelija
SDS	natrijev dodecilsulfat (angl. Sodium Dodecyl Sulphate)
SE	standardna napaka (ang. Standard Error)
T24	trajna celična linija, ki izvira iz malignega karcinoma humanega urotelija
TEMED	tetrametiletilen diamin (angl. tetramethylethylenediamine)
TnT	tunelske membranske nanocerkve (angl. tunneling membrane nanotubes)
UroM	definiran hranilni medij za normalne prašičje urotelijske celice in kokulture

1 UVOD

Medcelična komunikacija je osnovni proces, ki omogoča združevanje normalnih evkariontskih celic v tkiva, ključno vlogo pa ima tudi pri razvoju in napredovanju rakavih tvorbo. Zelo pomembna je tudi pri nastanku večceličnih bakterijskih združb in biofilmov, ki so v naravi zelo pogosti. Tunelske membranske nanocevke (TnT, angl. Tunneling nanotubes), ki so jih prvič opisali leta 2004, predstavljajo nov, še ne popolnoma raziskan način izmenjave snovi in informacij med celicami (Rustom in sod., 2004). Do nedavnega je veljalo prepričanje, da so TnT prisotne zgolj med evkariontskimi celicami, vendar sta Dubey in Ben-Yehuda v svoji študiji dokazala, da jih kot mehanizem za komunikacijo uporabljajo tudi bakterije iste ali različnih vrst (Dubey in Ben-Yehuda, 2011). Celično biološki mehanizmi nastanka in vloge TnT so zaenkrat dokaj slabo poznani, prav tako kot njihova vloga v karcinogenezi in patogenezi infekcijskih bolezni.

1.1 CILJI IN HIPOTEZE

Namen magistrske naloge je bil raziskati prisotnost motornih proteinov kinezina 5B, dineina in miozina Va v TnT normalnih urotelijskih celic (NPU), ki izvirajo iz normalnega prašičjega urotelija, in v TnT rakavih urotelijskih celic (T24), ki izvirajo iz visoko malignega karcinoma humanega urotelija. Zanimalo nas je, ali obstajajo razlike v vsebnosti motornih proteinov v TnT normalnih in rakavih urotelijskih celic. Prisotnost motornih proteinov v monokulturah smo najprej preverili z metodo prenosa western. Z metodo imunooznačevanja, ki nam je omogočila določanje njihove natančne znotrajcelične lokacije, smo dokazali, da se motorni proteini nahajajo znotraj TnT celic NPU in T24 ter da je njihova prisotnost pogojena s prisotnostjo ustreznega citoskeletnega elementa. Zanimalo nas je, ali sta znotraj iste TnT prisotna dva različna mehanizma aktivnega transporta, ki omogočata dvosmerno izmenjavo snovi med celicama, in ali aktivni transport snovi poteka tudi po TnT v kokulturi normalnih in rakavih urotelijskih celic.

Preučili smo pregled literature o prisotnosti in vlogi TnT med bakterijami. Ugotovili smo, da imajo TnT v naravi zelo pomembno vlogo pri nastanku in vzdrževanju večceličnih bakterijskih združb ter da omogočajo komunikacijo in izmenjavo snovi tudi med evolucijsko oddaljenimi vrstami.

DELOVNE HIPOTEZE

H1: TnT vsebujejo različne vrste motornih proteinov.

H2: Vsebnost motornih proteinov v TnT rakavih in normalnih urotelijskih celic je različna.

H3: Prisotnost motornih proteinov v TnT je povezana s prisotnostjo določenih citoskeletnih elementov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MEDCELIČNA KOMUNIKACIJA

Medcelična komunikacija in komunikacija celic z okoljem je osnovni pogoj za obstoj in delovanje bioloških sistemov. Sposobnost celic, da z različnimi mehanizmi skrbijo za učinkovito izmenjavo informacij, je omogočila razvoj in vzdrževanje kompleksnejših, večceličnih organizmov. Različna živalska in rastlinska tkiva niso samo skupki celic, ampak visoko organizirane populacije, ki si ves čas izmenjujejo informacije o zunaj- in znotraj-celičnem okolju (Gurke in sod., 2008a).

Nedolgo nazaj je za bakterije veljalo, da so kot individualne celice samozadostne. Domnevalo se je, da niso sposobne medsebojne komunikacije in ne zmorejo povezovanja v združbe. Odkritje, da se bakterije združujejo v kompleksne večcelične sisteme in da komunicirajo na različne načine je izrazito spremenilo naš pogled na bakterije kot organizme in povzročitelje bolezni (Greenberg, 2003).

2.1.1 Medcelična komunikacija pri evkariontskih celicah

Sposobnost združevanja rastlinskih in živalskih celic v tkiva, v katerih vsaka celica ohrani svojo individualno funkcijo, hkrati pa je njihovo vedenje usklajeno, je ključno za preživetje večceličnih organizmov. Z evolucijo so se zato razvili številni načini izmenjave informacij med celicami znotraj tkiva (Kumar in Gilula, 1996).

Najpomembnejši način komunikacije med evkariontskimi celicami je izločanje signalnih molekul v medcelični prostor, po katerem te molekule potujejo s pomočjo difuzije in se vežejo na receptorje sosednjih ali bolj oddaljenih tarčnih celic. Vezava signalnih molekul, kot so citokini, rastni dejavniki in hormoni, na receptorske molekule sproži v tarčni celici kaskado reakcij in s tem omogoči spremembo v delovanju proteinov in/ali izražanju genov (Kimura in sod., 2012).

Drugi način komunikacije je izločanje majhnih membranskih veziklov, premera 40 do 100 nm, imenovanih eksosomi, ki vsebujejo različne molekule (Stoorvogel in sod., 2002). Eksosomi nastanejo v notranjosti multivezikularnih teles in se ob eksocitozi izločijo iz celice, ter se ob stiku z drugo celico zlijejo z njeno plazmalemo (Fevrier in Raposo, 2004).

Presledkovni stiki so skupki medceličnih kanalčkov, ki nastanejo med dvema sosednjima celicama, katerih plazmalemi se stikata (Alberts in sod., 2002). Kanalčke tvorijo kompleksi transmembranskih proteinov, imenovani koneksini, ki omogočajo prehod majhnih, v vodi topnih molekul in anorganskih ionov iz citoplazme ene celice v drugo. Presledkovni stiki, ki jih najdemo v večini živalskih tkiv, omogočajo tudi prenos električnih signalov (Alberts in sod., 2002; Goodenough in Paul, 2009).

V rastlinskih tkivih, ki so zaradi rigidnih celičnih sten organizirana drugače kot živalska, komunikacijo med celicami omogočajo plazmodezme (Alberts in sod., 2002). Cilindrični kanalčki s premerom 20 do 40 nm, ki prehajajo celično steno, omogočajo izmenjavo molekul med sosednjimi celicami. Podobno kot presledkovni stiki omogočajo reguliran prehod manjših, topnih molekul in ionov (Lucas in Lee, 2004; Alberts in sod., 2002).

Način komunikacije med celicami, ki so ga odkrili šele nedavno, in je podrobneje predstavljen v tej nalogi, so tunelske membranske nanocevke (TnT, angl. Tunneling nanotubes). TnT so cevaste membranske nanostrukture, ki povezujejo dve celici in omogočajo izmenjavo snovi. Prvič so bile opisane leta 2004 kot nova oblika medcelične komunikacije med celicami celične linije PC12 (celice feocitokroma podgane) (Rustom in sod., 2004).

2.1.2 Medcelična komunikacija pri bakterijah

Bakterije se v naravi pogosto združujejo v večcelične združbe, ki jih imenujemo biofilmi, in so večinoma sestavljeni iz pripadnikov različnih bakterijskih vrst. Združevanje jim omogoča opravljanje določenih aktivnosti, pri katerih je za želen učinek na okolje ključna dovolj visoka gostota celic (Madigan in sod., 2010). Takšne aktivnosti so na primer bioluminiscenca, sporulacija, produkcija antibiotikov in izločanje virulentnih dejavnikov (Ng in Bassler, 2009). Medcelična komunikacija koristi celotni populaciji v biofilmu in pripomore k evolucijski uspešnosti bakterij. Pogoji zanjo je sposobnost pripadnikov večcelične združbe, da si izmenjujejo informacije in uskladijo izražanje genov (Kolter in Greenberg, 2006).

Bakterije med seboj komunicirajo na različne načine. Informacije si najpogosteje izmenjujejo z izločanjem in zaznavanjem ter sprejemanjem signalnih molekul. Ob dovolj visoki gostoti celic in s tem koncentraciji signala se le-ta znotraj celic veže na specifične aktivatorske proteine in sproži prepisovanje določenih genov (Madigan in sod., 2010). Takšno obliko komunikacije, ki je bila prvič opisana pri bakteriji *Vibrio fischeri*, imenujemo »zaznavanje celične gostote« ali »zaznavanje kvoruma« (angl. quorum sensing) in služi predvsem spremljanju gostote bakterijske populacije ter uravljanju

izražanja genov (Nealson and Hastings, 1979). »Zaznavanje celične gostote« je razširjeno predvsem pri po Gramu negativnih bakterijah, vendar ga najdemo tudi pri predstavnikih po Gramu pozitivnih bakterij (Madigan in sod., 2010).

Izmenjava informacij poteka pri po Gramu negativnih bakterijah tudi s pomočjo membranskih veziklov velikosti od 20 do 200 nm (Hoekstra in sod., 1976), ki jih bakterije izločajo v zunajcelični prostor. Vezikli, ki lahko potujejo tudi na daljše razdalje, prenašajo molekule, ki omogočajo zaznavanje celične gostote (angl. »quorum sensing«), protimikrobne dejavnike, toksine in celo DNA (Mashburn-Warren in Whiteley, 2006).

Različne študije so pokazale tudi načine bakterijske komunikacije, pri katerih sosednji celici med seboj vzpostavita direktno citoplazemsko povezavo. Pri filamentoznih cianobakterijah poteka izmenjava majhnih citoplazemskih molekul, kot so sladkorji in aminokisline, skozi medcelične kanalčke, imenovane mikroplazmodezme. Ta povezava je ključna za njihovo preživetje, saj omogoča izmenjavo snovi med heterocistami, ki fiksirajo dušik in fotosintetski celicami, ki proizvajajo hranila (Giddings in Staehelin, 1981).

Poseben način komunikacije med bakterijskimi celicami, ki je pogojen s fizičnim stikom med dvema celicama, je konjugacija, ki predstavlja najpomembnejši način horizontalnega prenosa genov med bakterijami. Gre za proces, pri katerem se dve celici povežeta s cevki podobno strukturo, imenovano pilus, po kateri se nato DNA prenese iz donorske v akceptorsko celico (Tatum in Lederberg, 1947).

Leta 2011 sta Dubey in Ben-Yehuda odkrila, da bakterije komunicirajo tudi s pomočjo tunelskih membranskih nanocevk, ki so bile do takrat poznane zgolj pri evkariontskih celicah (Dubey in Ben-Yehuda, 2011).

2.2 TUNELSKES MEMBRANSKE NANOCEVKE

TnT so tanke, cevaste membranske strukture, ki povezujejo celice in vzdržujejo neprekinjenost njihove plazmaleme (Rustom in sod., 2004). Opažene so bile v različnih vrstah trajnih in primarnih celičnih kultur, kjer omogočajo medcelični prenos organelov in citoplazemskih molekul (Gerdes in sod., 2007). Njihovo prisotnost so dokazali tudi v različnih tkivih *in vivo* (Austefjord in sod., 2014).

2.2.1 Lastnosti TnT

TnT povezujejo celice in omogočajo nastanek celičnih omrežij (Hodneland in sod., 2006; Gerdes in sod., 2007). Največkrat imajo obliko ravne, mostičku podobne strukture, le v redkih primerih so razvejane (Rustom in sod., 2004, Önfelt in sod., 2006).

Glavni kriteriji za identifikacijo TnT so morfološki, saj specifični proteinski označevalci do danes še niso bili odkriti (Austefjord in sod., 2014). TnT so v različnih študijah opazovali tako s svetlobno kot tudi z elektronsko mikroskopijo (Rustom in sod., 2004; Gurke in sod., 2008b; Sowinski in sod., 2008). Študije izvedene v zadnjem desetletju so pokazale veliko heterogenost v morfologiji in strukturi TnT, tudi znotraj posamezne celične linije (Önfelt in sod., 2006).

Značilnost TnT je, da se nikoli ne dotikajo podlage, temveč njihov najdaljši del lebdi v mediju (Rustom in sod., 2004). To je nekoliko manj opazno pri celicah, ki so ploščate ali nepravilne (asimetrične) oblike, kot so na primer normalne celice podganjih ledvic (NRK) *in vitro* in makrofagi *ex vivo* (Önfelt in sod., 2006).

2.2.1.1 Premer in dolžina TnT

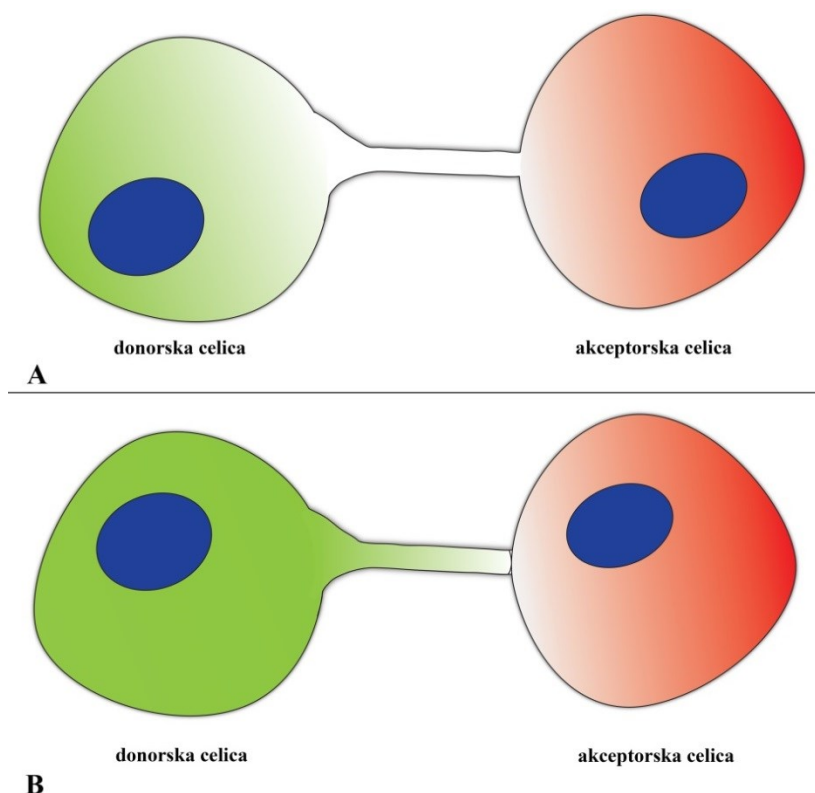
Premer in dolžina TnT sta odvisna od celične linije, vendar v splošnem velja, da njihov premer obsega med 50 in 200 nm, dolžina pa je lahko daljša od več dolžin celice (Rustom in sod., 2004). V kulturah humanih in glodalskih makrofagov (J774), z virusom Epstein-Barr (EBV) transformiranih humanih limfocitov B (721.221) in naravnih celic ubijalk (NK) je bila povprečna dolžina TnT 30 μm , v nekaterih primerih pa je presegla 140 μm (Önfelt in sod., 2004). V primeru humanih makrofagov so opazili dve podvrsti TnT: tanke, s premerom manjšim od 0,7 μm in debelejše, s premerom večjim od 0,7 μm (Önfelt in sod., 2006). Med rakavimi celicami humane prostate (DU 145) so prav tako opazili tanjše (premer med 100 in 200 nm) ter debelejše TnT (premer večji od 1 μm), njihova dolžina pa

je bila med nekaj mikrometri pa vse do 100 μm (Vidulescu in sod., 2004). Dolžina TnT rakavih urotelijskih celic T24 je bila med 25 in 32 μm , dolžina TnT normalnih prašičjih urotelijskih celic pa med 73 in 119 μm (Baraga, 2015).

Migracija celic povzroča spremembe v razdalji med celicami, zaradi česar je dolžina cevke dinamično regulirana (Sowinski in sod., 2008). TnT se prekinejo, ko je oddaljenost med celicama prevelika (Austefjord in sod., 2014).

2.2.1.2 Morfologija koncev TnT

Konci TnT sodelujejo pri tvorbi stikov med donorsko celico, iz katere izrašča TnT, in akceptorsko (tarčno) celico, na katero se TnT pritrdi, in so po morfologiji heterogeni (Hurtig in sod., 2010). Študije so pokazale, da obstajajo odprti in zaprti konci TnT (Slika 1), ki so rezultat uspešnega oziroma neuspešnega zlitja TnT s plazmalemo akceptorske celice. Odprti konci omogočajo prost prehod snovi, med drugim tudi večjih veziklov in mitohondrijev. V primeru zaprtega konca lahko poteka prenos snovi v akceptorsko celico s pomočjo endocitoze (Davis in Sowinski, 2008).



Slika 1: Shematski prikaz TnT med donorsko in akceptorsko celico. TnT z odprtim koncem, ki omogoča prost prehod snovi med celicama (A). TnT z zaprtim koncem, pri kateri prehajajo snovi v akceptorsko celico z endocitozo (B).

2.2.1.3 Stabilnost TnT

Opazovanje in raziskovanje TnT je težavno, saj so zelo občutljive na zunanje vplive, kot so daljša obdobja osvetljevanja, mehanski stres ali kemijska fiksacija (Rustom in sod., 2004). Kabaso in sod. (2011) so dokazali, da so TnT občutljive tudi na temperaturo, saj se je število TnT v kulturi rakavih urotelijskih celic T24 zmanjšalo, ko so celice gojili pri sobni temperaturi (23 °C).

Stabilnost TnT je odvisna od lipidne sestave njihove plazmaleme in citoskeletnih elementov, ki jih vsebujejo, ter je zelo raznolika (Veranič in sod., 2008). TnT so med limfociti T (Sowinski in sod., 2008) in med celicami feocitokroma podgane (PC12) prisotne od zgolj nekaj minut do 1 ure, medtem ko TnT med normalnimi podganjimi ledvičnimi celicami vzdržijo tudi do več ur (Bukoreshtliev in sod., 2009).

2.2.2 Nastanek TnT

V literaturi sta opisana dva različna načina nastanka TnT (Gurke in sod., 2008b). Prvi način so opisali že Rustom in sod. (2004), ki so preučevali izraščanje filopodijem podobnih izrastkov iz celic feocitokroma podgane (PC12), ki se podaljšujejo v smeri sosednjih celic. Ko izrastek vzpostavi kontakt s sosednjo celico, se vzpostavi razširjena in pogosto upognjena povezava, ki se kasneje pretvori v ravno in tanko strukturo imenovano tunelska membranska nanocevka (Rustom in sod., 2004). Navidezno usmerjeno izraščanje filopodijem podobnih izrastkov, iz katerih se razvijejo TnT, je sprožilo tudi ugibanja o vplivu kemotakse na nastanek TnT (Gurke in sod., 2008b).

Drugi način nastanka TnT je, ko se dve celici, ki sta se pred tem stikali, odmakneta druga od druge, in med njima ostane medcelična povezava (Önfelt in sod., 2004; Gerdes in sod., 2007). Za uspešno tvorbo TnT je pomembno, da sta celici, preden se odmakneta, v stiku vsaj nekaj minut (Sowinski in sod., 2008). Takšen način nastanka TnT je bil opisan tako pri celicah feocitokroma podgane (PC12) (Rustom in sod., 2004), kot tudi pri limfocitih T (Sowinski in sod., 2008) in ni odvisen od kemotaktičnih signalov (Gurke in sod., 2008b).

Oba načina nastanka TnT zahtevata polimerizacijo aktina (Gerdes in sod., 2007). Pri prvem mehanizmu je polimerizacija aktina ključna za nastanek TnT, pri drugem za njeno stabilizacijo (Gurke in sod., 2008b). Dokaz za to je študija v kateri so izmerili, da je hitrost izraščanja TnT 0,2 µm na sekundo, kar se ujema z izmerjeno hitrostjo polimerizacije aktina (Cameron in sod., 1999). Dodatno so Rustom in sod. (2004) dokazali, da snovi, ki preprečujejo polimerizacijo aktina, kot je latrunkulin B, preprečujejo tudi nastanek TnT.

Plazmalema se mora ob nastanku TnT prilagoditi spremembam, ki nastanejo zaradi vpliva mehanskih sil, če želi ohraniti svojo kontinuiteto. Ker je sestavljena iz lipidnega dvosloja, se na pritiske mehanskih sil odziva plastično (Hurtig in sod., 2010). Številne celice v svoji površini skladiščijo viške plazmaleme v obliki gub ali vanjo dodajajo lipide iz citoplazme (Dawis in Sowinski, 2008; Hurtig in sod., 2010). Zaloge plazmaleme v celici lahko tako vplivajo na število, dolžino in stabilnost TnT (Gurke in sod., 2008b).

2.2.3 Zgradba TnT

TnT gradijo citoskeletni elementi (Austefjord in sod., 2014). Večina TnT vsebuje snop aktinskih filamentov (F-aktin), ki se razteza po celotni dolžini nanocevke (Rustom in sod., 2004; Önfelt in sod., 2006; Gurke in sod., 2008b). Ker so aktinski filament ključni pri nastanku TnT, so ena izmed najpomembnejših tarč za njihovo označevanje in spremljanje (Austefjord in sod., 2014). Bukoreshtliev in sod. (2009) so dokazali, da prisotnost citohalazina, ki povzroča depolimerizacijo aktinskih filamentov, inhibira nastanek TnT med celicami feocitokroma podgane (PC12).

Veranič in sod. (2008) so v celičnih linijah rakavih urotelijskih celic (RT4, izoliranih iz neinvazivnega papilarnega karcinoma urotelija, in T24, izoliranih iz invazivnega karcinoma urotelija) odkrili dva tipa TnT, ki se razlikujeta v vsebnosti citoskeletnih elementov. TnT tipa I vsebujejo aktinske filamente, zrastejo do 30 µm in so dinamične. TnT tipa II vsebujejo intermediarne filamente citokeratine in dosežejo dolžino do več 100 µm ter so stabilne (Veranič in sod., 2008). V TnT celic feocitokroma podgane (PC12) (Rustom in sod., 2004) in v normalnih podganjih ledvičnih celicah (Gurke in sod., 2008b) so z imunooznačevanjem odkrili samo prisotnost aktinskih filamentov.

Önfelt in sod. (2006) so dokazali, da tudi humani makrofagi tvorijo dva tipa TnT. TnT tipa I vsebujejo samo aktinske filamente in so tanjše, TnT tipa II pa aktinske filamente in mikrotubule ter dosežejo debelino do 700 nm. Mikrotubule so odkrili tudi v TnT kardiomioblastov (H9c2) (He in sod., 2010), celic humanega pljučnega karcinoma (Wang in sod., 2012b), naravnih celic ubijalk (Chauveau in sod., 2010), ter v kokulturi primarnih živčnih celic in astrocitov (Wang in sod., 2012a). Mikrotubuli so nekoliko manj dinamični kot aktinski filament (Gittes in sod., 1993), zaradi česar bi prisotnost mikrotubulov lahko pomenila večjo stabilnost in daljšo življenjsko dobo TnT (Austefjord in sod., 2014).

2.2.3.1 Mikrotubuli

Mikrotubuli so dolge, relativno rigidne, cilindrične strukture, s premerom 25 nm, ki jih gradita proteina α - in β -tubulin. Rastejo iz majhnega področja v celici, imenovanega centrosom, ki se običajno nahaja v bližini jedra, ter se zvezdasto širijo proti periferiji celice. Centrosom določa število mikrotubulov v celici in njihovo orientacijo v citoplazmi (Alberts in sod., 2003).

Glavna naloga mikrotubulov je, da v interfazni celici določajo razporeditev membranskih organelov in omogočajo znotrajcelični transport (Alberts in sod., 2002). Ključni so tudi za tvorbo stabilnih struktur, kot so bički in migetalke, ki jih najdemo na površini celic (Fletcher in Mullins, 2010). Med celično delitvijo (v fazi M celičnega cikla) tvorijo mikrotubuli dinamično strukturo, imenovano delitveno vreteno, ki omogoča pravilno razporeditev in potovanje kromosomov v obe hčerinski celici.

Osnovna podenota mikrotubula je dimerna molekula tubulina, ki je sestavljena iz dveh globularnih proteinov, α - in β -tubulina. Dimerne molekule α - in β -tubulina se med seboj povezujejo v polimere, imenovane protofilamenti, ki se paralelno povežejo in tvorijo steno cilindrično oblikovanega mikrotubula (Alberts in sod., 2003). Za vsak protofilament, kot tudi za celoten mikrotubul, je značilna strukturna polarnost, ki je ključna za opravljanje njihove funkcije v celici. Konec z izpostavljenimi β -tubulini predstavlja bolj dinamičen konec plus, medtem ko del z izpostavljenimi α -tubulini predstavlja konec minus (Alberts in sod., 2002).

Posebna značilnost mikrotubulov je dinamična nestabilnost oziroma hitro preklapljanje med polimerizacijo in depolimerizacijo, ki je posledica sposobnosti tubulinskih dimerov, da hidrolizirajo GTP (gvanozin trifosfat) (Mitchison in Kirschner, 1984). Med polimerizacijo se na konec plus mikrotubula vežejo novi dimeri α - in β -tubulina, z vezanimi molekulami GTP. Dokler je hitrost vezave novih dimerov večja od hitrosti, s katero tubulin hidrolizira vezane molekule GTP v GDP (gvanozin difosfat), mikrotubul raste. Če končne molekule tubulina hidrolizirajo svoje vezane molekule GTP v GDP preden se nanje vežejo novi dimeri, se začne depolimerizacija mikrotubula, ki je lahko delna, lahko pa povzroči razgradnjo celotnega mikrotubula (Alberts in sod., 2002).

Strukturna polarnost mikrotubulov omogoča vezavo motornih proteinov iz družin kinezinov in dineinov, ki transportirajo različne celične komponente in organele znotraj celice (Fletcher in Mullins, 2010).

2.2.3.2 Aktinski filament

Aktinski filament, imenovani tudi mikrofilament, so najtanjši izmed citoskeletnih elementov in so prisotni v vseh evkariontskih celicah (Alberts in sod., 2003). Sestavljeni so iz globularnega proteina G-aktina, katerega molekule se s pomočjo hidrolize ATP (adenozin trifosfat) povezujejo v protofilament. Dva paralelna protofilamenta sta ovita drug okrog drugega in tvorita desnosučno vijačnico, ki jo imenujemo filamentozni aktin (F-aktin) ali aktinski filament (Alberts in sod., 2002). Aktinski filament ima obliko vlaken s premerom od 5 do 9 nm, ki se v celici zelo redko pojavljajo samostojno, z navzkrižnim povezovanjem namreč tvorijo snope, omrežja ali različne trirazsežnostne (3D) strukture, ki so veliko močnejše od individualnih filamentov (Fletcher in Mullins, 2010). Čeprav so razporejeni po celotni celici, je njihova koncentracija največja tik pod plazmalemo celice (Alberts in sod., 2002). V primerjavi z mikrotubuli so aktinski filament tanjši, krajši in manj rigidni (Alberts in sod., 2003).

Osnovna značilnost aktinskih filamentov je strukturna polarnost, ki je posledica paralelne orientiranosti molekul G-aktina in omogoča dodajanje ter odcepljanje posameznih molekul. Konec aktinskega filameta, na katerem je dodajanje in odcepljanje G-aktina bolj dinamično, imenujemo konec plus, nasprotni konec pa konec minus (Pollard in Borisy, 2003).

Aktinski filament igrajo ključno vlogo pri vzpostavljanju celične oblike, premikanju celic po površini, njihovi delitvi in fagocitozi. Povezujejo se z velikim številom aktin-vezavnih proteinov, ki omogočajo tvorbo stabilnih struktur, kot so mikrovili, ali začasnih struktur, kot je kontraktilni obroč (Alberts in sod., 2002).

Z aktinskimi filament so povezani motorni proteini iz družine miozinov, ki omogočajo znotrajcelični transport (Alberts in sod., 2002). Omrežje aktinskih filamentov v celici se neprestano prilagaja, glede na dogajanje v celici in njeni okolici (Parent, 2004).

2.2.3.3 Intermediarni filament

Intermediarni filament so nitasti citoskeletni elementi premera 10 nm. Predstavljajo zelo veliko in heterogeno skupino citoskeletnih elementov. Najdemo jih v citoplazmi večine evkariontskih celic, kjer se v obliki omrežja raztezajo od jedra proti plazmali in dajejo celici trdnost in mehansko odpornost (Alberts in sod., 2003).

Glavna naloga intermediarnih filamentov je zoperstavljanje mehanskemu stresu, zaradi česar je zanje značilna natezna trdnost. So najbolj vzdržljivi in elastični izmed citoskeletnih elementov (Fletcher in Mullins, 2010). Velikokrat se povezujejo med seboj ter z aktinskimi filamentami in mikrotubuli (Wiche, 1998).

Intermediarni filamentni so sestavljeni iz podolgovatih vlaknastih proteinov, ki tvorijo dimere tako, da se ovijejo drug okrog drugega v strukturo imenovano ovita vijačnica (coiled coil). Dva dimera se nato z nekovalentnimi vezmi povežeta v tetramer, osem tetramerov pa tvori intermediarni filament (Alberts in sod., 2003).

Za razliko od mikrotubulov in aktinskih filamentov, intermediarni filamentni niso strukturno polarni in za svoj obstoj ne potrebujejo ATP ali GTP (Alberts in sod., 2002). Prav tako zaenkrat še ni dokazov, da se nanje vežejo motorni proteini, oziroma da imajo vlogo pri aktivnem celičnem transportu (Fletcher in Mullins, 2010).

2.2.3.4 Citoskeletni elementi bakterij

Citoskeletni elementi bakterij so dolga leta ostajali skrivnost, njihovo odkrivanje se je začelo šele po letu 1990, ko so pri bakterijah prvič opisali protein FtsZ, ki sodeluje pri delitvi celice in je bakterijski homolog tubulina (Bi in Lutkenhaus, 1991). FtsZ, ki je odgovoren za celično delitev pri večini bakterij ter pri mitohodrijah in kloroplastih, tvori prstanu podobno strukturo, ki jo imenujemo obroč Z (Rothfield in sod., 1999; Osteryoung in sod., 2001). Podobno kot evkariontski tubulin se FtsZ s pomočjo hidrolize GTP združuje v dinamične, cilindrične polimere (Löwe in Amos, 1999; Lu in sod., 2000). Čeprav je podobnost proteina FtsZ in tubulina v aminokislinskem zaporedju majhna (med 10 in 18 %), je njuna tridimenzionalna struktura zelo podobna (Löwe in Amos, 1998).

Za razliko od tubulina ima aktin več različnih bakterijskih homologov. Največkrat se omenja protein MreB in njegovi homologi Mbl (MreB-like; MreB-podobni proteini), ki polimerizirajo in se združujejo v zavite filamentozne strukture podobne aktinskim filamentom (Jones in sod., 2001). Te strukture se nahajajo v periferiji celice, tik pod plazmalemo in se ves čas celičnega cikla dinamično spreminjajo (Carballido- Lopez in Errington, 2003). Podobno kot pri proteinu FtsZ in tubulinu je podobnost med aminokislinskima zaporedjema MreB in aktina dokaj majhna (15 %), medtem ko je 3D-struktura zelo podobna (Jones in sod., 2001). Proteine iz družine MreB najdemo pri številnih bakterijskih družinah in tudi pri nekaterih arhejah. Njihova prisotnost je odvisna od celične oblike - pri kroglastih (sferičnih) bakterijah homologi MreB niso prisotni, pri oblikah, ki odstopajo od sferičnih je prisoten vsaj eden izmed njih (Daniel in Errington, 2003). Mutacija v genu *mreB*, ali v katerem od sorodnih genov, povzroči izgubo normalne

paličaste oblike pri bakteriji *Escherichia coli* in vodi v rast sferičnih celic (Doi in sod., 1988).

Prokarionski homolog aktina je tudi protein ParM, ki sodeluje pri delitvi plazmida R1 bakterije *Escherichia coli*. ParM tvori filamente, ki so strukturni homologi aktinskim filamentom, ter so prav tako dinamično nestabilni in strukturno polarni (Gerdes in sod., 2010).

Edini do danes odkriti prokarionski homolog intermediarnih filamentov je filamentozni protein krescentin, ki so ga našli pri bakterijah iz rodu *Caulobacter* sp.. Protein je ključen za vzdrževanje specifične upognjene oblike polmeseca. Njegova specifična zavita oblika in sposobnost tvorbe dolgih filamentov spominjata na evkarionske intermediarne filamente, vendar podrobnosti o njegovi molekularni strukturi do danes še niso znane (Ausmees in sod., 2003).

Zaradi številnih podobnosti v aktivnosti in zgradbi znanstveniki predvidevajo, da bi bil lahko evkarionski citoskelet prokarionskega izvora (Van den Ent in sod., 2001).

2.2.4 Funkcije TnT

2.2.4.1 Transport celičnih komponent

V različnih študijah TnT so z uporabo fluorescenčnih barvil dokazali enosmeren (Rustom in sod., 2004; Gurke in sod., 2008b) in dvosmeren (Vidalescu in sod., 2004; Önfelt in sod., 2006) prenos membranskih veziklov ter endosomov in lizosomov med dvema celicama. Po prenosu membranskega vezikla v tarčno celico je prišlo do zlitja z njenim endocitotskim sistemom, kar dokazuje izmenjavo veziklov med celicama (Rustom in sod., 2004).

Dokazan je prenos mitohondrijev po TnT med kardiomiociti podgan in endotelijskimi predniškimi celicami človeka, kar bi lahko uporabili za izboljšanje preživetja človeških celic s poškodovanimi ali nedelujočimi mitohondriji (Koyanagi in sod., 2005; Spees in sod., 2006).

Neprekinjenost plazmaleme med celicama, ki ju povezuje TnT, je ključna za transport njenih komponent kot so različni lipidi in nanje vezani proteini (Önfelt in sod., 2004; Rustom in sod., 2004).

TnT omogočajo difuzijo topnih citoplazemskih molekul, katerih velikost je odvisna od celičnega tipa (Gerdes in sod., 2007). Različne študije so dokazale prenos citoplazemskega aktina, označenega z ojačanim zelenim fluorescenčnim proteinom (EGFP) (Rustom in sod., 2004), ter molekul različnih barvil kot sta zeleni fluorescenčni protein (GFP) (Koyanagi in sod., 2005) in barvilo Lucifer yellow (Watkins in Salter, 2005).

2.2.4.2 Prenos signalov

Zelo pomembno je bilo odkritje, da TnT pri številnih celičnih tipih omogočajo prenos električnih signalov in depolarizacijskih valov kalcijevih ionov (Watkins in Salter, 2005). Depolarizacijski val lahko po TnT potuje v obe smeri in tudi do 70 μm daleč, njegova moč pa je odvisna od oddaljenosti vira depolarizacije (Wang in sod., 2010). Prenos kalcijevih ionov ima zelo pomembno vlogo pri aktivaciji signalnih poti v procesih programiranega celičnega vedenja in embriogeneze (Sisakhtnezhad in sod., 2015).

TnT imajo pomembno vlogo tudi pri apoptozi, saj je stimulacija celic z ligandom Fas, ki sproža apoptozo, povzročila nastanek nanocevk med celicami (Arkwright in sod., 2010). Skozi TnT je nato potekal pospešen prenos signalov, ki so v povezanih celicah sprožili apoptozo (Luchetti in sod., 2012).

2.2.4.3 Prenos molekul imunskega sistema

Znotraj TnT med celicami imunskega sistema se prenašajo molekule glavnega histokompatibilnostnega kompleksa HLA I, ki imajo pomembno vlogo pri predstavitvi antigenov in aktivaciji imunskega odziva (Önfelt in sod., 2004). TnT prenašajo tudi signale, ki sprožijo pospešeno delitev mieločnih matičnih celic. Mieločne matične celice se začnejo ob stiku z bakterijskim produktom pospešeno deliti, signal za ta odziv pa se prenaša skozi TnT in lahko v kratkem času sproži delitev celotnega omrežja celic (Watkins in Salter, 2005).

2.2.4.4 Prenos patogenov

Zelo pomembno odkritje na področju TnT je bilo, da lahko te povezave med celicami služijo tudi kot sredstvo za prenos patogenov, kot so bakterije, virusi in prioni (Sisakhtnezhad in sod., 2015).

Tilney in Portnoy sta leta 1989 kot prva opisala način razširjanja bakterije *Listeria monocytogenes* med makrofagi, s pomočjo struktur podobnih TnT. Önfelt in sod. (2006) so v kulturi človeških makrofagov opazili obstoj tankih TnT, ki so vsebovale zgolj aktinske filamente, in debelejših, ki so vsebovale tudi mikrotubule. Ugotovili so, da znotraj debelejših TnT poteka dvosmerni transport različnih veziklov, na površino tanjših pa se vežejo bakterije *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Gueirin (BCG) in potujejo do neokuženega makrofaga, v katerega vstopijo z inducirano fagocitozo (Önfelt in sod., 2006).

Mišji levkemični virus (angl. Murine leukemia virus, MLV) med celicami prehaja tako, da sproži izražanje dolgih in tankih filopodijev, s pomočjo katerih se vzpostavi povezava med okuženim in neokuženim fibroblastom. Strukture, ki jih imenujemo virusne citoneme in so podobne TnT, omogočijo virusu, da po zunanji strani plazmaleme doseže neokuženo celico in vstopi vanjo (Sherer in sod., 2007). Sowinski in sod. (2008) so ugotovili, da TnT omogočajo tudi prenos virusa humane imunske pomanjkljivosti (HIV) med imunskimi celicami. Z uporabo rekombinantnega virusa HIV-1, ki ob izražanju kapsidnega gena *Gag* fluorescira, so dokazali prehod virusa iz okuženega limfocita v nanocevko in njegov prenos v neokuženo celico skozi TnT in po njeni površini (Sowinski in sod., 2008). Ta način prenosa sicer zmanjša izpostavljenost virusa protitelesom in komplementu, vendar bi lahko TnT služile kot nova tarča za protivirusna zdravila (Gurke in sod., 2008b).

Prioni so infektivni delci, ki se kopičijo v centralnem živčnem sistemu in povzročajo nevrodegenerativne bolezni (Caughey in Baron, 2006). Prioni se po TnT širijo na dva načina: znotraj membranskih veziklov z aktivnim aktomiozinskim transportom, ter s pomočjo pasivne lateralne difuzije (Gerdes in sod., 2009). Študije kažejo, da TnT predstavljajo enega izmed mehanizmov za vnos prionov v centralni živčni sistem in njihovo razširjanje znotraj le-tega (Sisakhtnezhad in sod., 2015).

2.2.5 Mehanizmi transporta v TnT

Zaradi velike strukturne raznolikosti in raznolikosti tovora, ki potuje po TnT, so se v TnT razvili različni mehanizmi transporta (Gurke in sod., 2008b). Önfelt in sod. (2006) so dokazali, da se prenos organelov skozi TnT ustavi, če v celično kulturo dodamo spojino, ki preprečuje hidrolizo ATP. Transport tovora po TnT je torej aktiven proces, ki je odvisen od ATP (Önfelt in sod., 2006). Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Gurke in sod. (2008b), ki so izmerili hitrost premikanja veziklov po TnT ($22,4 \pm 7,9$ nm/s), s čimer so dokazali, da gre za aktivni transport in ne premikanje s pasivno difuzijo.

Za razliko od organelov in virusnih delcev je enosmerno širjenje valov kalcijevih ionov najverjetneje posledica kemijskega gradienta. Znanstveniki domnevajo, da v primeru, ko je med celicama vzpostavljena kontinuiteta plazmaleme, manjše citoplazemske molekule in sestavine plazmaleme potujejo skozi TnT s pasivno difuzijo (Gurke in sod., 2008b).

Redke študije obravnavajo prisotnost posameznih motornih proteinov znotraj TnT. Menimo, da so takšne študije nujno potrebne za boljše razumevanje transportnih mehanizmov v TnT.

2.2.6 TnT normalnih celic

Preglednica 1: Primeri TnT pri različnih celičnih tipih, sestava njihovega citoskeleta ter prisotnost motornih proteinov in tovara, ki ga prenašajo.

Celični tip	Citoskeletni elementi in motorni proteini	Tovor	Vir
Celice podganjega feocitokroma (PC12)	Aktinski filament (miozin Va)	Vezikli endosomsko-lizosomskega sistema, komponente plazmaleme, organeli, EGFP-aktin	Rustom in sod., (2004); Bukoreshtliev in sod., (2009)
Naravne celice ubijalke (NK)	Aktinski filament, mikrotubuli	Komponente plazmaleme, signali za apoptozo	Chauveau in sod., 2010
Normalne celice podganjih ledvic (NRK)	Aktinski filament (miozin Va)	Vezikli endosomsko-lizosomskega sistema, depolarizacijski signali	Rustom in sod., (2004); Wang in sod., (2010)
Kardiomioblasti (H9C2)	Aktinski filament	Mitohondriji, kvantne pike	He in sod., (2010)
Keratinociti (NCTC2544)	Aktinski filament	Trdni lipidni nanodelci	Kristl in sod., 2013
Humane rakave pljučne celice (A549)	Aktinski filament, mikrotubuli	WGA (lektin iz rastline <i>Triticum vulgaris</i>) označen s kvantinimi pikami	Wang in sod., (2012b)
Kokultura primarnih nevronov in astrocitov	Aktinski filament, mikrotubuli	Depolarizacijski signali	Wang in sod., (2012a)
Humani makrofagi	Aktinski filament, mikrotubuli	Mitohondriji, lizosomi, komponente plazmaleme, bakterije	Önfelt in sod., (2006)
Celice Jurkat in primarni limfociti T	Aktinski filament	Proteini virusa HIV-1, mitohondriji, komponente plazmaleme	Sowinski in sod. (2008)

Dosedanje študije so dokazale obstoj TnT *in vitro* pri številnih in raznolikih celičnih tipih (Preglednica 1), pa tudi *in vivo* znotraj različnih tkiv. TnT v tkivih so za razliko od tistih *in vitro* velikokrat upognjene, saj številne ovire med povezanima celicama preprečujejo vzpostavitev povezave na najkrajši možni razdalji (Sowinski in sod., 2008). Zunajcelični matriks, ki je značilen za tkiva, omogoča tudi večjo stabilnost in daljšo življenjsko dobo TnT (Austefjord in sod., 2014).

V sistemih *in vivo* so vzpostavljene TnT odkrili med celicami nevralnega grebena pri piščančjih zarodkih, kjer so služile za izmenjavo citoplazemskega materiala med celicami, ki so se pred kratkim delile (McKinney in sod., 2011). Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Caneparo in sod. (2011), ki so ugotovili, da se celice zarodka ribe navadne cebrice povezujejo s TnT, skozi katere poteka izmenjava proteinov.

Večina do danes opisanih študij TnT *in vivo* je bila opravljenih na zarodkih, zaradi česar domnevamo, da imajo TnT vlogo pri razvoju večceličnih organizmov (Gerdes in sod., 2013).

2.2.7 TnT rakavih celic

Tunelske membranske nanocevke h komunikaciji med celicami ne prispevajo samo v fizioloških, ampak tudi v patoloških razmerah. Znano je, da TnT predstavljajo alternativni mehanizem za prenos signalov in celičnih sestavin v skupnosti rakavih celic (Sisakhtnezhad in sod., 2015). Znanstveniki menijo, da bi tvorba TnT med rakavimi celicami, ter med rakavimi celicami in normalnimi celicami, ki obdajajo rakave celice, lahko spodbujala tvorbo, rast in širjenje tumorjev (Lou in sod., 2012b).

Veranič in sod. (2008) so dokazali obstoj TnT v celičnih linijah človeških rakavih urotelijskih celic RT4 in T24. TnT povezujejo tudi celice drugih rakavih celičnih linij, ki izhajajo iz rakavih obolenj jajčnikov, dojk, trebušne slinavke, prostate in debelega črevesa (Lou in sod., 2012a). Lou in sod. (2012a) so pokazali tudi, da se TnT tvorijo znotraj monokulture rakavih mezotelijskih celic (MSTO211H) ali normalnih mezotelijskih celic (LP9), ne pa tudi med rakavimi in normalnimi celicami v kokulturi. Zelo pomembno je bilo odkritje, da so TnT prisotne znotraj tumorjev, izoliranih iz bolnikov, kar kaže na njihovo vlogo pri patogenezi in invazivnosti rakavih obolenj (Lou in sod., 2012a). Področje prisotnosti in vloge TnT *in vivo* še vedno ostaja precej neraziskano in odpira številne nove možnosti za napredek v razumevanju področja rakavih obolenj.

Med človeškimi rakavimi celicami poteka s pomočjo TnT izmenjava različnih celičnih sestavin, kot so mitohondriji in vezikli iz Golgijevega aparata (Lou in sod., 2012b). Thayanithy in sod. (2014a) so dokazali, da se skozi TnT prenašajo tudi onkogene mikroRNA, ki vplivajo na delitev in diferenciacijo celic in s tem na razvoj tumorjev. Mehanizem, s pomočjo katerega TnT pripomorejo k širjenju raka, bi lahko predstavljal tudi prenos poškodovanih mitohondrijev z mutirano DNA iz rakavih v normalne celice (Sisakhtnezhad in sod., 2015).

Znanstveniki so dokazali, da se skozi TnT, ki se vzpostavijo med celicami raka dojke MCF7, prenaša funkcionalna oblika P-glikoproteina (Pasquier in sod., 2011). P-glikoprotein deluje kot ABC-prenašalec (ATP-vezavna kaset, angl. *ATP-binding cassette*), ki preko plazmaleme iz celice izčrpava zdravila in tako v rakavih celicah omogoča odpornost proti kemoterapevtikom (Pasquier in sod., 2011). Podobne rezultate je pokazala tudi študija, v kateri so rakave celice začele izražati odpornost proti kemoterapevtikom po tem, ko so se vanje skozi TnT prenesli mitohondriji iz zdravih, endotelijskih celic (Pasquier in sod., 2013).

2.2.8 TnT kokultur

Koyanagi in sod. (2005) so preučevali TnT v kokulturi podganjih srčnomišičnih celic in humanih endotelijskih predniških celic. Ugotovili so, da prihaja do transporta mitohondrijev iz kardiomiocitov v predniške celice, kar bi lahko vplivalo na njihovo diferenciacijo in vodilo v razvoj novega srčnomišičnega tkiva (Koyanagi in sod., 2005).

Do vzpostavitve TnT med celicami različnega celičnega tipa pride tudi v kokulturi primarnih nevronov in astrocitov. Povezave služijo predvsem kot mehanizem prenosa depolarizacijskih valov in kalcijevih signalov iz astrocitov v nevrone, kar ima zelo pomembno vlogo pri proliferaciji, migraciji in diferenciaciji primarnih nevronov med embriogenezo (Wang in sod., 2012a).

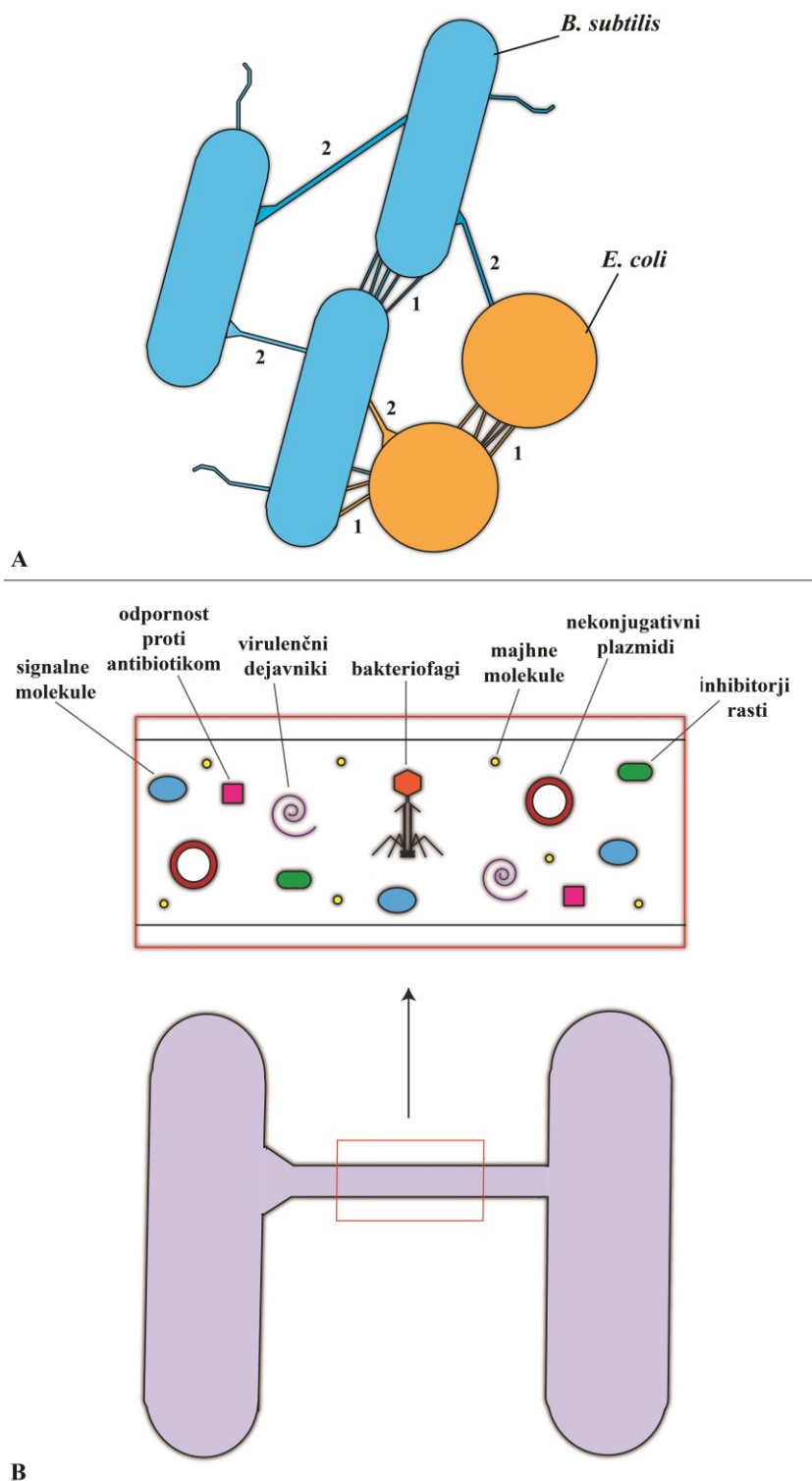
TnT se vzpostavljajo znotraj kokulture rakavih urotelijskih celic T24 in normalnih prašičjih urotelijskih celic NPU, kar kaže na zmožnost komunikacije in prenosa snovi med rakavimi in normalnimi urotelijskimi celicami (Baraga, 2015). Mehanizmi povezovanja normalnih in rakavih celic s pomočjo TnT so še vedno zelo slabo raziskani. TnT bi lahko predstavljale način prenosa onkogenih molekul iz rakavih v normalne celice, zaradi česar so nadaljnje raziskave takšnih povezav nujno potrebne (Lou in sod., 2012b).

2.2.9 TnT bakterij

Dubey in Ben-Yehuda (2011) sta dokazala doslej še neodkrit način izmenjave citoplazemske vsebine med oddaljenimi bakterijami, ki je bil do takrat poznan le pri evkariontskih celicah. Bakterijske TnT so tubularne strukture, ki povezujejo sosednje celice in tvorijo sinciciju podobno večcelično združbo (Dubey in Ben-Yehuda, 2011). Avtorja sta dokazala obstoj TnT med posameznimi celicami bakterije *Bacillus subtilis* in med različnimi bakterijskimi vrstami znotraj večvrstne bakterijske združbe. Vzpostavljene TnT so opazili med po Gramu pozitivnimi bakterijami vrste *Bacillus subtilis* in po Gramu negativnimi bakterijami vrste *Staphylococcus aureus* ter celo med evolucijsko zelo oddaljenima bakterijama *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli* (Dubey in Ben Yehuda, 2011) (Slika 2).

Dubey in Ben-Yehuda (2011) predlagata, da je komunikacija s pomočjo TnT ključni način medcelične komunikacije pri bakterijah v naravi. S pomočjo TnT si bakterije na krajših in daljših razdaljah izmenjujejo manjše citoplazemske molekule, signalne molekule in proteine. TnT pa predstavljajo tudi mehanizem za prenos patogenov, kot so prioni in bakteriofagi. Bakterijske TnT omogočajo tudi izmenjavo genetskega materiala, med drugim nekonjugativnih plazmidov in odpornosti proti antibiotikom, kar je ključno za pojav novih fenotipov in s tem preživetje v dinamičnih okoljih (Dubey in Ben Yehuda, 2011) (Slika 2).

Smer in mehanizem transporta skozi bakterijske TnT še vedno ostajata neraziskana. Potrebne so nadaljnje študije, ki bodo razkrile, ali je prenos molekul po bakterijskih TnT aktiven ali pasiven. Obstaja tudi možnost, da znotraj iste TnT delujeta oba mehanizma in je način transporta odvisen od vrste tovora. Prav tako do danes še ni raziskano ali sta, podobno kot pri evkariontskih celicah, tudi pri bakterijskih TnT donorska in akceptorska celica strogo določeni in ali se smer transporta ujema s smerjo izražanja TnT. Vprašanje ostaja tudi, ali je transport po bakterijskih TnT zgolj enosmeren ali izmenjava snovi poteka dvosmerno (Dubey in Ben Yehuda, 2011).



Slika 2: Shema različnih oblik TnT med bakterijami in shema prenosa tovora med dvema bakterijskima celicama. Bakterije se med seboj povezujejo z dvema tipoma TnT: 1) krajšimi in tanjšimi TnT ter 2) daljšimi in debelejšimi TnT. TnT povezujejo tudi bakterije različnih vrst (A). Prenos različnega tovora skozi TnT med dvema bakterijama (B).

2.2.9.1 Zgradba bakterijskih TnT

Dubey in Ben-Yehuda (2011) sta bakterijske TnT razdelila v 2 skupini. Debelejše TnT, ki povezujejo bolj oddaljene celice dosežejo dolžino do 1 μm in premer od 30 do 130 nm. Tanjše TnT povezujejo sosednje celice na zelo kratki razdalji in se pogosto nahajajo v skupkih. Debelejše TnT naj bi omogočale prenos večjih molekul, kot so proteinski kompleksi in plazmidi, tanjše pa manjših molekul kot so hranila ter manjši proteini (Dubey in Ben-Yehuda, 2011).

Molekulska sestava TnT ostaja skrivnost, čeprav so z različnimi metodami dokazali, da gre za večplastne strukture, sestavljene iz gradnikov celične stene, membranskih komponent in citoplazemske vsebine. Njihova struktura je zelo podobna zunanosti bakterij in nakazuje na neprekinjenost površine (Dubey in Ben-Yehuda, 2011).

Znanstveniki predvidevajo, da TnT pri bakterijah nastanejo z lokalno razgradnjo celične stene in brstenjem membrane, zlasti pri po Gramu pozitivnih bakterijah, za katere je značilna debela celična stena. Pri po Gramu negativnih bakterijah TnT predvidoma izraščajo direktno iz zunanje membrane (Dubey in Ben-Yehuda, 2011), na podoben način kot brstijo membranski vezikli (Mashburn-Warren in Whiteley, 2006).

Tvorba TnT med evolucijsko oddaljenimi vrstami kaže na možnost, da je vzpostavitev povezave med bakterijama uravnavana s splošnimi mehanizmi zlitja membran (Martens in McMahon, 2008). Lahko pa bi potekala tudi s pomočjo sekrecijskih sistemov patogenih, po Gramu negativnih bakterij, ki jih uporabljajo za interakcijo s svojimi gostiteljskimi celicami (Tseng in sod., 2009).

2.3 MOTORNI PROTEINI V TUNELSKIH MEMBRANSKIH NANOCEVKAH

Motorni proteini so molekularni motorji, ki hidrolizirajo ATP in se vežejo na citoskeletne elemente, za katere je značilna prisotnost konca plus in konca minus (aktinske filamente in mikrotubule). Energijo, ki se sprostí ob hidrolizi ATP, uporabljajo za enakomerne premike vzdolž citoskeletnega elementa. Razlikujejo se v tipu citoskeletnega elementa, na katerega se vežejo, v smeri premikanja in vrsti tovora, ki ga prenašajo (Alberts in sod., 2003).

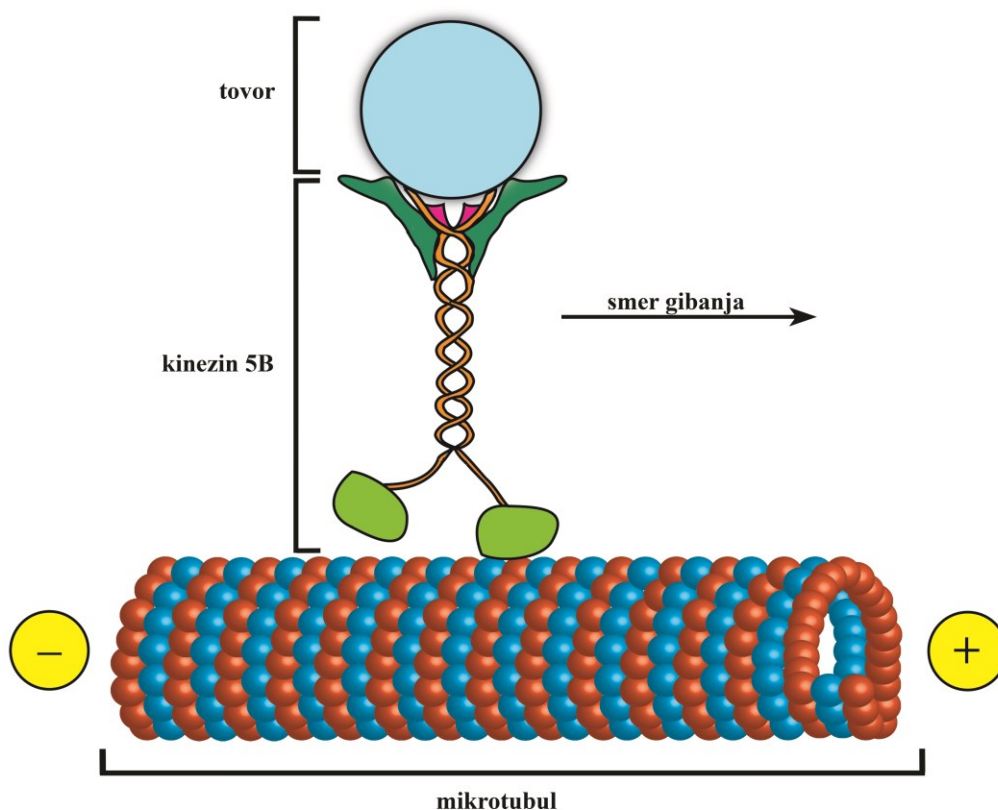
Vsi motorni proteini so encimi, t.i. ATP-aze, encimi, ki hidrolizirajo ATP. Energija, ki se sprostí ob cepitvi vezi med ADP (adenozin difosfat) in fosfatom, omogoči konformacijsko spremembo, rezultat katere je premik motornega proteina vzdolž citoskeletnega elementa (Alberts in sod., 2003).

2.3.1 Kinezin

Kinezini so dimerni motorni proteini, ki se trdno vežejo na mikrotubule in se po njih pomikajo v smeri konca plus s sunki dolžine 8,3 nm (Howard in sod., 1989). Naddružina kinezinov do danes obsega 14 razredov, ki se razlikujejo glede na terminalno domeno (Alberts in sod., 2003). Kristalna struktura kinezinov in miozinov je razkrila, da najverjetneje izvirajo iz skupnega prednika (Vale in Milligan, 2000). Kinezini omogočajo transport membranskih organelov, mRNA, intermediarnih filamentov in signalnih molekul (Goldstein in Philp, 1999). Kinezin je homodimer, z dvema identičnima katalitičnima domenama (glavama), ki se vežeta na mikrotubule in imata sposobnost hidrolize ATP (Howard in sod., 1989). Vsaka izmed glav je s povezovalno regijo vezana na terminalno domeno, ki se veže na tovor (Howard in sod., 1989). Motorni domeni omogočata koordinirano vezavo na mikrotubule, vendar natančen mehanizem premikanja še ni znan (Yildiz in sod., 2004) (Slika 3).

Obstajata dve teoriji gibanja kinezinov po mikrotubulih: teorija hoje (»hand over hand«), pri kateri se glavi izmenjujeta v vodstvu (Rice in sod., 1999) in teorija pednjanja (»inchworm«), pri kateri je ena izmed glav vedno vodilna, druga pa ji zgolj sledi (Hua in sod., 2002). V obeh primerih je vir energije hidroliza ATP, ki povzroči konformacijsko spremembo v povezovalni domeni in s tem specifičen premik motornega proteina (Vale in Milligan, 2000).

Kinezini iz družine 5 sodelujejo predvsem pri celični delitvi in tvorbi delitvenega vretena (Ferenz in sod., 2010). Do danes ni še nobene študije, ki bi se osredotočala na prisotnost kinezinskih motorjev znotraj TnT. Menimo, da so raziskave v tej smeri nujno potrebne za boljše razumevanje mehanizmov in smeri aktivnega transporta znotraj TnT.

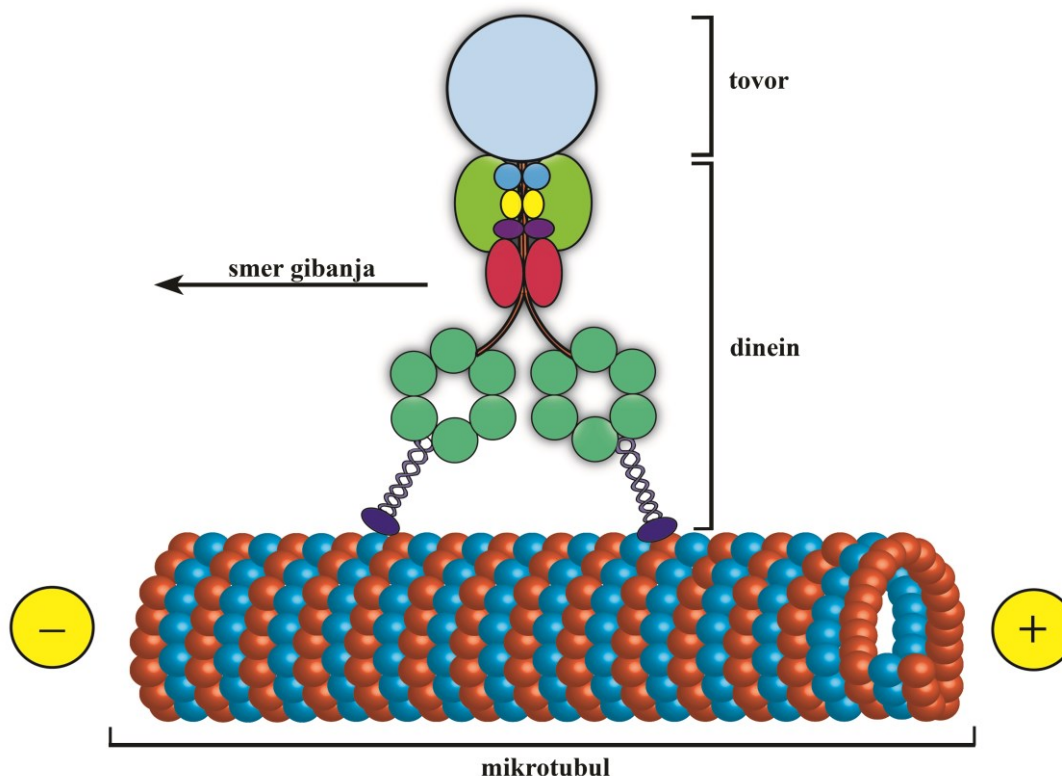


Slika 3: Shematski prikaz zgradbe motornega proteina kinezina 5B in njegovega gibanja po mikrotubulu v smeri konca plus. Kinezinski motorji sodelujejo pri celični delitvi in transportu organelov znotraj celice. Kinezin 5B je povezan s transportom kromosomov in oblikovanjem delitvenega vretena.

2.3.2 Dinein

Dineini so družina motornih proteinov, ki niso sorodni kinezinom in miozinom in se premikajo vzdolž mikrotubulov proti koncu minus (Alberts in sod., 2003). So največji izmed poznanih motornih proteinov in se najhitreje gibljejo. Vsak izmed dineinov je sestavljen iz 1 do 3 motornih domen, ki hidrolizirajo molekule ATP, ter domen, ki vežejo mikrotubule in tovor (Slika 4). Mehanizem gibanja dineina še ni popolnoma razjasnjen, vendar se bistveno razlikuje od mehanizmov miozina in kinezina (Burgess in sod., 2003).

Delijo se v dve družini: citoplazemske dineine, ki omogočajo ključne celične procese kot so premikanje jedra, organizacija delitvenega vretena in transport organelov znotraj celice, in aksonemne dineine, ki omogočajo gibanje bičkov in migetalk (Alberts in sod., 2003).



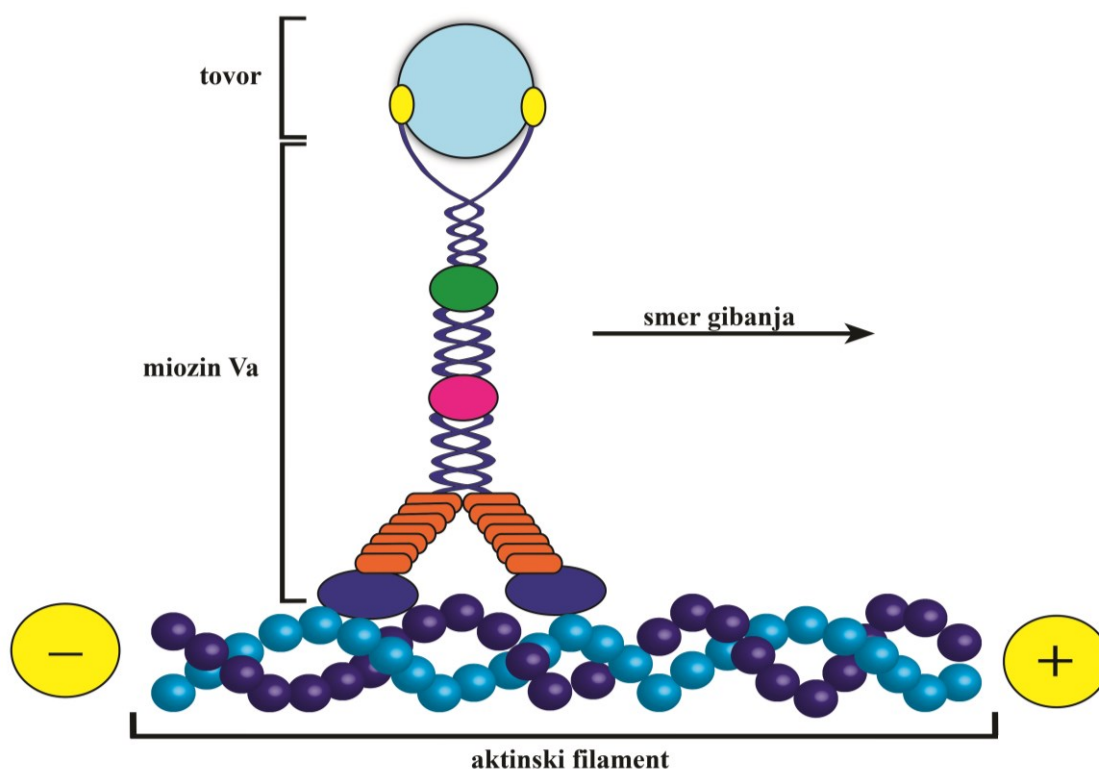
Slika 4: Shematski prikaz motornega proteina dineina in njegovega gibanja po mikrotubulu v smeri konca minus. Dineini sodelujejo pri premikanju jedra, organizaciji delitvenega vretena in transportu organelov znotraj celice.

2.3.3 Miozin

Naddružino miozinov tvori vsaj 14 do danes odkritih razredov motornih proteinov, ki se med seboj razlikujejo glede na aminokislinsko zaporedje motorne domene, za vse je značilna afiniteta vezave na aktin in premikanje proti koncu plus aktinskega filamenta. Skoraj vsi poznani miozini so sestavljeni iz ene ali dveh identičnih motornih domen (glav), ki se vežeta na aktin in proizvajata energijo s hidrolizo ATP. Glava je preko povezovalne regije, imenovane vrat, povezana s terminalno domeno, ki jo imenujemo rep. Repna domena je karakteristična za določeno skupino miozinov in določa vrsto njihovega tovora (Slika 5). Miozinski motorni proteini sodelujejo pri številnih bioloških aktivnostih, kot so mišična kontrakcija, citokineza, celično premikanje in membranski transporti (Mermall in sod., 1998).

Kadar je v aktivnem mestu motorne domene vezana molekula ATP, je katalitično jedro šibko vezano na aktinski filament in miozinska glava lahko spreminja svojo pozicijo oziroma se pomika vzdolž aktinskega filameta. Pri miozinih, ki so sestavljeni iz dveh identičnih globularnih motornih domen, se ti izmenjujeta pri vezavi na aktinski filament. Vezava glave na primerno vezavno mesto sproži hidrolizo ATP in sprostitve fosfata z aktivnega mesta v katalitičnem jedru. Reakcija povzroči trdno vezavo motorne domene na aktin in konformacijsko spremembo povezovalne domene, ki zaniha kot vzvod ter premakne aktinski filament za približno 10 nm. Po premiku se iz aktivnega mesta sprost preostala molekula ADP, kar omogoči ponovno vezavo ATP, sprostitve glave iz vezavnega mesta in vrnitev povezovalne domene v primarno pozicijo. Hitrost premikanja vzdolž aktinskih filamentov je enaka tudi pri miozinih, ki so sestavljeni iz ene motorne domene, vendar mehanizem njihovega gibanja še ni popolnoma razjasnjen (Vale in Milligan, 2000).

Miozini razreda V sodelujejo pri znotrajceličnem transportu veziklov in organelov (Alberts in sod., 2003). Miozin Va je protein z dvema motornima domenama in visoko afiniteto do aktina, ki mu omogoča, da je skupaj s tovorom dlje časa vezan na aktinski filament (Cheney in sod., 1993). Mutacija v genu za miozin Va pri miših je pokazala njegovo vpletenost v lokalizacijo gladkega endoplazemskega retikuluma v nevronih in pigmentnih granul v melanocitih (Mercer in sod., 1991). Rustom in sod. (2004) so s pomočjo fluorescenčne mikroskopije dokazali prisotnost miozina Va znotraj TnT med celicami feocitokroma (PC12).



Slika 5: Shematski prikaz zgradbe motornega proteina miozina Va in njegovega premikanja po aktinskem filamentu v smeri konca plus. Miozinski motorji sodelujejo pri številnih znotrajceličnih aktivnostih kot sta citokineza in celično gibanje, miozini razreda V pa sodelujejo predvsem pri znotrajceličnem transportu veziklov in organelov.

2.3.4 Motorni proteini pri bakterijah

Bakterije so zaradi svoje majhnosti in enostavne zgradbe dolgo veljale za primitivne sisteme, brez organiziranega znotrajceličnega sistema, kjer proteini in druge strukture svoje mesto dosežejo zgolj s pomočjo pasivne difuzije. Šele odkritje kompleksnega sistema citoskeletnih elementov, ki so dolgo veljali le za značilnost evkariontskih celic, je pokazalo, da je bila zgradba prokariotskih celic močno podcenjena (Mignot in Shaevitz, 2008).

Novejše tehnike visoko ločljivostne fluorescenčne in elektronske mikroskopije so pokazale, da zavzemajo bakterijski proteini, kot so receptorji, signalni proteini in metabolni encimi, znotraj bakterijskega citosola določena mesta, kjer opravljajo svoje funkcije (Straight in sod., 2007). Čeprav je bilo na to temo opravljenih že veliko študij, natančnih mehanizmov bakterijskega znotrajceličnega transporta še vedno ne poznamo (Mignot in Shaevitz, 2008).

Zaradi prostorske majhnosti bakterij je za večino majhnih molekul in prostih proteinov v citoplazmi pasivna difuzija zadosten način transporta (Elowitz in sod., 1999). Večje strukture, kot na primer kromosomi, se na daljše razdalje znotraj celice premikajo s pomočjo aktivnega transporta (Mignot in Shaevitz, 2008). Ta je pri večini bakterijskih vrst povezan s citoskeletnimi proteinoma ParA in MreB, katerih mehanizmi premikanja še niso popolnoma jasni (Mignot in Shaevitz, 2008). Gitai in sod. (2005) so predlagali obstoj motornega proteina, ki bi deloval v kombinaciji s citoskeletnim proteinom MreB pri segregaciji kromosoma, vendar jim domnevnega proteina ni uspelo okarakterizirati.

Do danes v prokariontskih celicah še niso odkrili molekularnih motornih proteinov, ki bi bili analogni evkariontskim (Mignot in Shaevitz, 2008).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

Preglednica 2: Aparature, ki smo jih uporabljali.

Aparatura	Proizvajalec
Aparat za električni prenos proteinov na nitrocelulozno membrano Mini Trans-Blot Electrophoretic transfer cell	BioRad, ZDA
CO ₂ inkubator HeraCell (celice T24 in kokulture celic (NPU+T24))	Heraeus, Nemčija
CO ₂ inkubator Heracell Vias 160i (celice NPU)	Heraeus, Nemčija
Elektroforetska celica Mini-PROTEAN	BioRad, ZDA
Fluorescenčni mikroskop AxioImager.Z1 z dodatkom Apotome	Zeiss, Nemčija
Fluorescenčni mikroskop Nikon Eclipse TE 300	Nikon, Japonska
Kaseta za izpostavljanje filmov Hypercassette	Amersham, Velika Britanija
Namizna centrifuga 5810R	Eppendorf, Nemčija
Spektrofotometer Synergy 2	BioTek, ZDA
Stresalnik KS 260 basic	Ika, Nemčija

Preglednica 3: Uporabljen laboratorijski material in kemikalije.

Laboratorijski material in kemikalije	Proizvajalec
Adenin	Sigma, Nemčija
Akrilamid/bis-akrilamid	Sigma, Nemčija
Bromfenol modro	Merck, Nemčija
BSA	Sigma, Nemčija
komplet reagentov za kolorimetrično detekcijo in kvantifikacijo proteinov BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific, ZDA
Deionizirana voda	Braun Medical, ZDA
EDTA	Sigma, Nemčija
EGTA	Sigma, Nemčija
Etanol	Kefo, Slovenija
Faloidin FITC P5282	Sigma, Nemčija
F12	Gibco, Thermo Fisher Scientific, ZDA
FBS	Gibco, Thermo Fisher Scientific, ZDA

se nadaljuje...

Nadaljevanje Preglednice 3: Uporabljen laboratorijski material in kemikalije.

Laboratorijski material in kemikalije	Proizvajalec
Fiksirna raztopina za filme RapidFix	Ilford, Velika Britanija
Filmi Medical X-ray film blue	Agfa; Belgija
Fosfoetanolamin	Sigma, Nemčija
Glicerol	Fluka, Honeywell, ZDA
Glicin	Sigma, Nemčija
Glutamax	Gibco, Thermo Fisher Scientific, ZDA
Gojitvene stekleničke (75 cm ²)	TPP, Švica
Gojitvene petrijevke	TPP, Švica
Hidrokortizon	Sigma, Nemčija
Hranilni medij MCDB153	Sigma, Nemčija
Hranilni medij A-DMEM (Advanced-Dulbecco's modification of Eagle's medium)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, ZDA
Inzulin	Sigma, Nemčija
KCl	Merck, Nemčija
KH ₂ PO ₄	Merck, Nemčija
Komplet za detekcijo proteinov SuperSignal chemiluminescent substrate #34087	WestPico, Thermo Fisher Scientific, ZDA
Kozji serum	Agilent, ZDA
Kozja sekundarna protitelesa konjugirana s hrenovo peroksidazo (anti-rabbit HRP, 6154/ anti-mouse HRP, A4416)	Sigma, Nemčija
Kozja sekundarna protitelesa konjugirana s fluorokromom (anti-rabbit AF488 in AF555, anti-mouse AF488 in AF555)	Alexa Fluor, Thermo Fisher Scientific, ZDA
Krovna stekelca z vgravirano mrežo (PCS-1.5-1818-GRD)	MatTek Corporation, ZDA
Kunčja sekundarna protitelesa	Sigma, Nemčija
Kunčje primarno protitelo proti miozinu Va (rabbit polyclonal anti-myosin Va antibody, #3402)	Cell Signaling Technology, ZDA
Kunčje primarno protitelo proti F-aktinu (rabbit anti-actin (A2066)	Sigma, Nemčija
Metanol	Carlo Erba Reagents, Francija

se nadaljuje...

Nadaljevanje Preglednice 3: Uporabljen laboratorijski material in kemikalije

Laboratorijski material in kemikalije	Proizvajalec
MgCl ₂	Merck, Nemčija
Mišja sekundarna protitelesa	Sigma, Nemčija
Mišje primarno protitelo proti α -tubulinu (mouse anti- α -tubulin (T6199)	Sigma, Nemčija
Mišje primarno protitelo proti dineinu (mouse anti-Dynein intermediate chain 1 antibody, ab23905)	Abcam, Velika Britanija
Mišje primarno protitelo proti kinezinu 5B (mouse monoclonal anti-Kinesin (KIF 5B) antibody [SUK-4], ab28060)	Abcam, Velika Britanija
Molekulski standardi Color protein standard	New England BioLabs, ZDA
Na ₂ HPO ₄	Merck, Nemčija
Nitrocelulozna membrana	Amersham, Velika Britanija
Paraformaldehid	Sigma, Nemčija
PenStrep	Gibco, Thermo Fisher Scientific, ZDA
PIPES	Sigma, Nemčija
PMSF	Fluka, Honeywell, ZDA
Pufer za čiščenje membran Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific, ZDA
Razvijalna raztopina za filme Ilfotec LC29	Ilford, Velika Britanija
SDS	Merck, Nemčija
TEMED	Sigma, Nemčija
Tripansko modrilo	Invitrogen, ZDA
Trypsin - Tryple Select	Gibco, Thermo Fisher Scientific, ZDA
Tris	Sigma, Nemčija
Triton X-100	Fluka, Honeywell, ZDA
Tween-20	Sigma, Nemčija
Vectashield	Vector Laboratories, ZDA

3.2 GOJENJE CELIC

Gojili smo monokulture normalnih prašičjih urotelijskih celic NPU in celic trajne celične linije T24, izolirane iz mišično invazivnega karcinoma človeškega urotelija (ATTC®HTB-4TM) po predhodno opisanem postopku v Kreft in sod., 2010; Višnjar in Kreft, 2013; Yu in sod., 2016. Gojili smo tudi kokulture normalnih urotelijskih celic NPU in rakavih urotelijskih celic T24 (NPU+T24) po enakem postopku kot monokulture.

3.2.1 Presajanje in štetje celic

Celice smo presadili iz celičnih monokultur, ko so dosegle 90 % konfluentnost oziroma prerasle 90 % podlage. Celični kulturi smo dodali določeno količino proteolitičnega encima tripsina, ki cepi medcelične stike in stike celic s podlago. Po 15-30 minutah inkubacije, ko so se celice odlepile od podlage, smo jih sprali s hranilnim medijem in prenesli v centrifugirko, ter jih centrifugirali 5 minut z 200 g pri temperaturi 23 °C. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in preostale celice redčili v količini hranilnega medija, ki je bila odvisna od količine celic. V mikrocentrifugirko smo prenesli 50 µl celične suspenzije in ji dodali 10 µl tripsanskega modrila, ki skozi poškodovano plazmalem prodre v mrtve celice in jih obarva modro. 10 µl suspenzije smo nato nanesti v dve komori hemocitometra in v 8 kvadrantih prešteli žive ter mrtve celice. Po enačbi (1) smo izračunali preživetje celic.

$$\text{preživetje celic (\%)} = \left(\frac{\text{število preštetihih živih celic}}{\text{število vseh preštetihih celic}} \right) \times 100 \quad \dots (1)$$

S pomočjo enačbe (2) smo nato izračunali število vseh celic v izbranem volumnu hranilnega medija.

$$\text{št. živih celic/ml} = \frac{\text{št. živih celic} \times \text{faktor redčenja (1,2)} \times 10^4}{\text{št. kvadrantov}} \text{ celic/ml} \quad \dots (2)$$

3.2.2 Nasaditev celic

Na osnovi števila živih celic v določenem volumnu celične suspenzije, smo izračunali, kolikšen volumen celične suspenzije moramo nasaditi na krovno stekelce oziroma v gojitveno posodico, da dosežemo želeno nasaditveno gostoto (Preglednica 4). Celice za imunooznačevanje smo nasadili na krovna stekelca z vgravirano mrežo (18 mm × 18 mm),

v plastične petrijevke s površino $9,2 \text{ cm}^2$. Celice, v katerih smo določali vsebnost motornih proteinov s prenosom western, smo nasadili v plastične posodice s površino 75 cm^2 .

Preglednica 4: Kulture gojenih celic in njihove nasaditvene gostote.

Oznaka kulture	Nasaditvena gostota celic NPU (celic/ cm^2)	Nasaditvena gostota celic T24 (celic/ cm^2)
Celice NPU za imunooznačevanje (gojene 2 dni v mediju UroM)	1×10^5	
Celice NPU za prenos western (gojene 2 dni v mediju UroM)	1×10^5	
Celice NPU za prenos western (gojene 7 dni v mediju UroM)	1×10^5	
Celice NPU za prenos western (gojene 3 tedne v mediju UroM)	1×10^5	
Celice T24 za imunooznačevanje (gojene 2 dni v mediju A-DMEM)		5×10^3
Celice T24 za prenos western (gojene 2 dni v mediju A-DMEM)		5×10^3
Celice T24 za prenos western (gojene 7 dni v mediju A-DMEM)		5×10^4
Kokultura celic NPU in T24 za imunooznačevanje (gojena 2 dni v mediju UroM)	1×10^5	5×10^3

3.2.3 Gojenje monokultur celic NPU in T24 ter kokulture celic (NPU+T24)

Celice smo gojili v CO_2 -inkubatorju pri temperaturi 37°C v 5 % atmosferi CO_2 in 100 % vlažnosti. Za potrebe imunofluorescenčnega označevanja nanocerk smo monokulture celic NPU in T24 ter kokulture celic (NPU+T24) gojili 2 dni od nasaditve, saj smo predhodno ugotovili, da je takrat gostota celic najprimernejša za tvorbo nanocerk. Za potrebe prenosa western pa 2 dni, 7 dni in 3 tedne od nasaditve (Preglednica 4).

3.2.4 Mikroskopiranje celic

Monokulture celic NPU in T24 ter kokulture celic (NPU+T24) smo prvi in drugi dan po nasaditvi opazovali z invertnim faznokontrastnim svetlobnim mikroskopom Eclipse TE300. Pri 400-kratni povečavi mikroskopa smo poslikali TnT živih celic.

3.2.5 Hranilni medij

3.2.5.1 Hranilni medij za celice NPU in kokulture celic (NPU+T24)

Za gojenje monokulture celic NPU in kokulture celic (NPU+T24) smo uporabljali hranilni medij UroM ($-Ca^{2+} + S$), ki vsebuje MCDB 153 in A-DMEM (oba predstavljata 50 % končne koncentracije hranilnega medija), ter adenin, inzulin, hidrokortizon, fosfoetanolamin, glutamaks, antibiotike, FBS (angl. fetal bovine serum) in nima dodanega kalcija (Preglednica 5).

Preglednica 5: Sestavine hranilnega medija UroM ($-Ca^{2+} + S$) za gojenje monokulture celic NPU in kokulture celic (NPU+T24).

Sestavine hranilnega medija	Proizvajalec in kataloška številka	Koncentracije sestavin v hranilnem mediju
MCDB 153	Sigma, M7403	50 %
A-DMEM	Gibco, 12491-015	50 %
adenin	Sigma, A2786	15 µg/ml
inzulin	Sigma, I 1882	5 µg/ml
hidrokortizon	Sigma, H 0888	0,5 µg/ml
fosfoetanolamin	Sigma, P0503	0,1 mM
glutamaks	Gibco, 35050-038	4 mM
PenStrep (mešanica penicilina in streptomicina)	Gibco, 15140-122	100 µg/ml penicilina in 100 U/ml streptomicina
FBS	Gibco, 10108-165	2,5 %

3.2.5.2 Hranilni medij za celice T24

Za gojenje rakavih celic smo uporabljali hranilni medij A-DMEM, katerega osnovni sestavini sta medija A-DMEM in F12 vsebuje pa tudi FBS in antibiotika (penicilin, streptomicin) (Preglednica 6).

Preglednica 6: Sestavine hranilnega medija A-DMEM za gojenje celic T24.

Sestavine hranilnega medija	Proizvajalec in kataloška številka	Koncentracije sestavin v hranilnem mediju
A-DMEM	Gibco, 12491-015	50 %
F12	Gibco, 21765-037	50 %
FBS	Gibco, 10108-165	5 %
Glutamaks	Gibco, 35050-038	4 mM
PenStrep (mešanica penicilina in streptomicina)	Gibco, 15140-122	100 µg/ml penicilina in 100 U/ml streptomicina

3.3 PRENOS WESTERN

3.3.1 Priprava celičnih lizatov

Celice NPU in T24 smo postrgali z dna plastične posodice za gojenje celic 2 ali 7 dni po nasaditvi. Celice NPU, ki smo jih gojili 3 tedne po nasaditvi, smo uporabili kot pozitivno kontrolo. Celice smo skupaj z medijem prenesli v centrifugirko in centrifugirali 5 min pri temperaturi 23 °C in 200 g. Medij smo odstranili in celice v obliki peleta zamrznili na temperaturo -80 °C. Naslednji dan smo celice počasi odmrznili na ledu in jim dodali pufer RIPA z dodanim PMSF (fenilmetilsulfonil fluorid) (Priloga B). Celice, ki smo jih v centrifugirkah ves čas hranili na ledu, smo nato homogenizirali s pipeto in dodajali pufer RIPA z dodanim PMSF po potrebi, dokler raztopina v centrifugirki ni postala bistra. Lizat celic smo centrifugirali 10 minut pri temperaturi 4 °C in 15557 g, ter nato previdno odstranili supernatant.

3.3.2 Določanje koncentracije proteinov

Koncentracijo proteinov v lizatih celic NPU in T24 smo izmerili s pomočjo kompleta reagentov za kolorimetrično detekcijo in kvantifikacijo proteinov BCA. Za umeritveno krivuljo smo pripravili standardne raztopine govejega serumskega albumina (BSA, Bovine Serum Albumin) s koncentracijami od 1 µg/ml do 10 µg/ml. Standardne raztopine ter desetkrat in dvajsetkrat redčene lizate celic smo na mikrotitrski plošči zmešali z delovnim reagentom BCA in jih inkubirali pri temperaturi 37 °C, 30 minut. Zatem smo s spektrofotometrom izmerili absorbanco standardov in vzorcev pri 560 nm. S pomočjo umeritvene krivulje smo izračunali koncentracijo proteinov v posameznih lizatih celic in preračunali količine vzorcev za nanos na gel.

3.3.3 Elektroforeza

Vzorci lizatov celic smo za nanos na gel pripravili tako, da smo jim dodali nanašalni pufer (Priloga C) in jih inkubirali 15 min pri temperaturi 100 °C. Pripravili smo poliakrilamidne gele različnih koncentracij (Preglednica 7), ter nanje nanесли vzorce in standarde za določanje molekulske mase proteinov. Na gele za elektroforezo smo nanašali od 3 µg do 10 µg proteinov, prenos western smo za vsak protein ponovili od 3 do 5 krat. Elektroforezo smo izvedli v elektroforetski celici, napolnjeni s pufrom za elektroforezo (Running buffer) (Priloga D) pri napetosti 200 V.

Preglednica 7: Sestava poliakrilamidnih gelov za elektroforezo.

Koncentracija gela	7,5 %	12 %
Deionizirana voda	4,85 ml	3,35 ml
1,5 mM TRIS/HCl, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl
30 % akrilamid/bis-akrilamid	2,5 ml	4,0 ml
10 % amonijev persulfat	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl

3.3.4 Prenos proteinov na nitrocelulozno membrano

Poliakrilamidni gel, na katerem so bili proteini ločeni glede na molekulsko maso, smo prenesli v ohlajen pufer za prenos (Transfer buffer) (Priloga E). V enakem pufu smo namočili tudi nitrocelulozno membrano, krpice iz blaga (velikosti 7 cm × 10 cm) in filtrirni papir. V kaseti smo pripravili sendvič z naslednjimi plastmi: krpica iz blaga, 4 koščki filtrirnega papirja, poliakrilamidni gel, nitrocelulozna membrana, 4 koščki filtrirnega papirja in krpica iz blaga. Pri sestavljanju smo pazili, da med plasti niso bili ujeti zračni mehurčki. Kaseto s sestavljenim sendvičem smo potopili v rezervoar aparature za električni prenos proteinov na nitrocelulozno membrano, ga napolnili z ohlajenim pufrom za prenos (Transfer buffer) (Priloga E) in pri napetosti 100 V prenašali proteine 1 uro.

3.3.5 Imunodetekcija motornih proteinov na nitrocelulozni membrani

Nitrocelulozne membrane smo po prenosu proteinov inkubirali v raztopini za blokado nespecifične vezave protiteles (5 % mleko v prahu v pufu PBS-Tween (1 % Tween-20 v pufu PBS)) 90 minut pri sobni temperaturi. Sledila je inkubacija membrane s primarnimi mišjimi protitelesi proti dineinu (mouse anti-Dynein intermediate chain 1 antibody,

redčena 1:1000 v pufru PBS-Tween), ali s primarnimi mišjimi protitelesi proti kinezinu 5B (mouse monoclonal anti-Kinesin (KIF 5B) antibody [SUK-4], redčena 1:1000 v pufru PBS-Tween), ali s primarnimi kunčjimi protitelesi proti miozinu Va (rabbit polyclonal anti-myosin Va antibody, redčena 1:1000 v pufru PBS-Tween) (Preglednica 6), na stresalniku, preko noči pri temperaturi 4 °C. Naslednji dan smo nitrocelulozne membrane spirali v pufru PBS-Tween trikrat po 5 minut in jih nato inkubirali v raztopini sekundarnih protiteles konjugiranih s hrenovo peroksidazo (anti-rabbit HRP, 6154/ anti-mouse HRP, A4416, redčenih 1:1000 v pufru PBS-Tween), 2 uri pri sobni temperaturi. Sledilo je spiranje membran s pufrom PBS-Tween petkrat po 5 minut in nato detekcija proteinov z metodo izboljšane kemoluminisce (ECL) s pomočjo kompleta SuperSignal. Reagenta smo zmešali v razmerju 1:1, dobro premešali in nanесли reagent na stran nitrocelulozne membrane, na katero so se prenesli proteini. Po 5 minutah inkubacije smo reagent odstranili in vstavili membrano, skupaj s filmi, v kaseto za izpostavljanje filmov. Različne membrane smo izpostavljali različno dolgo časa, odvisno od intenzitete signala, nato smo filme razvili v razvijalni raztopini in fiksirali v fiksirni raztopini za filme.

Preglednica 8: Molekulska masa in gostota uporabljenega poliakrilamidnega gela za posamezno protitelo.

Protitelo	Molekulska masa proteina (kDa)	Gostota gela (%)
Mišja primarna protitelesa proti kinezinu 5B (Mouse monoclonal anti-kinesin (KIF 5B) antibody [SUK-4])	120 kDa	7,5 %
Mišja primarna protitelesa proti dineinu (Mouse anti-dynein intermediate chain 1 antibody)	74 kDa	12 %
Kunčja primarna protitelesa proti miozinu Va (Rabbit polyclonal anti-myosin Va antibody)	207 kDa	7,5 %
Kunčja primarna protitelesa proti F-aktinu (Rabbit anti-actin)	43 kDa	7,5 %
Mišja primarna protitelesa proti α -tubulinu (Mouse anti- α -tubulin)	50 kDa	7,5 % ali 12 %

3.3.6 Kontrola nanosa in prenosa proteinov na nitrocelulozno membrano

Za kontrolo količine nanešenih proteinov na gel smo iste membrane po detekciji motornih proteinov uporabili še za imunodetekcijo aktina ali α -tubulina, ki sta prisotna v vseh celicah. Membrane smo inkubirali v pufru za čiščenje membran, 20 minut pri sobni temperaturi. Nato smo membrane spirali v pufru PBS-Tween trikrat po 5 minut ter ponovili celoten postopek imunodetekcije, pri katerem smo uporabili primarna kunčja protitelesa proti aktinu (rabbit anti-actin, A2066, redčena 1:2000 v pufru PBS-Tween) ali primarna

mišja protitelesa proti α -tubulinu (mouse anti- α -tubulin; T6199, redčena 1:2000 v pufru PBS-Tween) (Preglednica 6).

3.3.7 Semikvantitativna analiza proteinskih prog po prenosu western

Intenziteto proteinskih prog, pridobljenih z metodo prenosa western, smo semikvantitativno analizirali s programom ImageJ (1.51o). Relativno vrednost intenzitete proteinske proge za posamezni motorni protein smo izračunali tako, da smo intenziteto proge motornega proteina delili z intenziteto pripadajočega citoskeletnega proteina: kinezina 5B z α -tubulinom, dineina z α -tubulinom in miozina Va z F-aktinom.

3.4 IMUNOOZNAČEVANJE MONOKULTUR CELIC NPU IN T24 TER KOKULTURE CELIC (NPU+T24)

Celice NPU in T24 smo gojili na krovni stekelci z vgravirano mrežo v petrijevkah s površino 9,2 cm². Celice NPU smo nasadili z nasaditveno gostoto 1×10^5 , celice T24 z nasaditveno gostoto 5×10^4 celic/cm². V primeru kokulture celic (NPU+T24) smo celice NPU na stekelce nasadili z gostoto 1×10^5 celic/cm², celice T24 z gostoto 5×10^3 celic/cm². Celice smo 2 dni po nasaditvi fiksirali ter imunooznačili.

Celice imunooznačene s fluorescenco smo pregledali in poslikali s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa AxioImager Z1 z dodatkom Apotome, ki omogoča optično rezanje in oblikovanje 3D modela vzorca.

3.4.1 Dvojno imunooznačevanje α -tubulina in kinezina 5B

Monokulture in kokulture celic NPU in T24 smo 2 dni po nasaditvi fiksirali v 3,7 % (w/v) formalinu v pufru PEM/TX (Priloga F), 5 minut pri temperaturi 37 °C. Krovna stekelca s celicami smo nato spirali v pufru PBS trikrat po 5 minut. Sledila je dodatna fiksacija v 3,7 % (w/v) formalinu v pufru PBS, 5 minut pri temperaturi 37 °C in ponovno spiranje v pufru PBS petkrat v 20 minutah. Nespecifično vezavo primarnih protiteles smo blokirali z 1 % BSA v 10 % kozjem serumu v pufru PBS, 30 minut pri sobni temperaturi. Krovna stekelca smo nato prenesli na suho podlago in nanje nanесли mešanico primarnih protiteles: primarna kunčja protitelesa proti α -tubulinu (rabbit anti α -tubulin, redčena 1:100 v 1 % BSA v pufru PBS) in primarna mišja protitelesa proti kinezinu (mouse monoclonal anti-Kinesin (KIF 5B) antibody [SUK-4], redčena 1:100 v 1 % BSA v pufru PBS). Inkubacijo s

primarnimi protitelesi smo izvedli preko noči, pri temperaturi 4 °C. Naslednji dan je sledilo spiranje v pufru PBS petkrat po 5 minut in dvakrat po 10 minut, ter nanos mešanice sekundarnih protiteles: sekundarna kozja protitelesa proti kunčjim protitelesom (goat anti rabbit AF488, redčena 1:500 v 1 % BSA v pufru PBS) in sekundarna kozja protitelesa proti mišjim protitelesom (goat anti mouse AF555, redčena 1:500 v 1 % BSA v pufru PBS), ter inkubacija 90 minut v temi pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo krovna stekelca ponovno spirali v pufru PBS petkrat po 5 minut. Nato smo jih prenesli na objektna stekelca, na katera smo predhodno kanili kapljico hidrofilnega vklopnega medija Vectashield, ki preprečuje bledenje fluorescence in vsebuje barvilo DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol). DAPI se veže na molekule DNA in tako obarva jedra celic modro.

3.4.2 Dvojno imunooznačevanje α -tubulina in dineina

Monokulture in kokulture celic NPU in T24 smo 2 dni po nasaditvi fiksirali v 3,7 % (w/v) formalinu v pufru PEM/TX (Priloga F), 5 minut na 37 °C. Krovna stekelca s celicami smo nato spirali v pufru PBS trikrat po 5 minut. Sledila je dodatna fiksacija v 3,7 % (w/v) formalinu v pufru PBS, 5 minut pri temperaturi 37 °C in ponovno spiranje v pufru PBS petkrat v 20 minutah. Nespecifično vezavo primarnih protiteles smo blokirali z 1 % BSA v 10 % kozjem serumu v pufru PBS, 30 minut pri sobni temperaturi. Krovna stekelca smo nato prenesli na suho podlago in nanje nanесли mešanico primarnih protiteles: primarna kunčja protitelesa proti α -tubulinu (rabbit anti α -tubulin, redčena 1:100 v 1 % BSA v pufru PBS) in primarna mišja protitelesa proti dineinu (mouse anti-Dynein intermediate chain 1 antibody, redčena 1:50 v 1 % BSA v pufru PBS). Inkubacijo s primarnimi protitelesi smo izvedli preko noči, pri temperaturi 4 °C. Naslednji dan je sledilo spiranje v pufru PBS petkrat po 5 minut in dvakrat po 10 minut, ter nanos mešanice sekundarnih protiteles: sekundarna kozja protitelesa proti kunčjim protitelesom (goat anti rabbit AF488, redčena 1:500 v 1 % BSA v pufru PBS) in sekundarna kozja protitelesa proti mišjim protitelesom (goat anti mouse AF555, redčena 1:500 v 1 % BSA v pufru PBS), ter inkubacija 90 minut v temi pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo krovna stekelca ponovno spirali v pufru PBS petkrat po 5 minut, nato pa smo jih prenesli na objektna stekelca, na katera smo predhodno kanili kapljico hidrofilnega vklopnega medija Vectashield s fluorescenčnim barvilom DAPI.

3.4.3 Dvojno (imuno)označevanje aktinskih filamentov in miozina Va

Monokulture in kokulture celic NPU in T24 smo 2 dni po nasaditvi fiksirali v 4 % (w/v) paraformaldehidu, predhodno segretem pri temperaturi 37 °C, 10 minut pri sobni temperaturi. Krovna stekelca s celicami smo nato spirali v pufru PBS trikrat po 5 minut. Sledila je inkubacija v blokirnem pufru (0,5 % BSA, 0,1 % saponin, 0,1 % želatina, 50 mM

NH₄Cl, 0,02 % NaN₃), 45 minut pri sobni temperaturi. Krovna stekelca smo nato prenesli na suho podlago in nanje nanесли primarna kunčja protitelesa proti miozinu (rabbit polyclonal anti-myosin Va antibody, redčena 1:100 v 1 % BSA v pufru PBS). Inkubacijo s primarnimi protitelesi smo izvedli preko noči, pri temperaturi 4 °C. Naslednji dan je sledilo spiranje v pufru PBS petkrat po 5 minut in dvakrat po 10 minut, ter nanos sekundarnih kozjih protiteles proti kunčjim protitelesom (goat anti rabbit AF555, redčena 1:500 v 1 % BSA v pufru PBS), ter inkubacija 90 minut v temi pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo krovna stekelca ponovno spirali v pufru PBS petkrat po 5 minut, nato za označitev aktinskih filamentov nanje nanесли faloidin FITC (redčen 1:5 v pufru PBS) ter jih inkubirali 30 minut v temi pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo stekelca spirali v pufru PBS petkrat po 5 minut, nato smo jih prenesli na objektna stekelca na katera smo predhodno kanili kapljico Vectashield s fluorescenčnim barvilom DAPI.

3.4.4 Dvojno imunooznačevanje miozina Va in kinezina 5B

Monokulture in kokulture celic NPU in T24 smo 2 dni po nasaditvi fiksirali v 4 % (w/v) paraformaldehidu, predhodno segretem pri temperaturi 37 °C, 10 minut pri sobni temperaturi. Krovna stekelca s celicami smo nato spirali v pufru PBS trikrat po 5 minut. Sledila je inkubacija v blokirnem pufru (0,5 % BSA (*Sigma*), 0,1 % saponin, 0,1 % želatina, 50 mM NH₄Cl, 0,02 % NaN₃), 45 minut pri sobni temperaturi. Krovna stekelca smo nato prenesli na suho podlago in nanje nanесли primarna kunčja protitelesa proti miozinu (rabbit polyclonal anti-myosin Va antibody, redčena 1:100 v 1 % BSA v pufru PBS) in primarna mišja protitelesa proti kinezinu (mouse monoclonal anti-Kinesin (KIF 5B) antibody [SUK-4], redčena 1:100 v 1 % BSA v pufru PBS). Inkubacijo s primarnimi protitelesi smo izvedli preko noči, pri temperaturi 4 °C. Naslednji dan je sledilo spiranje v pufru PBS petkrat po 5 minut in dvakrat po 10 minut, ter nanos mešanice sekundarnih protiteles: sekundarna kozja protitelesa proti kunčjim protitelesom (goat anti rabbit AF555, redčena 1:500 v 1% BSA v pufru PBS) in sekundarna kozja protitelesa proti mišjim protitelesom (goat anti mouse AF488, redčena 1:500 v 1% BSA v pufru PBS), ter inkubacija 90 minut v temi pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo krovna stekelca ponovno spirali v pufru PBS petkrat po 5 minut, nato smo jih prenesli na objektna stekelca, na katera smo predhodno kanili kapljico hidrofilnega vklopnega medija Vectashield s fluorescenčnim barvilom DAPI.

3.4.5 Dvojno imunooznačevanje miozina Va in dineina

Monokulture in kokulture celic NPU in T24 smo 2 dni po nasaditvi fiksirali v 4 % (w/v) paraformaldehidu, predhodno segretem pri temperaturi 37 °C, 10 minut pri sobni temperaturi. Krovna stekelca s celicami smo nato spirali v pufru PBS trikrat po 5 minut. Sledila je inkubacija v blokirnem pufru (0,5 % BSA, 0,1 % saponin, 0,1 % želatina, 50 mM NH₄Cl, 0,02 % NaN₃), 45 minut pri sobni temperaturi. Krovna stekelca smo nato prenesli na suho podlago in nanje nanесли primarna kunčja protitelesa proti miozinu (rabbit polyclonal anti-myosin Va antibody, redčena 1:100 v 1 % BSA v pufru PBS) in primarna mišja protitelesa proti dineinu (mouse anti-Dynein intermediate chain 1 antibody, redčena 1:50 v 1 % BSA v pufru PBS). Inkubacijo s primarnimi protitelesi smo izvedli preko noči, pri temperaturi 4 °C. Naslednji dan je sledilo spiranje v pufru PBS petkrat po 5 minut in dvakrat po 10 minut, ter nanos mešanice sekundarnih protiteles: sekundarna kozja protitelesa proti kunčjim protitelesom (goat anti rabbit AF555, redčena 1:500 v 1% BSA v pufru PBS) in sekundarna kozja protitelesa proti mišjim protitelesom (goat anti mouse AF488, redčena 1:500 v 1% BSA v pufru PBS), ter inkubacija 90 minut v temi pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo krovna stekelca ponovno spirali v pufru PBS petkrat po 5 minut, nato smo jih prenesli na objektna stekelca, na katera smo predhodno kanili kapljico hidrofilnega vklopnega medija Vectashield s fluorescenčnim barvilom DAPI .

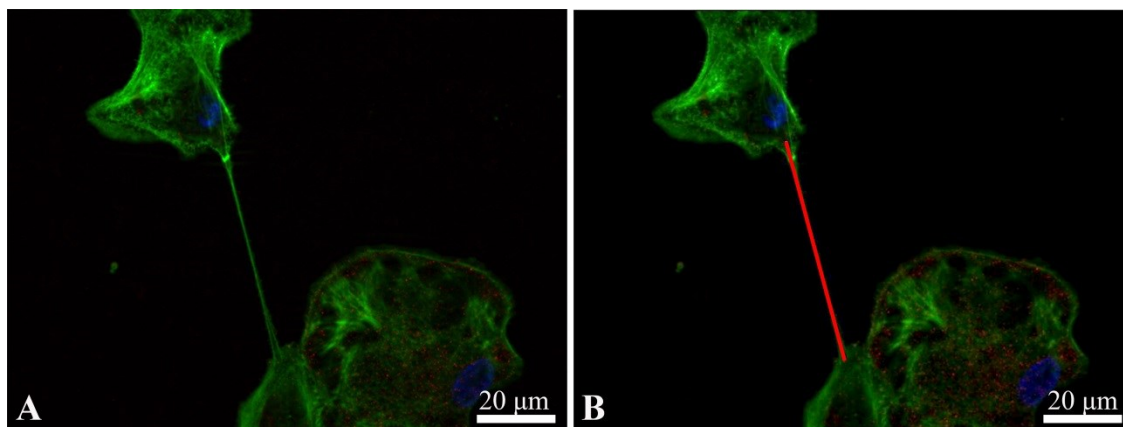
3.4.6 Negativna kontrola imunooznačevanja rakavih in normalnih urotelijskih celic

Pri vsakem poskusu imunooznačevanja rakavih in normalnih urotelijskih celic smo naredili tudi negativno kontrolo, s katero smo preverjali nespecifično vezavo sekundarnih protiteles. To smo storili tako, da smo izvedli popolnoma enak postopek, kot je opisano zgoraj, le da smo celice namesto v mešanici primarnih protiteles inkubirali v 1 % BSA v pufru PBS.

3.5 ANALIZA SLIK IN STATISTIČNA ANALIZA

3.5.1 Merjenje dolžine TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic ter TnT kokulture celic (NPU+T24)

Dolžino TnT celic NPU in T24 smo izmerili s pomočjo programa ImageJ (1.51o). Določili smo začetno in končno točko TnT v donorski oziroma akceptorski celici in izmerili razdaljo med njima (Slika 6).



Slika 6: Prikaz merjenja dolžine TnT. TnT med celicama NPU. (A). Rdeča črta prikazuje dolžino izmerjeno z računalniškim programom ImageJ (1.51o), ki ustreza dolžini TnT (B).

3.5.2 Določanje prisotnosti motornih in citoskeletnih proteinov v TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic ter v TnT kokulture celic (NPU+T24)

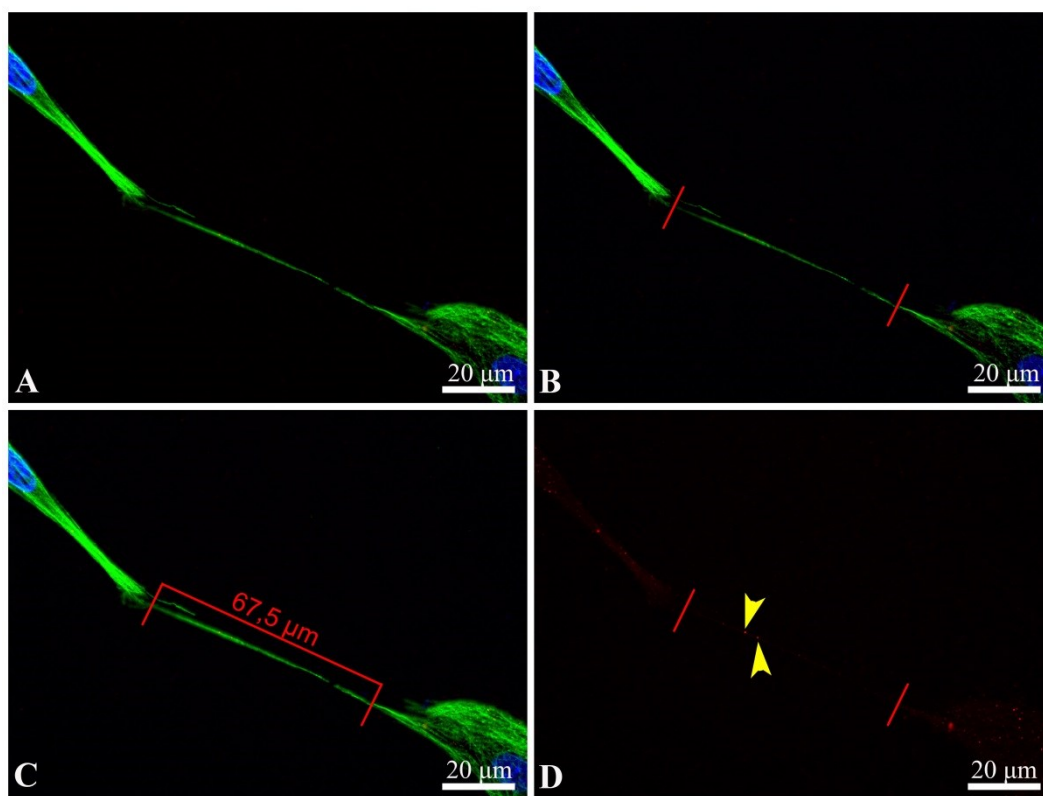
Preparate smo po izvedenem postopku imunooznačevanja motornih proteinov pregledali s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa AxioImager Z1 (*Zeiss*), ki omogoča optično rezanje. Vse TnT, ki smo jih opazili, smo tudi fotografirali. Za analizo fotografij smo uporabili program AxioVision. Na podlagi slik smo ugotavljali, ali so motorni proteini s pripadajočimi citoskeletnimi proteini prisotni v vseh TnT ali določene TnT vsebujejo samo citoskeletne proteine.

3.5.3 Primerjava vsebnosti in kvantifikacija motornih in citoskeletnih proteinov v TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic ter v TnT kokulture celic (NPU+T24)

Primerjavo vsebnosti motornih in citoskeletnih proteinov v TnT smo izvedli na podlagi analize mikrofotografij, na katerih so bili motorni proteini vidni v obliki točkastih fluorescenčnih signalov, citoskeletni proteini pa kot gradniki filamentoznih citoskeletnih

elementov. Po izvedeni analizi smo določili, v kolikšnem odstotku TnT so prisotni samo motorni ali samo citoskeletni proteini, in v kolikšnem odstotku so v TnT prisotni oboji. Pri tem smo za 100 % uporabili število vseh opaženih TnT.

Kvantifikacijo vsebnosti motornih proteinov v TnT normalnih in rakavih celic smo izvedli tako, da smo izračunali število točkastih fluorescenčnih signalov posameznega motornega proteina na μm TnT. V programu AxioVision smo izbrani TnT najprej določili meje, pri čemer smo izločili lijak ob stiku z donorsko celico, saj je bila tam koncentracija signala veliko višja kot v sami nanocevkki in je bilo štetje točkastih signalov oteženo. S pomočjo programa smo nato izmerili dolžino omejenega območja. V omejenem območju smo prešteli vse točkaste fluorescenčne signale in izračunali število točkastih fluorescenčnih signalov na μm TnT tako, da smo število točkastih signalov delili z dolžino omejenega območja TnT (Slika 7).



Slika 7: Prikaz postopka kvantifikacije vsebnosti motornih proteinov v TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic. Izbrani nanocevkki (A) smo določili meje (B), izmerili njeno dolžino (C) in prešteli točkaste signale motornih proteinov (D). Rumeni puščici prikazujeta točkaste signale. Uporabljali smo računalniški program AxioVision.

3.5.4 Določanje lokacije motornih proteinov v TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic ter v TnT kokulture celic (NPU+T24)

Določanje lokacije motornih proteinov v TnT normalnih in rakavih celic smo izvedli po enakem postopku, kot je opisan v poglavju 3.4.2, le da smo omejeno območje TnT razdelili na polovico in ločeno prešteli točkaste fluorescenčne signale, ki so bili bližje donorski in tiste, ki so se nahajali bližje akceptorski celici.

3.5.5 Statistična analiza podatkov

Vse pridobljene numerične rezultate smo statistično obdelali v programu Excel, s pomočjo katerega smo izračunali povprečja in standardno napako. Razlike v variancah smo preverili z F-testom, za testiranje statistično značilnih razlik pa smo uporabili Studentov *t*-test. Statistično značilno razliko smo postavili pri $p < 0,001$ ali $p < 0,05$.

4 REZULTATI

4.1 SPREMLJANJE NASTANKA IN MERJENJE DOLŽINE TUNELSKIH MEMBRANSKIH NANOCEVK

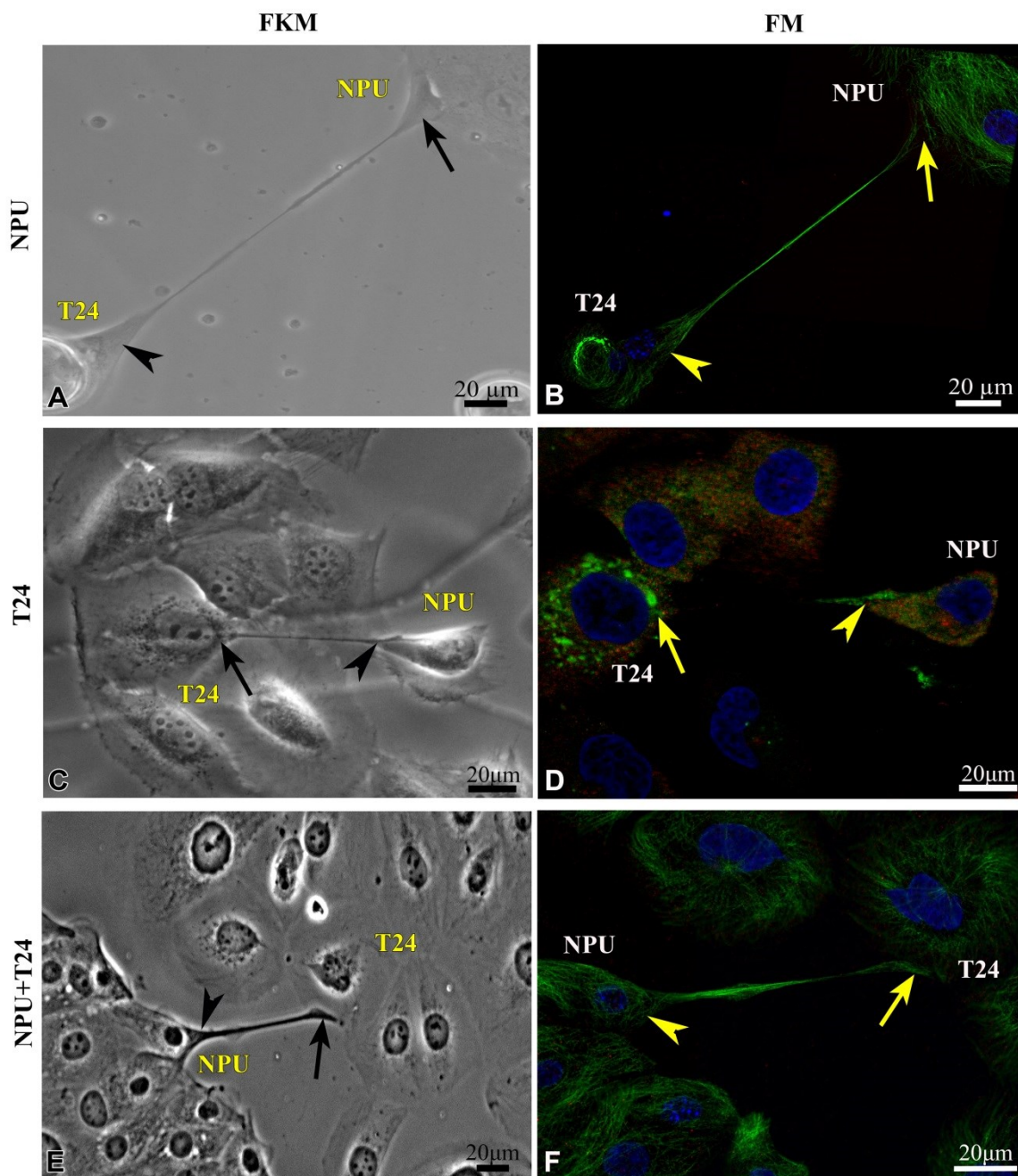
Monokulture celic NPU in T24 ter kokulture celic (NPU+T24) smo nasadili na stekelca z vgravirano mrežo. V razmerah *in vitro* smo jih gojili 2 dni in spremljali njihovo rast ter nastanek TnT.

4.1.1 Spremljanje nastanka in določanje smeri poteka TnT

Po nasaditvi celic in dodatku ustreznega hranilnega medija smo rast celic in nastanek TnT spremljali z invertnim faznokontrastnim svetlobnim mikroskopom. Celice so v večini sestavljene iz vode, zaradi česar organeli in druge celične strukture slabo absorbirajo svetlobo in so pod svetlobnim mikroskopom prosojne, kar oteži njihovo opazovanje. Za spremljanje celic smo zato uporabljali faznokontrastno mikroskopijo, pri kateri se poveča fazni zamik valovnih dolžin svetlobnih žarkov, ki potujejo skozi plasti celic različnih debelin. Pri tem se fazni zamiki seštevajo, kar povzroči spremembe v amplitudi valovanja svetlobe, naše oko pa te spremembe zazna kot razliko v kontrastu. Optično gostejše strukture smo tako videli kot temnejše, kar nam je močno olajšalo opazovanje celic (Slika 8A, 8C, 8E).

Uporaba krovnih stekelc z vgravirano mrežo nam je omogočila korelativno mikroskopijo, kar pomeni, da smo določeno TnT, ki smo jo opazovali s svetlobnim mikroskopom, opazovali tudi s fluorescenčnim mikroskopom po postopku imunooznačevanja (Slika 8B, 8D, 8F). TnT, ki so zelo občutljive na mehanske in kemijske dražljaje, so se med postopkom fiksacije in imunooznačevanja velikokrat pretrgale, zaradi česar smo s fluorescenčnim mikroskopom našli le 27 % TnT, ki smo jih opazili med spremljanjem rasti celic.

Po imunooznačevanju smo za vsako TnT poskušali določiti tudi njeno smer poteka. Donorska celica je tista, iz katere TnT izrašča v obliki širokega lijaka, akceptorska pa tista celica, na katero se TnT pritrdi (Slika 8). V kokulturi celic (NPU+T24) posameznega tipa celic nismo označili z membranskimi barvili, saj bi nam to otežilo zaznavanje prisotnosti citoskeletnih in motornih proteinov. Celice smo med seboj ločevali na podlagi morfologije oziroma razlike v velikosti celičnih jeder. Analiza premera 50 naključno izbranih jeder celic NPU in T24 je namreč pokazala, da meri premer jedra celic NPU povprečno $11,5 \pm 0,3 \mu\text{m}$, premer jedra celic T24 pa $20 \pm 0,4 \mu\text{m}$ (Priloga G).



Slika 8: Primerjava korelativne faznokontrastne in fluorescenčne mikroskopije TnT normalnih urotelijskih celic (NPU), rakavih urotelijskih celic (T24) in kokulture celic (NPU+T24). TnT celic NPU, T24 in NPU+T24 posnete s faznokontrastnim mikroskopom (FKM) (A, C, E). Iste TnT posnete s fluorescenčnim mikroskopom (FM) po izvedenem postopku imunooznačevanja citoskeletnih proteinov (zeleno) in motornih proteinov (rdeče) (B, D, F). Jedra celic so obarvana modro z barvilom DAPI. Glave puščic prikazujejo lijak donorskih celic, puščice pa mesto pritrditve TnT na akceptorsko celico.

4.1.2 Analiza dolžine TnT v monokulturah normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic in kokulturi celic (NPU+T24)

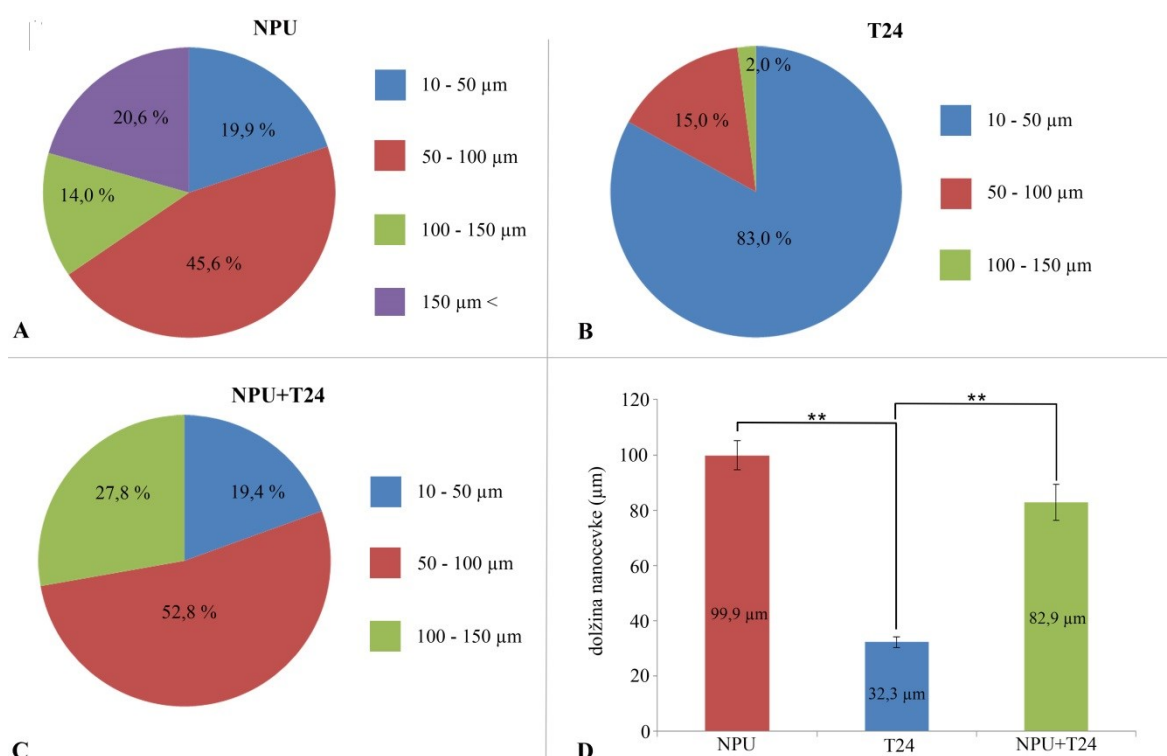
S programom ImageJ (1.51o) (Slika 6) smo izmerili dolžino vseh TnT, ki smo jih opazili v monokulturah celic NPU in T24 ter kokulturi celic (NPU+T24) po postopku, opisanem v metodah (Poglavje 3.4.1).

Analiza dolžine TnT v monokulturi celic NPU je pokazala, da je povprečna dolžina TnT med celicami $99,9 \pm 5,2 \mu\text{m}$ (Priloga H). 19,9 % izmerjenih TnT je bilo dolgih med 10 in $50 \mu\text{m}$, 45,6 % TnT med 50 in $100 \mu\text{m}$, 14 % TnT med 100 in $150 \mu\text{m}$, 20,6 % opaženih TnT pa je bilo daljših od $150 \mu\text{m}$ (Slika 9A).

Povprečna dolžina TnT v monokulturi celic T24 je bila $32,2 \pm 1,9 \mu\text{m}$. 83 % vseh izmerjenih TnT je bilo dolgih med 10 in $50 \mu\text{m}$ (Priloga H), 15 % TnT je bilo dolgih med 50 in $100 \mu\text{m}$, samo 2 % TnT je bilo dolgih več kot $100 \mu\text{m}$ (Slika 9B).

TnT v kokulturi celic (NPU+T24) so bile povprečno dolge $82,9 \pm 6,4 \mu\text{m}$ (Priloga H). 19,4 % TnT je bilo dolgih med 10 in $50 \mu\text{m}$, 52,8 % med 50 in $100 \mu\text{m}$ in 27,8 % med 100 in $150 \mu\text{m}$ (Slika 9C). TnT v kokulturi celic (NPU+T24) so bile po dolžini bolj podobne TnT celic NPU, kar se sklada z našimi rezultati, ki so pokazali, da več kot polovica pregledanih TnT v kokulturi izrašča iz celic NPU.

Med dolžino TnT celic NPU in dolžino TnT celic T24 obstaja statistično značilna razlika. Prav tako se dolžina TnT v kokulturi celic (NPU+T24) statistično razlikuje od dolžine TnT med celicami T24, medtem ko se statistično ne razlikuje od dolžine TnT med celicami NPU (Slika 9D).



Slika 9: Analiza dolžine TnT normalnih urotelijskih celic (NPU), rakavih urotelijskih celic (T24) in kokulture celic (NPU+T24). Dolžina TnT v monokulturi normalnih urotelijskih celic NPU (A). Dolžina TnT v monokulturi rakavih urotelijskih celic T24 (B). Dolžina TnT v kokulturi celic (NPU+T24) (C). Graf povprečnih dolžin (μm) TnT med celicami NPU, T24 in NPU+T24 (D). **p < 0,001. Število izmerjenih TnT: (A): 136, (B): 147, (C): 36.

4.2 PRISOTNOST IN LOKACIJA MOTORNIH PROTEINOV V TUNELSKIH MEMBRANSKIH NANOCEVKAH NORMALNIH (NPU) IN RAKAVIH (T24) UROTELIJSKIH CELIC, TER KOKULTURE CELIC (NPU+T24)

Z metodo imunooznačevanja smo preverjali, katere motorne proteine vsebujejo TnT, kakšna je njihova znotrajcelična lokacija in ali je prisotnost določenega motornega proteina pogojena s prisotnostjo ustreznega citoskeletnega elementa.

4.2.1 Preverjanje prisotnosti motornih proteinov v monokulturah normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic z metodo prenosa western

Prisotnost motornih proteinov v celicah NPU in T24 smo preverili s prenosom western. Motorne proteine smo določali v lizatih celic NPU in T24, ki smo jih gojili 2 oziroma 7 dni in lizatih celic NPU, gojenih 3 tedne. Sočasno z določanjem vsebnosti motornih proteinov

v celicah, smo določali tudi vsebnost citoskeletnih proteinov α -tubulina in F-aktina, kismo ju uporabili za kontrolo nanosa proteinov na gel.

4.2.1.1 Kontrola specifičnosti protiteles

Specifičnost vezave protiteles smo določali v vzorcih celic NPU, ki smo jih gojili 3 tedne in vzorcih celic T24, ki smo jih gojili 7 dni. Molekulska masa označenega proteina smo določili s pomočjo molekulskih standardov znanih molekulskih mas, ki se med elektroforezo razporedijo v gelu v obliki lestvice. Standard z največjo molekulsko maso se v gelu nahaja bližje mestu nanosa, tisti z najmanjšo molekulsko maso pa je od mesta nanosa najbolj oddaljen.

Kontrola specifičnosti vezave protiteles je pokazala, da se protitelesa vežejo na izbrane proteine z visoko specifičnostjo. Proge, ki označujejo prisotnost določenega proteina, so se namreč nahajale na ustreznih položajih glede na pričakovano molekulsko maso proteina (Slika 10).

4.2.1.2 Primerjava intenzitete proteinskih prog motornih proteinov v celicah NPU in T24

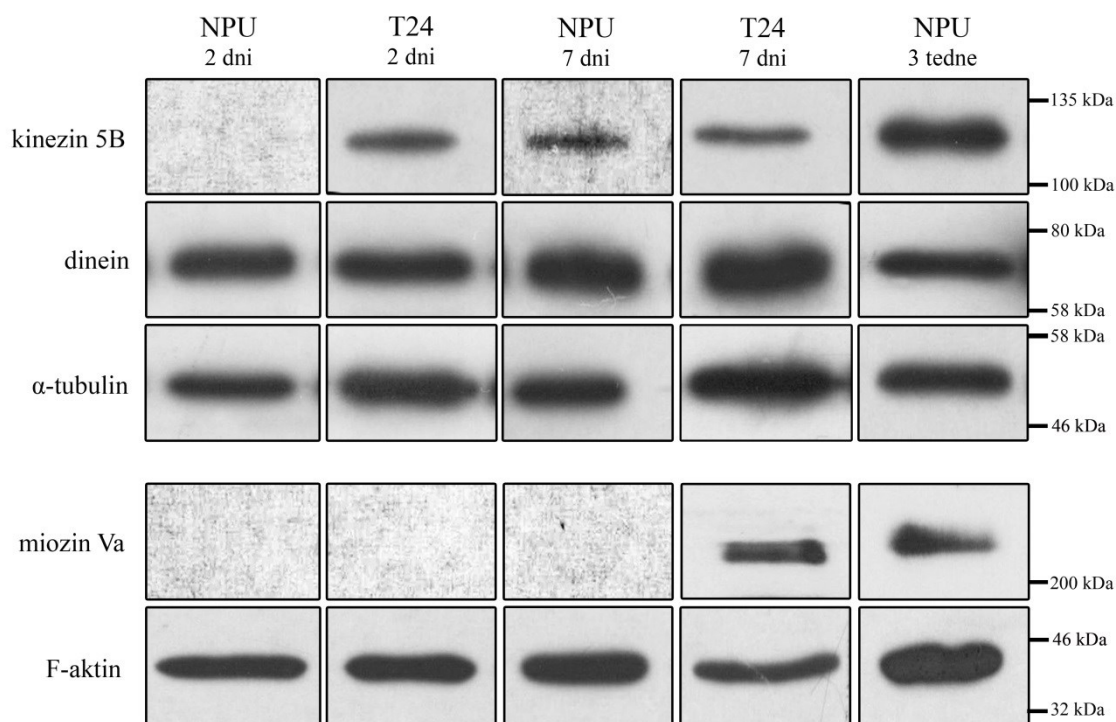
Zanimalo nas je, ali obstaja razlika v relativni količini kinezina 5B, dineina in miozina Va med celicami NPU in T24, ki smo jih gojili 2 dni in celicami, ki smo jih gojili 7 dni. Celice NPU, ki smo jih gojili 3 tedne, smo uporabili kot pozitivno kontrolo, saj smo domnevali, da vsebujejo največjo količino motornih proteinov.

Rezultati so pokazali, da celice NPU po 2 dneh gojenja bodisi ne vsebujejo kinezina 5B ali ga vsebujejo premalo, da bi ga lahko detektirali z našo metodo (Slika 10). Ker smo z imunooznačevanjem v teh celicah dokazali prisotnost kinezina 5B (Sliki 11, 14), sklepamo, da je bila količina proteinov v vzorcu manjša od meje detekcije metode prenosa western. Celice T24, ki smo jih prav tako gojili 2 dni, so vsebovale kinezin 5B. V celicah NPU oziroma T24, ki smo jih gojili 7 dni, je bila količina kinezina 5B manjša kot v celicah NPU po 3 tednih gojenja. Iz rezultatov je razvidno tudi, da celice T24 vsebujejo podobno količino motornega proteina kinezina 5B po 2 in 7 dneh gojenja, medtem ko se količina tega proteina v celicah NPU povečuje s časom gojenja celic (Slika 10).

Določanje relativne količine dineina v celicah NPU in T24 je pokazalo, da vsebujejo vse celice podobno količino proteina. Vsebnost dineina je bila v celicah NPU oziroma T24 po

2 dneh gojenja manjša, kot po 7 dneh gojenja, razlik v vsebnosti med normalnimi in rakavimi urotelijskimi celicami nismo opazili (Slika 10).

Rezultati prenosa western so pokazali tudi, da je količina motornega proteina miozina Va v celicah zelo nizka, saj smo liso, ki označuje njegovo prisotnost, opazili samo pri celicah T24 po 7 dneh gojenja in pri celicah NPU po 3 tednih gojenja. V vseh ostalih primerih je bila količina proteina prenizka, da bi ga zaznali z izbrano metodo (Slika 10).



Slika 10: Prenos western lizatov normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic po 2 in 7 dneh gojenja ter lizatov celic NPU celic po 3 tednih gojenja. Položaji proteinskih prog ustrezajo specifičnim molekulskim masam proteinov: kinezin 5B: 120 kDa, dinein: 74 kDa, miozin Va: 207 kDa, α -tubulin: 50 kDa in F-aktin: 43 kDa. Celice NPU, gojene 3 tedne, predstavljajo pozitivno kontrolo prisotnosti proteinov v vzorcih. Molekulske mase (kDa) molekulskih standardov so prikazane na desnem robu slike.

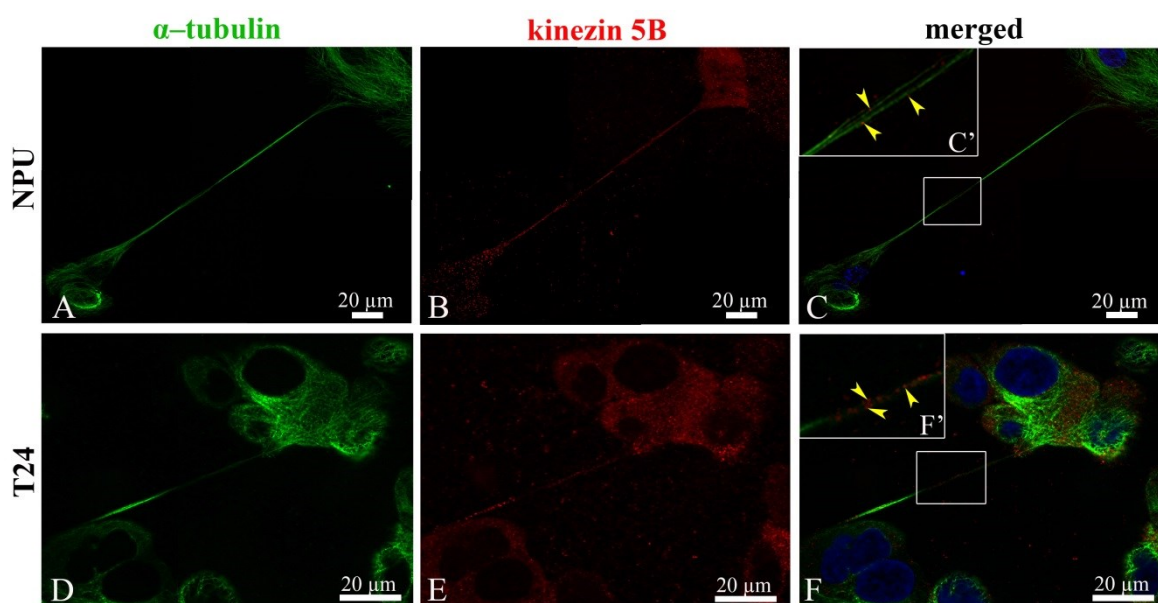
4.2.2 Določanje lokacije motornih in citoskeletnih proteinov v TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic z metodo imunooznačevanja

Z imunooznačevanjem kinezina 5B, dineina in miozina Va smo želeli preveriti, kakšna je lokacija motornih proteinov znotraj TnT normalnih in rakavih urotelijskih celic. Ker je delovanje celičnih motornih proteinov odvisno od prisotnosti ustreznih citoskeletnih elementov, smo v celicah hkrati označili tudi α -tubulin, ki je osnovni gradnik mikrotubulov in F-aktin, filamentozno obliko aktina, ki sestavlja aktinske filamente.

4.2.2.1 Lokacija α -tubulina in kinezina 5B znotraj TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic

Motorni protein kinezin 5B smo v normalnih in rakavih urotelijskih celicah označevali v kombinaciji z α -tubulinom. Naši rezultati so pokazali, da lokacija mikrotubulov (Slika 11A, 11D), ki so enakomerno razporejeni znotraj citoplazme celic, sovpada z lokacijo kinezina 5B (Slika 11B, 11E) tako pri celicah NPU kot T24.

Imunooznačevanje α -tubulina je pokazalo, da se mikrotubuli nahajajo tudi znotraj TnT celic NPU in T24, kar potrjuje pomembno vlogo mikrotubulov pri tvorbi in stabilizaciji TnT med normalnimi in rakavimi urotelijskimi celicami. Hkrati z mikrotubuli smo v TnT opazili fluorescenčne točkaste signale, ki predstavljajo molekule kinezina 5B (Slika 11C, 11F). Iz pridobljenih rezultatov sklepamo, da v TnT celic NPU in T24 poteka od kinezina odvisen aktivni transport, ki omogoča izmenjavo snovi med celicama in teče v smeri proti koncu plus mikrotubula oziroma od donorske celice proti akceptorski celici.

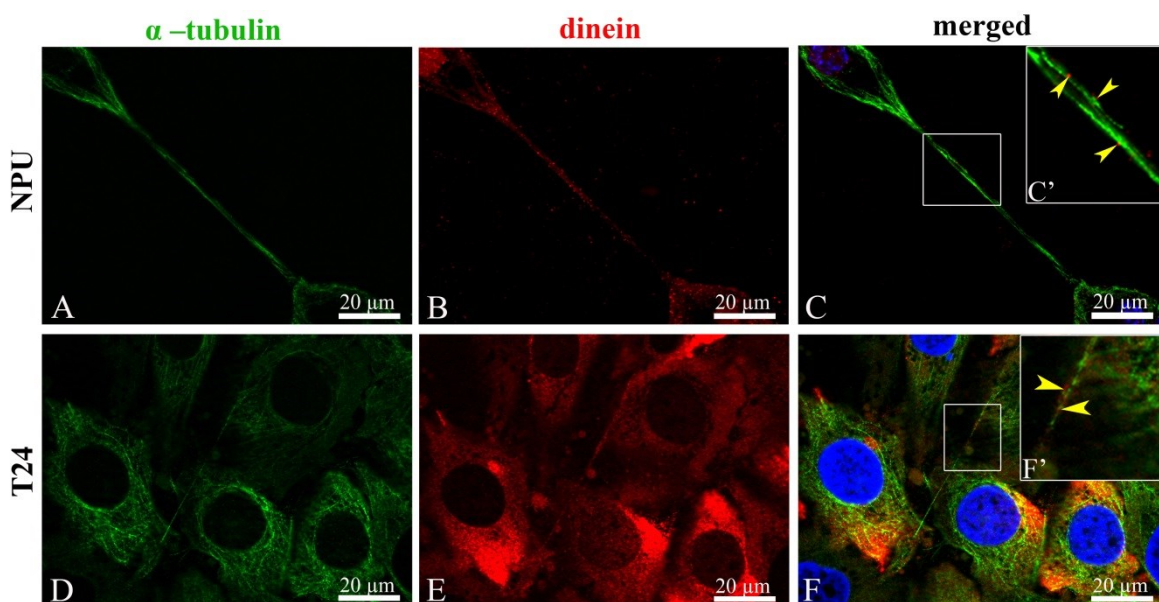


Slika 11: Imunooznačevanje α -tubulina in kinezina 5B v TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic. Imunofluorescenca α -tubulina (zeleno), ki je osnovni gradnik mikrotubulov (A, D). Imunofluorescenca motornega proteina kinezina 5B (rdeče) (B, E). Združene slike, na katerih so jedra celic obarvana modro z barvilom DAPI (C, F). Rumene puščice označujejo točkaste fluorescenčne signale (rdeče), ki predstavljajo molekule kinezina 5B. (C, F) Majhni okvirčki označujejo del slike, ki je v večjem okvirju zgoraj povečan za (C') 200 %, oziroma (F') 150 %.

4.2.2.2 Lokacija α -tubulina in dineina znotraj TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic

Imunooznačevanje α -tubulina je pokazalo enakomerno razporeditev mikrotubulov (Slika 12A, 12C) v citoplazmi celic NPU in T24, z njihovo lokacijo je sovpadala tudi prisotnost dineina (Slika 12B, 12E).

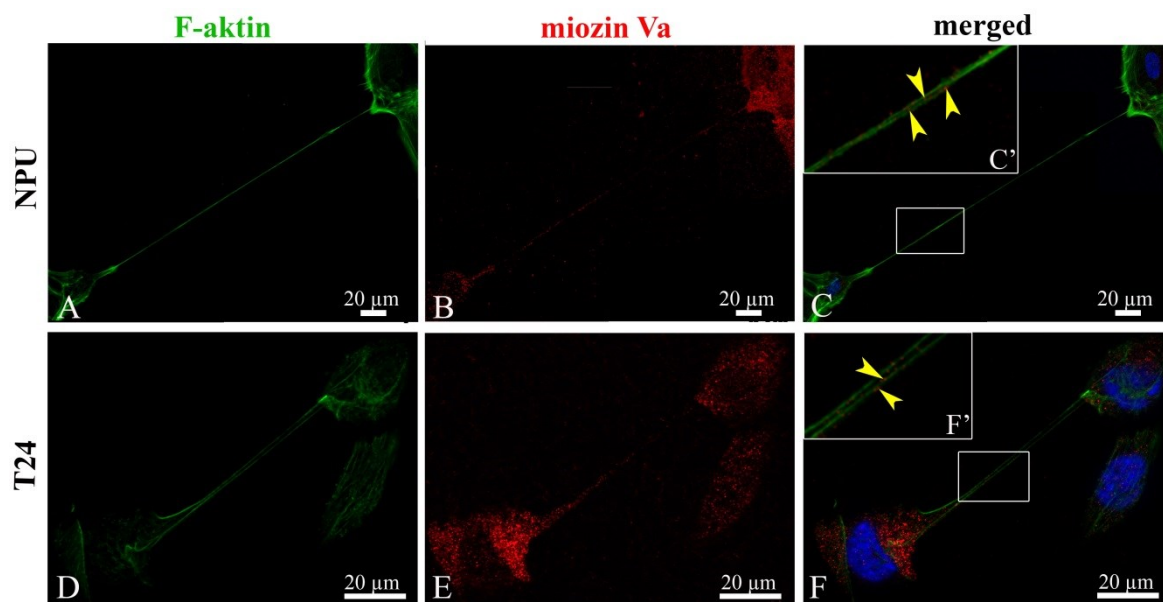
Naši rezultati so pokazali tudi hkraten obstoj α -tubulina in dineina znotraj TnT. Prisotnost dineina v TnT (Slika 12C, 12F) nakazuje na možnost, da transport snovi ne teče samo od donorske celice proti akceptorski celici, ampak tudi v obratni smeri, saj se dinein po mikrotubulu pomika v smeri proti koncu minus.



Slika 12: Imunooznačevanje α -tubulina in dineina v TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic. Imunofluorescenca α -tubulina (zeleno), ki je osnovni gradnik mikrotubulov (A, D). Imunofluorescenca motornega proteina dineina (rdeče) (B, E). Združene slike, na katerih so jedra celic obarvana modro z barvilom DAPI (C, F). Rumene puščice označujejo točkaste fluorescenčne signale (rdeče), ki predstavljajo molekule dineina. (C, F) Majhni okvirčki označujejo del slike, ki je v večjem okvirju zgoraj povečan za (C', F') 150 %.

4.2.2.3 Lokacija F-aktina in miozina Va znotraj TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic

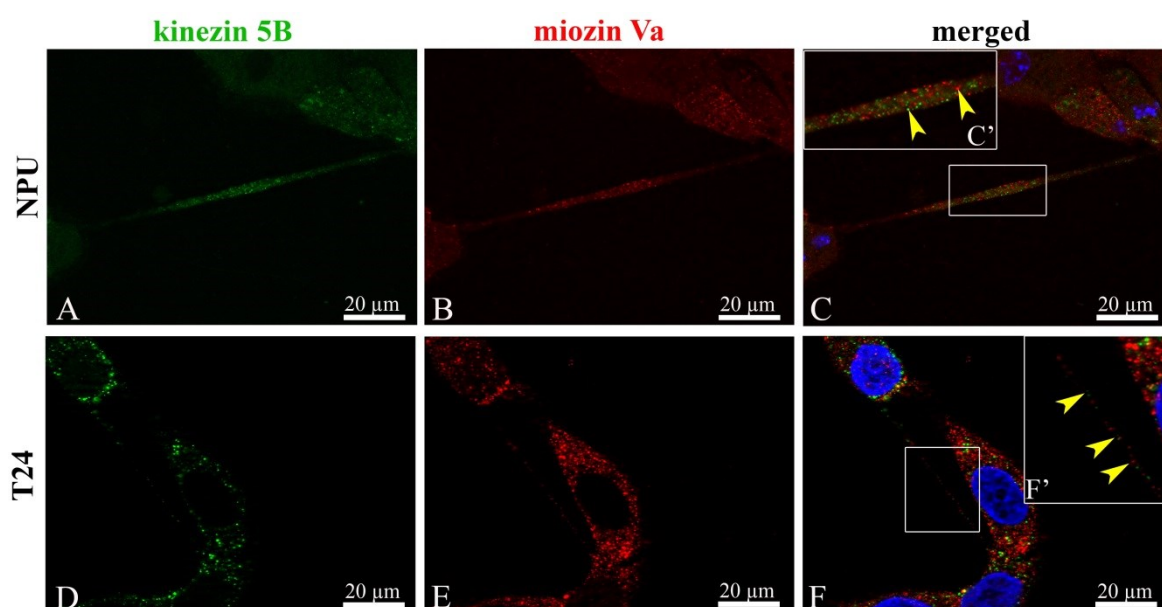
Z označevanjem F-aktina smo dokazali, da so aktinski filamenti enakomerno razporejeni znotraj normalnih in rakavih urotelijskih celic, tik pod plazmalemo pa je njihova koncentracija nekoliko povečana (Slika 13A, 13D). Lokacija motornega proteina miozina Va, ki ima pomembno vlogo v znotrajceličnem transportu snovi, v citoplazmi celic sovpada z lokacijo aktinskih filamentov. Naši rezultati so pokazali prisotnost aktinskih filamentov v TnT normalnih in rakavih urotelijskih celic. V TnT smo opazili tudi molekule miozina Va (Slika 13C, 13F), kar nakazuje na možnost transporta snovi med celicami v smeri proti koncu plus aktinskega filamenta oziroma od donorske proti akceptorski celici.



Slika 13: (Imuno)označevanje F-aktina in miozina Va v TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic. Fluorescenca F-aktina (zeleno), ki je osnovni gradnik aktinskih filamentov (A, D). Imunofluorescenca motornega proteina miozina Va (rdeče) (B, E). Združene slike, na katerih so jedra celic obarvana modro z barvilom DAPI (C, F). Rumene puščice označujejo točkaste fluorescenčne signale (rdeče), ki predstavljajo molekule miozina Va. (C, F) Majhni okvirčki označujejo del slike, ki je v večjem okvirju zgoraj povečan za (C') 200 %, oziroma (F') 150 %.

4.2.2.4 Lokacija kinezina 5B in miozina Va znotraj TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic

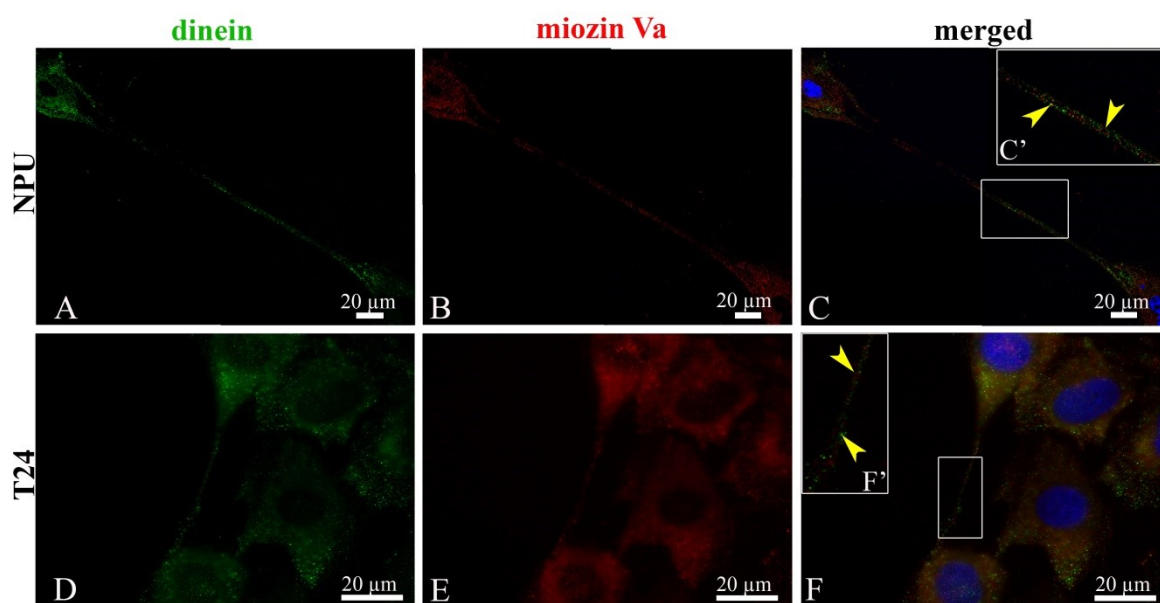
S hkratnim imunooznačevanjem motornih proteinov kinezina 5B (Slika 14A, 14C) in miozina Va (Slika 14B, 14E) smo dokazali, da so v TnT normalnih in rakavih urotelijskih celic sočasno prisotni motorni proteini, značilni za dva različna načina aktivnega transporta (Slika 14C, 14F). Čeprav je smer premikanja kinezina 5B in miozina Va enaka, izmenjava molekul med celicama najverjetneje poteka po dveh različnih mehanizmih in dveh različnih citoskeletnih elementih. Kot smo že pokazali, je prisotnost motornega proteina odvisna od prisotnosti ustreznega citoskeletnega elementa.



Slika 14: Imunooznačevanje miozina Va in kinezina 5B v TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic. Imunofluorescenca motornega proteina kinezina 5B (zeleno) (A, D). Imunofluorescenca motornega proteina miozina Va (rdeče) (B, E). Združene slike, na katerih so jedra celic obarvana modro z barvilom DAPI (C, F). Rumene puščice označujejo točkaste fluorescenčne signale, ki predstavljajo molekule kinezina 5B (zeleno) in miozina Va (rdeče). (C, F) Majhni okvirčki označujejo del slike, ki je v večjem okvirju zgoraj povečan za (C', F') 100 %.

4.2.2.5 Lokacija dineina in miozina Va znotraj TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic

Sočasna prisotnost motornih proteinov dineina (Slika 15A, 15D) in miozina Va (Slika 15B, 15E) v TnT celic NPU in T24 (Slika 15C, 15F), prav tako nakazuje na obstoj dveh različnih mehanizmov aktivnega transporta znotraj iste TnT. V tem primeru gre za motorna proteina z različnim načinom delovanja in tudi različno smerjo pomikanja po citoskeletnih elementih. Miozin Va se po aktinskih filamentih pomika v smeri konca plus, dinein pa po mikrotubulih v smeri konca minus. Soobstoj obeh proteinov znotraj iste TnT kaže na to, da lahko transport snovi znotraj TnT poteka sočasno v obe smeri.



Slika 15: Imunooznačevanje dineina in miozina Va v TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic. Imunofluorescenca motornega proteina dineina (zeleno) (A, D). Imunofluorescenca motornega proteina miozina Va (rdeče) (B, E). Združene slike, na katerih so jedra celic obarvana modro z barvilom DAPI (C, F). Rumene puščice označujejo točkaste fluorescenčne signale, ki predstavljajo molekule dineina (zeleno) in miozina Va (rdeče). (C, F) Majhni okvirčki označujejo del slike, ki je v večjem okvirju zgoraj povečan za (C', F') 100 %.

4.2.3 Lokacija motornih in citoskeletnih proteinov v TnT kokulture celic (NPU+T24)

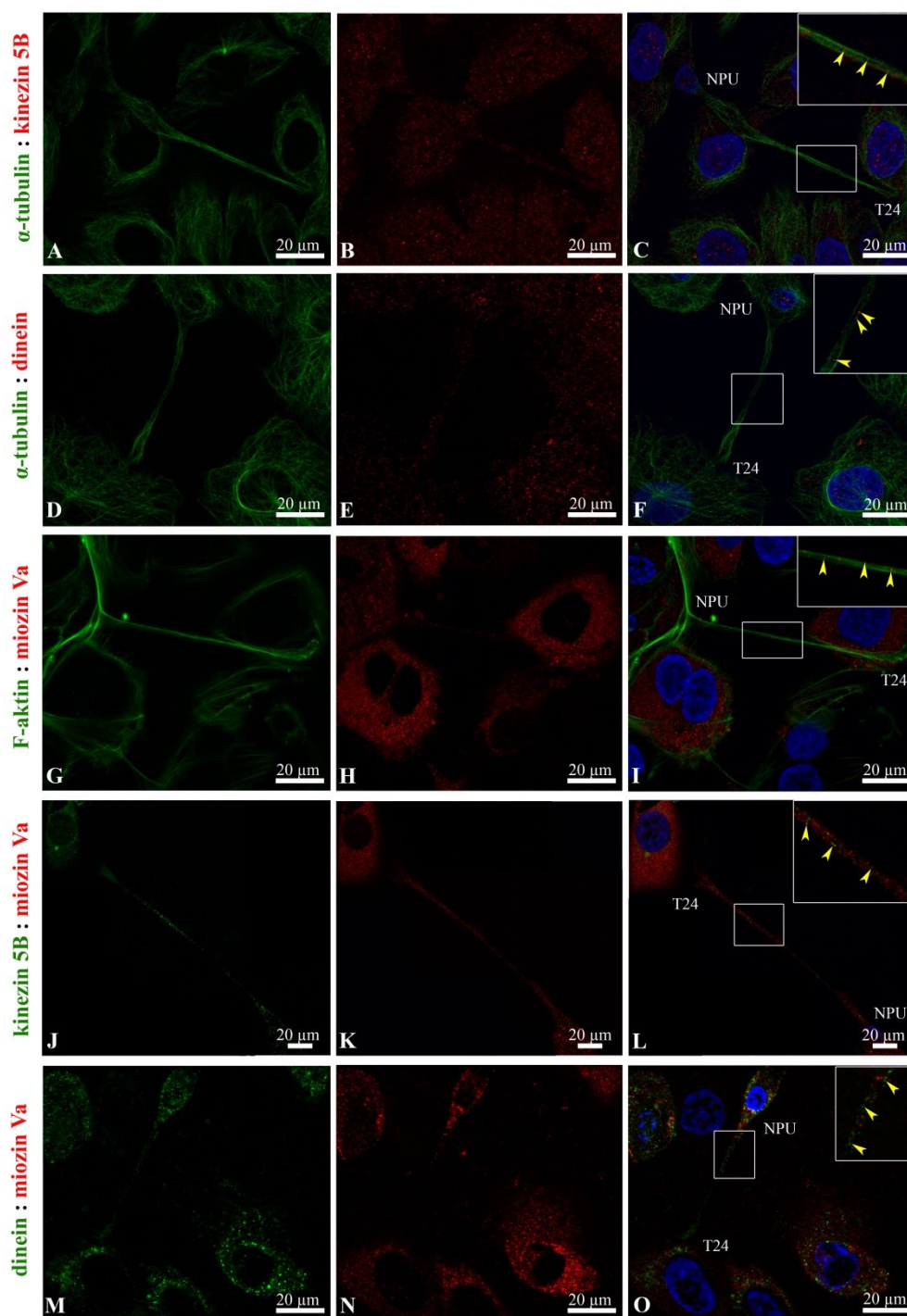
Lokacijo motornih proteinov smo želeli preveriti tudi v TnT, ki so nastale med normalnimi in rakavimi urotelijskimi celicami v kokulturah (NPU+T24). Opazili smo, da so na stekelcu rakave urotelijske celice T24 rastle na dnu, medtem ko so se normalne urotelijske celice NPU razraščale med in nad njimi v obliki otočkov.

Pri opazovanju vzpostavljenih TnT smo opazili, da se celice istega tipa večinoma povezujejo med seboj, manjkrat pa s celicami drugega tipa. Celice NPU so tvorile dolge TnT, ki so bile podobne tistim v monokulturah. Celice T24 so tvorile krajše TnT, ki so prav tako značilne za monokulture celic T24. Ugotovili smo, da je v kokulturi število TnT, vzpostavljenih med celico NPU in celico T24 $1,29 \pm 0,17$ TnT/cm² (Priloga I). V predhodni študiji je bilo dokazano, da je število TnT med celicami istega tipa nekoliko večje, v monokulturi normalnih celic NPU ($1,79 \pm 0,51$ TnT/cm²) in veliko večje v monokulturi rakavih celic T24 ($27,7 \pm 5,97$ TnT/cm²) (Baraga, 2015) (Priloga I).

Zanimalo nas je tudi, koliko izmed opaženih TnT v kokulturi celic (NPU+T24) izvira iz normalnih urotelijskih celic in se pritrja na rakave urotelijske celice in obratno. Rezultati so pokazali, da je 69 % pregledanih TnT izraščalo iz celic NPU proti celicam T24, 31 % TnT pa iz celic T24 proti celicam NPU. V 96 % primerov, ko je TnT izraščala iz celic NPU, je bila donorska celica, torej celica NPU, v manjšini oziroma obdana s celicami T24. Ko je TnT izraščala iz celice T24, je bila donorska celica, torej celica T24, v manjšini oziroma obdana s celicami NPU v 64 % primerov.

Rezultati določanja lokacije motornih proteinov in ustreznih citoskeletnih proteinov znotraj TnT kokulture celic (NPU+T24) so bili podobni rezultatom v monokulturah. Imunooznačevanje motornih proteinov kinezina 5B, dineina in miozina Va ter citoskeletnih proteinov α -tubulina in F-aktina je pokazalo, da so vsi proteini prisotni tako v citoplazmi celic kot tudi v TnT med celicami (NPU+T24).

Prisotnost kinezina 5B (Slika 16A-C) in dineina (Slika 16D-F) znotraj TnT, vzpostavljenih med celicami NPU in T24, je bila vezana na prisotnost citoskeletnih elementov mikrotubulov oziroma njihovega gradnika α -tubulina. Prav tako je bila prisotnost miozina Va v TnT kokulture (NPU+T24) pogojena s prisotnostjo aktinskih filamentov oziroma F-aktina (Slika 16G-I). Dvojno imunooznačevanje kinezina 5B in miozina Va (Slika 16J-L) oziroma dineina in miozina Va (Slika 16M-O) je pokazalo, da so tudi znotraj TnT kokulture celic (NPU+T24) sočasno prisotni različni motorni proteini.



Slika 16: (Imuno)označevanje citoskeletnih proteinov α -tubulina in F-aktina, ter motornih proteinov kinezina 5B, dineina in miozina Va v TnT kokulture normalnih in rakavih urotelijskih celic (NPU+T24). Imunofluorescenca α -tubulina in kinezina 5B (A-C). Imunofluorescenca α -tubulina in dineina (D-F). (Imuno)fluorescenca F-aktina in miozina Va (G-I). Imunofluorescenca kinezina 5B in miozina Va (J-L). Imunofluorescenca dineina in miozina Va (M-O). Na združenih slikah so jedra celic obarvana modro z barvilom DAPI. Rumene puščice označujejo točkaste fluorescenčne signale, ki predstavljajo molekule kinezina 5B (C-rdeče, L-zeleno), dineina (F- rdeče, O-zeleno) in miozina Va (I, L, O-rdeče). Majhni okvirčki označujejo del slike, ki je v večjem okvirju zgoraj povečan za (C', F', I', O') 100 % oziroma (L') 150 %.

4.3 KVANTIFIKACIJA MOTORNIH PROTEINOV V TUNELSKIH MEMBRANSKIH NANOCEVKAH NORMALNIH (NPU) IN RAKAVIH (T24) UROTELIJSKIH CELIC, TER KOKULTURE CELIC (NPU+T24)

Naši rezultati so pokazali, da so motorni proteini kinezin 5B, dinein in miozin Va prisotni v TnT celic NPU in T24, ter kokulture celic (NPU+T24). Za natančnejšo opredelitev razlik v vsebnosti motornih proteinov v TnT je bila potrebna kvantitativna analiza.

4.3.1 Kvantifikacija vsebnosti motornih in citoskeletnih proteinov v TnT monokultur normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic

Po postopku opisanem v metodah (Poglavje 3.4.3) smo izračunali odstotek TnT, ki so vsebovale določen motorni protein, citoskeletni protein ali ustrezno kombinacijo obeh (Priloga J).

Rezultati kvantifikacije vsebnosti citoskeletnih proteinov α -tubulina in F-aktina v TnT celic NPU in T24 so pokazali, da vse TnT vsebujejo vsaj enega izmed citoskeletnih elementov – mikrotubule ali aktinske filamente (Slika 17 A-D).

Analiza dvojnega imunooznačevanja α -tubulina in kinezina 5B je pokazala, da v monokulturi celic NPU kar 90 % TnT vsebuje α -tubulin in kinezin 5B, in le 10 % TnT samo α -tubulin, brez motornega proteina (Slika 17E). V monokulturi celic T24 citoskeletni in motorni protein vsebuje 55 % TnT, samo α -tubulin pa 45 % TnT (Slika 17G).

Imunooznačevanje α -tubulina in dineina je pokazalo, da je prisotnost mikrotubulov in motornega proteina dineina v TnT monokultur celic NPU in T24 precej podobna. V primeru celic NPU 75 % TnT vsebuje α -tubulin in dinein, 25 % pa samo α -tubulin (Slika 17F). Pri celicah T24 sta oba proteina prisotna v 78 % TnT, samo α -tubulin pa v 22 % TnT (Slika 17H).

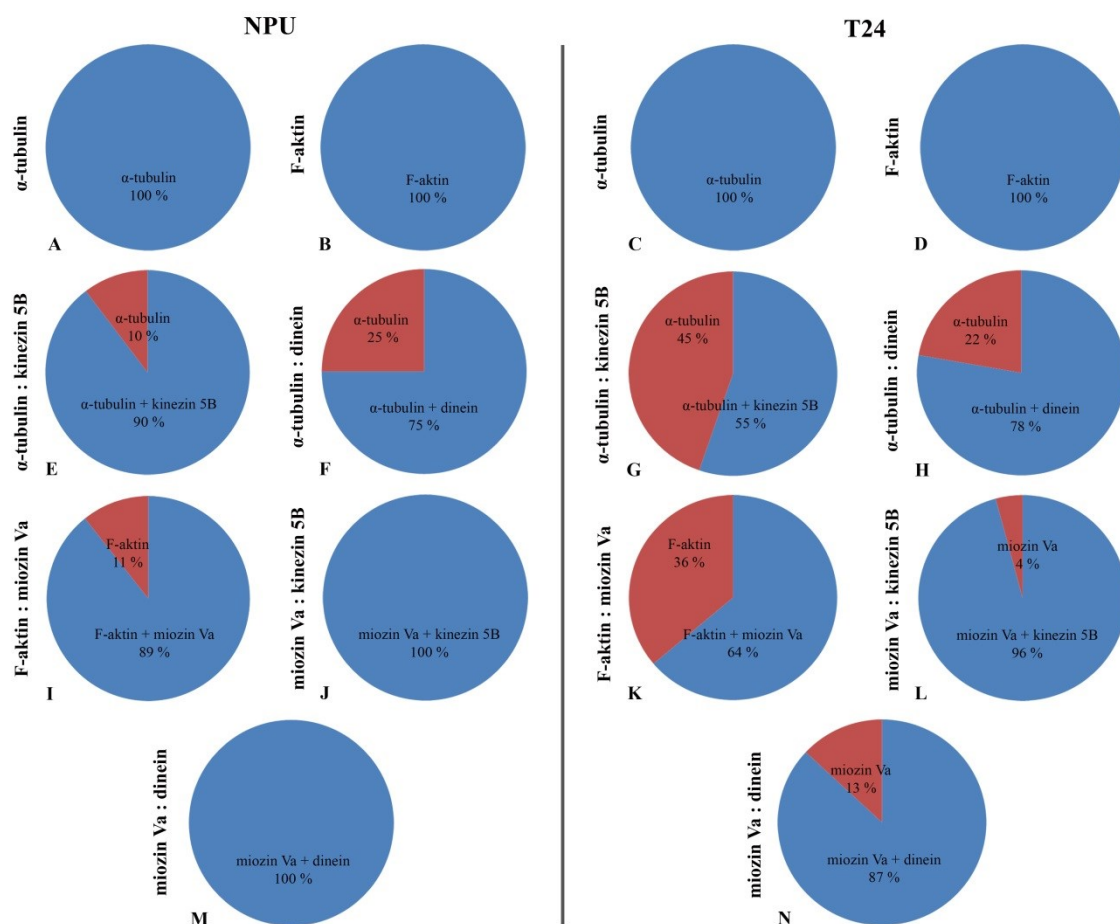
F-aktin in miozin Va vsebuje 83 % TnT v monokulturi celic NPU, samo F-aktin pa 17 % (Slika 17I). V primeru monokulture celic T24 je bil odstotek TnT, ki vsebujejo tako citoskeletni kot tudi motorni protein, nekoliko nižji, in sicer 64 %, v 36 % TnT pa nismo opazili prisotnosti motornega proteina miozina Va (Slika 17K).

Rezultati dvojnega imunooznačevanja miozina Va in kinezina 5B so pokazali, da v monokulturi celic NPU vse TnT vsebujejo oba motorna proteina (Slika 17J). V

monokulturi rakavih urotelijskih celic vsebuje 96 % TnT oba proteina, preostali 4 % TnT pa samo miozin Va (Slika 17L).

Podobne rezultate smo dobili tudi pri dvojnem imunooznačevanju miozina Va in dineina. Vse TnT celic NPU so vsebovale oba motorna proteina (Slika 17M), pri celicah T24 je oba proteina vsebovalo 87 % TnT, 13 % pa samo miozin Va (Slika 17N).

Kvantifikacija prisotnosti motornih in citoskeletnih proteinov v TnT monokultur celic NPU in T24 je pokazala, da vse opažene TnT vsebujejo vsaj enega izmed citoskeletnih elementov oziroma vsaj en motorni protein. Dokazali smo, da vse TnT, ki vsebujejo določen motorni protein, vsebujejo tudi pripadajoči citoskeletni element. Niso pa vse TnT, v katerih smo dokazali prisotnost citoskeletnega elementa, vsebovale tudi pripadajočega motornega proteina. V celicah NPU je samo α -tubulin vsebovalo 17,7 % TnT, samo F-aktin pa 17 % TnT. V celicah T24 je 33,5 % TnT vsebovalo samo α -tubulin, 36 % TnT pa samo F-aktin. To nakazuje na možnost, da aktivni transport po določenih TnT poteka le občasno, ali sploh ne. Obstaja tudi možnost, da v danem trenutku prisotnosti motornega proteina z metodo imunofluorescence nismo uspeli dokazati. Odstotek takšnih TnT je bil višji pri celicah T24. V primeru, kjer smo z imunooznačevanjem preverjali prisotnost in lokacijo dveh motornih proteinov znotraj iste TnT, so rezultati pokazali, da sta v vseh TnT celic NPU hkrati prisotna dva različna motorna proteina in s tem vsaj dva citoskeletna elementa. V 8,6 % TnT celic T24 je prisoten le miozin Va, iz česar lahko sklepamo, da je v teh TnT prisotna samo ena vrsta citoskeletnega elementa.



Slika 17: Odstotek TnT normalnih (NPU; levo) in rakavih (T24; desno) urotelijskih celic, ki vsebujejo določen motorni ali citoskeletni protein ali ustrezno kombinacijo. V TnT smo fluorescenčno označili α -tubulin (A, C), F-aktin (B, D), α -tubulin in kinezin 5B (E, G), α -tubulin in dinein (F, H), F-aktin in miozin Va (I, K), miozin Va in kinezin 5B (J, L), ter miozin Va in dinein (M, N). Nato smo pregledali vse TnT in izračunali, kolikšen odstotek TnT vsebuje določen motorni protein, citoskeletni protein ali ustrezno kombinacijo. Število vseh pregledanih TnT: (A): 68, (B): 74, (C): 28, (D): 47, (E): 29, (F): 38, (G): 36, (H): 36, (I): 28, (J): 47, (K): 27, (L): 24, (M): 17, (N): 23 (Priloga J).

4.3.2 Kvantifikacija vsebnosti motornih in citoskeletnih proteinov v TnT kokulture celic (NPU+T24)

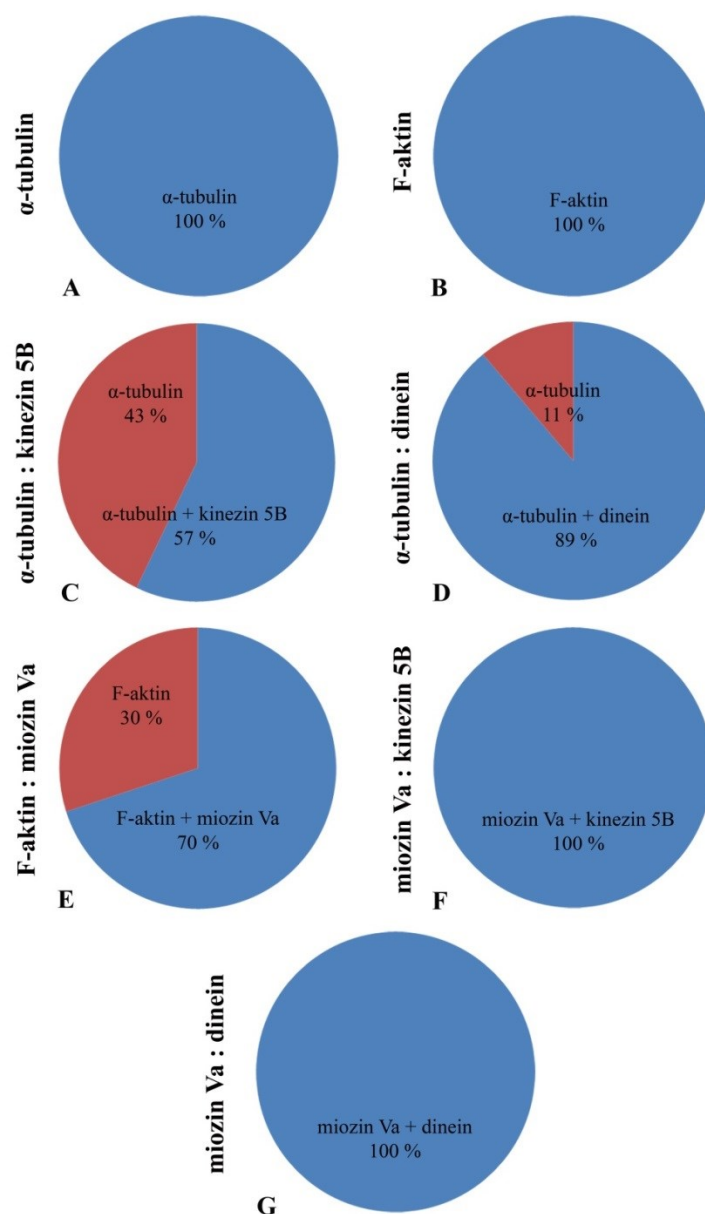
V kokulturah celic (NPU+T24) smo izvedli kvantifikacijo vsebnosti motornih in citoskeletnih proteinov v TnT, ki so bile vzpostavljene med celicama NPU in T24 (Priloga J). Rezultati so pokazali, da vse opažene TnT, prav tako kot TnT monokultur, vsebujejo vsaj enega izmed citoskeletnih elementov (Slika 18A-B).

Dvojno imunooznačevanje ustrezne kombinacije motornega in citoskeletnega proteina je pokazalo, da 57 % TnT kokulture celic (NPU+T24) vsebuje α -tubulin in kinezin 5B, 43 % TnT pa samo α -tubulin (Slika 18C). Kombinacijo α -tubulina in dineina vsebuje 89 % TnT, v 11 % TnT smo opazili samo α -tubulin, brez motornega proteina (Slika 18D).

Rezultati označevanja aktinskih filamentov in miozina Va v TnT kokulture celic (NPU+T24) so pokazali, da 70 % TnT vsebuje citoskeletni in motorni protein, 30 % TnT pa vsebuje samo aktinske filamente (Slika 18E).

Sočasno imunooznačevanje kombinacije dveh motornih proteinov (I) miozina Va in kinezina 5B, ter (II) miozina Va in dineina je razkrilo, da so vse označene TnT vsebovale dva motorna proteina (Slika 18F-G).

Rezultati kvantifikacije vsebnosti motornih in citoskeletnih proteinov v TnT kokulture celic (NPU+T24) so primerljivi z rezultati, ki smo jih dobili pri kvantifikaciji sestave TnT monokultur. Označevanje citoskeletnih proteinov je potrdilo, da vse TnT vsebujejo vsaj enega izmed citoskeletnih elementov. Dvojno imunooznačevanje motornih proteinov je še dodatno pokazalo, da vse TnT vsebujejo kinezin 5B ali dinein v kombinaciji z miozinom Va, kar kaže na dejstvo, da so v TnT kokulture celic (NPU+T24) hkrati prisotni tako mikrotubuli kot tudi aktinski filamenti. Podobno kot pri monokulturah, smo tudi v primeru kokulture celic (NPU+T24) opazili TnT, ki niso vsebovale motornih proteinov. 33,5 % vseh TnT je vsebovalo samo α -tubulin, 30 % TnT pa samo F-aktin, kar potrjuje hipotezo, da v nekaterih TnT aktivni transport poteka le občasno ali sploh ne, oziroma, da ga z uporabljenno metodo nismo uspeli detektirati.



Slika 18: Odstotek TnT, ki so v kokulturah (NPU+T24) nastale med celicami NPU in T24, in vsebujejo določen motorni ali citoskeletni protein ali kombinacijo obeh. V TnT smo fluorescenčno označili α -tubulin (A), F-aktin (B), α -tubulin in kinezin 5B (C), α -tubulin in dinein (D), F-aktin in miozin Va (E), miozin Va in kinezin 5B (F), ter miozin Va in dinein (G). Nato smo pregledali vse TnT in izračunali, kolikšen odstotek TnT vsebuje določen motorni protein, citoskeletni element ali ustrezno kombinacijo. Število vseh pregledanih TnT: (A): 16, (B): 9, (C): 7, (D): 9, (E): 9, (F): 4, (G): 6 (Priloga J).

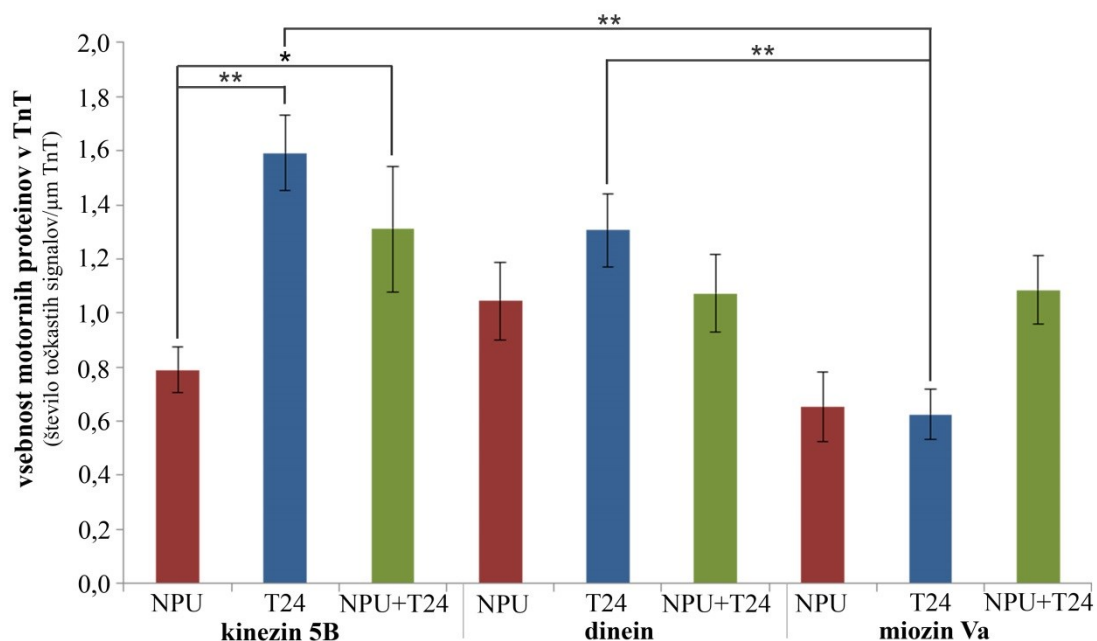
4.3.3 Primerjava vsebnosti motornih proteinov v TnT normalnih (NPU) in rakavih urotelijskih celic (T24) ter v TnT kokulture celic (NPU+T24)

Po postopku, opisanem v metodah (Poglavje 3.4.3, Slika 7) smo določili osrednji del TnT, izmerili njegovo dolžino, ter prešteli vse fluorescenčne točkaste signale za posamezen motorni protein. S pridobljenimi podatki smo nato izračunali število fluorescenčnih točkastih signalov za posamezen motorni protein na μm TnT.

Ugotovili smo, da je vsebnost kinezina 5B največja v TnT rakavih urotelijskih celic T24. Vsebnost kinezina 5B je v TnT celic T24 statistično značilno večja kot v TnT celic NPU. Vsebnost kinezina 5B v TnT kokulture celic (NPU+T24) je bila prav tako statistično značilno višja od njegove vsebnosti v TnT celic NPU (Slika 19).

Tudi dineina je bilo največ v TnT rakavih urotelijskih celic T24, najmanj pa v TnT normalnih urotelijskih celic NPU, vendar so bile razlike v vsebnosti dineina med TnT celic NPU, T24 in kokulture (NPU+T24) manjše kot v primeru drugih motornih proteinov (Slika 19).

Vsebnost motornega proteina miozina Va je najvišja v TnT kokulture celic (NPU+T24). Njegova količina v TnT celic NPU in T24 je zelo podobna, ampak precej nižja kot v TnT kokulture celic (NPU+T24). Vsebnost miozina Va v celicah T24 je bila statistično značilno nižja od vsebnosti kinezina 5B in dineina. V splošnem je bila količina miozina Va v TnT najnižja izmed preizkušenih motornih proteinov, ne glede na vrsto celic (Slika 19).



Slika 19: Vsebnost motornih proteinov v TnT. Vsebnost kinezina 5B je v TnT celic T24 statistično značilno večja od njegove vsebnosti v TnT celic NPU. Vsebnost dineina je prav tako največja v TnT celic T24, od vsebnosti v TnT celic NPU in kokulture celic (NPU+T24) pa se statistično ne razlikuje. Vsebnost miozina Va je največja v TnT kokulture (NPU in T24). Vsebnost miozina Va v TnT celic T24 je statistično značilno manjša od vsebnosti kinezina 5B in dineina. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$. Na grafu je za posamezen stolpec prikazana standardna napaka (SE). Število analiziranih TnT: (NPU): 52, (T24): 40, (NPU+T24): 29.

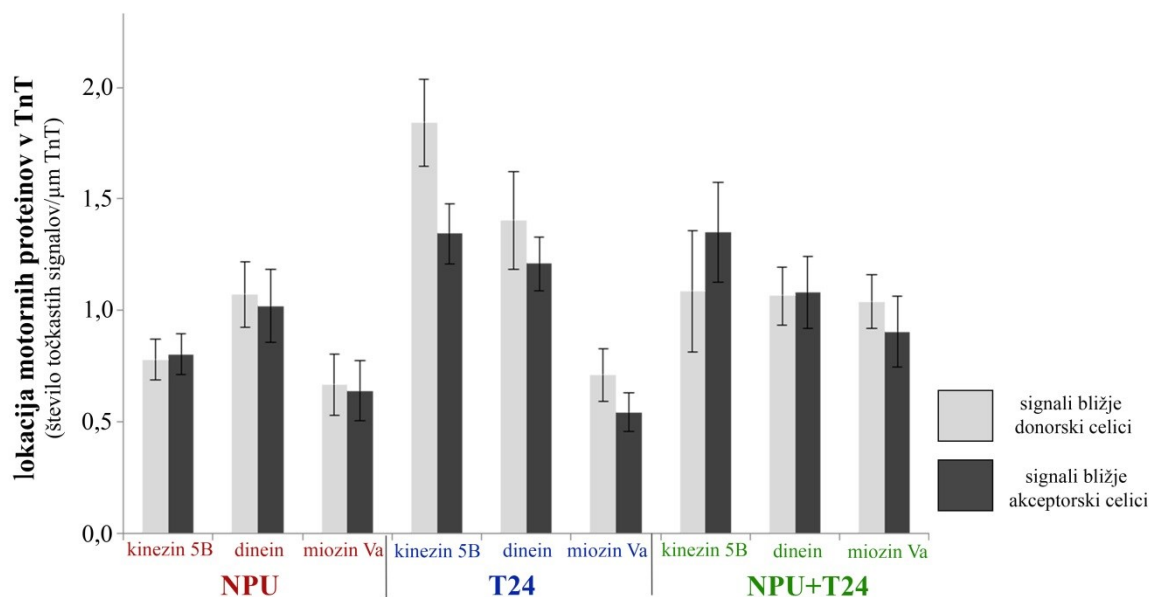
4.3.4 Razporeditev motornih proteinov in analiza smeri transporta v TnT normalnih (NPU) in rakavih (T24) urotelijskih celic ter v TnT kokulture celic (NPU+T24)

V magistrski nalogi smo želeli preveriti tudi razporeditev motornih proteinov znotraj TnT celic NPU in T24 ter kokulture celic (NPU+T24). Zanimalo nas je, ali nam lahko lokacija posameznih motornih proteinov glede na donorsko in akceptorsko celico poda informacije o preferenčni smeri transporta znotraj opazovane TnT.

Ugotovili smo, da so v TnT celic NPU vsi trije motorni proteini: kinezin 5B, dinein in miozin Va, enakomerno razporejeni med donorsko in akceptorsko celico. Iz tega sklepamo, da aktivni transport poteka enakomerno po celotni dolžini TnT med dvema celicama NPU. Glede na prisotnost kinezina 5B in dineina, ki smo ju v TnT celic NPU dokazali z več analizami lahko sklepamo, da aktivni transport poteka v obe smeri (Slika 20).

V TnT rakavih urotelijskih celic T24 se je razporejenost motornih proteinov razlikovala od tiste v TnT celic NPU. Vsi trije motorni proteini so bili v višji koncentraciji prisotni v bližini donorske celice (Slika 20). Celokupna količina motornih proteinov je bila v TnT celic T24 opazno večja kot v TnT celic NPU, kar se ujema z rezultati, ki smo jih pridobili z metodo prenosa western (Slika 10).

Motorni proteini so bili v TnT, ki so nastale med celicami NPU in T24 znotraj kokulture celic (NPU+T24), podobno kot pri normalnih urotelijskih celicah, precej enakomerno razporejeni. Ti podatki se skladajo z našimi ugotovitvami, da TnT v kokulturi celic (NPU+T24) največkrat izraščajo iz celic NPU, ki so v manjšini in so obdane s celicami T24, in imajo zato podobne lastnosti, kot TnT v monokulturi celic NPU. Nekoliko je izstopal le kinezin 5B, ki se je v višji koncentraciji nahajal bližje akceptorski celici (Slika 20).



Slika 20: Razporeditev motornih proteinov glede na donorsko in akceptorsko celico v TnT normalnih (NPU) in rakavih urotelijskih celic (T24) ter TnT kokulture celic (NPU+T24). Stolpci prikazujejo število točkastih signalov posameznega motornega proteina in njegovo lokacijo – ali se signal nahaja bližje donorski ali bližje akceptorski celici. Točkasti signali motornih proteinov so bili v TnT celic NPU razporejeni skoraj popolnoma enakomerno po celotni dolžini TnT. Podobna je bila tudi razporeditev signalov motornih proteinov po TnT celic v kokulturi (NPU+T24). V primeru celic T24 je bila večja količina motornih proteinov bližje donorski celici, vendar statistično značilnih razlik ni bilo ($p > 0,05$). Na grafu je za posamezen stolpec prikazana standardna napaka (SE). Število analiziranih TnT: (NPU): 52, (T24): 40, (NPU+T24): 29 (Priloga L).

5 RAZPRAVA

5.1 MOTORNI PROTEINI TUNELSKIH MEMBRANSKIH NANOCEVK NORMALNIH UROTELIJSKIH CELIC NPU, RAKAVIH UROTELIJSKIH CELIC T24 IN KOKULTURE CELIC (NPU+T24)

5.1.1 TnT celic NPU, T24 in kokulture celic (NPU+T24) vsebujejo različne motorne proteine, katerih prisotnost sovпада s prisotnostjo pripadajočih citoskeletnih elementov

Kinezinski motorni proteini iz družine 5 so ključni za transport mitohondrijev, sodelujejo pa tudi pri znotrajceličnem transportu lizosomov, endosomov, različnih veziklov in endoplazemskega retikuluma (Hirokawa in sod., 2009). Pri miših, ki so imele mutacijo v genu *Kif5b*, so bili mitohondriji združeni v skupke in so se nahajali ob celičnem jedru (Tanaka in sod., 1998). Iz tega lahko sklepamo, da motorni protein kinezin 5B sodeluje pri znotrajceličnem transportu mitohondrijev. Koyanagi in sod. (2005) so dokazali, da so TnT omogočile prenos mitohondrijev iz kardiomiocitov v predniške celice, kar je v slednjih povzročilo diferenciacijo v novo srčnomišično tkivo. V naši nalogi smo dokazali, da TnT celic NPU, T24 in kokulture celic (NPU+T24) vsebujejo motorni protein kinezin 5B, katerega prisotnost sovпада s prisotnostjo mikrotubulov. Iz tega sklepamo, da kinezin 5B sodeluje pri aktivnem transportu, ki poteka znotraj TnT v smeri proti koncu plus mikrotubula, in je najverjetneje odgovoren za prenos mitohondrijev ter drugih veziklov in organelov med celicami.

Dineini so motorni proteini, ki omogočajo retrogradni transport oziroma prenos snovi v smeri konca minus mikrotubula. Citoplazemski dinein ima zelo pomembno vlogo pri organizaciji delitvenega vretena in ločevanju kromosomov med celično delitvijo, poleg tega sodeluje tudi pri transportu membranskih organelov kot je Golgijev aparat ter lizosomov in endosomov (Hirokawa in sod., 1998). Številni znanstveniki so dokazali, da TnT omogočajo transport različnih veziklov iz endosomskega in lizosomskega sistema med celicami (Rustom in sod., 2004; Önfelt in sod., 2006; Bukoreshtliev in sod., 2009; Wang in sod., 2010). Naši rezultati so pokazali, da je dinein prisoten v TnT celic NPU, T24 in kokulture celic (NPU+T24), ter da njegova prisotnost sovпада s prisotnostjo mikrotubulov. Iz tega sklepamo, da motorni proteini iz družine dineinov omogočajo transport veziklov v TnT v smeri od akceptorske celice, na katero se TnT pritrdi, proti donorski celici, iz katere TnT izrašča.

Miozinski motorni proteini iz družine V prav tako sodelujejo pri transportu različnih veziklov in organelov znotraj celic (Alberts in sod., 2003). Različne študije so potrdile

prisotnost miozina Va v TnT rakavih celic podganjega feocitokroma (PC12) (Rustom in sod., 2004) in v TnT normalnih ledvičnih celic podgane (Wang in sod., 2010). V naši nalogi smo potrdili rezultate iz literature in hkrati dokazali tudi, da njegova prisotnost znotraj TnT urotelijskih celic sovpada s prisotnostjo aktinskih filamentov. Iz tega lahko sklepamo, da je motorni protein miozin Va udeležen pri aktivnem transportu veziklov in organelov skozi TnT, ki med seboj povezujejo urotelijske celice, v smeri proti koncu plus aktinskega filameta, oziroma od donorske proti akceptorski celici.

Prisotnost različnih motornih proteinov znotraj TnT celic NPU, T24 in kokulture celic (NPU+T24) kaže na to, da po TnT rakavih in normalnih urotelijskih celic poteka aktivni transport snovi, ki je odvisen od prisotnosti ustreznih elementov citoskeleta. Ti rezultati potrjujejo naše delovne hipoteze. Številne študije so pokazale, da skozi TnT potujejo različni vezikli in organeli, vendar dejanske povezave med motornimi proteini in vezikli, ki jih prenašajo, še niso bile dokazane. Zato so potrebne nadaljnje raziskave, v katerih bi lahko hkrati označili motorni protein in njegov tovor, ter spremljali njuno skupno premikanje skozi TnT v realnem času.

5.1.2 Znotraj TnT lahko hkrati deluje več mehanizmov aktivnega transporta, kar omogoča dvosmerni prenos snovi

Prisotnost motornih proteinov znotraj TnT dokazuje, da v TnT poteka aktivni transport snovi. Številne študije so potrdile prisotnost aktinskih filamentov in enosmernega, od miozinskih motornih proteinov odvisnega aktivnega transporta v TnT (Rustom in sod., 2004; Önfelt in sod., 2006; Sowinski in sod., 2008). Dokazan je tudi dvosmerni transport organelov skozi TnT, ki je odvisen od mikrotubulov in z njimi povezanih motornih proteinov kinezina in dineina (Önfelt in sod., 2006; Mineo in sod., 2012; Wang in sod., 2012b).

Poleg prisotnosti posameznega motorne proteina znotraj TnT, nas je zanimalo, ali znotraj iste TnT obstaja več različnih motornih proteinov in s tem več mehanizmov aktivnega transporta. Hkratno imunooznačevanje dveh različnih motornih proteinov je pokazalo, da so v isti TnT prisotne tako molekule kinezina 5B in miozina Va kot tudi molekule dineina in miozina Va. Kot smo v naši nalogi dokazali, prisotnost motorne proteina v TnT sovpada s prisotnostjo pripadajočega citoskeletnega elementa. Ti rezultati so pomembni, ker dokazujejo, da so znotraj iste TnT lahko hkrati prisotni aktinski filament in mikrotubuli, in da lahko znotraj iste TnT hkrati deluje več različnih mehanizmov aktivnega transporta. To dejstvo ima velik pomen predvsem za ugotavljanje smeri, v kateri poteka izmenjava snovi. Kinezin 5B in miozin Va sta sicer del različnih mehanizmov, vendar oba potujeta v smeri konca plus citoskeletnega elementa, torej od

donorske proti akceptorski celici. Dinein pa potuje v smeri konca minus mikrotubula, torej od akceptorske proti donorski celici.

Sočasna prisotnost več mehanizmov aktivnega transporta znotraj iste TnT nakazuje, da skozi TnT ne poteka samo enosmerni transport snovi iz donorske proti akceptorski celici, temveč si celici lahko medsebojno izmenjujeta različne snovi. To je ključno za medcelično komunikacijo, saj prenos informacij v tem primeru ni več omejen zgolj na smer od donorske proti akceptorski celici, ampak omogoča tudi odziv in odgovor akceptorske celice. Čeprav izsledki naše raziskave podajajo nova znanja o transportu po TnT, je to področje še vedno precej neraziskano in so nadaljnje študije, ki bodo izboljšale razumevanje vloge TnT v medcelični komunikaciji nujne.

5.1.3 Aktivni transport, ki temelji na kinezinu 5B, je v TnT celic T24 intenzivnejši kot v TnT celic NPU

Karcinogeneza je proces, ki v celicah sproži številne spremembe, vendar je sposobnost tvorbe TnT skupna tako normalnim kot tudi rakavim celicam. Zanimalo nas je, ali se TnT normalnih urotelijskih celic (NPU) in rakavih urotelijskih celic (T24) razlikujejo v vsebnosti motornih proteinov in posledično tudi v intenzivnosti aktivnega transporta. Z metodo prenosa western smo dokazali, da celice T24 vsebujejo več motornih proteinov kot celice NPU, ne glede na to, ali smo jih gojili 2 ali 7 dni. Iz tega lahko sklepamo, da je aktivni transport v celicah T24 bolj intenziven, kar je najverjetneje posledica sprememb v izražanju genov, do katerih pride med rakavo transformacijo celice.

Rezultati naše naloge so pokazali tudi, da TnT rakavih urotelijskih celic vsebujejo več kinezina 5B in dineina, kot TnT normalnih urotelijskih celic NPU. Druge študije so pokazale, da med TnT celic NPU in T24 ni večjih razlik v vsebnosti mikrotubulov (Baraga, 2015). Sklepamo lahko, da je aktivni transport, ki poteka s pomočjo kinezina 5B in dineina, v TnT rakavih urotelijskih celicah T24 bolj intenziven kot v normalnih urotelijskih celicah NPU. To nakazuje na pospešeno izmenjavo informacij in snovi med rakavimi urotelijskimi celicami T24, tako v smeri od donorske celice, iz katere TnT izrašča, proti akceptorski celici na katero se TnT pritrja, kot tudi v obratni smeri. TnT pri rakavih celicah predstavlja pomemben mehanizem za prenos signalov in celičnih komponent (Sisakhtnezhad in sod., 2015), mitohondrijev in drugih organelov (Lou in sod., 2012b) in celo mehanizmov odpornosti proti kemoterapevtikom (Pasquier in sod., 2011), s čimer TnT pripomorejo k rasti in širjenju tumorjev (Lou in sod., 2012b). Uporaba kemoterapevtikov, ki povzročajo hitro depolimerizacijo mikrotubulov, tako ne upočasni samo delitve celic (Jordan in Wilson, 2004), ampak lahko vpliva tudi na komunikacijo med njimi, in s tem še dodatno upočasni širjenje rakavega obolenja. Nadaljnje raziskave na

področju aktivnega transporta znotraj TnT so tako nujno potrebne tudi za razvoj inovativnih načinov zdravljenja raka.

Tako TnT celic NPU, kot tudi TnT celic T24 so vsebovale manj motornega proteina miozina Va v primerjavi s kinezinom 5B in dineinom. Prisotnost aktinskih filamentov znotraj TnT je ena izmed njihovih pomembnejših značilnosti (Rustom in sod. 2004, Wang in sod., 2011), kar so potrdili tudi naši rezultati. Razlog za manjšo prisotnost miozina Va v TnT celic NPU in T24 torej najverjetneje ni v pomanjkanju akto-miozinskega transporta, temveč v dejstvu, da miozin Va morda ni najpomembnejši miozinski motor, ki sodeluje pri transportu skozi TnT. Naddružina miozinov do danes obsega 14 razredov motornih proteinov (Alberts in sod., 2003), kar dopušča številne nadaljnje raziskave o vlogi različnih miozinskih motorjev v aktivnem transportu po TnT.

Analiza smeri transporta znotraj TnT je prav tako potrdila, da se TnT celic NPU in T24 med seboj razlikujejo. V monokulturi celic NPU so bili motorni proteini znotraj TnT enakomerno razporejeni med donorsko in akceptorsko celico, iz česar lahko sklepamo, da aktivni transport poteka enakomerno vzdolž celotne TnT. V monokulturi celic T24 so se vsi motorni proteini znotraj TnT v višji koncentraciji nahajali v bližini donorske celice. Na povečan transport snovi iz smeri donorske proti akceptorski celici kaže predvsem visoka koncentracija motornega proteina kinezina 5B v bližini donorske celice, kar potrjuje že pridobljene rezultate o intenzivnem transportu snovi med celicami T24.

Tako v monokulturi celic NPU kot v monokulturi celic T24 smo opazili TnT, ki niso vsebovale motornih proteinov, vendar je bil odstotek višji pri celicah T24. Dvojno imunooznačevanje miozina Va v kombinaciji s kinezinom 5B ali dineinom je še dodatno potrdilo, da nekatere TnT celic T24 vsebujejo le aktinske filamente. TnT, ki so vsebovale le mikrotubule ali aktinske filamente, ne pa tudi motornih proteinov, morda niso namenjene aktivnemu transportu, ali ta po njih poteka le občasno, večina snovi pa se po njih prenaša s pasivno difuzijo. TnT so tudi zelo občutljive na zunanje vplive, kot so kemijski reagenti, svetloba in temperatura (Rustom in sod., 2004; Kabaso in sod., 2011). Zaradi tega obstaja možnost, da so bile TnT, ki niso vsebovale motornih proteinov, poškodovane ali v procesu nastanka oziroma razpada. Motorna proteina kinezin 5B in miozin Va spadata v naddružini kinezinov oziroma miozinov, ki obsegata več različnih razredov proteinov (Alberts in sod., 2003), zaradi česar je možno tudi, da aktivnega transporta v teh TnT nismo zaznali, ker poteka s pomočjo drugih proteinov iz teh družin. Dejstvo je tudi, da so TnT precej redke strukture in da bi morali, kljub 44 izvedenim neodvisnim poskusom, število poskusov še povečati. Da bi dobili dokončen odgovor, so nujno potrebne nadaljnje študije, v katerih bi bilo možno v živih celicah spremljati Transporte skozi TnT.

Rezultati magistrske naloge, doseženi z različnimi metodami, so potrdili našo delovno hipotezo, da se TnT celic NPU in T24 razlikujejo v vsebnosti motornih proteinov. Da bi dokončno razjasnili prisotnost in vlogo aktivnega transporta v TnT bodo potrebne nadaljnje študije tega področja.

5.1.4 TnT omogočajo aktivni transport snovi med celicami NPU in T24

Dejstvo, da si normalne (Önfelt in sod., 2006; Chaevau in sod., 2010; He in sod., 2010; Wang in sod., 2010) in rakave (Rustom in sod., 2004; Veranič in sod., 2008; Lou in sod., 2012a) celice v monokulturi s pomočjo TnT med seboj izmenjujejo informacije, ni presentljivo in je bilo predmet številnih študij. Iz medicinskega stališča je bolj zanimivo dejstvo, da med seboj komunicirajo tudi normalne in rakave celice v kokulturi (Baraga, 2015).

V naši nalogi smo tudi uspeli z obliko korelativne faznokontrasnte in fluorescenčne mikroskopije spremljati nastanek in analizirati osnovne značilnosti TnT. Kombinacija faznokontrastne in fluorescenčne mikroskopije nam je omogočila opazovanje iste TnT pred in po postopku fiksacije oziroma imunooznačevanja. V primeru kokulture celic (NPU+T24) pa nam je olajšala razlikovanje med celicami NPU in T24, ter določanje smeri izraščanja TnT.

Naši rezultati so potrdili, da normalne urotelijske celice NPU in rakave urotelijske celice T24 v kokulturi med seboj tvorijo TnT, kar je bilo znano že iz prejšnjih študij (Baraga, 2015). Opazili smo tudi, da znotraj kokulture v večini primerov TnT tvorijo celice NPU, ki so v manjšini oziroma obdane s celicami T24. Te TnT so bile po dolžini, citoskeletni sestavi in vsebnosti motornih proteinov, bolj podobne TnT celic NPU, iz česar lahko sklepamo, da TnT, ki nastane med celico NPU in celico T24 prevzame določene lastnosti celice iz katere izrašča. V kokulturi celic (NPU+T24) so bile TnT med celico NPU in celico T24 manj pogoste kot TnT med dvema celicama istega tipa. To dejstvo lahko nakazuje, da so za nastanek teh TnT potrebni posebni pogoji. Thayanithy in sod. (2014b) so dokazali, da prisotnost eksosomov iz rakavih celic spodbudi nastanek TnT v celicah mezotelija. To kaže na možnost, da rakave celice z izločanjem eksosomov inducirajo nastanek TnT v normalnih celicah in tako povečajo svoje možnosti za preživetje ter za širjenje raka. Med normalnimi in rakavimi celicami prihaja do izmenjave molekul, med katerimi so tudi onkogene mRNA, ki lahko v normalni celici sprožijo proces karcinogeneze (Thayanithy in sod., 2014a). Pasquier in sod. (2013) so dokazali prenos mitohondrijev iz normalnih v rakave celice, s čimer le te pridobijo večjo odpornost za kemoterapevtike in preprečijo proces apoptoze. V naši nalogi smo dokazali, da sta možni obe vrsti transporta, saj smo v TnT med celico NPU in T24 dokazali prisotnost kinezina 5B, dineina in miozina Va, ki omogočajo aktivni transport snovi skozi TnT v različnih

smereh. Hkratna prisotnost dveh motornih proteinov z različnim mehanizmom aktivnega transporta dokazuje tudi, da je lahko izmenjava snovi med normalno in rakavo urotelijsko celico dvosmerna.

Raziskave komunikacije med normalnimi in rakavimi urotelijskimi celicami so nujne za boljše razumevanje raka sečnega mehurja. Poznavanje mehanizmov medcelične komunikacije bi lahko omogočilo razvoj novih kemoterapevtskih zdravil, katerih tarče bi bile TnT. Na ta način bi lahko prekinili prenos tovora med normalnimi in rakavimi celicami in tako zmanjšali možnost za prenos rezistence na kemoterapevtike v rakave celice ter upočasnili širjenje raka s prenosom onkogenega materiala v normalne celice.

5.2 TUNELSKA MEMBRANSKE NANOCEVKE BAKTERIJ

5.2.1 TnT imajo ključno vlogo pri vzpostavljanju večceličnih baterijskih združb

Dubey in Ben-Yehuda (2011) sta dokazala, da TnT predstavljajo pomemben način komunikacije tudi med bakterijami. V kulturi laboratorijskega seva bakterije *Bacillus subtilis* (PY79), gojeni na trdnem mediju, so med sosednjimi celicami opazili vzpostavljene TnT različnih dolžin, ki so bile velikokrat tudi razvejane in so omogočale nastanek omrežja povezanih celic. Podoben pojav so opazili tudi pri divjem sevu *Bacillus subtilis* (3610), ker je bilo število TnT v kulturi še večje kot pri laboratorijskem sevu. To nakazuje na dejstvo, da je tvorba TnT med bakterijami v naravi običajen pojav.

V isti študiji sta avtorja preverjala tudi, če TnT povezujejo bakterije različnih vrst. Dokazala sta obstoj TnT med bakterijami vrste *Bacillus subtilis* in *Staphylococcus aureus* iz česar lahko sklepamo, da v naravi s pomočjo TnT poteka izmenjava informacij med po Gramu pozitivnimi bakterijami različnih vrst. TnT, ki jih tvorijo po Gramu negativne bakterije vrste *Escherichia coli* so tanjše od TnT vrste *Bacillus subtilis*, kar kaže na različen način formacije TnT pri evolucijsko oddaljenih vrstah. Da gre za v naravi razširjen in vsestranski način izmenjave informacij, ki ni omejen na določeno vrsto, pa dokazuje prisotnost TnT med po Gramu negativnimi bakterijami vrste *Escherichia coli* in po Gramu pozitivnimi bakterijami vrste *Bacillus subtilis* (Dubey in Ben-Yehuda, 2011). Bakterije vrste *Escherichia coli* se v kokulturi s pomočjo TnT povežejo z bakterijami vrste *Acinetobacter baylyi*, kar jim omogoči obojestransko izmenjavo esencialnih aminokislin (Pande in sod., 2015). Izmenjavo hranil s pomočjo TnT so dokazali tudi med anaerobnima vrstama *Desulfovibrio vulgaris* in *Clostridium acetobutylicum* (Benomar in sod., 2015).

TnT bi tako lahko predstavljale najpogostejši način medcelične komunikacije znotraj biofilmov, kjer se več vrst bakterij nahaja tesno skupaj v omejenem prostoru (Kolter in Greenberg, 2006). Avtorja študije predvidevata, da sinergistična skupnost, ki jo ustvarjajo celice, povezane s TnT, omogoča izmenjavo različnih molekul in novih fenotipskih lastnosti ter izboljša preživetje celotne skupnosti (Dubey in Ben-Yehuda, 2011). Kooperacija med različnimi bakterijskimi vrstami znotraj biofilma omogoča na primer skupno razgradnjo kompleksnih molekul (Moons in sod., 2009).

TnT bi lahko igrale vlogo tudi pri številnih drugih socialnih aktivnostih bakterij, kot je nastanek večceličnega plodilnega telesca pri bakteriji vrste *Myxococcus xanthus*, za tvorbo katerega je potrebna sposobnost koordiniranega drsečega gibanja oziroma polzenja (Dubey in Ben-Yehuda, 2011). Znanstveniki domnevajo, da je takšno gibanje rezultat medceličnih stikov. Nudleman in sod. (2005) so dokazali, da pride ob stiku celice z mutacijo v genu za polzenje in normalne celice, do izmenjave membranskih lipoproteinov, ki mutanti ponovno omogočijo polzenje.

Še en primer potencialne vloge TnT znotraj bakterijske združbe je sposobnost določenih divjih tipov vrste *Escherichia coli*, da zavirajo rast laboratorijskih sevov z mehanizmom, ki temelji na kontaktu med celicami. Avtorji študije domnevajo, da fizični stik med celicami omogoči prenos inhibitornih dejavnikov in tako zavira rast konkurenčnega seva (Aoki in sod., 2005). TnT bi lahko predstavljale učinkovito strategijo tekmovanja med bakterijami s prenosom toksičnih molekul direktno v sosednje celice (Dubey in Ben-Yehuda, 2011).

Bakterijske TnT so zelo pomembne, ker omogočajo povezavo ne samo med bakterijami iste vrste, ampak tudi med nesorodnimi, celo evolucijsko zelo oddaljenimi vrstami. Posledično igrajo ključno vlogo pri vzpostavljanju in delovanju večceličnih bakterijskih združb, imenovanih biofilmi, s katerimi se srečujemo tudi na področju medicine. Biofilmi namreč pogosto nastajajo na različnih vsadkih in katetrih ter povzročajo akutne ali kronične okužbe (Costerton in sod., 1999). Nadaljnje raziskave mehanizmov vzpostavljanja TnT med bakterijami so zato nujne za boljše razumevanje in preprečevanje nastanka biofilmov.

5.2.2 TnT predstavljajo nov in učinkovit mehanizem transporta molekul med bakterijami

Do nedavnega je bila kot najpogostejši in najbolj učinkovit način komunikacije med bakterijami opisana izmenjava zunajceličnih signalnih molekul (Bassler in Lossick, 2006). Bakterije večinoma niso sposobne prepoznati in izločati specifičnih signalov drugih vrst, kar lahko omejuje sporazumevanje v večceličnih združbah (Ryan in Dow, 2008). TnT zato

predstavljajo način, kako zaobiti to težavo, saj signalna molekula potuje direktno iz citoplazme ene celice v citoplazmo druge celice. Ker so razmere znotraj TnT predvidoma enake tistim znotraj celice, so molekule med prenosom zaščitene pred encimi in neugodnimi zunanjimi razmerami. Kot sta avtorja pokazala v svoji študiji, TnT omogočajo prenos snovi na daljše razdalje (do 1 μm), če bakterije rastejo na trdni podlagi (Dubey in Ben-Yehuda, 2011).

TnT med bakterijami omogočajo tudi prenos genetskega materiala, kar predstavlja alternativo konjugaciji. Konjugacija je proces izmenjave dednega materiala, ki je pogojen s celičnim stikom. Inducirajo jo t. i. konjugativni plazmidi – krožne molekule DNA, ki vsebujejo posebno regijo z geni za konjugacijo, imenovano lokus *Tra*. Lokus *Tra* vsebuje gene za samopodvojevanje in za tvorbo konjugativnega pilusa. Konjugacija poteka med donorsko celico, ki vsebuje konjugativni plazmid, in akceptorsko celico, ki konjugativnega plazmida še nima. Pilus nastane na površini donorske celice in omogoča specifičen kontakt z akceptorsko celico. Ko sta celici povezani, se pilus počasi razgrajuje in celici se približata, dokler se ne združita. Kopija plazmida, ki se je znotraj donorske celice podvojil, se nato prenese v akceptorsko celico, čemur sledi ločitev celic. Skupaj s konjugativnimi plazmidi se lahko prenesejo tudi drugi genetski elementi, kot so deli kromosoma ali drugi, nekonjugativni plazmidi (Madigan in sod., 2010).

V nasprotju s konjugacijo za prenos plazmidov s pomočjo TnT niso potrebni posebni konjugativni elementi, izmenjava pa lahko poteka v obeh smereh (Dubey in Ben-Yehuda, 2011). Podoben pojav so opazili pri arhejah, kjer lahko obe celici služita kot donor ali akceptor plazmida, genetski material pa se med celicama prenaša po citoplazemskih mostičkih, ki dosežejo dolžino do 2 μm in premer do 100 nm (Rosenshine in sod., 1989). Čeprav je takšen prenos plazmidov manj učinkovit kot klasična konjugacija, verjetno v naravi predstavlja pogost način horizontalnega prenosa genov in medvrstne izmenjave plazmidov (Dubey in Ben-Yehuda, 2011).

Odkritje, da tudi bakterije komunicirajo s pomočjo TnT, je pomembno tudi z medicinskega stališča. Skozi TnT se med bakterijami prenašajo geni za odpornost proti antibiotikom, kar bi bila v naravi lahko zelo uspešna preživitvena strategija. Zaskrbljujoče je dejstvo, da lahko komenzalne bakterije skozi TnT dovajajo patogenim bakterijam hranila, patogene bakterije pa lahko komenzalnim prenesejo celo virulenčne dejavnike (Dubey in Ben-Yehuda, 2011). Zato je za lažje preprečevanje in zdravljenje okužb s patogenimi bakterijami, nujno boljše razumevanje sestave in funkcije bakterijskih TnT.

V naši nalogi smo dokazali, da pri evkariontskih celicah poteka transport skozi TnT s pomočjo motornih proteinov, ki energijo pridobivajo s hidrolizo ATP. Ugotovili smo tudi,

da transport snovi ne poteka samo od donorske proti akceptorski celici, ampak tudi v obratni smeri, in da lahko znotraj iste TnT obstajata in delujeta dva različna mehanizma aktivnega transporta.

Še vedno ostaja veliko vprašanj o načinu prenosa tovora po bakterijskih TnT. Ne vemo, če je transport aktiven in zahteva energijo, ali poteka pasivno, z difuzijo. Obstaja tudi možnost, da znotraj TnT obstajata oba mehanizma in je način prenosa odvisen od vrste tovora. Tudi smer prenosa je še vedno neraziskana, ne vemo, če sta donorska in akceptorska celica strogo določeni, ali prenos poteka v obe smeri (Dubey in Ben-Yehuda, 2011). Vse to so vprašanja, ki zahtevajo nadaljnje študije transporta po TnT pri bakterijah.

5.2.3 TnT bakterij kot mehanizem za prenos patogenov

TnT tako pri evkariontskih celicah, kot tudi pri bakterijah predstavljajo način za širjenje patogenov, predvsem prionov in virusov (Sherer in sod., 2007). Glede na razmerje med velikostjo bakteriofagov in premerom opaženih TnT, bi bakterijske TnT lahko omogočale prenos bakteriofagov in njihovih komponent med bakterijskimi celicami. Premer bakteriofaga lambda je namreč 55 nm (Hershey in Dove, 1983), premer bakterijskih nanocevk pa pogosto presega 100 nm (Dubey in Ben-Yehuda, 2011).

Zmožnost virusov, da se s pomočjo TnT širijo med bakterijami bi lahko izkoristili v razvoju fagne terapije, ki predstavlja alternativo antibiotičnemu zdravljenju okužb. Fagna terapija je način zdravljenja bakterijskih okužb s pomočjo bakteriofagov (Skurnik in Strauch, 2006). Njihov transport skozi TnT bi se lahko izkazal kot koristen predvsem v biofilmih, v katerih so bakterije manj občutljive na antibiotike. Odpornost proti antibiotikom je predvsem posledica strukture biofilma pa tudi izmenjave genov in s tem širjenja odpornosti znotraj bakterijske združbe (Costerton in sod., 1999).

Bakterijske TnT in njihova vloga zaenkrat ostajajo še precejšnja uganka. Da bi bolje razumeli njihovo sestavo, mehanizem nastanka in transporta snovi, bodo potrebne številne študije, ki bodo pripomogle k učinkovitejšemu preprečevanju in zdravljenju bakterijskih okužb.

6 SKLEPI

- Potrdili smo našo hipotezo, da TnT normalnih urotelijskih celic (NPU), rakavih urotelijskih celic (T24) in kokulture celic (NPU+T24) vsebujejo različne motorne proteine, katerih prisotnost sovпада s prisotnostjo pripadajočih citoskeletnih elementov.
- Znotraj iste TnT lahko sočasno obstaja in deluje več različnih mehanizmov aktivnega transporta, kar omogoča dvosmerno izmenjavo snovi med celicama.
- TnT rakavih urotelijskih celic (T24) vsebujejo več kinezina 5B kot TnT normalnih urotelijskih celic (NPU), kar potrjuje našo hipotezo, da je vsebnost motornih proteinov v TnT celic NPU in T24 različna. Iz tega lahko slepamo, da je aktivni transport, ki je vezan na mikrotubule in motorni protein kinezin 5B intenzivnejši v TnT celic T24. Povečana koncentracija kinezina 5B v bližini donorske celice v TnT celic T24 kaže na preferenčno smer transporta od donorske proti akceptorski celici.
- V naši nalogi smo uvedli tudi korelativno faznokontrastno-fluorescenčno mikroskopijo, s pomočjo katere smo proučevali iste TnT pred in po postopku fiksacije oziroma imunooznačevanja.
- TnT nastajajo med normalnimi urotelijskimi celicami (NPU) in rakavimi urotelijskimi celicami (T24). Tudi v teh TnT so prisotni motorni proteini kinezin 5B, dinein in miozin Va, iz česar sklepamo, da po njih poteka dvosmerna aktivna izmenjava snovi.
- Bakterijske TnT, ki se vzpostavljajo med bakterijami iste ali različnih vrst, imajo ključno vlogo pri nastanku in vzdrževanju večceličnih bakterijskih združb ter procesih, ki se dogajajo znotraj le-teh.
- TnT predstavljajo učinkovit način za izmenjavo različnih molekul med bakterijami, katerega transportnih mehanizmov zaenkrat ne poznamo.
- Poznavanje mehanizmov medcelične komunikacije s TnT pri bakterijah in evkariontskih celicah bi lahko omogočilo razvoj novih načinov zdravljenja rakavih in infekcijskih obolenj, katerih tarče bi bile TnT.

7 POVZETEK

Medcelična komunikacija je eden izmed ključnih pogojev za obstoj in normalno delovanje bioloških sistemov. Tunelske membranske nanocevke (TnT) predstavljajo nov način komunikacije med celicami, ki je bil odkrit šele nedavno. Gre za cevaste membranske strukture, ki povezujejo dve celici na določeni razdalji in za katere je v pogojih *in vitro* značilno, da se ne dotikajo podlage, temveč lebdi v mediju. Skoznje poteka transport različnih celičnih sestavin, organelov, veziklov, signalnih molekul in celo patogenov, kot so bakterije, virusi in prioni, zaradi česar predstavljajo nov mehanizem širjenja bolezni. TnT so prisotne tako v monokulturah normalnih, kot tudi rakavih celic, v kokulturi pa povezujejo tudi normalne in rakave celice. Nedavno so odkrili, da se pojavljajo tudi pri bakterijah, kjer igrajo pomembno vlogo pri vzpostavljanju večceličnih bakterijskih združb.

Namen magistrske naloge je bil ugotoviti, katere motorne proteine vsebujejo TnT normalnih (NPU) in rakavih urotelijskih celic (T24) ter kokulture obeh tipov celic (NPU+T24), ali je prisotnost teh motornih proteinov odvisna od prisotnosti pripadajočih citoskeletnih elementov in ali se TnT celic NPU in T24 razlikujejo glede na vsebnost in lokacijo motornih proteinov. Hkrati smo pripravili pregled literature o bakterijskih TnT in razpravljali o njihovi vlogi pri komunikaciji in razširjanju bakterij.

Izbrali smo 3 motorne proteine iz različnih družin motornih proteinov: kinezin 5B, dinein in miozin Va, za katere smo domnevali, da bi lahko bili udeleženi pri transportu snovi skozi TnT. Njihovo prisotnost znotraj celic smo skupaj s prisotnostjo citoskeletnih proteinov α -tubulina in F-aktina najprej preverili z metodo prenosa western. Zanimalo nas je, ali se vsebnost proteinov v celicah NPU in T24, ki smo jih gojili 2 dni, razlikuje od vsebnosti proteinov v celicah, ki smo jih gojili 7 dni. Ugotovili smo, da celice T24 po 2 dneh gojenja vsebujejo več kinezina 5B, po 7 dneh gojenja več miozina Va, kot celice NPU. Te razlike so najverjetneje posledica sprememb v izražanju genov, ki nastanejo pri rakavi transformaciji celic.

Natančnejšo lokacijo motornih in citoskeletnih proteinov znotraj TnT smo preverjali z metodo imunooznačevanja. Ta je pokazala, da TnT celic NPU, T24 in kokulture celic (NPU+T24) vsebujejo kinezin 5B, dinein in miozin Va, iz česar sklepamo, da znotraj TnT poteka aktivni transport. Prisotnost določenega motornega proteina je v vseh primerih sovpadala s prisotnostjo pripadajočega citoskeletnega elementa, kar je potrdilo našo hipotezo, da je prisotnost motornih proteinov v TnT povezana s prisotnostjo citoskeletnih elementov. Z imunooznačevanjem kombinacije dveh motornih proteinov smo dokazali, da lahko znotraj iste TnT obstaja večrazličnih mehanizmov aktivnega transporta. Iz tega sklepamo, da transport skozi TnT ne poteka samo v smeri od donorske proti akceptorski celici, ampak tudi v obratni smeri. To dejstvo ima velik pomen za medcelično komunikacijo, saj omogoča medsebojno izmenjavo snovi in informacij.

Preučili smo tudi, ali se vsebnost motornih proteinov v TnT celic NPU razlikuje od vsebnosti v TnT celic T24. Ugotovili smo, da TnT celic T24 vsebujejo več kinezina 5B kot TnT celic NPU. Iz tega sklepamo, da je aktivni transport, ki poteka po mikrotubulih v smeri proti koncu plus, intenzivnejši v TnT celic T24. Aktivni transport po TnT ima pri rakavih celicah pomembno vlogo pri rasti in širjenju tumorja, mikrotubuli pa predstavljajo eno izmed pomembnejših tarčnih molekul kemoterapevtikov, zaradi česar bi bile lahko naše ugotovitve pomembne tudi za razvoj novih kemoterapevtskih zdravil. TnT celic NPU in T24 so se razlikovale tudi v razporeditvi motornih proteinov znotraj TnT in verjetni smeri transporta. V monokulturi celic T24 so bili motorni proteini, predvsem kinezin 5B, znotraj TnT v višji koncentraciji prisotni v bližini donorske celice, kar kaže na preferenčno smer transporta od donorske proti akceptorski celici. V TnT celic NPU so bili motorni proteini enakomerno razporejeni vzdolž TnT, kar kaže na enakomeren transport snovi.

Za opazovanje in proučevanje lastnosti TnT v monokulturah celic NPU in T24 ter kokulturi celic (NPU+T24) smo uporabili korelativno faznokontrastno-fluorescenčno mikroskopijo.

V nalogi smo kot prvi dokazali, da so motorni proteini kinezin 5B, dinein in miozin Va prisotni tudi v TnT med normalno (NPU) in rakavo (T24) urotelijsko celico v kokulturi celic (NPU+T24). Iz tega sklepamo, da poteka aktivna izmenjava snovi tudi med celicami NPU in T24. Transport snovi med normalnimi in rakavimi celicami bi lahko predstavljal pomemben način za nastanek in širjenje tumorja, in s tem tudi pomembno tarčo za razvoj novih kemoterapevtskih zdravil.

Analiza literature o bakterijskih TnT je pokazala, da imajo TnT v naravi zelo pomembno vlogo pri vzpostavljanju večceličnih bakterijskih združb, saj omogočajo povezovanje celic iste, pa tudi evolucijsko oddaljenih vrst. S pomočjo TnT si izmenjujejo signalne molekule, mehanizme odpornosti proti antibiotikom in celo genetski material v obliki nekonjugativnih plazmidov. Takšna komunikacija jim omogoča sodelovanje, kar se kaže v izboljšanem fitnesu celotne populacije in številnih oblikah socialnega vedenja. TnT bakterij predstavljajo tudi pomemben mehanizem za prenos patogenov, kot so bakteriofagi in prioni. TnT ostajajo še precej neznano področje bakterijske komunikacije, ki ga je potrebno podrobno raziskati. Boljše razumevanje vloge in mehanizmov transporta po TnT, bi lahko namreč pomembno pripomoglo k razvoju novih načinov preprečevanja in zdravljenja bakterijskih okužb.

Naša magistrska naloga je nadgradila predhodne študije sestave in funkcije TnT urotelijskih celic. Ugotovili smo, da znotraj TnT obstajajo različni mehanizmi aktivnega transporta in da aktivni transport poteka tudi po TnT med rakavimi in normalnimi urotelijskimi celicami. Upamo, da bodo naši rezultati služili kot podlaga za nadaljnje raziskave, ki bodo pripomogle tudi k razvoju novih, inovativnih kemoterapevtskih zdravil in drugih načinov za zdravljenje rakavih obolenj.

8 VIRI

- Aoki S. K., Pamma R., Hernday A. D., Bickham J. E., Braaten B. A., Low D. A. 2005. Contact-dependent inhibition of growth in *Escherichia coli*. *Science*, 309, 5738: 1245-1248
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York, Garland Science: 1341 str.
- Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2003. *Essential cell biology*. 2nd ed. New York, Garland Science, Taylor & Francis Group: 864 str.
- Arkwright P. D., Luchetti F., Tour J., Roberts C., Ayub R., Morales A. P., Rodriguez J. J., Gilmore A., Canonico B., Papa S., Esposti M. D. 2010. Fas stimulation of T lymphocytes promotes rapid intercellular exchange of death signals via membrane nanotubes. *Cell Research*, 20, 1: 72-88
- Ausmees N., Kuhn J. R., Wagner C. J. 2003. The bacterial cytoskeleton: an intermediate filament-like function in cell shape. *Cell*, 115, 6: 705-713
- Austefjord M. W., Gerdes H. H., Wang X. 2014. Tunneling nanotubes: diversity in morphology and structure. *Communicative & Integrative Biology*, 7, 1: e27934, doi: 10.4161/cib.27934: 5 str.
- Baraga D. 2015. Ugotavljanje prisotnosti membranskih nanocevk med rakavimi in normalnimi urotelijskimi celicami. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 88 str.
- Bassler B. L., Losick R. 2006. Bacterially speaking. *Cell*, 125, 2: 237-246
- Benomar S., Ranava D., Cardenas M. L., Trably E., Rafrafi Y., Ducret A., Hamelin J., Lojou E., Steyer J. P., Giudici-Orticoni M. T. 2015. Nutritional stress induces exchange of cell material and energetic coupling between bacterial species. *Nature Communications*, 6, 6283, doi: 10.1038/ncomms7283: 10 str.
- Bi E. F., Lutkenhaus J. 1991. FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature*, 354, 6349: 161-164
- Bukoreshtliev N. V., Wang X., Hodneland E., Gurke S., Barroso J. F., Gerdes H. H. 2009. Selective block of tunneling nanotube (TNT) formation inhibits intercellular organelle transfer between PC12 cells. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 583, 9: 1481-1488
- Burgess S. A., Walker M. L., Sakakibara H., Knight P. J., Oiwa K. 2003. Dynein structure and power stroke. *Nature*, 421: 715-718

- Cameron L. A., Footer M. J., van Oudenaarden A., Theriot J. A. 1999. Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 9: 4908–4913
- Caneparo L., Pantazis P., Dempsey W., Fraser S. E. 2011. Intercellular bridges in vertebrate gastrulation. *Public Library of Science One*, 6, 5: e20230, doi:10.1371/journal.pone.0020230: 6 str.
- Carballido-Lopez R., Errington J. 2003. The bacterial cytoskeleton: *in vivo* dynamics of the actin-like protein Mbl of *Bacillus subtilis*. *Developmental Cell*, 4, 1: 19-28
- Caughey B., Baron G. S. 2006. Prions and their partners in crime. *Nature*, 443, 7113: 803-810
- Chauveau A., Aucher A., Eissmann P., Vivier E., Davis D. M. 2010. Membrane nanotubes facilitate long-distance interactions between natural killer cells and target cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 12: 5545-5550
- Cheney R. E., O'Shea M. K., Heuser J. E., Coelho M. V., Wolenski J. S., Espreafico E. M., Forscher P., Larson R. E., Mooseker M. S. 1993. Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell*, 75, 1: 13-23
- Costerton J. W. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, 5418: 1318-1322
- Daniel R. A., Errington J. 2003. Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell*, 113, 6: 767-776
- Davis D. M., Sowinski S. 2008. Membrane nanotubes: dynamic long-distance connections between animal cells. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 431, 6: 431-436
- Doi M., Wachi M., Ishino F., Tomioka S., Ito M., Sakagami Y., Suzuki A., Matsuhashi M. 1988. Determinations of the DNA sequence of the *mreB* gene and of the gene products of the *mre* region that function in formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells. *Journal of Bacteriology*, 170, 10: 4619-4624
- Dubey G. P., Ben-Yehuda S. 2011. Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell*, 144, 4: 590-600
- Elowitz M. B., Surette M. G., Wolf P. E., Stock J. B., Leibler S. 1999. Protein mobility in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 181, 1: 197-203
- Ferenz N. P., Gable A., Wadsworth P. 2010. Mitotic functions of kinesin-5. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 21, 3: 255-259
- Fevrier B., Raposo G. 2004. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Current Opinion in Cell Biology*, 16, 4: 415-421
- Fletcher D. A., Mullins R. D. 2010. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463, 7280: 485-492

- Gerdes H. H., Bukoreshtliev N. V., Barroso J. F. 2007. Tunneling nanotubes: a new route for the exchange of components between animal cells. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 581, 11: 2194-2201
- Gerdes H. H. 2009. Prions tunnel between cells. *Nature Cell Biology*, 11: 235-236
- Gerdes K., Howard M., Szardenings F. 2010. Pushing and pulling in prokaryotic DNA segregation. *Cell*, 141, 6: 927-942
- Gerdes H. H., Rustom A., Wang X. 2013. Tunneling nanotubes, an emerging intercellular communication route in development. *Mechanisms of Development*, 130, 6: 381-387
- Giddings T. H., Staehelin L. A. 1981. Observation of microplasmodesmata in both heterocyst-forming and non-heterocyst forming filamentous cyanobacteria by freeze-fracture electron microscopy. *Archives of Microbiology*, 129, 4: 295-298
- Gitai Z., Dye N. A., Reisenauer A., Wachi M., Saphiro L. 2005. MreB actin-mediated segregation of a specific region of a bacterial chromosome. *Cell*, 120, 3: 329-341
- Gittes F., Mickey B., Nettleton J., Howard J. 1993. Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *Journal of Cell Biology*, 120, 4: 923-934
- Goldstein L. B. S., Philp A. V. 1999. The road less traveled: emerging principles of kinesin motor utilization. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 15: 141-183
- Goodenough D. A., Paul D. L. 2009. Gap junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1, 1: a002576, doi: 10.1101/cshperspect.a002576: 19 str.
- Greenberg E. P. 2003. Bacterial communication: tiny teamwork. *Nature*, 424: 134
- Gurke S., Barroso J. F., Gerdes H. H. 2008a. The art of cellular communication: tunneling nanotubes bridge the divide. *Histochemistry and Cell Biology*, 129, 5: 539-550
- Gurke S., Barroso J. F., Hodneland E., Bukoreshtliev N. V., Schlicker O., Gerdes H. H. 2008b. Tunneling nanotube (TNT)-like structures facilitate a constitutive, actomyosin-dependent exchange of endocytic organelles between normal rat kidney cells. *Experimental Cell Research*, 314, 20: 3669-3683
- He K., Luo W., Zhang Y., Liu F., Liu D., Xu L., Qin L., Xiong C., Lu Z., Fang X., Zhang, Y. 2010. Intercellular transportation of quantum dots mediated by membrane nanotubes. *American Chemical Society Nano*, 4, 6: 3015-3022
- Hershey A. D., Dove W. 1983. *Lambda II*. New York, The Cold Spring Harbor Laboratory: 694 str.
- Hirokawa N., Noda Y., Okada Y. 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Current Opinion in Cell Biology*, 10, 1: 60-73

- Hirokawa N., Noda Y., Tanaka Y., Niwa S. 2009. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10, 10: 682-696
- Hodneland E., Lundervold A., Gurke S., Tai X. C., Rustom A., Gerdes H. H. 2006. Automated detection of tunneling nanotubes in 3D images. *Cytometry Part A*, 69, 9: 961-972
- Hoekstra D., Van der Laan J. W., Leij L., Witholt B. 1976. Release of outer membrane fragments from normally growing *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 455, 3: 889-899
- Howard J., Hudspeth A. J., Vale R. D. 1989. Movement of microtubules by single kinesin molecules. *Nature*, 342: 154-158
- Hua W., Chung J., Gelles J. 2002. Distinguishing inchworm and hand-over-hand processive kinesin movement by neck rotation measurements. *Science*, 295, 5556: 844-848
- Hurtig J., Chiu D. T., Önfelt B. 2010. Intercellular nanotubes: insights from imaging studies and beyond. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2, 3: 260-276
- Jones L. J., Carballido-Lopez R., Errington J. 2001. Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell*, 104, 6: 913-922
- Jordan A. M., Wilson L. 2004. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews: Cancer*, 4: 253-265
- Kabaso D., Lokar M., Kralj-Iglič V., Veranič P., Iglic A. 2011. Temperature and cholera toxin B are factors that influence formation of membrane nanotubes in RT4 and T24 urothelial cancer cell lines. *International Journal of Nanomedicine*, 6: 495-509
- Kimura S., Hase K., Ohno H. 2012. Tunneling nanotubes: emerging view of their molecular components and formation mechanisms. *Experimental Cell Research*, 318, 14: 1699-1706
- Kolter R., Greenberg E. P. 2006. Microbial sciences: the superficial life of microbes. *Nature*, 441: 300-302
- Koyanagi M., Brandes R. P., Haendeler J., Zeiher A. M., Dimmeler S. 2005. Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes? *Circulation Research*, 96, 10: 1039-1041
- Kreft M. E., Di Giandomenico D., Beznoussenko G. V., Resnik N., Mironov A. A., Jezernik K. 2010. Golgi apparatus fragmentation as a mechanism responsible for uniform delivery of uroplakins to the apical plasma membrane of uroepithelial cells. *Biology of the Cell*, 102, 11: 593-607

- Kristl J., Planjšek K. T., Kreft M. E., Janković B., Kocbek P. 2013. Intracellular trafficking of solid lipid nanoparticles and their distribution between cells through tunneling nanotubes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50, 1: 139-48
- Kumar N. M., Gilula N. B. 1996. The gap junction review communication channel. *Cell*, 84: 381–388
- Lou E., Fujisawa S., Morozov A., Barlas A., Romin Y., Dogan Y., Gholami S., Moreira A. L., Manova-Todorova K., Moore M. A. 2012a. Tunneling nanotubes provide a unique conduit for intercellular transfer of cellular contents in human malignant pleural mesothelioma. *Public Library of Science One*, 7, 3: e33093, doi: 10.1371/journal.pone.0033093: 11 str.
- Lou E., Fujisawa S., Barlas A., Romin Y., Manova-Todorova K., Moore M. A., Subramanian S. 2012b. Tunneling nanotubes: a new paradigm for studying intercellular communication and therapeutics in cancer. *Communicative & Integrative Biology*, 5, 4: 399-403
- Löwe J., Amos L. A. 1999. Tubulin-like protofilaments in Ca²⁺ induced FtsZ sheets. *European Molecular Biology Organization Journal*, 18: 2364-2371
- Lu C., Reedy M., Erickson H. P. 2000. Straight and curved conformations of FtsZ are regulated by GTP hydrolysis. *Journal of Bacteriology*, 182, 1: 164-170
- Lucas W. J., Lee J. Y. 2004. Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5, 9: 712-726
- Luchetti F., Canonico B., Arcangeletti M., Guescini M., Cesarini E., Stocchi V., Degli E. M., Papa S. 2012. Fas signalling promotes intercellular communication in T cells. *Public Library of Science One*, 7, 4: e35766, doi: 10.1371/journal.pone.0035766: 12. str.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Stahl D. A., Clark D. P. 2010. *Brock biology of microorganisms*. 13th ed. San Francisco, Benjamin Cummings: 1152 str.
- Martens S., McMahon H. T. 2008. Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 7: 543-556
- Mashburn-Warren L. M., Whiteley M. 2006. Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 61, 4: 839-846
- McKinney M. C., Stark D. A., Teddy J., Kulesa P. M. 2011. Neural crest cell communication involves an exchange of cytoplasmic material through cellular bridges revealed by photoconversion of KikGR. *Developmental Dynamics*, 240, 6: 1391-1401
- Mercer J. A., Seperack P. K., Strobel M. C., Copeland N. G., Jenkins N. A. 1991. Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus. *Nature*, 349: 709-713

- Mermall V. 1998. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science*, 279, 5350: 527-533
- Mignot T., Shaevitz J. W. 2008. Active and passive mechanisms of intracellular transport and localization in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 11, 6: 580-585
- Mineo M., Garfield S. H., Taverna S., Flugy A., De Leo G., Alessandro R., Kohn E. C. 2012. Exosomes released by K562 chronic myeloid leukemia cells promote angiogenesis in a Src-dependent fashion. *Angiogenesis*, 15, 1: 33-45
- Mitchison T., Kirchner M. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*, 312: 237-242
- Moons P., Michiels C. W., Aertsen A. 2009. Bacterial interactions in biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*, 35, 3: 157-168
- Nealson K. H., Hastings J. W. 1979. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiological Reviews*, 43: 496-518
- Ng W. L., Bassler B. L. 2009. Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual Review of Genetics*, 43: 197-222
- Nudleman E., Wall D., Kaise D. 2005. Cell-to-cell transfer of bacterial outer membrane lipoproteins. *Science*, 309, 5731: 125-127
- Önfelt B., Nedvetzki S., Yanagi K., Davis D. M. 2004. Cutting edge: membrane nanotubes connect immune cells. *The Journal of Immunology*, 173, 3: 1511-1513
- Önfelt B., Nedvetzki S., Benninger R. K., Purbhoo M. A., Sowinski S., Hume A. N., Seabra M. C., Neil M. A., French P. M., Davis D. M. 2006. Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. *Journal of Immunology*, 177, 12: 8476-8483
- Osteryoung K. W. 2001. Organelle fission in eukaryotes. *Current Opinion in Microbiology*, 4, 6: 639-646
- Pande S., Shitut S., Freund L., Westermann M., Bertels F., Colesie C., Bischofs I. B., Kost C. 2015. Metabolic cross-feeding via intercellular nanotubes among bacteria. *Nature Communications*, 6, 6238, doi: 10.1038/ncomms7238: 13 str.
- Parent C. A. 2004. Making all the right moves: chemotaxis in neutrophils and Dictyostelium. *Current Opinion in Cell Biology*, 16, 1: 4-13
- Pasquier J., Magal P., Boulangé-Lecomte C., Webb G., Le Fol F. 2011. Consequences of cell-to-cell P-glycoprotein transfer on acquired multidrug resistance in breast cancer: a cell population dynamics model. *Biology Direct*, 6, 5, doi: 10.1186/1745-6150-6-5: 18 str.

- Pasquier J., Guerrouahen B. S., Al Thawadi H., Ghiabi P., Maleki M., Abu-Kaoud N., Jacob A., Mirshahi M., Galas L., Rafii S. 2013. Preferential transfer of mitochondria from endothelial to cancer cells through tunneling nanotubes modulates chemoresistance. *Journal of Translational Medicine*, 11, 94, doi: 10.1186/1479-5876-11-94: 14 str.
- Pollard T. D., Borisy G. G. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112, 4: 453-465
- Rice S., Lin A. W., Safer D., Hart C. L., Naberk N., Carragher B. O., Cain S. M., Pechatnikova E., Wilson-Kubalek E. M., Whittaker M., Patel E., Cookek R., Taylor E. W., Milligan R. A., Vale R. D. 1999. A structural change in the kinesin motor protein that drives motility. *Nature*, 402, 6763: 778-784
- Rosenshine I., Tchelet R., Mevarech M. 1989. The mechanism of DNA transfer in the mating system of an archaebacterium. *Science*, 245, 4924: 1387-1389
- Rothfield L., Justice S., Garcia-Lara J. 1999. Bacterial cell division. *Annual Review of Genetics*, 33: 423-448
- Rustom A., Saffrich R., Markovic I., Walther P., Gerdes H. H. 2004. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science*, 303: 1007-1010
- Ryan R. P., Dow J. M. 2008. Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. *Microbiology*, 154, 7: 1845-1858
- Sisakhtnezhad S., Khosravi L. 2015. Emerging physiological and pathological implications of tunneling nanotubes formation between cells. *European Journal of Cell Biology*, 94, 10: 429-443
- Sherer N. M., Lehmann M. J., Jimenez-Soto L. F., Horensavitz C., Pypaert M., Mothes W. 2007. Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission. *Nature Cell Biology*, 9, 3: 310-315
- Skurnik M., Strauch E. 2006. Phage therapy: facts and fiction. *International Journal of Medical Microbiology*, 296, 1: 5-14
- Sowinski S., Jolly C., Berninghausen O., Purbhoo M. A., Chauveau A., Köhler K., Oddos S., Eissmann P., Brodsky F. M., Hopkins C., Önfelt, B., Sattentau Q., Davis D. M. 2008. Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nature Cell Biology*, 10, 2: 211-219
- Spees J. L., Olson S. D., Whitney M. J., Prockop D. J. 2006. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 5: 1283-1288
- Stoorvogel W., Kleijmeer M. J., Geuze H. J., Raposo G. 2002. The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic*, 3, 5: 321-330

- Straight P. D., Fischbach M. A., Walsh C. T., Rudner D. Z., Kolter R. 2007. A singular enzymatic megacomplex from *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 1: 305-310
- Tanaka Y., Kanai Y., Okada Y., Nonaka S., Takeda S., Harada A., Hirokawa N. 1998. Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. *Cell*, 93, 7: 1147-1158
- Tatum E. L., Lederberg J. 1947. Gene recombination in the bacterium *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 53, 6: 673-684
- Thayanithy V., Babatunde V., Dickson E. L., Wong P., Oh S., Ke X., Barlas A., Fujisawa S., Romin Y., Moreira A. L., Downey R. J., Steer C. J., Subramanian S., Manova-Todorova K., Moore M. A., Lou, E. 2014a. Tumor exosomes induce tunneling nanotubes in lipid raft-enriched regions of human mesothelioma cells. *Experimental Cell Research*, 323, 1: 178-188
- Thayanithy V., Dickson E. L., Steer C., Subramanian S., Lou E. 2014b. Tumor-stromal cross talk: direct cell-to-cell transfer of oncogenic microRNAs via tunneling nanotubes. *Translational Research*, 164, 5: 359-365
- Tilney L. G., Portnoy D. A. 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Cell Biology*, 109, 4: 1597-1608
- Tseng T. T., Tyler B. M., Setubal J. C. 2009. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the gene ontology. *BioMed Central Microbiology*, 9, 1, doi: 10.1186/1471-2180-9-S1-S2: 9 str.
- Vale R. D., Milligan R. A. 2000. The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science*, 288: 88-95
- Van den Ent F., Amos L. A., Löwe J. 2001. Procaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature*, 413: 39-44
- Veranič P., Lokar M., Schutz G. J., Weghuber J., Wieser S., Hagerstrand H., Kralj-Iglic V., Iglic A. 2008. Different types of cell-to-cell connections mediated by nanotubular structures. *Biophysical Journal*, 95, 9: 4416-4425
- Vidulescu C., Clejan S., O'Connor K. C. 2004. Vesicle traffic through intercellular bridges in DU 145 human prostate cancer cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 8, 3: 388-396
- Višnjar T., Kreft M. E. 2013. Air-liquid and liquid-liquid interfaces influence the formation of the urothelial permeability barrier *in vitro*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 49, 3: 196-204

- Wang X., Veruki M. L., Bukoreshtliev N. V., Hartveit E., Gerdes H. H. 2010. Animal cells connected by nanotubes can be electrically coupled through interposed gap-junction channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 40: 17194–17199
- Wang X, Bukoreshtliev N. V., Gerdes H. H. 2012a. Developing neurons form transient nanotubes facilitating electrical coupling and calcium signaling with distant astrocytes. *Public Library of Science One*, 7, 10: e47429, doi: 10.1371/journal.pone.0047429: 9 str.
- Wang Z. G., Liu S. L., Tian Z. Q., Zhang Z. L., Tang H. W., Pang D. W. 2012b. Myosin-driven intercellular transportation of wheat germ agglutinin mediated by membrane nanotubes between human lung cancer cells. *American Chemical Society Nano*, 6, 11: 10033-10041
- Watkins S. C., Salter R. D. 2005. Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubules. *Immunity*, 23, 3: 309-318
- Wiche G. 1998. Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *Journal of Cell Science*, 111: 2477-2486
- Yildiz A., Tomishige M., Vale R. D., Selvin P. R. 2004. Kinesin walks hand-over-hand. *Science*, 303, 5658: 676-678
- Yu Y., Skočaj M., Kreft M. E., Resnik N., Veranič P., Franceschi P., Sepčič K., Guella G. 2016. Comparative lipidomic study of urothelial cancer models: association with urothelial cancer cell invasiveness. *Molecular Biosystems*, 12, 11: 3266-3279

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici izr. prof. dr. Mateji Erdani Kreft in somentorici doc. dr. Daši Zupančič za izkazano zaupanje in za vse znanje, ki sta ga nesebično delili z mano. Hvala tudi predsednici komisije za zagovor magistrskega dela doc. dr. Tjaši Danevčič in recenzentki prof. dr. Kristini Sepčič.

Zahvaljujem se Sanji Čabraja, Nadi Pavlica Dubarić, Lindi Štrus in Sabini Železnik za pomoč pri delu in dobro družbo, ki je občutno skrajšala vse ure preživete v laboratoriju.

Iskrena hvala asist. dr. Nataši Resnik, Taji Železnik Ramuta in vsem zaposlenim na Inštitutu za biologijo celice Medicinske fakultete v Ljubljani za vse nasvete pri pripravi naloge. Hvala tudi ostalim študentom za družbo, še posebej Timu Prezlju za neprecenljivo moralno podporo.

Največjo zahvalo pa dolgujem svoji družini, fantu Niku in mojim puncam, ki mi stojijo ob strani in verjamejo vame ne glede na vse.

PRILOGE

Priloga A: Biološke ponovitve, neodvisni poskusi in tehnične ponovitve.

- prenos western

Uporabili smo različne pasaže celic trajne celične linije T24, izolirane iz mišično invazivnega karcinoma človeškega urotelija (ATTC®HTB-4TM), ki predstavljajo 1 biološko ponovitev. Pri celicah NPU, izoliranih iz normalnega prašičjega urotelija, smo uporabili 2 različni biološki ponovitvi oziroma celice izolirane iz sečnih mehurjev 2 različnih prašičev. Za vsak motorni protein in citoskeletni element: kinezin 5B, dinein, miozin Va, α -tubulin in F-aktin smo izvedli od 3 do 5 neodvisnih poskusov prenosa western. Na gele za elektroforezo smo nanašali od 3 do 10 μ g proteinov, pri čemer je bila količina nanesenih proteinov pri posameznem poskusu enaka za vse vzorce.

- imunooznačevanje motornih in citoskeletnih proteinov

Biološke ponovitve pri celicah NPU predstavljajo celice, izolirane iz sečnih mehurjev različnih prašičev. Z vsako biološko ponovitvijo smo izvedli od 1 do 3 neodvisne poskuse imunooznačevanja posamezne kombinacije motornih proteinov. Število tehničnih ponovitev predstavlja število slik TnT, pridobljenih v posameznem neodvisnem poskusu.

Imunooznačevanje kinezina 5B in α -tubulina

Imunooznačevanje kinezina 5B in α -tubulina v TnT celic T24 smo izvedli v 1 biološki ponovitvi, saj gre za celično linijo. Izvedli smo 3 neodvisne poskuse imunooznačevanja: november 2016 (celice T24 pasaža 44, 1 tehnična ponovitev), februar 2017 (celice T24 pasaža 21, 7 tehničnih ponovitev) in marec 2017 (celice T24 pasaža 23, 30 tehničnih ponovitev).

Imunooznačevanje kinezina 5B in α -tubulina v TnT celic NPU smo izvedli v 2 bioloških ponovitvah. S prvo biološko ponovitvijo smo izvedli 1 neodvisni poskus: marec 2017 (P₃U_{7b}, 10 tehničnih ponovitev). Z drugo biološko ponovitvijo smo izvedli 3 neodvisne poskuse: marec 2017 (celice P₄U_{14a}, 7 tehničnih ponovitev), marec 2017 (celice P₄U_{7a}, 4 tehnične ponovitve), april 2017 (celice P₄U_{9a}, 8 tehničnih ponovitev).

Imunooznačevanje kinezina 5B in α -tubulina v TnT kokulture celic (NPU+T24) smo izvedli v 2 bioloških ponovitvah. Z vsako biološko ponovitvijo smo izvedli po 1 neodvisni poskus: junij 2017 (celice P₃U_{9a}+T24 pasaža 8, 5 tehničnih ponovitev), julij 2017 (celice P₂U_{6d}+T24 pasaža 11, 3 tehnične ponovitve).

Imunooznačevanje dineina in α -tubulina

Imunooznačevanje dineina in α -tubulina v TnT celic T24 smo izvedli v 1 biološki ponovitvi. Izvedli smo 4 neodvisne poskuse imunooznačevanja: oktober 2016 (celice T24, pasaža 39, 1 tehnična ponovitev), november 2016 (celice T24 pasaža 42, 1 tehnična ponovitev), februar 2017 (celice T24 pasaža 21, 20 tehničnih ponovitev) in marec 2017 (celice T24 pasaža 23, 15 tehničnih ponovitev).

Imunooznačevanje dineina in α -tubulina v TnT celic NPU smo izvedli v 2 bioloških ponovitvah. S prvo biološko ponovitvijo smo izvedli 1 neodvisni poskus: marec 2017 (celice P₃U_{7b}, 11 tehničnih ponovitev). Z drugo biološko ponovitvijo smo izvedli 3 neodvisne poskuse: marec 2017 (celice P₄U_{14a}, 1 tehnična ponovitev), marec 2017 (celice P₄U_{7a}, 8 tehničnih ponovitev), april 2017 (celice P₄U_{9a}, 16 tehničnih ponovitev).

Imunooznačevanje dineina in α -tubulina v TnT kokulture celic (NPU+T24) smo izvedli v 2 bioloških ponovitvah. Z vsako biološko ponovitvijo smo izvedli po 1 neodvisni poskus: junij 2017 (celice P₃U_{9a}+T24 pasaža 8, 4 tehnične ponovitve), julij 2017 (celice P₂U_{6d}+T24 pasaža 11, 6 tehničnih ponovitev).

(Imuno)označevanje miozina Va in F-aktina

Imunooznačevanje miozina Va in F-aktina v TnT celic T24 smo izvedli v 1 biološki ponovitvi. Izvedli smo 2 neodvisna poskusa imunooznačevanja: januar 2017 (celice T24, pasaža 14, 7 tehničnih ponovitev), februar 2017 (celice T24 pasaža 21, 41 tehničnih ponovitev).

Imunooznačevanje miozina Va in F-aktina v TnT celic NPU smo izvedli v 3 bioloških ponovitvah. Z vsako biološko ponovitvijo smo izvedli po en neodvisni poskus: april 2017 (celice P₄U_{9a}, 18 tehničnih ponovitev), maj 2017 (celice P₂U_{6c}, 3 tehnične ponovitve), julij 2017 (celice P₃U₄, 3 tehnične ponovitve).

Imunooznačevanje miozina Va in F-aktina v TnT kokulture celic (NPU+T24) smo izvedli v 2 bioloških ponovitvah. Z vsako biološko ponovitvijo smo izvedli po 1 neodvisni poskus: junij 2017 (celice P₃U_{9a}+T24 pasaža 8, 9 tehničnih ponovitev), julij 2017 (celice P₂U_{6d}+T24 pasaža 11, 5 tehničnih ponovitev).

Imunooznačevanje kinezina 5B in miozina Va

Imunooznačevanje kinezina 5B in miozina Va v TnT celic T24 smo izvedli v 1 biološki ponovitvi. Izvedli smo 3 neodvisne poskuse imunooznačevanja: januar 2017 (celice T24,

pasaža 15, 2 tehnični ponovitvi), februar 2017 (celice T24 pasaža 16, 14 tehničnih ponovitev), februar 2017 (celice T24 pasaža 21, 10 tehničnih ponovitev).

Imunooznačevanje kinezina 5B in miozina Va v TnT celic NPU smo izvedli v 1 biološki ponovitvi. Izvedli smo 3 neodvisne poskuse: marec 2017 (celice P₄U_{14a}, 13 tehničnih ponovitev), marec 2017 (celice P₄U_{7a}, 4 tehnične ponovitve), april 2017 (celice P₄U_{9a}, 4 tehnične ponovitve).

Imunooznačevanje kinezina 5B in miozina Va v TnT kokulture celic (NPU+T24) smo izvedli v 2 bioloških ponovitvah. Z vsako biološko ponovitvijo smo izvedli po 1 neodvisni poskus: junij 2017 (celice P₄U_{5bc}+T24 pasaža 6, 4 tehnične ponovitve), junij 2017 (celice P₃U_{9a}+T24 pasaža 8, 3 tehnične ponovitve).

Imunooznačevanje dineina in miozina Va

Imunooznačevanje dineina in miozina Va v TnT celic T24 smo izvedli v 1 biološki ponovitvi. Izvedli smo 3 neodvisne poskuse imunooznačevanja: januar 2017 (celice T24, pasaža 15, 5 tehničnih ponovitev), februar 2017 (celice T24 pasaža 16, 12 tehničnih ponovitev), februar 2017 (celice T24 pasaža 21, 6 tehničnih ponovitev).

Imunooznačevanje dineina in miozina Va v TnT celic NPU smo izvedli v 1 biološki ponovitvi. Izvedli smo 3 neodvisne poskuse: marec 2017 (celice P₄U_{14a}, 7 tehničnih ponovitev), marec 2017 (celice P₄U_{7a}, 6 tehničnih ponovitev), april 2017 (celice P₄U_{9a}, 1 tehnična ponovitev).

Imunooznačevanje dineina in miozina Va v TnT kokulture celic (NPU+T24) smo izvedli v 3 bioloških ponovitvah. Z vsako biološko ponovitvijo smo izvedli po 1 neodvisni poskus: junij 2017 (celice P₄U_{5bc}+T24 pasaža 6, 5 tehničnih ponovitev), junij 2017 (celice P₃U_{9a}+T24 pasaža 8, 4 tehnične ponovitve), julij 2017 (celice P₂U_{6d}+T24 pasaža 11, 2 tehnični ponovitvi).

Priloga B: Sestava pufra RIPA (pH=8) z dodanim PMSF.

Sestavine pufra	Koncentracija sestavin v pufu
NaCl	150 mM
Tris	50 mM
EDTA	1m M
Triton X-100	1 %
SDS	0,1 %
Natrijev deoksiholat	0,5 %
Destilirana H ₂ O	Dopolnimo do 100 ml
PMSF	1 %

Priloga C: Sestava nanašalnega pufra dodanega lizatoma celic pred elektroforezo.

Sestavine pufra	Količina sestavin v pufu
Glicerol	2 ml
Bromfenol modro	0,008 g
SDS	2 g
Destilirana H ₂ O	Do 10 ml

Priloga D: Sestava pufra za elektroforezo (Running buffer).

Sestavine pufra	Količina sestavin v pufu
Tris	9 g
Glicin	43,2 g
SDS	3 g
Destilirana H ₂ O	do 600 ml

160 ml pufra za elektroforezo (Running buffer) dodamo 640 ml destilirane H₂O

Priloga E: Sestava pufra za prenos proteinov na nitrocelulozno membrano (Transfer buffer).

Sestavine pufra	Količina sestavin v pufu
Tris	3,03 g
Glicin	14,4 g
Metanol	200 ml
Destilirana H ₂ O	do 1000 ml

Pufer pred uporabo ohladimo na temperaturo -30 °C.

Priloga F: Sestava pufra PEM/TX (pH=6,8).

Sestavine pufra	Koncentracija sestavin v pufu
PIPES	100 mM
EGTA	5 mM
MgCl ₂	2 mM
Destilirana H ₂ O	do 100 ml
Triton X-100	0,2 %

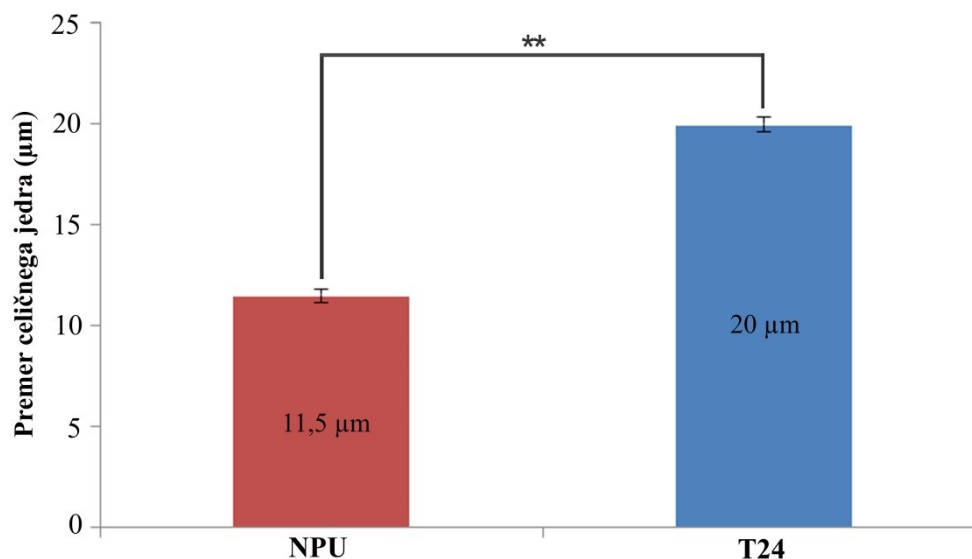
3,7 % formalin v pufu PEM/TX (w/v) pripravimo tako, da v 9 delov pufra PEM/TX dodamo 1 del 3,7 % formaldehida. Raztopino uporabljamo za fiksacijo celic v postopku imunooznačevanja.

Priloga G: Premer celičnega jedra pri celicah NPU in T24.

Opisne statistike: M: povprečje, N: velikost vzorca, SD: standardni odklon, SE: standardna napaka, $**p < 0,001$

	NPU	T24
M	11,5 μm	20,0 μm
N	50,0	50,0
SD	2,2	2,6
SE	0,3	0,4

- Povprečni premer celičnega jedra pri celicah NPU in T24 ($**p < 0,001$)



Priloga H: Dolžina TnT pri celicah NPU, T24 in kokulturi celic (NPU+T24).

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

	NPU	T24	NPU+T24
M	99,9 µm	32,3 µm	82,9 µm
N	136	147	36
SD	60,6	23,4	38,6
SE	5,20	1,93	6,43

Priloga I: Število TnT na cm² v monokulturah celic NPU in T24 ter v kokulturi celic (NPU+T24).

Opisne statistike: M: povprečje, N: velikost vzorca, SD: standardni odklon, SE: standardna napaka, ENOTA: število TnT/ cm²

	NPU	T24	(NPU+T24)
M	1,74	27,74	1,29
N	8,00	8,00	11,00
SD	1,44	14,06	0,57
SE	0,51	4,97	0,17

(Podatki za celice NPU (nasaditvena gostota 1×10^5) in T24 (nasaditvena gostota 5×10^3) so povzeti po Baraga, 2015).

Priloga J: Kvantifikacija motornih in citoskeletnih proteinov v TnT v TnT celic NPU, T24 in v TnT kokulture celic (NPU+T24).

Na podlagi analize mikrografij smo določili, v kolikšnem odstotku TnT so prisotni motorni proteini v kombinaciji s pripadajočimi citoskeletnimi proteini, in v kolikšnem odstotku so v TnT prisotni samo citoskeletni proteini. Pri tem smo za 100 % uporabili število vseh opaženih TnT.

- Kvantifikacija motornih in citoskeletnih proteinov v TnT celic NPU.

				Povprečna vrednost
α-tubulin + kinezin 5B	89,7 %	α-tubulin	10,3 %	17,7 %
α-tubulin + dinein	75,0 %	α-tubulin	25,0 %	
F-aktin + miozin Va	89,3 %	F-aktin	10,7 %	0 %
miozin Va + kinezin 5B	100 %	miozin Va	0 %	
miozin Va + dinein	100 %	miozin Va	0 %	
α-tubulin	100 %	/	/	
F-aktin	100 %	/	/	

- Kvantifikacija motornih in citoskeletnih proteinov v TnT celic T24.

				Povprečna vrednost
α-tubulin + kinezin 5B	55,3 %	α-tubulin	44,7 %	33,5 %
α-tubulin + dinein	77,8 %	α-tubulin	22,2 %	
F-aktin + miozin Va	63,8 %	F-aktin	36,2 %	8,6 %
miozin Va + kinezin 5B	95,8 %	miozin Va	4,2 %	
miozin Va + dinein	87,0 %	miozin Va	13,0 %	
α-tubulin	100 %	/	/	
F-aktin	100 %	/	/	

- Kvantifikacija motornih in citoskeletnih proteinov v TnT kokulture (NPU+T24).

				Povprečna vrednost
α-tubulin + kinezin 5B	57,1 %	α-tubulin	42,9 %	27,0 %
α-tubulin + dinein	88,9 %	α-tubulin	11,1 %	
F-aktin + miozin Va	70,0 %	F-aktin	30,0 %	
miozin Va + kinezin 5B	100 %	miozin Va	0 %	0 %
miozin Va + dinein	100 %	miozin Va	0 %	
α-tubulin	100 %	/	/	
F-aktin	100 %	/	/	

Priloga K: Primerjava vsebnosti motornih proteinov v TnT celic NPU, T24 in v TnT kokulture celic (NPU+T24).

Opisne statistike: M: povprečje, N: velikost vzorca, SD: standardni odklon, SE: standardna napaka, ENOTA: število točkastih signalov/ μm TnT

	kinezin 5B			dinein			miozin Va		
	NPU	T24	NPU+T24	NPU	T24	NPU+T24	NPU	T24	NPU+T24
M	0,79	1,59	1,31	1,04	1,31	1,07	0,65	0,62	1,09
N	17	13	12	19	10	16	16	15	10
SD	0,34	0,50	0,80	0,63	0,42	0,57	0,52	0,35	0,40
SE	0,08	0,14	0,23	0,14	0,13	0,14	0,13	0,09	0,13

Priloga L: Razporeditev motornih proteinov v TnT celic NPU, T24 in v TnT kokulture celic (NPU+T24).

Opisne statistike: M: povprečje, N: velikost vzorca, SD: standardni odklon, SE: standardna napaka, D: bližina donorske celice, A: bližina akceptorske celice, ENOTA: število točkastih signalov/ μm TnT

NPU							T24					
	kinezin 5B		dinein		miozin Va		kinezin 5B		dinein		miozin Va	
	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A
M	0,78	0,80	1,07	1,02	0,67	0,64	1,84	1,34	1,40	1,21	0,71	0,54
N	17	17	19	19	16	16	13	13	10	10	15	15
SD	0,38	0,38	0,65	0,72	0,55	0,54	0,71	0,49	0,69	0,38	0,46	0,33
SE	0,09	0,09	0,15	0,16	0,14	0,13	0,20	0,14	0,22	0,12	0,12	0,09

NPU+T24						
	kinezin 5B		dinein		miozin Va	
	D	A	D	A	D	A
M	1,33	1,35	1,06	1,08	1,04	0,90
N	12	12	16	16	10	10
SD	0,94	0,78	0,52	0,65	0,38	0,51
SE	0,27	0,22	0,13	0,16	0,12	0,16